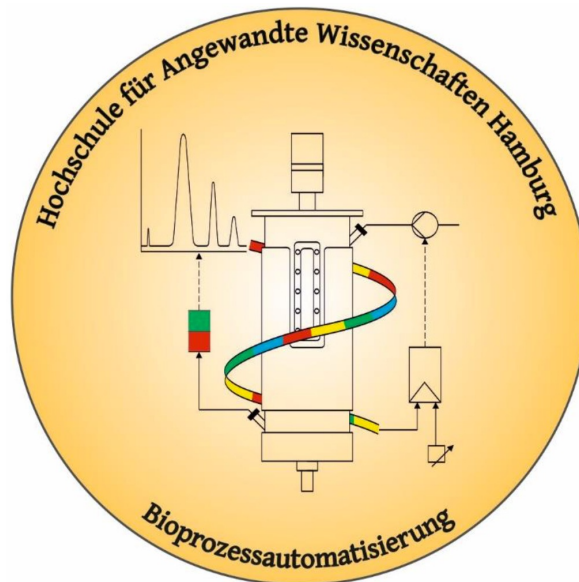


# Masterthesis

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

## Etablierung und Analyse kontinuierlicher Kultivierungen von *Bacillus licheniformis* mit Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle



Labor für Bioprozessautomatisierung

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science (M.Sc.)**

**Laura Isabel Amler**

Hamburg, den 14. Dezember 2021

1. Gutachter
2. Gutachter

Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt und motiviert haben.

Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen möchte ich herzlich für die Möglichkeit einer Mitarbeit im Labor für Bioprozessautomatisierung sowie die Bereitstellung und die gute Betreuung der Masterarbeit danken.

Des Weiteren geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser für die Übernahme des Zweitgutachters sowie für konstruktive Anmerkungen und Rückmeldungen.

Frau M.Sc. Stefanie Kaul möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die umfangreiche Einarbeitung in den Laboren, die Zusammenarbeit und die stets kompetente Beantwortung meiner Fragen danken.

Hans-Peter Bertelsen, Ulrich Scheffler sowie dem gesamten Team des Labors für Bioprozessautomatisierung danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung und die großartige Zusammenarbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines gesamten Studiums durchgängig unterstützt und motiviert haben.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>Nomenklatur</b> .....	<b>V</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>IV</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>V</b>	<b>Anhangsverzeichnis Abbildungen</b> .....	<b>XIII</b>
<b>VI</b>	<b>Anhangsverzeichnis Tabellen</b> .....	<b>XIV</b>
	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XV</b>
	<b>Abstract</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Problemstellung und Zielsetzung .....	3
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>4</b>
2.1	Die Gattung <i>Bacillus</i> und der Modellorganismus <i>Bacillus licheniformis</i> .....	4
2.2	Industrieller Einsatz von <i>Bacillus licheniformis</i> .....	6
2.3	Herstellung von Hefeextrakten .....	7
2.4	Fermentationsverfahren .....	8
2.4.1	Bioprozessmodelle und Monod-Kinetik .....	8
2.4.2	Satzbetrieb (Batch) .....	13
2.4.3	Kontinuierlicher Betrieb .....	15
2.4.4	Zulaufverfahren (Fed-Batch) .....	25
<b>3</b>	<b>Das Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus</b> .....	<b>26</b>
3.1	Das Prozessleitsystem MFCS/win.....	27
3.2	Messtechnik.....	29
3.2.1	Kalibrierung der pH- und pO <sub>2</sub> -Sonde .....	29
3.2.2	<i>Inline</i> -Messung der optischen Zelldichte .....	30
3.2.3	Abgasanalytik und Gasphasenbilanzierung .....	31
<b>4</b>	<b>Material</b> .....	<b>36</b>
4.1	Organismus .....	36
4.2	Chemikalien .....	36
4.3	Geräte.....	37
4.4	Hefeextrakte .....	38
4.5	Zusammensetzung 10x Phosphatpuffer .....	39
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>40</b>
5.1	Working-Zellbank.....	41

---

5.2	Vorversuche .....	42
5.3	Kalibrierung der Zufütterpumpe.....	42
5.4	Fermentation an der Multifermentieranlage .....	43
5.4.1	Aufbau der Qplus-Anlage für den kontinuierlichen Betrieb .....	43
5.4.2	Vorbereitung des Inokulums .....	46
5.4.3	Vorbereitung des Bioreaktors.....	46
5.4.4	Inokulation.....	48
5.4.5	Fermentationsrezept MFCS/win.....	48
5.4.6	Batch-Phase.....	50
5.4.7	Chemostat-Phase .....	50
5.5	Versuchsreihen.....	51
5.5.1	Versuchsreihe 1 .....	51
5.5.2	Versuchsreihe 2 .....	52
5.5.3	Versuchsreihe 3 .....	53
5.6	Offline-Analytik .....	55
5.6.1	Probennahme.....	55
5.6.2	Offline-Bestimmung der Zellkonzentration .....	56
5.6.3	Analyse der Kohlenhydrate und organischen Säuren per HPLC .....	58
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
6.1	Überprüfung der Working-Zellbank .....	61
6.2	Vorversuche .....	62
6.3	Kalibrierung der Zufütterpumpen.....	66
6.4	Fermentationsverläufe.....	67
6.4.1	Fermentation K2L.....	68
6.4.2	Fermentation K4L.....	70
6.4.3	Fermentation K1LM.....	74
6.4.4	Fermentation K2LM.....	77
6.5	Auswertung der kontinuierlichen Prozesse .....	80
6.5.1	Istwerte der Flussrate, des Reaktionsvolumens und der Verdünnungsrate.....	80
6.5.2	Bestimmung der Wachstumsrate .....	86
6.5.3	Substratanalyse .....	91
6.5.4	Bestimmung des Ausbeutekoeffizienten $y_{x/s}$ .....	92
6.5.5	Korrekturmittelverbrauch .....	92
6.5.6	Abgasanalytik und -bilanzierung .....	95

6.5.7	Bestimmung der Sättigungskonstante $K_s$ .....	95
6.5.8	Bestimmung einer optimalen Verdünnungsrate und einer maximalen Produktivität .....	96
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>99</b>
7.1	Working-Zellbank.....	99
7.2	Vorversuche .....	100
7.3	Kalibrierung der Zufütterpumpen.....	104
7.4	Analyse der Fermentationsverläufe.....	104
7.4.1	Fermentation K2L.....	104
7.4.2	Fermentation K4L.....	106
7.4.3	Fermentation K1LM.....	109
7.4.4	Fermentation K2LM.....	111
7.5	Beurteilung der Etablierung der kontinuierlichen Prozesse.....	113
7.5.1	Auswirkungen der Flussrate des Zulaufreservoirs auf den Prozess	113
7.5.2	Vergleich der Wachstums- und Verdünnungsrate .....	114
7.5.3	Substratanalyse per HPLC.....	116
7.5.4	Auswirkungen der Zell- und Substratkonzentration auf den Ausbeutekoeffizienten $y_{x/s}$ .....	117
7.5.5	Die Sättigungskonstante $K_s$ .....	117
7.5.6	Das X-D-Diagramm .....	119
7.6	Fehlerbetrachtung .....	120
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>124</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>i</b>
A.1	Anhang zu 3 Das Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus.....	i
A.2	Anhang zu 4.4 Hefeextrakte .....	ii
A.3	Anhang zu 5.4 Fermentation an der Multifermentieranlage .....	viii
A.4	Anhang zu 6.4 Fermentationsverläufe.....	xi
A.4.1	Fermentationsverlauf zum Prozess K2L .....	xi
A.4.2	Fermentationsverlauf zum Prozess K4L .....	xiii
A.4.3	Fermentationsverlauf zum Prozess K1LM .....	xvi
A.4.4	Fermentationsverlauf zum Prozess K2LM .....	xvii
A.5	Anhang zu 6.5 Auswertung der kontinuierlichen Prozesse .....	xviii
A.5.1	Anhang zu 6.5.1 Istwerte der Flussrate, des Reaktionsvolumens und der Verdünnungsrate .....	xviii

A.5.2	Anhang zu 6.5.2 Bestimmung der Wachstumsrate .....	xix
A.5.3	Anhang zu 6.5.3 Substratanalyse .....	xx

## I Nomenklatur

$\tilde{c}_{SL}$	:= Gleichgewichtssubstratkonzentration in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$\tilde{c}_{XL}$	:= Gleichgewichtsbiomassekonzentration in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$c_L$	:= Konzentration der Komponente l in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$c_{PL}$	:= Produktkonzentration in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$c_{S2L}$	:= Konzentration des Substrats 2 in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$c_{S2R2}$	:= Konzentration im Reservoir des Substrats 2	$[gL^{-1}]$
$c_{SL D_i}$	:= Substratkonzentration in der Flüssigphase in der Verdünnungsrate $D_i$	$[gL^{-1}]$
$c_{SL}$	:= Substratkonzentration in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$c_{SR}$	:= Substratkonzentration im Reservoir	$[gL^{-1}]$
$c_{Ti}$	:= Konzentration des Titrationsmittels $T_i$	$[gL^{-1}]$
$c_{XL BTM}$	:= Zellkonzentration aus der Biotrockenmassebestimmung	$[gL^{-1}]$
$c_{XL opt}$	:= optimale Zellkonzentration	$[gL^{-1}]$
$c_{XL turb}$	:= Zellkonzentration aus der Trübungsmessung	$[gL^{-1}]$
$c_{XL}$	:= Zellmassenkonzentration in der Flüssigphase	$[gL^{-1}]$
$D, D_i$	:= Verdünnungsrate, Verdünnungsrate $i$	$[h^{-1}]$
$D_{crit}$	:= kritische Verdünnungsrate	$[h^{-1}]$
$D_{opt}$	:= optimale Verdünnungsrate	$[h^{-1}]$
$F$	:= Volumenstrom	$[Lh^{-1}]$
$F_H$	:= Ernterate	$[Lh^{-1}]$
$F_{nA R}$	:= Luftbegasungsrate unter Normalbedingungen	$[Lh^{-1}]$
$F_{nG}$	:= Gesamtbegasungsrate unter Normalbedingungen	$[Lh^{-1}]$
$F_{nN2}$	:= Stickstoffbegasungsrate unter Normalbedingungen	$[Lh^{-1}]$
$F_R$	:= Zufütterrata	$[Lh^{-1}]$
$F_{R2}$	:= Substratzufütterrata aus dem Reservoir 2	$[Lh^{-1}]$
$ITR$	:= Transferrate der Komponente l	$[gL^{-1}h^{-1}]$
$l_w$	:= Sollwert eines Parameters / einer Variable / einer Prozessgröße l	$[-]$
$k_1, k_2$	:= Korrelationsparameter	$[-]$

$K_S$	:= Sättigungs- oder Affinitätskonstante des Substrats	$[\text{gL}^{-1}]$
$\dot{m}_{\text{CG ein}}$	:= Kohlenstoffdioxideingangsmassenstrom in die Gasphase	$[\text{gh}^{-1}]$
$\dot{m}_{\text{G aus}}$	:= Ausgangsmassenstrom der Komponente I aus der Gasphase	$[\text{gh}^{-1}]$
$\dot{m}_{\text{G ein}}$	:= Eingangsmassenstrom der Komponente I in die Gasphase	$[\text{gh}^{-1}]$
$m_L$	:= Masse einer Komponente I in der Flüssigphase	$[\text{g}]$
$M$	:= Molmasse der Komponente I	$[\text{gmol}^{-1}]$
$m_{\text{MRG}}$	:= Masse eines Mikroreaktionsgefäßes	$[\text{g}]$
$m_{\text{MRG tot}}$	:= Gesamtmasse eines Mikroreaktionsgefäßes mit Zellpellet	$[\text{g}]$
$\dot{m}_{\text{OG ein}}$	:= Sauerstoffeingangsmassenstrom in die Gasphase	$[\text{gh}^{-1}]$
$m_R$	:= Masse des Zulaufreservoirs	$[\text{g}]$
$m_{\text{SL}}$	:= Substratmasse in der Flüssigphase	$[\text{g}]$
$m_{i+1}$	:= Masse des Titrationsmittels $T_i$ zum Zeitpunkt $i+1$	$[\text{g}]$
$m_{\text{XL}}$	:= Zellmasse in der Flüssigphase	$[\text{g}]$
$N_{\text{St}}$	:= Rührerdrehzahl	$[\text{min}^{-1}]$
$\text{OD}_{600}$	:= optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm	$[-]$
$p_{\text{O}_2}$	:= relativer Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit	$[\%]$
$Q_{\text{CO}_2}$	:= volumetrische Kohlenstoffdioxidaustragsrate	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$Q_{\text{max}}$	:= maximale volumetrische Eintragsrate der Komponente I	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$Q_{\text{O}_2}$	:= volumetrische Sauerstoffeintragsrate	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$Q_i$	:= volumetrische Verbrauchsrate des Korrekturmittels $T_i$	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$Q_{\text{YE}}$	:= volumetrische Hefeextraktzulauftrate	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$r_L$	:= Reaktionsrate der Komponente I in der Flüssigphase	$[\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$\text{RQ}$	:= Respirationsquotient	$[-]$
$\text{S1}$	:= Substrat 1 (Glukose)	$[-]$
$\text{S2}$	:= Substrat 2 (Hefeextrakt)	$[-]$
$\text{S}_{\text{turb}}$	:= optisches Signal der Trübungsmessung	$[\text{AU}]$
$t$	:= (Prozess)Zeit	$[\text{h}]$
$t_d$	:= Verdopplungszeit	$[\text{h}]$



---

$t_g$	:= Generationszeit	[h]
$T_i$	:= Titrationsmittel i	[-]
$V_L$	:= Flüssigkeitsvolumen im Reaktor / Reaktionsvolumen	[L]
$V_{L, D_i}$	:= Reaktionsvolumen in der jeweiligen Verdünnungsrate $D_i$	[L]
$V_{nM}$	:= Molvolumen eines Gases unter Normalbedingungen	[Lmol <sup>-1</sup> ]
$V_{Probe}$	:= Probenvolumen	[L]
$x_{CG}$	:= Abgasmolenbruch Kohlenstoffdioxid	[-]
$x_{CO_2}$	:= Kohlenstoffdioxidmengenanteil im Abgasstrom	[%]
$x_{CO_2, ein}$	:= Kohlenstoffdioxidmengenanteil im Eingangsstrom	[%]
$XD$	:= Raum-Zeit-Ausbeute / Produktivität	[gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$XD_{max}$	:= maximale Raum-Zeit-Ausbeute / Produktivität	[gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$x_{O_2}$	:= Sauerstoffmengenanteil im Abgasstrom	[%]
$x_{O_2, ein}$	:= Sauerstoffmengenanteil im Eingangsstrom	[%]
$x_{OG}$	:= Abgasmolenbruch Sauerstoff	[-]
$y_{X/S}$	:= Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat	[-]
$\mu$	:= zellspezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu_{max}$	:= maximale zellspezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
$\tau$	:= hydraulische Verweilzeit	[h]
$\rho_{T_i}$	:= Dichte des Korrekturmittels $T_i$	[gL <sup>-1</sup> ]
$\vartheta_L$	:= Temperatur in der Flüssigphase	[ C]
$\Delta_{\mu D}$	:= Differenz von Wachstums- und Verdünnungsrate	[h <sup>-1</sup> ]

**II Abkürzungsverzeichnis**

<i>B. licheniformis</i>	<u>B</u> acillus licheniformis
BTM, CDW	<u>B</u> iotrocken <u>m</u> asse (engl. <u>c</u> ell <u>d</u> ry <u>w</u> eight)
DCU	digitale Kontrolleinheit (engl. <u>d</u> igital <u>c</u> ontrol <u>u</u> nit)
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
GRAS	allgemein als sicher anerkannt (engl. <u>g</u> enerally <u>r</u> ecognized <u>a</u> s <u>s</u> afe)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
LB-Medium	<u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth Medium
MFCS/win	<u>M</u> ulti <u>F</u> ermentor <u>C</u> ontrol <u>S</u> ystem for <u>W</u> indows
MRG	<u>M</u> ikro <u>r</u> eaktionsgefäß
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
VE-Wasser	<u>v</u> oll <u>e</u> ntmineralisiertes Wasser
WCB	Working-Zellbank (engl. <u>w</u> orking <u>c</u> ell <u>b</u> ank)

### III      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme einer <i>B. licheniformis</i> Kultur unter dem Phasenkontrastmikroskop. ....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Hefeextrakten. ....	7
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit $\mu$ in Abhängigkeit der limitierenden Substratkonzentration $c_{SL}$ nach dem Monod-Modell. ....	11
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms zur Bestimmung der Sättigungskonstante $K_S$ . ....	12
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung eines X-D-Diagramms. ....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anlagenperipherie für den kontinuierlichen Prozess. ....	26
Abbildung 7: Bedienungsoberfläche der MFCS/win <i>shell</i> . ....	28
Abbildung 8: Prinzip zur Bestimmung des Sauerstoffmolenbruchs. ....	32
Abbildung 9: Prinzip zur Bestimmung des Kohlenstoffdioxidmolenbruchs. ....	33
Abbildung 10: Übersicht des generellen Vorgehens für die Fermentationen in Form eines Flussdiagramms. ....	40
Abbildung 11: Anlagenaufbau der Qplus-Anlage für den kontinuierlichen Betrieb. ....	44
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Ablaufs des automatisierten Kultivierungsprozesses. ....	49
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Probennahme. ....	55
Abbildung 14: Kolonien von <i>B. licheniformis</i> auf Agarplatten. ....	61
Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen der <i>B. licheniformis</i> DSM 13-Working-Zellbank bei 400-facher Vergrößerung. ....	62
Abbildung 16: Wachstumsgraphen aller vier Schüttelkolben-Ansätze mit $10 \text{ gL}^{-1}$ Hefeextrakt und einer Glukosekonzentration von $20 \text{ gL}^{-1}$ . ....	65
Abbildung 17: Kalibriergeraden der Zufütterpumpe ISM936. ....	66
Abbildung 18: Kalibriergerade der Zufütterpumpe ISM936. ....	67
Abbildung 19: Fermentation K2L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch- und Chemostat-Phase $D_1$ . ....	69

---

Abbildung 20: Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D <sub>6</sub> und D <sub>7</sub> (unten). .....	71
Abbildung 21: Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D <sub>8</sub> und D <sub>9</sub> .....	72
Abbildung 22: Abgasanalyse der Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D <sub>4</sub> und D <sub>5</sub> (unten). .....	73
Abbildung 23: Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D <sub>4</sub> und D <sub>5</sub> (unten). .....	75
Abbildung 24: Abgasanalyse der Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D <sub>4</sub> und D <sub>5</sub> (unten). .....	76
Abbildung 25: Fermentation K2LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D <sub>4</sub> , D <sub>5</sub> und D <sub>6</sub> (unten). .....	78
Abbildung 26: Abgasanalyse der Fermentation K2LM – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D <sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D <sub>4</sub> , D <sub>5</sub> und D <sub>6</sub> (unten). .....	79
Abbildung 27: Bestimmung der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase im Batch der jeweiligen Fermentation. ....	88
Abbildung 28: Lineweaver-Burk-Diagramm der Fermentation K2LM. ....	96
Abbildung 29: X-D-Diagramm der Fermentationen K2L und K4L. ....	97
Abbildung 30: X-D-Diagramm der Fermentationen K1LM und K2LM. ....	98
Abbildung 31: Biosyntheseweg von Pulcherriminsäure in <i>B. licheniformis</i> . .....	100

**IV Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Auflistung der <i>Online</i> - und <i>Inline</i> -Messtechnik am Bioreaktor Qplus. .....	29
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien mit Hersteller, Artikelnummer und Charge. .....	36
Tabelle 3:	Verwendete Geräte mit Typ und Hersteller. ....	37
Tabelle 4:	Enthaltene Aminosäuren in den verwendeten Hefeextrakten. ....	39
Tabelle 5:	Zusammensetzung des 10x Phosphatpuffers. ....	39
Tabelle 6:	Sollwerte der Prozessparameter und -variablen in der Initialisierungsphase. ....	49
Tabelle 7:	Übersicht der Eigenschaften in den Versuchsreihen. ....	53
Tabelle 8:	Übersicht der Fermentationen und der Sollwerte der Verdünnungsraten sowie deren Dauer. ....	54
Tabelle 9:	Aufbau der Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanlage. ....	59
Tabelle 10:	Übersicht der Standards für die Kohlenhydrat- und organischen Säuren-Analytik per HPLC. ....	59
Tabelle 11:	Übersicht der Konzentrationen der Hefeextrakte für die Standardreihen für die Kohlenhydrat- und organischen Säuren- Analytik per HPLC. ....	60
Tabelle 12:	Übersicht der maximalen Zellkonzentration in den Vorversuchen mit den jeweiligen Hefeextrakten. ....	63
Tabelle 13:	Vergleich der Soll- und Istwerte der Flussraten des Zulaufreservoirs in der jeweiligen Verdünnungsrate. ....	81
Tabelle 14:	Mittelwerte des Reaktionsvolumens während der jeweiligen Verdünnungsraten sowie die prozentuale Abweichung vom Sollwert. .....	83
Tabelle 15:	Vergleich der Soll- und Istwerte der Verdünnungsraten in den Fermentationen. ....	85
Tabelle 16:	Korrelationsparameter $k_1$ und $k_2$ für die Fermentationsphasen. ....	87
Tabelle 17:	Spezifische Wachstumsraten in den Fermentationsphasen der kontinuierlichen Prozesse. ....	89
Tabelle 18:	Abweichung der Verdünnungs- und Wachstumsrate in der kontinuierlichen Phase der Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Leiber. ....	90

Tabelle 19:	Abweichung der Verdünnungs- und Wachstumsrate in der kontinuierlichen Phase der Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand.....	90
Tabelle 20:	Substratkonzentration in den Fermentationsphasen der kontinuierlichen Prozesse. ....	91
Tabelle 21:	Eigenschaften der Korrekturmittel. ....	93
Tabelle 22:	Korrekturmittelverbrauch in den Fermentationen K2L und K4L. ....	94
Tabelle 23:	Korrekturmittelverbrauch in den Fermentationen K1LM und K2LM. ....	94

## V Anhangsverzeichnis Abbildungen

Abb. A. 1:	Schematische Darstellung der veränderten Deckelbelegung der Qplus Reaktoren. ....	i
Abb. A. 2:	Fermentation K2L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D2 bis D7.....	xi
Abb. A. 3:	Fermentation K2L – Verlauf der Chemostat-Phase D8.....	xii
Abb. A. 4:	Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D2 bis D5.....	xiii
Abb. A. 5:	Abgasanalyse der Fermentation K4L – Verlauf der Chemostat-Phase D <sub>2</sub> und D <sub>3</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D <sub>6</sub> und D <sub>7</sub> (unten). ....	xiv
Abb. A. 6:	Abgasanalyse der Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D <sub>8</sub> und D <sub>9</sub> . ....	xv
Abb. A. 7:	Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Chemostat-Phasen D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> und D <sub>6</sub> (oben) und Verlauf der Abgasanalyse in den Chemostat-Phasen D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> und D <sub>6</sub> (unten). ..	xvi
Abb. A. 8:	Fermentation K2LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Chemostat-Phasen D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> und D <sub>7</sub> (oben) und Verlauf der Abgasanalyse in den Chemostat-Phasen D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> und D <sub>7</sub> (unten). .	xvii
Abb. A. 9:	Chromatogramm der HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren mit Hefeextrakt der Fa. Leiber. ....	xxi
Abb. A. 10:	Chromatogramm des Hefeextraktes der Fa. Leiber.....	xxii
Abb. A. 11:	Kalibriergerade des Hefeextraktes der Fa. Leiber.....	xxiii
Abb. A. 12:	Chromatogramm der HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand.....	xxiv
Abb. A. 13:	Chromatogramm des Hefeextraktes der Fa. Lallemand. ....	xxv
Abb. A. 14:	Kalibriergerade des Hefeextraktes der Fa. Lallemand. ....	xxvi
Abb. A. 15:	Vergleich der Hefeextrakte der Fa. Leiber und Fa. Lallemand....	xxvii
Abb. A. 16:	Chromatogramm der getesteten Kohlenhydrate und organischen Säuren mit Retentionszeit. ....	xxviii

**VI Anhangsverzeichnis Tabellen**

Tab. A. 1:	Hydraulische Verweilzeit und Anzahl der Durchläufe der jeweiligen Verdünnungsraten.....	xviii
Tab. A. 2:	Biomassekonzentration in den verschiedenen Fermentationsphasen der Prozesse K2L und K4L. ....	xix
Tab. A. 3:	Biomassekonzentration in den verschiedenen Fermentationsphasen der Prozesse K1LM und K2LM. ....	xx



## ZUSAMMENFASSUNG

### Titel der Masterthesis

Etablierung und Analyse kontinuierlicher Kultivierungen von *Bacillus licheniformis* mit Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle

### Zusammenfassung

Kontinuierliche Kultivierungen können für die Analyse kinetischer Parameter, wie die Sättigungskonstante, der Bestimmung der optimalen und kritischen Verdünnungsrate sowie der maximalen Produktivität herangezogen werden. Diese Parameter dienen der Optimierung biotechnologischer Prozesse, bei denen ein primäres Ziel eine hohe Zeit-Raum-Ausbeute ist. Hefeextrakte stellen aufgrund ihrer vielfältigen Zusammensetzung und ihres hohen Gehalts an essenziellen Substanzen wie Aminosäuren, Mineralien und Vitaminen eine kostengünstige Nährstoffkomponente in Bioprocessen dar. Experimente haben gezeigt, dass der gram-positive Modellorganismus *Bacillus licheniformis* DSM 13 in der Lage ist, alle essenziellen Aminosäuren zu synthetisieren und Hefeextrakte als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für den Wachstums- und Erhaltungsstoffwechsel zu nutzen.

In dieser Thesis wurde für die Etablierung kontinuierlicher Prozesse die Anlagenperipherie einer Multifermenteranlage erfolgreich verändert. In mehreren Kultivierungen in 1 L Bioreaktoren wurden verschiedene Hefeextrakte bei Verdünnungsraten von  $0,07 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,977 \text{ h}^{-1}$  getestet. Die Reservoirkonzentration wurde dabei immer konstant auf  $10 \text{ gL}^{-1}$  eingestellt. Eine anschließende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gab Aufschluss über verbrauchte Kohlenstoffquellen. Zusammen mit der Biotrockenmasse ermöglichte sie die Auftragung im X-D-Diagramm und damit die Bestimmung der maximalen Produktivität des Hefeextraktes als einzige Kohlenstoffquelle ( $XD_{\max, \text{Leber}}: 0,5878 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $XD_{\max, \text{Lamend}}: 0,8726 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Die Bestimmung der Sättigungskonstante war aufgrund der Datenlage nicht möglich. Eine stark ausgeprägte Biofilmbildung an der Glasinnenwand und den Sonden des Bioreaktors erschwerte die Analyse der Prozesse.

## ABSTRACT

### Title of the master thesis

Establishment and analysis of continuous cultivations of *Bacillus licheniformis* using yeast extract as the only carbon source

### Abstract

Continuous cultivation can be used for the analysis of kinetic parameters such as saturation constant, the determination of optical and critical dilution rate and the maximum productivity. These are helpful parameters in optimizing the time-space-yield in biotechnological processes.

Yeast extracts provide an inexpensive nutrient media component in bioprocesses due to their diverse composition and high content of essential substances such as amino acids, minerals and vitamins. Experiments have shown that the gram-positive model organism, *Bacillus licheniformis* DSM 13, is able to synthesize all essential amino acids and use yeast extracts as the only carbon source and energy source for growth and maintenance metabolism.

In this thesis, the plant periphery of a multifermenter plant was successfully modified for the establishment of continuous processes. Several cultivations were performed in a 1 L bioreactor to test different yeast extracts at dilution rates ranging from  $0,07 \text{ h}^{-1}$  to  $0,977 \text{ h}^{-1}$ , while the reservoir concentration was kept constant at  $10 \text{ gL}^{-1}$ . A subsequent high performance liquid chromatography provided information about consumed carbon sources. Together with the cell density, it allowed plotting on the X-D-diagram to determine the maximum productivity of the yeast extract ( $XD_{\max, \text{Leber}}: 0,5878 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $XD_{\max, \text{Lemand}}: 0,8726 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Determination of the saturation constant was not possible due to the data situation. The analysis was complicated on account of the complex composition of the yeast extract and a strong biofilm formation on the inner wall and probes of the bioreactor.

## 1 EINLEITUNG

Hefeextrakte stellen ein klassisches Produkt der Biotechnologie dar. Aufgrund ihrer reichhaltigen Inhaltsstoffe, wie Aminosäuren, Vitamine und Mineralien, werden sie auch gerne als Nährmedienbestandteil in biotechnologischen Prozessen zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt.

Die unterschiedlichen Herstellungsprozesse der Hefeextrakte können dabei zu variierenden Zusammensetzungen führen. Die Vielfalt an Hefeextrakten auf dem Markt, sowie deren Chargenvarianz kann zu Instabilität in Hinsicht auf Wachstum und Produktion führen und ein ernstes Problem in Bioprozessen darstellen. Die Qualität der Hefeextrakte spielt daher eine wichtige Rolle in der Produktion. Je nach genetischen Eigenschaften des Produktionsorganismus kann ein Hefeextrakt, als Teil des Nährmediums, signifikanten Einfluss auf das mikrobielle Wachstum haben. Daher ist es von Relevanz, dass Hefeextrakte zusammen mit dem Mikroorganismus getestet werden, bevor sie für die industrielle Anwendung genutzt werden. (Tachibana et al., 2019)

Zur Beurteilung der Qualität eines Hefeextraktes können verschiedene Verfahren angewendet werden. Beispielsweise können Hefeextrakte mit Hilfe von Standardlaboranalysemethoden, basierend auf ihren Inhaltsstoffen, verglichen werden. Dies reicht aber nicht aus, um eine qualitative Aussage über die wachstumsfördernde Leistung der Hefeextrakte für das mikrobielle Wachstum treffen zu können. Daher sind direkte Anwendungsmethoden, wie Kultivierungen, notwendig.

Bei der Medienentwicklung und -beurteilung kommt oft die kontinuierliche Prozessführung zum Einsatz. Im Chemostatbetrieb erlaubt sie die Identifizierung der Sättigungskonstante der zu untersuchenden Medienkomponente und dient zur Bestimmung der optimalen und kritischen Verdünnungsrate sowie der maximalen Zeit-Raum-Ausbeute (Produktivität). (Chmiel, 2011)

Das Ziel industrieller Bioprozesse ist generell die Maximierung der Produktivität mit gleichzeitiger Einsparung an Rohstoffkosten und Zeitaufwand. Die Gesamtproduktivität hängt dabei von der Produktivität der einzelnen Teilbereiche eines Verfahrens ab. Daher ist der Einsatz des richtigen Hefeextraktes in Zusammenhang

mit dem gewünschten Produktionsorganismus, sowie dessen Chargen-Stabilität von großer Wichtigkeit für einen ökonomisch erfolgreichen Bioprozess.

Diese Thesis zielt auf die Etablierung und Analyse eines kontinuierlichen Prozesses im Chemostatbetrieb zur qualitativen Beurteilung der wachstumsfördernden Leistung von Hefeextrakten ab. Als Modellorganismus dient ein Stamm der Spezies *Bacillus licheniformis*. Mikroorganismen dieser Spezies zählen aufgrund hoher Produktion und Sekretion von Exoenzymen zu den relevantesten Produzenten in der industriellen Biotechnologie (Schallmey et al., 2004).

Eine besondere genetische Eigenschaft des *Bacillus licheniformis* ist die Autosynthese aller essentiellen Aminosäuren und die Fähigkeit Hefeextrakte als einzige Kohlenstoffquelle zum Zellerhalt (*maintenance*) und Zellwachstum nutzen zu können. (Rachinger, 2010; Rey et al., 2004; Schwarzer, 2010; Veith et al., 2004)

## 1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Thesis ist die Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses an einer Multifermentieranlage, sowie die Analyse der Kultivierungen. Die Herausforderung besteht darin, kontinuierliche Kultivierungen im Chemostatbetrieb mit *Bacillus licheniformis* mit Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle durchzuführen. Dies gibt die Möglichkeit, Eigenschaften von Hefeextrakten zu ermitteln und kinetische Parameter, wie die Sättigungskonstante der Hefeextrakte, bestimmen zu können.

## 2 THEORETISCHER HINTERGRUND

### 2.1 Die Gattung *Bacillus* und der Modellorganismus *Bacillus licheniformis*

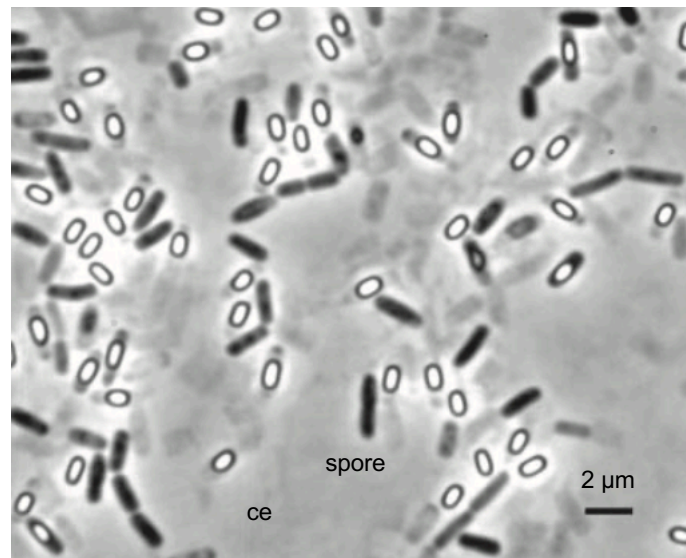
Phylogenetisch betrachtet zählt die Gattung *Bacillus* (lat. *Stäbchen*) zur Familie der Bacillaceae, welche unter anderem auch die Gattung *Clostridium* umfasst. Im Gegensatz zu diesen Anaerobiern kann die Gattung *Bacillus* sowohl einen aeroben als auch einen fakultativ anaeroben Metabolismus betreiben (Clements et al., 2002; Turnbull, 1996).

Trotz dieser Fähigkeit können Umwelteinflüsse, wie beispielsweise oxidativer oder osmotischer Stress, Nährstoffmangel oder hohe Zelldichten die Bildung von Sporen begünstigen. Die Sporulation bietet dem Organismus dabei die Möglichkeit diese unvorteilhaften physikalischen oder chemischen Einflüsse zu überdauern (Zhou et al., 2019).

*Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) wird zumeist aus Bodenproben isoliert, tritt aber auch in Vogelfedern, Wasser- und Essensproben auf (Garrity et al., 2010). Das mesophile, gram-positive Bakterium zeigt bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 40 °C ein Wachstum, wobei das Temperaturoptimum bei 37 °C liegt (Andriani et al., 2017; Seiler, 2010). Ebenso ist *Bacillus licheniformis* fähig in einem pH-Bereich von pH 3 bis 11 zu wachsen (Ateş et al., 2007; Ghani et al., 2013).

Auf festen Nährböden bildet *B. licheniformis* krustige, flechtenartige, beige Kolonien. Bei stark eisenhaltigen Medien weisen die Kolonien eine rot-braune Färbung aufgrund des Pigments „Pulcherrimin“ auf (Jayalakshmi et al., 2012).

Der Organismus besitzt eine längliche, stäbchenförmige Morphologie (Abbildung 1) sowie eine peritriche Begeißelung, welche ihm eine aktive Bewegung im Lebensraum ermöglicht (Seiler, 2010; Zhou et al., 2019). Die Zellen der Gattung *Bacillus* weisen zumeist eine Länge von 2 bis 5 µm und einen Durchmesser von 1 µm auf (Fuchs et al., 2007).



**Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme einer *B. licheniformis* Kultur unter dem Phasenkontrastmikroskop.** (Garrity et al., 2010)

Die Abbildung 1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer *B. licheniformis* Kultur unter dem Phasenkontrastmikroskop. Die stäbchenförmige Morphologie sowie die Verkettung einiger Zellen sind erkennbar. Ebenso sind helle, ellipsoidische, zentrale und subterminale Sporen sichtbar. (Garrity et al., 2010)

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *B. licheniformis* DSM 13 (ATCC 14580) ist ein Neotyp des *B. licheniformis* (Smith et al., 1964). Untersuchungen seines Genoms zeigten, dass dieses aus einem einzigen Chromosom mit 4.222.748 Basenpaaren (GC-Gehalt: 46,2 %) besteht. Außerdem besitzt es alle notwendigen Enzyme für die zentralen Stoffwechselwege der Glykolyse, des Pentosephosphat-Wegs und des Tricarbonsäurezyklus sowie für den Glyoxylat-Bypass. Dies ermöglicht dem Organismus unter anderem die Metabolisierung von sieben der 18 proteinogenen Aminosäuren, so dass sie ihm als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können. Darüber hinaus ist der Organismus fähig, alle essentiellen Aminosäuren und Vitamine zu synthetisieren. (Rachinger, 2010; Rey et al., 2004; Schwarzer, 2010; Veith et al., 2004)

## 2.2 Industrieller Einsatz von *Bacillus licheniformis*

Die U.S. Food and Drug Administration stuft *Bacillus licheniformis* als allgemein sicher anerkannten (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) Organismus ein. Neben der Möglichkeit bereits auf einfachen Routinemedien wie Nährstoffagar oder *lysogeny broth* hohe Zelldichten zu erreichen, bietet die GRAS-Klassifizierung den Vorteil, den Organismus als sicheren und vielseitigen Produzenten industrieller Bioprodukte (z. B. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme) einzusetzen (Garrity et al., 2010). In der biotechnologischen Produktion können dabei große Mengen an Exoenzymen, wie Amylasen oder Proteasen, in hohen Konzentrationen von 20 bis 25 gL<sup>-1</sup> gewonnen werden. (de Boer et al., 1994; Schallmey et al., 2004; Veith et al., 2004)

Extrazelluläre Enzyme sind durch ihren einfacheren Downstream-Prozess in der industriellen Anwendung lukrativer als intrazelluläre Produkte. Des Weiteren müssen bei gram-positiven Organismen keine Lipopolysaccharide, welche als Endotoxine fungieren, entfernt werden, was mit hohen Kosten und Produktverlust verbunden ist. Besonders die Produktion rekombinanter Proteine wie der alkalischen Serin-Protease aus *Bacillus subtilis*, welche einen Hauptbestandteil vieler Waschmittel darstellt, aber auch die Produktion nativer Proteine wie beispielsweise Amylasen, Lipasen, Pektatlyasen und Tannasen in *B. licheniformis* stellen durch die oben genannten Eigenschaften eine hohe Attraktivität für die Industrie dar. (Drejer et al., 2018; Mohapatra et al., 2009; Patel et al., 2017; Veith et al., 2004; Wiegand et al., 2013)

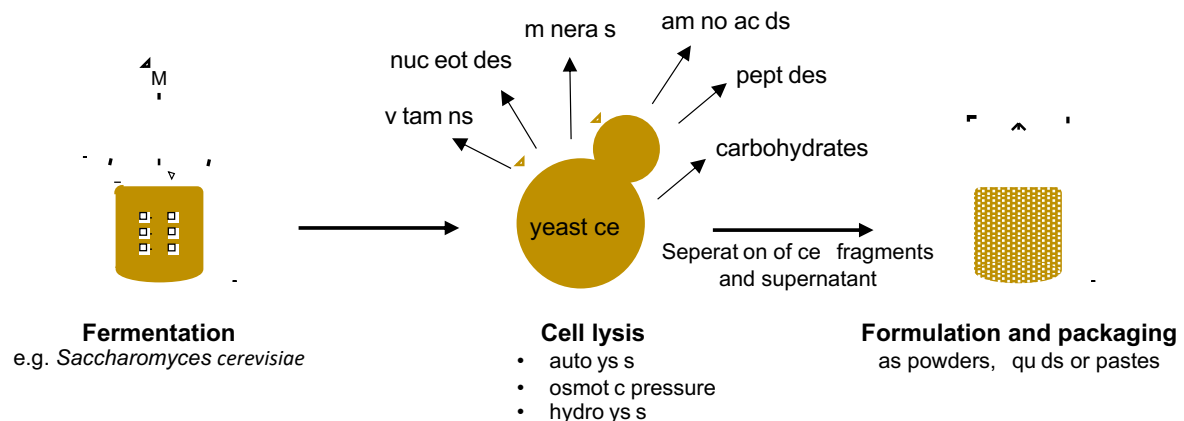
Wichtige Aspekte in der Produktion sind hohe Zeit-Raum-Ausbeuten. Diese lassen sich durch die Optimierung des Fermentationsprozesses und/oder durch genetische Veränderung des verwendeten Organismus bzw. des Zielenzyms (*Genetic-/Protein-Engineering*) realisieren (Schallmey et al., 2004).

Ein wichtiger Teil der Optimierung von Prozessparametern, neben pH und Temperatur, stellt dabei die Zusammensetzung des Nährmediums dar. Dieses kann sowohl definierte als auch komplexe Bestandteile, wie Hefeextrakte, enthalten.



## 2.3 Herstellung von Hefeextrakten

In der industriellen Biotechnologie fungieren Hefeextrakte nicht nur als Produkt, sie können auch als Substrat eingesetzt werden. Neben der Verwendung als Würz- oder Nahrungsergänzungsmittel in der Lebensmittelindustrie wird Hefeextrakt zudem als Bindemittel in Tabletten für die Pharmaindustrie und als Komponente in Nährmedien in der Biotechnologie genutzt. Durch die einfache Produktion und dem hohen Anteil vieler wichtiger Substanzen wie Aminosäuren, Vitaminen und Mineralstoffen werden Hefeextrakte in der Industrie in großen Mengen produziert. Im Jahr 2019 lag die jährliche Produktion weltweit bei 160.000 Tonnen Hefeextrakt, Tendenz steigend (Undersun Biomedtech Co.Ltd, 2019). Der dabei am häufigsten verwendete Organismus ist *Saccharomyces cerevisiae*. Die Hefeextrakte lassen sich je nach Zellaufschlussverfahren der Autolyse, Plasmolyse oder Hydrolyse zuordnen. (Tangüler & Erten, 2009; Zarei et al., 2016)



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Hefeextrakten.**  
Grafik erstellt in Anlehnung an (Jacob, Striegel, et al., 2019; Jacob, Methner, et al., 2019)

Die Autolyse ist der gängigste Prozess. Es handelt sich um einen enzymatischen Prozess, bei dem zelleigene Enzyme zur Lyse der Zelle genutzt werden. Diese können durch erhöhte Temperaturen (45 °C bis 60 °C, einige Stunden bis zu mehreren Tagen) oder osmotischen Druck aktiviert werden. Bei der Plasmolyse wird der autolytische Prozess durch hohe Konzentrationen eines Plasmolyten, wie beispielsweise Natriumchlorid unterstützt, während bei der Hydrolyse Salzsäure zum Einsatz kommt, bevor im Anschluss eine Neutralisierungsreaktion stattfindet.

Bei der Aufreinigung werden zunächst die Zellbruchstücke vom Überstand getrennt, bevor der Überstand, wie in Abbildung 2, in einem Sprühtrocknungs- oder Abdämpfungsprozess formuliert wird. (Jacob, Methner, et al., 2019; Tangüler & Erten, 2009; Zarei et al., 2016)

## **2.4 Fermentationsverfahren**

Fermentationsverfahren finden in Bioreaktoren statt, wobei in diskontinuierliche (Batch, Fed-Batch) und kontinuierliche Prozesse unterschieden werden kann. Der kontinuierliche Prozess zeichnet sich dabei durch einen Zu- und Ablauf aus, während in diskontinuierlichen Prozessen nur Zuströme vorhanden sind. Neben der Konstruktion des Bioreaktors spielen auch die Prozessparameter pH-Wert, Temperatur, Belüftungssystem und Zusammensetzung des Nährmediums, sowie ein leistungsfähiger Organismus eine entscheidende Rolle in Bioprozessen.

Um Fermentationsverfahren genauer zu beschreiben und zu untersuchen, werden mathematische Modelle zur Hilfe herangezogen, sogenannte Bioprozessmodelle. (Chmiel, 2011; Metz, 1971)

### **2.4.1 Bioprozessmodelle und Monod-Kinetik**

Bioprozessmodelle beziehen zum einen die Aspekte der technischen Anlage (Bioreaktor) und zum anderen die biochemischen Eigenschaften des Mikroorganismus mit ein. Diese Kombination ermöglicht die genauere Beschreibung eines Bioprozesses. Um die mathematischen Modelle zu vereinfachen, wird der Bioreaktor als „ideal durchmischter Rührkessel“ betrachtet. Die Kinetik basiert dabei auf dem Wachstumsmodell nach Monod (Monod, 1949). Im folgenden Abschnitt wird auf die verschiedenen Betriebsweisen genauer eingegangen. Dabei wird sich hauptsächlich an der Beschreibung der Lösungsansätze für die einzelnen Betriebsweisen nach Chmiel, 2011 und Cornelissen 2004, orientiert. (Chmiel, 2011; Cornelissen, 2004)

Allgemein lässt sich sagen, dass die Änderung einer Masse im System mit der Zeit

$$\frac{dm_L}{dt},$$

$$\frac{dm_{iL}}{dt} = \underbrace{\frac{d[c_{iL}(t) \cdot V_L(t)]}{dt}}_{\text{Akkumulation}} \quad (2.1)$$

$$= \underbrace{F_{\text{ein}}(t) \cdot c_{iL,\text{ein}}(t) - F_{\text{aus}}(t) \cdot c_{iL,\text{aus}}(t)}_{\text{Konvektion}} \pm \underbrace{r_{iL}(t) \cdot V_L(t) \pm V_L \cdot \text{ITR}(t)}_{\text{Reaktion}}$$

mit	$m_{iL}$	:= Masse einer Komponente I in der Flüssigphase	[g]
	$t$	:= Zeit	[h]
	$c_{iL}$	:= Konzentration der Komponente I in der Flüssigphase	[g L <sup>-1</sup> ]
	$V_L$	:= Reaktionsvolumen (Arbeitsvolumen)	[L]
	$F$	:= Volumenstrom	[L h <sup>-1</sup> ]
	$\text{ITR}$	:= Transferrate der Komponente I	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
	$r_{iL}$	:= Reaktionsrate der Komponente I in der Flüssigphase	[g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ],

durch die Zu- und Abfuhr (mit „ein“ bzw. „aus“ gekennzeichnet) dieser Masse, sowie deren Umsatz, mit der Zeit formuliert werden kann (Gl.(2.1)).

Massen stellen dabei abhängige Variablen, Volumenströme operative Parameter und die Zeit eine unabhängige Variable dar. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $r$  der Komponente I wird für Substrate mit einem negativen und für Produkte mit einem positiven Vorzeichen versehen.

Das Modell nach Monod wird herangezogen, um die Eigenschaften der Biophase zu beschreiben. Hierbei wird der Biomassekonzentration in der Flüssigphase  $c_{XL}$  eine direkte Proportionalität zur Wachstumsgeschwindigkeit  $r_{XL}$  zugeschrieben,

$$r_{XL}(t) = \mu(t) \cdot c_{XL}(t) \quad (2.2)$$

mit	$\mu$	:= zellspezifische Wachstumsrate	[h <sup>-1</sup> ]
	$c_{XL}$	:= Biomassekonzentration in der Flüssigphase	[g L <sup>-1</sup> ],

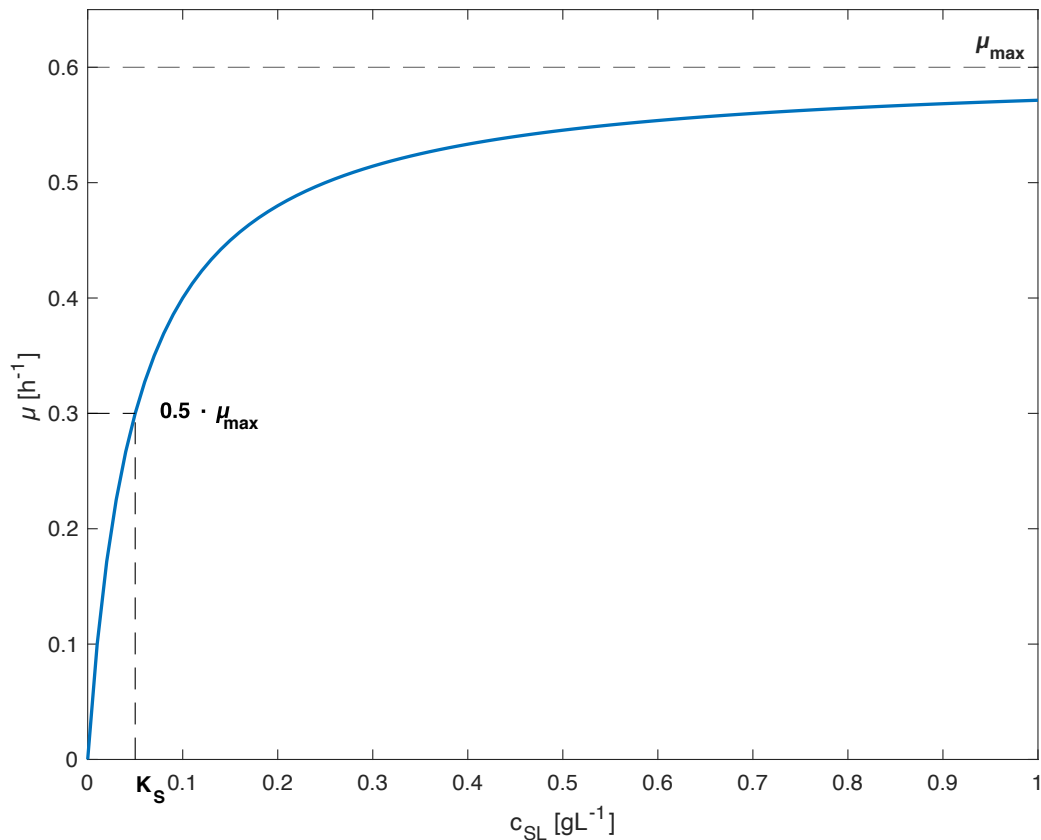
welche als autokatalytische Reaktion bezeichnet wird. Der Proportionalitätsfaktor ist dabei die zellspezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  (2.2). (Monod, 1949)

Gleichzeitig ist zu beachten, dass die Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  als eine Funktion der Nährstoffversorgung angesehen werden kann. Üblicherweise liegt eine Medienkomponente limitierend vor (limitierendes Substrat), während die restlichen Medienbestandteile im Überschuss vorhanden sind. Die Gl.(2.3) ist an die Standardgleichung einer enzymatischen Reaktion mit einem Substrat an Michaelis und Menten angelehnt. (Michaelis & Menten, 1913)

$$\mu(t) = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{\text{SL}}(t)}{c_{\text{SL}}(t) + K_{\text{S}}} \quad (2.3)$$

mit  $\mu_{\max}$  := maximale zellspezifische Wachstumsrate [h<sup>-1</sup>]  
 $c_{\text{SL}}$  := Substratkonzentration in der Flüssigphase [gL<sup>-1</sup>]  
 $K_{\text{S}}$  := Sättigungs- oder Affinitätskonstante des Substrats [gL<sup>-1</sup>]

Die Sättigungs- oder Affinitätskonstante  $K_{\text{S}}$  nimmt dabei den Wert der limitierenden Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit erreicht ist (siehe Abbildung 3).

