

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Übertragung des Laborversuches mit der French Press des ARV Praktikums auf einen Hochdruckhomogenisator

Bachelorarbeit

im Studiengang

Biotechnologie

Vorgelegt von:

Diana Belsch

Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg, 06.05.2026

1. Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde an der HAW Hamburg betreut und erstellt

Inhalt

1. Einleitung und Zielsetzung.....	6
1.1 Einleitung.....	6
1.2 Ziel	6
2. Theoretische Grundlagen	7
2.1 Hefezellen als Modellorganismus	7
2.1.1 Morphologie, Zellstruktur und Eigenschaften von <i>S. cerevisiae</i>	8
2.1.2 Zellwandstruktur und mechanische Stabilität von <i>S. cerevisiae</i>	9
2.2 Zellaufschlussverfahren	11
2.2.1 Relevanz von Zellaufschluss in der Biotechnologie	11
2.2.2 Überblick über nicht-mechanische Zellaufschlussverfahren	13
2.2.2.1 Physikalische Aufschlussverfahren	13
2.2.2.2 Chemische Aufschlussverfahren	14
2.2.2.3 Biologische Aufschlussverfahren	15
2.2.3 Überblick über mechanische Zellaufschlussverfahren.....	16
2.2.3.1 Nassvermahlung	16
2.2.3.2 Aufschluss durch Ultraschall.....	17
2.2.3.3 Aufschluss mittels Hochdruckverfahren	18
2.2.4 French Press	20
2.2.4.1 Funktionsprinzip der French Press	20
2.2.4.2 Einflussparameter bei der French Press	21
2.2.4.3 Vor- und Nachteile der French Press	22
2.2.5 Hochdruckhomogenisator	22
2.2.5.1 Funktionsprinzip des Hochdruckhomogenisators	22
2.2.5.2 Einflussparameter bei einem Hochdruckhomogenisator.....	24
2.2.5.3 Vor- und Nachteile des Hochdruckhomogenisators	25
2.2.6 Vergleich French Press vs. Hochdruckhomogenisator	25
2.3 Analytik.....	25
2.3.1 Trübungsmessung.....	26
2.3.2 Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assay	26
2.3.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Biuret	27
2.3.4 Grundlagen der Photometrie	28
3. Material und Methoden	29

3.1 Material	29
3.2 Methoden	29
3.2.1 Herstellung der Hefesuspension	29
3.2.1.1 Ansatz des Puffers	29
3.2.1.2. Ansatz der Hefesuspension.....	30
3.2.1.3 Messung der Konzentration von Hefesuspension (OD).....	30
3.2.2 Analytische Methoden zur Beurteilung des Zellaufschlusses	30
3.2.2.1 Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assay	30
3.2.2.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Biuret	31
3.2.3 Temperaturmessung.....	32
4. Durchführung und Ergebnisse.....	33
4.1 Durchführung des Aufschlusses mit der French Press.....	33
4.1.1 Beobachtungen während des Versuches.....	34
4.2 Durchführung des Aufschlusses mit dem Hochdruckhomogenisator	35
4.2.1 Beobachtungen während der Versuchsdurchführung	36
4.3 Ergebnisse	36
4.3.1 French Press: Aufschluss über acht Druckstufen	36
4.3.2 Hochdruckhomogenisator	46
4.3.2.1 Aufschluss über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung	47
4.3.2.2 Aufschluss über neun Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung.....	49
4.3.2.3 Aufschluss über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung	50
4.3.3 Vergleich der Ergebnisse FP vs. HDH.....	63
4.3.4 Reproduzierbarkeit und Handhabung im Praktikum.....	64
5. Diskussion	65
5.1 Interpretation der Ergebnisse	65
5.2 Eignung des Hochdruckhomogenisators als Ersatz der French Press im Praktikum.....	67
5.3 Implementierung im Praktikum: Grenzen und mögliche Optimierungen des Versuches	68
6. Fazit und Ausblick.....	69
6.1 Zusammenfassung der Arbeit	69
6.2 Ausblick und mögliche Weiterentwicklungen des Versuches	70
7. Literaturverzeichnis.....	71
8. Eidesstattliche Erklärung.....	73
9. Anhang	74

Anhang 1: <i>Aufschluss mit der FP - Pipettierschema (Proteinbestimmung)</i>	74
Anhang 2: <i>Aufschluss mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Enzymkinetik (inkl. Rohdaten)</i>	75
Anhang 3: <i>Aufschluss mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Pipettierschema (Proteinbestimmung)</i>	77
Anhang 5: <i>Aufschluss mit dem HDH über neun Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Pipettierschema (Proteinbestimmung)</i>	83
Anhang 6: <i>Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Enzymkinetik Passage 2 (inkl. Rohdaten)</i>	87
Anhang 7: <i>Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Pipettierschemas Passage 1 (Proteinbestimmung)</i>	89
Anhang 8: <i>Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Pipettierschemas Passage 2 (Proteinbestimmung)</i>	90
Anhang 9: <i>Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Standardkurven Passage 2 (Proteinbestimmung)</i>	91
Anhang 10: <i>Einwaagen</i>	94
Anhang 11: <i>OD₆₀₀-Messung</i>	95

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Abschlussarbeit unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen. Ich danke ihr für die exzellente Betreuung meiner Arbeit sowie für die wertvolle Unterstützung und Begleitung, die mir insbesondere in der Abschlussphase eine große Hilfe war. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich außerdem bei Ulrich Scheffler und Hans-Peter Bertelsen herzlich bedanken, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Durch ihre Unterstützung durfte ich viel Neues lernen und wertvolle Erfahrungen sammeln. Des Weiteren geht ein herzlicher Dank an das ganze Team des OCB-Labors und des Labors für Instrumentelle Analytik, die mir während der Versuche tatkräftig geholfen haben.

Die größte und unverzichtbare Unterstützung während meines Studiums war meine Familie. Ich möchte meinem Vater danken, der mir dieses Studium ermöglicht hat und damit den Grundstein für diesen wichtigen Lebensabschnitt gelegt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Ehemann, der mich im Laufe des gesamten Studiums unermüdlich und jederzeit mit Rat und Tat unterstützt hat - sowohl fachlich als auch menschlich. Deine Hilfe und dein Verständnis haben wesentlich dazu beigetragen, dass ich diesen Abschluss erreichen konnte. Danke, dass du immer an meiner Seite warst und bist. Schließlich danke ich meiner Tochter: Du warst und bist meine größte tägliche Motivation und der Grund, warum ich dieses Ziel mit so viel Energie und Ausdauer verfolgt habe.

Ich danke allen Unterstützenden herzlich.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Mikroorganismen sind eine wichtige Quelle für zahlreiche biotechnologisch relevante Produkte wie Proteine, Enzyme und Polysaccharide, die häufig intrazellulär vorliegen (Walker, 1998; Liu et al., 2016). Die Zellen müssen aufgeschlossen werden, um das Zielprodukt zu erhalten. Dementsprechend stellt der Zellaufschluss einen wichtigen Aufarbeitungsschritt in der Biotechnologie dar und hat einen direkten Einfluss auf den Ablauf und die Effizienz der Produktgewinnung (Cornelissen, WS23/24).

Hefen wie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (im Folgenden *S. cerevisiae*) werden seit dem Ende des 19. Jahrhunderts in der Forschung eingesetzt und gelten bis jetzt als einer der in der Biotechnologie am häufigsten verwendeten Modellorganismen. Dank der robusten Zellwand hat die Bäckerhefe eine stabile Struktur, aufgrund derer jedoch eine hohe Zellaufschlussleistung erforderlich ist (Parapouli et al., 2020 oder Middelberg, 1995). Hier finden diverse Zellaufschlussverfahren Anwendung. Im Hinblick auf den Zellaufbau von *S. cerevisiae* sind insbesondere mechanische Zellaufschlussmethoden relevant (Gomes et al., 2020).

Der mechanische Zellaufschluss umfasst ein breites Spektrum an Verfahren, zu denen ebenfalls der Zellaufschluss mittels French Press und Hochdruckhomogenisator zählt. Bei den beiden Aufschlussverfahren werden die Zellen unter hohem Druck durch einen engen Spalt gepresst, wobei es starke Scherkräfte, Turbulenzen und Druckunterschiede entstehen, die die Zellwände zerstören. Dabei sind verschiedene Parameter zu beachten, die die Effizienz des Zellaufschlusses beeinflussen (Cornelissen, WS23/24).

1.2 Ziel

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist, den Versuch aus dem ARV (Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren) Praktikum „Aufschluss von Hefezellen mit der French Press (FP)“ auf einen Hochdruckhomogenisator (HPH) zu übertragen. Hierbei müssen der wissenschaftliche Hintergrund beider Methoden vertieft und eine reproduzierbare Methodik für die Durchführung des Zellaufschlusses von Hefezellen mittels HPH entwickelt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Hefezellen als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein einzelliger eukaryotischer Mikroorganismus, der seit vielen Jahrzehnten weltweit intensiv untersucht wird. Der Ursprung der Hefeforschung liegt im klassischen wissenschaftlichen Werk von Pasteur vom Jahr 1857. In dieser Arbeit beschreibt Louis Pasteur, dass die Hefen biochemische Prozesse steuern und für Fermentation verantwortlich sind. Außerdem betont der Autor, dass kontrollierte Kulturen von Mikroorganismen während der Fermentation stabilere industrielle Prozesse gewährleisten können. Dies ist ein wichtiger Meilenstein in der historischen Bedeutung von Hefen, deren Anwendung in der Forschung immer noch aktuell ist (Wojciech, 2010).

Die Hefe *S. cerevisiae* (wörtliche Übersetzung: „Bierzuckerpilz“) gehört zu den wichtigsten Mikroorganismen der Lebensmittelindustrie. Sie wird vom Menschen seit Jahrtausenden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Fermentation gezielt zur Herstellung von alkoholischen Getränken und Backwaren genutzt. Neben diesen Anwendungen dient die Hefe als Quelle für Hefeextrakte, die als Geschmacksverstärker und Nährstoffzusätze fungieren. Außerdem wird die Biomasse der Hefe zur Gewinnung von Vitaminen und als Zusatzstoff in der Tierernährung verwendet, um die Nährqualität zu verbessern (Parapouli et al., 2020; Reece et al., n.d.).

Die erfolgreiche Transformation von der Bäckerhefe mittels Plasmidreplikation in *E. coli* im Jahr 1978 hat dazu beigetragen, dass der Einsatz der Hefen sich in der Forschung schnell verbreitet hat (Hinnen et al., 1978; Vanderwaeren et al., 2022). Außerdem ist *S. cerevisiae* das erste eukaryotische Organismus, dessen Genome vollständig sequenziert wurde (Wojciech, 2010). Zahlreiche Studien an der *S. cerevisiae* förderten das Verständnis von dem grundlegenden Wissen über Prozesse und Aufbau eukaryotischer Zellen wie Zellzyklus, DNA-Replikation, Transkription, Struktur der Telomere, Vesikeltransport, Autophagie und Zelltod (Cazzanelli and Pereira, n.d.; Vanderwaeren et al., 2022). Die Sammlung der genetischen Methoden und Werkzeuge, die mit Hefe entwickelt wurden und ebenfalls für andere Mikroorganismen anwendbar sind, hat die Forschung in Biologie, Genetik und Genomik maßgeblich beschleunigt. Die Tatsache, dass fast 30 % der bekannten Gene, die an menschlichen Krankheiten beteiligt sind, entsprechende homologe Gene in Hefe haben, hat *S. cerevisiae* zu einem attraktiven Forschungsmodell auch für Medizin gemacht. Die mittels Hefe entwickelten genetischen Methoden sind besonders nützlich, um neue biologisch aktive Stoffe zu finden und Wirkmechanismen zu verstehen, die durch Medikamente ausgelöst werden

(Lum et al., 2004). Zahlreiche Eigenschaften der Bäckerhefe rechtfertigen ihren Einsatz in verschiedenen Fachgebieten. Der kurze Lebenszyklus, das gut beschriebene Genom und die einfache genetische Manipulation machen aus Hefe einen hervorragenden Modellorganismus. Außerdem lässt sich Hefe unter Laborbedingungen leicht kultivieren, da sie kein komplexes Nährmedium zum Wachstum benötigt. Ein zusätzlicher Vorteil der Hefe ist die kurze Teilungsintervall von 90 Minuten (Vanderwaeren et al., 2022). Aufgrund ihrer biotechnologisch relevanten Eigenschaften wie die Fermentationskapazität, die durch Produktion von Alkohol und Kohlenstoffdioxid begleitet wird, und Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Bedingungen wie hoher osmotischer Druck und pH-Wert-Schwankungen hat sich *S. cerevisiae* auch in Alkohol- und Biokraftstoffindustrie durchgesetzt. Da Hefe den Status GRAS (Generally Recognized as Safe) besitzt, eignet sie sich ausgezeichnet für die Lebensmittelindustrie. Sie ist eine günstige und verfügbare Quelle für Proteine und Aminosäuren, die als Nährhefe-Biomasse oder als Stickstoffquelle dienen. Die Hefebiomasse ist ebenfalls als Nahrungs- und Futtermittelquelle und Alternative zur Soja- bzw. Fleisch- sowie Fischmehl geeignet (Jach et al., 2022).

2.1.1 Morphologie, Zellstruktur und Eigenschaften von *S. cerevisiae*

Die Zellen von *S. cerevisiae* sind rund oder oval und haben einen Durchmesser von ca. 5-10 µm (Vanderwerden et al., 2022; Chavez et al., 2023;). Die Hefezellen sind flach, glatt, feucht, glänzend oder matt und haben eine cremefarbene bis leicht bräunliche Farbe (Montes de Oca et al., 2016). Als ein eukaryotischer Organismus enthält sie die wichtigsten Organellen wie Zellwand, Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Vakuole und Golgi-Apparat, die mit einer extra- und intrazellulären Membrannetzwerk verbunden sind (s. Abb. 1) (Walker and Stewart, 2016).

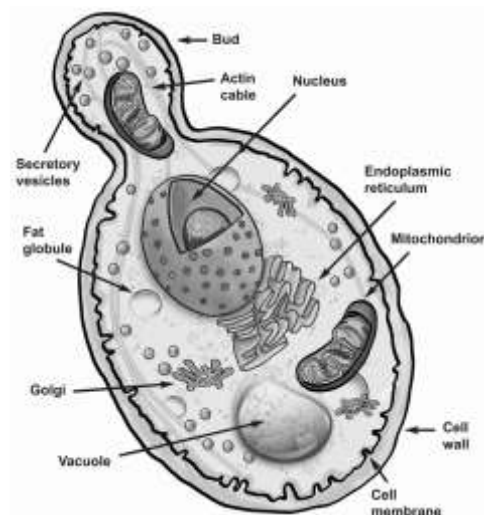


Abb. 1. Zellstruktur und Organellen einer Hefezelle (°). Dargestellt ist eine Zelle während der Sprossung mit den wichtigsten Bestandteilen: Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Vakuole, Vesikel sowie Zellmembran und Zellwand. Quelle: Walker et al., 2016

Die Bäckerhefe ist ein einzelliger sich schnell teilender fakultativ anaerober Mikroorganismus, der zum Reich der Pilze gehört. Kolonien von der Bäckerhefe wachsen schnell und reifen in der Regel innerhalb von drei Tagen. In der Gegenwart von Sauerstoff betreibt die Bäckerhefe aerobe Atmung, während derer Kohlenstoff, Wasser und viel Energie gewonnen wird. Wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht, findet in den Hefezellen alkoholische Gärung statt, wobei Produkte wie Ethanol und Kohlenstoffdioxid entstehen (de Oca, 2016).

S. cerevisiae sind heterotrophe Organismen, die ihre Energie aus Zucker gewinnen und in der Lage sind, sowohl respiratorischen als auch fermentativen Stoffwechsel zu betreiben. Als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen Zucker verschiedener Art wie Glukose, Maltose, Sucrose, Lactose und Fructose. Außerdem werden Aminosäuren und Ammonium als Stickstoffquelle für den Aufbau von Proteinen und Enzymen in den Hefezellen benötigt. Die Funktionalität von Enzymen und Zellprozessen werden durch die Aufnahme von verschiedenen Mineralstoffen aufrechterhalten. Zahlreiche Vitamine und Wachstumsfaktoren sind ebenfalls wichtig und dienen als Cofaktoren im Stoffwechsel von *S. cerevisiae* (Walker and Stewart, 2016; Wojciech, 2010).

2.1.2 Zellwandstruktur und mechanische Stabilität von *S. cerevisiae*

Die Zellwand beträgt ca. 30 % des Trockengewichtes einer vegetativen *S. cerevisiae*-Zelle. Die Organisation und Struktur der Zellwand verändern sich im Laufe des Wachstums und der Entwicklung der Hefezelle. Den Anteil von Polysacchariden wie β -Glucane, Mannane und Chitin beträgt ca. 85 % und der Anteil der Proteine in der Hefezellwand umfasst ca. 15 %. Das

Zytoplasma von *S. cerevisiae* ist von einer Lipiddoppelschicht, so genannter Plasmamembran umgeben. Die Zellwand besteht hauptsächlich aus β -Glucanen, Mannoproteinen, Chitin und Anteilen von Lipiden (s. Abb. 2) (Cornelissen, WS23/24; Lesage and Bussey, 2006a).

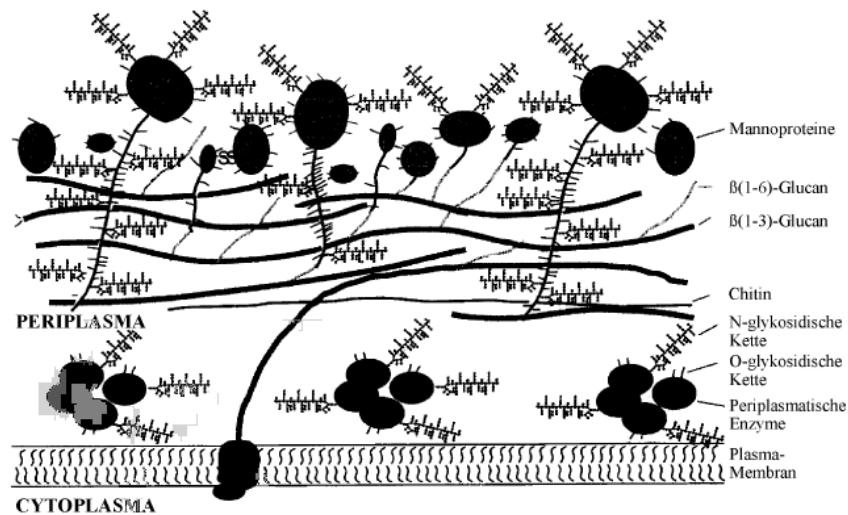


Abb. 2. Schematischer Aufbau der Zellwand von *S. cerevisiae*. Dargestellt ist die Schicht aus Mannoproteinen, die durch ein Netzwerk von β -Glucanen und Chitin stabilisiert wird, und die darunterliegende Plasmamembran. Quelle: ARV Vorlesungsskript WS23/24.

β -Glucane betragen ca. 30-60 % des Trockengewichtes der Zellwand und kommen in der Zellwand in Form von β -1,3- und β -1,6-Glucanen vor. β -1,3-Glucane sind größtenteils für die Zugfestigkeit und Erhalt der Form der Zellwand verantwortlich und verleihen der Hefezelle mechanische Stabilität ("ARV Skript WS2324" n.d.), indem sie mit anderen Zellwandkomponenten kovalente faserartige Strukturen bilden. β -1,6-Glucane bilden im Vergleich zu β -1,3-Glucanen kürzere Ketten und durch Bindung mit anderen Bestandteilen der Zellwand eher ungeordnete Strukturen bilden. Sie dienen als Bindemittel zwischen β -1,3-Glucanen, Chitin und Mannoproteinen in der Zellwand und sind dadurch für die Vernetzung der dreidimensionalen Struktur der Zellwand verantwortlich (Lesage and Bussey, 2006b; Orlean, 2012).

Mannoproteine kommen in der Zellwand anhand ihrer Funktion in der Zellwand der Bäckerhefe vor. Die Mannoproteine erster Gruppe wie Hydrolasen und Transglycosidasen sind an der Zellwandbildung beteiligt. Zu der zweiten Gruppe der Mannoproteine gehören Proteine ohne enzymatische Funktion wie Agglutinine, Flocculine und β -1,3-Glucanvernetzter. Mannoproteine der dritten Gruppe sind Single-Pass-Plasmamembranproteine, die als Mechanosensoren fungieren. Sie sind in der Lage, Stress und Beschädigungen in der Zellwand zu erkennen und Zellwand-Integritäts-Signalweg zu aktivieren (Orlean, 2012).

2.2 Zellaufschlussverfahren

2.2.1 Relevanz von Zellaufschluss in der Biotechnologie

Zahlreiche Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Mikroalgen stellen Quellen für zahlreichen Bioprodukte wie Proteine, Enzyme, Lipide, Pigmente und organische Säuren für industriellen Anwendungen dar (Gomes et al., 2020). Viele dieser Mikroorganismen sind in der Lage, wertvolle biochemische Verbindungen zu produzieren. Die Primär- und Sekundärmetabolite werden häufig vor der Zelle in die Umgebung ausgeschieden und können anschließend durch geeignete Methoden vor der Zelle extrazellulär abgetrennt werden. In einigen Fällen können Mikroorganismen eingesetzt werden, die dazu fähig sind, das gewünschte Zielprodukt zu sekretieren. Jedoch werden viele Proteine ausschließlich intrazellulär gebraucht, sodass die Sekretion nicht vorgesehen ist ("ARV Skript WS2324" n.d.). Im Gegenteil dazu werden die intrazellulär hergestellten Proteine meistens nicht sekretiert und verbleiben im Zellinneren. Zu ihrer Gewinnung, ist dann ein Zellaufschluss notwendig. Die Gewinnung dieser hochwertigen intrazellulären Biomoleküle umfasst viele Aufarbeitungsschritte, wobei der entscheidende Prozessschritt der Aufschluss der Zellwand ist (Gomes et al., 2020).

Der Zellaufschluss (engl. *cell disruption*) ist die gezielte Zerstörung bzw. Beschädigung der Zellwand, wobei das im Zellinneren befindliche Produkt freigesetzt wird. Das Zielprodukt gelangt dabei infolge der beschädigten Zellstrukturen in das Medium außerhalb der Zelle und kann anschließend von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt werden (Cornelissen, WS23/24).

Die Zellyse ist bei der Gewinnung intrazellulärer Produkte von großer Bedeutung und stellt in den meisten Fällen die erste Stufe der Isolierung des Zielproduktes dar. Das Hauptziel ist, eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen und gleichzeitig Verluste und Kontamination zu vermeiden. Zusätzlich müssen die Selektivität und Effizienz der Aufschlussmethode sowie ökonomische Aspekte wie Betriebskosten und Skalierbarkeit der Downstreaming berücksichtigt werden (Gomes et al., 2020).

Die optimale Zellaufschlussmethode soll die Bildung von Zelltrümmern möglichst klein halten, um die nachfolgenden Reinigungsschritte zu sparen, die Stabilität des Biomoleküls, inklusive seiner Struktur und Funktionalität, erhalten und einen möglichst geringen Energieverbrauch verursachen. Da Mikroorganismen unterschiedliche mechanische Eigenschaften ihrer Zellwand besitzen und unter verschiedenen Kulturmedien wachsen, verhalten sie sich somit während des

Aufschlusses unterschiedlich. Dementsprechend kann die Bestimmung einer optimalen Aufschlusstechnik eine Herausforderung darstellen. Die Auswahl der geeigneten Methodik richtet sich nach dem Mikroorganismus und seiner Zellstruktur, der Lokalisation des Zielproduktes in der Zelle, dem gewünschten Reinheitsgrad des Zielproduktes, der Skalierbarkeit sowie dem zulässigen Energieeintrag. Darüber hinaus beeinflusst die gewählte Aufschlussmethode die weiteren Downstream-Prozesse. Die genannten Faktoren bestimmen den Aufwand der Isolierung des Zielproduktes und die damit verbundenen Kosten (Gomes et al., 2020).

Im nächsten Kapitel wird ein Überblick über verschiedene Zellaufschlussverfahren vorgestellt, wobei es auf die Unterschiede im Hinblick auf die Prinzipien und technischen Aufwand sowie die Vor- und Nachteile eingegangen wird. Hauptsächlich wird zwischen intensiven (engl. *severe*), schonenden (engl. *gentle*) und kombinierten Verfahren unterschieden (s. Abb. 4). Da einige Verfahren allein nur eine bedingte Effizienz erreichen, werden sie häufig mit Aufschlusstechniken kombiniert. Ziel der kombinierten Methoden ist, um die Ausbeute zu erhöhen und den gesamten Gewinnungsprozess effektiver zu gestalten (Cornelissen, WS23/24; Gomes et al., 2020)

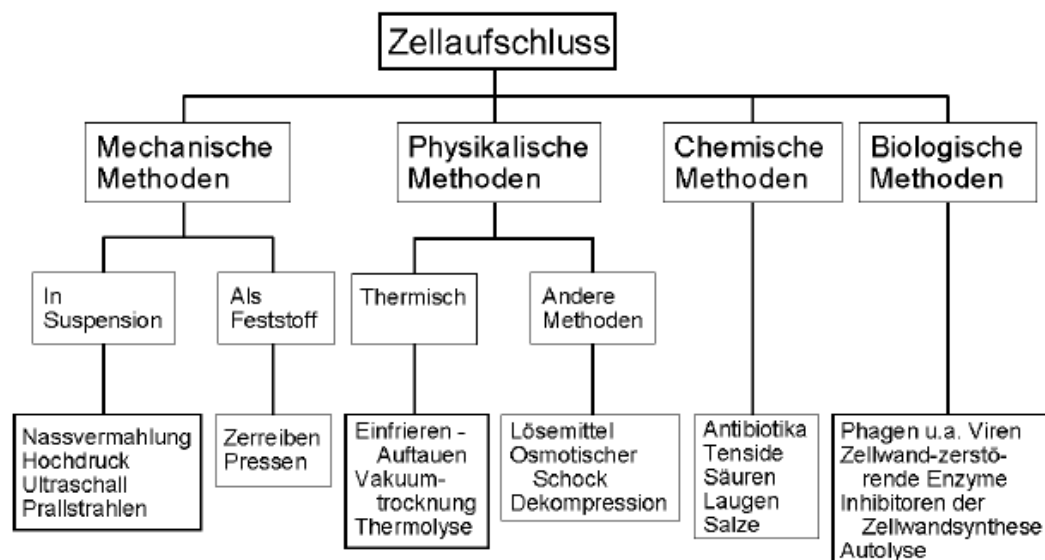


Abb. 3. Grafische Übersicht von Aufschlussverfahren, unterteilt nach ihren Wirkprinzipien.

Quelle: ARV Vorlesungsskript WS23/24.

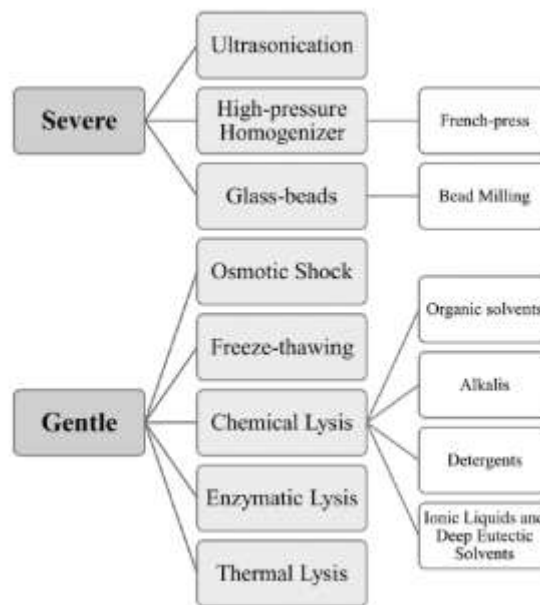


Abb. 4. Überblick der Aufschlussmethoden hinsichtlich ihres Intensitätsgrades. Hauptsächlich wird es zwischen intensiven (engl. severe) und schonenden (engl. gentle) Methoden unterschieden.
Quelle: Gomes et al., 2020.

2.2.2 Überblick über nicht-mechanische Zellaufschlussverfahren

Die nicht-mechanischen Aufschlussmethoden werden als schonende (eng. „gentle“) Methoden genannt (s. Abb. 3, 4). Sie sind im Vergleich zu mechanischen Aufschlusstechniken weniger wirksam, was in einigen Fällen vorteilhaft ist. Diese Methoden wirken auf die Zellwand weniger aggressiv und weisen eine höhere Selektivität und Spezifität auf. In einigen Fällen kann die schonende Wirkung dieser Aufschlussmethoden vorteilhaft sein, jedoch kann damit kein vollständiger Zellaufschluss erreicht werden (Cornelissen, WS23/24; Gomes et al., 2020). Hier wird zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Methoden unterschieden (Gomes et al., 2020).

2.2.2.1 Physikalische Aufschlussverfahren

Physikalische Aufschlussverfahren umfassen solche Aufschlussmethoden wie Dekompression, osmotischer Schock sowie Thermolyse. Während der Dekompression wird in die Zellen komprimiertes Gas eingebracht, welches aufgrund der Druckentlastung expandiert und infolgedessen platzt die Zelle. Der osmotische Schock macht schnelle Veränderungen des osmotischen Drucks in der Zelle zu Nutze. Als Folge strömt Wasser ins Zellinnere und beschädigt die Zellwand. Diese Technik ist sehr schonend, da beim milden osmotischen Druck lediglich eine Fraktur der Zellwand verursacht wird. Bei der Thermolyse wird die Zellwand

durch erhöhte Temperaturen beschädigt, wobei periplasmatische und intrazelluläre Proteine freigesetzt werden (Cornelissen, WS23/24).

Die physikalischen Aufschlussmethoden gelten als schonend, da sie die Zellwand nicht vollständig auseinandernehmen. Somit weisen sie aber eine geringere Effizienz auf und sind auf bestimmte Zellarten gebunden. Die oben genannten Aufschlussmethoden werden überwiegend im kleinen Labormaßstab eingesetzt (Cornelissen, WS23/24).

2.2.2.2 Chemische Aufschlussverfahren

Durch den Einsatz chemischer Verbindungen kann die Zellwand der Mikroorganismen vollständig aufgeschlossen oder gezielt permeabilisiert werden. Ein wichtiger Punkt ist, dass jede im Laufe des Aufschlusses zugegebene Chemikalie nach dem Aufschluss wieder entfernt werden muss. Besonders im Falle von Produkten der Pharma- und Lebensmittelindustrie sind strenge Grenzwerte einzuhalten und zu überwachen (Cornelissen, WS23/24).

Durch die Behandlung mit Antibiotika werden die Zellwandsynthese oder die Zellmembranen angegriffen. Jedoch aufgrund der niedrigen Effizienz, hoher Kosten und aufwendiger Entsorgung wird diese Methode technisch nicht eingesetzt. Chelatbildner wie EDTA und EGTA können die äußere Membran gram-negativer Bakterien destabilisieren und somit gezielt periplasmatische Proteine freisetzen. Auf die zytoplasmatische Membran und auf die Peptidoglykan-Schicht wirken Chelatbildner nicht. Bestimmte hydrophobe Bestandteile der Zellwand wie Membranproteine können durch hohe Konzentration chaotroper Agentien solubilisiert werden. Allerdings ist aufgrund der Kosten der Reagenzien und deren Entsorgung bisher keine technische Applikation bekannt. Ein weiteres Aufschlussverfahren ist der Einsatz von Detergenzien. Diese Substanzen sind amphipathische Verbindungen, die in der Lage sind, gemischte Mizellen zu bilden. Dabei lösen sie Lipide aus der Zellmembran heraus, bis diese vollständig solubilisiert ist. Detergenzien weisen jedoch eine niedrige Effizienz und können die Produktqualität stark beeinflussen (z. B. durch Denaturierung). Daher ist deren Einsatz eingeschränkt. Eine weitere Variation des chemischen Zellaufschlusses ist die Zugabe von Lösungsmitteln, die unpolare Komponente aus den Zellmembranen lösen. Dies führt zur Permeabilisierung der Membranen, sodass der Zellinhalt freigesetzt wird. Damit ist es möglich, die zytoplasmatische Membran anzugreifen und periplasmatische oder zytoplasmatische Proteine freizusetzen. Trotz der Permeabilisierung der Zellmembran können z. B. bei Hefen nur niedermolekulare Substanzen und keine Enzyme bzw. Proteine freigesetzt werden. Lösungsmittel sind begrenzt effektiv und häufig toxisch, dementsprechend werden sie

ausschließlich im Labormaßstab eingesetzt. Des Weiteren wird der alkalische Schock mit Hydroxiden bzw. Hydrochloriten aufgrund seiner Effektivität sowohl im Labor- als auch im technischen Maßstab eingesetzt. Jedoch ist diese Methode nur für Substanzen geeignet, die gegenüber einem hohen pH-Wert resistent sind, wie z. B. DNA. Daher ist die Gewinnung von leicht hydrolysierbaren Substanzen wie Proteinen mit dieser Aufschlusstechnik nicht möglich (Cornelissen, WS23/24).

Insgesamt sind chemische Methoden häufig selektiv, dennoch hinsichtlich Kosten, Skalierbarkeit und des gewünschten Produktreinheitsgrades teilweise eingeschränkt. Die meisten chemischen Aufschlussmethoden zeigen eine höhere Effizienz in Kombination mit anderen Aufschlusstechniken (Cornelissen, WS23/24).

2.2.2.3 Biologische Aufschlussverfahren

Biologische Aufschlussverfahren basieren auf natürlichen Prozessen, die die Zellwandkomplexe gezielt destabilisieren. Ein Beispiel dafür ist die Autolyse. Als Grundlage fungiert die Produktion wirtseigener lytischer Enzyme, die fähig sind, die Zellwand abzubauen. Dieses Verfahren ist nicht eindeutig als ein enzymatischer Prozess einzustufen, da häufig eine Induktion durch eine chemische oder eine physikalische Behandlung nötig ist. Diese Methode findet ihre technische Anwendung seit Jahren in der Herstellung von Hefeextrakten, wobei der Zellabbau durch eine pH-Wert- und Temperaturänderung induziert wird. Diese Methode ist günstig und leicht skalierbar, jedoch oft auf einzelne Mikroorganismen beschränkt. Die Methode ist z. B. bei *E. coli* nur unter spezifischen Wachstumsbedingungen wirksam. Die Phagenlyse von Bakterien weist ebenfalls eine hohe Effizienz im Hinblick auf die Zellaufschlusseffizienz auf, allerdings wird diese Technik in der Industrie nicht eingesetzt. Grund dafür ist das hohe Risiko einer Kontamination mit Phagen in den Prozessanlagen, die zu einer unerwünschten Lyse führen könnte. Für den Zellaufschluss werden zudem aktiv fremde lytische Enzyme eingesetzt. Da die Enzyme substratspezifisch sind, muss die genaue Zusammensetzung der Zellwand bekannt sein. Je nach Komplexität der Zellwandstruktur werden unterschiedliche Enzym-Cocktails verwendet, wobei jedes Enzym einen konkreten Bestandteil der Zellwand angreift. Beispielsweise bauen bei Hefen die Proteasen die Mannoproteinschicht ab, während die Glucanasen auf das stabilisierende Glucangerüst einwirken. Während grampositive Bakterien allein mit Lysozym aufgeschlossen werden können, wird bei dem Aufschluss von gramnegativen Bakterien ein Zusatz wie ein Chelatbildner (z. B. EDTA) benötigt, um die äußere Membran zu beschädigen. Der Einsatz von

fremden lytischen Enzymen gilt als ein mildes Aufschlussverfahren und überzeugt aufgrund der hohen Selektivität und einfachen Abtrennung von groben Zellbruchstücken nach dem Aufschluss. Jedoch erfordert die Zugabe von Enzymen häufig eine aufwendige Reinigung des Zielproduktes, um die zugesetzten Enzyme zu entfernen, und ist im Vergleich zu Chemikalien mit höheren Kosten verbunden. Fremde lytische Enzyme finden vor allem bei der Gewinnung empfindlicher Produkte ihren Einsatz. In den technischen Prozessen stellt die enzymatische Lyse eine Konkurrenz zu den mechanischen Aufschlussverfahren, wird aber häufig in Kombination mit diesen als Vorbehandlung verwendet (Cornelissen, WS23/24).

2.2.3 Überblick über mechanische Zellaufschlussverfahren

Mechanische Aufschlussmethoden werden den intensiven Verfahren zugeordnet, da sie unspezifisch wirken und auf mechanischen Prinzipien basieren (s. Abb. 3, 4). Diese Kräfte zielen darauf ab, die wichtigsten strukturellen Bestandteile, die für die Stabilität der Zellwand verantwortlich sind, vollständig zu zerstören. Dazu zählen die Nassvermahlung, der Aufschluss mittels Hochdruck (Hochdruckhomogenisator, French Press), Prallstrahlen sowie Ultraschallaufschluss. Ein wesentlicher Vorteil aller mechanischen Verfahren ist, dass sie ohne chemische oder enzymatische Zusätze erfolgen. Dies vereinfacht die anschließende Aufreinigung erheblich und minimiert zusätzliche Kosten. Als Nachteil ist jedoch ein möglicher Anstieg der Viskosität und das nicht-Newtonsche Verhalten der Suspension zu beobachten. Zusätzlich sind mechanische Aufschlussverfahren mit einem hohen Energieeintrag und dem Verschleiß der Bauteile verbunden, was häufig zu hohen Betriebskosten führt (Cornelissen, WS23/24; Gomes et al., 2020).

2.2.3.1 Nassvermahlung

Da die aufzuschließenden Mikroorganismen meistens in Form einer Zellsuspension vorliegen, stellt die Nassvermahlung ein wichtiges Aufschlussprinzip dar. Das Verfahren basiert auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand durch Bewegung der Mahlkörper in einer Suspension. Dazu kommen Schwing- und Rührwerkskugelmøhlen. Die Verwendung von Schwingmøhlen beschränkt sich ausschließlich auf den Labormaßstab. Hierbei wird ein mit Glaskugeln und der Zellsuspension gefüllter Mahlbehälter in hochfrequente Schwingung gebracht, wobei intensive Bewegungen und Stöße zwischen den Glaskugeln und den Zellen zur Zerstörung der Zellwand der letzteren führen. Durch Wechselschwingungen prallen die Zellen gegeneinander, gegen Mahlkugeln und gegen die Wand des Mahlbehälters und werden dadurch zerrieben. Die Schlagwirkung hängt dabei von Schwingfrequenz und dem spezifischen Gewicht der

Glaskugeln. Im Gegensatz dazu hat sich der Einsatz von Rührwerkskugelmøhlen im technischen und industriellen Maßstab durchgesetzt. Bei einer Rührwerkskugelmøhle wird das Mahlgut über einen Einlass in den Mahlbehälter befördert und das innen montierte Rührwerk bringt die Mahlperlen und das Mahlgut in Bewegung. Da es während des Betriebes zu einem hohen Energieeintrag kommt, wird der Mahlbehälter mit einem Doppelmantel ergänzt, der als Kühlung fungiert. Die kinetische Energie wird durch schnelles Rotieren des Rührwerkes auf die Zellsuspension übertragen, und im Mahlbehälter entstehen mehrere Mahlkörperschichten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Zellen werden aufgeschlossen, indem sie durch Scherkräfte, intensive Schichtströmungen und Kollisionen zwischen den Mahlkugeln zerrissen werden (Cornelissen, WS23/24).