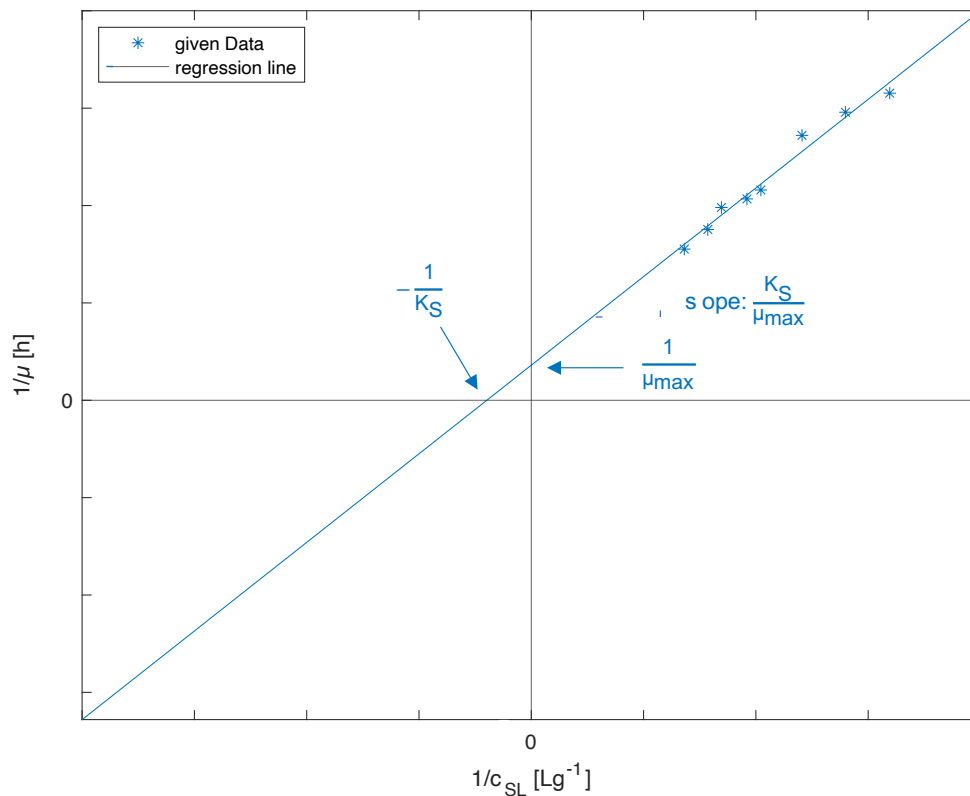


**Abbildung 3:** Exemplarische Darstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  in Abhängigkeit der limitierenden Substratkonzentration  $c_{SL}$  nach dem Monod-Modell. Mit  $\mu_{max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$  und  $K_S = 0,05 \text{ gL}^{-1}$ . Eigene Darstellung nach (Michaelis & Menten, 1913)

Zur Bestimmung der Sättigungskonstante kann in der Praxis das Lineweaver-Burk-Diagramm genutzt werden. Durch die doppeltreziproke Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung, Gl.(2.3), erhält man nachstehende Geradengleichung (2.4).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{c_{SL}} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (2.4)$$

Die Abbildung 4 zeigt eine exemplarische Darstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms.



**Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms zur Bestimmung der Sättigungskonstante  $K_S$ .** Eigene Darstellung nach (Lineweaver & Burk, 1934).

Der Schnittpunkt mit der X-Achse gibt nach Umformung die Sättigungskonstante  $K_S$  wieder. Durch die Umformung des Y-Achsenabschnitts erhält man  $\mu_{\max}$ .

Die Zellkonzentration  $c_{XL}$  ist über den sogenannten Ausbeutekoeffizienten  $y_{X/S}$  mit der Substratkonzentration  $c_{SL}$  verbunden. Dieser stellt das Verhältnis von Biomassewachstums- und Substrataufnahmegeschwindigkeit dar Gl.(2.5) und gibt Auskunft darüber, wie viel Gramm Biomasse X aus einem Gramm Substrat S entstehen kann unter der Annahme, dass die einzige Eigenschaft der Biomasse das Wachstum sei.

$$y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\Delta(x \cdot V)}{\Delta(c \cdot V)} = \frac{\Delta c_{XL}}{\Delta c_{SL}} = \frac{c_{XL}(t) - c_{XL}(t_0)}{c_{SL}(t_0) - c_{SL}(t)} \quad (2.5)$$

mit  $\Delta X$  := Änderung der Biomasse [g]  
 $\Delta S$  := Substratverbrauch [g]

Dies bedeutet, es wird in gleichem Maße Substrat verbraucht, wie Biomasse entsteht (2.6).

$$r_{XL} = r_{SL} \cdot Y_{X/S} \quad (2.6)$$

In den folgenden Abschnitten wird nun näher auf die einzelnen Prozessmodelle eingegangen.

#### 2.4.2 Satzbetrieb (Batch)

Der Satzbetrieb, auch Batch genannt, stellt die einfachste Umsetzung eines Fermentationsverfahrens dar. Für Vorversuche in kleinen Maßstäben werden zumeist Schüttelkolben benutzt. Hierbei handelt es sich um ein nahezu geschlossenes System, da ein geringer, nicht kontrollierbarer Gasaustausch stattfindet. Es werden keine Korrektur- und Antischaummittel hinzugefügt. Ein Durchmischen und eine konstante Temperatur können durch einen Schüttelinkubator sichergestellt werden.

Der Satzbetrieb wird auch als Vorkultur für einen folgenden Prozess oder als Hauptkultur im Bioreaktor verwendet. Hierbei wird neben der Temperierung auch ein kontrollierter Gasaustausch (Zufuhr von Sauerstoff und Abfuhr von Kohlenstoffdioxid) sowie die Zufuhr geringer Mengen Korrekturmitteln (pH-Wert, Antischaum) sichergestellt. Diese Mengen sind vernachlässigbar klein, wodurch für die folgenden Betrachtungen die Annahme eines konstanten Volumens vorausgesetzt werden kann. Während der Batch-Kultivierung liegen alle Medienkomponenten in ausreichenden Mengen vor ( $c_{SL} \gg K_S$ ) womit der Sättigungsterm  $\left(\frac{c_{SL}(t)}{c_{SL}(t) + K_S}\right)$  der Michaelis-Menten-Gleichung (2.3) gegen Eins strebt. Die Wachstumsrate  $\mu$  nähert sich somit auch der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{max}$  an.

Es ergeben sich aus den Gleichungen (2.1) und (2.2) für die Biomassebilanz im Satzbetrieb die Gleichungen (2.7) und (2.8).

$$\frac{dc_{XL}(t)}{dt} = r_{XL}(t) \quad (2.7)$$

$$\frac{dc_{XL}(t)}{dt} = c_{XL}(t) \cdot \mu(t) \quad (2.8)$$

Bei der Annahme, dass  $\mu = \mu_{\max}$  konstant ist, kann nach der Variablentrennung integriert werden. Unter unlimitierenden Bedingungen verläuft das Zellwachstum exponentiell und Gl.(2.9) ergibt sich.

$$c_{XL}(t) = c_{XL0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot (t - t_0)} \quad (2.9)$$

In der Praxis kann für die Bestimmung der Wachstumsrate in der Batch-Phase die Gl.(2.9) logarithmiert werden, wodurch sich Gl.(2.10) ergibt.

$$\ln(c_{XL}(t)) = \mu \cdot t + \ln(c_{XL0}) \quad (2.10)$$

Durch die halblogarithmische Auftragung der logarithmierten Biomassekonzentration  $\ln(c_{XL})$  über die Zeit lässt sich durch das Einfügen einer Regressionsgeraden in der Batch-Phase die Wachstumsrate  $\mu$  bestimmen.

Mit steigender Zellkonzentration nimmt die Substratkonzentration ab, bis durch die Limitierung eines Substrates das Zellwachstum gegen Null geht. Die Wachstumsphase ist beendet und der Prozess kann gestoppt oder in einen anderen Betriebsmodus geändert werden.



### 2.4.3 Kontinuierlicher Betrieb

Charakteristisch für den kontinuierlichen Prozess, ist der kontinuierliche Zulauf von sterilem Kulturmedium bei parallelem Ablauf der Zellsuspension mit gleicher Flussrate. Dabei stellt sich ein Fließgleichgewicht (*engl. steady-state*), sowie ein konstantes Reaktionsvolumen im Bioreaktor ein. Außerdem wird angenommen, dass es sich um einen ideal kontinuierlich durchströmten Rührkesselreaktor (*engl. ideal continuous-flow stirred-tank reactor*) handelt. Dies bedeutet, dass die Konzentrationen innerhalb des Reaktors  $c_{iL}$  gleich der Konzentrationen im Ablauf  $c_{iL,aus}$  sind und die Mischzeit bei einem ideal durchmischten Rührkessel Null ist.

Im kontinuierlichen Betrieb liegt für das Reaktionsvolumen,

$$V_L(t) = V_{L0} = V_L = \text{const.} \quad (2.11)$$

eine Konstanz vor (2.11). Mit konstantem Reaktionsvolumen gilt damit für die Substratzufütterrate  $F_R$  die nachstehende Gl.(2.12).

$$F_R(t) = F_H(t) = F(t) \quad (2.12)$$

Die Verdünnungsrate  $D$  (*eng. dilution rate*) ist der, auf das Reaktionsvolumen bezogene Strom und setzt sich aus dem Quotienten der Zufütter- bzw. Ernterate  $F$  sowie dem Reaktionsvolumen  $V_L$  zusammen (2.13) und hat die Einheit einer reziproken Zeit [ $\text{h}^{-1}$ ].

$$D = \frac{F}{V_L} \quad (2.13)$$

Das Fließgleichgewicht wird auch als pseudostationärer und zeitinvarianter Zustand beschrieben. Damit reduziert sich im Fließgleichgewicht die Massenbilanz für jede Komponente  $l$  im System zu Gl.(2.14).

$$\frac{dm_{lL}(t)}{dt} = \frac{d[c_{lL}(t) \cdot V_L]}{dt} \equiv 0 \quad (2.14)$$

Somit gilt für die Biomassebilanz im Fließgleichgewicht die folgende Gl.(2.15).

$$\frac{dc_{XL}(t) \cdot V_L}{dt} \equiv 0 \quad (2.15)$$

Mit den Gleichungen (2.2), (2.12) und (2.13) ergibt sich außerdem Gl.(2.16).

$$r_{XL} = \mu \cdot c_{XL} = D \cdot (c_{XL,aus} - c_{XL,ein}) \quad (2.16)$$

Mit der Annahme, das zugeführte Medium sei zellfrei  $c_{XL,ein} = 0$  und die Konzentrationen im Reaktor  $c_{lL}$  seien gleich den Konzentrationen im Ablauf, kann das folgende Gleichgewicht aufgestellt und gelöst werden.

$$\mu \cdot c_{XL} = D \cdot c_{XL} \quad (2.17)$$

Für Bioprozesse gilt die Annahme  $c_{XL} > 0$ , da ein Bioprozess ohne Organismen (Biokatalysatoren) nicht sinnvoll ist.

Somit ergibt sich als Lösung nach Einstellung eines Fließgleichgewichtes mit konstanter Zelldichte die nachstehende Beziehung (2.18).

$$\mu = D \quad (2.18)$$

Das zeigt, dass im kontinuierlichen Betrieb eine physiologische Größe  $\mu$  durch eine operative Größe  $D$  (innerhalb bestimmter Grenzen) eingestellt werden kann. Dies wird auch als Kernbeziehung des Chemostaten bezeichnet. Die Übereinstimmung der Beziehung aus Gl.(2.18) kann in der Praxis mit Gl.(2.19) überprüft werden.

$$\pm\Delta_{\mu D} = \mu - D \quad (2.19)$$

Der Begriff Chemostat bedeutet, dass rein durch das Dosieren einer Chemikalie, das heißt durch das Limitieren eines Substrates, ein pseudostationärer Zustand erreicht wird. Eine weitere Fahrweise wäre der Turbidostat, bei dem der pseudostationäre Zustand über die Turbidität geregelt wird. Außerdem gibt es das Konzept des Permittistaten, des Nutristaten und den Spezialfall des pH-Auxostaten, auf die hier im Folgenden aber nicht weiter eingegangen wird.

Um die gewünschte Verdünnungsrate  $D$  zu erhalten, muss ein bestimmter Volumenstrom  $F$  eingestellt werden. Der Volumenstrom  $F$  (2.20) ist die zeitliche Ableitung des geförderten Volumens  $V_F$  und lässt sich über eine Pumpe regulieren. Der maximale bzw. minimale Volumenstrom  $F$  ist somit sowohl von der Leistung der eingesetzten Pumpe als auch von den Durchmessern der verwendeten Schläuche abhängig.

$$F = \frac{dV_F}{dt} \quad (2.20)$$

In der Praxis kann die Bestimmung der tatsächlichen Flussrate des Zulaufreservoirs  $F_R$  über die Massendifferenz des Zulaufreservoirs  $m_R$  und der zeitlichen Differenz erfolgen. Dazu kann die Gl.(2.21) genutzt werden.

$$F_R = \frac{m_R(t_{+1}) - m_R(t)}{t_{+1} - t} \quad (2.21)$$

mit

$$\begin{aligned} F_R &:= \text{Flussrate des Zulaufreservoirs} && [\text{Lh}^{-1}] \\ m_R &:= \text{Masse des Zulaufreservoirs} && [\text{g}] \end{aligned}$$

Bis sich ein Gleichgewicht in einem kontinuierlichen Prozess einstellt, muss zumeist das komplette Reaktorvolumen mehrmals ausgetauscht werden. Dies kann mehrere Stunden bis Tage in Anspruch nehmen (Ziv et al., 2013). Als "Faustregel" wird oft die Dauer des Austausches des drei- bis fünffachen Reaktionsvolumens als Anhaltspunkt herangezogen ("Interdisziplinäres Praktikum - Kontinuierliche Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae*" 2008). Zur Bestimmung der Zeit, welche benötigt wird, um das Reaktionsvolumen im Bioreaktor einmal komplett auszutauschen, wird der Kehrwert der Gl.(2.13) genutzt und wird als mittlere hydraulische Verweilzeit  $\tau$  [h] bezeichnet, Gl.(2.22).

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V_L}{F} \quad (2.22)$$

Wie den Gleichungen (2.16) und (2.17) zu entnehmen ist, entspricht die Biomassekonzentration im Bioreaktor  $c_{XL}$ , der aus dem Bioreaktor ausgetragenen Biomassekonzentration  $c_{XL,aus}$ . Da im kontinuierlichen Betrieb das Reaktionsvolumen konstant ist, ergibt sich für die entstehende bzw. ausgetragene Biomasse  $\dot{m}_{XL}$  im Gleichgewichtszustand die Gl.(2.23).

Die Gl.(2.23) enthält einen „Ernteterm“, der eine Verringerung der Zellmasse und einen „Wachstumsterm“, der den Zuwachs an Zellmasse ausdrückt.

$$\dot{m}_{XL}(t) = \underbrace{F(t) \cdot c_{XL}(t)}_{\text{Ernteterm}} + \underbrace{\mu(t) \cdot m_{XL}(t)}_{\text{Wachstumsterm}} \quad (2.23)$$

Umgestellt nach der Wachstumsrate  $\mu$  erhält man die Gl.(2.24).

$$\mu(t) = \frac{\dot{m}_{XL}(t) + F(t) \cdot c_{XL}(t)}{m_{XL}(t)} \quad (2.24)$$

Die Gl.(2.24) kann in der Praxis zur Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$  in der kontinuierlichen Phase einer Kultivierung genutzt werden.

Entspricht die Zeit  $dt$  der hydraulischen Verweilzeit  $\tau$ , so entspricht auch das geförderte Volumen  $dV_F$  dem Reaktionsvolumen  $V_L$ . Daher ergibt sich für die Biomasse  $\dot{m}_{XL}$  zum Zeitpunkt  $t = \tau$  aus Gl.(2.23) die Gl.(2.25).

$$\dot{m}_{XL}(\tau) = c_{XL} \cdot V_L = m_{XL} \quad (2.25)$$

Dies zeigt, dass die Biomasse  $m_{XL}$  im Fließgleichgewicht aufgrund der Zeitinvarianz zu allen Zeitpunkten  $t$  gleichbleibend ist. Zum Zeitpunkt  $t_0$  liegt also die gleiche Menge an Biomasse vor, wie zum späteren Zeitpunkt  $t$ .

Im Modell des kontinuierlichen Bioprozesses wird angenommen, dass der verwendete Organismus während des gesamten Prozesses keinerlei Mutationen eingeht. Dies bedeutet, alle Zellen seien genetisch identisch und das Wachstum beschränke sich ausschließlich auf die, zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene, Zellzahl.

Für das Fließgleichgewicht ergibt sich somit eine konstante Verdopplungszeit  $t_d$  als auch eine konstante Generationszeit  $t_g$  (2.26).

$$t_d = t_g = \tau = \frac{1}{D} = \frac{1}{\mu} \quad (2.26)$$

Gl.(2.26) zeigt, dass sich die Biomasse innerhalb des Zeitraumes  $t = \tau$  einmal verdoppelt. Das heißt die vorliegende Zellpopulation, die sich in der Zeit  $t = \tau$  gebildet hat, ist hinsichtlich ihrer Morphologie, Physiologie und Zusammensetzung konstant und daher repräsentativ für die vorliegenden Parametereinstellungen, unter der Voraussetzung, dass diese gleichbleibend für den Zeitraum  $t = \tau$  sind.

Für die Substratmassenbilanz im Fließgleichgewicht gilt Gl.(2.27) mit einer negativen Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat.

$$\frac{dc_{SL}}{dt} \equiv 0 = D \cdot c_{SL,e,n} - D \cdot c_{SL} - r_{SL} \quad (2.27)$$

Umgestellt nach der Reaktionsgeschwindigkeit für das Substrat  $r_{SL}$  gilt die nachfolgende Gl.(2.28).

$$r_{SL} = D \cdot (c_{SL} - c_{SL,e,n}) \quad (2.28)$$

Gemäß den Gleichungen (2.2) und (2.6) erfolgt für die Biomassekonzentration im Fließgleichgewicht  $\tilde{c}_{XL}$  Gl.(2.29)

$$\tilde{c}_{XL} = Y_{X/S} \cdot (c_{SL,e,n} - \tilde{c}_{SL}) \quad (2.29)$$

Die Gleichgewichtsbiomassekonzentration ist somit von einem biologischen ( $y_{X/S}$ ) und einem operativen Parameter ( $c_{SL,e n}$ ) sowie einer Zustandsvariablen ( $\tilde{c}_{SL}$ ) abhängig.

Der Ausbeutekoeffizient  $y_{X/S}$  lässt sich im Fließgleichgewicht durch Umstellung der Gl.(2.29) nach  $y_{X/S}$  bestimmen, wodurch sich Gl.(2.30) ergibt.

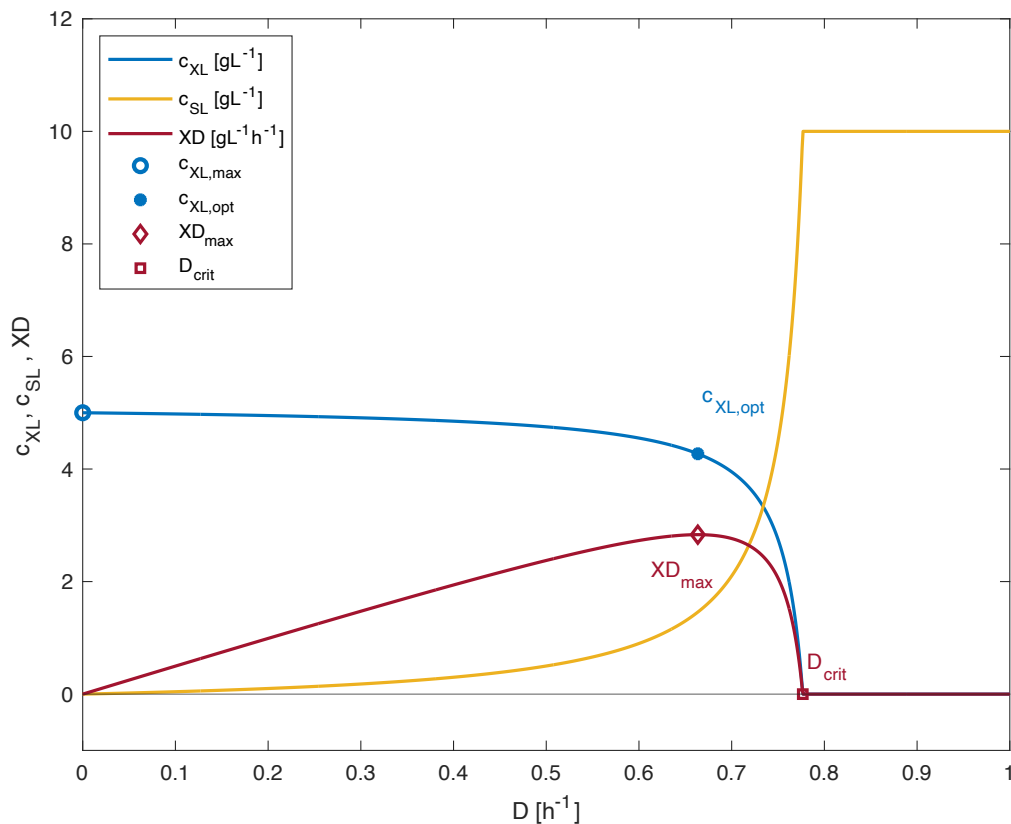
$$y_{X/S} = \frac{\tilde{c}_{XL}}{(c_{SL,e n} \tilde{c}_{SL})} \quad (2.30)$$

Durch die Kernbeziehung des Chemostaten (2.18) und unter Anwendung der Monod-Kinetik (2.3) ist die Gleichgewichtssubstratkonzentration  $\tilde{c}_{SL}$  mit Gl.(2.31) bestimmbar.

$$\tilde{c}_{SL} = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D} \quad (2.31)$$

Die grafische Darstellung der Zustandsvariablen  $c_{XL}$  und  $c_{SL}$  erfolgt über ein sogenanntes X-D-Diagramm (siehe Abbildung 5). Dabei werden die Zell- und Substratkonzentrationen gegen die jeweiligen Verdünnungsraten aufgetragen. Als weitere Größe kann die Produktivität aufgetragen werden. Diese ist das Produkt der Zellkonzentration  $c_{XL}$  und der Verdünnungsrate  $D$ .

Die Abbildung 5 zeigt eine exemplarische Darstellung eines X-D-Diagramms.



**Abbildung 5: Exemplarische Darstellung eines X-D-Diagramms.** Mit  $K_S = 0,3 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\mu_{max} = 0,8 \text{ h}^{-1}$ ,  $y_{X/S} = 0,5 \text{ gg}^{-1}$  und  $c_{SR} = 10 \text{ gL}^{-1}$ .

Mit steigender Verdünnungsrate nimmt durch Abnahme der Verbraucher auch die Substratkonzentration zu. Dies geschieht bis die Substratkonzentration  $c_{SL}$  die Zulaufreservoirkonzentration  $c_{SR}$  erreicht. Ab diesem Punkt nimmt die Zellkonzentration  $c_{XL}$  den Wert Null an, da keine Zellen mehr vorhanden sind, die Substrat verbrauchen könnten. Dieser Punkt wird auch als kritische Verdünnungsrate  $D_{crit}$  bezeichnet und lässt sich mit nachstehender Gl.(2.32) bestimmen.

$$D_{crit} = \mu_{max} \cdot \frac{c_{SL,en}}{c_{SL,en} + K_S} \quad (2.32)$$



Oftmals ist eine hohe Produktrate Ziel des Fermentationsprozesses, welche wiederum aus einer hohen Biomassekonzentration resultiert. Mit Hilfe des Produktivitätsgraphen  $XD$  (Abbildung 5) lässt sich am Maximum dessen ( $XD_{\max}$ ), die optimale Verdünnungsrate  $D_{\text{opt}}$  und Zellkonzentration  $c_{X,L,\text{opt}}$  bestimmen. Unter der allgemeinen Bedingung, dass die erste Ableitung des Graphen an einem Extrempunkt Null ist, kann die folgende Gl.(2.33) zur Bestimmung der optimalen Verdünnungsrate  $D_{\text{opt}}$  genutzt werden.

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\max} \cdot \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + c_{S,L,\text{en}}}} \right) \quad (2.33)$$

Diese Werte ermöglichen einen Bioprozess am Optimum seines Produktivitätsmaximums zu betreiben.

Während des Prozesses kann es zu Störungen kommen. Diese können auf Grundlage unterschiedlicher Faktoren resultieren und werden in „Puls-“ und „Sprungstörungen“ unterteilt. Zu einer Pulsstörung kommt es durch die Änderung einer Zustandsgröße, beispielsweise der Änderung einer Konzentration durch die Zugabe konzentrierter Substratlösungen. Bei einer Sprungstörung (*engl. shift* oder *step*) liegt die Ursache in der Änderung einer Betriebsgröße. Dies kann zum Beispiel die Einstellung der Pumpleistung und somit eine Veränderung der Verdünnungsrate bedeuten. Ebenso zählt der Wechsel des Zulaufreservoirs zu einer Sprungstörung.

Bei beiden Methoden wird zunächst das Fließgleichgewicht gestört und das System wird sich (sofern keine weiteren Störungen auftreten) allmählich wieder stabilisieren. Solche Transienten lassen sich in der Praxis nicht verhindern, da jede kontinuierliche Kultur zunächst über eine initiale Satzkultur gestartet werden muss.

Zur Erstellung eines X-D-Diagramms, ist es notwendig *shift*-Experimente, d.h. Änderungen in den Verdünnungsraten, durchzuführen. Ein Annähern an die optimale Verdünnungsrate geschieht dabei über die schrittweise Erhöhung der Verdünnungsrate, also über die Änderung eines Parameters (z. B. Pumpleistung) und somit die Veränderung der operativen Größe (z. B. Verdünnungsrate).

Betrachtet man nun die Biomassebilanz nach der Erhöhung der Verdünnungsrate, so zeigt sich, dass zu Beginn der Akkumulationsterm negativ wird. Grund dafür ist die sofortige Änderung des Konvektionsterms  $D \cdot c_{XL}$  und eine verzögerte Änderung des Reaktionsterms  $+\mu \cdot c_{XL}$ . Durch die Erhöhung der Verdünnungsrate steht den Mikroorganismen bei gleichbleibender Reservoirkonzentration eine höhere Substratkonzentration pro Zeiteinheit zur Verfügung. Die Substratkonzentration muss zunächst akkumulieren, bevor sich die zellspezifische Wachstumsrate anpassen kann. Dies ist auch in der Substratbilanz zu sehen. Hier stellt sich eine sofortige Änderung im Konvektionsterm  $+D \cdot c_{SL,e_n}$  und eine Verzögerung im Anstieg des Reaktionsterms, also im Substratverbrauch  $-\mu \cdot c_{SL}$ , ein. Schlussendlich stellt sich ein neues Fließgleichgewicht bei höherer Substratkonzentration und niedrigerer Biomassekonzentration ein, wie die Graphen im X-D-Diagramm in Abbildung 5 zeigen.

Bei Betrachtung des Monod-Modells (Gl.(2.3)) fällt auf, dass die Produktbildung vernachlässigt wird. Diese ist jedoch oft das Ziel eines Fermentationsprozesses. Daher ist eine Erweiterung des Monod-Modells erforderlich. Dazu können die Produkte zunächst in verschiedene Kategorien klassifiziert werden. Die erste Gruppe bilden Produkte, die streng an den Primärstoffwechsel gekoppelt sind. Sie können zur Energiegewinnung weiter abgebaut oder ausgeschieden werden. Hierzu zählen zum Beispiel Kohlenstoffdioxid, Acetat oder Citrat. Die zweite Gruppe umfasst Aminosäuren oder organische Säuren, welche Komponenten des primären Anabolismus sind. Wie die erste Produktgruppe, sind auch diese Substanzen weitgehend wachstumsassoziiert. Antibiotika oder Toxine sind typische Produkte, die zu den Sekundärmetaboliten zählen und somit die dritte Gruppe bilden. Diese werden hauptsächlich in der stationären Phase produziert, um den Zellen einen Überlebensvorteil zu verschaffen. Die vierte Gruppe stellen Enzyme dar, welche je nach ihrer spezifischen Funktion im Stoffwechsel der Zellen sowohl wachstums- als auch nicht wachstumsassoziiert sein können. Sie unterliegen vor allem dem physiologischen Bedarf der Zellen. Die fünfte Gruppe bilden Transformationsprodukte, welche beispielsweise aus Hydrolyse-, Synthese-, Additions-, Redox- und Isomerisationsverfahren resultieren.

#### 2.4.4 Zulaufverfahren (Fed-Batch)

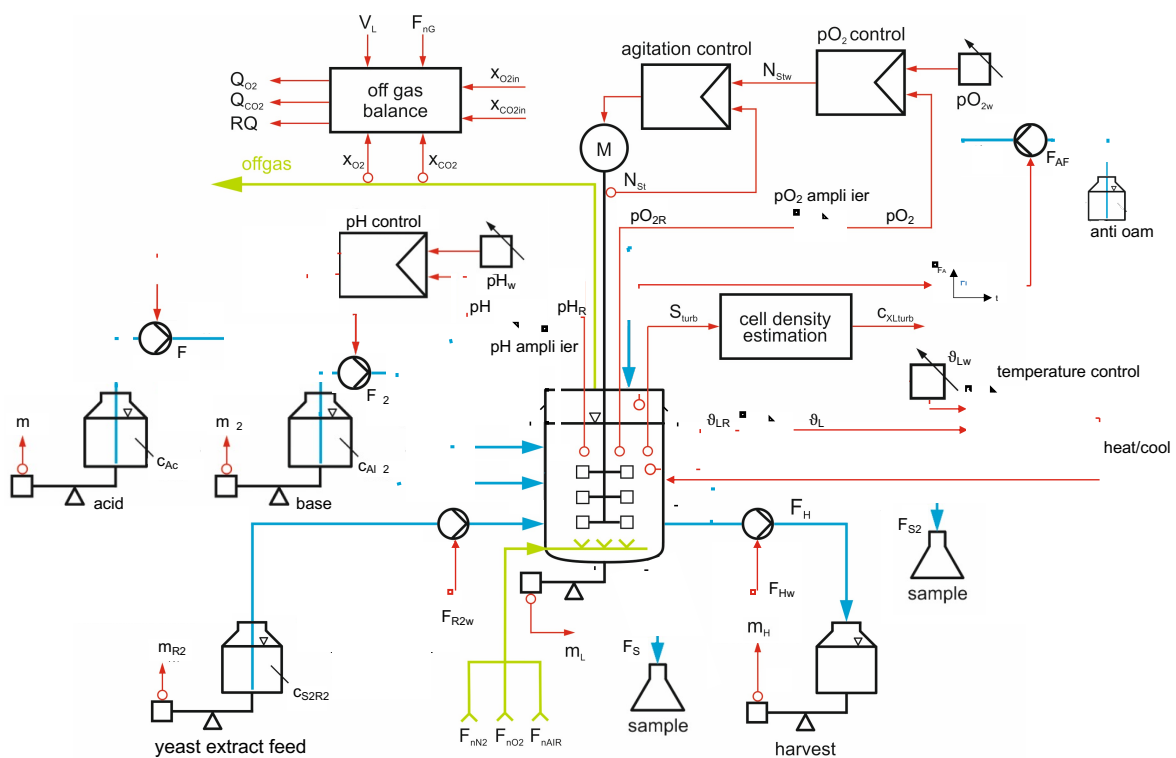
Zur Vollständigkeit wird im Folgenden das Zulaufverfahren, der sogenannte Fed-Batch, kurz erläutert. Der Fed-Batch definiert sich durch die (kontinuierliche) Zugabe von Medienkomponenten, ohne die Abfuhr von Zellsuspension. Dies hat zur Folge, dass das Reaktionsvolumen stetig zunimmt und das Volumen als Zustandsvariable hinzukommt. Auf entsprechende Formeln wird hierbei verzichtet.

Der Fed-Batch kommt zum Einsatz, wenn beispielsweise die Substratkonzentration niedrig gehalten werden muss, um eine Substrathemmung oder Katabolitenrepression der Produktsynthese zu vermeiden. Durch die Einstellung eines vorgegebenen Flussprofils oder mit Hilfe eines Regelkreises ermöglicht der Fed-Batch, dass die spezifische Substrataufnahmegeschwindigkeit unter einem kritischen Wert gehalten werden kann. Nachteilig ist zum einen der erhöhte apparative Aufwand für dieses Verfahren. Außerdem werden hohe Zelldichten, wie im Batch-Verfahren, erst zu Ende des Prozesses erreicht und die Totzeit der Produktion durch die Entleerung, Reinigung und Neubefüllung des Reaktors ist, im Vergleich zum kontinuierlichen Prozess, beim Batch und Fed-Batch länger. (Chmiel, 2011; Minihane & Brown, 1986)

### 3 DAS MULTI-BIOREAKTORSYSTEM BIOSTAT® QPLUS

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Multifermentieranlage der Firma Sartorius Stedim Systems verwendet. Sie umfasst neben einem 5 L Zellanzuchtsbioreaktor BIOSTAT® Bplus sechs weitere 1 L BIOSTAT® Qplus Bioreaktoren für Entwicklungs- und Optimierungsversuche. Zum Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus gehören ein Grundgerät mit einer digitalen Kontrolleinheit (*engl. digital control unit; DCU*), zwei Versorgungseinheiten und sechs Bioreaktoren. Eine Versorgungseinheit kann dabei bis zu drei Bioreaktoren versorgen. Diese ermöglicht die separate Begasung und Temperierung, die Regelung des pH-Wertes durch Zugabe von Säure und Base und die Eindämmung von Schaum durch Antischaummittelzugabe über dort angebrachte Pumpen. (Fricke, 2015)

Für die hier durchgeführten Versuche wurde ein 1 L BIOSTAT® Qplus Bioreaktor genutzt und die Anlagenperipherie für den kontinuierlichen Prozess entsprechend verändert. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des Bioreaktoraufbaus (siehe auch Abbildung 11, S. 44).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Anlagenperipherie für den kontinuierlichen Prozess. Quelle: Labor für Bioprozessautomatisierung, veränderte Darstellung.

Das Kulturgefäß des BIOSTAT® Qplus Bioreaktors besteht aus einem autoklavierbaren Glasgefäß mit Doppelmantel zur Temperierung und umfasst ein Arbeitsvolumen von 0,5 L bis 1 L. Ein für den BIOSTAT® Qplus Bioreaktor konzipierter Edelstahlring befindet sich zwischen Kulturgefäß und Deckel. Dieser ermöglicht den Anschluss von vier Sterilkupplungen der Firma Stäubli, sowie vier weiteren Anschlüssen über Schlaucholiven. An einem freien Deckelport (*dummy plug*) wurde ein Steigrohr auf der Höhe des Füllstandes angebracht. Dieses Steigrohr dient zum Ablauf der Zellsuspension (*harvest*) im kontinuierlichen Prozess. Der Zulauf des frischen Mediums (*feed*) erfolgt im kontinuierlichen Betrieb über eine Sterilkupplung am Edelstahlring. Die Deckelbelegung des BIOSTAT® Qplus Bioreaktors ist in der Abb. A. 1 im Anhang zu sehen.

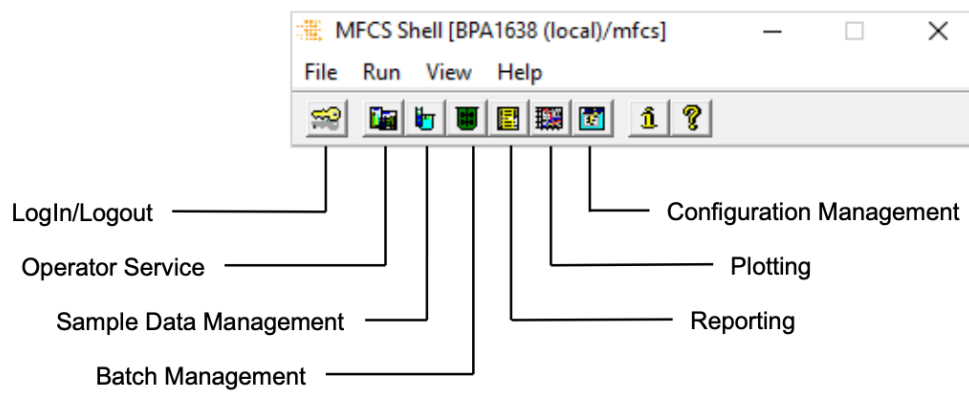
Auf die vorhandene Messtechnik, welche neben der Abgasanalytik auch die pH-, pO<sub>2</sub>- und Trübungsmessung umfasst, wird in Kapitel 3.2 Messtechnik genauer eingegangen.

Die DCU stellt ein Bindeglied zwischen Bioreaktor und dem Prozessleitsystem dar. Sie dient neben der Erfassung von Messwerten auch der Steuerung und Regelung von Prozessgrößen, der Kalibrierung der verschiedenen Sensoren und der Überwachung eingestellter Alarmkriterien. Ein in die DCU integriertes Touchpanel ermöglicht die direkte Bedienung des Bioreaktors. Über einen Computer lassen sich die meisten Einstellungen auch fernsteuern (Remote-Modus). Der Remote-Modus erfordert ein System zur Überwachung, Steuerung und Datenerfassung (*engl. supervisory control and data acquisition; SCADA*). Für Bioreaktoren der Firma Sartorius Stedim Systems dient dabei das Prozessleitsystem MFCS/win.

### **3.1 Das Prozessleitsystem MFCS/win**

Das Prozessleitsystem MFCS/win steht für *Multi Fermentor Control System for Windows* und ist eine von der Firma Sartorius entwickelte Software zur Steuerung und Regelung sowie Dokumentation von Prozessparametern. Es bietet die Möglichkeit, Automatisierungsstrategien für Bioprozesse umzusetzen und Fermentationsphasen zu planen. Während des laufenden Prozesses kann auf die Parameter jederzeit zugegriffen werden. Ebenso können zur *Online*-Verfolgung des aktuellen Prozesses graphische Darstellungen erstellt und Prozessgrößen

verändert werden. MFCS/win steht dabei in stetigem Austausch mit der digitalen Kontrolleinheit. Über ein Prozessdatennetzwerk können Prozessdaten kontinuierlich ausgetauscht werden. Der Betreiber hat dadurch die Möglichkeit, in Echtzeit auf Veränderungen des Prozesses zu reagieren. MFCS/win besteht aus Teilprogrammen, welche über die Bedienungsoberfläche (MFCS/win *shell*, Abbildung 7) angewählt werden können. Die verschiedenen Optionen werden im Folgenden kurz erläutert.



**Abbildung 7: Bedienungsoberfläche der MFCS/win shell.**

Teilprogramme von MFCS/win:

- Der *Operator Service* gibt dem Benutzer die Möglichkeit, neue Prozesse zu starten, aktuelle Prozessdaten, wie beispielsweise  $pO_2$ , Temperatur, Pumprate oder Rührerdrehzahl einzusehen und Prozessparameter manuell zu verändern.
- Das *Sample Data Management* dient zur Eintragung und Verwaltung vorgenommener Probennahmen und deren *Offline*-Daten (z. B. optische Dichte).
- Das *Batch Management* gewährt Zugriff auf die Daten von bereits beendeten Kultivierungen. Ebenso lassen sich neue Kultivierungen planen und mit dem im *Configuration Management* erstellten Rezepten verknüpfen.
- Unter der Option *Reporting* können Daten vergangener Kultivierungen für die weitere Verarbeitung in verschiedene Dateiformate exportiert werden.

- *Plotting* bietet die Möglichkeit einer visuellen Darstellung ausgewählter Parameter des laufenden oder bereits beendeter Prozesse(s).
- Das *Configuration Management* ermöglicht neue Rezepte zu erstellen oder vorhandene Rezepte einzusehen und ihre Prozessvariablen zu modifizieren. Ein Rezept beinhaltet dabei die einzelnen Fermentationsphasen eines Prozesses und arbeitet diese nacheinander ab.

### 3.2 Messtechnik

Um optimale Bedingungen im Bioreaktor zu schaffen, sind präzise Kontrollen während des Prozesses wichtig. *Online*- und *Inline*-Messungen bieten die Möglichkeit einer stetigen Prozessüberwachung und der schnellen Einflussnahme auf das Prozessgeschehen. Dazu können am Reaktor verschiedene Sonden angebracht werden, um weitere Prozessdaten zu generieren. Die am Bioreaktor Qplus installierte Messtechnik ist in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Auflistung der *Online*- und *Inline*-Messtechnik am Bioreaktor Qplus.**

Messgröße	Parameter	Sonde/Sensor	Messbereich	Hersteller
Temperatur	$\vartheta_L$	Pt100	-50-150 C	Jumo GmbH & Co. KG, Fulda, Deutschland
pH-Wert	pH	EasyFerm Plus K8325	pH 0-14	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Sauerstoff-partialdruck	pO <sub>2</sub>	341000003/ 41887034	1 ppb-40 ppm	Mettler Toledo, Columbus, USA
Turbidität	S <sub>turb</sub>	ASD19-N-EB-10	0-6 AU	optek-Danulat GmbH, Essen, Deutschland
Sauerstoff-molenbruch	xO <sub>2</sub>	BCP-O2	1-50 %	BlueSens gas sensor GmbH, Herten Deutschland
Kohlenstoff-dioxidmolenbruch	xCO <sub>2</sub>	BCP-CO2	0-25 %	

#### 3.2.1 Kalibrierung der pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde

Die Kalibrierung der Sonden findet vor jeder Kultivierung statt. Aufgenommene Kalibrierdaten (Nullpunkt und Steigung) werden in zugehörigen Kultivierungsdateien dokumentiert.

### pH-Sonde

Die potentiometrische pH-Sonde wird außerhalb des Reaktors vor dem Autoklavieren kalibriert. Dazu wird in der DCU das Menü *Calibration* aufgerufen und eine Zweipunktkalibrierung bei Raumtemperatur, welche einem Thermometer zu entnehmen ist, durchgeführt. Die Sonde wird in einem Stativ fixiert und die jeweilige Pufferlösung auf einem Magnetrührer positioniert. Im ersten Schritt der Zweipunktkalibrierung wird die Sonde in eine Pufferlösung mit pH-Wert 7,0 getaucht, um den Nullpunkt zu bestimmen. Im zweiten Schritt wird eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4,0 verwendet, um die Steigung zu erfassen. Vor und nach jedem Schritt wird die Sonde mit vollentmineralisiertem (VE) Wasser gespült. Die Kalibrierung ist beendet, wenn für beide Pufferlösungen ein stabiles Signal der Sonde festgestellt werden konnte.

### pO<sub>2</sub>-Sonde

Zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks wird eine polarographische Clark-Elektrode eingesetzt. Vor der Kalibrierung wird die Sonde für mindestens zwei Stunden unter Kultivierungsbedingungen (30 °C, 400 min<sup>-1</sup>) in VE-Wasser polarisiert. Die Zweipunktkalibrierung wird nach dem Autoklavieren im Kulturmedium durchgeführt. Zur Nullpunktbestimmung wird der Bioreaktor zunächst mit Stickstoff  $F_{nN_2} = 100\%$  begast und anschließend die Steigung, mit Hilfe der Begasung mit Druckluft  $F_{nAIR} = 100\%$ , bestimmt.

### 3.2.2 *Inline*-Messung der optischen Zelldichte

Eine 1-Kanal-NIR-Absorptionssonde ermöglicht die *Inline*-Messung der Zelldichte. Diese bietet gegenüber der *Offline*-OD-Messung den Vorteil, dass die Zelldichte stetig aufgenommen und verfolgt werden kann. Die Funktionsweise beruht dabei auf einer LED, welche Licht in der Wellenlänge von 840 bis 910 nm in die Flüssigkeit emittiert, während die Sonde die daraus resultierende Absorption misst. Als Detektor dient eine Fotodiode aus Silizium, welche von der Fermentationsbrühe durch ein Saphirglas hermetisch abgetrennt ist.

Eine Korrelation zwischen dem analog aufgezeichneten Trübungssignal  $S_{\text{turb}}$  und der offline analysierten Zelldichte aus der Biotrockenmasse  $c_{\text{XL,BTM}}$  ermöglicht die Bestimmung der Zellkonzentration  $c_{\text{XL,turb}}$  während des Prozesses. Hierbei werden



die Daten der Trübung auf die Zeitachse der *offline* bestimmten Zelldichten zum Zeitpunkt  $t$  interpoliert und ein exponentieller Ansatz mit zwei Korrelationsparametern  $k_1$  und  $k_2$  zur Bestimmung gewählt.

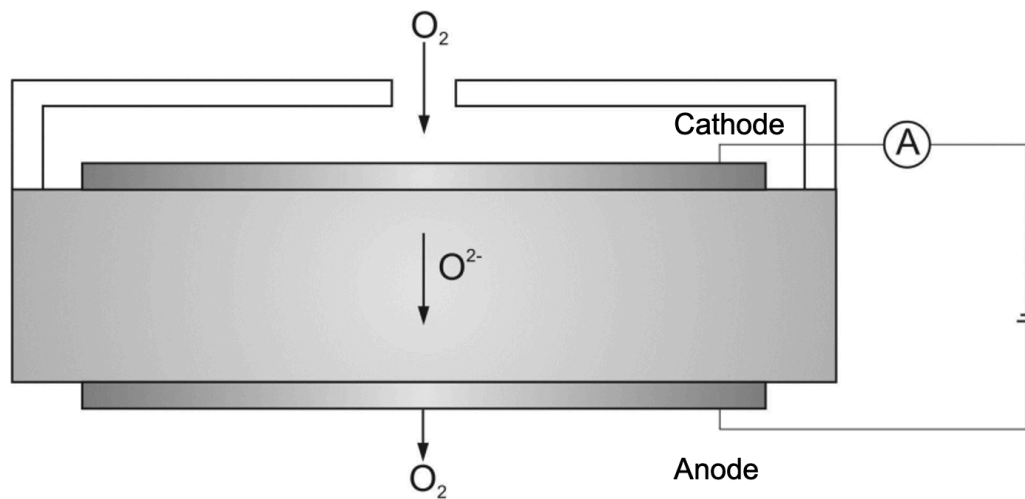
$$c_{XL,turb}(t) = k_1 \cdot (e^{k_2 \cdot S_{turb}(t_i)} - 1) \quad (3.1)$$

Unter Anwendung eines least-squares-Algorithmus nach dem Simplex-Verfahren (Nelder & Mead, 1965) mit der Software MATLAB® der Fa. The MathWorks GmbH, USA können nun die Korrelationsparameter  $k_1$  und  $k_2$  bestimmt und die Zellkonzentration  $c_{XL,turb}$  berechnet werden.

### 3.2.3 Abgasanalytik und Gasphasenbilanzierung

Zur *Online*-Bestimmung der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidmolenbrüche ( $x_{O_2}$  und  $x_{CO_2}$ ) ist die Multifermenteranlage mit Abgassensoren der Fa. BlueSens gas sensor GmbH, ausgestattet. Diese ermöglichen eine *Online*-Messung direkt im Abgasstrom des Bioreaktors. Die Sensoren unterscheiden sich dabei in ihrer Messmethodik.

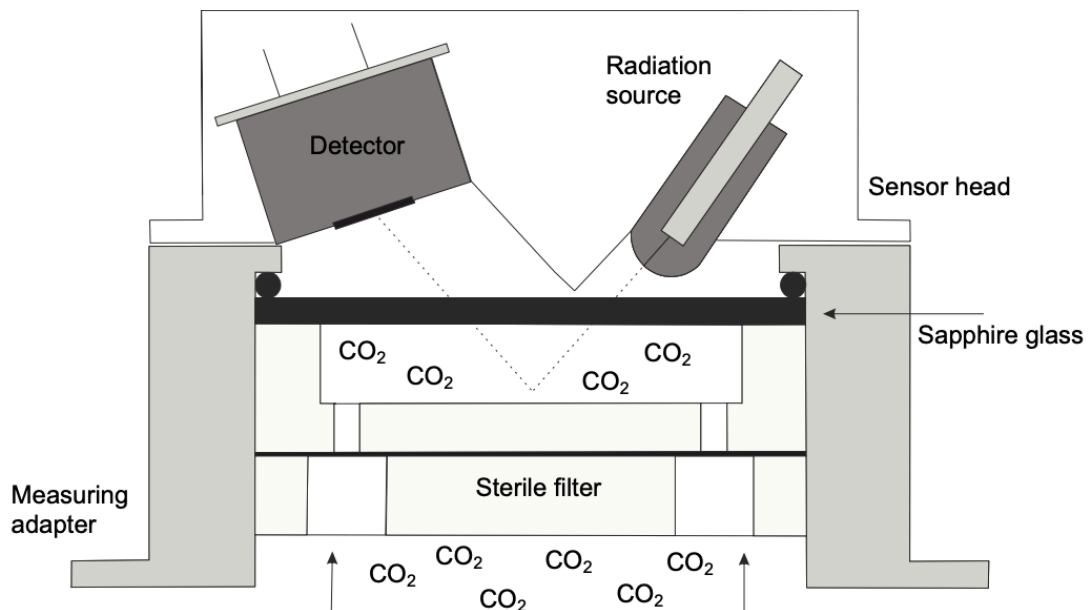
Der Sensor zur Bestimmung des Sauerstoffmolenbruchs basiert auf einem elektrochemischen Prinzip mit einer Sauerstoffpumpzelle. Dabei werden durch Anlegen einer Spannung negativ geladene Sauerstoffionen  $O^{2-}$  von der Kathode zur Anode gepumpt (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Prinzip zur Bestimmung des Sauerstoffmolenbruchs.** (Fricke, 2015)

Die Kathode wird daraufhin mit einer undurchlässigen Gasbarriere abgeschirmt, wodurch sich beim Erhöhen der Spannung ein Sättigungsstrom einstellen kann. Dieser ist ein Maß für die in der Umgebung vorliegende Sauerstoffkonzentration.

Die folgende Abbildung 9 zeigt das Messprinzip des Kohlenstoffdioxidsensors, welcher auf der Infrarotspektroskopie basiert. Im Sensorkopf befindet sich eine Strahlungsquelle und ein Detektor. Die Strahlungsquelle strahlt dabei Licht in die Messzelle ein, welches von den im Analytgas anwesenden  $CO_2$ -Molekülen absorbiert und dadurch abgeschwächt wird. Die Intensität des Infrarotlichts kann dann vom Detektor erfasst werden und ist damit ein Maß für die im Abgas vorliegende Kohlenstoffdioxidkonzentration.



**Abbildung 9: Prinzip zur Bestimmung des Kohlenstoffdioxidmolenbruchs.** (Fricke, 2015)

Die Messzelle ist vom Sensorkopf durch ein Saphirglas abgedichtet, um direkten Kontakt zwischen Analyten und Detektor zu verhindern. Ein Sterilfilter am Eingang zur Messzelle dient dem Rückhalt von Partikeln und dem Eindringen von Wasser. Zur Vorbeugung von Kondensatbildung im Messadapter befindet sich neben dem Detektor und der Strahlungsquelle auch eine Heizung im Sensorkopf.

Die Abgasanalytik ermöglicht die globale Gasphasenbilanzierung des Fermentationsprozesses. So können die Prozesswerte, wie beispielsweise der Respirationsquotient RQ oder die volumetrischen Ein- und Austragsraten  $Q_i$  bestimmt werden.

Mit Hilfe der Abgasmolenbrüche kann der Respirationsquotient,

$$\begin{aligned} \text{RQ}(t) &= \frac{Q_{\text{CO}_2}(t) \cdot M_{\text{O}_2}}{M_{\text{CO}_2} \cdot Q_{\text{O}_2}(t)} & (3.2) \\ &= \frac{x_{\text{CG}}(t) \cdot [1 - x_{\text{OG, en}}(t)] - x_{\text{CG, en}}(t) \cdot [1 - x_{\text{OG}}(t)]}{x_{\text{OG, en}}(t) \cdot [1 - x_{\text{CG}}(t)] - x_{\text{OG}}(t) \cdot [1 - x_{\text{CG, en}}(t)]} \end{aligned}$$

mit

$Q_I$	:= volumetrische Gaseintragsrate der Komponente I	[gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$M_I$	:= Molmasse der Komponente I	[gmol <sup>-1</sup> ]
$x_{IG}$	:= Ausgangsmolenbruch der Gaskomponente I	[-]
$x_{IG, en}$	:= Eingangsmolenbruch der Gaskomponente I	[-],

bestimmt werden.

Die maximalen volumetrischen Eintragsraten für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid

$Q_{I\text{max}}$ ,

$$Q_{I\text{max}}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_I}{V_{nM} \cdot V_L(t)} \quad (3.3)$$

mit

$F_{nG}$	:= Gesamtbegasungsrate unter Normbedingungen	[Lh <sup>-1</sup> ]
$M_I$	:= Molmasse der Komponente I	[gmol <sup>-1</sup> ]
$V_{nM}$	:= Molvolumen des Gases unter Normbedingungen	[Lmol <sup>-1</sup> ]
$V_L$	:= Reaktionsvolumen	[L],

geben an, wieviel Masse dem Organismus pro Volumen und Zeiteinheit zur Verfügung steht.