Die Nassvermahlung als Aufschlussmethode bietet eine hohe Effizienz, auch bei Mikroorganismen mit einer harten Zellwand wie grampositive Bakterien, wobei andere mechanische Aufschlussverfahren häufig scheitern. Außerdem erlaubt diese Methode eine einfache Skalierung und dank der unspezifischen Funktionsweise universell einsetzbar. Als zusätzlicher Vorteil wird es gesehen, dass die nach dem Aufschluss verbleibenden Zellbruchstücke groß genug sind, um in den nachfolgenden Schritten unkompliziert abgetrennt zu werden. Nachteilig bei der Nassvermahlung ist allerdings der hohe Energiebedarf. Dementsprechend ist eine intensive Kühlung während des Zellaufschlusses zwingend erforderlich, um eine thermische Denaturierung vom Produkt zu verhindern. Zudem führen die Energie- und Anlagekosten (inklusive Verschleißteile und Wartung) sowie die anschließende Abtrennung der Mahlkörpern mit kleinem Durchmesser zu hohen Betriebskosten. Außerdem ist eine Inaktivierung der Proteine durch mechanische Beanspruchung nicht ausgeschlossen (Cornelissen, WS23/24).

2.2.3.2 Aufschluss durch Ultraschall

Der Aufschluss mit Ultraschall zählt ebenfalls zu den mechanischen Aufschlussverfahren und wird häufig im Labormaßstab eingesetzt. Ultraschall-Desintegratoren bestehen aus einem Hochfrequenz-Generator, einem Konverter und einer Sonotrode, die mechanische Schwingungen in die Flüssigkeit überträgt. Das grundlegende Prinzip ist die Kavitation. Durch die Schwingungen des Ultraschalls entstehen in der Flüssigkeit kleine Gasbläschen, die anschließend schlagartig implodieren. Dies löst starke Scherkräfte und lokale Druckunterschiede aus, wodurch die nebenliegenden Zellen durch die Implosion zerrissen werden. Diese Methode ist mit einem minimalen apparativen Aufwand sowie hoher Effektivität

und Flexibilität verbunden, daher hat sie sich im Labormaßstab gut etabliert. Jedoch können während des Aufschlusses Wärme und reaktive Radikale entstehen, die empfindliche Moleküle schädigen können. Je nach Beanspruchung kann es zudem zum Abrieb der Sonotrode kommen. Da es für eine Effektivität dieses Verfahrens zahlreiche probenspezifische Parameter wie Temperatur, Druck, Probenkonzentration, Einwirkungszeit berücksichtigt werden müssen, ist die industrielle Anwendung anspruchsvoller. Dennoch kann Ultraschall durch den Einsatz kontinuierlich betriebener Durchflusszellen auch im industriellen Maßstab angewendet werden (Cornelissen, WS23/24).

2.2.3.3 Aufschluss mittels Hochdruckverfahren

Zu den mechanischen Aufschlussverfahren mittels Hochdruckverfahren zählen der Zellaufschluss mit der French Press (FP) und mit dem Hochdruckhomogenisator (HDH). Beide Geräte dienen dem Aufschluss nicht-filamentöser Mikroorganismen. Das grundlegende Prinzip beider Geräte ist identisch: Die Probe wird in einen Probenbehälter gefüllt, unter Hochdruck (bis zu 1000 bar und höher) verdichtet und durch einen engen, verstellbaren Spalt gepresst. Beim Austritt entstehen hohe Scherkräfte sowie spontane Druckentspannungen auf Umgebungsdruck, die die Zellwand mechanisch zerstören (Chmiel et al., n.d.; Cornelissen, WS23/24).

Dennoch gibt es Unterschiede im Hinblick auf den Aufbau und die Anwendung. Die French Press besteht aus einer Mess- und einer Presszelle und ist nur für kleine Suspensionsvolumina ausgelegt. Daher wird die FP im Labormaßstab verwendet. Der Druckaufbau erfolgt hydraulisch, und die Einstellung des Spaltes wird manuell nachjustiert. Die Suspension fließt anschließend über einen Auslassschlauch ab. Im Gegensatz zur FP ist mit dem HDH eine kontinuierliche Arbeitsweise möglich, daher findet der HDH seine Anwendung auch in der Industrie. Da das Gerät neben einer Homogenisiereinheit zusätzlich über eine Hochdruck-Kolbenpumpe verfügt. In der Hochdruck-Kolbenpumpe wird die Suspension auf bis zu 1000 bar und höher verdichtet. Sobald der Einstelldruck erreicht ist, öffnet sich das Homogenisierventil und erzeugt, je nach Bauart und Betriebsbedingungen, typischerweise einen Spalt im Mikrometerbereich (10-20 µm). Die Suspension fließt mit einer hohen Geschwindigkeit hindurch und prallt auf einen Prallring. Dabei wird sie auf Atmosphärendruck entspannt, was die Zellen mechanisch zerstört. Viele Modelle können zusätzlich mit einem Wärmetauscher ergänzt werden, um einen kritischen Temperaturanstieg zu verhindern. Da der HDH nicht nur zum Zellaufschluss von Mikroorganismen verwendet wird, unterscheidet sich

der genaue Aufbau je nach der jeweiligen Anwendung. Das Funktionsprinzip und der Aufbau des HDH sind im 2.2.5.1 ausführlicher beschrieben (Cornelissen, WS23/24; Gomes et al., 2020).

Neben dem Zellaufschluss wird die Hochdruckhomogenisation zusätzlich in der Bio- und Lebensmittelverfahrenstechnik eingesetzt. Außer der Extraktion von Proteinen und bioaktiven Verbindungen, wie beispielsweise Polyphenolen, dient dieses Verfahren der Steuerung technologischer Funktionseigenschaften. Dazu zählen die Stabilisierung von Emulsionen, die Modifikation der Viskosität sowie die Verbesserung der Löslichkeit von Inhaltsstoffen. Darüber hinaus ist die Hochdruckhomogenisation als „Green Technology“ bekannt und wird zur nicht-thermischen Konservierung eingesetzt. Hierbei wurden Mikroorganismen und Enzyme durch mechanische Belastung inaktiviert, während sensible Inhaltsstoffe geschont bleiben. In den letzten Jahren hat sich der Einsatz von HDH auch auf die Steigerung von Bioverfügbarkeit von Nährstoffen sowie auf die Aufwertung von Nebenprodukten in der Lebensmittelindustrie (Food Waste) ausgeweitet (Mesa et al., 2020).

Neben den klassischen Homogenisatoren nutzen solche Geräte wie der Microfluidizer und der Homogenisator von Constant Systems den Hochdruck als Antriebskraft für den Zellaufschluss. Diese Geräte basieren auf dem Prallstrahl-Prinzip: Die Zellsuspension wird unter Hochdruck von bis zu 2000 bar durch Kapillaren geleitet und entweder gegen eine Oberfläche oder gegen einen entgegengesetzten Flüssigkeitsstrahl gelenkt, wobei die Zellwände durch Scherkräfte mechanisch zerstört werden. Vergleichbar zum HDH ist bei diesen Verfahren ebenfalls eine Kühlung erforderlich, da der hohe Energieeintrag zur thermischen Denaturierung führen kann (Cornelissen, WS23/24).

Der Zellaufschluss mit Hochdruck, insbesondere mittels HDH, zeichnet sich durch eine hohe Aufschlusseffizienz aus, da Zellen mit starren Zellwänden wie *S. cerevisiae* oder *E. coli* bereits bei 500 bar aufbrechen. Dieses Verfahren liefert auch bei schwankenden Konzentrationen der Zellsuspension nahezu stabile Geschwindigkeitskonstanten und lässt sich gut skalieren. Die Verwendung eines HDH ist industriell etabliert und bietet hohe Flussraten an, wodurch sich dieses Verfahren gut für die Produktion eignet. Dennoch ist ein Aufschluss mit Hochdruck energiebedürftig und somit auf eine intensive Wärmeabfuhr angewiesen, um die Produktqualität zu schonen. Bei einigen Mikroorganismen sind mehrere Passagen notwendig, um einen nahezu vollständigen Aufschlussgrad zu erzielen. Hohe mechanische Beanspruchung (vor allem im hohen Druckbereich ab 1000 bar) kann zur Denaturierung des Zielproduktes

führen und das Homogenisierventil für Abnutzung besonders anfällig machen. Die Energie- und Anlagenkosten sowie Verschleißteile wie Keramikventile tragen zum ökonomischen Aspekt bei. Dabei ist zu beachten, dass der Zellaufschluss mittels Hochdruck nur für nicht-filamentöse Mikroorganismen geeignet ist und unspezifisch erfolgt, wobei Letzteres sowohl von Vorteil als auch von Nachteil sein kann (Chmiel et al., n.d.; Cornelissen, WS23/24).

2.2.4 French Press

2.2.4.1 Funktionsprinzip der French Press

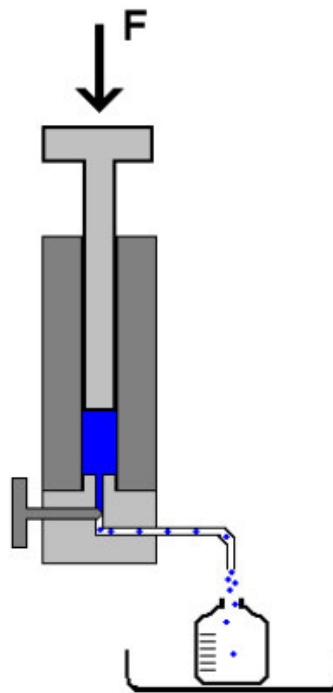


Abb. 5. Schematische Darstellung von der French Press. Der Zellaufschluss erfolgt durch das Pressen der Zellsuspension mittels eines Kolbens durch eine enge, über ein Ventil verstellbare Öffnung unter Drücken von bis zu 2800 bar. Die aufgeschlossene Probe wird über einen Schlauch entnommen. Quelle: ARV Praktikumsskript WS25/26.

Die French Press ermöglicht einen mechanischen Zellaufschluss mittels hohen Drucks. Das System besteht aus zwei Einheiten – einer Messzelle (Druckkammer) und einer hydraulischen Presse (s. Abb. 5). Die Messzelle wird vor jedem Aufschluss aus mehreren Edelstahl-Bauteilen zusammengebaut. Dabei wird zunächst ein Kolben in den Metallzylinder eingeführt. Nach dem Wenden des Zylinders wird Probesuspension eingefüllt. Der Verschlussblock, in den zuvor das Ventil und der Auslassschlauch eingeschraubt wurden, wird anschließend auf den Zylinder aufgesetzt. Diese Apparatur muss wieder um 180° gedreht und anschließend in der Presse fixiert werden. Nach dem Aufbau wird das Ventil kurz geöffnet, um die verbleibende Luft aus der

Messzelle zu entlassen. Mit den Ventilen auf der Press-Einheit werden die entsprechenden Druckstufen eingestellt. Die Suspension wird dadurch hohem Druck ausgesetzt und durch den engen Ventilsplatt gepresst. Dabei zerstören die auftretenden Scherkräfte und der plötzliche Druckabfall die Zellwände. Die Probe kann anschließend über den Probeschlauch gesammelt werden (Cornelissen, WS23/24; Gomes et al., 2020).

2.2.4.2 Einflussparameter bei der French Press

Im Laufe des Versuches sind verschiedene Einflussparameter zu beachten, da sie einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse haben. Im Folgenden werden die kritischen Punkte beschrieben, die während des Versuchs besonders zu beachten sind.

- Konzentration der Hefesuspension:

Die Konzentration der Zellsuspension bestimmt den Viskositätsgrad der Lösung und hat dementsprechend einen direkten Einfluss auf die Aufschlusseffizienz.

- Druck

Der in der French Press aufgebaute Druck spielt eine zentrale Rolle im Versuch. Es wird angenommen, dass bei unterschiedlichen Druckstufen abweichende Zellaufschlussgrade erzielt werden. Es ist darauf zu achten, dass die Druckwerte möglichst exakt eingestellt werden.

- Position des Probenventiles

Laut Versuchsanleitung wird bei dem ersten Arbeitsdruck von 50 bar ein Auslassvolumenstrom von ca. 60 Tropfen pro Minute durch manuelles Justieren am Probenventil eingestellt. Die eingestellte Position des Ventiles ist bei jeder Probenahme beizubehalten, denn eine Änderung der Ventilstellung die Ventilgeometrie verändert und somit einen weiteren Einflussparameter in das System einbringt.

- Totvolumen bei der Probenahme

Nach jeweiliger Probenahme verblieb eine Menge der Probe im Probenschlauch. Dementsprechend wurde bei jeder erneuten Probenahme zunächst ca. 1,2 mL Totvolumen der vorherigen Probe abgelassen und verworfen. Erst danach wurde die nächste Probe gesammelt.

2.2.4.3 Vor- und Nachteile der French Press

Die French Press ist ein robustes Laborgerät mit moderatem Bedienungsaufwand, bei dem Drücke bis zu 2800 bar eingestellt werden können. Sie erlaubt einen effektiven Zellaufschluss, wobei die biologische Aktivität der Zellinhalte in dem meisten Fällen erhalten bleibt. Jedoch stößt diese Aufschlussmethode in der Praxis an ihre Grenzen. Der Innenraum der French Press ist auf das Volumen von 35 mL beschränkt und erlaubt damit nur Durchläufe mit kleinen Volumina. Zwischen den Probennahmen muss das Totvolumen des Schlauches von 1,2 mL manuell abgelassen werden, um die weiteren Proben nicht zu verschmutzen. Durch hohe Druckunterschiede erwärmt sich die Zellsuspension während des Prozesses. Da das Gerät über keine Kühlung verfügt, kann dies für temperaturlabile Produkte kritisch sein. Ein kontinuierlicher Betrieb ist nicht möglich, da die Messzelle für jede Befüllung manuell ausgebaut werden muss, was eine Skalierbarkeit ausschließt. Die Probenahme stellt eine Herausforderung dar, da die Position des Probeventiles bei jeder Probenahme exakt gleich eingestellt werden muss. Da dies ausschließlich durch manuelles Nachjustieren erfolgt, kann der Prozess im Hinblick auf die Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit negativ beeinflusst werden.

2.2.5 Hochdruckhomogenisator

2.2.5.1 Funktionsprinzip des Hochdruckhomogenisators

Ein Hochdruckhomogenisator (HDH) besteht aus einer Hochdruck-Kolbenpumpe und einer Homogenisiereinheit, die zwei Homogenisierstufen umfasst (s. Abb. 6). Die Zellsuspension wird zuerst in einen Einlauftrichter (max. Volumen 400 mL) eingefüllt und mittels einer Kolbenpumpe zu der ersten Homogenisierstufe befördert.

Die erste Homogenisierstufe sorgt für das Homogenisieren der Suspension, wobei die Zellen aufgeschlossen werden, indem sie mittels Kolbenpumpe unter Betriebsdruck von bis zu 2000 bar durch einen kleinen einstellbaren Spalt gedrückt werden. Aus dieser Öffnung treten sie mit hoher Geschwindigkeit heraus. Dabei entstehen hohe Scherkräfte, Druckdifferenzen und Turbulenzen, die zum Aufbruch der Zellwände führen (s. Abb. 7, 8). Nach dem Spalt treffen die Zellen auf den Prallring und werden abrupt abgebremst. Dabei entstehen zusätzliche Scherkräfte und Strömungen, die zum weiteren Aufschluss restlicher intakter Zellen beitragen (Cornelissen, WS23/24; Middelberg, 2000).

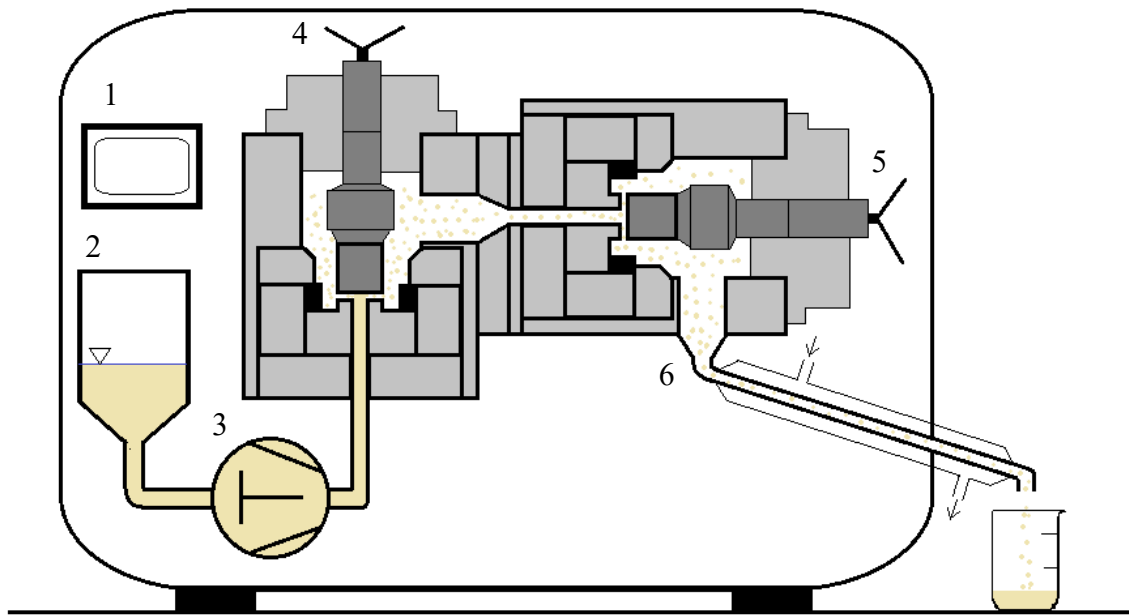


Abb. 6. Die schematische Darstellung des HDH. 1) Digitales Display zur Bedienung des Gerätes. 2) Einlauftrichter für die zu untersuchende Suspension. 3) Kolbenpumpe. 4) Erste Homogenisierstufe mit Betriebsdruckstufen bis zu 2000 bar. 5) Zweite Homogenisierstufe mit Betriebsdruckstufen bis zu 150 bar. 6) Auslass mit einem Wärmetauscher optional erweitert werden kann. Hier ist ein Wärmetauscher mit Kühlwasserzu- und -ablauf abgebildet. Quelle: Eigene Darstellung

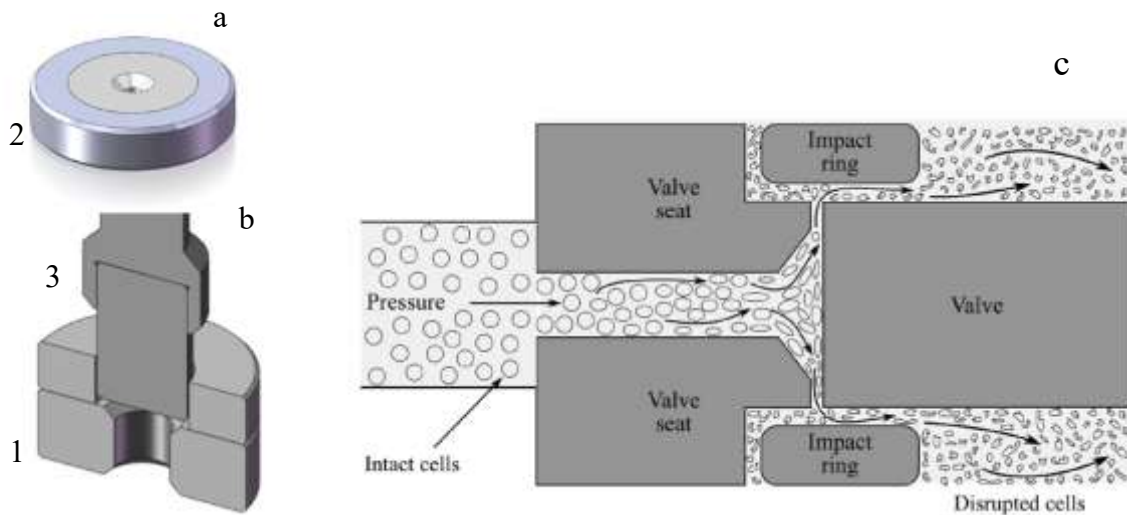


Abb. 7. Schematische Darstellung der Bauteile der Homogenisiereinheit. a) Hier ist der Homogenisierventilsitz mit einer zentralen Öffnung dargestellt, durch die die zu untersuchende Suspension unter hohem Druck strömt. b) Hier sind der Homogenisierventilsitz (1), der Prallring (2) und der Ventilkörper (3) abgebildet. c) Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines HDH. Quelle: a/b) Dennis Glinke, GEA Niro Soavi, persönliche Mitteilung, April 2026; c) Gomes et al, 2020.

HD-Homogenisatoren in der Praxis

Der Effekt von 2-stufigem Homogenisieren

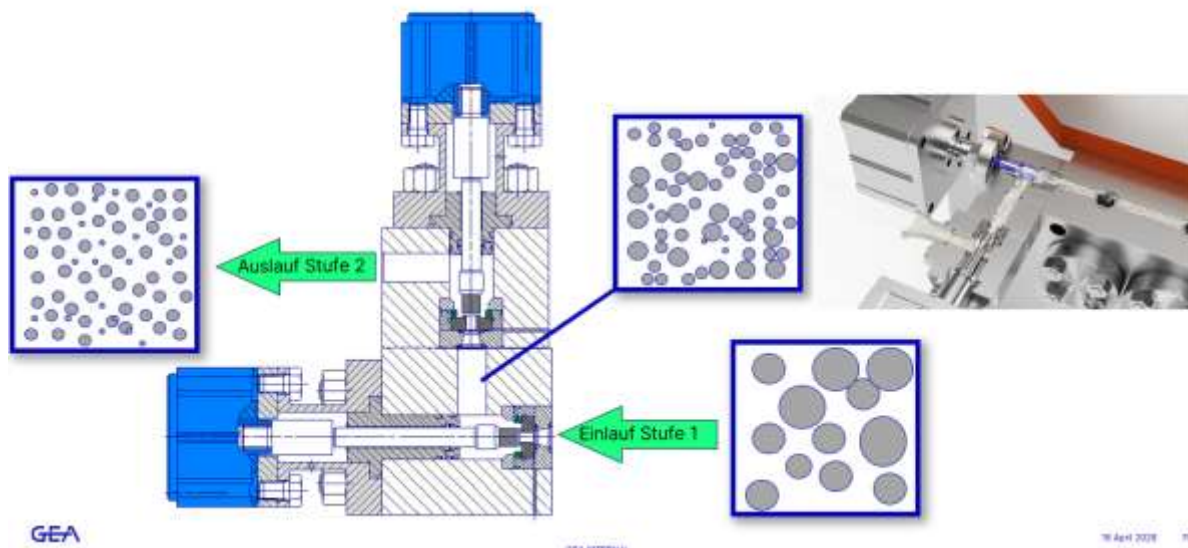


Abb. 8. Schnittdarstellung der zwei Homogenisierstufen. Die erste Homogenisierstufe dient der Zerkleinerung der Partikel, während die zweite die Re-Agglomeration der Partikel verhindert und zur Stabilisierung der Dispersion beiträgt. Die Verwendung der zweiten Homogenisierstufe ist optional. Quelle: Dennis Glinke, GEA Niro Soavi, persönliche Mitteilung, April 2026.

Da die Hochdruckhomogenisation nicht nur für den Zellaufschluss eingesetzt wird, existieren unterschiedliche Ausführungen des Systems, wie z. B. die Integration einer zweiten Druckstufe. Die zweite Homogenisierstufe lässt sich auf einen Maximaldruck von 150 bar einstellen und dient primär zur Partikelzerkleinerung, indem sie einer Re-Agglomeration des Produktes entgegenwirkt. Für den Zellaufschluss der Backhefe ist jedoch die Verwendung der ersten Homogenisierstufe ausreichend. Daher bleibt die zweite Homogenisierstufe im Rahmen der durchgeführten Versuche vollständig entspannt (Dennis Glinke, GEA Niro Soavi, persönliche Mitteilung, 2026).

2.2.5.2 Einflussparameter bei einem Hochdruckhomogenisator

- Konzentration der Zellsuspension:

Die Konzentration der Zellsuspension beeinflusst ihre Viskosität und dadurch ebenfalls die herrschenden Kräfte im Laufe des Zellaufschlusses.

- Homogenisierdruck:

Der eingestellte Druck hat einen direkten Einfluss auf die Aufschlusseffizienz. Der Arbeitsdruck für Aufbrechen der Zellwand von Mikroorganismen beginnt ab 500 bar. Die Drücke unter 500 bar reichen für den Zellaufschluss von Mikroorganismen nicht aus.

- Design des Homogenisierventiles:

Die Auswahl bzw. Bauart des Homogenisierventiles steht im direkten Zusammenhang mit der Aufschlussgrad. Das Homogenisierventil bestimmt die Strömungsverhältnisse und wirkt somit auf die Scherkräfte, Kavitation und Turbulenzen. Dies hat einen starken Einfluss auf den Zellaufschluss.

- Temperatur der Zellsuspension:

Mit steigender Temperatur sinkt die Viskosität der Zellsuspension. Eine niedrigere Viskosität ist erwünscht und führt zu einem besseren Fließverhalten und höheren Turbulenzen.

- Anzahl der Durchgänge:

Durch mehrfache Passagen einer Probe kann ein höherer Zellaufschlussgrad erzielt werden. Bei einigen Modellorganismen ist aufgrund ihrer Morphologie ein wiederholter Zellaufschluss sinnvoll.

2.2.5.3 Vor- und Nachteile des Hochdruckhomogenisators

Der HDH bietet durch das digitale Display einen besseren Überblick über die gemessenen Druckstufen. Der Homogenisierbereich des HDHs wird gekühlt, wodurch das Produkt geschont wird. Mit dem HDH ist ein kontinuierlicher Betrieb möglich und der Prozess ist auch für größere Volumina gut skalierbar. Jedoch ist auch in dem Fall mit gewissen Nachteilen zu rechnen. Für bestimmte Mikroorganismen sind mehrere Durchgänge nötig, um einen höheren Aufschlussgrad zu erreichen. Außerdem ist bei steigendem Druck mit mechanischem Verschleiß des Homogenisierventiles zu rechnen.

2.2.6 Vergleich French Press vs. Hochdruckhomogenisator

Der HDH sorgt im Vergleich zur FP für einen reproduzierbareren und kontrollierbareren Zellaufschluss, da er ein größeres Suspensionsvolumen erlaubt und eine präzise Überwachung der Druckwerte bietet. Beim HDH ist ein Einfüllen der Zellsuspension im laufenden Prozess möglich, ohne den Prozess zu unterbrechen. Außerdem verfügt der HDH über einen Kühlmantel um den Homogenisierbereich, sodass temperatursensitive Produkte nur minimalen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

2.3 Analytik

Die Analytik dient dazu, den Zellaufschluss zu bewerten. Im Folgenden wird der theoretische Hintergrund der während der Versuche verwendeten analytischen Methoden erläutert.

2.3.1 Trübungsmessung

Durch Turbidimetrie (Trübungsmessung) ist eine optische Methode zur Bestimmung des Trübungsgrades in Suspensionen. Dabei wird die Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchtritt durch die Probe gemessen, die bei Zellsuspensionen durch Lichtabsorption und Lichtstreuung verursacht wird (Kurzweil & Kurzweil, 2023, s. 167). Die Intensitätsabnahme mit zunehmender Zellkonzentration korreliert, kann der OD_{600} -Wert als Näherungswert für die Konzentration von Mikroorganismen in einer Suspension verwenden. Diese Messmethode hat sich im Laufe der Jahre etabliert und wird im biologischen Bereich zur Bestimmung von Wachstum bzw. Zellzahl mikrobieller Kulturen eingesetzt. Dafür standardisierte sich die Messung bei Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) an einem Photometer. Um sicherzustellen, dass die frische Hefe nach dem Vermischen mit dem Aufschlusspuffer nahezu gleiche Konzentration aufwies, wurde nach dem Ansatz von Hefesuspension die OD_{600} -Messung durchgeführt.

2.3.2 Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assay

Für die Bestimmung von Enzymaktivität in den Proben wurde das Assay für Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. Dieses Enzymassay basiert auf der ersten Reaktion des Pentosephosphatwegs (PPP). Der PPP ist ein Stoffwechselweg der Glucose, der parallel zur Glykolyse abläuft. Es unterteilt sich in zwei Phasen, die enzymatisch ablaufen: eine oxidative und eine nicht-oxidative Phase. Die oxidative Phase ist irreversibel und wandelt Glukose-6-Phosphat in Ribulose-5-Phosphat um, wobei zwei Moleküle NADPH entstehen.

Die erste Reaktion der oxidativen Phase ist durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) katalysiert und oxidiert Glucose-6-Phosphat in 6-Phosphoglucono- δ -lacton, wobei $NADP^+$ zu NADPH reduziert wird. Danach wird durch die 6-Phosphogluconolactonase (6PGL) das Lacton zu Gluconat-6-Phosphat hydrolysiert. Anschließend katalysiert die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGD) eine Oxidation 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat unter Bildung von NADPH und CO_2 . Diese Phase liefert Ribulose-5-Phosphat für Nukleotidsynthese und NADPH als Reduktionsmittel für zahlreiche biosynthetische Reduktionsreaktionen.

Die reversible nicht-oxidative Phase stellt die Verbindung zur Glykolyse dar, indem die Kohlenstoffeinheiten zwischen Ribose-5-Phosphat und Intermediaten der Glykolyse Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat umgelagert werden. Diese Phase des PPPS wird durch die Enzyme katalysiert wie Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (RPE), Ribose-5-Phosphat-

Isomerase (RPI), Transaldolase (TALDO) und Transketolase (TK) katalysiert (TeSlaa et al., 2023).

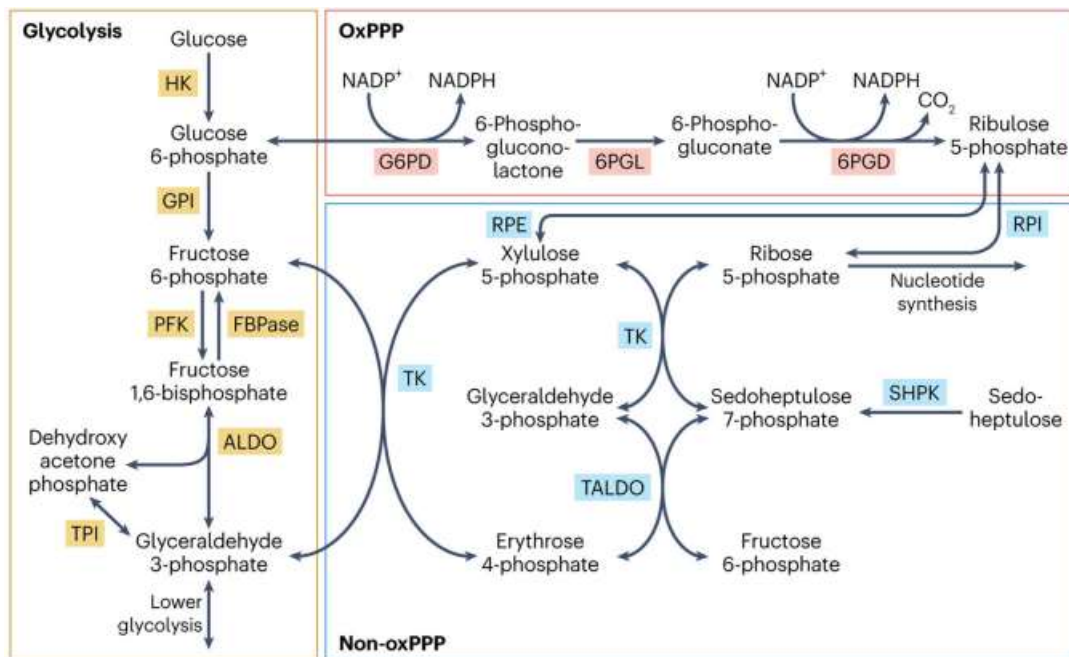


Abb. 9. Der Pentosephosphatweg (PPP) (unterteilt in zwei Phasen) und seine Verknüpfung zur Glykolyse. Die erste oxidative Phase (OxPPP) liefert NADPH für weitere Reduktionsreaktionen und Ribulose-5-Phosphat für die Nukleotidsynthese, wobei eine Umlagerung von Kohlenstoffatomen zwischen Ribulose-5-Phosphat und Glykolyse-Intermediaten, Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, während der nicht-oxidativen Phase (Non-oxPPP) stattfindet. Die Reaktionen laufen enzymatisch ab.

2.3.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Biuret

Die Zugabe des Salzes mit Kupfer(II)-Ionen zu einer alkalischen Lösung eines Proteins erzeugt eine rötlich-violette Verfärbung der Lösung. Diese Reaktion ist als Biuret-Reaktion bekannt und wird weltweit aufgrund ihrer Präzision und klaren theoretischen Hintergrund eingesetzt. Während dieser Reaktionen werden Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert und die Ionen bilden mit Proteinen und Peptiden einen charakteristischen rötlich-violetten Komplex. Die Farbintensität ist proportional zur Proteinkonzentration in der Probe und kann photometrisch bei 492 nm bestimmt werden („Roti Quant Biuret,” n.d.).

Heutzutage werden fertige Reagenzien für die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Biuret verwendet. Sie weisen Toleranz gegenüber viele Störfaktoren auf („Roti Quant Biuret,” n.d.).

Die Ausbildung der rötlich-violetten Farbe ist nicht proteinspezifisch, sondern nur für Proteine und Peptide mit ausreichender Anzahl an Peptidbindungen anwendbar. Diese Reaktion beruht auf der Bindung eines Kupfer(II)-Ions an vier Stickstoffatome, die im alkalischen Milieu

deprotoniert vorliegen. Die Anordnung hat eine nahezu quadratisch-planare Struktur (Lubran, n.d.). Die charakteristische Farbe entsteht, nur wenn das Peptid aus mindestens drei Aminosäuren besteht. Das Kupferatom bindet sich in der Regel an die Stickstoffatome des Peptides, die die Peptidbindungen zwischen Aminosäuren bilden. Alternativ kann das Kupferatom sich zum Beispiel mit dem Stickstoff der terminalen NH_2 -Gruppe, der Amidgruppe oder des Imidazolringes der Peptidkette verbinden (s. Abb. 10).

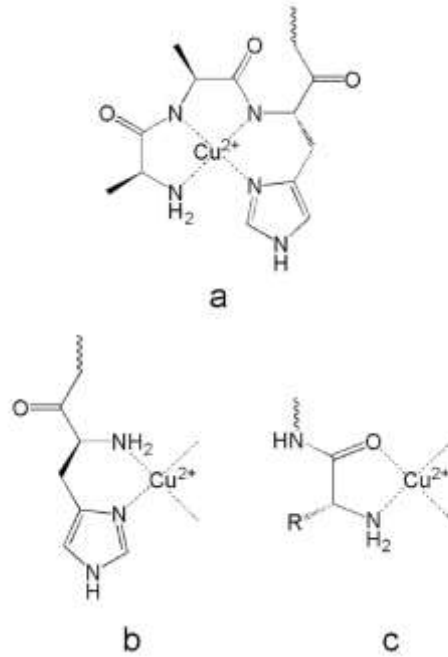


Abb. 10. Bindungsstellen eines Kupfer(II)-Ionen im Hinblick auf die Biuret-Reaktion. a) Kupferatom an der terminalen NH_2 -Gruppe einer Peptidbindung. b) Kupferatom an dem Imidazolring einer Peptidbindung. c) Kupferatom an der Amidgruppe einer Peptidbindung.

Die Intensität der rötlich-violetten Farbe ist proportional zu der in der Lösung vorliegenden Proteinkonzentration und nimmt mit steigender Alkalität der Lösung zu. Es stehen mehr Bindungsstellen bzw. deprotonierte Stickstoffatome zur Verfügung. Im sauren Milieu bindet sich das Kupferatom an Sauerstoffatome von Carboxylgruppen. Durch diese Bindung entsteht kein rötlich-violetter Komplex (Lubran, n.d.; „Roti Quant Biuret,” n.d.) .

2.3.4 Grundlagen der Photometrie

Das Lambert-Beer-Gesetz bildet eine theoretische Grundlage der Spektralphotometrie, da über die Messung der Extinktion Rückschlüsse auf die Konzentration einer unbekannten Probe gezogen werden können. Dieses Gesetz basiert auf den physikalischen Prinzipien der Lichtabsorption und dient somit zur quantitativen Bestimmung lichtabsorbierender Substanzen (Kurzweil & Kurzweil, 2023, s. 152). Dieses Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen

der Abschwächung von Licht beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz und deren Konzentration in der Lösung. Wenn ein monochromatischer Lichtstrahl einer bestimmten Länge auf eine Probe tritt, wird ein Teil der Strahlung von den in der Lösung enthaltenen Molekülen absorbiert, während der restliche Anteil die Probe durchdringt. Die Stärke dieser Lichtabsorption hängt dabei sowohl von der Konzentration der absorbierenden Teilchen als auch von der Weglänge, also der Schichtdicke der Küvette, ab. Mit steigender Konzentration oder zunehmender Weglänge des Lichtstrahles durch die Lösung nimmt die Absorption proportional zu (Kurzweil & Kurzweil, 2023, s.152). Der mathematische Zusammenhang wird durch die folgende Formel [1] beschrieben:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [1]$$

A : Extinktion

ε : molarer Extinktionskoeffizient L/(mol·cm)

c : Stoffmengenkonzentration in mol/L

d : Schichtdicke der Küvette in cm

Der Extinktionskoeffizient ε ist dabei eine substanz- und wellenlängenspezifische Konstante, die angibt, wie stark ein Stoff Licht absorbiert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

In allen Versuchen wurde frische Backhefe (*S. cerevisiae*) der Marke „UNIFERM“ (ein Würfel à 42 g) verwendet. Die Hefe wurde nach dem Kauf im Kühlschrank bei 7 °C gelagert und innerhalb von drei Tagen verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Hefesuspension

3.2.1.1 Ansatz des Puffers

50 mM Phosphatpuffer mit Volumen von 1600 mL wurde angesetzt und mittels Titration mit 0,1 M Natronlauge auf pH-Wert von 7,6 eingestellt.

3.2.1.2. Ansatz der Hefesuspension

Für die Herstellung der Hefesuspension wurden 320 g frische Hefe in 1600 mL Phosphatpuffer suspendiert. Zur Aktivierung der Hefe wurden 64 g Glycerin zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert.

3.2.1.3 Messung der Konzentration von Hefesuspension (OD)

Für die Messung der optischen Dichte wurden aus der intakten Hefesuspension zwei Verdünnungsreihen erstellt und gemessen. Für jede Verdünnungsreihe wurde die Hefesuspension seriell im Verhältnissen 1:5, 1:25, 1:50, 1:100 und 1:200 mit Wasser verdünnt. Die OD-Messung wurde bei 600 nm photometrisch bestimmt.

3.2.2 Analytische Methoden zur Beurteilung des Zellaufschlusses

Die Analytik wurde im Anschluss an den Zellaufschluss durchgeführt, um die Effizienz des Aufschlusses zu ermitteln. Die Enzymaktivität wurde mittels Enzymassay bestimmt, um die Funktionalität des Proteins zu bewerten. Zusätzlich wurde die Gesamtproteinmenge gemessen, um den Aufschlussgrad zu bestimmen.