Anschließend können mit dem Respirationsquotienten RQ die volumetrische Eintragsrate für Sauerstoff  $Q_{O_2}$

$$Q_{O_2}(t) = \frac{\dot{m}_{OG,e n}(t) - \dot{m}_{OGaus}(t)}{V_L(t)} = Q_{O_2max}(t) \cdot \frac{x_{OG,e n}(t) - x_{OG}(t)}{1 - [1 - RQ(t)] \cdot x_{OG}(t)} \quad (3.4)$$

sowie die volumetrische Austragsrate für Kohlenstoffdioxid  $Q_{CO_2}$

$$Q_{CO_2}(t) = \frac{\dot{m}_{CG,aus}(t) - \dot{m}_{CG,e n}(t)}{V_L(t)} \quad (3.5)$$

$$= Q_{CO_2max}(t) \cdot \frac{x_{CG}(t) - x_{CG,e n}(t)}{1 - [1 - RQ^{-1}(t)] \cdot x_{CG}(t)}$$

mit

$\dot{m}_{I,G,e n}$  := Eingangsmassenstrom der Komponente I in die Gasphase [gh<sup>-1</sup>]

$\dot{m}_{I,G,aus}$  := Ausgangsmassenstrom der Komponente I aus der Gasphase [gh<sup>-1</sup>]

berechnet werden.

## 4 MATERIAL

Das folgende Kapitel umfasst alle relevanten Informationen zu den eingesetzten Materialien und Geräten.

### 4.1 Organismus

In dieser Arbeit dient der Stamm *Bacillus licheniformis* DSM 13 mit der Deklaration ATCC 1458 als Modellorganismus. Der Organismus wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) des Leibniz-Instituts bezogen.

### 4.2 Chemikalien

Die Tabelle 2 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien auf.

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Hersteller, Artikelnummer und Charge.**

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Charge
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	5210.3	152182069
Ameisensäure ROTIPURAN® ≥98 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4724.3	168270127
Ammoniak 25 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	5460.1	476251466
Anthron	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.01468.0010	K48580168 714
Citronensäure ≥99,5 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	X863.2	319285213
D-Mannose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4220.1	178265356
D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6887.5	449288914
di-Kaliumhydrogen- phosphat ≥99 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	P749.2	290298676
DL-Arabinose ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8954.1	148270153
Entschäumer	Schill+Seilacher Struktol GmbH, Hamburg, Deutschland	J 673	02041; KA00501
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3738.5	403205399

Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K928.4	429110479
Hefeextrakt Fermentation H	Leiber GmbH, Bramsche, Deutschland	100434	17005684
Hefeextrakt FM803	ANGEL YEAST CO.,LTD, Yichang, China	FM803	2018013102B6
Hefeextrakt FNI 103	Lallemand Bio-Ingredients Inc., Montreal Kanada	33103-44-26	12906129
Hefeextrakt, pulverisiert für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2363.2	446250133
Kaliumdihydrogen- phosphat ≥99 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3904.1	027253659
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	X964.2	-
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9265.1	486252534
<i>ortho</i> - Phosphorsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6366.1	260290073
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8986.1	337259477
Schwefelsäure 96 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9316.2	134210532

### 4.3 Geräte

Die verwendeten Gerätschaften dieser Arbeit sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Typ und Hersteller.**

Geräte	Typ	Hersteller
Analysenwaage	LA 230 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie	D-7000	Hitachi Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	VS-C10	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mehrkanal-Dosierpumpe	REGLO <i>Digital</i> MS- 2/12 / ISM596D	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Mehrkanal- Kassettenpumpe mit Planetenantrieb	IPC-N 8 / ISM936	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Mikroplatten-Reader	INFINITE 200 PRO	Tecan Austria GmbH, Männedorf, Schweiz

Mikroskop	DME	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge	1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
pH-Meter	pH 211 Microprocessor	HANNA instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	bbi-biotech GmbH, Berlin, Deutschland
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Heraeus, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham plc, Little Chalfont, GB
Standautoklav	VX-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Trockenschrank	-	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultratiefkühlschrank	HFU B Series	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

#### 4.4 Hefeextrakte

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Hefeextrakte unterschiedlicher Hersteller verwendet. Dabei handelte es sich um Produkte von Angel Yeast Co., LTD, Lallemand, Leiber GmbH und Carl Roth GmbH + Co. KG (siehe Tabelle 2). Informationen über die Inhaltsstoffe der Hefeextrakte, sofern diese vorhanden sind, sind im Anhang unter A.2 einzusehen. Alle vier Hefeextrakte sind Produkte der Bäcker-/Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Für diese Arbeit ist vor allem der Vergleich der vorhandenen Kohlenhydrate in den jeweiligen Hefeextrakten von Bedeutung, da in den Versuchen keine weitere Kohlenstoffquelle zugefüttert wird. Für die Hefeextrakte der Firma Angel Yeast Co., LTD, der Carl Roth GmbH + Co. KG und Lallemand sind keine Angaben über den Kohlenhydratgehalt vorhanden. Ausschließlich die Leiber GmbH gibt einen Kohlenhydratgehalt (total) von 13,1 g / 100 g an. Davon sind 0,1 g / 100 g Zucker.

Die Hefeextrakte können auf Basis ihrer vorhandenen Aminosäuren verglichen werden, da auch diese als Energiequelle dem Organismus dienen können. Für den Hefeextrakt der Fa. Carl Roth liegen hierfür keine Daten vor.



In Tabelle 4 sind die vorhandenen Aminosäuren in den drei weiteren Hefeextrakten gelistet.

**Tabelle 4: Enthaltene Aminosäuren in den verwendeten Hefeextrakten.**

Hefeextrakt	Aminosäuren
Angel	Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val
Leiber / Lallemand	Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val

Der Hefeextrakt der Fa. Angel unterscheidet sich von den anderen beiden (Lallemand und Leiber) durch das Fehlen der Aminosäure Tryptophan. Die vorliegende Form der Aminosäuren (frei bzw. gebunden) sowie deren Menge ist in den Datenblätter der Hefeextrakte im Anhang unter A.2 aufgelistet.

Außerdem enthalten die Hefeextrakte diverse Vitamine und Mineralstoffe.

Der Organismus *B. licheniformis* ist aufgrund seines Metabolismus fähig, Tryptophan zu synthetisieren. Außerdem ist es ihm möglich, alle für sich essentiellen Aminosäuren herzustellen, sowie einige als Kohlenstoffquelle zu nutzen. (Schwarzer, 2010; Voigt et al., 2015)

#### 4.5 Zusammensetzung 10x Phosphatpuffer

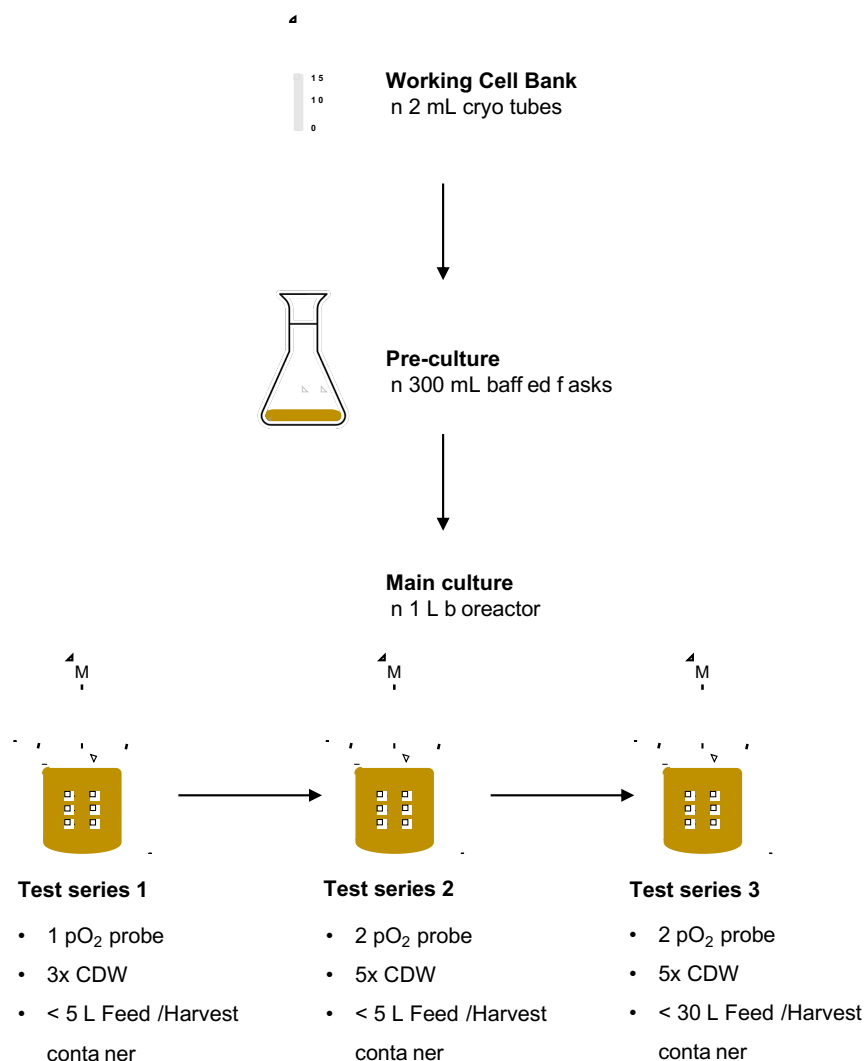
Für die Vorversuche wird eine zehnfachkonzentrierte Phosphatpuffer-Stocklösung (Tabelle 5) als Puffersystem genutzt. Diese setzt sich aus di-Kaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat zusammen und wurde mit 25 %iger Ammoniaklösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des 10x Phosphatpuffers.**

Komponente		c [gL <sup>-1</sup> ]
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	50
di-Kaliumhydrogenphosphat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	53
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	133

## 5 METHODEN

Das folgende Kapitel umfasst die Methoden, welche für die vorliegende Arbeit relevant sind. Zunächst wird auf die Herstellung einer Working-Zellbank und die Vorversuche eingegangen. Diese dienen als Vorbereitung für die Hauptversuche und um erste Informationen zu sammeln. Die nachstehende Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung des Vorgehens von der Working-Zellbank über die Vorkulturen bis hin zu den Hauptversuchsreihen.



**Abbildung 10: Übersicht des generellen Vorgehens für die Fermentationen in Form eines Flussdiagramms.**

## 5.1 Working-Zellbank

Die Working-Zellbank (WCB) diente zum Animpfen der Vorkulturen. Die Herstellung einer WCB erfolgte über das Ansetzen einer Vorkultur mit einer Master-Zellbank des Stammes *B. licheniformis* DSM 13. Dazu wurden 100 mL eines komplexen Mediums ( $12,5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt +  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose + 10x Phosphatpuffer) mit 50  $\mu\text{L}$  der Kryokultur angeimpft und bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 160 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute; rpm*) im Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Die Medienbestandteile und benötigten Gefäße wurden separat autoklaviert und anschließend unter laminarem Luftstrom in einer Sicherheitswerkbank gemischt. 15 mL der Zellsuspension wurden in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 15 mL 50 %igem Glycerin versetzt und mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers kurz gemischt. Die Aliquotierung erfolgte zu je 1 mL in sterile Kryoröhrchen, welche entsprechend beschriftet und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden. Die Working-Zellbank wurde zur Kontrolle auf Kontamination mikroskopisch untersucht und auf Agarplatten mit *lysogeny broth* (LB)-Medium ausgestrichen.

Für den Ausstrich auf den Agarplatten wurden zunächst 20 g LB-Medium der Fa. Roth in 1 L VE-Wasser gelöst. Die Formulierung des LB-Mediums nach Lennox beinhaltet  $5 \text{ gL}^{-1}$  Natriumchlorid,  $5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt und  $10 \text{ gL}^{-1}$  Trypton. Dazu wurde Agar-Agar entsprechend hinzugefügt, um eine 1,5 %ige Agar-Lösung zu erhalten. Für einen weiteren Ansatz wurde LB-Medium aus den Einzelkomponenten angesetzt und mit  $5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt der Fa. Lallemand supplementiert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer 3 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend auf ca.  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt und unter laminarem Luftstrom in einer Sicherheitswerkbank in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur abgekühlt und nach Erstarren des Mediums konnte der Ausstrich der Working-Zellbank mit Hilfe einer sterilen Impföse erfolgen. Anschließend wurden die Platten bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wärmeschrank für mehrere Tage inkubiert.

Zur Kontrolle wurden 10  $\mu\text{L}$  der Working-Zellbank auf einen Objektträger pipettiert und mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung untersucht.

## 5.2 Vorversuche

Um erste Erkenntnisse über die Hefeextrakte zu gewinnen, wurden Vorversuche in Schikanekolben durchgeführt. Diese dienten der Datengenerierung und Konzeptionierung der Hauptversuche.

Um die wachstumsfördernde Leistung der verschiedenen Hefeextrakte vergleichen zu können, wurden Vorversuche in 300 mL Schüttelkolben durchgeführt. Zum einen wurden Ansätze mit  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose und jeweils einem Hefeextrakt in den Konzentrationen  $5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $10 \text{ gL}^{-1}$ ,  $12,5 \text{ gL}^{-1}$  und  $15 \text{ gL}^{-1}$  vorbereitet. Zum anderen gab es Ansätze mit ausschließlich  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt als Nährmedium.

Die Medienbestandteile wurden getrennt autoklaviert und anschließend in entsprechender Konzentration gemischt. Als Puffersystem diente ein 10x Phosphatpuffer mit pH 7 (Tabelle 5), von dem jeweils 2,5 mL den Kultivierungsansätzen hinzugegeben wurde. Das Volumen in den Schüttelkolben für die Vorversuche betrug 100 mL. Es wurde mit  $50 \mu\text{L}$  der Working-Zellbank des *B. licheniformis* DSM 13 Wildtyps inokuliert. Die WCB wurde dazu bei Raumtemperatur aufgetaut und nach Gebrauch verworfen. Die Ansätze wurden anschließend bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $160 \text{ min}^{-1}$  in einem Schüttelinkubator für bis zu drei Tagen inkubiert.

Bei jeder Probennahme wurde 1 mL der Bakteriensuspension steril unter laminarem Luftstrom in einer Sicherheitswerkbank aus den Schikanekolben entnommen und die Zellkonzentration, wie unter 5.6.2 beschrieben, bestimmt.

## 5.3 Kalibrierung der Zufütterpumpe

Zur Einstellung der Verdünnungsraten im kontinuierlichen Prozess war es notwendig, die Zufütterpumpen (ISM936 und ISM596D) zu kalibrieren. Dazu wurden Schläuche (PharMed BPT, Cole-Parmer GmbH) mit verschiedenen Innendurchmessern (1,30 mm, 2,06 mm und 2,76 mm) in der jeweiligen Mehrkanalpumpe getestet. Alle getesteten Schläuche haben eine Wandstärke von 0,85 mm und eine Länge von 400 mm.

Für die Kalibrierung der Pumpen wurde ein Becherglas mit VE-Wasser gefüllt. Ein weiteres, leeres Becherglas wurde auf einer Waage positioniert und die Waage tariert. Der zu testende Schlauch wurde in die Pumpe eingelegt und vollständig mit

VE-Wasser befüllt, indem manuell VE-Wasser gepumpt wurde. Die Drehzahleinstellung wurde zunächst auf 100 % eingestellt. Die Pumpe wurde gestartet und das Waagensignal nach 5 Minuten notiert. Anschließend wurden die Drehzahleinstellungen 75 %, 50 %, 25 % und 10 % eingestellt, für 5 Minuten gepumpt und jeweils die geförderte Masse notiert. Dies ermöglichte die Bestimmung der Flussrate [ $Lh^{-1}$ ] und der Verdünnungsrate [ $h^{-1}$ ] (siehe Gl.(2.13)).

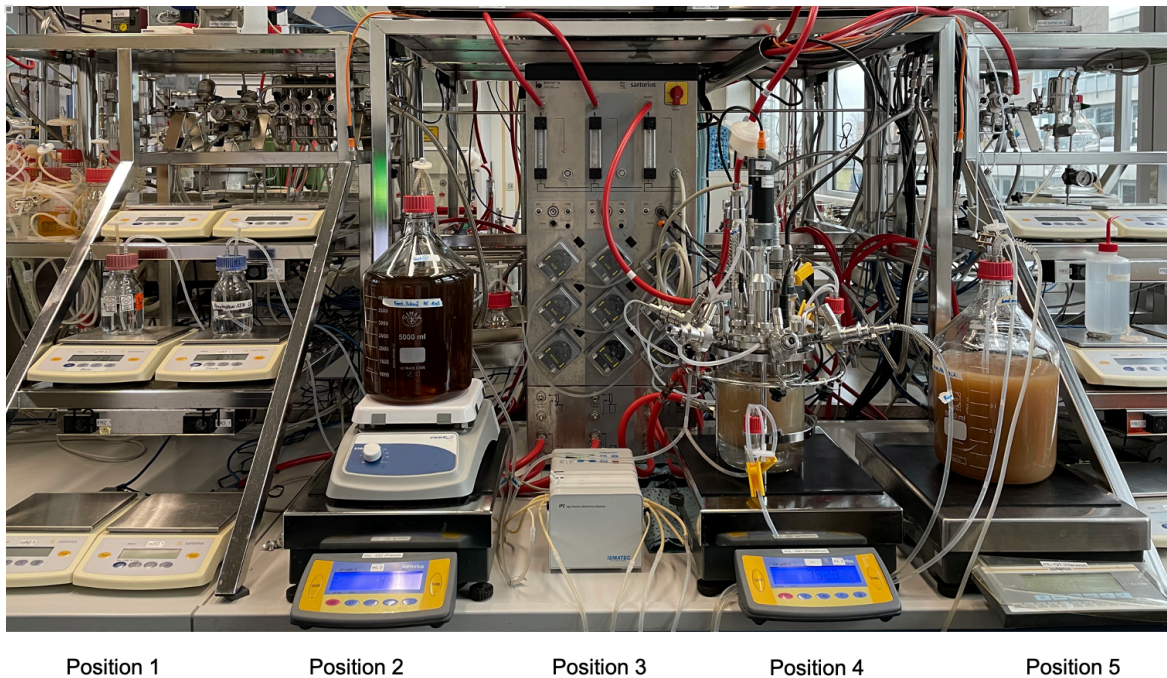
#### **5.4 Fermentation an der Multifermentieranlage**

Die Hauptversuche können in drei Versuchsreihen gegliedert werden. Im Folgenden wird auf den grundsätzlichen Aufbau der Anlage, die generellen Kultivierungsbedingungen und den allgemeinen Ablauf der Fermentationen näher eingegangen. Änderungen in der Anlagenperipherie und der Probenanalytik in den jeweiligen Versuchsreihen werden anschließend entsprechend erläutert.

##### **5.4.1 Aufbau der Qplus-Anlage für den kontinuierlichen Betrieb**

Die Hauptversuche fanden an der BIOSTAT® Qplus-Multifermentieranlage statt. Der generelle Aufbau dieser Anlage wurde bereits im Kapitel 3 erklärt. Für den kontinuierlichen Betrieb wurden von jeder Versorgungseinheit zwei der drei Bioreaktoren entfernt und mit den notwendigen Elementen (Zulaufreservoir, Pumpsystem, Erntegefäß) für den kontinuierlichen Prozess ausgestattet.

Der grundsätzliche Anlagenaufbau für die Hauptversuche ist in der nachfolgenden Abbildung 11 gezeigt.



**Abbildung 11: Anlagenaufbau der Qplus-Anlage für den kontinuierlichen Betrieb.** Die Titrationsmittel zur pH-Wert-Regulierung sind auf Position 1 positioniert. Auf Position 2 befindet sich das Zulaufreservoir. Das Pumpsystem befindet sich auf Position 3. Position 4 und 5 belegen der Bioreaktor Qplus 1 L und das Erntegefäß.

Für den kontinuierlichen Prozess wurden als Titrationsmittel zur Korrektur des pH-Wertes 1,5 molare Phosphorsäure (T1) und 12,5 %ige Ammoniaklösung (T2) eingesetzt. Für die Massenbilanz und zur Bestimmung der volumetrischen Verbrauchsrate an Korrekturmitteln  $Q_{T1}$ ,  $Q_{T2}$  [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] wurden diese auf Waagen positioniert und deren Signale über MFCS/win aufgezeichnet.

Das Zulaufreservoir wurde auf einer Waage und einem Magnetrührer positioniert. Der Magnetrührer dient dabei zur kontinuierlichen Durchmischung des Zulaufreservoirs und sorgt somit für eine homogene Zusammensetzung, um das Absetzen von Schwebstoffen, welche sich im Hefeextrakt befinden können, vorzubeugen.

Die Förderung des Zulaufs und der Abtransport von Zellsuspension wurde über ein Pumpsystem realisiert. Dabei kam entweder eine Mehrkanal-Kassettenpumpe mit Planetenantrieb (IPC-N 8 / ISM936) oder Mehrkanal-Dosierpumpen (REGLO Digital MS-2/12 / ISM596D) der Firma Cole-Parmer GmbH zum Einsatz (Position 3 in Abbildung 11).

Der Bioreaktor verfügt über einen Edelstahlring mit vier Sterilkupplungen, welche zum Teil mit einem Tauchrohr versehen sind. Dort sind die Korrekturmittel (Säure, Base, Antischaum) sowie das Zulaufreservoir angeschlossen (Abb. A. 1). Dabei ist zu beachten, dass das Zulaufreservoir gegenüberliegend vom Steigrohr für die Ernte liegt. Dies beugt dem direkten Abtransport von frischem Nährmedium über das Ernte-Steigrohr vor. Das Antischaummittel wird an einem Sterilport ohne Tauchrohr angeschlossen, damit dieses direkt an der Oberfläche auftretenden Schaum zerstören kann. Eine Füllstandssonde ist für das Auslösen der Antischaummittelpumpe am Deckel des Bioreaktors angebracht.

Die Temperatur wird mit Hilfe einer Temperatursonde über den Glasdoppelmantel geregelt.

Zur Vorbeugung wurden ab Versuchsreihe 2 (siehe 5.5), zwei  $pO_2$ -Sonden angebracht, um im Falle eines Ausfalls einer Sonde die Anschlüsse wechseln und weiterhin ein funktionierendes Signal aufzeichnen zu können.

Des Weiteren ist eine Turbiditäts- und pH-Sonde (siehe 3.2 Messtechnik) sowie ein Abgaskühler am Deckel des Bioreaktors montiert. Die Begasung mit Druckluft erfolgt über einen PTFE-Luftfilter (Sartorius Midisart® 2000).

Das Rührwerk besteht aus einem abnehmbaren Motor und einer Rührwelle mit zwei Sechsblasscheibenrührern.

Für die Probennahmen sind zwei Probennahmegefäße vorhanden. Ein Probennahmegefäß ist für die Batch-Phase und über ein Steigrohr am Reaktordeckel befestigt. Das zweite Probennahmegefäß ist über ein Y-Schlauchverbinder an den Ernteschlauch angeschlossen, um möglichst wenig Volumen während des kontinuierlichen Prozesses bei der Probennahme zu verlieren.

Das Erntegefäß besitzt eine STT-Schnellkupplung, welche den Anschluss eines zweiten Gefäßes ermöglicht, um das erste, welches direkt mit dem Bioreaktor verbunden ist, zu leeren oder um ein frisches Erntegefäß anzuschließen.

#### 5.4.2 Vorbereitung des Inokulums

Das Inokulum des Bioreaktors wurde in zwei 300 mL Schikanekolben mit je 100 mL Nährmedium angesetzt. Das Nährmedium bestand aus  $10 \text{ gL}^{-1}$  des jeweiligen Hefeextraktes,  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose sowie  $2,5 \text{ mL } 10\text{x Phosphatpuffer pH } 7$ . Die benötigten Materialien wurden separat autoklaviert ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 Minuten, 2 bar) und die Vorkulturen wurden steril mit  $50 \text{ }\mu\text{L}$  der *B. licheniformis*-Kryokultur angeimpft.

Die Vorkulturen wurden am Tag vor der Inokulation (ca. 16 h vor Inokulation) angesetzt, um die Zellen möglichst in der exponentiellen Phase in den Reaktor überführen zu können. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 160 rpm im Schüttelinkubator.

#### 5.4.3 Vorbereitung des Bioreaktors

Nachdem in den Vorversuchen die verschiedenen Hefeextrakte getestet wurden, konnte aufgrund dieser Ergebnisse eine Hefeextraktkonzentration für den kontinuierlichen Prozess ausgewählt werden. Diese wurde als Zulaufreservoirkonzentration  $c_{S2R2}$  festgelegt und betrug  $10 \text{ gL}^{-1}$ .

Das Zulaufreservoir wurde mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt vorbereitet und anschließend autoklaviert. Die Harvest-Gefäße wurden im Inneren angefeuchtet und leer autoklaviert.

Der Bioreaktor wurde zum Trieren der Waage vor dem Autoklavieren vollständig an die Anlage angeschlossen, so dass alle Schläuche, Verbindungen und Sonden sowie der Motor befestigt und eingebaut wurden. Der Doppelmantel wurde vollständig befüllt und das Waagensignal des Bioreaktors wurde tariert. Der Bioreaktor wurde vor dem Autoklavieren mit  $500 \text{ mL}$  Hefeextrakt mit einer Konzentration von  $15 \text{ gL}^{-1}$  befüllt, um nach Zufügen von Glukose und Inokulum eine Endkonzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  bei einem Reaktionsvolumen  $V_L$  von  $0,75 \text{ L}$  zu erreichen. In eine separate Schottflasche wurden  $15 \text{ g}$  Glukose eingewogen und mit  $100 \text{ mL}$  VE-Wasser aufgefüllt. Zur Sicherstellung einer sterilen Überführung der Glukose in den Bioreaktor nach dem Autoklavieren wurde die Schottflasche mit einer Sterilkupplung versehen. Eine weitere Schottflasche mit Sterilkupplung wurde leer autoklaviert und diente zur Überführung des Inokulums in den Bioreaktor.



Die pH-Sonde wurde außerhalb des Bioreaktors, wie unter 3.2.1 beschrieben, kalibriert und vor dem Autoklavieren wieder in den Bioreaktor eingebaut.

Vor der Kultivierung wurde kontrolliert, ob ausreichend Korrekturmittel (Base, Säure, Antischaummittel) vorhanden sind und wenn nötig, neu angesetzt. Alle Korrekturmittel verfügten über eine Sterilkupplung. Säure und Antischaummittel wurden, anders als die Base wegen ihrer Flüchtigkeit, bei jeder Kultivierung erneut autoklaviert.

Für das Autoklavieren des Bioreaktors wurden die Schlauchklemmen der Probennahmegefäße geöffnet und alle Filter, elektrischen Anschlüsse und die Rührwelle mit Alufolie versehen, um Schäden durch Kondensat zu vermeiden. Der Doppelmantel wurde vor dem Autoklavieren geleert, die Schläuche des Doppelmantels wurden entfernt und mit Schutzkappen aus Gummi versehen, um das Glasgewinde nicht zu beschädigen. Alle Sterilkupplungen wurden mit einem durchlässigen Gegenstück versehen und der Abgasfilter für den Druckausgleich geöffnet. Das Rohr des Pt100 der Kempe Sonde wurde mit VE-Wasser gefüllt und die Temperatursonde des Autoklaven eingeführt. Alle Schläuche wurden vor und nach dem Autoklavieren auf Unversehrtheit kontrolliert, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren. Nach dem Autoklavieren wurden alle Sterilkupplungen unverzüglich mit undurchlässigen Gegenstücken bestückt, sowie der Abluftfilter geschlossen. Ebenso wurden alle Schlauchklemmen geschlossen.

Im ersten Schritt wurde die separat autoklavierte Glukose über eine Sterilkupplung angeschlossen und die Ventilbrücke für 10 Minuten mit Heißdampf sterilisiert. Parallel wurden die Korrekturmittel angeschlossen und ebenfalls dampfsterilisiert. Anschließend konnte die Glukose in den Bioreaktor überführt werden und die pO<sub>2</sub>-Sonden konnten wie unter 3.2.1 beschrieben, kalibriert werden. Die Schläuche der Korrekturmittel wurden manuell vorgepumpt und die Schalter der Pumpen anschließend auf „auto“ gestellt. Die Schaumregelung des Reaktors wurde an der DCU im Menü „Main“ unter „FOAM“ auf „auto“ gesetzt.

Der Doppelmantel des Bioreaktors wurde über die Versorgungseinheit per Schalter manuell mit Wasser befüllt.

#### 5.4.4 Inokulation

Vor der Inokulation wurden die Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor manuell über das Prozessleitsystem MFCS/win eingestellt. Der Bioreaktor wurde auf 30 °C temperiert und der pH-Wert auf pH 7 eingestellt. Zur Durchmischung wurde der Rührer zunächst auf 400 min<sup>-1</sup> gestellt. Es wurde eine Probe des Mediums genommen, bevor die Inokulation stattfand.

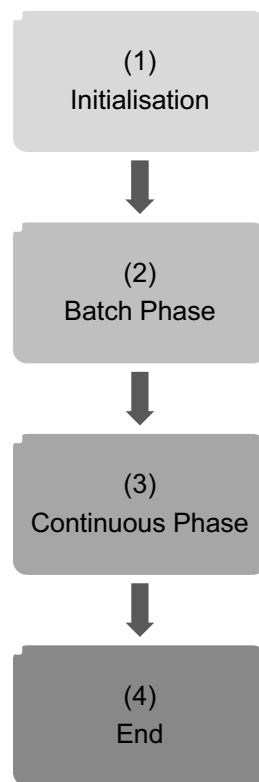
Die Vorkulturen wurden aus dem Schüttelinkubator entnommen und steril unter einer Sicherheitswerkbank in einem der beiden Schikanekolben gemischt. Anschließend wurden 150 mL der Vorkultur in einem autoklavierten Messzylinder abgemessen und in die leere Schottflasche mit Sterilkupplung überführt. Das Inokulum wurde an den Bioreaktor angeschlossen und die Ventilbrücke für 10 Minuten mit Heißdampf sterilisiert. Im Prozessleitsystem MFCS/win wurde das entsprechende Rezept (siehe nachfolgender Abschnitt) für die Kultivierung gestartet und das Inokulum in den Bioreaktor gepumpt. Unverzüglich wurde eine Probe des frisch angeimpften Mediums genommen.

Der genaue Probennahmeprovorgang und die weitere Verarbeitung der Fermentationsproben werden im nachfolgenden Abschnitt 5.6 *Offline-Analytik* beschrieben.

#### 5.4.5 Fermentationsrezept MFCS/win

Für den Batch und die kontinuierlichen Fermentationen wurde ein gemeinsames Rezept im *Configuration Management* des Prozessleitsystems MFCS/win erstellt. Dieses Rezept basiert auf einem bereits vorhandenen Rezept eines Fed-Batch-Prozesses, welches entsprechend für den kontinuierlichen Prozess ergänzt wurde. Im Nachfolgenden wird genauer auf die Funktionen des Rezepts eingegangen.

Die vier Hauptphasen (siehe Abbildung 12) gliedern sich in die Initialisierung (1), die Batch-Phase (2), die kontinuierliche Phase (3) und das Ende (4).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Ablaufs des automatisierten Kultivierungsprozesses.**

Die Initialisierungsphase dient dazu, den Reaktor für den Prozess vorzubereiten, so dass die Inokulation stattfinden kann. Die nachstehende Tabelle 6 zeigt die für den Prozess gesetzten Sollwerte der Prozessparameter.

**Tabelle 6: Sollwerte der Prozessparameter und -variablen in der Initialisierungsphase.**

Prozessparameter/-variable	Sollwert
pH	7,0
pO <sub>2</sub>	30 %
F <sub>nAR</sub>	90 Lh <sup>-1</sup>
ϑ <sub>L</sub>	30 C
N <sub>St</sub>	400 min <sup>-1</sup>

Auf die Initialisierungsphase folgt mit der Inokulation die Batch-Phase. Die Sollwerte bleiben hier unverändert. Die pO<sub>2</sub>-Regelung wird gestartet. Sofern der pO<sub>2</sub>-Wert über dem Sollwert liegt, dreht der Rührer auf seiner Minimaldrehzahl (400 min<sup>-1</sup>). Der Rührer befindet sich in einer Kaskadenregelung mit dem pO<sub>2</sub>-Regler. Dies

bedeutet, dass die Rührerdrehzahl bei Bedarf ansteigt, um den  $pO_2$ -Wert auf 30 % halten zu können ( $pO_2$ /Drehzahl-Regelung).

Die Batch-Phase (2) soll beendet werden, wenn eine stationäre Phase im Zellwachstum ersichtlich wird oder ein Peak im Sauerstoffpartialdruck und des pH-Wertes auftritt. Der Phasenübergang von der Batch- zur kontinuierlichen Phase (3) wird manuell bestätigt. Die Zufütterpumpe wird aktiviert und kann manuell über den *Operator Service* auf die gewünschte Drehzahl eingestellt werden. Die kontinuierliche Phase wird so lange fortgeführt, bis sie vom Nutzer manuell beendet wird. Anschließend wird die Phase (4) Ende eingeleitet. In dieser Phase werden alle Prozessparameter und -variablen, sowie Regler auf Null gesetzt. Zur Beendigung der Kaskadenregelung muss zunächst der  $pO_2$ -Regler beendet werden, bevor der Rührer auf Null gesetzt werden kann. Der Prozess ist somit beendet.

Das komplette Rezept ist im Anhang unter A.3 einzusehen.

#### 5.4.6 Batch-Phase

In der Batch-Phase wurden zu Beginn und Ende des Batches Proben genommen. Das Ende der Batch-Phase ist erreicht, sobald oben genannte Kriterien eingetreten sind. Je nach Versuchsreihe wurden auch während der Batch-Phase Proben für die Zellkonzentrationsbestimmung genommen. Die Verarbeitung der Proben wird im Kapitel 5.6 *Offline-Analytik* erläutert. Die Kultivierungsbedingungen sind dem vorangegangenen Abschnitt zu entnehmen.

#### 5.4.7 Chemostat-Phase

Beim Übergang von Batch- zu kontinuierlicher Phase ist zumeist noch Glukose vorhanden, welche nicht verstoffwechselt wurde. Daher wurde mindestens eine Verweilzeit abgewartet, bis das komplette Reaktionsvolumen ausgetauscht war, so dass sichergestellt werden konnte, dass die komplette Glukose verbraucht bzw. ausgewaschen wurde. Nach Ablauf dieser „Übergangsphase“ wird der Start der kontinuierlichen Phase definiert.

Die Einstellung der Verdünnungsrate erfolgte über die manuelle Einstellung der Drehzahleinstellung der Zufütterpumpe. Es wurde mit niedrigen Verdünnungsraten begonnen und nach Einstellung eines Gleichgewichts die Verdünnungsrate erhöht.

Das Gleichgewicht wurde erreicht, wenn ein (möglichst) stationäres Signal der Turbidität festgestellt werden konnte. Nach Eintritt des Gleichgewichts erfolgte die Probennahme nach 0 min, 30 min und 60 min. Diese Proben stehen stellvertretend für die jeweilige Verdünnungsrate und werden im Folgenden als „Gleichgewichtsproben“ bezeichnet.

Zum Teil wurden auch Proben genommen, bevor sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte, um beispielsweise die Zellkonzentration zu prüfen. Diese Proben wurden im Folgenden aber weitestgehend vernachlässigt. Die weitere Behandlung der Proben wird unter 5.6 erläutert.

Der Prozess wurde beendet, sobald ausreichend Daten aufgenommen wurden.

## 5.5 Versuchsreihen

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden mehrere Experimente durchgeführt, welche sich in verschiedene Versuchsreihen gliedern lassen. Die Versuchsreihen definieren sich über gewisse Prozesseigenschaften, die im Folgenden entsprechend erläutert werden. Veränderungen in den jeweiligen Versuchsreihen beruhen auf Erkenntnissen und Informationen aus den vorangegangenen Experimenten und dienen der Optimierung des Prozesses. Auf die jeweiligen Optimierungsmaßnahmen wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

Die Bezeichnung der durchgeführten Fermentationen ist wie folgt:

K = kontinuierliche Fermentation

1, 2, ... = Nummer des Prozesses

L, LM = Hefeextrakt Leiber (L), Lallemand (LM)

Beispiel: die zweite kontinuierliche Fermentation des Hefeextraktes der Firma Leiber wird als **K2L** bezeichnet.

### 5.5.1 Versuchsreihe 1

Der Versuchsreihe 1 werden die Fermentationen K1L und K2L zugeordnet. Die Fermentation K1L wird im Folgenden nicht weiter berücksichtigt, da sie ausschließlich als Testlauf der Anlage diene.

In der Versuchsreihe 1 wurde nur eine  $pO_2$ -Sonde verwendet, die Deckelbelegung war ansonsten wie in Abb. A. 1 dargestellt. Der freie Deckelport war mit einem Blindstutzen verschlossen. Die Zu- und Ablaufgefäße umfassten ein Volumen von bis zu 5 Litern.

Proben wurden zu Beginn und Ende der Batch-Phase genommen, sowie während der kontinuierlichen Phase und im Gleichgewicht. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der Biotrockenmasse und eine Doppelbestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Neben der Zellkonzentrationsbestimmung erfolgten vier *Offline*-Analysemethoden zur Ermittlung der Substratkonzentration. Neben der chromatographischen Analyse (siehe 5.6.3) wurden eine Fluoreszenzanalyse, eine Gesamtkohlenhydratanalyse sowie eine Analyse freier Aminostickstoffe durchgeführt.

Die Fluoreszenzanalyse wurde in einem Mikroplatten-Reader (INFINITE 200 PRO) der Firma Tecan Austria GmbH durchgeführt. Gesamtkohlenhydrat- und Aminostickstoffanalyse erfolgten in einer Einmalküvette mit Hilfe eines Photometers. Während die Fluoreszenzanalyse auf der Eigenfluoreszenz des Hefeextraktes basiert, sind sowohl die Gesamtkohlenhydrat- als auch die Aminostickstoffanalyse kolorimetrische Analysen, welche auf Farbreaktionen basieren. Die verschiedenen Analysemethoden waren notwendig, um zunächst ermitteln zu können, welche Methode zielführende Ergebnisse liefert. Im Folgenden wird nicht weiter auf diese Analysemethoden eingegangen.

### 5.5.2 Versuchsreihe 2

Der zweiten Versuchsreihe können die Fermentationen K3L und K1LM zugeordnet werden. Die Fermentation K3L musste aufgrund erhöhter Mengen an Antischaummittel abgebrochen werden und wird daher nicht weiter betrachtet.

Eine Optimierungsmaßnahme im Vergleich zur Versuchsreihe 1 war die Anbringung einer zweiten  $pO_2$ -Sonde, wie der Deckelbelegung in Abb. A. 1 zu entnehmen ist. Des Weiteren wurden Fünffachbestimmungen der Zellbiotrockenmasse (BTM) durchgeführt. So stand ausreichend Überstand zur Analyse der Fermentationsproben zur Verfügung.

### 5.5.3 Versuchsreihe 3

Die Versuchsreihe 3 beinhaltet die Fermentationen K4L und K2LM. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchsreihen wurden für diese Fermentationen zusätzlich größere Zu- und Ablaufgefäße verwendet. Die Zulaufgefäße umfassten ein Füllvolumen von 20 L und ermöglichten Fermentationen mit höheren Verdünnungsraten, so dass ausreichend Zulaufreservoir über Nacht zur Verfügung stand. Für den Ablauf wurde ein 30 L Edelstahlbehälter genutzt und auf dem Boden vor der Anlage positioniert. Aufgrund des hohen Gewichtes des Edelstahlbehälters, konnte in diesen Fermentationen kein Waagsignal für den Ablauf aufgezeichnet werden.

Es wurde ebenfalls eine Fünffachbestimmung der Zellbiotrockenmasse und eine Doppelbestimmung der optischen Dichte durchgeführt.

Die Tabelle 7 fasst die Eigenschaften der jeweiligen Versuchsreihen zusammen.

**Tabelle 7: Übersicht der Eigenschaften in den Versuchsreihen.**

Fermentation	Versuchsreihe	Anzahl BTM-Proben	Volumen Zu- und Ablaufgefäß [L]	Pumpsystem	Ø Schlauch [mm]	Anzahl pO <sub>2</sub> -Sonden
K1L	1	3	< 5	IPC-N 8	1,30	1
K2L	1	3	< 5	IPC-N 8	1,30	1
K3L	2	5	< 5	IPC-N 8	2,06	2
K4L	3	5	< 30	ISM596D	1,30	2
K1LM	2	5	< 5	IPC-N 8	2,06	2
K2LM	3	5	< 30	ISM596D	1,30	2

Die Tabelle 7 zeigt alle durchgeführten kontinuierlichen Fermentationen auf. Weiß hinterlegte Fermentationen wurden für die weitere Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Grau hinterlegte Fermentationen werden im Folgenden genauer betrachtet.

Die folgende Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Fermentationen sowie die jeweiligen Sollwerte der Verdünnungsraten  $D_w$  und deren Dauer im Kultivierungsprozess auf.

**Tabelle 8: Übersicht der Fermentationen und der Sollwerte der Verdünnungsraten sowie deren Dauer.**

Fermentation	Sollwert der jeweiligen Verdünnungsrate $D_{iw}$ [ $h^{-1}$ ]		Dauer der Verdünnungsrate [h]
K2L	D <sub>1</sub>	0,070	120,1
	D <sub>2</sub>	0,080	73,95
	D <sub>3</sub>	0,090	95,95
	D <sub>4</sub>	0,100	71,82
	D <sub>5</sub>	0,110	71,74
	D <sub>6</sub>	0,120	67,43
	D <sub>7</sub>	0,135	23,98
	D <sub>8</sub>	0,150	23,92
K4L	D <sub>1</sub>	0,250	22,06
	D <sub>2</sub>	0,300	45,45
	D <sub>3</sub>	0,350	26,85
	D <sub>4</sub>	0,400	44,91
	D <sub>5</sub>	0,450	29,16
	D <sub>6</sub>	0,525	20,79
	D <sub>7</sub>	0,600	23,43
	D <sub>8</sub>	0,702	23,06
	D <sub>9</sub>	0,972	24,9
K1LM	D <sub>1</sub>	0,100	48,17
	D <sub>2</sub>	0,130	90,52
	D <sub>3</sub>	0,150	53,20
	D <sub>4</sub>	0,170	112,3
	D <sub>5</sub>	0,200	29,30
	D <sub>6</sub>	0,300	19,50
K2LM	D <sub>1</sub>	0,400	17,97
	D <sub>2</sub>	0,475	25,66
	D <sub>3</sub>	0,575	21,69
	D <sub>4</sub>	0,650	28,64
	D <sub>5</sub>	0,700	22,03
	D <sub>6</sub>	0,812	22,62
	D <sub>7</sub>	0,934	7,781

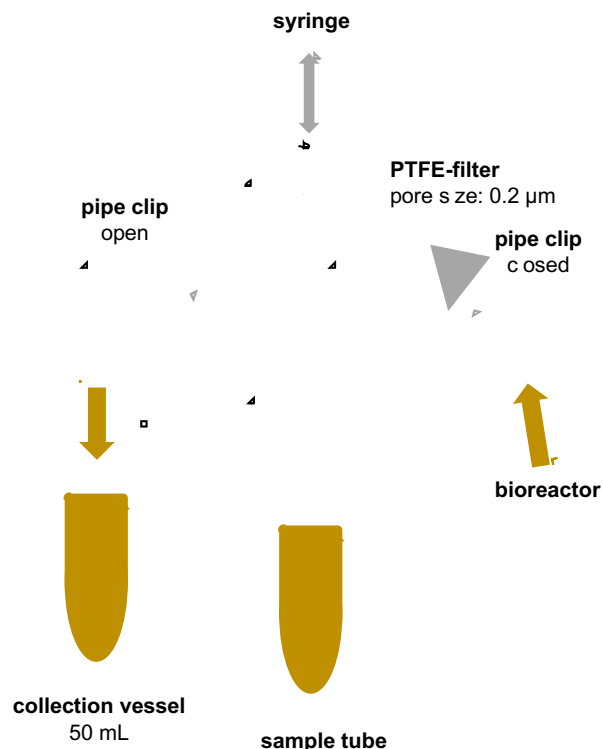


## 5.6 Offline-Analytik

Während der Fermentation wurden Proben für die *Offline*-Analytik genommen. Die Methoden der *Offline*-Analytik werden im Folgenden erläutert.

### 5.6.1 Probennahme

Die Probennahme erfolgte über ein Probennahmegefäße (*sample tube*), welches mit zwei Schläuchen und Schlauchklemmen versehen ist. Ein Schlauch ist dabei mit dem Reaktor verbunden, während der andere vom Probennahmegefäß zu einem 50 mL Sammelgefäß (*collection vessel*) führt. Ein weiterer Schlauch ist mit einem Filter versehen, auf dem eine Spritze montiert werden kann (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Probennahme.** Die Darstellung zeigt den Zustand der Probennahme, wenn die Probe vom Probennahmegefäß in das Sammelgefäß gepumpt wird. Dabei ist die Schlauchklemme zwischen Bioreaktor und Probennahmegefäß geschlossen, während die Schlauchklemme vom Probennahmegefäß zum Sammelgefäß geöffnet ist.

Im Normalzustand, d. h. während des Prozessbetriebs, sind beide Schlauchklemmen geschlossen. Zur Probenahme wird eine Spritze auf dem Filter angebracht und die Schlauchklemme zwischen Bioreaktor und Probennahmegefäß

geöffnet. Durch das Aufziehen der Spritze entsteht ein Unterdruck im Probennahmegefäß, wodurch die Bakteriensuspension aus dem Reaktor in das Probennahmegefäß überführt werden kann. Um die Bakteriensuspension vom Probennahmegefäß in das Sammelgefäß zu überführen, wird die Schlauchklemme zum Bioreaktor geschlossen und die Schlauchklemme zum Sammelgefäß geöffnet. Die Luft in der Spritze wird nun über den sterilen Filter zurück in das Probennahmegefäß gedrückt, wodurch die Probe in das Sammelgefäß überführt wird. Das erste Aliquot einer jeden Probennahme von ca. 5 mL wird in einem 50 mL Sammelgefäß aufgefangen und verworfen, da es ausschließlich dazu dient Rückstände aus dem Probennahmeschlauch zu entfernen. Das zweite Aliquot von ca. 5 bis 10 mL dient der Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmasse.

#### 5.6.2 *Offline*-Bestimmung der Zellkonzentration

Die Methode der optischen Dichtemessung zur Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte photometrisch und ist eine Streulichtmessung. Dazu wurden die Fermentationsproben, wenn nötig, mit vollentmineralisiertem Wasser so verdünnt, dass sie im linearen Bereich des Photometers zwischen 0,1 und 0,3 AU lagen. Zur Messung wurden 1 mL Einmalküvetten verwendet und gegen VE-Wasser (Nullwert) gemessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das restliche Aliquot wurde zur Biotrockenmassebestimmung verwendet.

Mikroreaktionsgefäße (MRG) mit einem Volumen von 1,5 mL wurden für die Bestimmung der Leermasse  $m_{\text{MRG},0}$  für mindestens 24 h bei 80 °C im Trockenschrank geöffnet getrocknet und anschließend mit geschlossenem Deckel auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen. Nach der Probennahme wurden die Mikroreaktionsgefäße mit je 1 mL Bakteriensuspension gefüllt und bei  $14.800 \text{ min}^{-1}$  für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Analytik bei -20 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde für mindestens 24 h bei 80 °C im Trockenschrank mit geöffnetem Deckel getrocknet. Zur Bestimmung der Gesamtmasse des Mikroreaktionsgefäßes mit Zellpellet  $m_{\text{MRG,tot}}$  wurden die Mikroreaktionsgefäße geschlossen und auf Raumtemperatur gekühlt, bevor ihr Gewicht bestimmt wurde. Dabei wurden stets Einmalhandschuhe getragen. Je nach

Versuchsreihe erfolgte eine Dreifach- bzw. Fünffachbestimmung. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Die Biotrockenmasse  $c_{XL,BTM}$ ,

$$c_{XL,BTM}(t) = \frac{m_{MRG,tot}(t) - m_{MRG,0}}{V_{Probe}} \quad (5.1)$$

mit

$$\begin{aligned} m_{MRG,tot} &:= \text{Gesamtmasse Mikroreaktionsgefäß + Zellpellet} && [\text{g}] \\ m_{MRG,0} &:= \text{Leermasse des Mikroreaktionsgefäßes} && [\text{g}] \\ V_{Probe} &:= \text{Probenvolumen} && [\text{L}], \end{aligned}$$

ist eine gravimetrische Methode zur Bestimmung der Zellkonzentration und lässt sich mit Gl.(5.1) bestimmen.

Der Zusammenhang von optischer Dichte und Biotrockenmasse kann über den Proportionalitätsfaktor  $K_{X/OD}$  ausgedrückt werden. Der Proportionalitätsfaktor lässt sich durch Auftragung der Daten der Biotrockenmasse gegen die Daten der optischen Dichte aus der Steigung bestimmen.

$$c_{XL,OD}(t) = K_{X/OD} \cdot OD(t) \quad (5.2)$$

mit

$$\begin{aligned} K_{X/OD} &:= \text{Proportionalitätsfaktor} && [\text{gL}^{-1}\text{AU}^{-1}] \\ OD &:= \text{optische Dichte bei 600 nm} && [\text{AU}] \end{aligned}$$

und  $K_{X/OD} = 0,41 \text{ gL}^{-1}\text{AU}^{-1}$ .

Der Proportionalitätsfaktor wurde in den Fermentationen K2L, K4L, K1LM und K2LM bestimmt und gemittelt. Für die Fermentationen K2L und K4L beläuft sich der

Proportionalitätsfaktor auf  $0,4103 \text{ gL}^{-1}\text{AU}^{-1}$  bzw.  $0,4033 \text{ gL}^{-1}\text{AU}^{-1}$  mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,9933 bzw. 0,9729. Der Proportionalitätsfaktor für die Fermentationen K1LM und K2LM liegt bei  $0,4085 \text{ gL}^{-1}\text{AU}^{-1}$  bzw.  $0,4129 \text{ gL}^{-1}\text{AU}^{-1}$  mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,9792 bzw. 0,9883. Zugehörige Diagramme sind in dieser Arbeit nicht gezeigt.

### 5.6.3 Analyse der Kohlenhydrate und organischen Säuren per HPLC

Im Hefeextrakt und in der Fermentationsbrühe enthaltene Kohlenhydrate und organische Säuren wurden *offline* mit Hilfe einer Ionenausschlusschromatographie in einem Hochleistungsflüssigkeitsverfahren analysiert. Dies ermöglichte sowohl die Bestimmung der verbrauchten als auch produzierten Kohlenhydrate und organischen Säuren.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl. high performance liquid chromatography*; HPLC) ist ein chemisches Analyseverfahren zur Trennung nicht-flüchtiger Substanzen, welches zur Identifizierung und Quantifizierung (mit Hilfe von Internen Standards) dient. Dabei wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit der flüssigen mobilen Phase (Eluent) unter hohem Druck durch die feste stationäre Phase in der Trennsäule gepumpt und chromatographisch getrennt.

Für die Bestimmung der Kohlenhydrate und organischen Säuren in den Hefeextrakten und im Überstand der Fermentationsproben, wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanlage (Hitachi LaChrom, Fa. Merck) mit einer sulfonierten Polystyrol-Divinylbenzol-Säule (IOA-1000) der Firma Hichrom Limited (Hauptsäule) verwendet. Zum Schutz der Hauptsäule wurde ein Carbo-H-Vorsäule der Firma Phenomenex® (4·3,0) mm genutzt, um Verunreinigungen und Substanzen welche irreversibel an die Säulenmatrix binden, zu filtern.

Die nachstehende Tabelle 9 umfasst die Einzelteile der HPLC-Anlage sowie deren Modellnummern.

**Tabelle 9: Aufbau der Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanlage.**

Einzelteile der HPLC-Anlage	Modellnummer
Automatischer Probennehmer ( <i>autosampler</i> )	L-7250
Brechungsindex-Detektor	L-7490
Diodenarraydetektor ( <i>diode array detector, DAD</i> )	L-7455
Pumpsystem	L-7100
Säulenofen	L-7360
Schnittstelle ( <i>interface</i> )	D-7000

Der Säulenofen wurde auf 60 °C temperiert. Als Eluent wurde 5 mM Schwefelsäure angesetzt und steril filtriert (Porengröße  $\leq 45 \mu\text{m}$ ). Zum Equilibrieren der Säule wurde mit dem Eluenten bei  $0,1 \text{ mLmin}^{-1}$  gespült, bis ein konstantes Signal im Brechungsindex-Detektor festzustellen war.