3.2.2.1 Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assay

Die Aktivität der G6PDH wurde photometrisch über die Bildung von NADPH bestimmt. Dabei wird NADP^+ im Laufe der enzymatischen Reaktion zur NADPH reduziert, dessen Absorption bei 340 nm verfolgt wird. Die Messung von der Enzymaktivität von G6PDH wurde gemäß der Anleitung aus dem ARV Praktikumsskript durchgeführt.

Es wurde ein Halbmikro-Assay mit einem Gesamtvolumen von 1 mL verwendet. Das Reaktionsgemisch bestand aus vier Lösungen, die in der Küvette zusammengeführt wurden: 833 μL 0,1 M Triethanolaminpuffer (pH 7,6, eingestellt durch Titration mit 1 M NaOH), 67 μL 0,1 M Magnesiumchlorid, 33 μL Glukose-6-Phosphat-Dinatriumsalz-Dihydrat (10 mg mL^{-1}), 33 μL NADP-Dinatriumsalz (mg mL^{-1}). Die Reaktion wird mit der Zugabe 34 μL Probe (Überstand nach Zentrifugation) gestartet. Für die Referenzlösung wurde statt der Probe 34 μL Wasser zugegeben.

Die Messung wurde nach einer Vorlaufzeit von 60 Sekunden begonnen. Die Messung erfolgte über einem Zeitraum von 90 Sekunden mit einem Messintervall von 20 Sekunden. Für die Messung wurde das Parallelmodus des Photometers verwendet. Jede Probe wurde in Triplikat gemessen, wobei die drei Messungen parallel im Photometer durchgeführt wurden.

Die Berechnung der Enzymaktivität (A) basierte auf dem Lambert-Beersche Gesetz (s. [1], [2]). Da die Enzymaktivität über die Zeit gemessen wird, wurde das Lambert-Beersche Gesetz nach der Konzentration umgestellt und als zeitlich Änderung der Extinktion ($\frac{\Delta E}{\Delta t}$) betrachtet (s. [2]).

Für die Berechnung wurde der Faktor $F=23,175 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Bergmeyer verwendet und in die Formel [2] eingesetzt (s. [3]). Dieser Faktor fasst konstante Parameter des Enzymassays wie das Gesamtvolumen (V_{Test}), das Probenvolumen (V_{Probe}), die Schichtdicke (d) und den molaren Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), um eine vergleichbare und präzise Auswertung zu gewährleisten (Anspach and Cornelissen, WS25/26).

$$A = \frac{V_{\text{Test}}}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{V_{\text{Probe}}} \quad [2]$$

$$A = F \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad [3]$$

3.2.2.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Biuret

Für den Nachweis der Proteine in den Proben nach dem Zellaufschluss wurde das Roti-Quant universal Kit verwendet. Der Ansatz der Arbeitslösungen und die Verdünnungen der Proben erfolgten laut der Gebrauchsanweisung von Roti-Quant universal Kit.

Als Standardprotein wurde BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion V) verwendet. Vor der Messung wurde aus der BSA-Stocklösung (2 mg mL^{-1}) eine Standardverdünnungsreihe erstellt (s. Tab 1). Die Proben wurden seriell im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200 verdünnt. Für den Ansatz der Standardlösungen und Verdünnungen der Proben wurde der Aufschlusspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,6 eingestellt durch Titration mit 1 M NaOH) eingesetzt.

Die Proteinbestimmung erfolgte im Mikroansatz. Für die Messung wurden das Roti-Quant universal Kit und Mikrotiterplatten verwendet. Die Arbeitslösung wurde aus Reagenz 2 und Reagenz 1 im Verhältnis 1:16 angesetzt. 50 μL Standardlösungen wurden als Duplikate, 50 μL Aufschlusspuffer als Leerwert im Quadrupel und 50 μL jede Probe als Triplikate in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Verhältnis Probe:Arbeitslösung betrug 1:2. 100 μL der Arbeitslösung wurden in jedes Well zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie abgedeckt und für 15 Minuten bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur abgekühlt und innerhalb von 15 Minuten mit einem Photometer gemessen. Vor der Messung wurde die Mikrotiterplatte für 60 Sekunden bei 420 rpm geschüttelt.

Tab. 1. Pipettiertabelle der Standardlösungen (A-K) für die Proteinbestimmung nach Biuret. Für die Standards wurde eine BSA-Stocklösung (2 mg/mL) verwendet und der 50 mM-Phosphatpuffer (auch als Leerwert verwendet). In der Tabelle wird die gesamte serielle Verdünnungsreihe dargestellt.

Lösung	Endkonzentration BSA in µg/mL	Verdünnungspuffervolumen in mL	Volumen von BSA- Stocklösung in mL	Herkunft der BSA- Lösung
A	2000	0	400	BSA-Stocklösung
B	1500	125	375	BSA-Stocklösung
C	1000	325	325	BSA-Stocklösung
D	750	325	325	B
E	500	325	325	C
F	250	325	325	E
G	125	325	325	F
H	50	450	300	G
I	25	400	100	G
K	5	400	100	I
LW	0	400	0	Verdünnungspuffer

Für die Berechnung der Proteinkonzentration diente das Lambert-Beer-Gesetz als Grundlage (s. [1]). Zur Quantifizierung wurden Standardlösungen bekannter Konzentrationen verwendet. Durch das Auftragen der gemessenen Extinktionswerte der Standardlösungen gegen die entsprechenden Konzentrationen wurde eine Standardkurve (Kalibrierkurve) erstellt. Dabei wurden alle Messwerte um den Leerwert korrigiert. Für jede verwendete Mikrotiterplatte wurde eine eigenständige Standardkurve erstellt. Mit dieser Standardkurve wurde ein linearer Bereich mit einem Bestimmtheitsmaß von $\geq 0,99$ ermittelt. Die Extinktionswerte der Proben wurden ausschließlich in diesem Bereich berücksichtigt. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe der Geradengleichung der Standardkurve bestimmt und unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors auf die Ausgangskonzentration hochgerechnet.

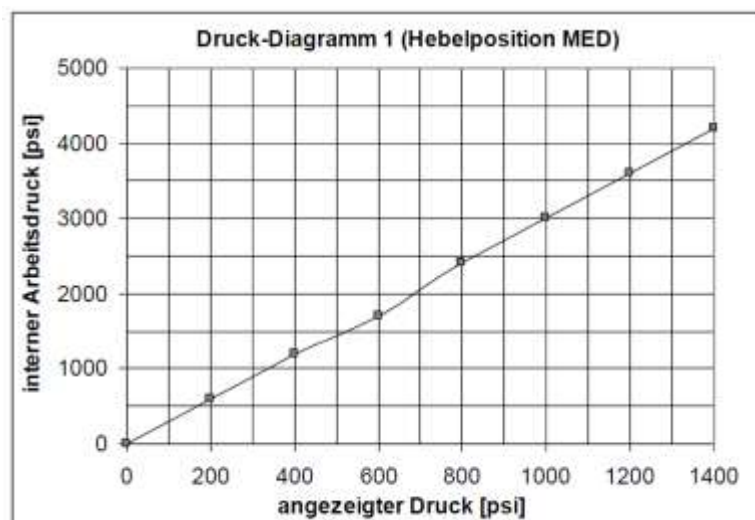
3.2.3 Temperaturmessung

Die Temperaturmessung erfolgte unmittelbar nach der Probenahme. Die Messwerte wurden mittels VOLTcraft PTM-100 Temperatur-Messgerät mit einem PT1000 Extratemperaturfühler erfasst. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Sensorfühler für mindestens 2 cm in die Probe eingetaucht wurde.

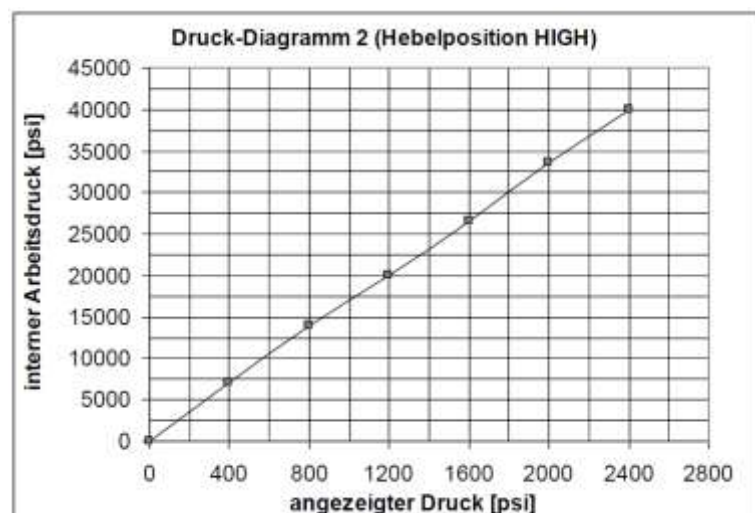
4. Durchführung und Ergebnisse

4.1 Durchführung des Aufschlusses mit der French Press

Das analoge Manometer der French Press zeigt die Druckwerte in psi an. Zur Einstellung müssen die Zielwerte in bar durch Multiplikation mit einem Faktor 14,5 in psi umgerechnet werden. Da der interne Druck jedoch mit dem angezeigten Druck nicht übereinstimmt, müssen die gewünschten Druckwerte anschließend mittels Diagramme ermittelt werden (s. Abb. 11). Dabei ist zu beachten, dass die French Press in zwei Druckbereichen betrieben werden kann: MED (0-5000 psi) und HIGH (5000-45000 psi).



a



b

Abb. 11. Diagramme zur Umrechnung der internen Drücke in die angezeigten Druckwerte. a) Druckbereich MED 0 bis 5000 psi. b) Druckbereich 5000 bis 45000 psi.

Die French Press wurde aufgebaut und die Messzelle wurde mit der Hefesuspension gefüllt. Es wurde sichergestellt, dass sich keine Luft in der Messzelle befindet, indem diese über den

Probeschlauch abgelassen wurde. Der Zellaufschluss fand bei Drücken von 250, 500, 700, 1000, 1200, 1500, 2000 und 2500 bar statt. Anfangs wurde eine Flussrate von 60 Tropfen/Minute durch Nachjustieren des Probenventils eingestellt. Es wurde darauf geachtet, dass das Ventil bei jeder Probenahme die gleiche Position einnimmt. Bei jedem eingestellten Druck wurde eine Probe mit Volumen von etwa 2 mL genommen. Direkt nach der Probenahme erfolgte eine Nach jeder Probenahme wurde das Totvolumen von 1,2 mL abgelassen. Alle Proben wurden nach der Probenahme und zwischen den Arbeitsschritten möglichst in Eiswasser gelagert. Zusätzlich zu den acht Proben wurde eine Probe der intakten Hefesuspension genommen.

Nach dem Zellaufschluss wurden alle Proben zweimal für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationen wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße umpipettiert. Am selben Tag fand die Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assays statt. Die Überstände wurden eingefroren und am nächsten Tag wurde die Proteinbestimmung nach Biuret durchgeführt.

4.1.1 Beobachtungen während des Versuches

Der Aufbau der Messzelle ist mit physischem Aufwand verbunden, da die Bauteile schwer sind und mit Vorsicht behandelt werden müssen. Vor und nach jeder Versuchsdurchführung war sicherzustellen, dass alle Oberflächen vollständig sauber und frei von Partikeln sind. Die Kontaktoberflächen der Bauteile, mussten zusätzlich mit fusselfreien Tüchern gereinigt werden. Außerdem war vor und nach jeder Versuchsdurchführung zu überprüfen, dass alle O-Ringe mit Gleitfett beschichtet sind. Beim Aufbau, dem Befüllen mit Hefesuspension und der Installation der Messzelle in die Druckkammer war Vorsicht geboten, da die Bauteile eine bestimmte Anordnung haben mussten, da eine fehlerhafte Installation zu irreversiblen Beschädigungen führen könnte.

Während des Zellaufschlusses stellte sich heraus, dass die Einstellung des Probenventils in die gleiche Position mit Schwierigkeiten verbunden war. Da es bei verschiedenen Druckstufen zu unterschiedlich starken Volumenströmen kommt, gestaltete es sich problematisch, das Probenventil bei jeder Probenahme um den gleichen Winkel zu öffnen. Da der ansteigende Druck einen starken Volumenstrom erzeugte, war es schwer, die Probe aufzufangen, da die Hefesuspension aus dem Probeschlauch spritzte. Dies erfordert Übung und stellt eine Fehlerquelle dar, da die Einstellung des Ventils die Ergebnisse direkt beeinflussen kann. Außerdem musste darauf geachtet werden, dass die Druckstufen im richtigen Druckbereich

(MED oder HIGH) eingestellt sind. Die Anzeige auf der French Press ist analog. Der Druckanstieg ist gut zu verfolgen, jedoch beinhaltet die analoge Anzeige eine gewisse Ungenauigkeit bei der Einstellung der Druckwerte. Da mit der French Press nur ein Suspensionsvolumen von ca. 30 mL verarbeitet werden konnte, erfolgte der Zellaufschluss der Proben schnell. Dementsprechend konnten mögliche Druckschwankungen während des Prozesses nicht erfasst werden. Während des Zellaufschlusses konnten nur kleine Probenvolumina dem eingestellten Druck ausgesetzt werden, dementsprechend wurden eventuelle Druckschwankungen während des Aufschlusses aus zeitlichen Gründen nicht abgelesen. Falls es nicht gelungen war, die gewünschte Druckstufe aufgrund des schwergängigen Ventiles einzustellen, musste die Messzelle erneut mit Hefesuspension befüllt werden. Dafür musste die Messzelle aus der Presse entnommen und abgebaut werden.

4.2 Durchführung des Aufschlusses mit dem Hochdruckhomogenisator

Für die Durchführung des Zellaufschlusses mit dem Hochdruckhomogenisator wurde ein Volumen an Hefesuspension von mindestens 150 mL pro Probe benötigt. Es wurde eine Hefesuspension hergestellt mit einem Endvolumen von 1900 mL. Zuerst wurde das Kühlventil geöffnet. Der Zellaufschluss fand im Druckbereich von 50 bis 2000 bar statt. Zwischen den Probenahmen von ca. 3 mL wurden die Leitungen mit ausreichend Leitungswasser gespült, bis das Wasser im Probenbehälter klar war. Der eingestellte Druck bezog sich dabei auf das Leitungswasser im Probenbehälter. Es wurde gewartet, bis der Wassermeniskus die untere Düsenöffnung des Einlaufrichters erreichte, woraufhin die Hefesuspension eingefüllt wurde. Das Druckverhalten am Display des Gerätes wurde beobachtet. Die Probe wurde aus dem mittleren Bereich des austretenden Volumenstromes genommen. Die Temperaturmessung fand direkt nach dem Zellaufschluss statt. Der gemessene Druck und die Temperatur wurden notiert. Die Proben wurden nach dem Zellaufschluss sofort in Eiswasser gestellt. Pro Probe wurden 2 mL in Reaktionsgefäße pipettiert und zweimal für 10 Minuten bei 13400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationen wurde der Überstand abgenommen und in saubere Reaktionsgefäße umpipettiert. Am selben Tag fand die Enzymaktivitätsmessung mittels G6PDH-Assays statt. Die Überstände wurden eingefroren und an einem anderen Tag wurde die Proteinbestimmung nach Biuret durchgeführt.

Der Zellaufschluss mit anschließender Analytik wurde insgesamt achtmal durchgeführt, wobei die Prozessparameter wie die Betriebsdrücke, die Anzahl der Passagen und der Probenahmen sowie die Temperatur der Kühlung variiert wurden. Bei der Durchführung mit zwei Passagen

wurde das aufgefangene Suspensionsvolumen nach dem ersten Durchgang erneut in den Einlaufrichter überführt. Nach jeder Passage erfolgte eine Probenahme von ca. 2 mL. Zwischen den Durchgängen wurden die Leitungen sowie der Einlaufrichter mit Leitungswasser gespült. Im Falle eines Druckabfalls zwischen den Durchgängen wurde der Arbeitsdruck nachgestellt.

4.2.1 Beobachtungen während der Versuchsdurchführung

Nach dem Einfüllen der Hefesuspension in den Probenbehälter stieg der Druck an. Des Weiteren wurden Geräusche, wie ein Quietschen, sowie Vibrationen und Stoßvibrationen beobachtet. Im Laufe des Zellaufschlusses traten Druckschwankungen auf, die mit ansteigendem Druck eine größere Abweichung aufwiesen. Ab einem Druck von ca. 500 bar wurde gelegentlich das Ventil locker, was zur Druckentspannung führte. In diesem Fall musste der Druck erneut eingestellt werden und das Ventil während des Zellaufschlusses mit der Hand festgehalten werden. Dies trat nicht bei jeder Versuchsdurchführung und nicht bei jeder Druckstufe auf, dennoch am häufigsten im Bereich zwischen 500 und 700 bar. Da das Gerät nicht leerlaufen darf, wurde es darauf geachtet, dass genug Leitungswasser bereitstand, um den Einlaufrichter rechtzeitig wieder zu befüllen.

4.3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Enzymaktivitäts- und der Proteinbestimmung dargestellt. Für den Aufschluss mit der French Press werden die in Excel übertragenen Rohdaten der Enzymkinetik sowie die Standardkurven zur Berechnung der Proteinkonzentrationen grafisch abgebildet. Da es mit dem Hochdruckhomogenisator mehrere Aufschlüsse mit variierenden Prozessparametern durchgeführt wurden, beschränkt sich die grafische Darstellung der Enzymkinetik und der Standardkurven auf den Versuch, der als finale Version für das ARV Praktikum empfohlen wird. Die entsprechenden Verweise auf die Rohdaten im Anhang sind in den jeweiligen Unterkapiteln aufgeführt.

4.3.1 French Press: Aufschluss über acht Druckstufen

In diesem Kapitel wird die Berechnung der Enzymaktivitäten und der Proteinkonzentrationen dargestellt. Diese Berechnung gilt für alle Daten, die während weiterer Versuche erfasst und berechnet wurden.

In Tab. 2 sind die gemessenen Extinktionswerte (Rohdaten) der Enzymaktivitätsmessung dargestellt. Jede Probe wurde in Triplikat gemessen.

Tab. 2. Aufschluss mit der FP. Enzymaktivitätsbestimmung: Gemessene Extinktionen der Proben (Triplikatmessung pro Probe).

Probe	Zeit in s	Extinktion		
250 bar	0	0,180	0,180	0,171
	20	0,213	0,212	0,201
	40	0,244	0,244	0,233
	60	0,274	0,276	0,265
	80	0,305	0,309	0,297
500 bar	0	0,105	0,101	0,108
	20	0,120	0,110	0,120
	40	0,130	0,120	0,130
	60	0,140	0,130	0,140
	80	0,150	0,150	0,160
750 bar	0	0,154	0,156	0,148
	20	0,180	0,180	0,170
	40	0,200	0,210	0,200
	60	0,230	0,230	0,220
	80	0,250	0,260	0,240
1000 bar	0	0,227	0,205	0,197
	20	0,266	0,238	0,231
	40	0,306	0,273	0,267
	60	0,345	0,309	0,303
	80	0,386	0,347	0,340
1200 bar	0	0,227	0,257	0,227
	20	0,264	0,299	0,265
	40	0,301	0,339	0,303
	60	0,339	0,379	0,342
	80	0,376	0,423	0,382
1500 bar	0	0,452	0,422	0,396
	20	0,533	0,504	0,475
	40	0,620	0,584	0,555
	60	0,701	0,662	0,632
	80	0,776	0,737	0,708
2000 bar	0	0,596	0,557	0,489
	20	0,704	0,667	0,597
	40	0,805	0,773	0,701
	60	0,905	0,872	0,802
	80	1,002	0,967	0,897
2500 bar	0	0,595	0,554	0,547
	20	0,701	0,658	0,656
	40	0,804	0,758	0,761
	60	0,901	0,853	0,864
	80	0,991	0,943	0,958
intakte Hefe	0	0,061	0,065	0,065
	20	0,061	0,065	0,065
	40	0,061	0,066	0,064
	60	0,061	0,066	0,064
	80	0,061	0,066	0,065

In Tab. 3 sind die Mittelwerte aus den gemessenen Extinktionen dargestellt. Aus den Extinktionen der Triplikatmessungen wurden Mittelwerte gebildet und anschließend gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 12). In Abb. 12 sind die zeitlichen Verläufe der enzymatischen Reaktion von G6PDH über die Zeit bei jeder Druckstufe dargestellt. Für jede Probe wurde über die Bildung einer Regressionsgeraden sowohl die lineare Gleichung als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt.

Tab. 3. Aufschluss mit der French Press: Tabellarische Darstellung der berechneten Extinktionswerte (ermittelt aus Mittelwerten der Rohmesswerte).

Zeit in s	250 bar	500 bar	750 bar	1000 bar	1200 bar	1500 bar	2000 bar	2500 bar	intakte Hefe
0	0,177	0,105	0,153	0,210	0,237	0,423	0,547	0,565	0,0637
20	0,209	0,117	0,177	0,245	0,276	0,504	0,656	0,672	0,0637
40	0,240	0,127	0,203	0,282	0,314	0,586	0,760	0,774	0,0637
60	0,272	0,137	0,227	0,319	0,353	0,665	0,860	0,873	0,0637
80	0,304	0,153	0,250	0,358	0,394	0,740	0,955	0,964	0,0640

Abb. 12 zeigt, dass die Kurvenverläufe der Extinktionen von den Proben im Druckbereich von 250 bar bis 2500 bar einen linearen Verlauf mit einer positiven Steigung aufweisen. Mit Ausnahme der intakten Hefeprobe liegt das Bestimmtheitsmaß R^2 aller Proben zwischen 0,996 und 1. Die Extinktionswerte der Proben im Bereich von 1500 bar bis 2500 bar steigen deutlich an. Im Druckbereich von 500 bar bis 1200 bar ist ein moderater Anstieg der Extinktion zu verzeichnen. Die Werte der intakten Hefeprobe bleiben mit einer Steigung von Null hingegen nahezu konstant und bilden eine annähernd horizontale Linie.

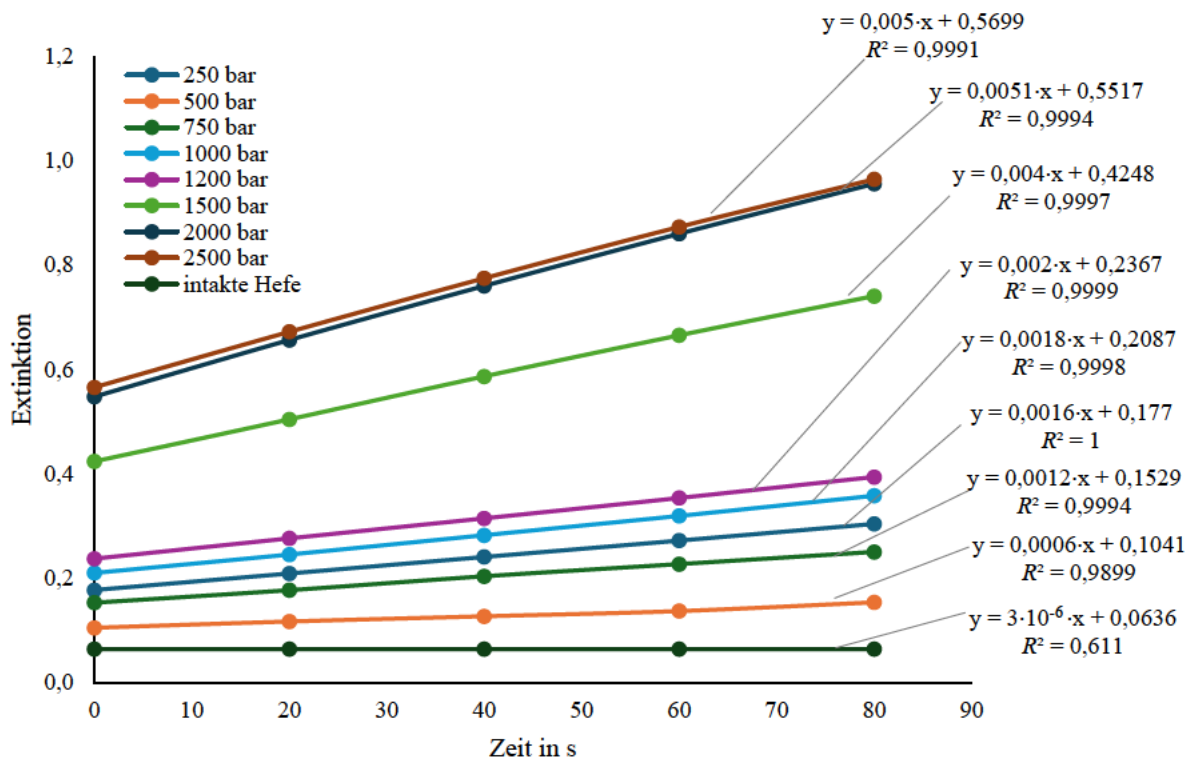


Abb. 12. Enzymkinetik zur Bestimmung der Enzymaktivität (G6PDH) nach dem Aufschluss mit der French Press bei Druckstufen von 250 bar bis 2500 bar mit Angabe der linearen Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 .

In Tab. 4 sind die gemessenen Extinktionen und aus diesen Messwerten berechneten Werte für die Steigung $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, das Bestimmtheitsmaß R^2 sowie die Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ angegeben. Die Werte wurden in Excel berechnet, wobei nur die Endergebnisse (Mittelwerte) aufgerundet wurden.

Beispielsrechnung für die Probe 1200 bar:

- 1) Mittelwert für die Steigung:

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{0,0019 + 0,0021 + 0,0019}{3} = 0,0020$$

- 2) Mittelwert für das Bestimmtheitsmaß:

$$R^2 = \frac{1,000 + 1,000 + 1,000}{3} = 1,000$$

- 3) Berechnung der Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{s})$ von der 1. Probe im Triplikat (s. [3]):

$$A = (0,00187 \cdot 23,175) \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{s}) = 0,043 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{s})$$

4) Berechnung des Mittelwertes der Enzymaktivitäten:

$$A = \frac{(0,043 + 0,048 + 0,045)\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})}{3} = 0,045 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$$

5) Umrechnung der Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$:

$$A = 0,045 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s}) \cdot 60 \frac{\text{s}}{\text{min}} = 2,72 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$$

Tab. 4. Aufschluss mit der French Press: Aus den Enzymaktivitäten berechnete Werte für die Proben bei den Druckstufen von 250 bar bis 2500 bar und für die intakte Hefeprobe.

	Zeit in s / Parameter	250 bar	500 bar	750 bar	1000 bar	1200 bar	1500 bar	2000 bar	2500 bar	intakte Hefe
1. Probe im Triplikat	0	0,180	0,105	0,154	0,227	0,227	0,452	0,596	0,595	0,061
	20	0,213	0,120	0,180	0,266	0,264	0,533	0,704	0,701	0,061
	40	0,244	0,130	0,200	0,306	0,301	0,620	0,805	0,804	0,061
	60	0,274	0,140	0,230	0,345	0,339	0,701	0,905	0,901	0,061
	80	0,305	0,150	0,250	0,386	0,376	0,776	1,002	0,991	0,061
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00156	0,00055	0,00121	0,00198	0,00187	0,00408	0,00507	0,00496	0,00000
	R^2	1,000	0,992	0,997	1,000	1,000	0,999	1,000	0,999	1
	A in $\mu\text{mol}/$ $(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,036	0,013	0,028	0,046	0,043	0,094	0,117	0,115	0,000
2. Probe im Triplikat	0	0,180	0,101	0,156	0,205	0,257	0,422	0,557	0,554	0,065
	20	0,212	0,110	0,180	0,238	0,299	0,504	0,667	0,658	0,065
	40	0,244	0,120	0,210	0,273	0,339	0,584	0,773	0,758	0,066
	60	0,276	0,130	0,230	0,309	0,379	0,662	0,872	0,853	0,066
	80	0,309	0,150	0,260	0,347	0,423	0,737	0,967	0,943	0,066
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00161	0,00059	0,00129	0,00177	0,00206	0,00394	0,00513	0,00487	0,00001
	R^2	1,000	0,969	0,997	0,999	1,000	1,000	0,999	0,999	0,750
	A in $\mu\text{mol}/$ $(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,037	0,014	0,030	0,041	0,048	0,091	0,119	0,113	0,000
3. Probe im Triplikat	0	0,171	0,108	0,148	0,197	0,227	0,396	0,489	0,547	0,065
	20	0,201	0,120	0,170	0,231	0,265	0,475	0,597	0,656	0,065
	40	0,233	0,130	0,200	0,267	0,303	0,555	0,701	0,761	0,064
	60	0,265	0,140	0,220	0,303	0,342	0,632	0,802	0,864	0,064
	80	0,297	0,160	0,240	0,340	0,382	0,708	0,897	0,958	0,065
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00158	0,00062	0,00117	0,00179	0,00193	0,00391	0,00511	0,00515	0,00001
	R^2	1,000	0,979	0,994	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999	0,083
	A in $\mu\text{mol}/$ $(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,037	0,014	0,027	0,041	0,045	0,090	0,118	0,119	0,000
Mittel- werte	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0016	0,0006	0,0012	0,0018	0,0020	0,0040	0,0051	0,0050	0,0000
	R^2	1,000	0,980	0,996	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999	0,417
	A in $\mu\text{mol}/$ $(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,037	0,014	0,028	0,043	0,045	0,092	0,118	0,116	0,000
	A in $\mu\text{mol}/$ $(\text{mL}\cdot\text{min})$	2,20	0,82	1,70	2,57	2,72	5,53	7,09	6,94	0,00
	Abweichung	0,038	0,049	0,085	0,163	0,137	0,129	0,042	0,202	0,014

In Abb. 13 sind die berechneten Enzymaktivitäten und die gemessenen Temperaturen der Proben dargestellt. In Abb. 13a ist ein tendenzieller Anstieg der Enzymaktivität mit steigendem Druck zu beobachten, wobei der erste Messwert bei 250 bar eine Ausnahme bildet, da der Messwert im Vergleich zu den nachfolgenden Messwerten bei 500 bar und 750 bar deutlich höher liegt. Am oberen Ende des Messbereiches (2000 bar und 2500 bar) nähern sich die Werte an und liegen bei $7,09 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bzw. $6,94 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$. Bei der intakten Hefeprobe konnte keine Enzymaktivität gemessen werden (Messwert unter der Nachweisgrenze). Die Temperaturwerte wiesen mit zunehmendem Druck ebenfalls einen tendenziellen Anstieg auf, wobei der größte Wert bei einem Maximaldruck von 2500 bar liegt (s. Abb. 13b).

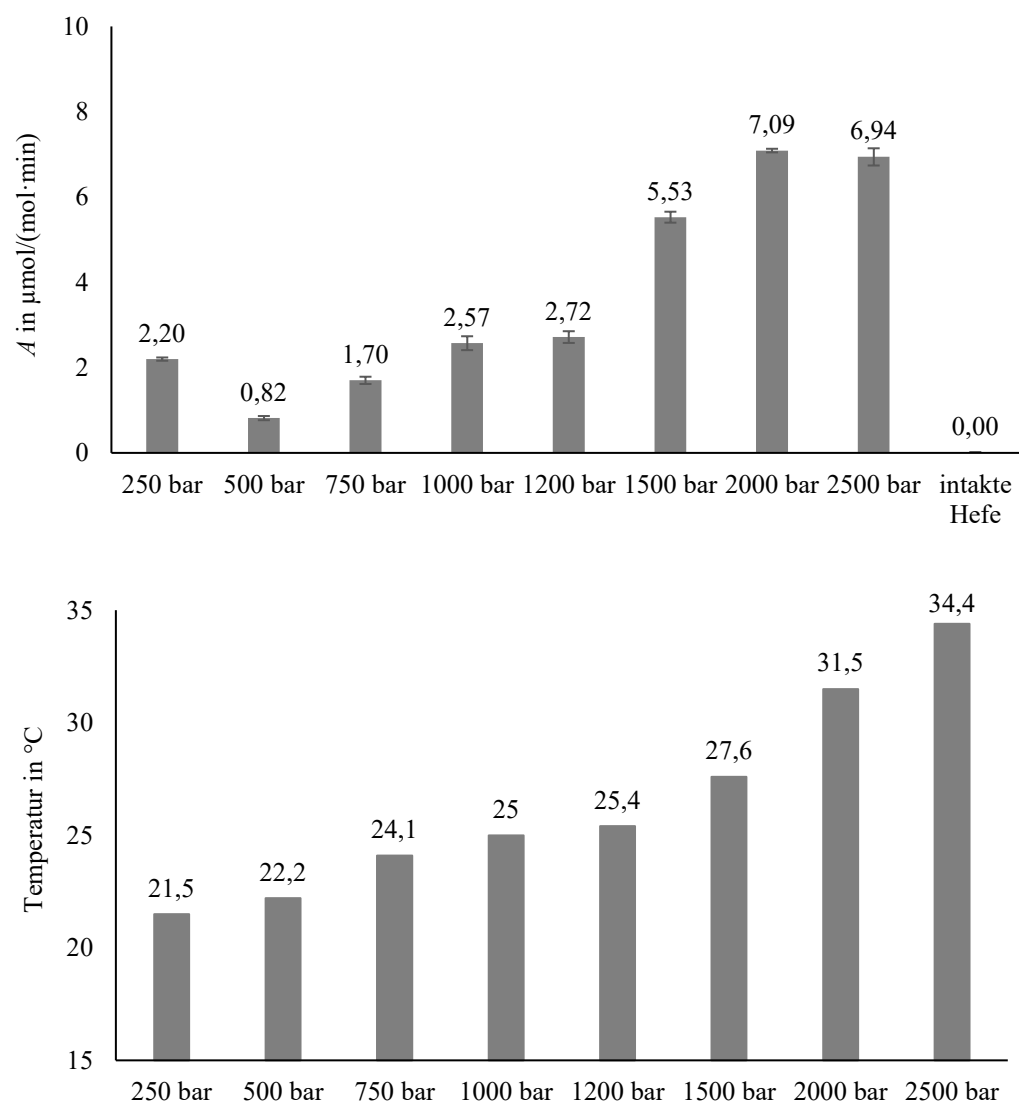
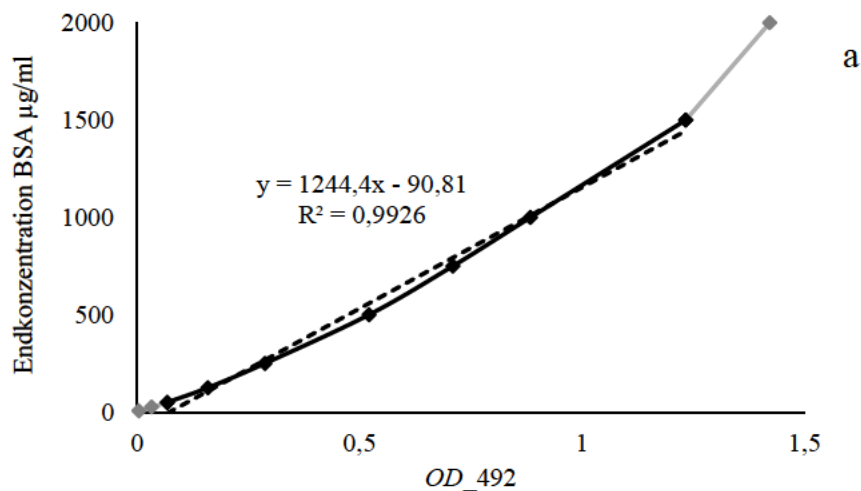


Abb. 13. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit der French Press. a) Dargestellt sind die berechneten Enzymaktivitäten der Proben (A) $\mu\text{mol}/(\text{mol} \cdot \text{min})$ inklusive Fehlerbalken, aufgetragen gegen die eingestellten Druckstufen. b) Temperaturen der Proben, gemessen unmittelbar nach dem Zellaufschluss.

Für die Messung wurden zwei Mikrotiterplatten verwendet, dementsprechend wurde für jede Mikrotiterplatte eine eigenständige Standardkurve ermittelt. Aus den gemessenen Extinktionen wurden die einzelnen Messpunkte für die Standardkurven berechnet, indem die Duplikatmesswerte gemittelt wurden. In Tab. 5 sind die einzelnen Extinktionen mit den bekannten Konzentrationen der BSA-Lösung dargestellt. Anhand dieser Daten wurden die Standardkurven gebildet (Abb. 14). Bei jeder Standardkurve wurde ein linearer Bereich mit einem Wert $R^2 > 0,99$ ermittelt. Mithilfe der Gleichung der jeweiligen Regressionsgeraden (gestrichelte Trendlinie) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt (s. Tab. 6).

Tab. 5. Proteinbestimmung (FP): Die während der Messung erfassten Messpunkte der Standardkurve 1 und 2. Fett hervorgehoben ist der lineare Bereich, der zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet wurde.

1	Endkonzentration von BSA in µg/ml	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
	<i>OD</i> ₄₉₂	1,423	1,234	0,885	0,710	0,522	0,288	0,159	0,068	0,033	0,004
2	Endkonzentration von BSA in µg/ml	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
	<i>OD</i> ₄₉₂	1,456	1,206	0,934	0,754	0,5465	0,3085	0,1585	0,0755	0,0575	0,0085



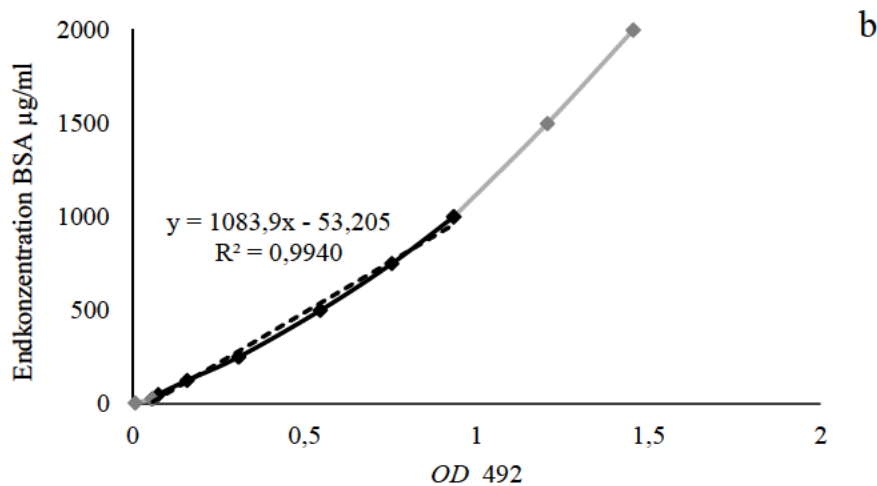


Abb. 14. Standardkurven zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind die Regressionsgeraden mit dem jeweils definiertem linearen Bereich für: a) Proben der Druckstufen 250 bar bis 1500 bar (Mikrotiterplatte 1) sowie b) Proben der Druckstufen 2000 bar und 2500 bar sowie der intakten Hefe (Mikrotiterplatte 2).

In Tab. 6a und Tab. 6b sind die während der Proteinbestimmung erfassten Extinktionen (Rohdaten und die berechneten Werte) für die Mikrotiterplatte 1 und 2 dargestellt. Das jeweilige Pipettierschema ist im Anhang 1 aufgeführt.