Für die Probenanalytik wurden mehrere Standards gewählt, welche Anhaltspunkte über die in den Hefeextrakten vorhanden Kohlenhydraten und organischen Säuren, geben sollen. Die folgende Tabelle 10 zeigt die Liste der getesteten Standards in der Konzentration  $5 \text{ gL}^{-1}$ .

**Tabelle 10: Übersicht der Standards für die Kohlenhydrat- und organischen Säuren-Analytik per HPLC.**

Standard	
Acetat	Glukose
L(-)-Äpfelsäure	$\alpha$ -Lactose
DL-Arabinose	D-Mannose
Bernsteinsäure	Milchsäure
Citrat	Propionsäure
Formiat	Pyruvat

Des Weiteren wurden von den Hefeextrakten (Leiber, Lallemand) Verdünnungen für eine Standardreihe vorbereitet. Die Konzentrationen hierfür sind der nachstehenden Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11: Übersicht der Konzentrationen der Hefeextrakte für die Standardreihen für die Kohlenhydrat- und organischen Säuren-Analytik per HPLC.**

Standard	Konzentrationen [gL <sup>-1</sup> ]
Hefeextrakte (Leiber, Lallemand)	25,0
	10,0
	7,5
	5,0
	2,5
	2,0
	1,0
	0,5

Zur Probenvorbereitung wurden zunächst die Überstände der Fermentationsproben bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle zu analysierenden Proben und Standards wurden mit einer 0,5 M Schwefelsäure angesäuert, um eine Konzentration von 5 mM in den Proben zu erreichen. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 14.000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert, um ausgefallene Probenbestandteile abzutrennen. Mit Hilfe einer 1 mL Spritze wurde der Überstand der Proben abgenommen und durch einen 0,2 µm Nylonfilter in 1,5 mL Glasgefäße (HPLC-Vials) mit 0,2 mL Mikroinsätze gefüllt. Die HPLC-Vials wurden mit einem Schraubverschluss inklusive Septum verschlossen.

Nachdem ein konstantes Signal durch das Equilibrieren der Säule festzustellen war, konnte die Messung gestartet werden. Die Methode umfasst eine Flussrate von 0,4 mLmin<sup>-1</sup> und benötigt pro Probe 40 Minuten. Das automatische Injektionsvolumen beträgt dabei 25 µL. Nach Beendigung der Messung wurde die Säule ausgebaut und in 5 mM Schwefelsäure gelagert. Die Anlage wurde nach Ausbau der Säule und Ausschalten des Säulenofens mit 20 %igem Ethanol gespült.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Überprüfung der Working-Zellbank

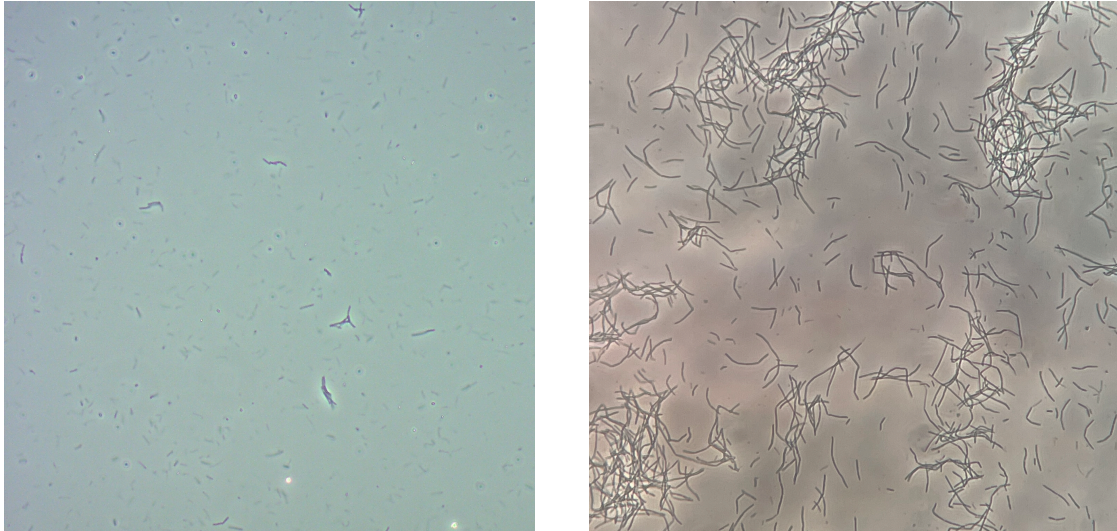
Zur Überprüfung der Working-Zellbank auf Kontaminationen und Vitalität wurde die Kryokultur auf Petrischalen ausgestrichen und mikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen in Abbildung 14 zeigen mit *B. licheniformis* bewachsene Petrischalen nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C im Wärmeschrank.



**Abbildung 14: Kolonien von *B. licheniformis* auf Agarplatten.** Links auf LB-Medium mit Agar-Agar. Rechts auf LB-Medium mit Agar-Agar und Hefeextrakt der Fa. Lallemand.

In Abbildung 14 (links) sind die beigefarbenen Kolonien des *B. licheniformis* zu erkennen. Ebenso wird die krustige Struktur des Organismus in Abbildung 14 deutlich. Eine rot-braune Färbung der Kolonien ist in Abbildung 14 (rechts) sichtbar. Kontaminationen durch Pilze oder Hefen sind in beiden Ansätzen nicht festzustellen.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Working-Zellbank in Abbildung 15 zeigen die stäbchenförmigen Zellen des *B. licheniformis*.



**Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen der *B. licheniformis* DSM 13-Working-Zellbank bei 400-facher Vergrößerung.**

Neben den einzelnen Stäbchen sind auch verkettete Stäbchen und punktförmige Zellen in den mikroskopischen Aufnahmen zu sehen.

## 6.2 Vorversuche

In den Vorversuchen wurde der Einfluss der vier Hefeextrakte auf das mikrobielle Wachstum getestet. Die Tabelle 12 zeigt eine Übersicht aller Ansätze mit den jeweiligen getesteten Hefeextraktkonzentrationen sowie die Glukosekonzentration. Des Weiteren sind die erreichten Maximalwerte der Zellkonzentrationen aufgelistet, sowie die Kultivierungszeit als diese gemessen wurden.



**Tabelle 12: Übersicht der maximalen Zellkonzentration in den Vorversuchen mit den jeweiligen Hefeextrakten.**

Hefeextrakt	Konzentration Hefeextrakt [gL <sup>-1</sup> ]	Konzentration Glukose [gL <sup>-1</sup> ]	max. Zellkonzentration [gL <sup>-1</sup> ]	Kultivierungszeit [h]
Angel	5	20	2,378	44
	7,5		2,332	65
	10		4,535	24
	12,5		3,943	44
	15		4,859	29
	10	-	3,143	45
Roth	5	20	0,481	44
	7,5		1,151	65
	10		2,547	24
	12,5		1,362	23
	15		1,443	29
	10	-	-	-
Leiber	5	20	3,406	41
	7,5		4,379	42
	10		4,900	24
	12,5		5,392	24
	15		7,052	22,5
	10	-	3,157	29
Lallemand	5	20	1,664	17
	7,5		2,353	24
	10		8,770	24
	12,5		4,034	42
	15		4,670	26,5
	10	-	2,257	27

Bei einer Konzentration von 5 gL<sup>-1</sup> Hefeextrakt und 20 gL<sup>-1</sup> Glukose konnte in allen Ansätzen in den ersten 6 h kein Wachstum nachgewiesen werden. Im Ansatz mit 5 gL<sup>-1</sup> Angel-Hefeextrakt setzte das Wachstum erst nach 16 h ein. Der Maximalwert der Zellkonzentration konnte nach 44 h Kultivierung gemessen werden und liegt bei 2,378 gL<sup>-1</sup>. Auch der Ansatz mit 7,5 gL<sup>-1</sup> Angel-Hefeextrakt und 20 gL<sup>-1</sup> Glukose

zeigte erst nach 18 h Wachstum und erreichte nach 65 h eine Maximalkonzentration von  $2,332 \text{ gL}^{-1}$ .

Gleiches gilt für die Ansätze des Roth-Hefeextraktes. In den Ansätzen mit  $5 \text{ gL}^{-1}$  und  $7,5 \text{ gL}^{-1}$  des Hefeextraktes der Fa. Roth und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose dauerte die Anlaufphase (*lag*-Phase) bis zu 16 h an. Nach 44 h konnte im Ansatz mit  $5 \text{ gL}^{-1}$  ein Maximalwert der Zellkonzentration von  $0,481 \text{ gL}^{-1}$  gemessen werden, im Ansatz mit  $7,5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt lag die Zellkonzentration nach 65 h bei  $1,151 \text{ gL}^{-1}$ . Der Ansatz mit  $5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt der Fa. Lallemand und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose zeigte nach 17 h Kultivierung einen Maximalwert der Zellkonzentration von  $1,664 \text{ gL}^{-1}$  auf, während mit der höheren Konzentration von  $7,5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt der Fa. Lallemand eine Konzentration von  $2,353 \text{ gL}^{-1}$  nach 24 h gemessen wurde.

Der Ansatz mit Hefeextrakt der Fa. Leiber erreichte bereits mit  $5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose eine Zellkonzentration von  $3,406 \text{ gL}^{-1}$  nach 41 h Kultivierung. Mit  $7,5 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt der Fa. Leiber konnte nach 42 h eine maximale Zellkonzentration von  $4,379 \text{ gL}^{-1}$  erreicht werden.

Die Ansätze mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt wurden sowohl mit als auch ohne Glukose getestet. Während im Ansatz ohne Glukose und  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt der Fa. Angel das Wachstum erst nach 23 h eintrat und nach 45 h eine Zellkonzentration von  $3,143 \text{ gL}^{-1}$  erreichte, konnte im Ansatz mit Glukose nach 24 h bereits eine Zellkonzentration von  $4,535 \text{ gL}^{-1}$  gemessen werden. Im Ansatz mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Roth-Hefeextrakt konnte ohne Glukose kein Wachstum festgestellt werden. Jedoch konnte mit  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose eine Zellkonzentration von  $2,547 \text{ gL}^{-1}$  nach 24 h gemessen werden.

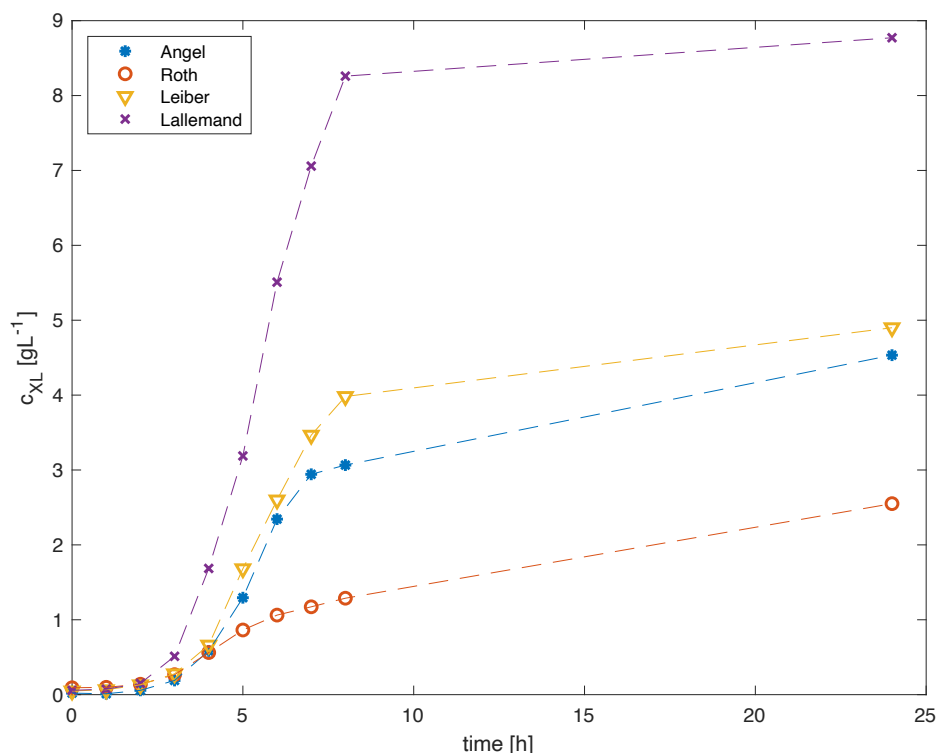
Ohne Glukose wurde in den Ansätzen mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Leiber- bzw. Lallemand-Hefeextrakt eine maximale Zellkonzentration von  $3,157 \text{ gL}^{-1}$  bzw.  $2,257 \text{ gL}^{-1}$  nach 29 h bzw. 27 h erreicht. Hingegen wurde in den Ansätzen mit Glukose nach je 24 h eine Zellkonzentration von  $4,900 \text{ gL}^{-1}$  (Leiber) bzw.  $8,770 \text{ gL}^{-1}$  (Lallemand) gemessen. Dagegen zeigte der Ansatz mit  $12,5 \text{ gL}^{-1}$  Leiber-Hefeextrakt nach 24 h eine Zellkonzentration von  $5,392 \text{ gL}^{-1}$  auf. Im Ansatz mit  $12,5 \text{ gL}^{-1}$  Lallemand-Hefeextrakt wurde eine Zellkonzentration von  $4,034 \text{ gL}^{-1}$  nach 42 h Kultivierung gemessen. Für die Ansätze mit Angel- und Roth-Hefeextrakt wurde mit einer

Konzentration von  $12,5 \text{ gL}^{-1}$  eine Zellkonzentration von  $3,943 \text{ gL}^{-1}$  nach 44 h bzw.  $1,362 \text{ gL}^{-1}$  nach 23 h erreicht.

Im Ansatz mit der höchsten Hefeextraktkonzentration von  $15 \text{ gL}^{-1}$  und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose konnte beim Hefeextrakt der Fa. Angel bis 29 h kein Wachstum festgestellt werden. Nach 40 h erreichte die Zellkonzentration  $4,859 \text{ gL}^{-1}$ . Mit  $15 \text{ gL}^{-1}$  Roth-Hefeextrakt und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose wurde nach 29 h bereits eine Zellkonzentration von  $1,443 \text{ gL}^{-1}$  gemessen.

Die Ansätze mit  $15 \text{ gL}^{-1}$  Leiber- und Lallemand-Hefeextrakt zeigten eine *lag*-Phase von 7,5 h auf. Anschließend stieg die Zellkonzentration im Ansatz mit Leiber-Hefeextrakt auf  $7,052 \text{ gL}^{-1}$  nach 22,5 h Kultivierung an. Im Lallemand-Ansatz wurde eine Zellkonzentration von  $4,670 \text{ gL}^{-1}$  nach 26,5 h erreicht.

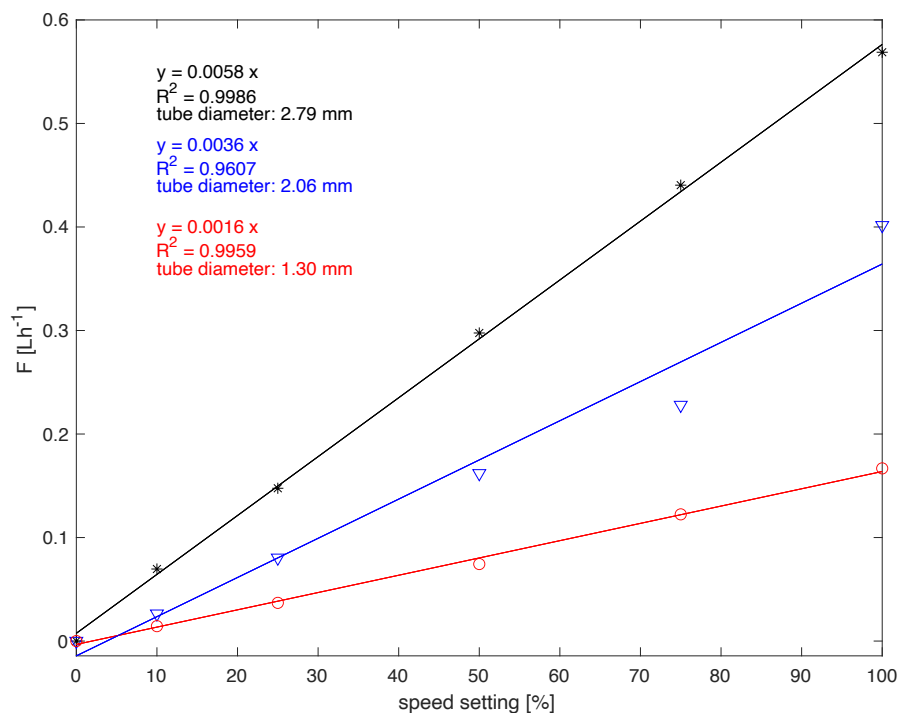
Die Abbildung 16 zeigt die Graphen aller Hefeextrakte der Kultivierung mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt und  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose. Alle anderen Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt.



**Abbildung 16:** Wachstumsgaphen aller vier Schüttelkolben-Ansätze mit  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt und einer Glukosekonzentration von  $20 \text{ gL}^{-1}$ . Kultivierungsbedingungen:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ min}^{-1}$ , 24 h.

### 6.3 Kalibrierung der Zufütterpumpen

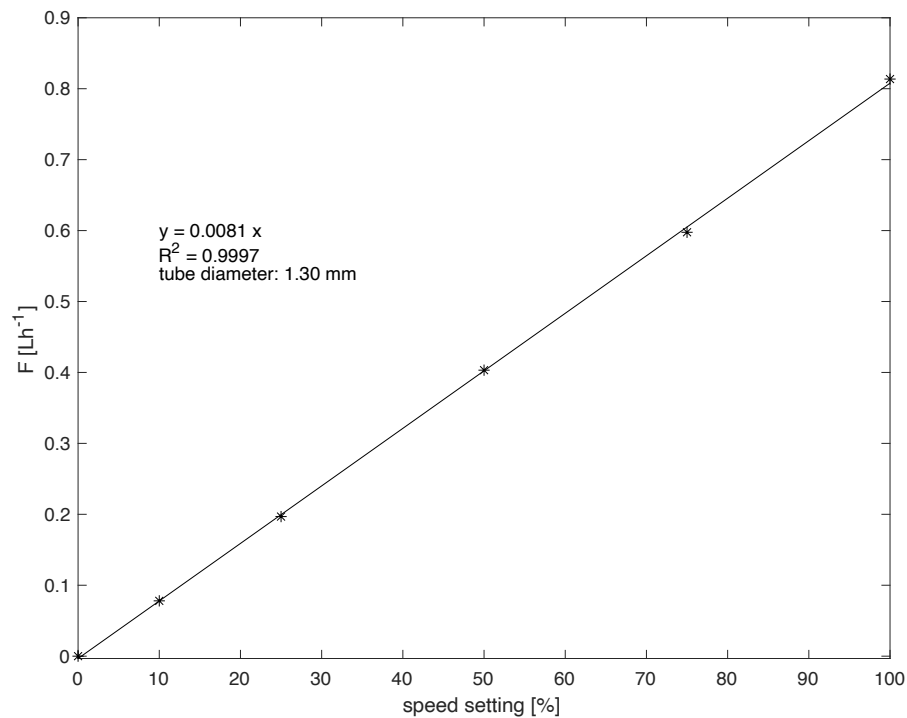
Vor den Kultivierungen wurden die Zufütterpumpen ISM936 und ISM593D kalibriert, um einen kontinuierlichen Zufluss des Mediums während des Prozesses sicherzustellen. Die Abbildung 17 zeigt die Kalibriergeraden der Zufütterpumpe ISM936 für die Schlauchinnendurchmesser 1,30 mm, 2,06 mm und 2,76 mm. Zu sehen sind die jeweils erreichten Flussraten [ $\text{Lh}^{-1}$ ] bei den getesteten Drehzahleinstellungen von 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 %.



**Abbildung 17: Kalibriergeraden der Zufütterpumpe ISM936.** Schlauchinnendurchmesser: 1,30 mm, 2,06 mm und 2,79 mm.

Mit einem Schlauchinnendurchmesser von 2,79 mm konnte eine maximale Flussrate von  $0,5688 \text{ Lh}^{-1}$  erreicht werden. Für die beiden anderen Schläuche mit Innendurchmesser von 2,06 mm bzw. 1,30 mm liegt die maximale Flussrate bei  $0,4016 \text{ Lh}^{-1}$  bzw.  $0,1668 \text{ Lh}^{-1}$ .

Für die Zufütterpumpe ISM596D wurde ausschließlich der Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1,30 mm getestet, da dieser ausreichend Volumen förderte. Die zugehörige Kalibriergeraden ist in Abbildung 18 gezeigt.



**Abbildung 18: Kalibriergerade der Zufütterpumpe ISM936.** Schlauchinnendurchmesser: 1,30 mm.

Hierbei konnte eine maximale Flussrate von 0,8316 Lh<sup>-1</sup> erreicht werden, was bei einem Reaktionsvolumen von 0,75 L einer Verdünnungsrate über 1 h<sup>-1</sup> entspricht.

#### 6.4 Fermentationsverläufe

Im Folgenden sind Ausschnitte der Fermentationen K2L, K4L, K1LM und K2LM dargestellt und beschrieben. Die weiteren Ausschnitte der Fermentationsverläufe sind im Anhang unter A.4 einzusehen. Zu den Zeitpunkten wo die volumetrische Hefeextraktzulauftrate  $Q_{YE}$  den Wert Null annimmt, wurde ein Wechsel des Zulaufreservoirs durchgeführt, welcher mit einer zehnminütigen Sterilisationszeit verbunden war.

### 6.4.1 Fermentation K2L

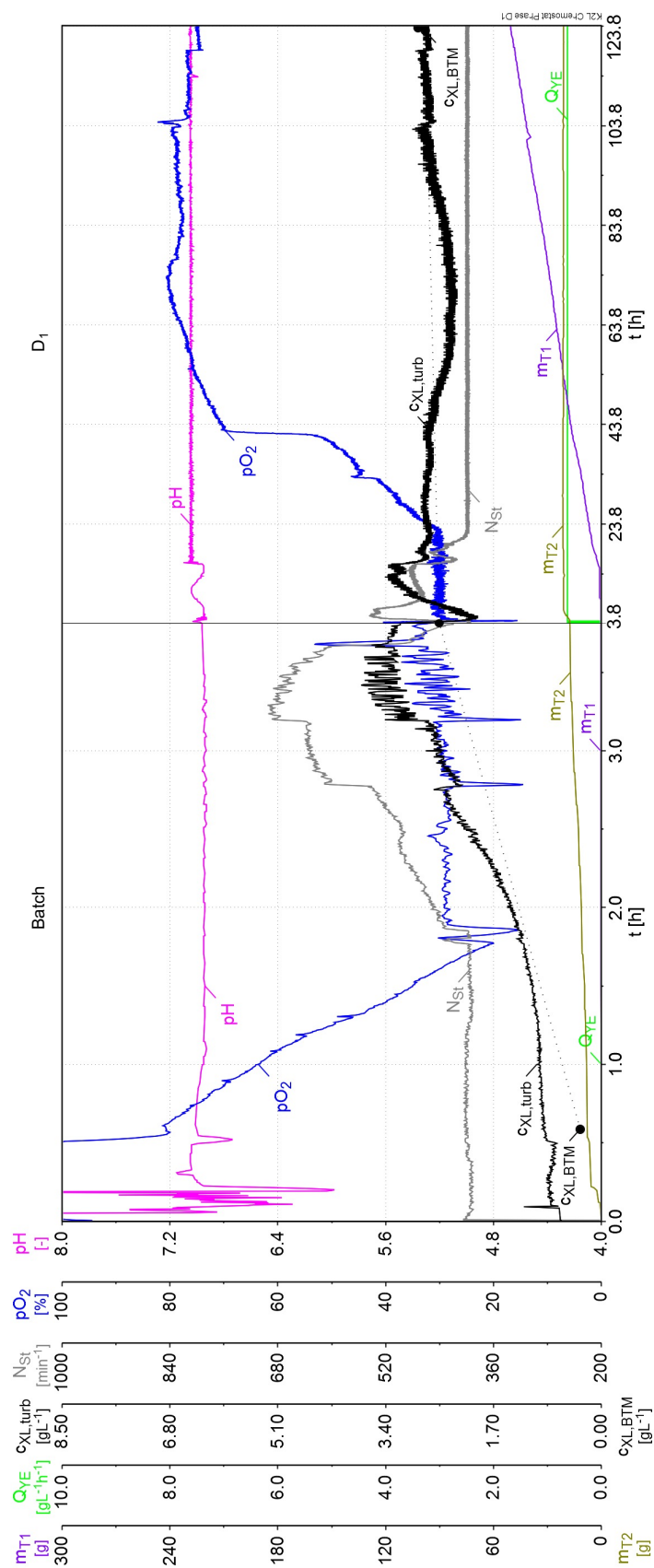
Zum Zeitpunkt  $t = 0,5867$  h fand die Inokulation statt. Die Zellkonzentration nach dem Animpfen betrug  $0,3321 \text{ gL}^{-1}$ . Nach ca. 1,6 h setzte die  $p\text{O}_2$ /Drehzahl-Regelung ein, welche durch eine ansteigende Rührerdrehzahl bei einem Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks von 30 % zu sehen war (Abbildung 19). In der Batch-Phase wurde überwiegend Base für die pH-Wert-Regulierung benötigt.

Der Batch wurde nach 3,818 h mit einer Zellkonzentration von  $2,557 \text{ gL}^{-1}$  beendet und die Chemostat-Phase gestartet. Die erste volumetrische Zulauftrate an Hefeextrakt  $Q_{YE}$  betrug  $0,6265 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Während der Übergangsphase (ca. 15 h) zeigte sich zunächst ein Anstieg der Zellkonzentration. Diese sank bis zum Zeitpunkt  $t = 15,5$  h wieder ab und ging in eine nahezu stationäre Phase über.

Im Chemostastbetrieb wurde kontinuierlich Säure hinzugegeben, während der Verbrauch an Base stagnierte (siehe Tabelle 22). Der  $p\text{O}_2$  stieg nach der Übergangsphase an und die Rührerdrehzahl war konstant am vorgegebenen Minimum der Rührerdrehzahl von  $400 \text{ min}^{-1}$ . Eine neue Korrekturmittelflasche mit Säure wurde nach ca. 316 h angeschlossen.

In den Chemostat-Phasen  $D_2$  und  $D_3$  nahm der Sauerstoffpartialdruck langsam wieder ab, bis in der Chemostat-Phase  $D_4$  starke Schwankungen und ein Anstieg im  $p\text{O}_2$ -Signal zu vernehmen waren, die sich bis zum Ende des Prozesses durchzogen (siehe Abb. A. 2 und Abb. A. 3). In der Chemostat-Phase  $D_8$  übersteigt das  $p\text{O}_2$ -Signal die 100 %, weshalb die Skalierung der entsprechenden Achse hier angepasst (0-1000 %) wurde (Abb. A. 3). Starke Veränderungen in der Rührerdrehzahl spiegelten sich in der Zellkonzentration  $c_{XL,turb}$  wider. Alle zugehörigen Graphen befinden sich im Anhang unter A.4.1. Die Änderungen in den Zeitachsen sind zu beachten. Eine Abgasanalytik war aufgrund falscher Kalibrierung der Abgassensoren nicht möglich.



**Abbildung 19: Fermentation K2L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch- und Chemostat-Phase D<sub>1</sub>. Zeitachsenabschnitte**

im Batch: 1 h. Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase D<sub>1</sub>: 20 h.

#### 6.4.2 Fermentation K4L

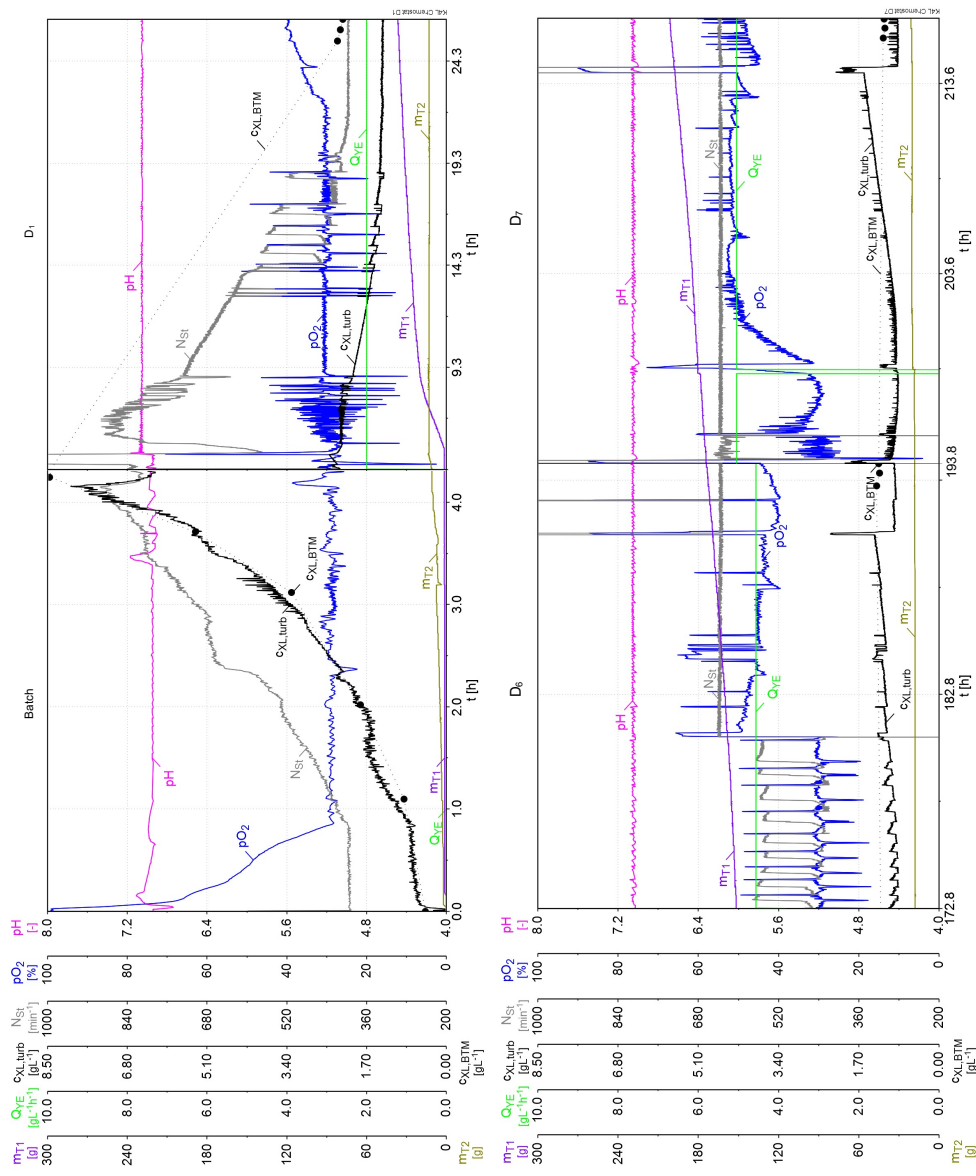
Die Zellkonzentration betrug zu Beginn der Fermentation  $0,4442 \text{ gL}^{-1}$ . Bereits nach  $0,83 \text{ h}$  war die  $p\text{O}_2$ /unkontrollierte Phase zu Ende und die  $p\text{O}_2$ /Drehzahl-Regelung hat gestartet (Abbildung 20). Zu Ende der Batch-Phase nach  $4,324 \text{ h}$  betrug die Zellkonzentration  $8,454 \text{ gL}^{-1}$ . Die kontinuierliche Phase startete mit einer volumetrischen Hefeextraktzulauftrate  $Q_{YE}$  von  $1,997 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Die kalkulierten Daten für die Auftragung von  $c_{XL,turb}$  stimmen im Batch nahezu mit den *Offline*-Messungen  $c_{XL,BTM}$  überein, während die Daten in der Chemostat-Phase abweichen. Ein Anstieg der Zellkonzentration nach Start der kontinuierlichen Phase war nicht zu beobachten. Als Korrekturmittel für den pH-Wert wurde in der Batch-Phase vorwiegend Base zugegeben, im Chemostatbetrieb hauptsächlich Säure. Erst in der letzten Verdünnungsrate  $D_9$  (Abbildung 21) stagnierte die Säurezugabe und die Zugabe an Base stieg wieder an.

Gegen Ende der Verdünnungsrate  $D_3$  (ca.  $t = 91 \text{ h}$ ) waren bis zum Zeitpunkt  $t = 180 \text{ h}$  starke Schwankungen in der  $p\text{O}_2$ -Messung und der Rührerdrehzahl zu beobachten (Abb. A. 4).

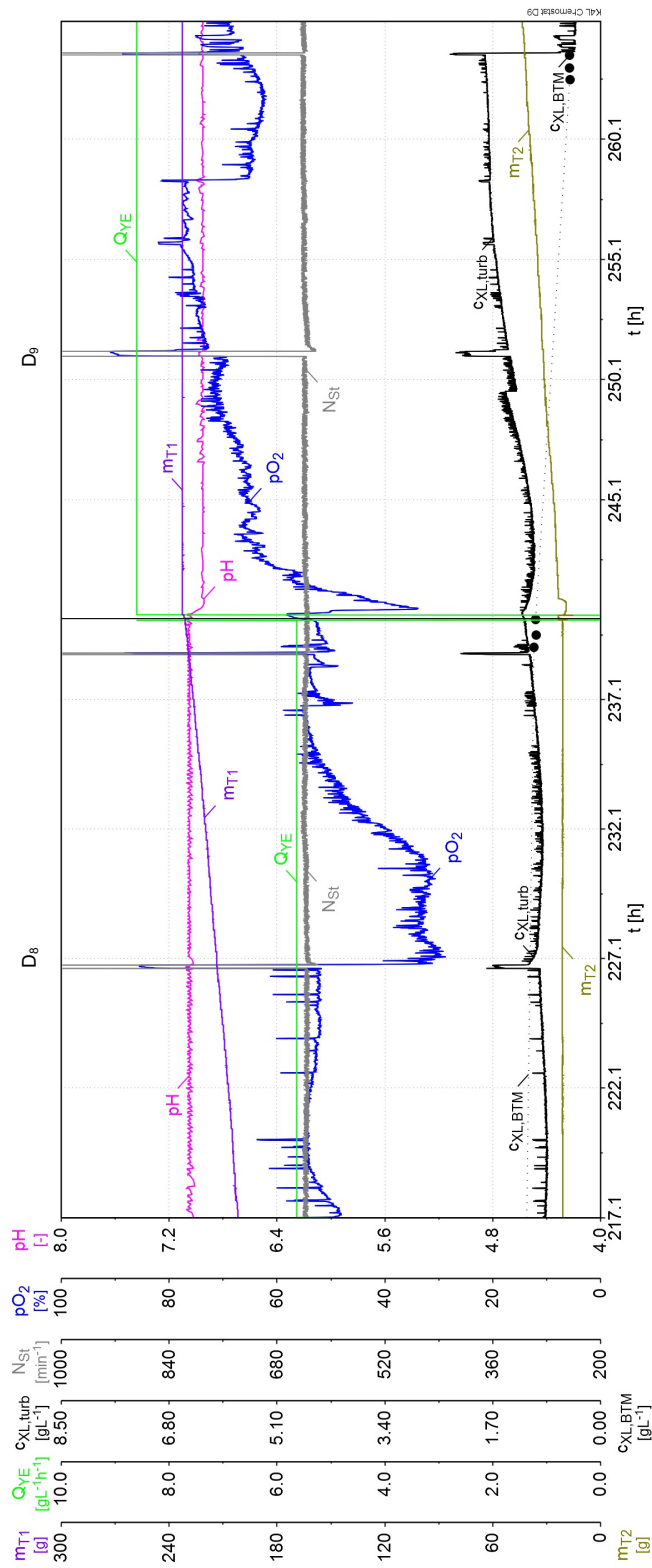
Während diesem Prozess wurde die Begasungsrate mit Luft  $F_{nAIR}$  mehrmals verändert. In der Batch-Phase wurde eine Begasungsrate von  $45 \text{ Lh}^{-1}$  eingestellt. In der Verdünnungsrate  $D_3$  wurde die Begasungsrate auf  $36 \text{ Lh}^{-1}$  herabgesetzt. In der Chemostat-Phase  $D_5$  wurde die Begasungsrate für kurze Zeit wieder auf  $45 \text{ Lh}^{-1}$  eingestellt bevor sie dann auf  $60 \text{ Lh}^{-1}$  bzw.  $90 \text{ Lh}^{-1}$  erhöht wurde (Abbildung 22). Trotz veränderter Begasungsrate konnten keine Verbesserungen in Bezug auf die Schwingungen des  $p\text{O}_2$ -Singals beobachtet werden (Abb. A. 4).

Der Respirationsquotient RQ stieg während der Batch-Phase bis auf einen Wert von ca.  $1,25$  an. Zu Beginn der Chemostat-Phase sank er zunächst auf ca.  $1,0$  ab. Im Laufe der kontinuierlichen Phase befand sich der Respirationsquotient zumeist im Bereich von  $0,5$  und  $1,0$ , wobei der Respirationsquotient in der letzten Verdünnungsrate  $D_9$  vornehmlich im Bereich von  $0,5$  lag (Abb. A. 5 und Abb. A. 6).



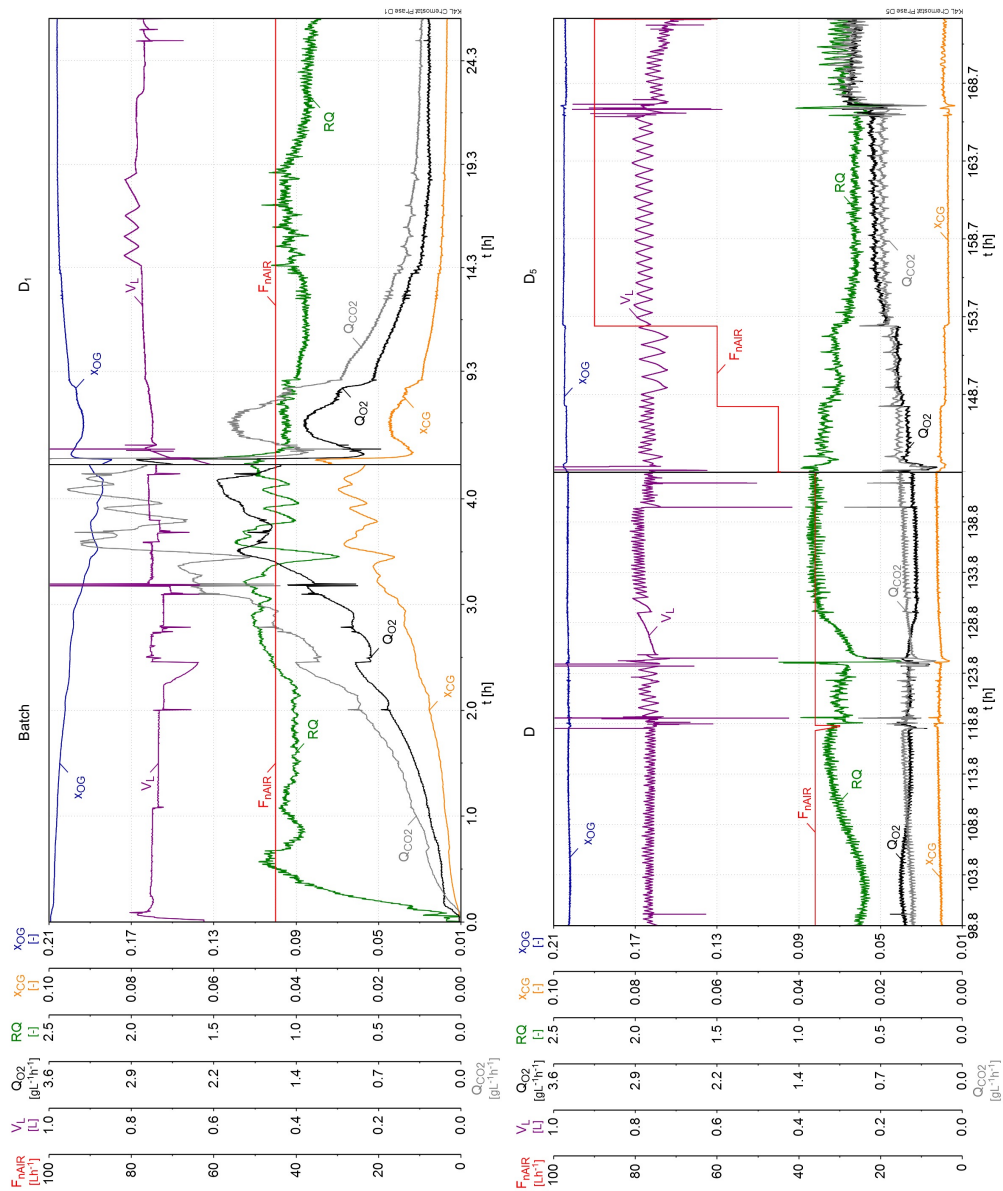


**Abbildung 20:** Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D<sub>6</sub> und D<sub>7</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im Batch: 1 h. Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase D<sub>1</sub>: 5 h, in D<sub>6</sub> und D<sub>7</sub>: 10 h.



**Abbildung 21: Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D<sub>8</sub> und D<sub>9</sub>.**

Zeitachsenabschnitte in beiden Phasen: 5 h.



**Abbildung 22: Abgasanalyse der Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D<sub>4</sub> und D<sub>5</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im Batch: 1 h. Zeitachsenabschnitte in der**

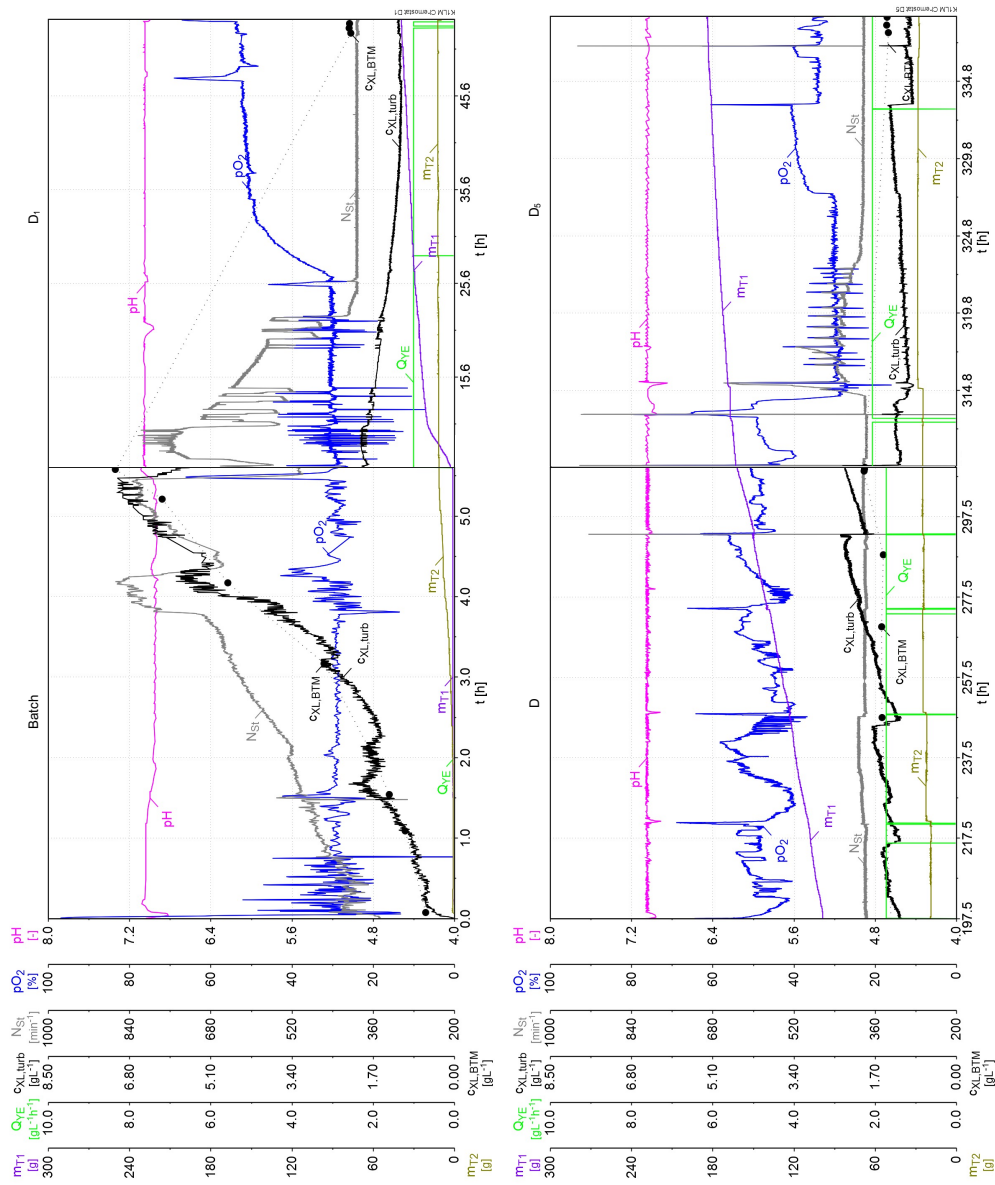
### 6.4.3 Fermentation K1LM

Bei der Fermentation K1LM kam es bei der Datenaufzeichnung über MFCS/win zu Ausfällen, in denen keine Signale aufgenommen werden konnten. Aus diesem Grund konnten in der Verdünnungsrate  $D_2$  in den Zeiträumen 55,52 h bis 88,74 h; 89,21 h bis 104,9 h; 106,5 h bis 118,9 h und 132,2 h bis 142,9 h keine Daten aufgezeichnet werden.

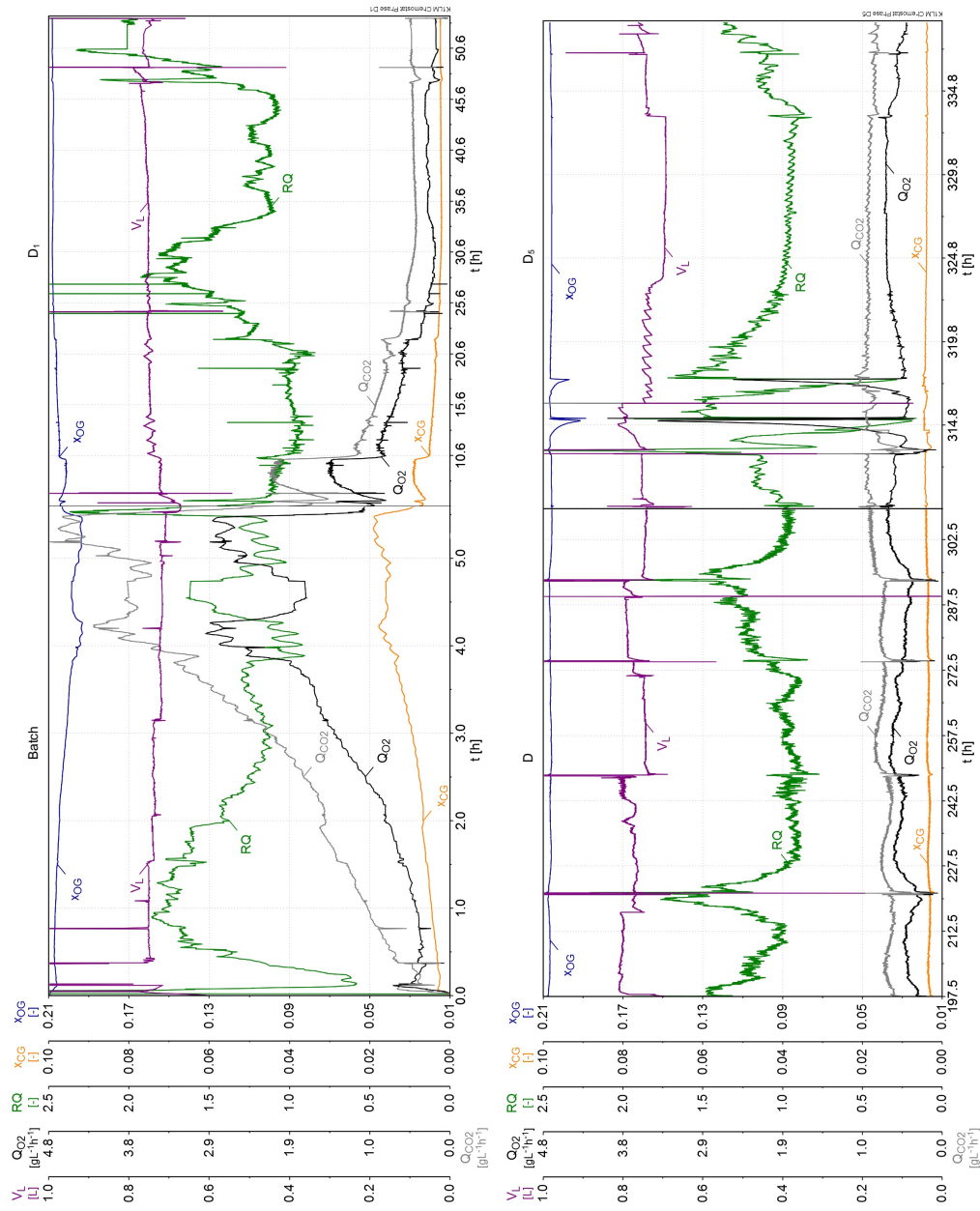
Nach der Inokulation betrug die Zellkonzentration im Reaktor  $0,6039 \text{ gL}^{-1}$ . Der Sauerstoffpartialdruck fiel nach Inokulation rapide auf ca. 30 % ab, wodurch die  $pO_2$ /Drehzahl-Regelung einsetzte. Dabei waren zu Beginn starke Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck zu beobachten (Abbildung 23). Nach 5,6 h konnte eine Zellkonzentration von  $7,100 \text{ gL}^{-1}$  erreicht werden. Für den Batch wurde überwiegend Base zur Korrektur des pH-Wertes benötigt, während Säure erst in der kontinuierlichen Phase zugegeben wurde. Im restlichen Verlauf der Chemostat-Phase wurde kaum noch Base zugegeben und der pH-Wert wurde durch Säurezugabe geregelt. Die Zellkonzentration fiel nach Start der kontinuierlichen Phase ab und stieg erst in der Verdünnungsrate  $D_4$  wieder leicht an. Der Sauerstoffpartialdruck nahm gleichzeitig zum Zeitpunkt  $t = 26 \text{ h}$  zu, bis er in der Verdünnungsrate  $D_3$  sank und Schwankungen bis zum Ende der Verdünnungsrate  $D_5$  zeigte. Die volumetrische Hefeextraktzulauftrate  $Q_{YE}$  startete mit  $1,006 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  und betrug in der letzten Verdünnungsrate des Prozesses  $2,982 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Die *Offline*-Messungen der Zellkonzentration  $c_{XL,BTM}$  korrelieren in der Batch-Phase gut mit der Zellkonzentration  $c_{XL,turb}$ , während sie in der Chemostat-Phase stärker abweichen.

Die Abgasanalyse in Abbildung 24 zeigt nach anfänglichen Schwankungen des Respirationsquotient einen Anstieg auf 2,0. Im restlichen Verlauf der Batch-Phase bewegte sich der Respirationsquotient zwischen 1,0 und 1,5. Auch in der Chemostat-Phase befand sich der Respirationsquotient hauptsächlich bei 1,0 und höher.