Beispielsrechnung für die Probe 1200 bar (Reihe G, in Tab. 6a unterstrichen) über die Gleichungen der Regressionsgeraden:

- 1) Leerwert 0,093 abziehen und die kleinste passende Verdünnung bestimmen.
- 2) Über die Gleichung $y = 1244,4 \cdot x - 90,81$ die Proteinkonzentration berechnen:

$$y = 1244,4 \cdot 0,349 - 90,81 \cong 343,17 \frac{\mu g}{mL}$$

Anmerkung: Die Berechnung erfolgte in Excel und nur die Endwerte wurden gerundet. Demensprechend könne die Ergebnisse der Zwischenschritte kleine Abweichungen aufweisen. Die Werte in Tab. 5 mussten aus platztechnischen Gründen zur besseren Übersicht aufgerundet.

- 3) Mittelwert bilden und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe 1:10 in mg/mL umrechnen:

$$\frac{(343,17 + 327,0 + 319,53) \frac{\mu g}{mL}}{3} \cdot 10 \div 1000 \frac{mg}{\mu g} = 3,30 \frac{mg}{mL}$$

Tab. 6a. Aufschluss mit der FP: Berechnung der Proteinkonzentrationen aus Rohdaten (Mikrotiterplatte 1: Proben von 250 bar bis 1200 bar)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	<i>1,545</i>	<i>1,43</i>	<i>0,993</i>	<i>0,824</i>	<i>0,626</i>	<i>0,388</i>	<i>0,258</i>	<i>0,165</i>	<i>0,131</i>	<i>0,099</i>	0,094	0,096
	B	<i>1,487</i>	<i>1,224</i>	<i>0,963</i>	<i>0,783</i>	<i>0,604</i>	<i>0,374</i>	<i>0,247</i>	<i>0,158</i>	<i>0,122</i>	<i>0,096</i>	0,088	0,095
	C	0,382	0,362	0,35	0,234	0,244	0,236	0,162	0,156	0,156	0,129	0,128	0,133
	D	0,258	0,246	0,238	0,17	0,174	0,169	0,126	0,125	0,123	0,106	0,108	0,113
	E	0,322	0,304	0,297	0,202	0,205	0,204	0,138	0,144	0,142	0,113	0,117	0,123
	F	0,37	0,365	0,346	0,211	0,213	0,212	0,141	0,141	0,143	0,116	0,118	0,125
	G	<u>0,442</u>	<u>0,429</u>	<u>0,423</u>	0,27	0,276	0,276	0,173	0,177	0,175	0,137	0,142	0,152
	H	0,716	0,671	0,643	0,416	0,429	0,421	0,247	0,246	0,245	0,176	0,18	0,195
Leerwert abgezogen	A	<i>1,452</i>	<i>1,337</i>	<i>0,900</i>	<i>0,731</i>	<i>0,533</i>	<i>0,295</i>	<i>0,165</i>	<i>0,072</i>	<i>0,038</i>	<i>0,006</i>	<i>(Der lin. Bereich ist unten angegeben)</i>	
	B	<i>1,394</i>	<i>1,131</i>	<i>0,870</i>	<i>0,690</i>	<i>0,511</i>	<i>0,281</i>	<i>0,154</i>	<i>0,065</i>	<i>0,029</i>	<i>0,003</i>		
	C	0,289	0,269	0,257	0,141	0,151	0,143	0,069	0,063	0,063	0,036	0,035	0,040
	D	0,165	0,153	0,145	0,077	0,081	0,076	0,033	0,032	0,030	0,013	0,015	0,020
	E	0,229	0,211	0,204	0,109	0,112	0,111	0,045	0,051	0,049	0,020	0,024	0,030
	F	0,277	0,272	0,253	0,118	0,120	0,119	0,048	0,048	0,050	0,023	0,025	0,032
	G	<u>0,349</u>	<u>0,336</u>	<u>0,330</u>	0,177	0,183	0,183	0,080	0,084	0,082	0,044	0,049	0,059
	H	0,623	0,578	0,550	0,323	0,336	0,328	0,154	0,153	0,152	0,083	0,087	0,102
Berechnung über die Gleichung* in µg/ml	C	268,51	243,62	228,69	84,34	96,78	86,83	-5,26	-12,72	-12,72	-46,32	-47,57	-41,35
	D	114,20	99,27	89,32	4,70	9,68	3,45	-50,06	-51,30	-53,79	-74,94	-72,46	-66,23
	E	193,85	171,45	162,74	44,52	48,25	47,01	-35,12	-27,66	-30,15	-66,23	-61,26	-53,79
	F	253,58	247,36	223,71	55,72	58,21	56,96	-31,39	-31,39	-28,90	-62,50	-60,01	-51,30
	G	<u>343,17</u>	<u>327,00</u>	<u>319,53</u>	129,14	136,60	136,60	8,43	13,41	10,92	-36,37	-30,15	-17,70
	H	684,14	628,14	593,30	310,82	327,00	317,04	100,52	99,27	98,03	12,16	17,14	35,81

Tab. 6b. Aufschluss mit der FP: Berechnung der Proteinkonzentrationen aus Rohdaten (Mikrotiterplatte 2: Proben von 1500 bar bis 2500 bar, intakte Hefe). Rot markiert: Der Leerwert wurde doppelt pipettiert (Pipettierfehler).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,614	1,326	1,045	0,856	0,658	0,413	0,285	0,177	0,157	0,108	0,204	0,09
	B	1,494	1,282	1,019	0,848	0,631	0,4	0,228	0,17	0,154	0,105	0,107	0,097
	C	0,899	0,818	0,827	0,516	0,534	0,527	0,306	0,314	0,317	0,204	0,225	0,241
	D	0,936	0,873	0,852	0,527	0,541	0,538	0,307	0,318	0,321	0,217	0,234	0,254
	E	0,192	0,183	0,179	0,14	0,137	0,136	0,114	0,114	0,103	0,106	0,12	0,101
	F	0,12	0,121	0,118	0,105	0,109	0,106	0,111	0,112	0,103	0,113	0,124	0,114
	G	0,133	0,127	0,126	0,145	0,148	0,146	0,169	0,168	0,167	0,176	0,191	0,194
	H	0,108	0,106	0,103	0,111	0,045	0,045	0,045	0,048	0,045	0,045	0,045	0,045
Leerwert abgezogen	A	1,516	1,228	0,947	0,758	0,56	0,315	0,187	0,079	0,059	0,01	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,396	1,184	0,921	0,75	0,533	0,302	0,13	0,072	0,056	0,007		
	C	0,801	0,72	0,729	0,418	0,436	0,429	0,208	0,216	0,219	0,106	0,127	0,143
	D	0,838	0,775	0,754	0,429	0,443	0,44	0,209	0,22	0,223	0,119	0,136	0,156
	E	0,094	0,085	0,081	0,042	0,039	0,038	0,016	0,016	0,005	0,008	0,022	0,003
	F	0,022	0,023	0,02	0,007	0,011	0,008	0,013	0,014	0,005	0,015	0,026	0,016
	G	0,035	0,029	0,028	0,047	0,05	0,048	0,071	0,07	0,069	0,078	0,093	0,096
	H	0,01	0,008	0,005	0,013	-0,053	-0,053	-0,053	-0,05	-0,053	-0,053	-0,053	-0,053
Berechnung über die Gleichung* in µg/ml	C	815,00	727,20	736,96	399,87	419,38	411,79	172,25	180,92	184,17	61,69	84,45	101,79
	D	855,10	786,82	764,06	411,79	426,96	423,71	173,33	185,25	188,50	75,78	94,21	115,88
	E	48,68	38,93	34,59	-7,68	-10,93	-12,02	-35,86	-35,86	-47,79	-44,53	-29,36	-49,95
	F	-29,36	-28,28	-31,53	-45,62	-41,28	-44,53	-39,11	-38,03	-47,79	-36,95	-25,02	-35,86
	G	-15,27	-21,77	-22,86	-2,26	0,99	-1,18	23,75	22,67	21,58	31,34	47,60	50,85
	H	-42,37	-44,53	-47,79	-39,11	-110,65	-110,65	-110,65	-107,40	-110,65	-110,65	-110,65	-110,65

In Tab. 7 sind die berechneten Proteinkonzentrationen dargestellt.

Tab. 7. Aufschluss mit der FP: Die unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe berechneten Proteinkonzentrationen.

Druckstufen	Konz. in mg/mL	Abweichung in mg/mL
250 bar	2,47	0,201
500 bar	1,01	0,125
750 bar	1,76	0,160
1000 bar	2,42	0,158
1200 bar	3,30	0,121
1500 bar	6,35	0,458
2000 bar	7,60	0,481
2500 bar	8,02	0,474
intakte Hefe	0,41	0,072

In Abb. 15 sind die berechneten Proteinkonzentrationen abgebildet. Abb. 15 zeigt einen Anstieg der Werte mit steigendem Druck, wobei der erste Messwert einen im Vergleich zu den nachfolgenden Werten höheren Wert von 2,47 mg/mL aufweist. Es ist kein eindeutiges Plateau zu erkennen. Die intakte Hefeprobe weist einen im Vergleich zu den anderen Messwerten den kleinsten Wert auf.

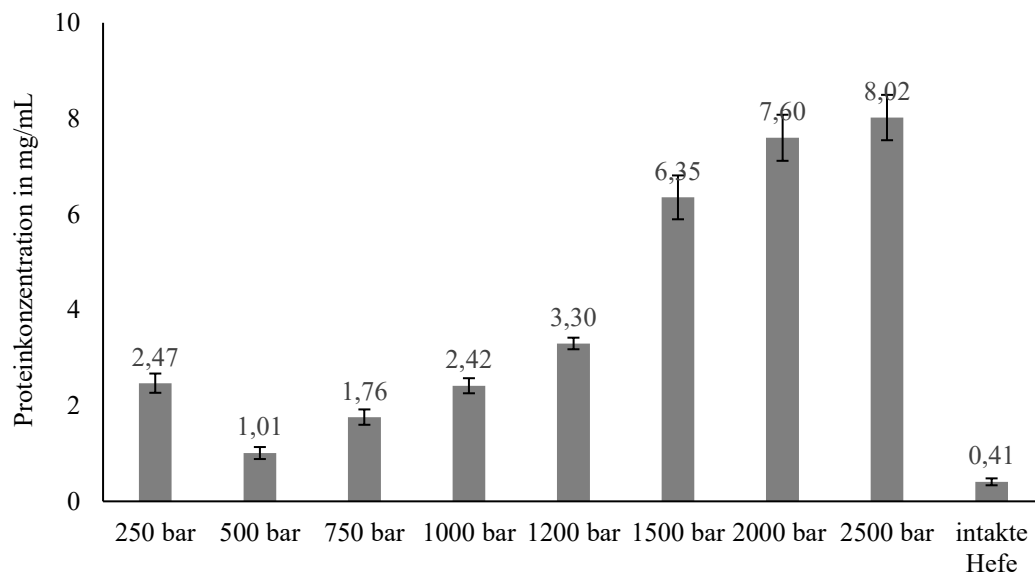


Abb. 15. Die Ergebnisse des Zellaufschlusses mit der French Press. Dargestellt sind die berechneten Proteinkonzentrationen der Proben in mg/mL inklusive Fehlerindikatoren, aufgetragen gegen die eingestellten Drücke.

Die Bestimmung des OD₆₀₀-Messwertes im linearen Bereich erfolgte über eine serielle Verdünnungsreihe. Während der Messung der unverdünnten Probe 3,67 ergab, wurde durch Verdünnung 1:200 ein Messwert von 0,67 ermittelt. Daraus ergibt sich ein rechnerischer Wert von 134 für die Ausgangssuspension. Die Rohdaten sind im Anhang 11 aufgeführt.

4.3.2 Hochdruckhomogenisator

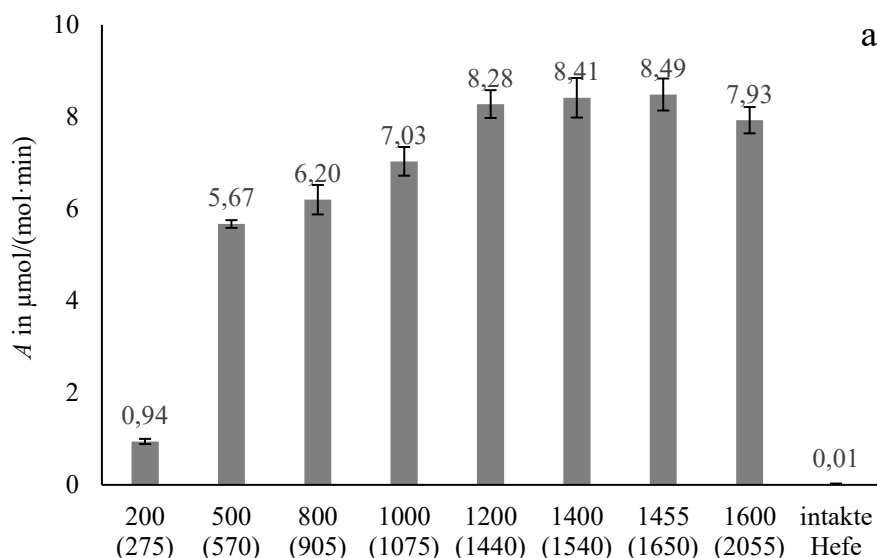
In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH präsentiert. Um den Einfluss der variierenden Prozessparameter übersichtlich darzustellen, wurde aus den insgesamt sieben durchgeführten Versuchsreihen eine repräsentative Auswahl von vier Versuchen getroffen. Diese Auswahl ermöglicht einen klaren Vergleich der Effekte auf die Enzymaktivität und die Proteinfreisetzung. Anschließend werden die Ergebnisse des Zellaufschlusses mit der French Press sowie mit dem Hochdruckhomogenisator miteinander verglichen. Sofern nichts anderes explizit angegeben, beziehen sich alle Druckangaben auf die Sollwerte.

4.3.2.1 Aufschluss über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung

In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-, der Temperaturmessung und der Proteinbestimmung präsentiert. Die Rohdaten sind im Anhang 2 aufgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Passage über acht Druckstufen in einem Bereich von 200 bis 1600 bar. Um den prozessbedingten Temperaturanstieg zu dokumentieren, wurde keine Kühlung am Auslass zugeschaltet.

In Abb. 16a zeigt sich ein eindeutiger Anstieg der Enzymaktivität beginnend von $0,94 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei einem Druckwert von 200 bar, wobei sich ein Plateau im Arbeitsdruckbereich von 1200 bar bis 1455 bar bildet, das die Werte von $8,28 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bis $8,49 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ umfasst. Bei der maximalen Druckstufe von 1600 bar ist ein Rückgang der Enzymaktivität auf $7,93 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ zu beobachten. Abb. 16b ist zu entnehmen, dass die gemessene Temperatur mit steigendem Druck kontinuierlich zunimmt.

Laut Abb. 16c ist ein Anstieg der Proteinkonzentration mit dem zunehmenden Druckwert festzustellen, wobei die kleinste Proteinkonzentration von $1,30 \text{ mg/mL}$ bei dem Druck von 200 bar und die größte Proteinkonzentration von $15,34 \text{ mg/mL}$ bei dem Maximaldruck von 1600 bar liegen. Bei der intakten Hefeprobe liegt die Proteinkonzentration bei $0,38 \text{ mg/mL}$ und ist im Vergleich zu anderen Messwerten der kleinste Wert. Das Pipettierschema und die Standardkurven sind im Anhang 3 aufgeführt.



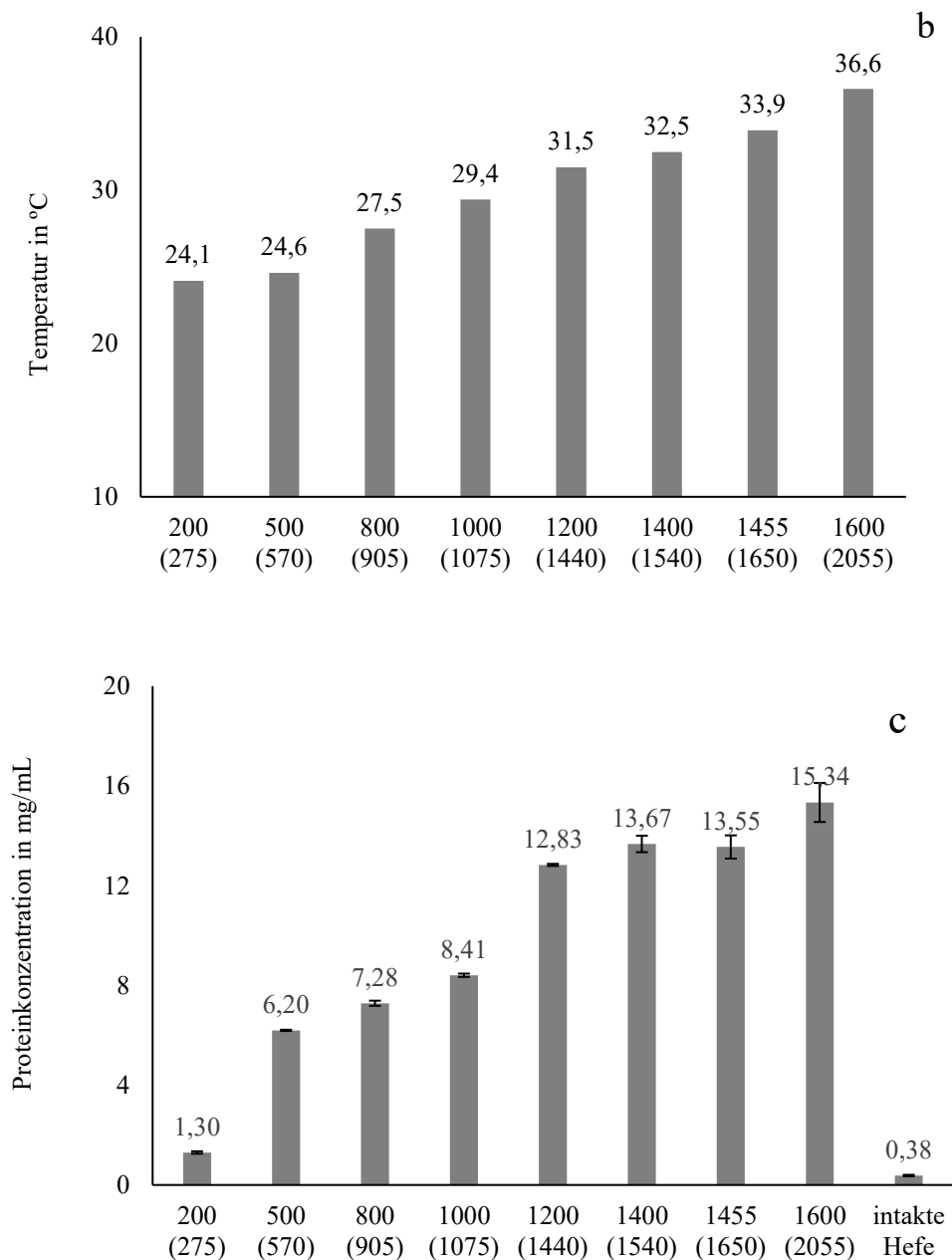


Abb. 16. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung am Auslass. a) Berechnete Enzymaktivitäten (A) in $\mu\text{mol}/(\text{mol} \cdot \text{min})$ inklusive Fehlerbalken. b) Temperaturen der Proben, gemessen unmittelbar nach dem Zellaufschluss. c) Berechnete Proteinkonzentrationen in mg/mL inklusive Fehlerbalken. Die Darstellung erfolgt gegen die eingestellten Solldrücke. In Klammern sind die während des Aufschlusses gemessenen Ist-Druckwerte angegeben. Die Skalierung der x-Achse ist in bar.

Die Bestimmung des OD_{600} -Messwertes im linearen Bereich erfolgte über eine serielle Verdünnungsreihe. Während der Messung der 1:100 verdünnten Probe ergab sich ein Wert von 1,09. Daraus ergibt sich ein rechnerischer Wert von 109 für die Ausgangssuspension. Die Rohdaten sind im Anhang 11 aufgeführt.