Während des Prozesses wurde durchgängig mit einer Begasungsrate  $F_{nAIR}$  von  $90 \text{ Lh}^{-1}$  begast (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 23: Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D<sub>4</sub> und D<sub>5</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im Batch: 1 h. Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase**



**Abbildung 24:** Abgasanalyse der Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D<sub>4</sub> und D<sub>5</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im Batch: 1 h. Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-

#### 6.4.4 Fermentation K2LM

Die Fermentation K2LM startete mit einer Zellkonzentration von  $0,1233 \text{ gL}^{-1}$ . Nach ca. 2,5 h trat die  $p\text{O}_2$ /Drehzahl-Regelung mit steigender Rührerdrehzahl ein. Die Batch-Phase wurde nach einem Anstieg im Sauerstoffpartialdruck und im pH-Wert nach 7,543 h beendet. Am Ende der Batch-Phase wurde eine Zellkonzentration von  $8,237 \text{ gL}^{-1}$  gemessen. Während der Batch-Phase wurde überwiegend Base zur Korrektur des pH-Wertes zugegeben. Die kontinuierliche Phase begann mit einer volumetrischen Hefeextraktzulauftrate von  $3,97 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

In diesem Prozess wurde vor allem Base in der kontinuierlichen Phase zur Regelung des pH-Wertes zugegeben. Nach 55,5 h und nach 144 h wurde eine neue Korrekturmittelflasche mit Base angeschlossen.

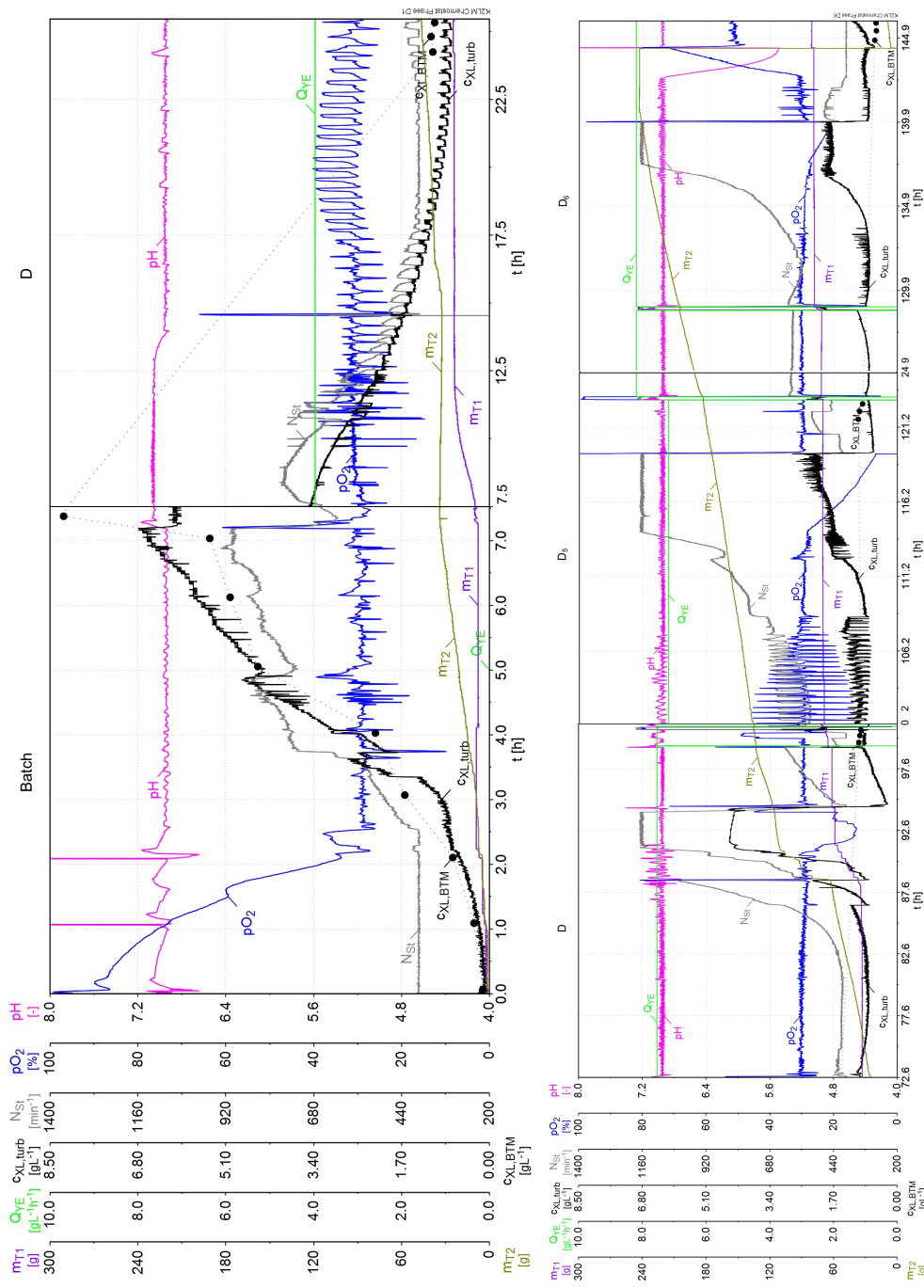
Zu Beginn der Chemostat-Phase (Abbildung 25) bis zum Anfang der Verdünnungsrate  $D_2$  (Abb. A. 8) waren Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck zu erkennen, welche sich in der Rührerdrehzahl  $N_{\text{St}}$  und der Zellkonzentration  $c_{\text{XL,turb}}$  widerspiegelten.

Im Zeitraum von ca. 86 h bis 94 h sank über Nacht das Reaktorvolumen ab, während die Rührerdrehzahl auf maximaler Einstellung ( $1200 \text{ min}^{-1}$ ) lief.

Bei auftretender Biofilmbildung wurde die Rührerdrehzahl kurzzeitig manuell erhöht. Langzeitige Anstiege der Rührerdrehzahl resultieren aus der automatischen  $p\text{O}_2$ /Drehzahl-Regelung.

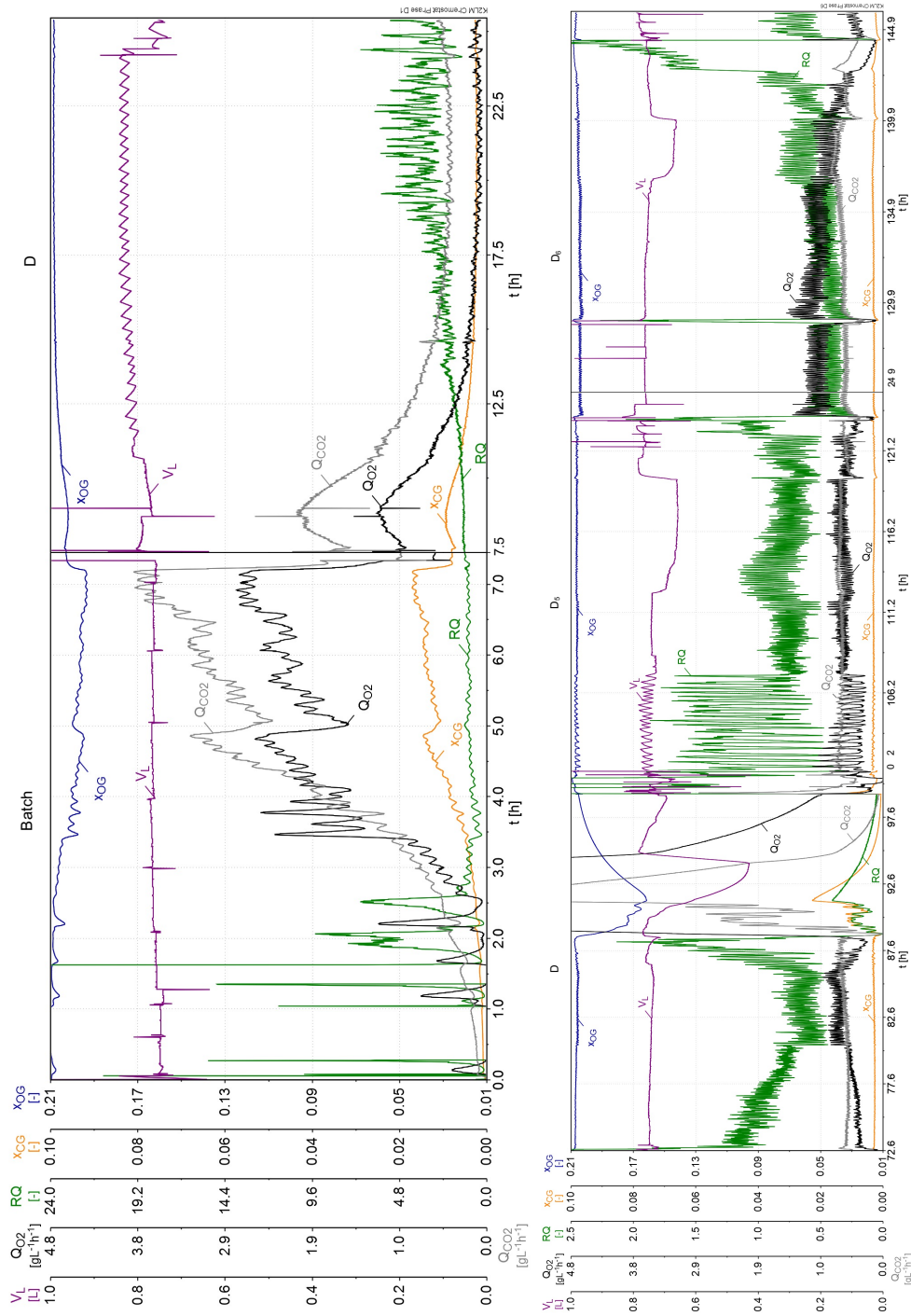
In der Abgasanalyse und -bilanzierung (Abbildung 26) waren in der Batch-Phase hohe Schwankungen im Respirationsquotienten zu erkennen. Die Skalierung der RQ-Achse wurde entsprechend erweitert, um die Daten darstellen zu können. Ab der Verdünnungsrate  $D_2$  wurde die Skalierung wieder zurückgesetzt. Im kompletten Prozessverlauf schwankte der Respirationsquotient stark, befand sich aber (ausgenommen der Batch- und Chemostat-Phase  $D_1$ ) in einem Bereich zwischen 0,5 und 1,0.

Es wurde während des Prozesses konstant mit einer Begasungsrate  $F_{\text{nAIR}}$  von  $90 \text{ Lh}^{-1}$  begast (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 25:** Fermentation K2LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> und D<sub>6</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im





**Abbildung 26:** Abgasanalyse der Fermentation K2LM – Verlauf der Batch und Chemostat-Phase D<sub>1</sub> (oben) und der Chemostat-Phasen D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> und D<sub>6</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte im Batch: 1 h.

## 6.5 Auswertung der kontinuierlichen Prozesse

Für die Beurteilung der kontinuierlichen Prozesse können verschiedene Aspekte betrachtet werden. Ein Qualitätsmerkmal ist die Genauigkeit der eingestellten Verdünnungsrate. Sie lässt sich über die Akkuratessse der Flussrate des Zulaufreservoirs und der Stabilität des Reaktionsvolumens beurteilen. Des Weiteren lässt sich beurteilen, ob die Bedingung aus Gl.(2.18), dass die Wachstumsrate gleich der Verdünnungsrate ist, stimmt.

### 6.5.1 Istwerte der Flussrate, des Reaktionsvolumens und der Verdünnungsrate

Die Bestimmung der tatsächlichen Verdünnungsrate  $D$  erfolgt über die Bestimmung der tatsächliche Flussrate des Hefeextraktzulaufreservoirs  $F_{R2}$  und des tatsächlichen Reaktionsvolumens  $V_L$ .

Die tatsächliche Flussrate des Zulaufreservoirs wurde mit Hilfe der aufgezeichneten Daten von MFCS/win bestimmt werden. Dazu wurde innerhalb einer Verdünnungsrate, ein Zeitraum ausgewählt, in dem kein Wechsel des Zulaufreservoirs stattfand. In diesem Zeitraum wurde die gravimetrische Differenz des Waagensignals des Hefeextraktzulaufreservoirs  $m_{R2}$  bestimmt und mit Gl.(2.21) die tatsächliche Flussrate des Hefeextraktzulaufreservoirs ermittelt.

Die Tabelle 13 zeigt ein Vergleich der Soll- und Istwerte der Flussraten, sowie die prozentuale Abweichung.

**Tabelle 13: Vergleich der Soll- und Istwerte der Flussraten des Zulaufreservoirs in der jeweiligen Verdünnungsrate.**

Fermentation	Verdünnungsrate $D_i$	Sollwert der Flussrate des Zulaufreservoirs $F_{R2w}$ [ $Lh^{-1}$ ]	Istwert der Flussrate des Zulaufreservoirs $F_{R2}$ [ $Lh^{-1}$ ]	Prozentuale Abweichung [%]
<b>K2L</b>	D <sub>1</sub>	0,0525	0,0426	18,86
	D <sub>2</sub>	0,0600	0,0486	19,00
	D <sub>3</sub>	0,0675	0,0564	16,44
	D <sub>4</sub>	0,0750	0,0665	11,33
	D <sub>5</sub>	0,0825	0,0708	14,18
	D <sub>6</sub>	0,0900	0,0803	10,78
	D <sub>7</sub>	0,1013	0,0856	15,46
	D <sub>8</sub>	0,1125	0,0998	11,29
<b>K4L</b>	D <sub>1</sub>	0,1875	0,1522	18,83
	D <sub>2</sub>	0,2250	0,1905	15,33
	D <sub>3</sub>	0,2625	0,2132	18,78
	D <sub>4</sub>	0,3000	0,2423	19,23
	D <sub>5</sub>	0,3375	0,2932	13,13
	D <sub>6</sub>	0,3938	0,3339	15,20
	D <sub>7</sub>	0,4500	0,3805	15,44
	D <sub>8</sub>	0,5265	0,4280	18,71
	D <sub>9</sub>	0,7290	0,6727	7,723
<b>K1LM</b>	D <sub>1</sub>	0,0750	0,0770	2,667
	D <sub>2</sub>	0,0975	0,0950	2,564
	D <sub>3</sub>	0,1125	0,1130	0,444
	D <sub>4</sub>	0,1275	0,1350	5,882
	D <sub>5</sub>	0,1500	0,1532	2,133
	D <sub>6</sub>	0,2250	0,2350	4,444
<b>K2LM</b>	D <sub>1</sub>	0,3000	0,3235	7,833
	D <sub>2</sub>	0,3563	0,3660	2,737
	D <sub>3</sub>	0,4313	0,4438	2,910
	D <sub>4</sub>	0,4875	0,5385	10,46
	D <sub>5</sub>	0,5250	0,5343	1,771
	D <sub>6</sub>	0,7050	0,6208	11,94
	D <sub>7</sub>	0,8100	0,7751	4,309
Durchschnittliche prozentuale Abweichung				10,66 %

Die Tabelle 13 zeigt, dass die Flussraten zum Teil bis zu 20 % von ihrem Sollwert abweichen. Im Durchschnitt beträgt die prozentuale Abweichung 10,66 %. Für eine genauere Beurteilung der tatsächlichen Verdünnungsrate wird das tatsächliche Reaktionsvolumen benötigt.

Das tatsächliche Reaktionsvolumen wurde durch das Waagensignal des Bioreaktors  $m_L$  bestimmt. Dazu wurde der Mittelwert über den Zeitraum einer gesamten Verdünnungsrate gebildet. Es wurde zur Vereinfachung angenommen, dass 1 mL Zellsuspension einem Gramm entspricht. Der Sollwert des Reaktionsvolumens  $V_{LW}$  betrug zu jedem Zeitpunkt der Fermentation 0,75 L.

Die nachstehende Tabelle 14 zeigt die Mittelwerte des tatsächlichen Reaktionsvolumens  $V_L$  in den jeweiligen Verdünnungsraten der Fermentationen sowie deren prozentuale Abweichung vom Sollwert  $V_{LW}$ .

**Tabelle 14: Mittelwerte des Reaktionsvolumens während der jeweiligen Verdünnungsraten sowie die prozentuale Abweichung vom Sollwert.**

<b>Fermentation</b>	<b>Verdünnungsrate <math>D_i</math></b>	<b>Mittelwert des Reaktionsvolumens <math>V_L</math> [L]</b>	<b>Prozentuale Abweichung [%]</b>
<b>K2L</b>	D <sub>1</sub>	0,680	9,333
	D <sub>2</sub>	0,715	4,667
	D <sub>3</sub>	0,764	1,867
	D <sub>4</sub>	0,723	3,600
	D <sub>5</sub>	0,730	2,667
	D <sub>6</sub>	0,798	6,400
	D <sub>7</sub>	0,764	1,867
	D <sub>8</sub>	0,750	0,000
<b>K4L</b>	D <sub>1</sub>	0,762	1,613
	D <sub>2</sub>	0,770	2,680
	D <sub>3</sub>	0,780	4,013
	D <sub>4</sub>	0,774	3,213
	D <sub>5</sub>	0,767	2,293
	D <sub>6</sub>	0,732	2,453
	D <sub>7</sub>	0,754	0,547
	D <sub>8</sub>	0,760	1,387
	D <sub>9</sub>	0,782	4,240
<b>K1LM</b>	D <sub>1</sub>	0,765	2,027
	D <sub>2</sub>	0,800	6,627
	D <sub>3</sub>	0,776	3,467
	D <sub>4</sub>	0,781	4,067
	D <sub>5</sub>	0,739	1,413
	D <sub>6</sub>	0,788	5,093
<b>K2LM</b>	D <sub>1</sub>	0,815	8,653
	D <sub>2</sub>	0,760	1,293
	D <sub>3</sub>	0,791	5,547
	D <sub>4</sub>	0,714	4,707
	D <sub>5</sub>	0,742	1,053
	D <sub>6</sub>	0,756	0,787
	D <sub>7</sub>	0,793	5,747
<b>Durchschnittliche prozentuale Abweichung</b>			<b>3,44 %</b>

Die prozentuale Abweichung des Reaktionsvolumens vom Sollwert beläuft sich in zwei Fällen auf 8,65 % bzw. 9,33 %. Im Durchschnitt beträgt die prozentuale Abweichung 3,44 %.

Mit den Istwerten der Flussrate des Zulaufreservoirs  $F_{R2}$  und dem Reaktionsvolumen  $V_L$  konnte mit Hilfe der Gl.(2.13) die tatsächliche Verdünnungsrate bestimmt werden.

Die folgende Tabelle 15 zeigt den Vergleich der Soll- und Istwerte der Verdünnungsraten der Fermentationen, sowie die prozentuale Abweichung.

Tabelle 15: Vergleich der Soll- und Istwerte der Verdünnungsraten in den Fermentationen.

Fermentation	Verdünnungsrate $D_i$	Sollwert der jeweiligen Verdünnungsrate $D_{iw}$ [ $h^{-1}$ ]	Istwert der Verdünnungsrate $D$ [ $h^{-1}$ ]	Prozentuale Abweichung [%]
K2L	D <sub>1</sub>	0,070	0,063	10,50
	D <sub>2</sub>	0,080	0,068	15,04
	D <sub>3</sub>	0,090	0,074	17,98
	D <sub>4</sub>	0,100	0,092	8,022
	D <sub>5</sub>	0,110	0,097	11,83
	D <sub>6</sub>	0,120	0,101	16,15
	D <sub>7</sub>	0,135	0,112	17,01
	D <sub>8</sub>	0,150	0,133	11,29
K4L	D <sub>1</sub>	0,250	0,200	20,12
	D <sub>2</sub>	0,300	0,247	17,54
	D <sub>3</sub>	0,350	0,273	21,92
	D <sub>4</sub>	0,400	0,313	21,75
	D <sub>5</sub>	0,450	0,382	15,07
	D <sub>6</sub>	0,525	0,456	13,07
	D <sub>7</sub>	0,600	0,505	15,90
	D <sub>8</sub>	0,702	0,563	19,82
	D <sub>9</sub>	0,972	0,860	11,48
K1LM	D <sub>1</sub>	0,100	0,101	0,627
	D <sub>2</sub>	0,130	0,119	8,620
	D <sub>3</sub>	0,150	0,146	2,921
	D <sub>4</sub>	0,170	0,173	1,745
	D <sub>5</sub>	0,200	0,207	3,598
	D <sub>6</sub>	0,300	0,298	0,617
K2LM	D <sub>1</sub>	0,400	0,397	0,755
	D <sub>2</sub>	0,475	0,482	1,425
	D <sub>3</sub>	0,575	0,561	2,498
	D <sub>4</sub>	0,650	0,753	15,92
	D <sub>5</sub>	0,700	0,720	2,855
	D <sub>6</sub>	0,812	0,821	12,63
	D <sub>7</sub>	0,934	0,977	9,509
Durchschnittliche prozentuale Abweichung				10,94 %

Die prozentuale Abweichung der Verdünnungsrate von den Soll- und Istwerten bewegt sich in einem Bereich von 0,6 % bis 22 %. Im Durchschnitt liegt die prozentuale Abweichung der Verdünnungsraten bei 10,94 %.

Mit den Istwerten der Verdünnungsraten aus Tabelle 15 konnte durch Bildung des Kehrwertes der Verdünnungsraten die hydraulische Verweilzeit, wie in Gl.(2.26) gezeigt, bestimmt werden. Mit den Kultivierungszeiten der jeweiligen Verdünnungsraten aus Tabelle 8 ließ sich die Anzahl an Durchläufen bestimmen. Die Anzahl an Durchläufen ist der Quotient aus Kultivierungsdauer und der hydraulischen Verweilzeit. Ein Durchlauf entspricht einem vollständigen Austausch des Reaktionsvolumens. Die zugehörigen Daten sind im Anhang in Tab. A. 1 einzusehen.

#### 6.5.2 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Bestimmung der Wachstumsrate in der Batch-Phase erfolgte über das Logarithmieren der Biomassekonzentration  $c_{XL}$  und über die anschließende halblogarithmische Auftragung der logarithmierten Biomassekonzentration gegen die Zeit (siehe Gl.(2.10)).

Für die halblogarithmische Auftragung der Biomassekonzentration gegen die Zeit wurden die Turbiditätsdaten verwendet. Unter Verwendung der in 3.2.2 beschriebenen Gl.(3.1), konnte die Zellkonzentration  $c_{XL,turb}$  über den kompletten Prozess aus den Turbiditätsdaten berechnet werden. Wie bereits in 3.2.2 beschrieben, müssen dazu die Korrelationsparameter  $k_1$  und  $k_2$  für jede Kultivierung, für die Batch- und die kontinuierliche Phase bestimmt werden.



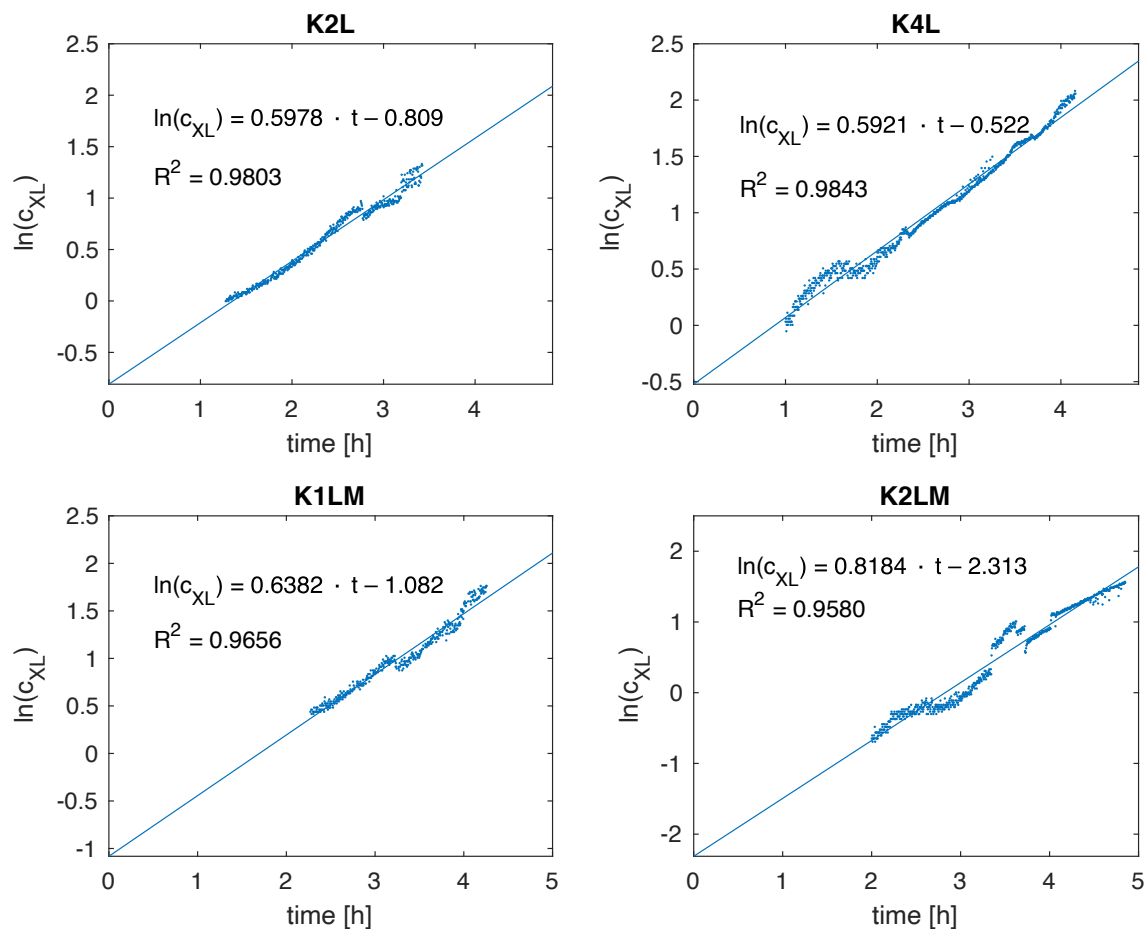
Die Tabelle 16 zeigt die, unter Anwendung des *least-squares*-Algorithmus nach dem Simplex-Verfahren bestimmten, Korrelationsparameter  $k_1$  und  $k_2$ .

**Tabelle 16: Korrelationsparameter  $k_1$  und  $k_2$  für die Fermentationsphasen.**

Fermentation	Korrelationsparameter	Batch-Phase	Chemostat-Phase
K2L	$k_1$	0,2168*	
	$k_2$	1,402*	
K4L	$k_1$	1,702	104,8
	$k_2$	1,031	0,0142
K1LM	$k_1$	0,978	171,6
	$k_2$	1,375	0,0084
K2LM	$k_1$	1,702	60,58
	$k_2$	1,031	0,0375

\*gemeinsame Korrelationsparameter aufgrund unzureichender Daten

Mit den Korrelationsparametern  $k_1$  und  $k_2$  aus Tabelle 16 wurde die Biomassekonzentration aus den Turbiditätsdaten bestimmt. Anschließend erfolgte das Logarithmieren der Daten und die Auftragung gegen die Zeit (siehe Abbildung 27). Die Bestimmung der Wachstumsrate in der Batch-Phase erfolgte in der exponentiellen Phase. Mit der Software MATLAB® kann eine lineare Regressionsgerade bestimmt werden. Die Steigung der Geraden gibt die Wachstumsrate  $\mu$  an. In Abbildung 27 ist die logarithmierte Funktion sowie das Bestimmtheitsmaß der Funktion angegeben.



**Abbildung 27: Bestimmung der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase im Batch der jeweiligen Fermentation.** Auftragung der logarithmierten Biomassekonzentration in der exponentiellen Phase im Batch über die Zeit. Die Steigung der linearen Regressionsgeraden gibt die Wachstumsrate  $\mu$  an.

Für die Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Leiber konnten Wachstumsraten von  $0,5978 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,5921 \text{ h}^{-1}$  bestimmt werden. Die Auftragungen der Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand ergaben Wachstumsraten von  $0,6382 \text{ h}^{-1}$  für K1LM bzw.  $0,8184 \text{ h}^{-1}$  für K2LM in der Batch Phase.

Im Vergleich dazu wurden in Batch-Kultivierungen mit Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle mit einer Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  nur Wachstumsraten von  $0,1828 \text{ h}^{-1}$  mit Hefeextrakt der Fa. Leiber erreicht. Für den Hefeextrakt der Fa. Lallemand betrug die Wachstumsrate auf Hefeextrakt ohne weitere Kohlenstoffquellen  $0,2588 \text{ h}^{-1}$ .

Zur Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate in der kontinuierlichen Phase und zur Überprüfung der Bedingung, dass die Wachstumsrate gleich der Verdünnungsrate sei (Gl.(2.18),  $\mu = D$ ), wird die Gl.(2.24) verwendet.

Die Tabelle 17 zeigt die, gemäß Gl.(2.24) bestimmten spezifischen Wachstumsraten in den Fermentationsphasen des jeweiligen Prozesses. Die für die Auswertung genutzten Biomassekonzentrationen sind im Anhang unter A.5.2 einzusehen.

**Tabelle 17: Spezifische Wachstumsraten in den Fermentationsphasen der kontinuierlichen Prozesse.**

Fermentations- phase	K2L $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	K4L $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	K1LM $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	K2LM $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]
<b>Batch</b>	0,5978	0,5821	0,6382	0,8184
<b>D<sub>1</sub></b>	0,08005	0,1552	0,09316	0,3670
<b>D<sub>2</sub></b>	0,02616	0,2075	0,1106	0,5072
<b>D<sub>3</sub></b>	0,1335	0,2733	0,1276	0,5115
<b>D<sub>4</sub></b>	0,05462	0,3012	0,1645	0,7043
<b>D<sub>5</sub></b>	0,09115	0,3629	0,2016	0,6465
<b>D<sub>6</sub></b>	0,07438	0,4820	0,3319	0,8571
<b>D<sub>7</sub></b>	0,03278	0,4870	-	0,9930
<b>D<sub>8</sub></b>	0,1453	0,5789	-	-
<b>D<sub>9</sub></b>	-	0,8521	-	-

Bis auf den Prozess K2L zeigen alle Fermentationen eine zunehmende Wachstumsrate mit steigender Verdünnungsrate (vgl. Tabelle 15) auf.

Die Abweichung  $\Delta_{\mu D}$ , der bereits bekannten Verdünnungsrate  $D$  und der mit Hilfe von Gl.(2.24) bestimmten spezifischen Wachstumsrate  $\mu$ , kann mit der Gl.(2.19) überprüft werden.

Die Tabelle 18 und Tabelle 19 zeigen die Abweichungen von Verdünnungs- und Wachstumsrate, welche über Gl.(2.19) ermittelt wurden.

**Tabelle 18: Abweichung der Verdünnungs- und Wachstumsrate in der kontinuierlichen Phase der Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Leiber.**

Fermentations- phase	K2L			K4L		
	$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	D [ $h^{-1}$ ]	$\pm\Delta_{\mu D}$ [ $h^{-1}$ ]	$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	D [ $h^{-1}$ ]	$\pm\Delta_{\mu D}$ [ $h^{-1}$ ]
D <sub>1</sub>	0,08005	0,063	0,01705	0,1552	0,200	-0,0448
D <sub>2</sub>	0,02616	0,068	-0,04184	0,2075	0,247	-0,0395
D <sub>3</sub>	0,1335	0,074	0,05950	0,2733	0,273	0,0003
D <sub>4</sub>	0,05462	0,092	-0,03738	0,3012	0,313	-0,0118
D <sub>5</sub>	0,09115	0,097	-0,00585	0,3629	0,382	-0,0191
D <sub>6</sub>	0,07438	0,101	-0,02662	0,4820	0,456	0,0260
D <sub>7</sub>	0,03278	0,112	-0,07922	0,4870	0,505	-0,0180
D <sub>8</sub>	0,1453	0,133	0,01234	0,5789	0,563	0,0159
D <sub>9</sub>	-	-	-	0,8521	0,860	-0,0079

**Tabelle 19: Abweichung der Verdünnungs- und Wachstumsrate in der kontinuierlichen Phase der Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand.**

Fermentations- phase	K1LM			K2LM		
	$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	D [ $h^{-1}$ ]	$\pm\Delta_{\mu D}$ [ $h^{-1}$ ]	$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	D [ $h^{-1}$ ]	$\pm\Delta_{\mu D}$ [ $h^{-1}$ ]
D <sub>1</sub>	0,09316	0,101	-0,00784	0,3670	0,397	-0,0300
D <sub>2</sub>	0,1106	0,119	-0,00840	0,5072	0,482	0,0252
D <sub>3</sub>	0,1276	0,146	-0,01840	0,5115	0,561	-0,0495
D <sub>4</sub>	0,1645	0,173	-0,00850	0,7043	0,753	-0,0487
D <sub>5</sub>	0,2016	0,207	-0,00540	0,6465	0,720	-0,0735
D <sub>6</sub>	0,3319	0,298	0,03390	0,8571	0,821	0,0361
D <sub>7</sub>	-	-	-	0,9930	0,977	0,0160

Die Tabelle 18 zeigt für den Prozess K2L Abweichungen von  $\pm 0,00585 h^{-1}$  bis zu  $\pm 0,07922 h^{-1}$  auf. Im Prozess K4L beträgt die größte Abweichung hingegen nur  $\pm 0,0448 h^{-1}$ .

Für den Prozess K1LM zeigt die Tabelle 19 Abweichungen bis zu  $\pm 0,0339 h^{-1}$  auf während für den Prozess K2LM Abweichungen bis zu  $\pm 0,0735 h^{-1}$  ermittelt wurden.

### 6.5.3 Substratanalyse

Zur Ermittlung der Substratkonzentrationen wurde eine HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren durchgeführt. Dazu wurden sowohl die verwendeten Hefeextrakte sowie die Fermentationsproben analysiert. Durch die Messung unterschiedlicher Hefeextraktkonzentrationen (Standardreihe) wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. A. 11 und Abb. A. 14). Diese diente als Referenz für die Auswertung des Substratverbrauchs. Da der Organismus fähig ist, organische Säuren nicht nur zu verbrauchen, sondern auch zu produzieren, wurden für die Auswertung die Peakflächen in der Standardreihe und in den Fermentationsproben verglichen. Für die Auswertung wurden ausschließlich Peaks miteinbezogen, deren Flächen während des Prozesses eine Abnahme im Vergleich zur Probe mit Reservoirkonzentration ( $c_{S2R2} = 10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt) aufzeigen.

Das Substrat Hefeextrakt wird durch die Summe der (abnehmenden) Peakflächen repräsentativ dargestellt. Die Auswertung des Substratverbrauchs bezieht sich somit auf den Verbrauch der im Hefeextrakt vorhandenen Kohlenhydrate und organischen Säuren. Der ausführliche Auswertungsweg für die Substratkonzentration ist im Anhang unter A.5.3 exemplarisch gezeigt. Die Werte in Tabelle 20 setzen sich aus dem Mittelwert der Proben einer Verdünnungsrate (Gleichgewichtsproben) zusammen. Tabelle 20 zeigt die in den jeweiligen Verdünnungsraten bestimmte Substratkonzentration  $c_{S2L,D}$ .

**Tabelle 20: Substratkonzentration in den Fermentationsphasen der kontinuierlichen Prozesse.**

Fermentations- phase	K2L $c_{S2L,Di} [\text{gL}^{-1}]$	K4L $c_{S2L,Di} [\text{gL}^{-1}]$	K1LM $c_{S2L,Di} [\text{gL}^{-1}]$	K2LM $c_{S2L,Di} [\text{gL}^{-1}]$
D <sub>1</sub>	3,723	5,441	2,931	3,162
D <sub>2</sub>	3,886	6,485	2,969	3,473
D <sub>3</sub>	3,973	6,999	3,170	3,544
D <sub>4</sub>	4,068	7,192	3,294	2,491
D <sub>5</sub>	4,238	7,654	3,120	3,332
D <sub>6</sub>	4,273	7,149	3,193	4,297
D <sub>7</sub>	4,380	7,132	-	4,814
D <sub>8</sub>	4,830	7,238	-	-
D <sub>9</sub>	-	8,495	-	-

Für die Fermentation K2L ist mit zunehmender Verdünnungsrate auch eine zunehmende Substratkonzentration in Tabelle 20 zu erkennen. Die Substratkonzentration nimmt in Fermentation K4L fast kontinuierlich zu, schwankt aber geringfügig im Bereich der Verdünnungsraten  $D_5$  bis  $D_7$ . Ähnliche Schwankungen der Substratkonzentration sind auch in den Fermentationen K1LM und K2LM zu sehen. Trotz allem zeigt der Trend eine Zunahme der Substratkonzentration mit zunehmender Verdünnungsrate.

Im Anhang unter A.5.3 ist außerdem das Chromatogramm (Abb. A. 16) der Standards verschiedener Kohlenhydrate und organischen Säuren mit ihrer Retentionszeit gezeigt.

#### 6.5.4 Bestimmung des Ausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$

Der Ausbeutekoeffizient  $y_{X/S}$  gibt das Verhältnis von entstandener Biomasse zu verbrauchtem Substrat wieder. Mit den entsprechenden Werten für die Biomassekonzentration (Tab. A. 2 und Tab. A. 3) und der Substratkonzentration (Tabelle 20) konnte mit  $c_{S,Le n} = c_{S2R2}$  der Ausbeutekoeffizient mit Gl.(2.30) bestimmt werden. Für die Chemostat-Prozesse mit Hefeextrakt der Fa. Leiber ergibt sich ein Ausbeutekoeffizient  $y_{X/S,Le ber}$  von  $0,4675 \text{ gg}^{-1}$ . Für die Prozesse mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand beläuft sich der Ausbeutekoeffizient  $y_{X/S,La emand}$  auf  $0,2017 \text{ gg}^{-1}$ .

#### 6.5.5 Korrekturmittelverbrauch

Zur Korrektur des pH-Wertes wurde in den Fermentationen 1,5 M Phosphorsäure (T1) und 12,5 %ige Ammoniaklösung (T2) verwendet. Mit Hilfe der aufgezeichneten Signale der Korrekturmittelwaagen in MFCS/win konnte der Verbrauch an Säure bzw. Base während der Fermentationsprozesse bestimmt werden.

Die Daten werden als volumetrische Korrekturmittelverbrauchsrate  $Q_T$  [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] angegeben und können mit der Gl.(6.1) bestimmt werden.

$$Q_T = \frac{\frac{(m_{T,+1} - m_{T,i}) \cdot c_T}{(t_{+1} - t)}}{V_{L,D}} \cdot \rho_T \quad (6.1)$$

mit  $Q_T$  := volumetrische Verbrauchsrate des Korrekturmittels  $T_i$  [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]  
 $m_{T,+1}$  := Masse des Titrationsmittels  $T_i$  zum Zeitpunkt  $i+1$  [g]  
 $c_T$  := Konzentration des Korrekturmittels  $T_i$  [ $\text{g L}^{-1}$ ]  
 $\rho_T$  := Dichte des Korrekturmittels  $T_i$  [ $\text{g L}^{-1}$ ]  
 $V_{L,D}$  := Reaktionsvolumen in der jeweiligen Verdünnungsrate [L]

Die Tabelle 21 zeigt die Dichte und die Konzentration der Korrekturmittel  $c_T$ , welche sich aus der Stoffmengenkonzentration  $c$  und der molaren Masse  $M$  zusammensetzt.

**Tabelle 21: Eigenschaften der Korrekturmittel.**

Korrekturmittel	$c_{T_i}$ [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$c$ [ $\text{mol L}^{-1}$ ]	$M$ [ $\text{g mol}^{-1}$ ]	$\rho_{T_i} (25^\circ \text{C})$ [ $\text{g L}^{-1}$ ]
T1	146,9	1,5	97,95	1880
T2	114,1	6,7	17,03	9501

Mit Gl.(6.1) lässt sich nun die volumetrische Verbrauchsrate an Korrekturmittel während der Fermentationsphasen bestimmen.

Der Korrekturmittelverbrauch für die kontinuierlichen Fermentationen ist in der Tabelle 22 für die Fermentationen K2L und K4L und in der Tabelle 23 für die Fermentationen K1LM und K2LM aufgelistet.

**Tabelle 22: Korrekturmittelverbrauch in den Fermentationen K2L und K4L.**

Fermentationsphase	K2L		K4L	
	$Q_{T1}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T2}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T1}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T2}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b>Batch</b>	0,0136	0,0770	0,0331	0,0427
<b>D<sub>1</sub></b>	0,0504	0	0,0946	0,0017
<b>D<sub>2</sub></b>	0,0591	0	0,0425	0,0003
<b>D<sub>3</sub></b>	0,0650	0,0001	0,0533	0
<b>D<sub>4</sub></b>	0,0789	0	0,1128	0,0012
<b>D<sub>5</sub></b>	0,0792	0	0,1111	0,0004
<b>D<sub>6</sub></b>	0,0870	0,0001	0,1170	0,0003
<b>D<sub>7</sub></b>	0,0952	0	0,1213	0,0017
<b>D<sub>8</sub></b>	0,1032	0	0,1329	0,0003
<b>D<sub>9</sub></b>	-	-	0,0032	0,0140

**Tabelle 23: Korrekturmittelverbrauch in den Fermentationen K1LM und K2LM.**

Fermentationsphase	K1LM		K2LM	
	$Q_{T1}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T2}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T1}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Q_{T2}$ [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b>Batch</b>	0,0370	0,0323	0,1150	0,0652
<b>D<sub>1</sub></b>	0,0453	0,0001	0,0254	0,0133
<b>D<sub>2</sub></b>	0,0526	0,0012	0,0048	0,0183
<b>D<sub>3</sub></b>	0,0203	0,0007	0,0347	0,0178
<b>D<sub>4</sub></b>	0,0566	0,0008	0,1310	0,0648
<b>D<sub>5</sub></b>	0,0776	0,0016	0,0225	0,0389
<b>D<sub>6</sub></b>	0,0229	0,0013	0,0345	0,0525
<b>D<sub>7</sub></b>	-	-	0,0298	0,0512

Die Tabelle 22 und Tabelle 23 zeigen deutlich, dass bis auf den Prozess K2LM hauptsächlich Säure im Chemostatbetrieb benötigt wird.



### 6.5.6 Abgasanalytik und -bilanzierung

Die Auswertung der Abgasanalytik erfolgte mit Hilfe der Gleichung aus 3.2.3. Für den Prozess K2L konnte keine Abgasbilanzierung durchgeführt werden, da die entsprechenden Abgassensoren keine plausiblen Werte aufgezeichnet haben.

Die Daten der Abgasanalyse und- bilanzierung ( $RQ$ ,  $Q_{CO_2}$ ,  $Q_{CO_2}$ ,  $x_{OG}$ ,  $x_{CG}$ ) sind in den Fermentationsverläufen unter 6.4 und im Anhang unter A.4 einzusehen.

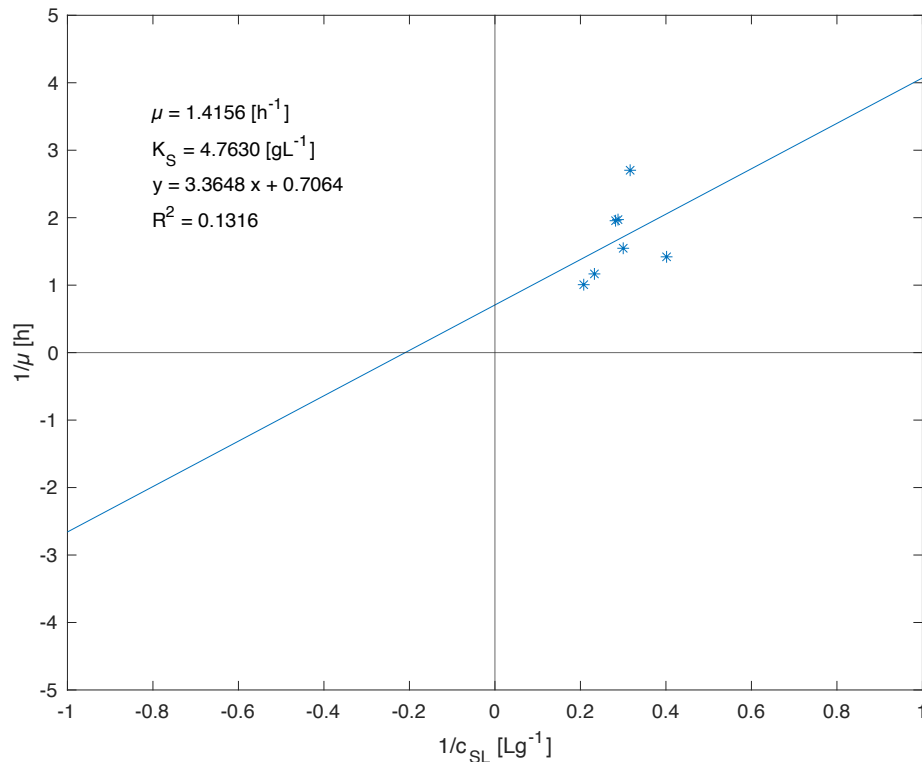
### 6.5.7 Bestimmung der Sättigungskonstante $K_s$

Zur Bestimmung der Sättigungskonstante wurde das Lineweaver-Burk-Diagramm, wie in Abbildung 4 dargestellt, verwendet. Dazu wurde die Michaelis-Menten-Gleichung doppeltreziprok, mit  $\mu = D$ , aufgetragen, um die Geradengleichung (2.4) zu erhalten.

Für die Auswertung wurden die Wachstumsraten aus Tabelle 18 bzw. Tabelle 19 und die Substratkonzentrationen aus Tabelle 20 genutzt. Für die Fermentationen K2L, K4L und K1LM konnte nach doppeltreziproker Auftragung der Daten keine Sättigungskonstanten bestimmt werden, da alle Geradengleichungen negative Schnittpunkte mit der Y-Achse und positive Schnittpunkte mit der X-Achse aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Lediglich die Fermentation K2LM zeigte nach doppeltreziproker Auftragung eine Geradengleichung auf, welche entsprechende Schnittpunkte für eine Auswertung vorweist.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm der Fermentation K2LM ist in der nachstehenden Abbildung 28 gezeigt.



**Abbildung 28: Lineweaver-Burk-Diagramm der Fermentation K2LM.**

Nach Umstellung der Geradengleichung nach  $\mu_{\max}$  bzw.  $K_S$  ergibt sich für die Wachstumsrate ein Wert von  $1,4156 \text{ h}^{-1}$  und für die Sättigungskonstante ein Wert von  $4,7630 \text{ gL}^{-1}$ . Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  weist einen Wert von  $0,1316$  auf.

### 6.5.8 Bestimmung einer optimalen Verdünnungsrate und einer maximalen Produktivität

Für die Bestimmung einer optimalen Verdünnungsrate wird das X-D-Diagramm genutzt (siehe Abbildung 5). Das Maximum des Produktivitätsgraphen XD gibt die optimale Verdünnungsrate  $D_{\text{opt}}$  und die optimale Zellkonzentration  $c_{\text{XL,opt}}$  an (vgl. Seite 23).

In der Abbildung 29 ist das X-D-Diagramm der kontinuierlichen Fermentationen K2L und K4L dargestellt. Ausgehend von der Definition, dass ein Maximum des Produktivitätsgraphen die optimale Verdünnungsrate sowie die optimale Zellkonzentration wieder gibt, kann anhand der Abbildung 29 ein Maximum der

Produktivität  $XD_{\max}$  von  $0,5878 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei einer optimalen Verdünnungsrate  $D_{\text{opt}}$  von  $0,456 \text{ h}^{-1}$  abgelesen werden. Die entsprechende Zellkonzentration  $c_{\text{XL,opt}}$  beläuft sich auf  $1,289 \text{ gL}^{-1}$ .

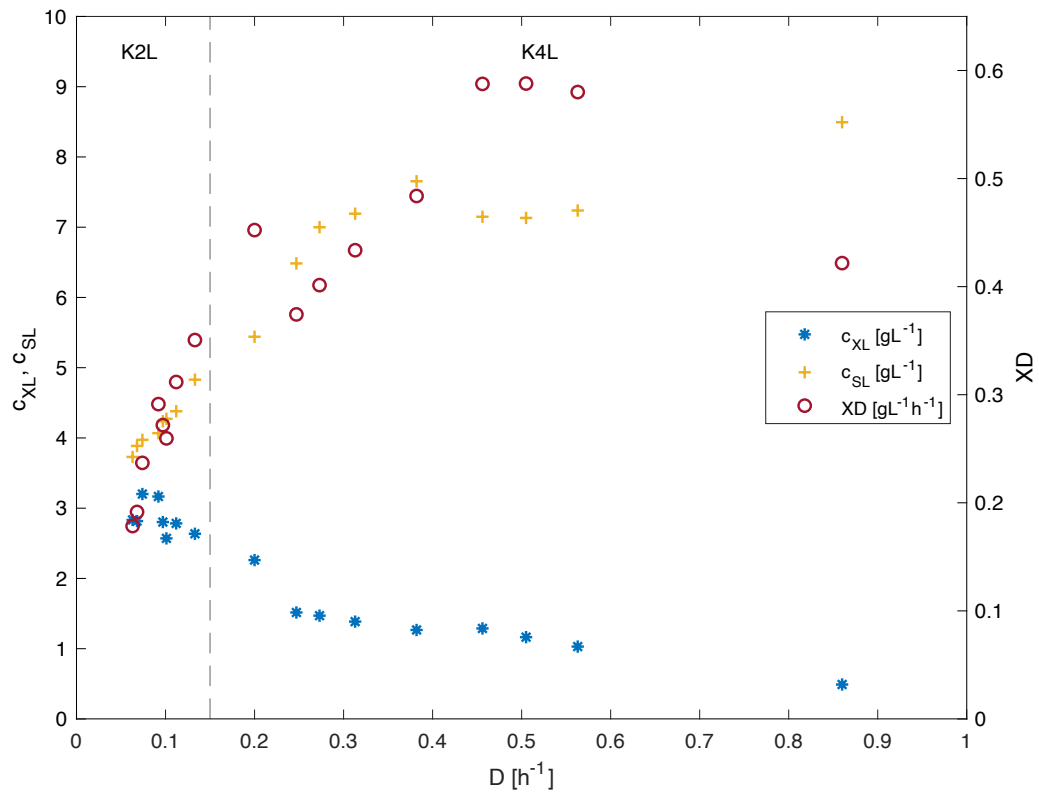
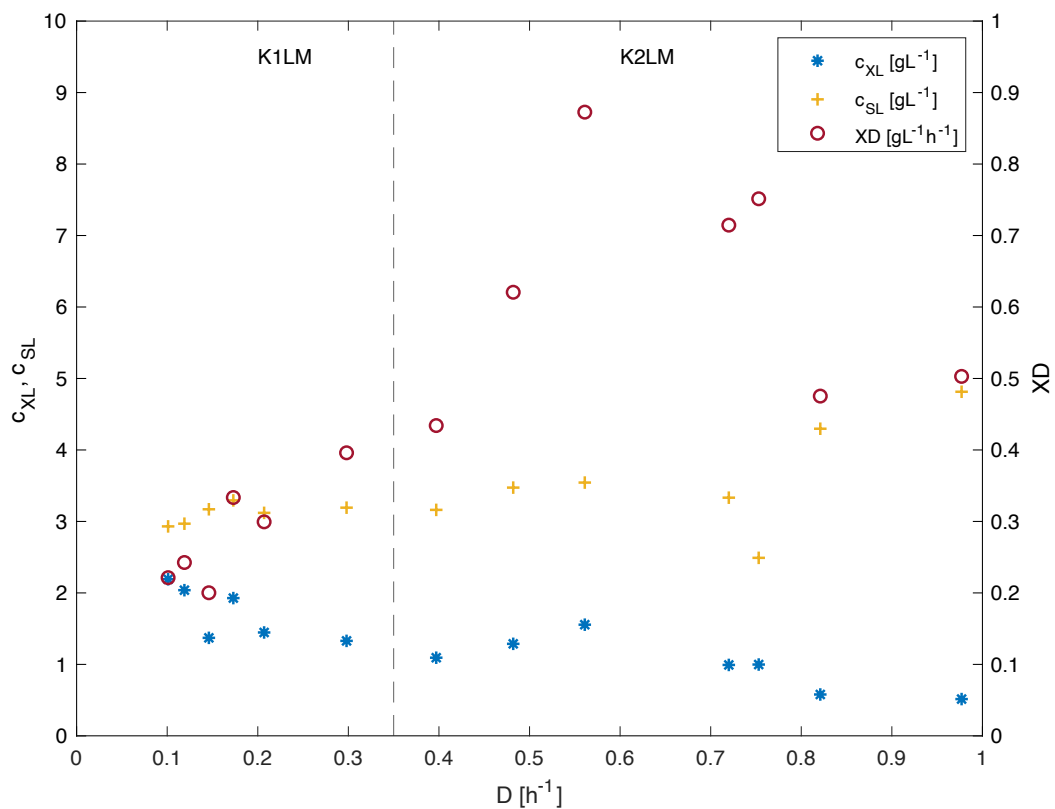


Abbildung 29: X-D-Diagramm der Fermentationen K2L und K4L.

Die Abbildung 30 zeigt das X-D-Diagramm der Fermentationen K1LM und K2LM. Das Produktivitätsmaximum  $XD_{\max}$  liegt bei  $0,8726 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  bei einer Verdünnungsrate von  $0,561 \text{ h}^{-1}$  und die optimale Zellkonzentration  $c_{XL,\text{opt}}$  entsprechend bei  $1,555 \text{ gL}^{-1}$ .



**Abbildung 30: X-D-Diagramm der Fermentationen K1LM und K2LM.**

Die kritische Verdünnungsrate konnte in beiden Fällen nicht bestimmt werden, da kein Auswaschpunkt erreicht wurde.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Working-Zellbank

Ein wichtiger Aspekt für eine Working-Zellbank ist, dass sie frei von Kontaminationen ist. Aufgrund dessen wurde eine Überprüfung auf potentielle Kontaminationen durchgeführt. Dazu wurde die Kryokultur auf Agarplatten ausgestrichen und mikroskopisch untersucht.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 15 zeigen keine Kontaminationen mit Pilzen oder Hefen auf. Die Aufnahmen wirken homogen, so dass keine anderen Zellmorphologien außer Stäbchen zu sehen sind. Da gelegentlich auch Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) in den Laboren stattfinden, kann auf Basis der Aufnahmen eine Kontamination mit anderen stäbchenförmigen Zellen noch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Sichtkontrolle der Agarplatten zeigte deutlich die für *B. licheniformis* bekannte Krustenbildung, während *E. coli* glatte, weiß-gelbe Kolonien aufweisen würde. Es kann daher angenommen werden, dass die WCB frei von Kontaminationen anderer Organismen ist.

In Abbildung 15 sind neben den Stäbchen auch punktförmige Zellen zu sehen. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Sporen des *B. licheniformis*. Da die Zellen unter dem Mikroskop in verschiedenen Ebenen liegen können, kann eine vermeintliche Spore, auch eine vertikal liegende Zelle sein.

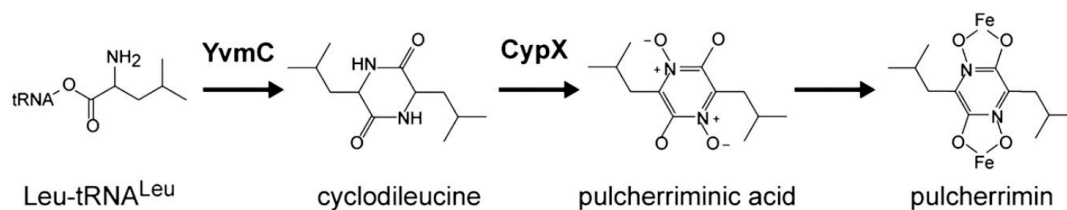
Vergleicht man die Agarplatten in Abbildung 14, so zeigen diese einen deutlichen Farbunterschied. Die rot-bräunliche Färbung konnte auch im kontinuierlichen Prozess mit dem Hefeextrakt der Fa. Lallemand beobachtet werden. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde *B. licheniformis* auf Agarplatten mit LB-Medium der Fa. Roth und eigens hergestelltem LB-Medium mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand ausgestrichen. Dabei zeigte der Organismus auf den Agarplatten mit LB-Medium der Fa. Roth beigene Kolonien, während bei Agarplatten mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand rot-braune Kolonien auftraten.

Eine rot-braune Färbung tritt oft in Verbindung mit Eisen auf. Laut Datenblatt der Fa. Lallemand enthält dieser Hefeextrakt (Anhang, S. ii) mehr als 80 mg Eisen pro 100 g Hefeextrakt. Das U.S. Department für Landwirtschaft gibt im Vergleich ein

Eisengehalt von 4 mg pro 100 g Hefeextrakt an (U.S. Department for Agriculture, 2020). Der Hefeextrakt der Fa. Lallemand enthält somit eine sehr hohe Menge an Eisen. Für das LB-Medium ist keine Angabe über den Eisengehalt verfügbar.

Die rot-braune Färbung in Abbildung 14 kann auf die Bildung eines Eisen-Chelat-Komplexes zurückgeführt werden (Arnauteli et al., 2019; Wang et al., 2018).

Die Abbildung 31 zeigt den Biosyntheseweg dieses Eisen-Chelat-Komplexes (Pulcherrimin) in *B. licheniformis*. Ausgehend von Leu-tRNA<sup>Leu</sup> wird mit der Ligase YvmC zunächst die Verknüpfung von Zyklodileucin katalysiert, welches mit der Oxidoreduktase CypX zu Pulcherriminsäure umgesetzt wird. Anschließend wird die Pulcherriminsäure sekretiert und bildet extrazellulär mit Eisenionen einen Eisen-Chelat-Komplex, das Pigment Pulcherrimin, welches die Rotfärbung der Kolonien verursacht. (Bonfond et al., 2011; Wang et al., 2018)



**Abbildung 31: Biosyntheseweg von Pulcherriminsäure in *B. licheniformis*.** Die Ligase YvmC katalysiert die Bildung von Leu-tRNA<sup>Leu</sup> zu Zyklodileucin, welches mit der CypX zu Pulcherriminsäure oxidiert. Freie Eisenionen im Medium bilden mit der Pulcherriminsäure einen Eisen-Chelat-Komplex, wodurch das Pulcherrimin entsteht (Bonfond et al., 2011).

Die rot-braune Färbung der Kolonien in Abbildung 14 ist somit auf die Bildung von Pulcherrimin zurückzuführen und stellt keine Kontamination dar.

## 7.2 Vorversuche

Die Vorversuche wurden durchgeführt, um erste Erkenntnisse über die wachstumsfördernde Leistung der Hefeextrakte zu erlangen. Aufgrund der konstanten Glukosekonzentration in den Ansätzen (mit Ausnahme der vier Ansätze ohne Glukose) kann die Glukose als Faktor für die erreichten Zellkonzentrationen ausgeschlossen werden. In den Ansätzen mit Hefeextrakt der Fa. Angel und Glukose wurden die höchsten Zelldichten bei Hefeextraktkonzentrationen von

10 gL<sup>-1</sup> und 15 gL<sup>-1</sup> erreicht. Bei den Hefeextraktkonzentrationen von 5 gL<sup>-1</sup> und 7,5 gL<sup>-1</sup> wurde etwa die Hälfte der Zelldichten erreicht. Dies zeigt, dass bei Konzentrationen unter 10 gL<sup>-1</sup> eine oder mehrere Komponenten des Hefeextraktes das mikrobielle Wachstum limitieren.

Beim Ansatz ohne Glukose und 10 gL<sup>-1</sup> Hefeextrakt der Fa. Angel war erst nach 23 h ein Wachstum zu beobachten. Ein Grund dafür könnte das Fehlen der Aminosäure Tryptophan sein. *B. licheniformis* ist in der Lage, die proteinogene Aminosäure zu synthetisieren, allerdings kann die Umstellung des Metabolismus an die Nährstoffumgebung eine gewisse Zeit andauern, wodurch es zu einer längeren *lag*-Phase kommen kann. Tryptophan spielt eine Rolle als Provitamin für Vitamin B3 (Nicotinsäure). Es wird für die Proteinbiosynthese benötigt und trägt im Kynurenin-Stoffwechsel zur zellulären Energiegewinnung durch den Auf- und Abbau von Kohlenhydraten, Amino- und Fettsäuren bei. Der Hefeextrakt der Fa. Angel enthält ca. 200 bis 300 mg Vitamin B3 pro 1 kg Hefeextrakt, während im Hefeextrakt der Fa. Leiber und Lallemand 520 mg bzw. 350 mg pro 1 kg Hefeextrakt vorhanden sind. Somit ist im Hefeextrakt der Fa. Angel weniger Vitamin B3 vorhanden und es fehlt die für den Energiestoffwechsel notwendige Aminosäure Tryptophan, was einen negativen Einfluss auf das Wachstum haben kann. (Angel Yeast Co. LTD, 2015; Dehghani et al., 2019; KEGG Pathway Database, 2020; Richard et al., 2009; Schmidt, 2010)

Ebenso kann die Ausbildung von Sporen ein Grund für die *lag*-Phase sein. Wird die Sporulation einmal angeregt, so ist sie ein unaufhaltsamer Prozess, welcher mehrere Stunden andauern kann (Huang et al., 2017).

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in den Ansätzen mit Hefeextrakt der Fa. Roth dokumentiert werden. Mit steigender Hefeextraktkonzentration bis zu 10 gL<sup>-1</sup> steigt auch die maximal erreichte Zellkonzentration an. Im Vergleich zu den anderen Hefeextrakten, bei denen Zelldichten von bis zu 8,770 gL<sup>-1</sup> erreicht wurden, konnte mit diesem Hefeextrakt nur eine Zellkonzentration von 2,547 gL<sup>-1</sup> erzielt werden. Daraus lässt sich schließen, dass in diesem Hefeextrakt essentielle Komponenten fehlen oder nur in sehr geringen Mengen vorliegen. Dies kann schnell zu einer Substratlimitierung führen. Eine Auflistung der genauen Inhaltsstoffe wird von der Fa. Roth nicht herausgegeben, weshalb hierzu nur Annahmen getroffen

werden können. Mit Roth-Hefeextrakt ohne Glukose konnte in Kultivierungen im Schüttelkolben über drei Tage kein Wachstum beobachtet werden.

In den Ansätzen mit Hefeextrakt der Fa. Leiber steigt die Zellkonzentration mit zunehmender Hefeextraktkonzentration an. Dies zeigt, dass in diesen Kultivierungen nicht die Glukose, sondern eine Komponente des Hefeextraktes ein limitierendes Substrat darstellt. Ohne Glukose konnte zwar ein Wachstum beobachtet werden, allerdings wurde hierbei nur eine Zellkonzentration von  $3,157 \text{ gL}^{-1}$  erreicht. Grund dafür könnte das Fehlen weiterer Kohlenstoffquellen sein, da die Zellkonzentration in den darauffolgenden Stunden langsam sank. Ein Mangel an Sauerstoff kann ausgeschlossen werden, da in den Ansätzen mit Glukose höhere Zelldichten erreicht wurden. Der pH-Wert stieg von 7,0 auf 8,5 während der Kultivierung an. Dies sollte für den Organismus kein Problem darstellen, da das Bakterium auch bei einem pH-Wert von 11 überlebensfähig ist (Ghani et al., 2013).

In den Ansätzen mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand wurden gleiche Beobachtungen gemacht, wie in den Ansätzen von Angel- und Roth-Hefeextrakt. Die Zellkonzentration stieg bis zu einer Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  an und nimmt bei höheren Hefeextraktkonzentrationen wieder ab. Hier könnte die Glukose das limitierende Substrat darstellen. Allerdings könnten auch eine oder mehrere Komponenten des Hefeextraktes bei höheren Konzentrationen inhibierend wirken. In Hefeextrakten können Spurenschadstoffe wie Polyphenole und Bitterstoffe enthalten sein. Diese können eine antimikrobielle Wirkung haben (Bouarab-Chibane et al., 2019; Xie et al., 2017).

Gleiche Wirkung können auch Spurenelemente haben. Spurenelemente, wie Mineralien, sind für den oligodynamischen Effekt bekannt. Das heißt, sie sind in kleinsten Mengen essentiell notwendig, können aber in größeren Dosen hemmend oder gar toxisch wirken. (Chmiel, 2011)

Die vorhandene Menge an Mineralien, wie Eisen, Mangan und Zink unterscheidet sich in den Hefeextrakten der Fa. Leiber und Fa. Lallemand erheblich. Während im Hefeextrakt der Fa. Lallemand über 800 mg Eisen pro 1 kg Hefeextrakt enthalten sind, sind im Hefeextrakt der Fa. Leiber nur 34 mg Eisen pro 1 kg Hefeextrakt vorhanden (siehe Anhang A.2). Genaue quantitative Angaben, ab welcher Konzentration Mineralstoffe inhibierend wirken, sind schwer zu treffen, da die



Spurenelemente meist schon als Verunreinigungen Bestandteile von Medien sind. Hohe Eisenkonzentrationen können im Zellinneren zur Bildung unselektiver Oxidationsmittel und so zu Schädigungen der Zelle führen. (Fuchs et al., 2007; Haenle, 2007)

Hohe Mangankonzentrationen führen zur Hemmung der RNA- und Proteinsynthese (Cheung et al., 1982; Hohle & O'Brian, 2014). Auch dieses Spurenelement ist im Hefeextrakt der Fa. Lallemand mit über 1400 mg pro 1 kg Hefeextrakt deutlich höher konzentriert vorhanden als im Hefeextrakt der Fa. Leiber (3,2 mg pro 1 kg Hefeextrakt). Die hohe Mangankonzentration könnte ein Grund für die geringere maximale Zellkonzentration in den Ansätzen über  $10 \text{ gL}^{-1}$  Lallemand-Hefeextrakt sein.

In hohen Konzentrationen kann auch Zink eine inhibitorische oder gar toxische Wirkung hervorrufen. Zink kann innerhalb der Zelle mit Thiolen reagieren und wichtige Stoffwechselreaktionen stören (Hantke, 2005). Der Hefeextrakt der Fa. Lallemand enthält über die 50-fache Menge an Zink ( $> 900 \text{ mg Zink pro kg Hefeextrakt}$ ) im Vergleich zum Hefeextrakt der Fa. Leiber ( $16 \text{ mg Zink pro kg Hefeextrakt}$ ).

Für die Kultivierung mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand und ohne Glukose wurden gleiche Beobachtungen gemacht wie für den Hefeextrakt der Fa. Leiber. Es konnte zwar ein Wachstum beobachtet werden, allerdings wurde nur eine optische Dichte von  $2,257 \text{ gL}^{-1}$  erreicht. Dies könnte auf fehlende Kohlenstoffquellen hinweisen.

Der Vergleich aller Ansätze zeigt, dass eine Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt mit  $20 \text{ gL}^{-1}$  Glukose in den Kultivierungen Angel, Roth und Lallemand die höchsten Zellkonzentrationen erreichte. Der Hefeextrakt der Fa. Lallemand weist große Mengen an metallischen Spurenelementen (Eisen, Mangan, Zink) auf, welche bei hohen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung haben können. Des Weiteren wird von der Fa. Leiber eine Dosierung von bis zu  $10 \text{ gL}^{-1}$  Hefeextrakt empfohlen (Anhang A.2). Daher wurde für das Zulaufreservoir im kontinuierlichen Prozess eine Hefeextraktkonzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  gewählt.

### 7.3 Kalibrierung der Zufütterpumpen

Bei beiden Pumpen konnte ein lineares Profil in der Drehzahleinstellung zur Flussrate erstellt werden. Es gab keine Auffälligkeiten oder Störungen bei der Kalibrierung der Pumpen. Für zukünftige Versuche wäre eine Kalibrierung direkt mit den jeweiligen Hefeextrakten und den entsprechenden Schläuchen zu empfehlen. So kann beobachtet werden, ob sich bei kleinen Schlauchinnendurchmessern Ablagerungen oder sogar Verstopfungen durch Schwebstoffe im Hefeextrakt bilden und es dadurch zu geringeren Flussraten kommt.

### 7.4 Analyse der Fermentationsverläufe

Im Folgenden werden die Verläufe der Fermentationen K2L, K4L, K1LM und K2LM betrachtet und diskutiert.

#### 7.4.1 Fermentation K2L

Die Batch-Phase der Fermentation K2L verlief gemäß den Erwartungen. Nach Abfall des Sauerstoffpartialdrucks auf 30 % setzte die  $pO_2$ /Drehzahl-Regelung ein. Der kontinuierliche Prozess wurde nach 3,818 h mit einer Zellkonzentration von  $2,557 \text{ gL}^{-1}$  gestartet, da die Turbidität stagnierte. Hier kann es sich allerdings auch um eine kurze Stagnation des Wachstums aufgrund einer Anpassung des Stoffwechsels an gegebene Medienbedingungen handeln. Es ist anzunehmen, dass hier eine Komponente des Hefeextraktes limitierend wirkte. Nach Start der kontinuierlichen Phase stieg die Turbidität wieder an. Dies würde bestätigen, dass die Glukose aus der Batch-Phase noch nicht vollständig verbraucht wurde und eine Hefeextraktkomponente limitierend wirkte. Durch die Zugabe von frischem Hefeextrakt sind wieder alle notwendigen Substanzen für ein Wachstum vorhanden, bis die Restglukose verbraucht bzw. ausgewaschen wurde. Anschließend sinkt die Turbidität und es kommt zu einem starken Anstieg im Sauerstoffpartialdruck, was mit einer geringeren Wachstumsrate einhergeht. Auffällig ist, dass ab der Chemostat-Phase fast ausschließlich Säure für die Korrektur des pH-Wertes benötigt wurde. Vorherige Arbeiten mit *B. licheniformis* berichten von einer fast ausschließlichen Zugabe von Base in glukosebasierenden Fermentationen, aufgrund der Produktion von organischen Säuren (Michel, 2019; Yan et al., 2013). Im Chemostatbetrieb konnte ebenfalls durch die Analyse per HPLC gezeigt werden,

dass sich organische Säuren während des Prozesses im Medium anreicherten (Abb. A. 9). Außerdem gibt das Datenblatt des Hefeextraktes der Fa. Leiber einen pH-Wert von 5 bis 6 in Lösung an. Da aber vorwiegend Säure zugeführt wurde, muss angenommen werden, dass der Organismus basische Substanzen produziert oder saure Komponenten des Mediums verstoffwechselt. Die ansteigende Zugabe an Säure (Tabelle 22) während der Chemostat-Phase lässt sich durch die Zunahme der Verdünnungs- und somit Wachstumsrate erklären. Da mit steigender Verdünnungsrate eine höhere Hefeextraktkonzentration zur Verfügung steht, können die Zellen ihr Wachstum steigern und entsprechend mehr basische Substanzen dem Medium entziehen. Außerdem kann der Organismus organische Säuren, wie Acetat, nicht nur produzieren, sondern auch wieder verstoffwechseln. Besteht ein Mangel an Kohlenhydraten, kann der Organismus Acetat und andere organische Säuren zur Energiegewinnung und zum Zellerhalt nutzen, wodurch Säure dem Medium entzogen wird. (Rachinger, 2010; Schwarzer, 2010; Veith et al., 2004) Die HPLC-Analyse zeigte ebenfalls zu- und abnehmende Acetatkonzentrationen im Verlauf der Fermentation. Dies gibt Grund zur Annahme, dass Acetat sowohl produziert als auch als Energiequelle genutzt wird (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Grund für den Bedarf an Säure kann die Phosphatkonzentration sein. Der Hefeextrakt der Fa. Leiber enthält 160 mg Phosphor in 100 g Hefeextrakt (siehe A.2). Besteht eine Limitierung an Phosphatquellen seitens des Hefeextraktes für den Organismus, kann es dazu führen, dass die zur Korrektur des pH-Wertes verwendete *ortho*-Phosphorsäure verstoffwechselt wird. Diese dissoziiert außerdem in Wasser, was zu einem chemischen Ungleichgewicht führen kann, wodurch zur Korrektur des pH-Wertes ständig Säure nachgeführt werden muss. Phosphat ist elementar notwendig für den Energiestoffwechsel (Bildung von Adenintriphosphat, ATP) des Organismus. (Berg et al., 2013; Hopp, 2018)

In der Fermentation K2L wurden Daten für den Sauerstoffpartialdruck von über 100 % aufgenommen (Abb. A. 3). Dies ist nicht realistisch. Es scheint sich hierbei um einen Defekt am Gerät oder in der Datenübertragung zu handeln. Die Sonden für die Messung des Sauerstoffpartialdrucks beinhalten ein Kaliumchlorid-Elektrolyten, welcher durch eine feine Membran von der Zellsuspension getrennt

ist. Schon kleine Beschädigungen an der Sonde reichen aus, dass der Elektrolyt austritt und die Sonde ihre Funktionsfähigkeit verliert. Außerdem kann es bei langen Prozessen ( $> 500$  h) zu Biofilmbildung an den Sonden kommen, welche ebenfalls das Signal verfälschen. Nach Beendigung der Kultivierung konnten keine Risse in der Membran festgestellt werden. Trotz allem wurde für die weiteren Versuche die Sonde ausgetauscht, sowie sicherheitshalber eine weitere  $pO_2$ -Sonde installiert.

Im gesamten Verlauf konnte ein leicht abfallender Trend der Zellkonzentration  $c_{XL,turb}$  beobachtet werden. Dies spiegelt sich auch weitestgehend in der Zellkonzentration aus der Biotrockenmassebestimmung wider (Tab. A. 2) und entspricht der Theorie des X-D-Diagramms (Abbildung 5), dass bei geringen Verdünnungsraten nur geringe Änderungen in der Zellkonzentration zu sehen sind.

Ebenso steigt die Substratkonzentration nur sehr gering mit zunehmender Verdünnungsrate an (Abbildung 29). Auffallend ist, dass die Substratkonzentration nicht um Null liegt. Laut Theorie des X-D-Diagrammes müsste bei niedrigen Verdünnungsraten das Substrat nahezu vollständig verbraucht werden und erst mit steigender Verdünnungsrate, nahe der kritischen Verdünnungsrate, die Substratkonzentration zunehmen. Es scheinen aber nicht alle Kohlenhydrate bzw. organischen Säuren des Hefeextraktes vollständig verbraucht zu werden.

#### 7.4.2 Fermentation K4L

In der Fermentation K2L wurde keine kritische Verdünnungsrate erreicht, daher wurde die Fermentation K4L durchgeführt. Hierbei wurde direkt mit einer höheren Verdünnungsrate gestartet, welche in größeren Abständen als zuvor erhöht wurde. Die Fermentation K4L startete mit einer Verdünnungsrate von  $0,2 \text{ h}^{-1}$  nach einer Batch-Phase von  $4,324 \text{ h}$ . In der Batch-Phase ist deutlich eine *lag*-Phase nach der Inokulation zu sehen (Abbildung 20). In der *lag*-Phase sinkt der Sauerstoffpartialdruck auf 30 % ab und mit Start der  $pO_2$ /Drehzahl-Regelung setzte auch die exponentielle Wachstumsphase ein. In beiden Fermentationen mit Hefeextrakt der Fa. Leiber (K2L, K4L) wurde eine spezifische Wachstumsrate von  $0,59 \text{ h}^{-1}$  und entsprechend eine Verdopplungszeit von  $101,7 \text{ min}$  in der Batch-Phase erzielt. In der Literatur finden sich Verdopplungszeiten von 60 Minuten auf Glukose ohne Hefeextrakt bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (Hanlon & Hodges, 1981). In einer vorherigen Arbeit

wird von Wachstumsraten von ca.  $0,3 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,35 \text{ h}^{-1}$  auf Komplexmedium berichtet (Michel, 2019). Die hier vorliegenden Wachstumsraten sind somit höher als die Erfahrungswerte vorheriger Arbeiten, liegen dennoch unter den Literaturwerten für die maximale Wachstumsrate von *B. licheniformis*.

Nach einem rapiden Anstieg im Sauerstoffpartialdruck und einem Abfall der Zellkonzentration wurde die Chemostat-Phase gestartet. Dies führte zu einem direkten Absinken der Zellkonzentration durch ein Auswaschen der Zellen. In diesem Batch ist davon auszugehen, dass die Glukose, anders als im Prozess K2L, vollständig verstoffwechselt wurde, da nach Start der Zugabe von frischem Hefeextrakt kein Anstieg in der Zellkonzentration zu erkennen ist. Wie auch im vorherigen Prozess wurde hier hauptsächlich Base in der Batch-Phase zur Korrektur des pH-Wertes verwendet, während im Chemostatbetrieb vorwiegend Säure zugeführt wurde. Tabelle 22 zeigt, dass die Zufuhr an Säure in den Verdünnungsraten  $D_2$  und  $D_3$  noch ähnlich niedrig ist, wie in den Verdünnungsraten  $D_1$  und  $D_2$  im Prozess K2L.

Bis zur Verdünnungsrate  $D_4$  zeigt sich eine abnehmende Zellkonzentration, welche anschließend durch Schwankungen im  $pO_2$  und in der Rührerdrehzahl, ebenfalls ins Schwanken gerät. Eine Anlagerung von Zellen und Luftblasen an der  $pO_2$ -Sonde kann Schwankungen im Signal verursachen.

Außerdem konnte ab dieser Verdünnungsrate eine Biofilmbildung an der Glaswand des Bioreaktors und an der Turbiditätssonde beobachtet werden. Dieser Biofilm könnte auch den Bedarf an Säure ab Verdünnungsrate  $D_4$  erklären, da dieser doppelt so hoch ist, wie in Verdünnungsrate  $D_3$ . Die Immobilisierung der Zellen an der Reaktorinnenwand führten zu einer höheren Zellkonzentration innerhalb des Reaktors und somit auch zu einer höheren Stoffwechselrate, was einen erhöhten Bedarf an Säure erklären könnte.

Bei Betrachtung der Verdünnungsrate  $D_9$  fällt auf, dass hier deutlich mehr Base als Säure zugeführt wurde. Dies lässt auf eine sinkende Zellkonzentration hindeuten. Es kann angenommen werden, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren sich schnell genug zu teilen und aufgrund der erhöhten Verdünnungsrate ausgewaschen wurden. Daher wurden dem Hefeextrakt weniger basische Substanzen entzogen, wodurch der pH-Wert im Medium saurer und Base zugeführt wurde. Es konnte zwar

noch eine geringe Zellkonzentration gemessen werden, welche möglicherweise aber nicht vorhanden gewesen wäre, wenn die Biofilmbildung nicht so stark gewesen wäre. Außerdem kann bei der Bestimmung der Biotrockenmasse nicht von lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Die Biofilmbildung ist ein komplexer Vorgang, welcher durch verschiedene Faktoren der Umwelt beeinflusst wird. Der Biofilm stellt eine Überlebensstrategie des Organismus dar, um sich vor Umwelteinflüssen zu schützen. Umwelteinflüsse können zum Beispiel pH-Wert- und Salzkonzentrationsänderungen oder Nährstoffbedingungen sein (Randrianjatovo-Gbalou et al., 2017). Der Hefeextrakt der Fa. Leiber stellt nur geringe Mengen freier Kohlenhydrate zur Verfügung (1,31 g Kohlenhydrate pro 10 g Hefeextrakt). Dabei kann es schnell zu einem Mangel an Kohlenstoffquellen kommen. Der Organismus ist zwar fähig, aus den vorhandenen Aminosäuren, Kohlenstoffe zu beziehen, muss hierfür aber entsprechende Enzyme synthetisieren und seinen Metabolismus anpassen (Voigt et al., 2015). Die Biofilmbildung kann dem Organismus Schutz vor negativen Umwelteinflüssen bieten.

Die Abgasanalyse des Prozesses in Abbildung 22 zeigt, dass in der Batch-Phase ein Respirationsquotient von 1,0 bis 1,3 erreicht wird. Dies weist auf die Verstoffwechslung von Glukose hin, bei der unter Verbrauch von sechs Sauerstoffmolekülen sechs Kohlenstoffdioxidmoleküle entstehen. Bei der Verstoffwechslung von sauerstoffreichen Säuren wie Maleinsäure, welche laut der Daten der HPLC-Analyse in Abb. A. 9 (vgl. Abb. A. 16) im Hefeextrakt vorhanden ist, kommt es zu einem Respirationsquotienten von über 1,0.

Im darauffolgenden Verlauf des Prozesses sinkt der Respirationsquotient in der Chemostat-Phase auf ca. 0,75 ab (Abb. A. 5 und Abb. A. 6). Respirationsquotienten von 0,71 bis 0,80 weisen auf die Verstoffwechslung von Proteinen und Fetten hin. Dies würde zeigen, dass der Organismus in der kontinuierlichen Phase seinen Metabolismus auf die Verstoffwechslung von Aminosäuren zur Energiegewinnung umgestellt hat. (Chmiel, 2011)

In diesem Prozess wurde die Begasungsrate variiert, um deutlichere Unterschiede in den Abgasmolenbrüchen zu erzielen. Die Begasungsrate kann dabei Einfluss auf den Sauerstoffpartialdruck haben, da sich die Größe der eingetragenen Gasblasen

mit unterschiedlicher Begasungsrate verändern kann. Hierbei können große Gasblasen Störungen der Sonde verursachen. Die Änderung in der Begasungsrate konnte keine Besserung im  $pO_2$ -Signal bewirken und keine deutlicheren Unterschiede in den Abgasmolenbrüchen erzielen. Es konnte nicht geklärt werden, was die Ursache für die Schwankungen ab Ende der Verdünnungsrate  $D_3$  ist.

#### 7.4.3 Fermentation K1LM

Die Kultivierung K1LM startete in der exponentiellen Phase ohne erkennbare *lag*-Phase. Diese stagnierte am Zeitpunkt  $t = 1,6$  h kurzzeitig, bevor sie nach ca. 4,3 h in die stationäre Phase überging. Als Ursache der Stagnation kann eine nährmedienbedingte Umstellung des Metabolismus angenommen werden. Der Batch endete mit einem starken Peak im Sauerstoffpartialdruck und einem parallelen Sinken der Zellkonzentration zum Zeitpunkt  $t = 5,5$  h. Dies bedeutet, die Medienvoraussetzungen für unlimitiertes Wachstum sind ab diesem Zeitpunkt nicht mehr gegeben. Die Zellen benötigen weniger Sauerstoff, daher kommt es zum steilen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks. Ebenso wird schlagartig keine Säure mehr produziert, wodurch es zum Anstieg des pH-Wertes kommt. In diesem Prozess wurde in der Batch-Phase eine Wachstumsrate von  $0,6382 \text{ h}^{-1}$  bestimmt, welche wie bereits im Abschnitt zuvor erwähnt, die erwartete Wachstumsrate von ca.  $0,35 \text{ h}^{-1}$  deutlich übersteigt, dennoch unter Literaturwerten liegt (Hanlon & Hodges, 1981).

Die Chemostat-Phase wurde mit einer volumetrischen Hefeextraktzulauftrate von  $1,006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gestartet, da aufgrund der vorherigen Prozesse davon ausgegangen wurde, dass die kritische Verdünnungsrate nicht unter  $0,1 \text{ h}^{-1}$  liegt. Das Verhalten der Korrekturmittel entspricht hierbei den Beobachtungen aus vorangegangenen Prozessen. In der Batch-Phase wird vorwiegend Base zugeführt, während in der Chemostat-Phase die Zufuhr an Säure anstieg. Aufgrund einer Abnahme der Zellkonzentration nach dem Übergang in die Chemostat-Phase, kann angenommen werden, dass die Glukose der Batch-Phase vollständig verbraucht wurde. Auffallend ist, dass die Zellkonzentrationen aus der Biotrockenmassebestimmung und die ermittelten Zellkonzentrationen aus der Turbiditätsmessung teilweise stark voneinander abweichen, obwohl diese aufeinander basieren. Um eine bessere Übereinstimmung der Daten zu erzielen, wären beispielsweise Änderungen in der

Auswertungsmethode mit MATLAB® nötig. Dies könnte zum Beispiel ein anderes Verfahren zur Bestimmung zweier unbekannter Korrelationsparameter sein.

In der Verdünnungsrate  $D_4$  traten Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck und in der Turbidität auf. Ab der Verdünnungsrate  $D_4$  konnte auch eine Anlagerung von Zellen an der Glasinnenwand des Bioreaktors und an der Turbiditätssonde beobachtet werden. Aufgrund des unerwarteten Verlaufs der Turbiditätsmessung wurden hier auch innerhalb der Verdünnungsrate *Offline*-Proben genommen. Dies diente zur Überprüfung, ob die Zellkonzentration tatsächlich angestiegen ist oder die Sonde mit einem Biofilm bedeckt war. Da die *Offline*-Zellkonzentration gleich blieb, aber die Turbidität anstieg, ist davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um einen Zellbewuchs an der Sonde handelte.

Es konnte beobachtet werden, dass die Färbung der Zellsuspension in der Batch-Phase beige und gelblich war, während sie in der Chemostat-Phase mit zunehmender Zulauftrate an Hefeextrakt eine rot-braune Färbung aufwies. Da in der Batch-Phase nur eine initiale Eisenkonzentration vorlag, kann angenommen werden, dass das vorhandene Eisen schnell verstoffwechselt oder komplexiert wurde, die Menge an Eisen-Chelat-Komplexen für eine visuell erkennbare Färbung aber nicht ausreichend war. In der Chemostat-Phase hingegen wurden die Zellen kontinuierlich mit hohen Eisenkonzentrationen (im Vergleich zum Hefeextrakt der Fa. Leiber, siehe 7.1) versorgt. Dadurch kann die Annahme getroffen werden, dass die Bildung von Eisen-Chelat-Komplexen hier höher ist und es zu einer ausgeprägten Rotfärbung kommt.

Die Abgasbilanzierung zeigt einen Respirationsquotienten, welcher sich nach einem Anstieg in der Batch-Phase vorwiegend im Bereich von 1,0 bis 1,5 bewegte. Wie im Abschnitt 7.4.2 erwähnt, weist ein Respirationsquotient von über 1,0 auf eine Verstoffwechslung von organischen Säuren hin (Chmiel, 2011). So bezieht der Organismus seine Energie in der Chemostat-Phase vor allem aus organischen Säuren. Erst in der letzten Verdünnungsrate  $D_6$  sinkt der Respirationsquotient etwas unter 1,0.

Ein kritische Verdünnungsrate wurde in dieser Fermentation nicht erreicht, weshalb eine zweite Fermentation mit höheren Verdünnungsraten durchgeführt wurde.



#### 7.4.4 Fermentation K2LM

Die Fermentation K2LM zeigt in Abbildung 25 einen für Batch-Kultivierungen erwarteten Verlauf. Nach einer anfänglichen *lag*- und  $pO_2$ /unkontrollierten-Phase, beginnt ab ca. 2,5 h die exponentielle Phase mit Einsetzen der  $pO_2$ /Drehzahl-Regelung. Wie in den Prozessen zuvor wurde in der Batch-Phase hauptsächlich Base zugeführt. Das Ende der Batch-Phase konnte nach ca. 7,2 h durch einen Peak im Sauerstoffpartialdruck und im pH-Wert beobachtet werden. Dies weist auf eine Substratlimitierung und auf eine einhergehende Wachstumsstagnation hin. Die maximale Wachstumsrate von  $0,8184 \text{ h}^{-1}$  übersteigt ebenfalls die Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe ( $0,3 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,35 \text{ h}^{-1}$ ). Im Gegensatz zu den vorherigen Prozessen wurde in dieser Kultivierung vorwiegend Base in der Chemostat-Phase (ab ca. 16 h) zugeführt. Da keine Angaben über den Kohlenhydratgehalt der Fa. Lallemand vorliegen, konnten nur Anhand des HPLC-Chromatogramms in Abb. A. 15 Annahmen getroffen werden. Die Peakfläche des Hefeextraktes der Fa. Lallemand ist bei einer Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  deutlich größer. Es wird somit angenommen, dass mehr Kohlenhydrate bzw. organische Säuren vorliegen, was den Bedarf an Base erklären könnte. Bei höheren Hefeextraktzulaufkonzentrationen stehen dem Organismus mehr Kohlenstoffquellen für das Wachstum zur Verfügung. Dadurch lässt sich annehmen, dass weniger organische Säuren zur Energiegewinnung genutzt werden. Dies würde dazu führen, dass weniger Base zugeführt werden muss, um den pH-Wert auf pH 7,0 zu regeln. Allerdings spricht dagegen, dass der Respirationsquotient über 1,0 ist (siehe Abbildung 26 und Abb. A. 8), was auf eine Verstoffwechslung von organischen Säuren hinweist.

Die Phosphatkonzentration könnte in diesem Fall auch eine Rolle spielen. Im Gegensatz zum Hefeextrakt der Fa. Leiber, welcher 160 mg Phosphor pro 100 g Hefeextrakt enthält, sind im Hefeextrakt der Fa. Lallemand 1280 mg Phosphor in 100 g Hefeextrakt vorhanden (siehe A.2). Im Kapitel 7.4.1 wurde bereits die Relevanz von Phosphatquellen für den Organismus erläutert. In dieser Fermentation kann daher die Annahme getroffen werden, dass dem Organismus mit höheren volumetrischen Hefeextraktzulaufkonzentrationen eine höhere Konzentration an Phosphat zur Verfügung steht. Aus diesem Grund besteht für den

Organismus nicht die Notwendigkeit die Phosphatquelle aus dem Titrationsmittel zu beziehen.

Im Verlauf der Fermentation in Abbildung 26 traten Kippschwingungen im Reaktionsvolumen auf. Da die Pumpe gleichmäßig Hefeextrakt zu- und abgeführt hat (Ausnahme im Bereich 90 h bis 95 h), kann die Pumpe für die Schwankungen ausgeschlossen werden. Die Ernte der Zellsuspension erfolgte über ein Tauchrohr auf Füllstandshöhe. Das Reaktionsvolumen wurde gravimetrisch erfasst. Der Druck der Gaszufuhr wurde kontrolliert und zeigte keine Schwankungen auf. Es konnte allerdings nach der Fermentation zum Teil ein Zellbewuchs am Begasungsring festgestellt werden. Dieser Zellbewuchs beeinflusst die Durchlässigkeit der Luftzufuhr und kann ein Grund für eine wechselnde Gasblasengröße sein. Es wurde beobachtet, dass die Größe der Gasblasen in diesen Zeiträumen stark variierte, so dass möglicherweise der Kontakt zwischen Zellsuspension und Tauchrohr nicht konstant aufrechterhalten werden konnte. Dies hat zur Folge, dass das Reaktionsvolumen schwankt.

Im Zeitraum von 90 h bis 95 h setzte sich der Schlauch der Hefeextraktzufuhr vollständig mit unlöslichen Bestandteilen des Hefeextraktes zu. Es konnte kein frisches Medium mehr zugeführt werden und es wurde nur Zellsuspension abgeführt. Durch den parallelen Anstieg der Rührerdrehzahl stieg der Füllstand und es kam zu einem Verlust von Reaktionsvolumen. Im Gegensatz zum Prozess K1LM, bei dem ein Schlauchinnendurchmesser von 2,06 mm genutzt wurde, betrug der Schlauchinnendurchmesser in diesem Prozess nur 1,30 mm. Es ist zu empfehlen, bei Hefeextrakten mit einem höheren Anteil an Schwebstoffen größere Schlauchinnendurchmesser zu verwenden.

Eine homogene Durchmischung der Reservoirgefäße mit einem Volumen von 20 L war aufgrund der unebenen Böden mit einem Rührfisch nicht zu erreichen. So akkumulierten sich die Schwebstoffe am Boden des Gefäßes und mit sinkendem Reservoirvolumen wurden mehr Schwebstoffe mitgeführt. Dies führte aller Annahmen nach zur Verstopfung der Zulaufleitung.

In diesem Prozess wurden Phasen mit steigender Rührerdrehzahl beobachtet, welche mit steigender Zellkonzentration aus der Turbidität und sinkendem Sauerstoffpartialdruck einhergingen. Im Zeitraum von 107 h bis 120 h ist dies

beispielsweise deutlich sichtbar. Eine Ursache für dieses Verhalten ist nicht zu erkennen. Durch eine langanhaltende hohe Rührerdrehzahl kam es zum Ablösen des Biofilms von der Reaktorinnenwand und den Sonden. Es war ein Sinken der Zellkonzentration zu beobachten, welches dadurch erklärt werden könnte, dass sich der Biofilm auf der Turbiditätssonde abgelöst hat. Ebenfalls kam es zu einem Abfall in der Rührerdrehzahl. Durch das Ablösen des Biofilms von der Reaktorinnenwand, konnten diese Zellen über das Erntetauchrohr abgeführt werden. Dies führt zu einer Reduktion der Sauerstoffverbraucher und einem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks. Durch die anschließende  $pO_2$ /Drehzahl-Regelung wurde der  $pO_2$  durch eine Reduktion der Rührerdrehzahl wieder eingestellt.

Nach ca. 140 h Kultivierungszeit war das Reservoir der Base über Nacht aufgebraucht, wodurch es zu einem Abfall im pH-Wert sowie der Zellkonzentration und entsprechend zu einem Anstieg im Sauerstoffpartialdruck kam.

In diesem Prozess konnte auch keine kritische Verdünnungsrate erzielt werden.

## **7.5 Beurteilung der Etablierung der kontinuierlichen Prozesse**

Im Folgenden wird die Etablierung einer Versuchsanlage zur Bestimmung wachstumsassoziierter Eigenschaften von Hefeextrakten im kontinuierlichen Prozess beurteilt.

### **7.5.1 Auswirkungen der Flussrate des Zulaufreservoirs auf den Prozess**

Ein Qualitätsmerkmal zur Beurteilung eines kontinuierlichen Prozesses stellt die Genauigkeit der Verdünnungsrate, sowie die Übereinstimmung mit der Wachstumsrate dar ( $\mu = D$ ). Eine Abweichung der tatsächlichen Flussrate des Zulaufreservoirs vom Sollwert hat Auswirkungen auf den gesamten Prozess. Die Flussrate ist wiederum abhängig von den Pumpen des Zulaufreservoirs und den verwendeten Schläuchen.

Trotz eines linearen Kalibrierungsprofils der Pumpen (siehe 6.3), fiel während der Fermentationen auf, dass nicht immer das gewünschte Volumen gefördert wurde. Gründe dafür können Feuchtigkeit im Abluftfilter und dadurch entstehender Druck im Reaktor, aber auch ein Blockieren der Schläuche sein. In allen Fermentationen konnte eine zum Teil starke Ablagerung nicht gelöster Substanzen in den

Schläuchen festgestellt werden. Dies führte (meist über Nacht) zur Anhäufung von ungelösten Substanzen, was sich auf die Flussrate und das Reaktionsvolumen auswirkte. Dies konnte vor allem an niedrig gelegenen Schlauchbereichen festgestellt werden. Es ist von Vorteil bei der Verwendung von Hefeextrakten Schläuche mit größerem Schlauchinnendurchmesser zu nutzen, um ein Blockieren der Schläuche zu verhindern. Eine Abnutzung der Schläuche konnte nach Kultivierungen über lange Zeiträume ( $> 300$  h) ebenfalls festgestellt werden. Durch Materialermüdung der Schläuche kann sich das Fördervolumen ändern.

Die Ernte erfolgte während der Fermentationen über ein Tauchrohr, welches sich auf Höhe des Füllstandes befand. Dies diente zur Aufrechterhaltung eines konstanten Reaktionsvolumens. Die Abweichungen des Reaktionsvolumens beliefen sich auf bis zu  $0,75 \text{ L} \pm 9,333 \%$ , was ca.  $0,070 \text{ L}$  entspricht. Im Durchschnitt belief sich die Abweichung des Reaktionsvolumens über alle Fermentationen auf  $3,44 \%$ , was  $0,0258 \text{ L}$  entspricht.

#### 7.5.2 Vergleich der Wachstums- und Verdünnungsrate

Entsprechend der Theorie eines kontinuierlichen Prozesses gilt die Annahme, die Wachstumsrate lasse sich über die Verdünnungsrate einstellen. Zur Überprüfung dieser Annahme sind verschiedene Wege möglich. Mit Hilfe der Turbiditätsdaten und der Korrelationsparameter  $k_1$  und  $k_2$ , konnte die Zellkonzentration bestimmt werden. Bei Betrachtung der Zellkonzentrationen über einen Zeitraum (z. B. über eine Stunde) am Ende einer Verdünnungsrate unter Annahme eines Gleichgewichts, sollte sich in einer halblogarithmischen Auftragung der Daten  $\ln(c_{XL})$  gegen die Zeit bei Anlegen einer Trendlinie, eine Steigung von Null ergeben. Dies würde bedeuten, es gibt keine Änderungen in der Zellkonzentration und ein Gleichgewicht hat sich eingestellt. Dies lässt sich in der Praxis allerdings schwer umsetzen. Schwankungen der Turbidität sind auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. So kann beispielsweise eine Änderung in der Rührerdrehzahl zu Schwankungen in der Turbidität führen, da die Trübungssonde sensitiv auf Begasungs- und Rührbedingungen reagiert (Gregory & Thornhill, 1997; Steinke et al., 2009). Des Weiteren konnte in allen Fermentationen beobachtet werden, dass sich ein Biofilm sowohl an den Sonden als auch an der Reaktorinnenwand bildete. Durch die Bildung des Biofilms an der Sonde wurden die

Daten verfälscht, da die Durchlässigkeit am Sensor der Sonde abnimmt und die Turbidität somit steigt. Daher liefern die Turbiditätsdaten in diesen Prozessen vor allem für den Chemostatbetrieb keine zuverlässigen Daten.

Eine andere Möglichkeit ist die Auftragung der gemessenen Daten der optischen Dichte innerhalb einer Stunde am Ende einer Verdünnungsrate. Da es sich hierbei lediglich um drei Datenpunkte handelt, ist es auch hier schwierig, die Steigung einer Trendlinie als Anhaltspunkt für die Übereinstimmung von Verdünnungs- und Wachstumsrate zu nehmen. Aufgrund dessen wurde für die Bestimmung der Wachstumsrate im Chemostatbetrieb die Gl.(2.24) verwendet. Diese bezieht neben der Zellkonzentration und -masse auch die Flussrate mit ein und bietet damit eine bessere Möglichkeit zur Bestimmung der Wachstumsrate. Die Vergleiche der Wachstums- und Verdünnungsraten in der Tabelle 18 und Tabelle 19 zeigen Abweichungen von  $\pm 0,07922 \text{ h}^{-1}$  auf, da nur Bezug auf wenige Datenpunkte genommen werden kann. Optimal für die Auswertung wäre eine Trübungssonde, die nicht anfällig für die Anhaftung von Bakterien ist.

Es fällt auf, dass die durchgeführten Verdünnungsraten zum Teil deutlich die maximale Wachstumsrate auf Hefeextrakt ( $0,1828 \text{ h}^{-1}$  Leiber;  $0,2588 \text{ h}^{-1}$  Lallemand) überschreiten. Daher wurden zunächst Verdünnungsraten unterhalb dieser Werte gewählt und die Verdünnungsrate nach und nach erhöht. Da es bis zu diesen Wachstumsraten zu keinem Zeitpunkt zu einem Auswaschen der Zellen kam, wurden auch Verdünnungsraten über der maximalen Wachstumsrate gewählt. Allerdings konnte auch hier die kritische Verdünnungsrate nicht ermittelt werden. Grund dafür könnte die bereits zuvor erwähnte Anhaftung der Zellen an der Bioreaktorwand sein. Durch die Bildung des Biofilms an der Reaktorinnenwand sammeln sich im Reaktor Zellen an, welche im Falle eines ideal durchmischten Rührkessels nicht vorhanden wären. So kann es sein, dass trotz erhöhten Verdünnungsraten noch Zellen vorhanden sind, obwohl die maximale Wachstumsrate bereits erreicht bzw. überschritten wurde. Durch eine manuelle kurzzeitige Erhöhung der Rührerdrehzahl sollte der Biofilm von der Innenseite des Reaktors und den Sonden möglichst gelöst werden, damit er anschließend über das Erntetauchrohr abgetragen werden konnte. Dieser Mechanismus löst allerdings auch aus, dass größere Zellflocken im Reaktor verweilen und beim Rührvorgang an

der Turbiditätssonde höhere Signale auslösen. Dies kann ebenfalls zu schwankenden Signalen führen. Es ist auch anzunehmen, dass durch das Rühren ständig Bakterien aus dem Biofilm gelöst werden und daher die maximale Wachstumsrate überschritten wird, da ständig Bakterien zurück in die Flüssigphase gelangen und zum Wachstum beitragen können.

### 7.5.3 Substratanalyse per HPLC

Die Substratanalyse in einem Prozess mit Hefeextrakt ist dahingehend kompliziert, da sich im Hefeextrakt viele verschiedene Substanzen, wie Vitamine, Mineralstoffe und Kohlenhydrate befinden und diese vom Organismus nie in gleichem Maße verbraucht werden. So war es, wie in der Durchführung dieser Arbeit schon erwähnt, zunächst nötig, verschiedene Methoden zur Analyse der Substrate zu testen, wobei sich die HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren als die zuverlässigste Methode herausstellte. Bei Betrachtung der einzelnen Substanzen des Hefeextraktes, kann angenommen werden, dass die Kohlenhydrate für den Organismus eine primäre Rolle im Wachstum und Lebenserhalt spielen. Daher wurden in dieser Arbeit diese stellvertretend als Substrat betrachtet. Durch die Fähigkeit des *B. licheniformis* essentielle Aminosäuren und Vitamine zu synthetisieren, scheinen diese als Inhaltsstoffe des Hefeextraktes nur eine sekundäre Rolle zu spielen.

Für die Bewertung des kompletten Hefeextraktes als Substrat, ist es notwendig für alle Substanzen entsprechende Analysemethoden heranzuziehen, um für jede einzelne Substanz eine Affinitätskonstante bestimmen zu können.

Im Nachhinein stellte auch die HPLC keine optimale Methode für die Substratanalyse dar. Da der Organismus organische Säuren nicht nur verstoffwechseln, sondern auch produzieren kann, musste zunächst differenziert werden, welche Kohlenhydrate und organischen Säuren ausschließlich verbraucht und nicht produziert wurden. Dies erschwerte die Auswertung der Daten.

Die Daten der Substratanalyse sind für die Bestimmung der Affinitätskonstante  $K_S$  allerdings wichtig. Bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk wird die reziproke Substratkonzentration gegen die reziproke Verdünnungsrate aufgetragen, um die Sättigungskonstante zu ermitteln. Laut Theorie des Chemostaten wäre zu erwarten,

dass die Substratkonzentration in den niedrigen Verdünnungsraten, d. h. vor allem in den Prozessen K2L und K1LM deutlich näher bei Null liegen würde (vgl. Tabelle 20). Erst mit Annäherung an die maximale Wachstumsrate wäre ein schneller Anstieg der Substratkonzentration zu erwarten. Bei Betrachtung beider Prozesse mit Hefeextrakt der Fa. Leiber zeigt sich, dass mit zunehmender Verdünnungsrate deutlichere Unterschiede in der Substratkonzentration bestimmt werden konnten. In den Prozessen K1LM und K2LM ist die Substratkonzentration selbst bei sehr hohen Verdünnungsraten nicht mal bei der Hälfte der Ausgangskonzentration im Reservoir von  $10 \text{ gL}^{-1}$ .

#### 7.5.4 Auswirkungen der Zell- und Substratkonzentration auf den Ausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$

Die Auswertung der Ausbeutekoeffizienten in 6.5.4 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Hefeextrakten auf. Während für den Hefeextrakt der Fa. Leiber ein Ausbeutekoeffizient von  $0,4675 \text{ gg}^{-1}$  ermittelt wurde, liegt der Ausbeutekoeffizient des Hefeextraktes der Fa. Lallemand nur bei  $0,2017 \text{ gg}^{-1}$ . Dieser deutlich niedrigere Wert liegt an den gemessenen Substratkonzentrationen, da diese nicht den Erwartungen entsprachen. Bereits unter 7.4.4 wurde mit Abb. A. 15 gezeigt, dass der Hefeextrakt der Fa. Lallemand deutlich mehr Kohlenhydrate und organischen Säuren enthält, so dass zu erwarten wäre, dass pro Gramm Substrat mehr Gramm Zellen entstehen würden. Allerdings könnten inhibitorische Faktoren zu diesem niedrigeren Ausbeutekoeffizienten führen.

#### 7.5.5 Die Sättigungskonstante $K_S$

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Sättigungskonstante für ein komplexes Medium wie Hefeextrakt zu bestimmen. Dabei war es notwendig, Bestandteile des Hefeextraktes als Vertreter des Hefeextraktes zu definieren, da das Monod-Modell nur ein limitierendes Substrat vorsieht (Chmiel, 2011). Für die Bestimmung der tatsächlichen Sättigungskonstante, wäre es nicht nur notwendig alle Bestandteile des Hefeextraktes zu kennen, sondern auch deren Verbrauch und Limitierung. Da dies bei Substraten mit sehr vielen Bestandteilen aber enorm erschwert wird, wird sich in dieser Arbeit auf einen kleinen Teil der vorhandenen Substanzen konzentriert. Da Kohlenhydrate und organische Säuren als primäre Energiequellen für den

Organismus dienen, wurden diese hier als Vertreter des Hefeextraktes ausgewählt. Die Sättigungskonstante bezieht sich somit auf die im Hefeextrakt vorhandenen Kohlenhydrate und organischen Säuren.

Für die Bestimmung der Sättigungskonstante wird gerne das Lineweaver-Burk-Diagramm zur Hilfe gezogen, welches durch eine doppeltreziproke Auftragung der Verdünnungsrate und der Substratkonzentration eine Gerade ergibt. Wie bereits unter 6.5.7 beschrieben, kann anhand der Geradengleichung die Sättigungskonstante abgelesen werden.

Die Fermentationsdaten der Prozesse K2L, K4L und K1LM ermöglichten keine Auswertung nach Lineweaver-Burk, da die Geradengleichung keinen negativen Schnittpunkt mit der X-Achse aufwies, wodurch die Bestimmung einer Sättigungskonstante nicht möglich war. Nur im Prozess K2LM konnte ein negativer Schnittpunkt ermittelt werden. Allerdings weisen die Daten in Abbildung 28 keine zufriedenstellenden Werte auf. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt lediglich einen Wert von 0,1316. Dies zeigt bereits, dass die Regressionsgerade wenig an die gegebenen Daten angepasst ist und die Daten somit nur geringfügig diesem Modell entsprechen. Die daraus gewonnenen Daten entsprachen nicht den Erwartungen. Zum einen ergab sich für die Wachstumsrate ein Wert von  $1,4156 \text{ h}^{-1}$ , welcher deutlich über den Wachstumsraten mit Glukose und den ermittelten Wachstumsraten auf Hefeextrakt liegt. Der Wert ist somit als nicht realistisch einzuschätzen. Zum anderen wurde für die Sättigungskonstante ein Wert von  $4,763 \text{ gL}^{-1}$  bestimmt. Nach dem Monod-Modell gibt ein kleiner Wert eine bessere Affinität gegenüber dem Substrat wieder. Da hierbei mehrere Substanzen als Substrat gewertet werden, ist durchaus ein erhöhter Wert zu erwarten. Der Vergleich mit bekannten Sättigungskonstanten für Kohlenhydrate zeigt, dass die vorliegende Sättigungskonstante zum Teil deutlich höher ist. Für *E. coli* werden Sättigungskonstanten für Glukose von  $0,058$  bis  $0,8 \text{ mgL}^{-1}$ , für Maltose  $100 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ , für Ribose  $132 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ , für Galaktose  $0,67 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$  und für Fruktose  $125 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$  angegeben (Lendenmann et al., 1999).

Bhunia et. al. geben für einen *B. licheniformis* Stamm eine Sättigungskonstante für Stärke von  $11,1 \text{ gL}^{-1}$  an (Bhunia et al., 2012). Dies zeigt, dass sich Sättigungskonstanten für verschiedene Substrate deutlich unterscheiden können.



Daher kann die hier ermittelte Sättigungskonstante für die Kohlenhydrate und organischen Säuren des Hefeextraktes der Fa. Lallemand durchaus einen plausiblen Wert widerspiegeln.

Zur Darstellung nach Lineweaver-Burk ist anzumerken, dass diese auf Kehrwerten gemessener Daten basiert. Kleine experimentelle Fehler können zu großen Fehlern bei den grafisch ermittelten Werten der Sättigungskonstante führen, insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen (Gummadi, 2017). Im Buch *Biochemical Reaction Engineering*, S.462, wird von zwei weiteren Methoden zur Bestimmung der Sättigungskonstante berichtet. Diese Darstellungen basieren ebenfalls auf der Lineweaver-Burk-Transformation, enthalten aber nur einen reziproken Term, wodurch sie zumeist genauere Daten liefern (Gummadi, 2017).

#### 7.5.6 Das X-D-Diagramm

Das X-D-Diagramm soll nach Auftragung der experimentell bestimmten Daten Auskunft über die optimale Verdünnungsrate und die maximale Produktivität wiedergeben. Die Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen, dass in beiden Fällen zumindest ein ähnliches Verhalten wie in Abbildung 5 zu erkennen ist. Vor allem im X-D-Diagramm der Fermentationen K2L und K4L in Abbildung 29 ist deutlich der Anstieg und Abfall der Produktivitätsdaten zu erkennen. Abweichend vom Diagramm in Abbildung 5 sind die Daten der Zell- und Substratkonzentration. Zu erwarten wären Daten nahe Null in der Substratkonzentration, welche erst nahe der kritischen Verdünnungsrate deutlich ansteigen, während die Zellkonzentration nahezu gleichbleibend wäre, bis sie nahe der kritischen Verdünnungsrate schnell abnimmt. Dieses Verhalten ist für beide Hefeextrakte nicht zu erkennen. Des Weiteren wäre aufgrund der maximalen spezifischen Wachstumsraten auf Hefeextrakt von  $0,1828 \text{ h}^{-1}$  (Leiber) bzw.  $0,2588 \text{ h}^{-1}$  (Lallemand) eine kritische Verdünnungsrate unterhalb dieser Werte zu erwarten. Dies konnte nicht gezeigt werden.

## 7.6 Fehlerbetrachtung

Als erstes sollte angemerkt werden, dass für jeden Hefeextrakt alle getesteten Verdünnungsraten jeweils nur einmal durchgeführt wurden. Für einen Vergleich von Ergebnissen wäre es daher von Vorteil, jede Fermentation mindestens als Doppelbestimmung durchzuführen.

Des Weiteren ist es sinnvoll, in jedem Prozess die gleichen Zufütterpumpen und Schlauchinnendurchmesser zu verwenden, um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden. Dies war nicht immer möglich, wenn zwei Kultivierungen parallel liefen und verschiedene Pumpen genutzt werden mussten. Wie bereits unter 7.3 und 7.4.4 erwähnt, sollten die verwendeten Schläuche mit dem jeweiligen autoklavierten Hefeextrakt im Voraus getestet werden, um mögliche Schwierigkeiten, wie ein Verstopfen der Schläuche, zu vermeiden.

Außerdem stellte die Turbiditätssonde ein Problem dar. Durch die Anhaftung der Zellen an der Sonde erschwerte sich die Auswertung der Zellkonzentration deutlich. Eine externe Sonde am Glasgefäß des Bioreaktors für die Messung der Zellkonzentration lieferte aufgrund des Zellbewuchs an der Glaswand des Bioreaktors auch keine zuverlässigen Ergebnisse.

Außerdem ist es hilfreich, möglichst große Gefäße für das Zulaufreservoir zu nutzen, um möglichst wenig Sprungstörungen zu haben und damit Instabilität durch Medienwechsel in das System zu bringen. Größere Gefäße bringen aber auch Probleme mit sich, wie beispielsweise lange Autoklavierphasen und eine unpraktische Handhabung, sowie eine erschwerte Durchmischung des Mediums, gerade bei Medien mit erhöhten Mengen an Schwebstoffen.

Für eine genauere Analyse der Substratkonzentration wäre es sinnvoll, verschiedene Komponenten des Hefeextraktes zu analysieren, da diese in unterschiedlichem Maße verbraucht werden. So könnten beispielsweise nicht nur Kohlenhydrate und organische Säuren, sondern auch Aminosäuren oder Mineralstoffe analysiert werden, um möglicherweise gründlichere Ergebnisse zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde für ein Substrat, welches viele Substanzen enthält, die Auswertung nach Monod gewählt. Dabei bezieht das Monod-Modell, wie bereits in

7.5.5 erwähnt, nur ein limitierendes Substrat mit ein (Chmiel, 2011). Das Monod-Modell müsste somit für jede einzelne Substanz des Hefeextraktes erweitert werden. Allerdings ist dies nur schwer möglich, da sehr viele verschiedene Analysen zunächst durchgeführt werden müssten, um alle Inhaltsstoffe und deren Anteil zu kennen. Oftmals sind keine oder nur ungenaue Herstellerangaben der Hefeextrakte gegeben, was die Analyse ebenfalls erschwert.

## 8 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Thesis war es, kontinuierliche Fermentationen basierend auf Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle zu etablieren und zu analysieren. Dazu wurde zunächst erfolgreich die Anlagenperipherie einer Multifermentieranlage entsprechend verändert. Anschließend wurden verschiedene Hefeextrakte in Vorversuchen getestet, welche erste Aussagen für die weiteren Hauptversuche ermöglichten und Informationen für weitere Entscheidungen lieferten. In dieser Thesis wurden mehrere kontinuierliche Fermentationen durchgeführt, welche auf den Erfahrungen der jeweils vorangegangenen Fermentationen basierten. So konnten Verbesserungen durchgeführt werden, welche der Etablierung der kontinuierlichen Kultur halfen. So war es möglich, einen kontinuierlichen Prozess bis zu über 22 Tagen aufrecht zu erhalten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lieferten wichtige Informationen über die getesteten Hefeextrakte. So konnte gezeigt werden, dass ein Wachstum des *Bacillus licheniformis* DSM13 auf Hefeextrakt der Fa. Roth ohne weitere Kohlenstoffquellen nach drei Tagen Kultivierung nicht möglich war. Ebenso zeigte der Hefeextrakt der Fa. Angel bis zu 48 h kein Wachstum auf, was auf ein Fehlen der Aminosäure Tryptophan zurückzuführen sein könnte. Nur die Hefeextrakte der Fa. Leiber und Fa. Lallemant erzielten entsprechende Ergebnisse, so dass sie in kontinuierlichen Fermentationen eingesetzt werden konnten.

In den durchgeführten kontinuierlichen Prozessen wurden Biofilme mit zunehmender Kultivierungsdauer zu einem massiven Problem. Diese beeinflussten erheblich die Zellkonzentrationsbestimmung. In zukünftigen Prozessen sollte hier nach einer besseren Möglichkeit der kontinuierlichen Trübungsmessung gesucht werden. Außerdem scheint die Beschaffenheit des Bioreaktors eine Anhaftung der Zellen an der Glasinnenwand zu ermöglichen. Dies wirkte sich ebenfalls negativ auf den Prozess aus.

Um eine Verstoffwechslung von Titrationsmitteln zu verhindern, sollte in zukünftigen Prozessen das Titrationsmittel keine Möglichkeit als Nährstoffquelle bieten.

In zukünftigen Kultivierungen mit Substraten, welche mehrere Komponenten besitzen, sollten die Analysemethoden entsprechend gewählt werden, damit eine bessere und genauere Auswertung möglich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Etablierung kontinuierlicher Kultivierungen mit Hefeextrakt als einzige Kohlenstoffquelle erfolgreich, die Analyse aufgrund der Komplexität des Hefeextraktes allerdings erschwert war.

## 9 LITERATUR

**Andriani Y, Safitri R, Rochima E, & Fakhrudin SD**, 2017. "Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)", *Nusantara Bioscience*, vol. 9, no. 2, pp. 188–193.

**Angel Yeast Co. LTD**, 2015. "Yeast Extract for Microbial Nutrition". Available from: <https://en.angelyeast.com/upload/files/2015/6/16122639748.pdf>. [20 July 2021].

**Arnauteli S, Matoz-Fernandez DA, Porter M, Kalamara M, Abbott J, MacPhee CE, Davidson FA, & Stanley-Wall NR**, 2019. "Pulcherrimin formation controls growth arrest of the *Bacillus licheniformis* biofilm", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 27, pp. 13553 LP – 13562. Available from: <http://www.pnas.org/content/116/27/13553.abstract>.

**Ateş Ö, Oner ET, Arikan B, Denizci AA, & Kazan D**, 2007. "Isolation and identification of alkaline protease producer halotolerant *Bacillus licheniformis* strain BA17", *Annals of Microbiology*, vol. 57, no. 3, pp. 369–375.

**Berg JM, Tymoczko JL, & Stryer L**, 2013. "DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information", *Stryer Biochemie*, pp. 110–141. Springer Berlin Heidelberg. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6_4).

**Bhunja B, Basak B, Bhattacharya P, & Dey A**, 2012. "Kinetic studies of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NCIM-2042", *Journal of microbiology and biotechnology*, vol. 22, no. 12, pp. 1758–1766.

**de Boer AS, Priest F, & Diderichsen B**, 1994. "On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 40, no. 5, pp. 595–598.

**Bonnefond L, Arai T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ishitani R, & Nureki O**, 2011. "Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, pp. 3912–3917.

**Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard-Akkari L, Oulahal N, Degraeve P, & Bordes C**, 2019. "Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models", *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 829. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00829>.

**Cheung HY, Vitković L, & Brown MRW**, 1982. "Toxic Effect of Manganese on Growth and Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*", *Microbiology*, vol. 128, no. 10, pp. 2395–2402. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-128-10-2395>.

**Chmiel H**, 2011. "Bioprozesstechnik", Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2477-8>

- Clements LD, Miller BS, & Streips UN**, 2002. "Comparative Growth Analysis of the Facultative Anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*", *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 25, no. 2, pp. 284–286. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004701137>.
- Cornelissen G**, 2004. "Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologischer wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*", Dissertation, Universität Hannover, Fortschritt-Berichte VDI, Düsseldorf.
- Dehghani M, Kazemi Shariat Panahi H, & Guillemin GJ**, 2019. "Microorganisms, Tryptophan Metabolism, and Kynurenine Pathway: A Complex Interconnected Loop Influencing Human Health Status", *International journal of tryptophan research: IJTR*, vol. 12, pp. 1178646919852996–1178646919852996. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31258331>.
- Drejer EB, Hakvåg S, Irla M, & Brautaset T**, 2018. "Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic bacillaceae", *Microorganisms*, vol. 6, no. 2.
- Fricke J**, 2015. "Optimierung eines Herstellungsprozesses artifizieller Malaria-Vakzine mittels Design of Experiments", Dissertation, Universität Hannover, Fortschritt-Berichte VDI, Düsseldorf.
- Fuchs G, Eitingner T, & Schlegel HG**, 2007. "Allgemeine Mikrobiologie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Available from: <https://books.google.de/books?id=m9cKJgRxPbsC>. [8 August 2021].
- Garrity G, De Vos P, Jones D, Kreig N, Ludwig W, Rainey F, Schleifer K, & Whitman W**, 2010. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Available from: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_1).
- Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra RR, Siddiqui NN, & Qader SAU**, 2013. "Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes", *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 26, no. 4, pp. 691–697.
- Gregory ME & Thornhill NF**, 1997. "The effects of aeration and agitation on the measurement of yeast biomass using a laser turbidity probe", *Bioprocess Engineering*, vol. 16, no. 6, pp. 339–344. Available from: <https://doi.org/10.1007/s004490050332>.
- Gummadi Sathyanarayana N**, 2017. "Chapter 6 - Biochemical Reaction Engineering", *Coulson and Richardson's Chemical Engineering (Fourth Edition)*, pp.451–568. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081010969000066>.
- Haenle M**, 2007. "Mikrobiologische Untersuchungen zur antibakteriellen Potenz von Metallionen sowie einer neuartigen antiinfektiösen Titan (IV)-oxid Oberflächenbeschichtung für medizinische Implantate", Dissertation, Technische Universität, München. Available from: <https://mediatum.ub.tum.de/doc/631436/631436.pdf>.

**Hanlon GW & Hodges NA**, 1981. "Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources", *Journal of Bacteriology*, vol. 147, no. 2, pp. 427–431.

**Hantke K**, 2005. "Bacterial zinc uptake and regulators", *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, no. 2, pp. 196–202. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527405000123>.

**Hohle TH & O'Brian MR**, 2014. "Magnesium-dependent processes are targets of bacterial manganese toxicity", *Molecular microbiology*, vol. 93, no. 4, pp. 736–747. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24975873>.

**Hopp V**, 2018. "Phosphorsäure, Phosphate - ihre Bedeutung im Stoffwechselprozess [E. phosphoric acid and phosphates in metabolism]", *Chemische Kreisläufe in der Natur: Chemie - Biologie - Energetik*, pp.159–195. Springer Berlin Heidelberg. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-55860-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-55860-7_6).

**Huang M, Hull CM, & Genet Author manuscript C**, 2017. "Sporulation: How to survive on planet Earth (and beyond) HHS Public Access Author manuscript", *Curr Genet*, vol. 63, no. 5, pp. 831–838. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5647196/pdf/nihms869327.pdf>.

"Interdisziplinäres Praktikum - Kontinuierliche Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae*", 2008. Available from: <https://www.scribd.com/document/232608023/06-Skript-Kontinuierliche-Fermentation-WS2008-Nov>. [4 April 2021].

**Jacob FF, Methner FJ, Michel M, Zarnkow M, & Hutzler M**, 2019. "The complexity of yeast extracts and its consequences on the utility in brewing: A review", *BrewingScience*, vol. 72, no. 3–4, pp. 50–62.

**Jacob FF, Striegel L, Rychlik M, Hutzler M, & Methner F-J**, 2019. "Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture: influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance", *European Food Research and Technology*, vol. 245, no. 6, pp. 1169–1182. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03237-9>.

**Jayalakshmi R, Bavanilatha M, Narendrakumar G, & Samrot A V**, 2012. "Bioactivity of pulcherrimin isolated from *Bacillus subtilis* SU-10 grown in FeSO<sub>4</sub> rich medium", *International Journal of Future Biotechnology (2012)*, vol. 1, no. 2, pp. 1–4.

**KEGG Pathway Database**, 2020. "Tryptophan metabolism - *Bacillus licheniformis* ATCC 14580" Available from: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?bli00380](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bli00380). [2 September 2021].

**Lendenmann U, Snozzi M, & Egli T**, 1999. "Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture", *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 72–80.



- Lineweaver H & Burk D**, 1934. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 56, no. 3, pp. 658–666. Available from: <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- Metz H**, 1971. "Probleme der Optimierung von Fermentationsverfahren", *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 43, no. 1–2, pp. 60–65.
- Michaelis L & Menten ML**, 1913. "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem. Z.*, vol. 49, pp. 333–369. Available from: <http://nemo.lf1.cuni.cz/mlab/ftp/Papers/Historic/1920-and-before/Michaelis-Menten-DE-1913.pdf>.
- Michel L**, 2019. "Untersuchung des Einflusses der Medienzusammensetzung bei Kultivierungen von *B. licheniformis* in einer Multifermentieranlage unter Anwendung von Design of Experiments", University of Applied Sciences HAW Hamburg.
- Minihane BJ & Brown DE**, 1986. "Fed-batch culture technology", *Biotechnology Advances*, vol. 4, no. 2, pp. 207–218.
- Mohapatra PK, Pati BR, & Mondal KC**, 2009. "Effect of amino acids on tannase biosynthesis by *Bacillus licheniformis* KBR6", *Journal of microbiology, immunology, and infection*, vol. 42, no. 2, pp. 172–175.
- Monod J**, 1949. "THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES", *Annual Review of Microbiology*, vol. 3, no. 1, pp. 371–394. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Nelder JA & Mead R**, 1965. "A Simplex Method for Function Minimization", *The Computer Journal*, vol. 7, no. 4, pp. 308–313.
- Patel AK, Singhania RR, & Pandey A**, 2017. "Chapter 2 - Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes", in *Biotechnology of Microbial Enzymes*, pp.13–41. Academic Press. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128037256000029>.
- Rachinger M**, 2010. "Stammdesign in *B. licheniformis*", Georg-August-Universität Göttingen.
- Randrianjatovo-Gbalou I, Rouquette P, Lefebvre D, Girbal-Neuhauser E, & Marcato-Romain CE**, 2017. "In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 122, no. 5, pp. 1262–1274.
- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jørgensen PL, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD, & Berka RM**, 2004. "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species", *Genome biology*, vol. 5, no. 10, p. R77.
- Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, & Dougherty DM**, 2009. "L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications", *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 2, no. 1, pp. 45–60.

**Schallmeyer M, Singh A, & Ward OP**, 2004. "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production", *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 50, no. 1, pp. 1–17.

**Schmidt SK**, 2010. "Antimikrobielle und immunregulatorische Eigenschaften der Tryptophan 2 , 3-Dioxygenase und die Analyse der funktionellen Effekte des Tryptophan- Analogons 1-Methyl-Tryptophan", Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=16975>. [18 September 2021].

**Schwarzer M**, 2010. "Physiologische Untersuchungen zur Regulation des Aminosäure-Stoffwechsels von *Bacillus licheniformis* DSM13", Georg-August-Universität Göttingen. Available from: <https://d-nb.info/1042725179/34>. [18 September 2021].

**Seiler H**, 2010. "Foto-Bibliothek für lebensmittelassoziierte aerobe Sporenbildner". Available from: [http://www.micbio.wzw.tum.de/cms/docs/Stammsammlung/Foto Bibliothek Bacillus.pdf](http://www.micbio.wzw.tum.de/cms/docs/Stammsammlung/Foto%20Bibliothek%20Bacillus.pdf). [10 August 2021].

**Smith NR, Gibson T, Gordon RE, & Sneath PHA**, 1964. "Type Cultures and Proposed Neotype Cultures of Some Species in the Genus *Bacillus*", *Microbiology*, vol. 34, no. 2, pp. 269–272. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-34-2-269>.

**Steinke L, Wessely B, & Ripperger S**, 2009. "Optische Extinktionsmessverfahren zur Inline-Kontrolle disperser Stoffsysteme", *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 81, pp. 735–747.

**Tachibana S, Watanabe K, & Konishi M**, 2019. "Estimating effects of yeast extract compositions on *Escherichia coli* growth by a metabolomics approach", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 128, no. 4, pp. 468–474.

**Tangüler H & Erten H**, 2009. "The effect of different temperatures on autolysis of baker's yeast for the production of yeast extract", *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 33, no. 2, pp. 149–154.

**Turnbull PCB**, 1996. "Bacillus", *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>.

**U.S. Department for Agriculture**, 2020. "Yeast extract spread". Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1103595/nutrients>. [30 August 2021].

**Undersun Biomedtech Co.Ltd**, 2019. "Yeast extract global production capacity". Available from: <https://www.underherb.com/info/yeast-extract-global-production-capacity-35203022.html>. [25 August 2021].

**Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A, & Gottschalk G**, 2004. "The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, vol. 7, no. 4, pp. 204–211.

**Voigt B, Albrecht D, Sievers S, Becher D, Bongaerts J, Evers S, Schweder T, Maurer KH, & Hecker M**, 2015. "High-resolution proteome maps of *Bacillus licheniformis* cells growing in minimal medium", *Proteomics*, vol. 15, no. 15, pp. 2629–2633.

**Wang D, Zhan Y, Cai D, Li X, Wang Q, & Chen S**, 2018. "Regulation of the Synthesis and Secretion of the Iron Chelator Cyclodipeptide Pulcherriminic Acid in *Bacillus licheniformis*", *Applied and environmental microbiology*, vol. 84, no. 13.

**Wiegand S, Voigt B, Albrecht D, Bongaerts J, Evers S, Hecker M, Daniel R, & Liesegang H**, 2013. "Fermentation stage-dependent adaptations of *Bacillus licheniformis* during enzyme production", *Microbial Cell Factories*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18.

**Xie Y, Chen J, Xiao A, & Liu L**, 2017. "Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition", *Molecules*, vol. 22, no. 11.

**Yan Z, Zheng XW, Chen JY, Han JS, & Han BZ**, 2013. "Effect of different *Bacillus* strains on the profile of organic acids in a liquid culture of Daqu", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 119, no. 1–2, pp. 78–83.

**Zarei O, Dastmalchi S, & Hamzeh-Mivehroud M**, 2016. "A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 4, pp. 907–913.

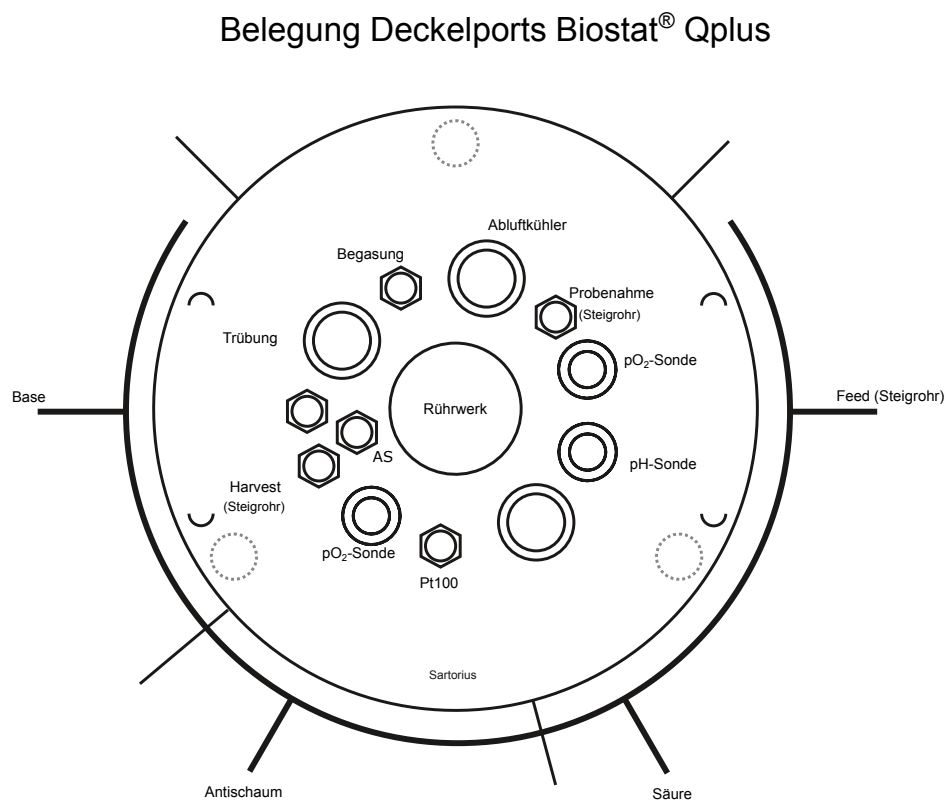
**Zhou C, Zhou H, Zhang H, & Lu F**, 2019. "Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*", *Microbial Cell Factories*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1174-1>.

**Ziv N, Brandt NJ, & Gresham D**, 2013. "The use of chemostats in microbial systems biology", *Journal of Visualized Experiments*, , no. 80, pp. 1–10.

## ANHANG

### A.1 Anhang zu 3 Das Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus

Die folgende Abb. A. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Deckelbelegung eines BIOSTAT® Qplus Bioreaktors.



**Abb. A. 1:** Schematische Darstellung der veränderten Deckelbelegung der Qplus Reaktoren.  
Quelle: Labor für Bioprozessautomatisierung.

## A.2 Anhang zu 4.4 Hefeextrakte

Die folgenden Seiten zeigen die Datenblätter und Analysezertifikate der Hefeextrakte der Fa. Angel, Fa. Leiber, Fa. Lallemand und Fa. Roth.

□



Technical data sheet

### Product name

Angel Yeast Extract FM803

### Definition

Yeast extract FM803 is a kind of powder product which is obtained by autolysis of primary grown *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, food grade.

### Description

Light beige to yellow, powder form, soluble in water.

Rich in Free amino acids, balanced Peptides, Vitamins, Nucleotides, Trace elements.

### Application

As a kind of nitrogen source in culture media, can be widely used in below applications:

Lactobacillus and amino acid-deficient strains

Primary metabolites

Laboratory culture media and microbiology test.

Industry fermentation such as Probiotics, Organic acids, Enzymes, APIs, etc.

Food industry application.

### Certification

Kosher, Halal, ISO9001, ISO14001, ISO22000, Sedex, BRC, CNAS

### Physical-chemical characteristics

Item	Data
Solubility (%)	0-2%, Totally soluble in water
pH (2%)	5.3-7.2
Moisture (%)	≤6.0%
Total nitrogen (Dry matter, %)	≥10.0%
Amino nitrogen (Dry matter, %)	≥5.0%
Ash (%)	≤15.0%
NaCl (%)	≤2.0%

### Angel Yeast Co., Ltd.

Address: 168 Chengdong Avenue, Yichang, Hubei 443003, China 443003  
Tel: 86-717-6369227 Fax: 86-717-6368757



Technical data sheet

**Microbiological characteristics**

Item	Data
Aerobic Count (cfu/g)	≤10000
Coliforms (MPN/g)	≤0.3
Salmonella	Negative/25g
Staphylococcus aureus	Negative/25g
Shigella	Negative/25g

**Heavy metals**

Item	Data
Lead (mg/kg)	≤1.0mg/kg
Arsenic (mg/kg)	≤0.5mg/kg
Mercury (mg/kg)	≤0.5 mg/kg

**Amino acid composition (For reference only)**

Amino acids	Free amino acids (%)	Total amino acids (%)
Aspartic acid	1.5	6.5
Threonine	2.0	3.0
Serine	1.8	3.0
Glutamic acid	6.0	12.0
Glycine	3.9	6.0
Alanine	3.7	6.5
Cystine	0.6	1.5
Valine	2.5	3.5
Methionine	0.5	0.7
Isoleusine	2.0	3.0
Leucine	3.8	4.5
Tyrosine	1.7	2.0
Phenylalanine	2.5	2.8
Lysine	2.0	4.8
Histidine	0.5	1.5
Arginine	1.9	3.6
Proline	1.5	2.4
Total	38.4	67.3

**Angel Yeast Co., Ltd.**

Address: 168 Chengdong Avenue, Yichang, Hubei 443003, China 443003  
 Tel: 86-717-6369227 Fax: 86-717-6368757

**Packaging and Storage**

Packaging: 20KG/BAG Sealed kraft paper bag with PE liner

Store condition: Stored in cool and dry place Shelf life: 24 months

## Leiber-Fermentation H 100434



Former art.no.: 44200P-118

### PRODUCT DATA SHEET

#### Product Description

Yeast peptone (synonym: yeast extract), derived from enzymatically hydrolysed brewers' yeast; to be used as a nutrient for biochemical fermentation processes

#### Appearance

Light brown powder

#### Application

Propagation of yeasts, lactobacilli, bifidus bacteria and other microorganisms

#### Recommended Dosage

1 - 10 g/l

#### Ingredients

Saccharomyces cerevisiae, ext.

#### Chemical Data

Dry matter	≥ 94	%
pH (5% solution)	5.0 - 6.0	
Protein	70 - 80	% on d.m.
NaCl	≤ 1	% on d.m.
Bitterness	≤ 5	BU/100g
Solubility 1g/250 ml hot water	clear	
Structure / Consistency	agglomerated	powder
Odour	typical	
Taste	typical	

#### Microbiological Data

Total plate count	≤ 10 000	CFU/g
Yeasts	≤ 100	CFU/g
Moulds	≤ 100	CFU/g
Enterobacteriaceae	≤ 10	CFU/g
Bacillus cereus	≤ 500	CFU/g
E. coli	≤ 3	CFU/g
Clostridium perfringens	≤ 10	CFU/g
Salmonellae	negative	in 25g

#### Minerals\*

Calcium	540	mg/kg
Magnesium	2.1	g/kg
Phosphor	16	g/kg
Potassium	31	g/kg
Iron	34	mg/kg
Sodium	6.5	g/kg
Zinc	16	mg/kg
Copper	5.8	mg/kg
Chromium	0.4	mg/kg
Cadmium	0.04	mg/kg
Lead	0.28	mg/kg
Iodine	≤ 10	mg/kg
Arsenic	0.1	mg/kg
Manganese	3.2	mg/kg
Silicium	310	mg/kg
Cobalt	≤ 0.1	mg/kg

#### Vitamins\*

B 1	10.7	mg/100g
B 2	0.7	mg/100g
B 3	52	mg/100g
B 6	3.8	mg/100g
Pantothenic acid	< 0.08	mg/100g
Folic acid	1092	µg/100g
Biotin	72	µg/100g

#### Amino Acids\*

	Total AA	Free AA	
Aspartic acid	7.6	2.9	g/100 g
Glutamic acid	7.4	3.3	g/100 g
Serine	2.9	2.6	g/100 g
Histidine	1.5	1.4	g/100 g
Glycine	3.1	1.8	g/100 g
Threonine	3.0	2.1	g/100 g
Arginine	1.1	0.4	g/100 g
Alanine	4.6	4.0	g/100 g
Tyrosine	1.8	0.7	g/100 g
Valine	4.0	3.0	g/100 g
Phenylalanine	2.8	2.3	g/100 g
Isoleucine	3.3	2.6	g/100 g
Leucine	4.6	4.0	g/100 g
Lysine	6.3	4.1	g/100 g
Proline	1.9		g/100 g
Methionine	1.1	1.0	g/100 g
Cysteine	0.6		g/100 g
Tryptophane	0.7	0.7	g/100 g
TOTAL	58.2	43.2	g/100 g

#### Composition

Protein (N x 6.25)	71.6	g/100g
Salt	1.65	g/100g
Total carbohydrates	13.1	g/100g
Sugars	0.1	g/100g
Total fats	0.5	g/100g
Saturated fats	0.1	g/100g
Dietary fibres	1.2	g/100g

#### Packaging Standards

Paper bag with PE inner bag, net weight 20kg

#### Storage

Closed, dry, cool, light protected

#### Shelf Life

24 months

#### Certifications

This product is Kosher and Halal certified.  
This product is gluten-free (≤20 ppm) according to EU-regulation 828/2014. Results are based on FDA approved ELISA-test of R-Biopharm (RIDASCREEN Gliadin "Sandwich" Art.Nr.: R7001).

#### Additional Information

REACH-Registration-No.: 01-2119539417-34-0003

\* These values are indicative and for informational purpose only

**TECHNICAL DATA**  
**FNI 103**  
**Fermentation**

Lallemand Bio-Ingredients FNI 103 is a water-soluble primary grown yeast extract of the genus *Saccharomyces cerevisiae*. FNI 103 is rich in manganese, iron and zinc; it contains a high level of protein in the form of readily and easily assimilated amino acids and peptides. It also contains soluble nucleic acids, vitamins and other factors to stimulate growth and metabolites production. FNI 103 is a spray-dried powder.

#### APPLICATIONS

FNI 103 is suggested for the production of *Bacillus* spores formers which require significant levels of minerals to stimulate growth and sporulation. It could be used in the production of enzymes (*B.cereus*, *B.substilis*), biopesticides (*Bh*), crop- protection (*B.firmus*..).

#### SPECIFICATIONS

The following are reported for each lot on the certificate of analysis:

Moisture	≤ 6 %
pH (2% solution)	5.5 – 7.0
Protein (N x 6.25) on DM	≥ 62 %
Salt (NaCl) on DM	< 1 %
Total plate count	< 10 000 CFU/g
Yeast	< 50 CFU/g
Molds	< 50 CFU/g
Coliforms	< 10 CFU/g
<i>E. coli</i>	Not detected/g
<i>S. aureus</i> (Coag +)	Not detected/g
<i>Salmonella</i>	Not detected/25 g

The following are guaranteed for each lot but not reported on the certificate of analysis:

Nitrogen on DM	≥ 9.92 %
Alpha amino nitrogen on DM	4 – 5 %
AN/TN on DM	40 – 50 %
Arsenic	< 2 ppm
Lead	< 2 ppm
Mercury	< 0.1 ppm
Cadmium	< 1 ppm

#### INGREDIENT

Yeast peptone, for use in culture media.

#### PACKAGING

20-kg kraft paper bag with polyliner;  
 also available in big bags.

The information contained herein, to the best of our knowledge, is true and accurate. Any recommendations or suggestions are made without warranty or guarantee, since the conditions of use are beyond our control. Nothing contained herein shall be construed to imply the nonexistence of any relevant patents, nor to constitute a permission, inducement, or recommendation to practice any invention without authority from the owner of the patent.

Page 1 of 2 Version: 108 Modified: 2019/09/30/ MT

This document is valid for 3 years unless superseded or otherwise indicated.

LALLEMAND BIO-INGREDIENTS DIVISION

1620 Préfontaine | Montréal QC H1W 2N8 | Canada | +1 514 251 3611 | Fax +1 514 221 3063 | LBID@lallemand.com | www.lallemand.com







**TECHNICAL DATA**  
**FNI 103**  
**Fermentation**

**NUTRITIONAL PROFILE**

The following are typical values per 100 g of product (as is) for indication purposes (not guaranteed):

Amino Acid	Total AA	Free AA
Aspartic acid	6.8 g	2.5 g
Glutamic acid	10.3 g	4.7 g
Alanine	4.7 g	2.7 g
Arginine	3.1 g	1.6 g
Phenylalanine	2.7 g	2.1 g
Glycine	2.7 g	1.0 g
Isoleucine	3.1 g	1.9 g
Histidine	2.7 g	1.7 g
Leucine	4.3 g	3.3 g
Lysine	4.7 g	1.9 g
Proline	2.3 g	0.8 g
Serine	3.3 g	1.9 g
Tyrosine	1.5 g	1.5 g
Threonine	2.9 g	1.5 g
Valine	3.4 g	2.3 g
Cystine	0.7 g	0.3 g
Methionine	0.9 g	0.8 g
Tryptophan	0.6 g	0.5 g

**Vitamin**

Thiamine HCL	6.9 mg
Riboflavin	6.1 mg
Niacin	35 mg
Pyridoxine acid HCL	2.6 mg
Folic acid	-
Pantothenic acid	11 mg
Biotin	0.07 mg

**Mineral**

Iron (Fe)	Min 80 mg
Magnesium (Mg)	132 mg
Manganese (Mn)	Min 140 mg
Phosphorus (P)	1 280 mg
Potassium (K)	3 600 mg
Sodium (Na)	678 mg
Zinc (Zn)	Min 90 mg
Calcium (Ca)	152 mg

The information contained herein, to the best of our knowledge, is true and accurate. Any recommendations or suggestions are made without warranty or guarantee, since the conditions of use are beyond our control. Nothing contained herein shall be construed to imply the nonexistence of any relevant patents, nor to constitute a permission, inducement, or recommendation to practice any invention without authority from the owner of the patent.

Page 2 of 2 Version: 108 Modified: 2019/09/30/ MT

This document is valid for 3 years unless superseded or otherwise indicated.

LALLEMAND BIO-INGREDIENTS DIVISION

1620 Préfontaine | Montréal QC H1W 2N8 | Canada | +1 514 251 3611 | Fax +1 514 221 3063 | LBID@lallemand.com | www.lallemand.com



□



## Analysenzertifikat

Artikelnummer:	2363	
<b>Hefeextrakt</b>		
<b>pulv., für die Bakteriologie</b>		
Charge:	446250133	
CAS-Nummer:	Druckdatum:	08.11.2016
Formel:	Empfohlenes Retest Datum:	26.09.2018
Dichte:	Freigabedatum:	26.09.2016
Molekulargewicht:	Lagertemperatur:	+20 °C
	<b>Garantieanalyse</b>	<b>Chargenwerte</b>
<b>Gesamtstickstoff</b>	≥8 %	10,7 %
<b>Aminostickstoff</b>	4,8-6,3 %	5,3 %
<b>Verhältnis AN/TN</b>	41-60	50
<b>Trocknungsverlust</b>	≤6 %	3,5 %
<b>Asche</b>	≤18 %	16,8 %
<b>pH-Wert</b>	6,4-7,4	7,1
<b>Löslichkeit (5 %, Wasser)</b>	klar	entspricht

Unsere Produkte sind für Laborzwecke geprüft.  
Die Angaben beziehen sich auf den aktuellen Stand der Produktqualität.  
Wir behalten uns vor, notwendige Änderungen durchzuführen.

**S. Lindenfelser**  
Quality Control

**N. Nyake**  
Quality Assurance

*Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig*

**Carl Roth GmbH + Co. KG**  
Schoemperlenstraße 3-5  
76185 Karlsruhe

Telefon 0721/5606-0  
Telefax 0721/5606-149  
E-Mail: info@carlroth.de

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Firma Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Vorsitzender des Aufsichtsrats Eberhard Gaul Geschäftsführer Dr. Alfred Wagner und Lothar Haidmann



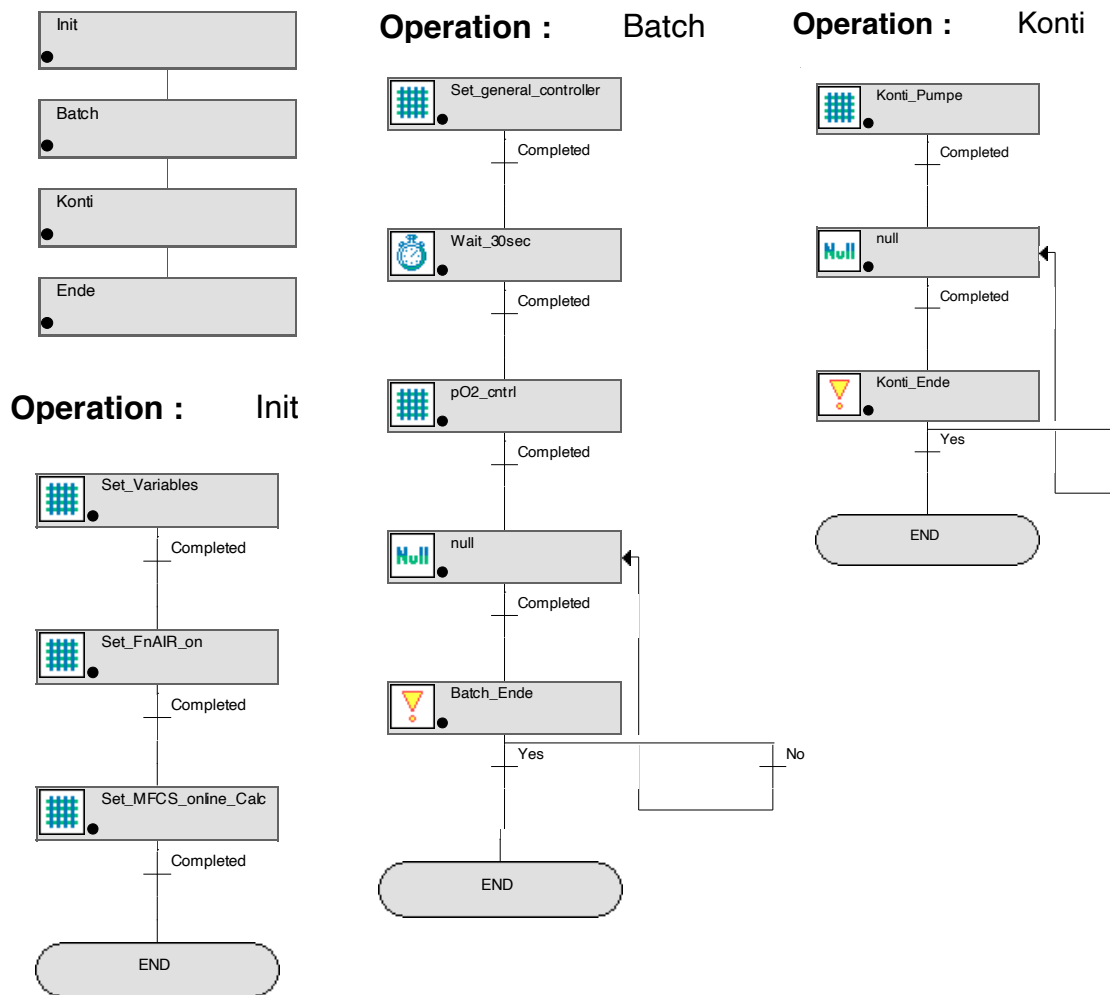
### A.3 Anhang zu 5.4 Fermentation an der Multifermentieranlage

Nachstehend ist das Fermentationsrezept für die kontinuierlichen Kultivierungen zu sehen.

□

<b>MFCs/win</b>	<b>Recipe List</b>	<b>P inted:</b>	10-Aug-2021
<b>Recipe:</b> Qplus_Konti_LA	HAW Hamburg BIOSTAT B+ / Q+6 85.003	Rev.	11:49:55 Mittleuropäische Zeit
<b>Version:</b> 1.002			
<b>Status:</b> APPROVED			

#### Recipe: Qplus\_Konti\_LA



□

<b>Parameter Phase</b>		
<b>Phase: All_Valves_closed</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
V100	Value	0
V101	Value	0
V102	Value	0
V103	Value	0
V104	Value	0
V200	Value	0
V201	Value	0
V202	Value	0
V203	Value	0
V204	Value	0
V205	Value	0
V206	Value	0
V207	Value	0
V208	Value	0
V209	Value	0
V210	Value	0
V400	Value	0
V401	Value	0
V402	Value	0
V403	Value	0
V404	Value	0
V 05	Value	0
V406	Value	0

pO2	Setpoint	30
-----	----------	----

<b>Phase: Set_FnAIR_on</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
FnAIR	Ctrl_status	Remote
FnAIR	Ctrl_mode	Auto
FnAIR	Setpoint	1.5

<b>Phase: Set_general_controller</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
TL	Ctrl_status	Remote
TL	Ctrl_mode	Auto
TL	Setpoint	30
NSt	Ctrl_status	Remote
NSt	Ctrl_mode	Auto
NSt	Setpoint	300
FnAIR	Ctrl_status	Remote
FnAIR	Ctrl_mode	Auto
FnAIR	Setpoint	1.5
pH	Ctrl_status	Remote
pH	Ctrl_mode	Auto
pH	Setpoint	7
FOAM	Ctrl_status	Remote
FOAM	Ctrl_mode	Auto

V407	Value	0
------	-------	---

<b>Phase: End_Control</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
pO2	Ctrl_mode	Off
pH	Ctrl_mode	Off
TL	Ctrl_mode	Off
FnA R	Ctrl_mode	Off
FOAM	Ctrl_mode	Off
calc_FR1real	Calculation	Off
FR1rel	Setpoint	0
FR1rel	Ctrl_mode	Off

<b>Phase: End_NSt</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
NSt	Ctrl_mode	Off

<b>Phase: Konti_Pumpe</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
F_conti	Ctrl_status	Remote
F_conti	Ctrl_mode	Auto

<b>Phase: pO2_cn I</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
pO2	Ctrl_status	Remote
pO2	Ctrl_mode	Auto

<b>Phase: Set_MFCS_online_Calc</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
calc_cXLturb	Calculation	On
calc_RQ	Calculation	On
calc_QO2	Calculation	On
calc_QCO2	Calculation	On
calc_OUR	Calculation	On
calc_OTR	Calculation	On
calc_kLa	Calculation	On
calc_HO2	Calculation	On
calc_CER	Calculation	On
calc_HCO2	Calculation	On

<b>Phase: Set_Variables</b>		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
K1	Value	0.0342
K2	Value	2.4594
FR1rel	Ctrl_mode	Auto
FR1rel	Setpoint	0
Process_phase	Value	100
cS1R1	Value	250
qXXw	Value	0.1

□

**Phase:** Batch\_Ende

**Prompt**  
Ist der Batch am Ende?

**Phase:** Konti\_Ende

**Prompt**  
Ist der Konti-Prozess am Ende?

**Wait Phase**

**Phase:** Wait\_30sec

**Wait Until**  
Duration: 00 hour(s) 00 minute(s) 30 second(s)

**Transition**

**Phase:** Set\_general\_controller

Algorithm Name	Title	Transition formula
Qplus_Konti_LA000	pp = 1	Set_general_controller.Transition1_value = process_phase.Value = 1

## A.4 Anhang zu 6.4 Fermentationsverläufe

### A.4.1 Fermentationsverlauf zum Prozess K2L

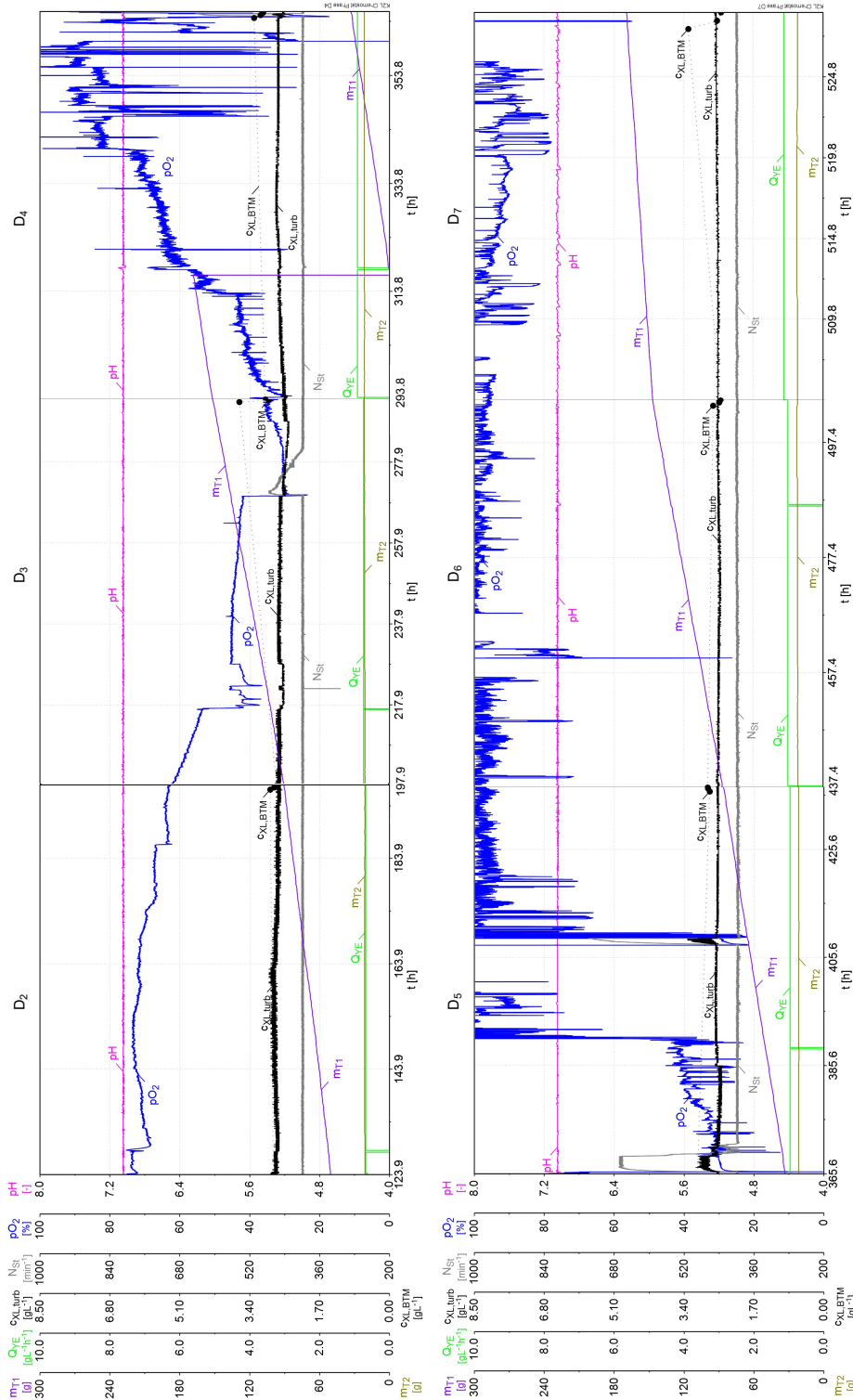
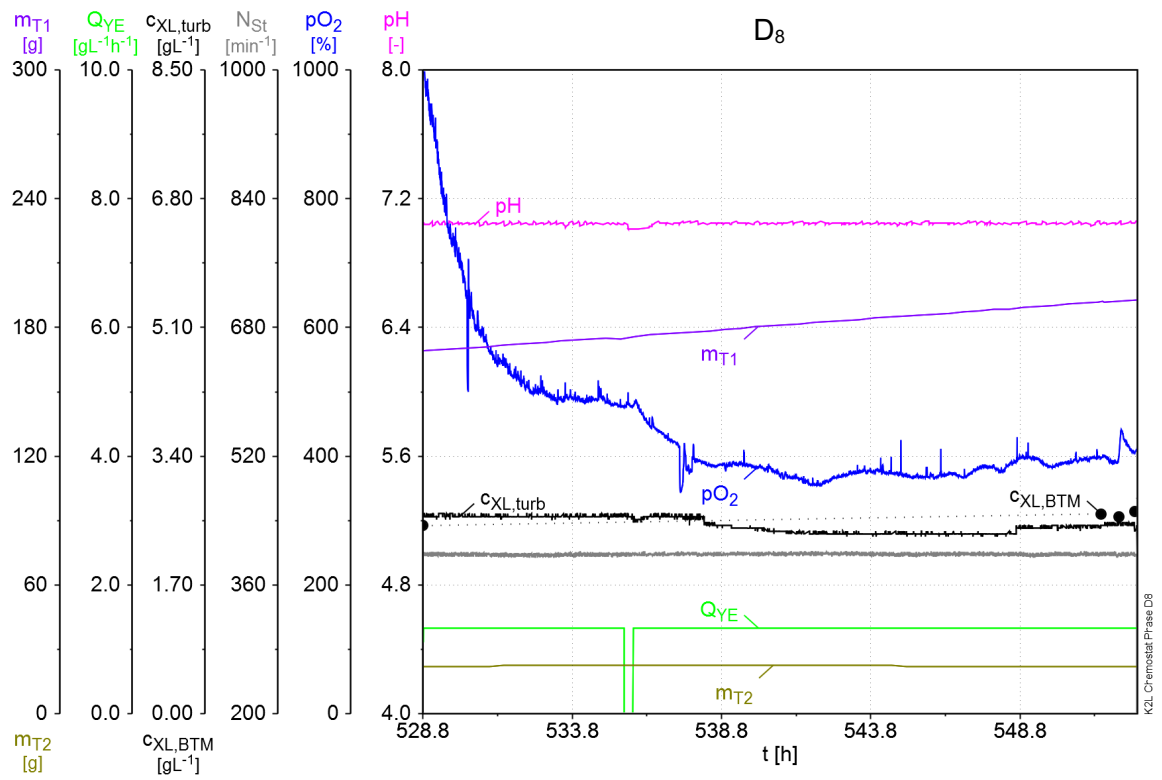
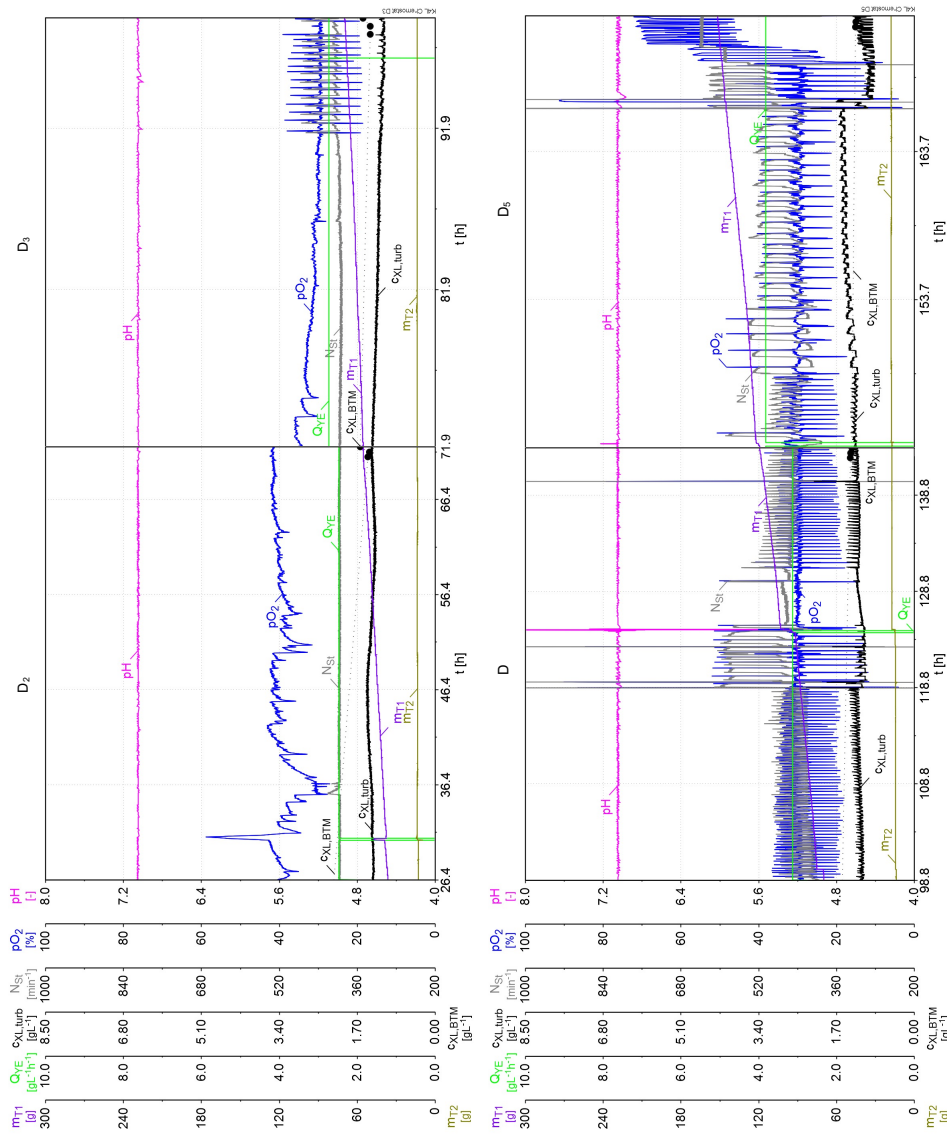


Abb. A. 2: Fermentation K2L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D2 bis D7.



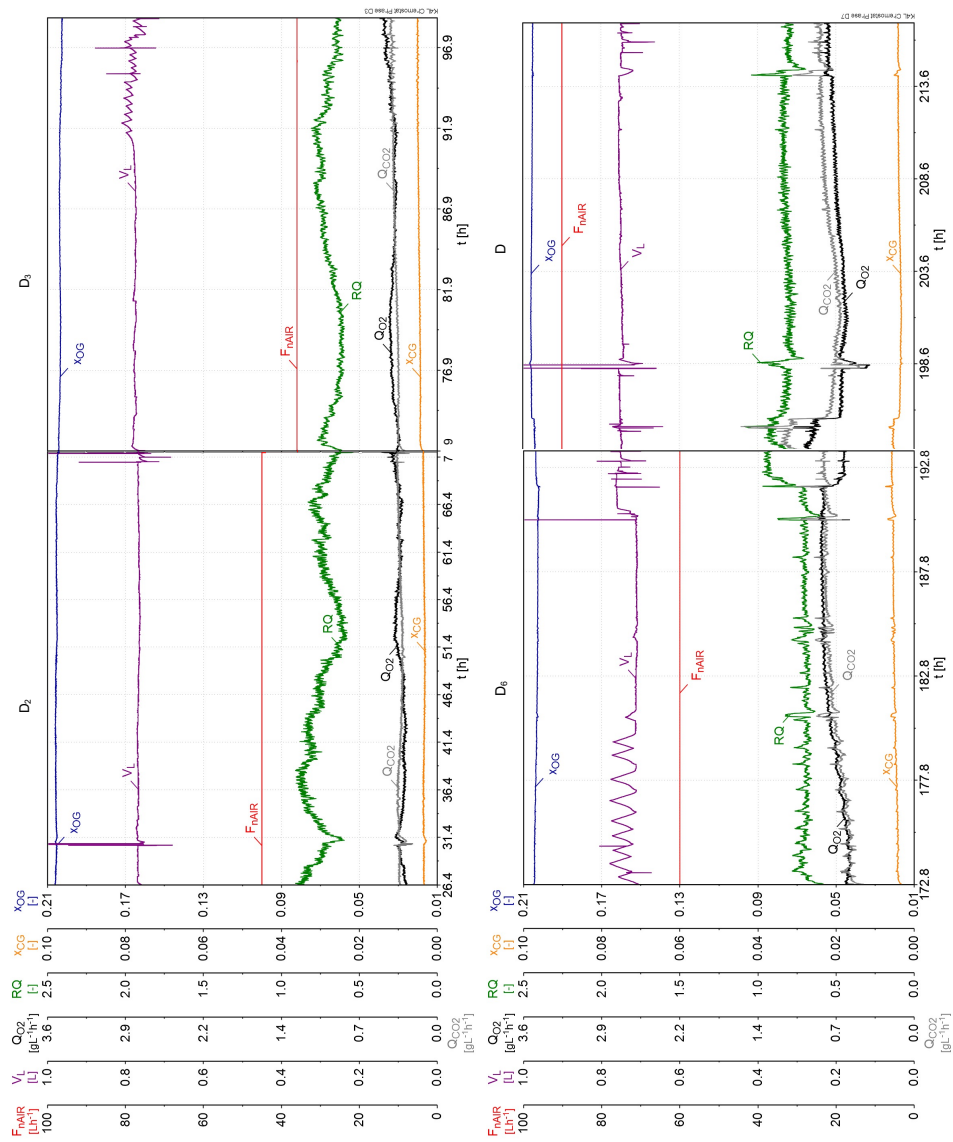
**Abb. A. 3: Fermentation K2L – Verlauf der Chemostat-Phase D8.** Erweiterte  $pO_2$ -Achse auf 1000 %. Zeitachsenabschnitt: 5 h.

A.4.2 Fermentationsverlauf zum Prozess K4L



**Abb. A. 4: Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-Phase D2 bis D5. Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase D<sub>2</sub> bis D<sub>5</sub>: 10 h.**





**Abb. A. 5: Abgasanalyse der Fermentation K4L – Verlauf der Chemostat-Phase D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> (oben) und der Chemostat-Phase D<sub>6</sub> und D<sub>7</sub> (unten). Zeitachsenabschnitte**

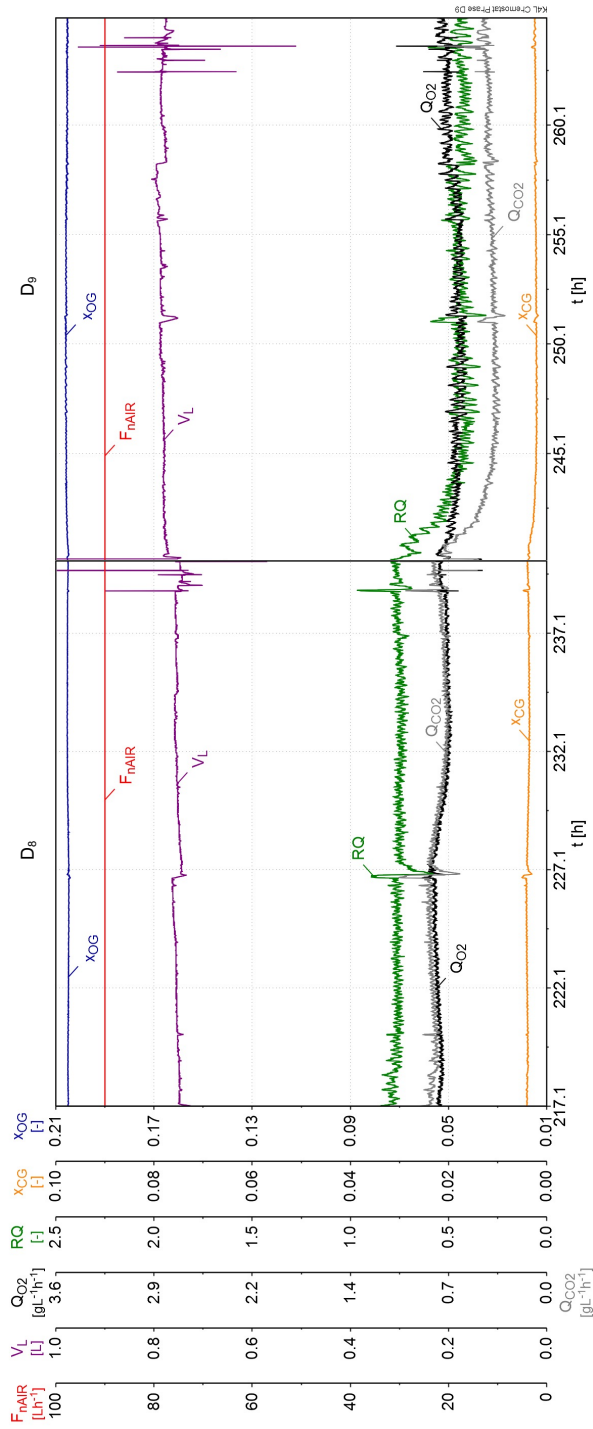
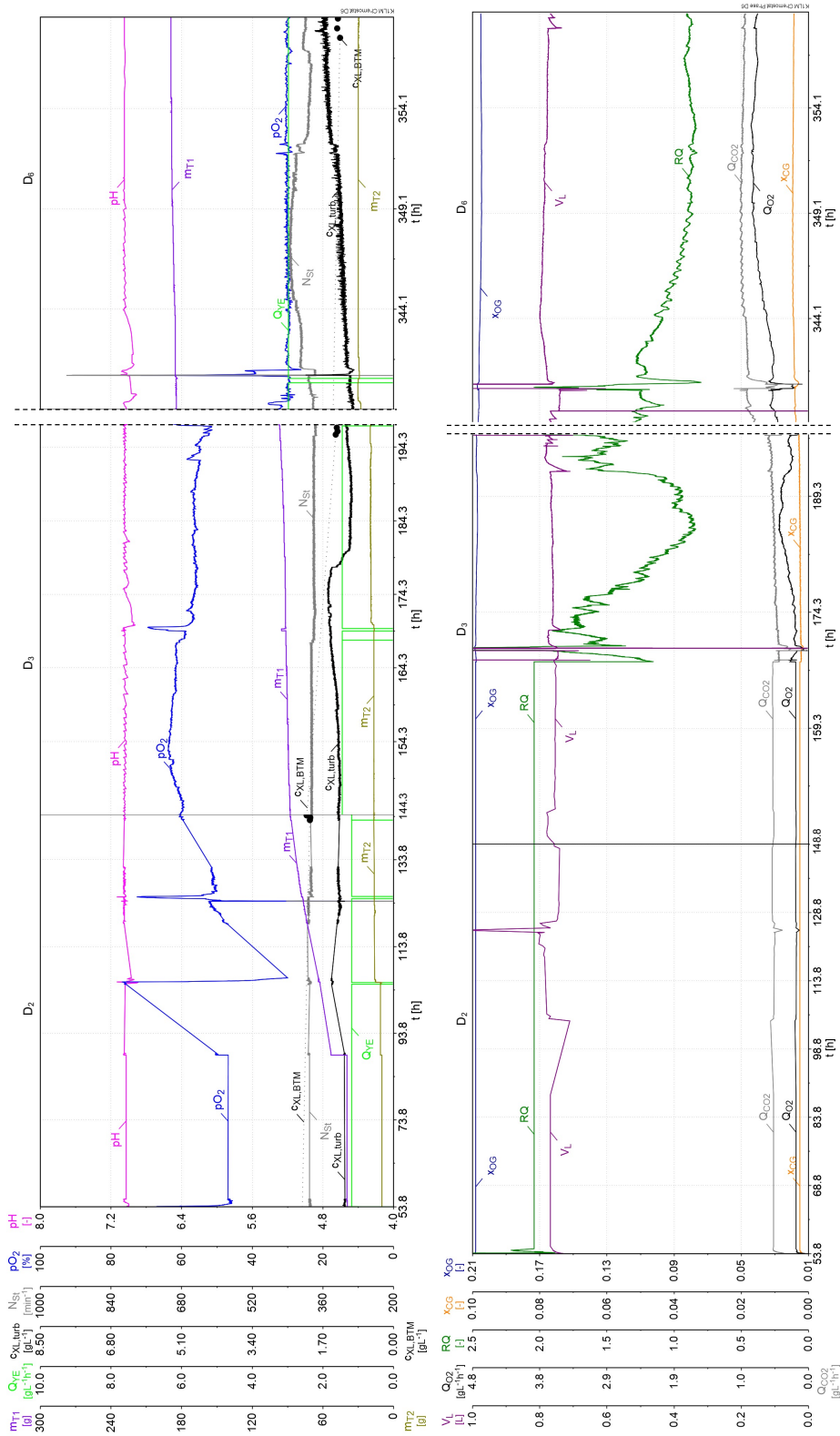


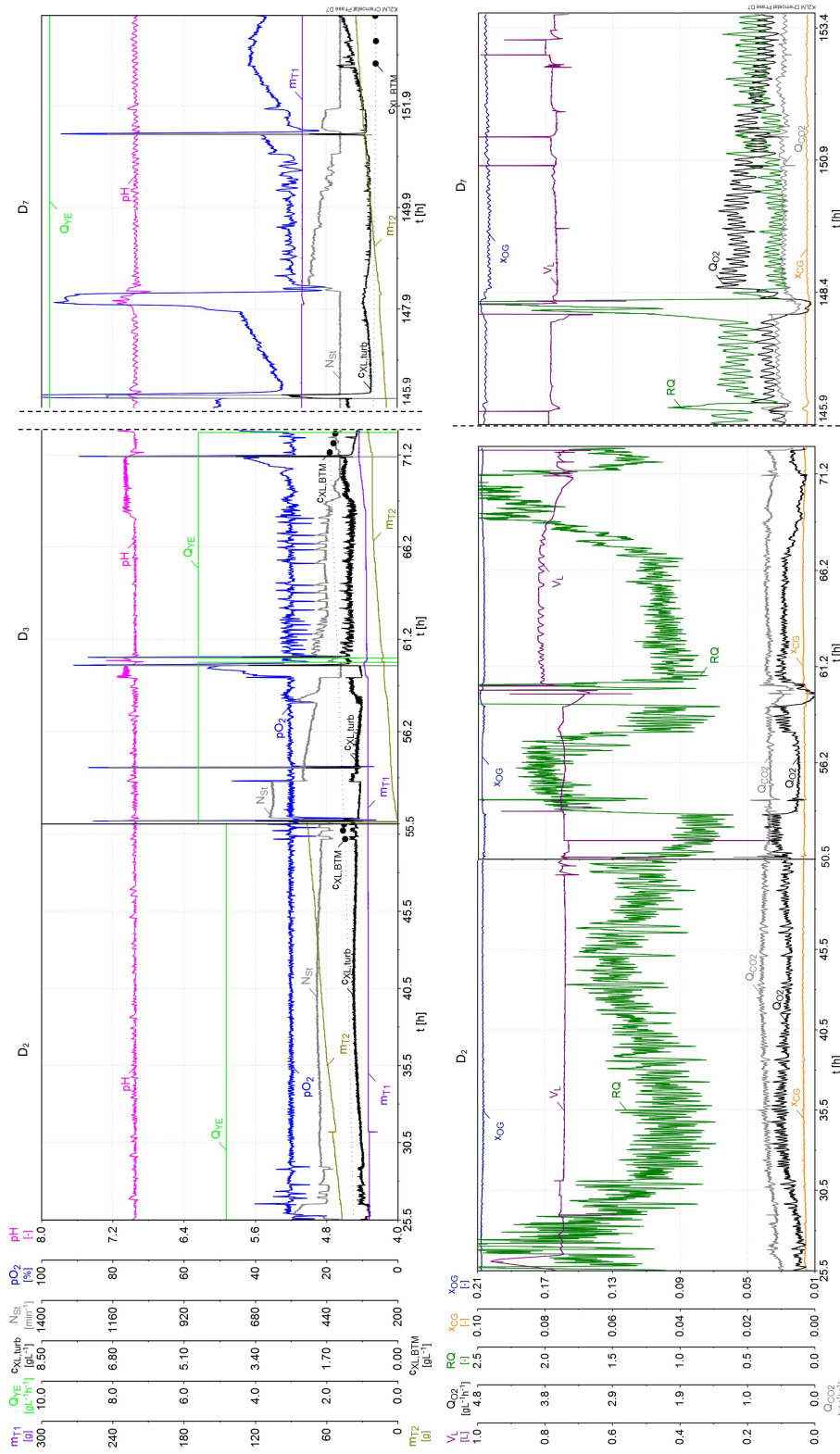
Abb. A. 6: Abgasanalyse der Fermentation K4L mit Hefeextrakt der Fa. Leiber – Verlauf der Chemostat-

A.4.3 Fermentationsverlauf zum Prozess K1LM



**Abb. A. 7:** Fermentation K1LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Chemostat-Phasen  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_6$  (oben) und Verlauf der Abgasanalyse in den Chemostat-Phasen  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_6$  (unten). Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase  $D_2$ : 20 h, in  $D_3$ : 10 h und  $D_6$ : 5 h.

A.4.4 Fermentationsverlauf zum Prozess K2LM



**Abb. A. 8:** Fermentation K2LM mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand – Verlauf der Chemostat-Phasen D2, D3 und D7 (oben) und Verlauf der Abgasanalyse in den Chemostat-Phasen D2, D3 und D7 (unten). Zeitachsenabschnitte in der Chemostat-Phase D2 und D3: 5 h, in D7: 2 h.

## A.5 Anhang zu 6.5 Auswertung der kontinuierlichen Prozesse

A.5.1 Anhang zu 6.5.1 Istwerte der Flussrate, des Reaktionsvolumens und der Verdünnungsrate

Tab. A. 1: Hydraulische Verweilzeit und Anzahl der Durchläufe der jeweiligen Verdünnungsraten.

Fermentation	Verdünnungsrate $D_x$	Hydraulische Verweilzeit $\tau$ [h]	Anzahl der Durchläufe
K2L	D <sub>1</sub>	15,87	7,57
	D <sub>2</sub>	14,71	5,03
	D <sub>3</sub>	13,51	7,10
	D <sub>4</sub>	10,87	6,61
	D <sub>5</sub>	10,31	6,96
	D <sub>6</sub>	9,901	6,81
	D <sub>7</sub>	8,929	2,69
	D <sub>8</sub>	7,519	3,18
K4L	D <sub>1</sub>	5,000	4,41
	D <sub>2</sub>	4,049	11,2
	D <sub>3</sub>	3,663	7,33
	D <sub>4</sub>	3,195	14,1
	D <sub>5</sub>	2,618	11,1
	D <sub>6</sub>	2,193	9,48
	D <sub>7</sub>	1,980	11,8
	D <sub>8</sub>	1,776	13,0
	D <sub>9</sub>	1,163	21,4
K1LM	D <sub>1</sub>	9,901	4,87
	D <sub>2</sub>	8,403	10,8
	D <sub>3</sub>	6,849	7,77
	D <sub>4</sub>	5,780	19,4
	D <sub>5</sub>	4,831	6,07
	D <sub>6</sub>	3,356	5,81
K2LM	D <sub>1</sub>	2,519	7,13
	D <sub>2</sub>	2,075	12,4
	D <sub>3</sub>	1,783	12,2
	D <sub>4</sub>	1,328	21,6
	D <sub>5</sub>	1,389	15,8
	D <sub>6</sub>	1,218	18,6
	D <sub>7</sub>	1,024	7,60

## A.5.2 Anhang zu 6.5.2 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Tab. A. 2 und Tab. A. 3 zeigen die Biomassekonzentrationen aus den Fermentationen K2L, K4L, K1LM und K2LM, welche zu Beginn und Ende der Batch-Phase sowie am Ende einer Verdünnungsrate zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{0,5}$  und  $t_1$  bestimmt wurden. Der Mittelwert aus den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{0,5}$  und  $t_1$  steht stellvertretend für eine Verdünnungsrate.

**Tab. A. 2: Biomassekonzentration in den verschiedenen Fermentationsphasen der Prozesse K2L und K4L.**

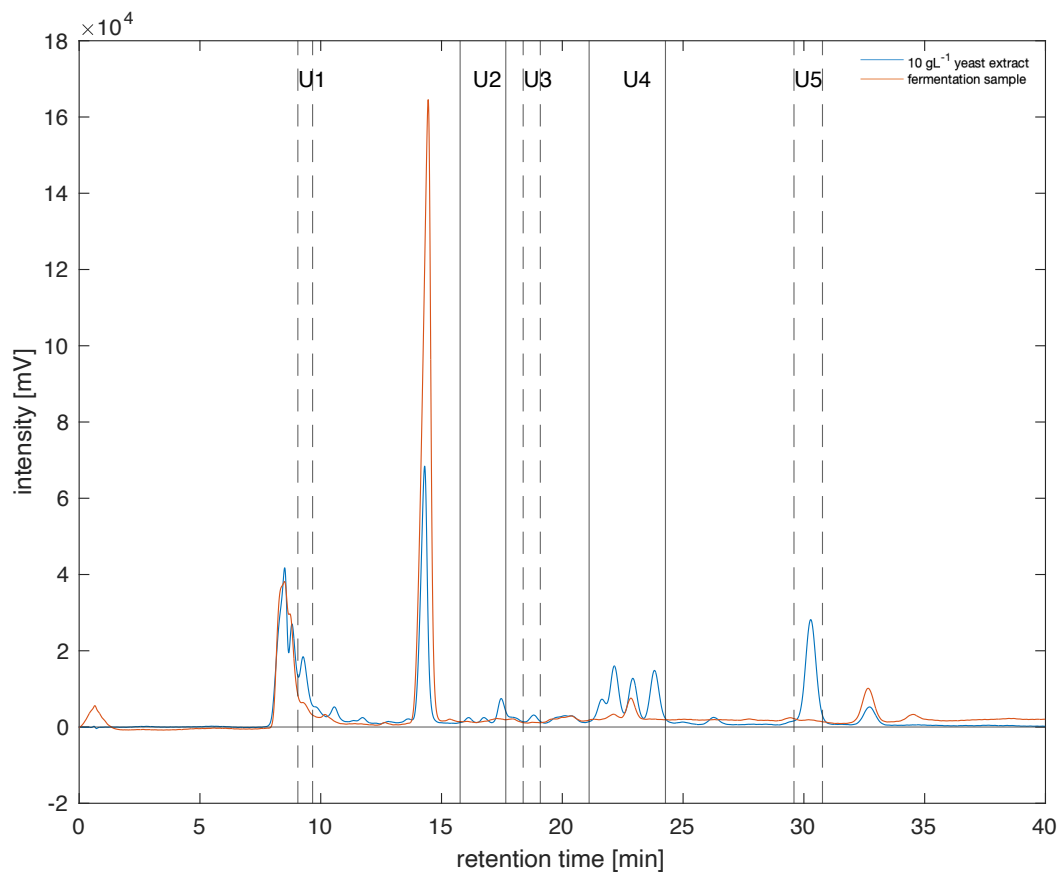
Prozess	Fermentationsphase	$c_{XL,Di}$ [gL <sup>-1</sup> ]			
		$t_0$	$t_{0,5}$	$t_1$	Mittelwert
K2L	Batch Start	0,3321			
	Batch Ende	2,557			
	Chemostat	$t_0$	$t_{0,5}$	$t_1$	Mittelwert
	D <sub>1</sub>	2,778	2,893	2,827	2,833
	D <sub>2</sub>	2,901	2,803	2,745	2,816
	D <sub>3</sub>	3,647	2,934	3,024	3,202
	D <sub>4</sub>	3,295	3,131	3,073	3,166
	D <sub>5</sub>	2,778	2,819	2,811	2,803
	D <sub>6</sub>	2,680	2,532	2,499	2,570
	D <sub>7</sub>	3,287	2,581	2,483	2,784
	D <sub>8</sub>	2,639	2,598	2,672	2,636
K4L	Batch Start	0,4442			
	Batch Ende	8,454			
	D <sub>1</sub>	2,316	2,259	2,210	2,262
	D <sub>2</sub>	1,468	1,439	1,640	1,515
	D <sub>3</sub>	1,418	1,418	1,574	1,470
	D <sub>4</sub>	1,398	1,390	1,369	1,386
	D <sub>5</sub>	1,287	1,275	1,238	1,267
	D <sub>6</sub>	1,324	1,263	1,279	1,289
	D <sub>7</sub>	1,185	1,144	1,164	1,164
	D <sub>8</sub>	1,049	1,017	1,025	1,030
	D <sub>9</sub>	0,486	0,494	0,492	0,490

**Tab. A. 3: Biomassekonzentration in den verschiedenen Fermentationsphasen der Prozesse K1LM und K2LM.**

Prozess	Fermentationsphase	$C_{X,L,D_i}$ [gL <sup>-1</sup> ]			
		$t_0$	$t_{0,5}$	$t_1$	Mittelwert
K1LM	Batch Start	0,6039			
	Batch Ende	7,1004			
	Chemostat	$t_0$	$t_{0,5}$	$t_1$	Mittelwert
	D <sub>1</sub>	2,172	2,205	2,197	2,191
	D <sub>2</sub>	2,016	2,008	2,090	2,038
	D <sub>3</sub>	1,393	1,352	1,369	1,371
	D <sub>4</sub>	1,938	1,930	1,914	1,928
	D <sub>5</sub>	1,426	1,459	1,455	1,446
	D <sub>6</sub>	1,291	1,360	1,336	1,329
K2LM	Batch Start	0,1322			
	Batch Ende	8,237			
	D <sub>1</sub>	1,091	1,128	1,062	1,094
	D <sub>2</sub>	1,259	1,312	1,292	1,288
	D <sub>3</sub>	1,628	1,538	1,501	1,555
	D <sub>4</sub>	1,025	1,001	0,968	0,998
	D <sub>5</sub>	1,042	1,005	0,931	0,992
	D <sub>6</sub>	0,603	0,562	0,572	0,579
	D <sub>7</sub>	0,515	0,507	0,523	0,515

### A.5.3 Anhang zu 6.5.3 Substratanalyse

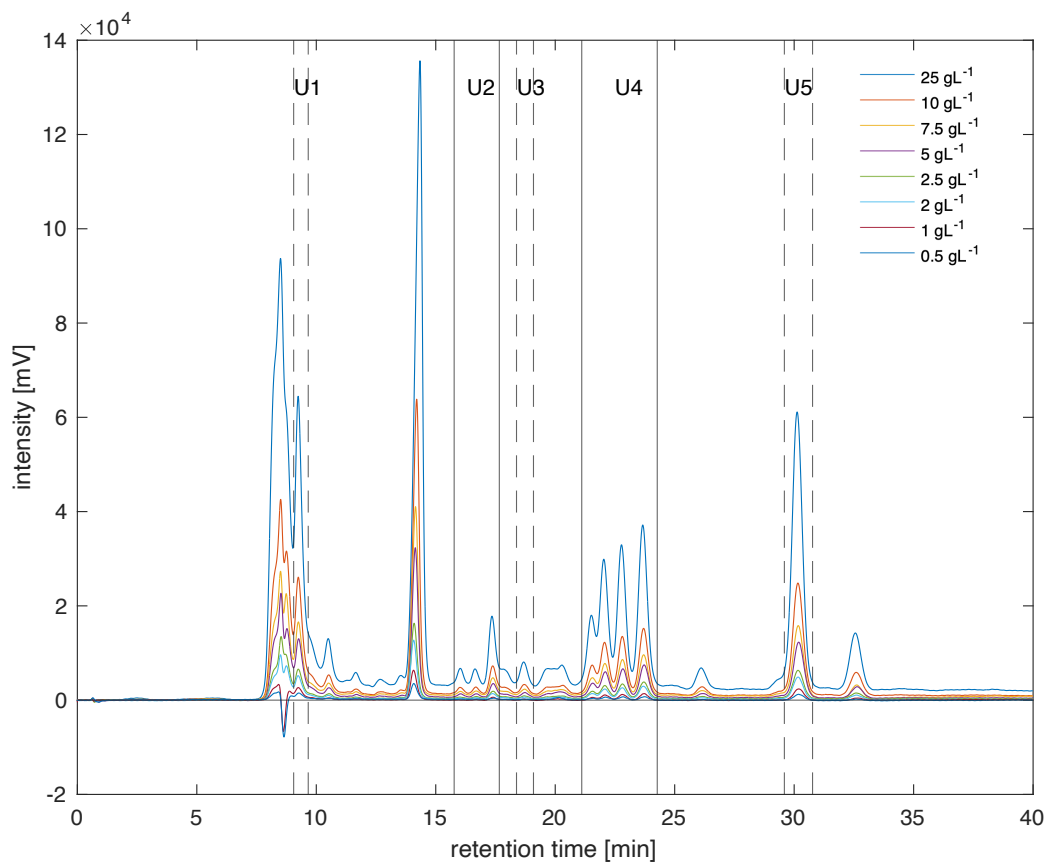
Im Folgenden wird auf die Auswertung der Substratanalyse genauer eingegangen. Die einzelnen Auswertungsschritte werden hier anhand des Hefeextraktes der Fa. Leiber aufgezeigt. Zunächst wird das Chromatogramm des Zulaufreservoirs mit den Fermentationsproben verglichen (siehe Abb. A. 9). Die Bereiche U1 bis U5 zeigen die Peakflächen an, welche im Vergleich zum Zulaufreservoir während der Fermentation abgenommen haben, also verbraucht wurden. Die Summe der Peakflächen (U1 bis U5) steht stellvertretend für die resultierende Konzentration in der jeweiligen Probe.



**Abb. A. 9:** Chromatogramm der HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren mit Hefeextrakt der Fa. Leiber. U1 bis U5 stehen für die unbekannt Peakflächen, welche während der Fermentationen K2L und K4L im Vergleich zum Zulaufreservoir ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ) abnehmen.

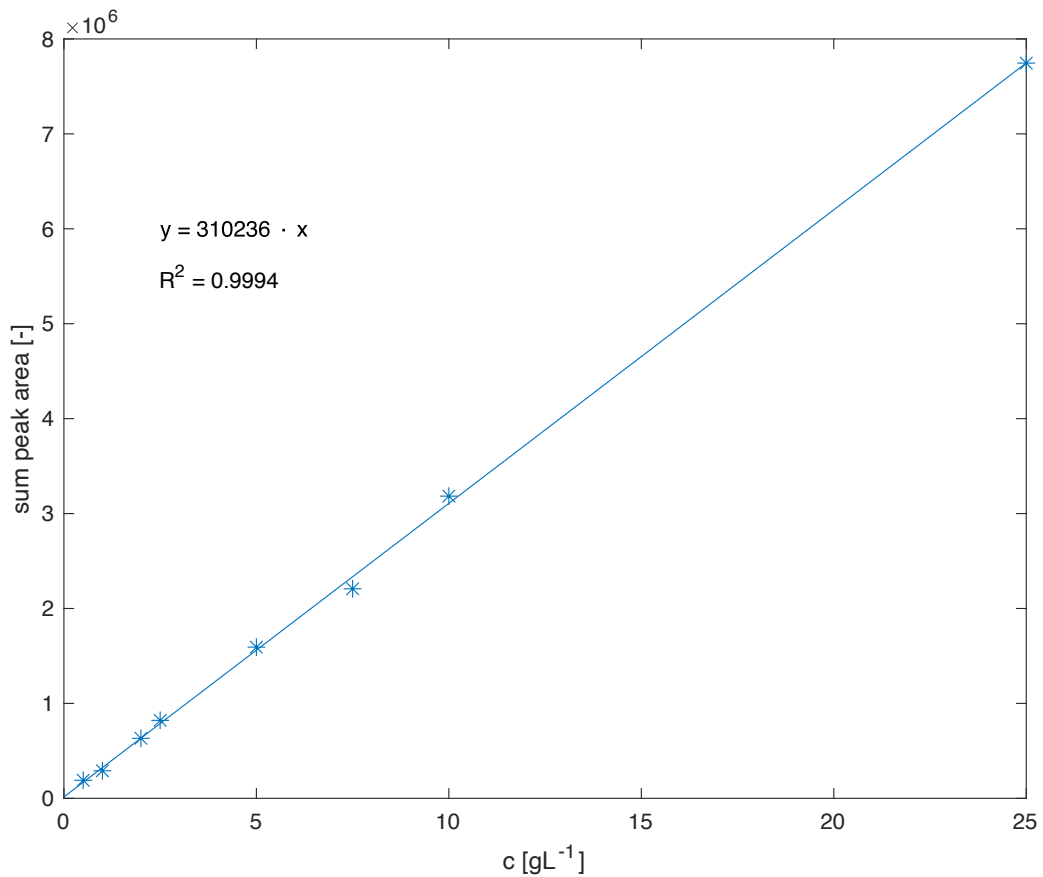
Nachdem die Bereiche abnehmender Peakflächen definiert wurden (siehe Abb. A. 9), kann die Summe der Peakflächen für die jeweilige Konzentration bestimmt werden. Diese dient zur Aufstellung einer Kalibriergeraden (siehe Abb. A. 11), welche im Anschluss die Bestimmung der Konzentrationen in den Fermentationsproben erlaubt.





**Abb. A. 10: Chromatogramm des Hefeextraktes der Fa. Leiber.** Hefeextraktkonzentration von  $0,5 \text{ gL}^{-1}$  bis  $25 \text{ gL}^{-1}$ .

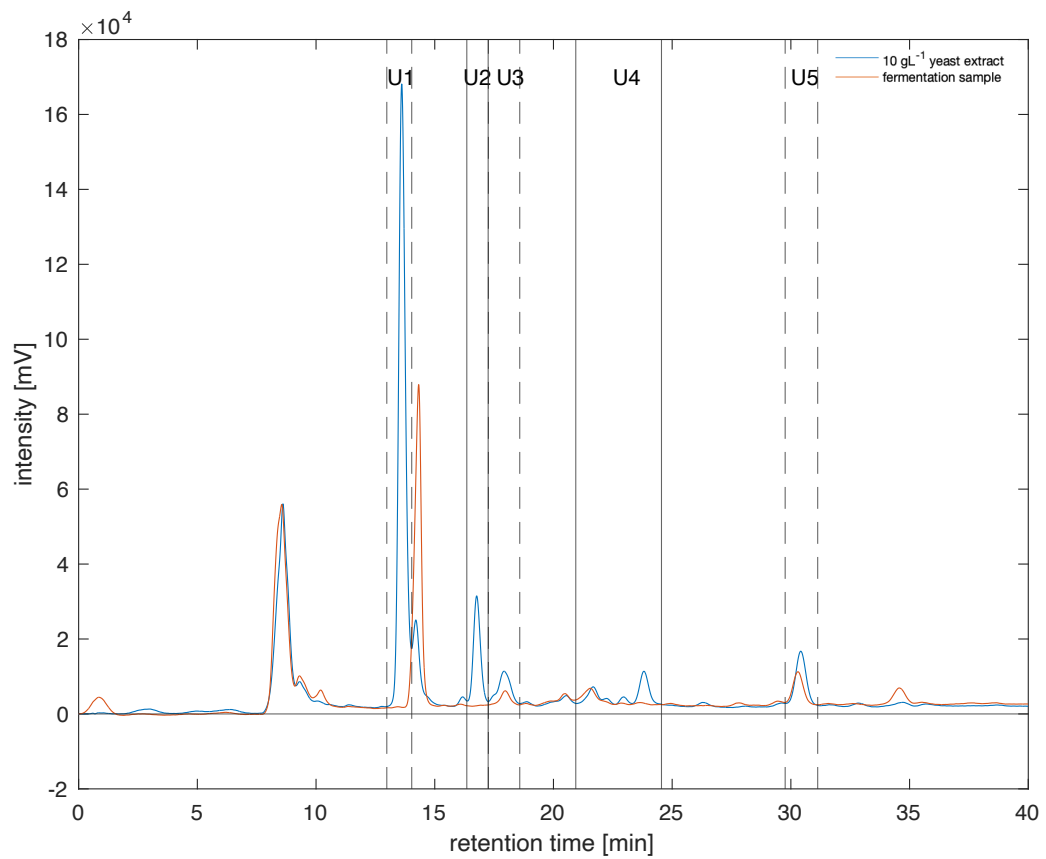
Abb. A. 10 zeigt das Chromatogramm der verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen der Fa. Leiber, welches für die Auftragung der Summe der Peakflächen gegen die Konzentration in der nachstehenden Abb. A. 11 dient.



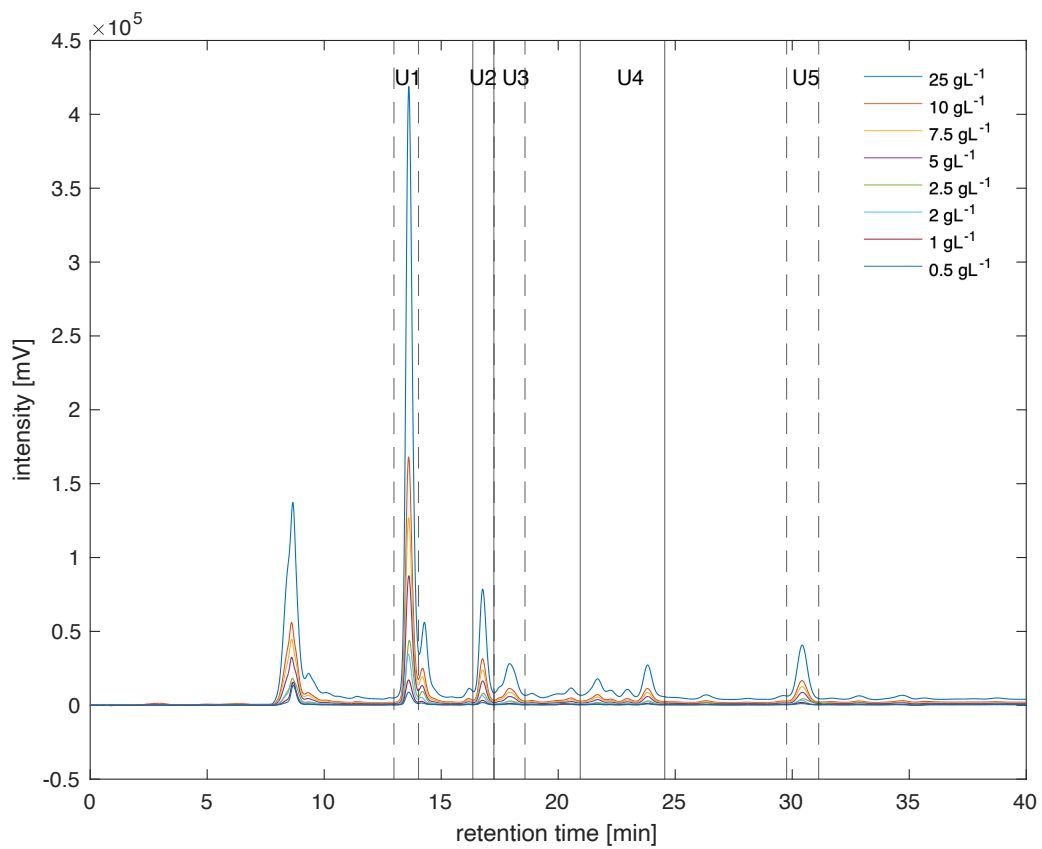
**Abb. A. 11: Kalibriergerade des Hefeextraktes der Fa. Leiber.** Auftragung der Summe der Peakflächen gegen die Hefeextraktkonzentration.

Durch Umstellung der Gleichung aus Abb. A. 11 nach  $x$ , kann über die Summe der Peakflächen (U1 bis U5) in den Fermentationsproben die Konzentration an Hefeextrakt bzw. an Kohlenhydraten und organischen Säuren bestimmt werden.

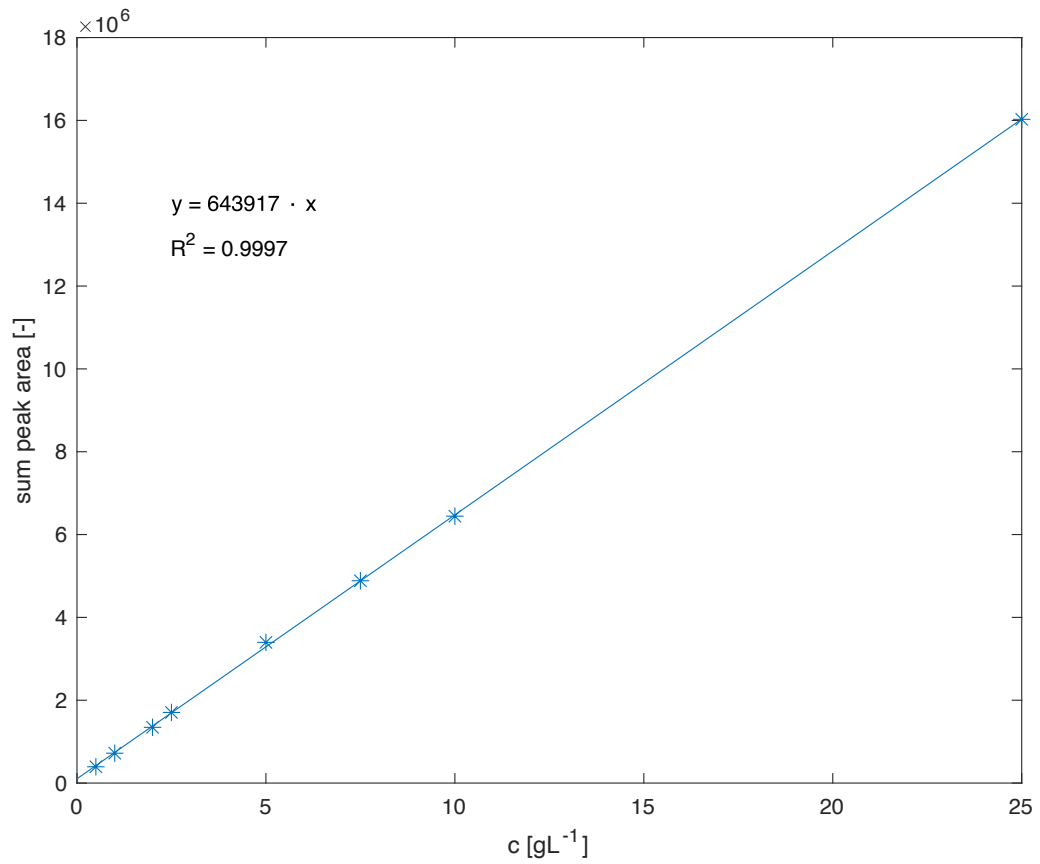
Gleiches Vorgehen wurde auch für die Bestimmung der Konzentration des Hefeextraktes der Fa. Lallemand und der Fermentationsproben aus den Prozessen K1LM und K2M angewandt. Die zugehörigen Chromatogramme und die Kalibriergerade sind im Folgenden gezeigt.



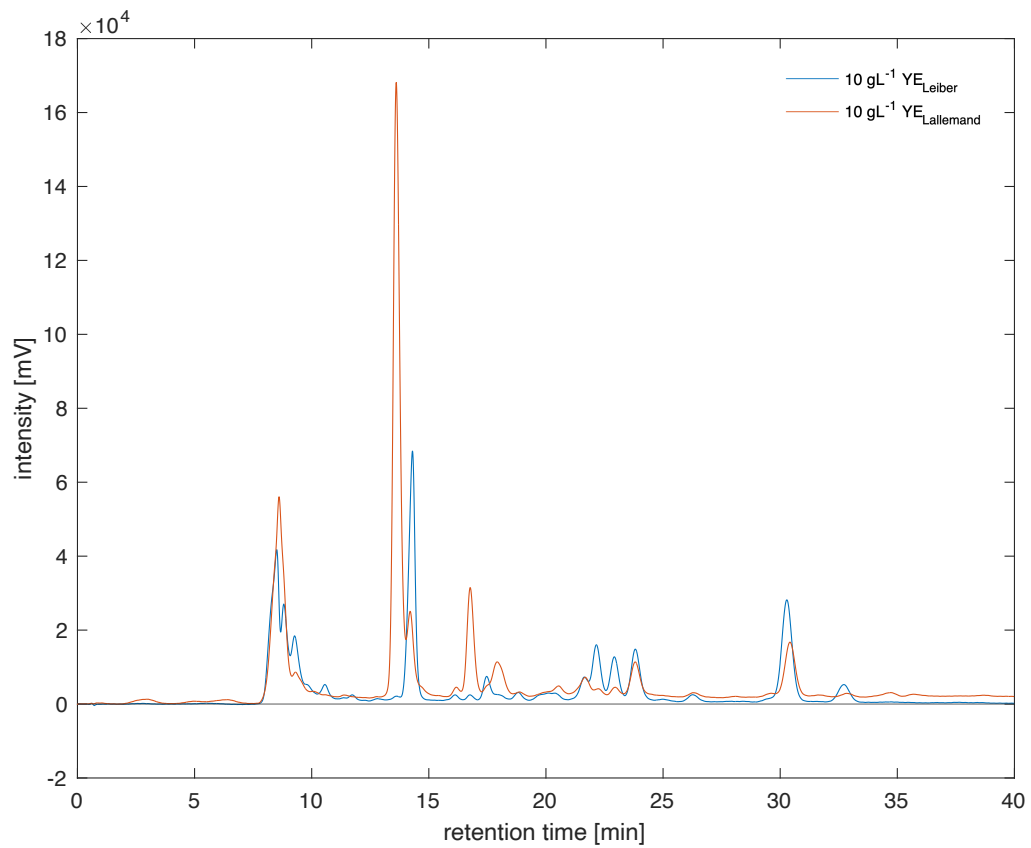
**Abb. A. 12: Chromatogramm der HPLC für Kohlenhydrate und organische Säuren mit Hefeextrakt der Fa. Lallemand. U1 bis U5 stehen für die unbekannt Peakflächen, welche während der Fermentationen K1LM und K2LM im Vergleich zum Zulaufreservoir ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ) abnehmen.**



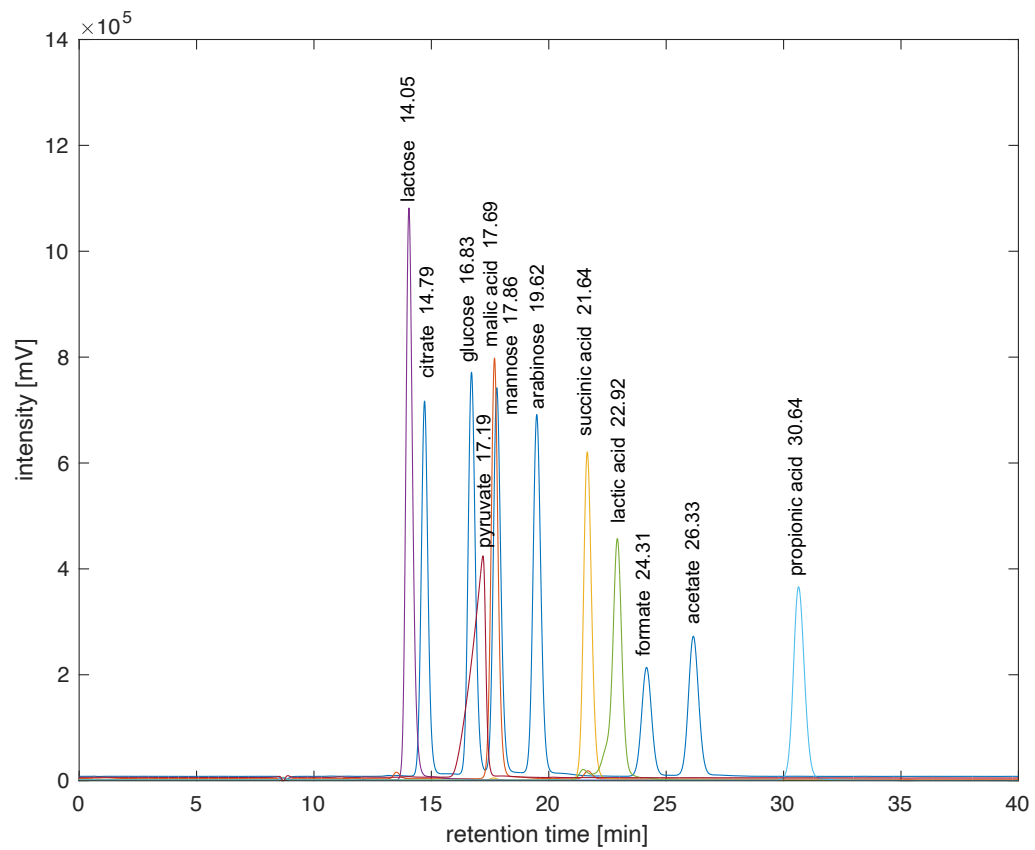
**Abb. A. 13: Chromatogramm des Hefeextraktes der Fa. Lallemand.** Hefeextraktkonzentration von 0,5 gL<sup>-1</sup> bis 25 gL<sup>-1</sup>.



**Abb. A. 14: Kalibriergerade des Hefeextraktes der Fa. Lallemand.** Auftragung der Summe der Peakflächen gegen die Hefeextraktkonzentration.



**Abb. A. 15: Vergleich der Hefeextrakte der Fa. Leiber und Fa. Lallemand.** Im Vergleich sind die Proben des Hefeextraktzulaufreservoirs mit einer Konzentration von  $10 \text{ gL}^{-1}$  zu sehen.



**Abb. A. 16: Chromatogramm der getesteten Kohlenhydrate und organischen Säuren mit Retentionszeit.** Die Konzentration beträgt jeweils  $5 \text{ gL}^{-1}$ .

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbst und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln, einschließlich des World Wide Web und anderer elektronischer Quellen angefertigt habe. Alle Stellen der Arbeit, die ich anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen. Die Arbeit ist von mir in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht eingereicht worden.

Hamburg, 14. Dezember 2021

---

Laura Isabel Amler