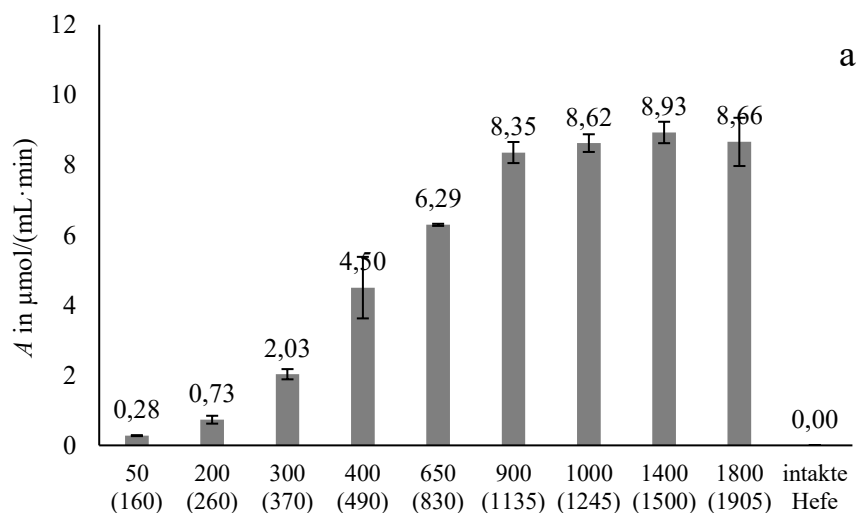
4.3.2.2 Aufschluss über neun Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung

In Abb. 17 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-, der Temperaturmessung sowie der Proteinbestimmung präsentiert. Die Rohdaten sind im Anhang 4 aufgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Passage über neun Druckstufen in einem Bereich von 50 bis 1800 bar. Um den prozessbedingten Temperaturanstieg zu minimieren, wurde ein Wärmetauscher am Auslass zugeschaltet.

Abb. 17a zeigt einen Kurvenverlauf der Enzymaktivitäten bei ansteigenden Arbeitsdrücken. Beginnend von dem kleinsten Messwert von $0,28 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei einem Druck von 50 bar steigen die Enzymaktivitäten um ungefähr den ähnlichen Wert im Druckbereich von 300 bar bis 900 bar an. Anschließend bilden die Messwerte ein Plateau im Druckbereich von 900 bar bis 1800 bar. Bei der intakten Hefeprobe konnte keine Enzymaktivität gemessen werden (Messwert unter der Nachweisgrenze).

Abb. 17b zu entnehmen, dass die Temperaturen mit steigendem Druck von $12,4^\circ\text{C}$ auf $20,0^\circ\text{C}$ im Druckbereich von 50 bar bis 900 bar kontinuierlich ansteigen. Im oberen Messbereich von 1000 bar bis 1800 bar ist ein Abstieg der Temperatur auf $17,0\text{--}17,1^\circ\text{C}$ zu beobachten, wobei die Messwerte auf einem Niveau bleiben.

Bei den Proteinkonzentrationen in Abb. 16c ist veranschaulichte Zunahme mit steigenden Druckstufen zu verzeichnen. Der Minimalwert von $0,89 \text{ mg/mL}$ liegt bei dem niedrigsten Druck von 50 bar, und die maximale Proteinkonzentrationen erreicht einen Wert von $13,93 \text{ mg/mL}$ bei einem Maximaldruck von 1800 bar. Die intakte Hefe ist der kleinste Wert im Vergleich zu anderen Werten und weist eine Konzentration von $0,57 \text{ mg/mL}$ auf. Das Pipettierschema und die Standardkurven sind im Anhang 5 aufgeführt.



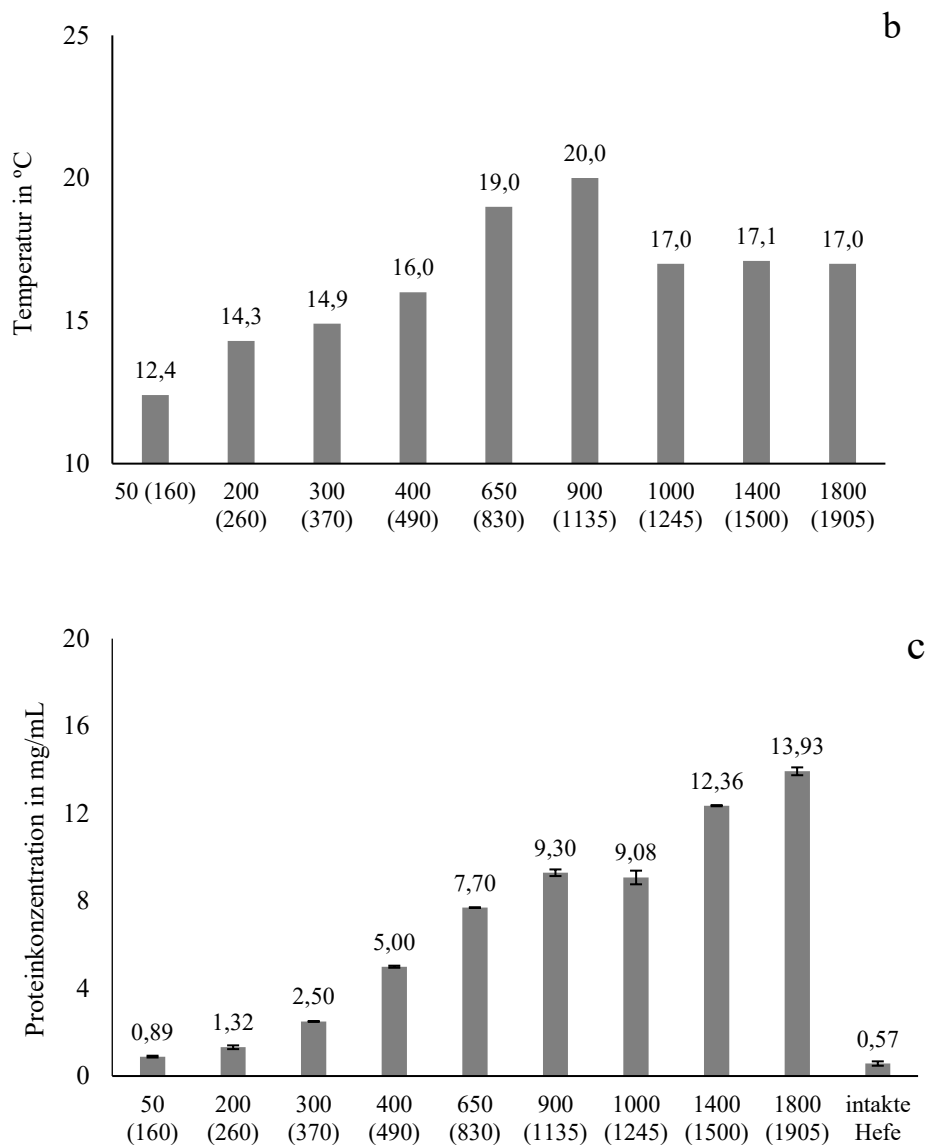


Abb. 17. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH über neun Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung am Auslass. a) Berechnete Enzymaktivitäten (A) in $\mu\text{mol}/(\text{mol} \cdot \text{min})$ inklusive Fehlerbalken. b) Temperaturen der Proben, gemessen unmittelbar nach dem Zellaufschluss. c) Berechnete Proteinkonzentrationen in mg/mL inklusive Fehlerbalken. Die Darstellung erfolgt gegen die eingestellten Solldrücke. In Klammern sind die während des Aufschlusses gemessenen Ist-Druckwerte angegeben. Die Skalierung der x-Achse ist in bar.

Die Bestimmung des OD_{600} -Messwertes im linearen Bereich erfolgte über eine serielle Verdünnungsreihe. Während der Messung der 1:200 verdünnten Probe ergab sich ein Wert von 0,69. Daraus ergibt sich ein rechnerischer Wert von 138 für die Ausgangssuspension. Die Rohdaten sind im Anhang 11 aufgeführt.

4.3.2.3 Aufschluss über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung

In Tab. 8 sind die gemessenen Extinktionswerte (Rohdaten) der Enzymaktivitätsmessung dargestellt. Jede Probe wurde in Triplikat gemessen. Die Rohdaten und die berechneten Werte in tabellarischer Form für die zweite Passage sind im Anhang 6 aufgeführt.

Tab. 8. Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, Passage 1, mit Kühlung. Enzymaktivitätsbestimmung: Gemessene Extinktionen der Proben (Triplikatmessung pro Probe).

Probe	Zeit in s	Absorbance		
50 (120) bar	0	0,051	0,047	0,045
	20	0,055	0,052	0,050
	40	0,059	0,056	0,053
	60	0,064	0,060	0,058
	80	0,069	0,065	0,062
200 (250) bar	0	0,109	0,093	0,101
	20	0,123	0,105	0,116
	40	0,137	0,118	0,130
	60	0,152	0,131	0,144
	80	0,167	0,144	0,160
300 (350) bar	0	0,176	0,172	0,170
	20	0,210	0,203	0,202
	40	0,244	0,235	0,236
	60	0,278	0,267	0,269
	80	0,313	0,300	0,304
400 (535) bar	0	0,465	0,366	0,405
	20	0,565	0,447	0,499
	40	0,660	0,529	0,589
	60	0,751	0,609	0,678
	80	0,836	0,685	0,761
600 (760) bar	0	0,291	0,274	0,269
	20	0,353	0,335	0,331
	40	0,415	0,400	0,393
	60	0,478	0,460	0,455
	80	0,539	0,521	0,516
800 (975) bar	0	0,520	0,506	0,475
	20	0,630	0,615	0,583
	40	0,734	0,720	0,687
	60	0,830	0,817	0,785
	80	0,920	0,909	0,880
1000 (1130) bar	0	0,765	0,669	0,670
	20	0,912	0,805	0,814
	40	1,042	0,926	0,948
	60	1,150	1,028	1,061
	80	1,239	1,115	1,154
1300 (1450) bar	0	0,827	0,820	0,852
	20	0,985	0,985	1,024
	40	1,114	1,125	1,166
	60	1,218	1,235	1,280
	80	1,297	1,320	1,371
1600 (1750) bar	0	1,006	0,912	0,951
	20	1,177	1,089	1,125
	40	1,314	1,238	1,267
	60	1,419	1,355	1,378
	80	1,497	1,447	1,464
1800 (1965) bar	0	0,827	0,742	0,545
	20	0,948	0,858	0,637
	40	1,063	0,967	0,728
	60	1,167	1,071	0,813
	80	1,262	1,166	0,899
intakte Hefe	0	0,045	0,034	0,041
	20	0,046	0,033	0,042
	40	0,047	0,033	0,042
	60	0,046	0,034	0,042
	80	0,048	0,034	0,042

In Tab. 9 sind die aus den gemessenen Extinktionen berechnete Mittelwerte dargestellt. Aus den Extinktionswerten der Triplikatmessungen wurden Mittelwerte gebildet und anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Abb. 18 zeigt die zeitlichen Verläufe der enzymatischen Reaktion von G6PDH über die Zeit bei jeder Druckstufe. Für jede Probe wurde über die Bildung einer Regressionsgeraden sowohl die lineare Gleichung als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt.

Aus Abb. 18 ist ersichtlich, dass die Messpunkte der Proben einen linearen Verlauf bilden. Abgesehen von der intakten Hefe wurde bei allen Proben eine Steigung größer Null bestimmt, wobei der R^2 -Wert stets zwischen 0,9205 und 1 liegt. Mit Ausnahme der Probe bei 600 bar nimmt die Extinktion über die Zeit mit steigendem Druck tendenziell zu. Die Extinktionswerte der intakten Hefeprobe bleiben hingegen nahezu konstant und bilden eine annähernd horizontale Linie.

Tab. 9. Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, Passage, mit Kühlung: Tabellarische Darstellung der berechneten Extinktionswerte (ermittelt aus Mittelwerten der Rohmesswerte)

Zeit in s	50 (120)	200 (250)	300 (350)	400 (535)	600 (760)	800 (975)	1000 (1130)	1300 (1450)	1600 (1750)	1800 (1965)	intakte Hefe
0	0,048	0,101	0,173	0,412	0,278	0,500	0,701	0,833	0,956	0,705	0,040
20	0,052	0,115	0,205	0,504	0,340	0,609	0,844	0,998	1,130	0,814	0,040
40	0,056	0,128	0,238	0,593	0,403	0,714	0,972	1,135	1,273	0,919	0,041
60	0,061	0,142	0,271	0,679	0,464	0,811	1,080	1,244	1,384	1,017	0,041
80	0,065	0,157	0,306	0,761	0,525	0,903	1,169	1,329	1,469	1,109	0,041

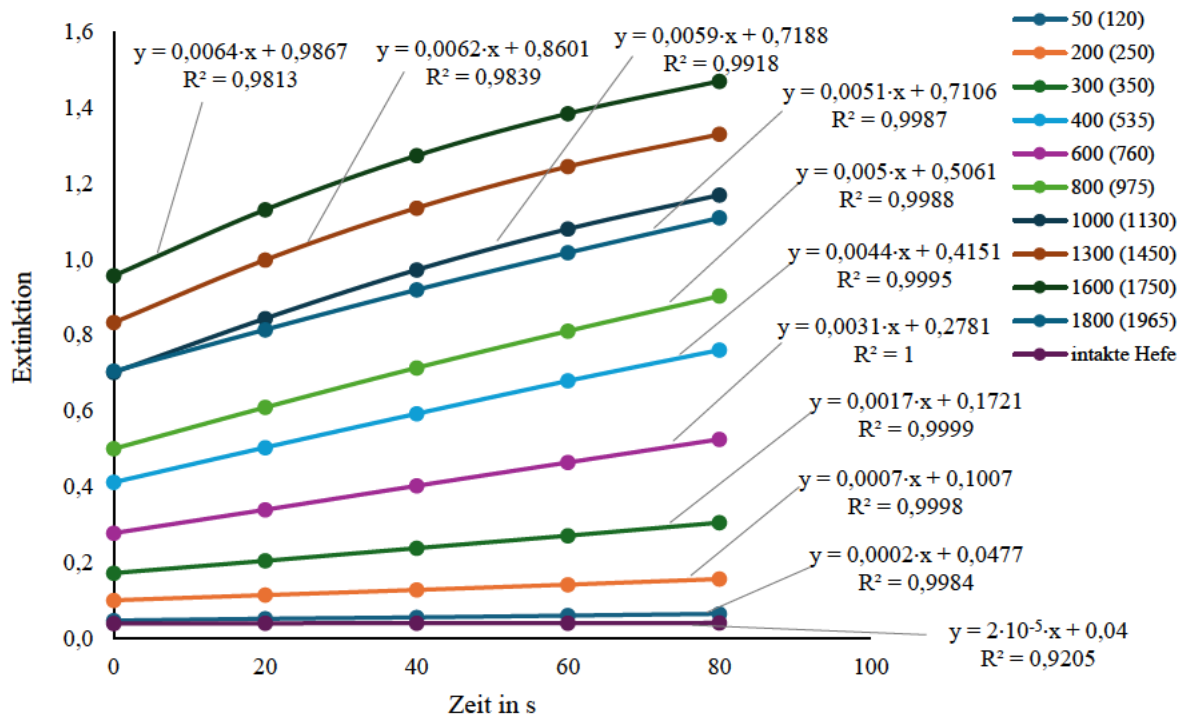


Abb. 18. Enzymkinetik zur Bestimmung der Enzymaktivität (G6PDH) nach dem Aufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator bei Druckstufen von 50 bar bis 1800 bar mit Angabe der linearen Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 .

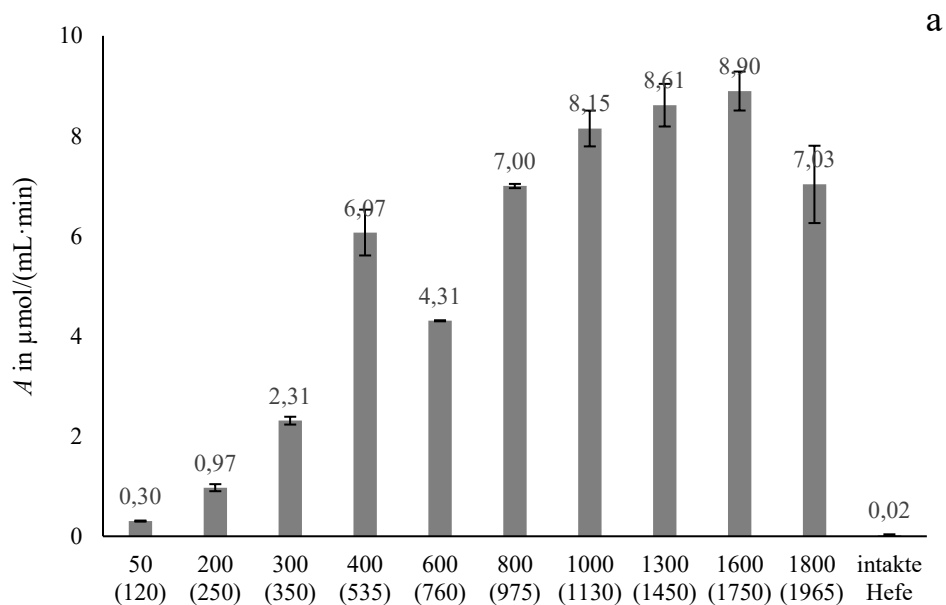
In Tab. 10 sind die gemessenen Extinktionen und aus diesen Messwerten berechneten Werte für die Steigung $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, das Bestimmtheitsmaß R^2 sowie die Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ angegeben. Die Werte wurden in Excel berechnet, wobei nur die Endergebnisse (Mittelwerte) aufgerundet wurden.

Tab. 10. Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, Passage 1, mit Kühlung: Aus den Enzymaktivitäten berechnete Werte für die Proben von 50 bar bis 1800 bar und die intakte Hefeprobe.

	Zeit in s / Parameter	50 (120)	200 (250)	300 (350)	400 (535)	600 (760)	800 (975)	1000 (1130)	1300 (1450)	1600 (1750)	1800 (1965)	intakte Hefe
1. Probe im Triplikat	0	0,051	0,109	0,176	0,465	0,291	0,52	0,765	0,827	1,006	0,827	0,045
	20	0,055	0,123	0,21	0,565	0,353	0,63	0,912	0,985	1,177	0,948	0,046
	40	0,059	0,137	0,244	0,66	0,415	0,734	1,042	1,114	1,314	1,063	0,047
	60	0,064	0,152	0,278	0,751	0,478	0,83	1,15	1,218	1,419	1,167	0,046
	80	0,069	0,167	0,313	0,836	0,539	0,92	1,239	1,297	1,497	1,262	0,048
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0007	0,0017	0,0046	0,0031	0,0050	0,0059	0,0059	0,0061	0,0054	0,000
	R^2	0,997	1,000	1,000	0,999	1,000	0,998	0,990	0,983	0,978	0,998	0,692
	A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,005	0,017	0,040	0,108	0,072	0,116	0,137	0,136	0,142	0,126	0,001
2. Probe im triplikat	0	0,047	0,093	0,172	0,366	0,274	0,506	0,669	0,82	0,912	0,742	0,034
	20	0,052	0,105	0,203	0,447	0,335	0,615	0,805	0,985	1,089	0,858	0,033
	40	0,056	0,118	0,235	0,529	0,4	0,72	0,926	1,125	1,238	0,967	0,033
	60	0,06	0,131	0,267	0,609	0,46	0,817	1,028	1,235	1,355	1,071	0,034
	80	0,065	0,144	0,3	0,685	0,521	0,909	1,115	1,32	1,447	1,166	0,034
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0006	0,0016	0,004	0,0031	0,0050	0,0056	0,0063	0,0067	0,0053	0,0000
	R^2	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999	0,992	0,984	0,984	0,999	0,083
	A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,005	0,015	0,037	0,093	0,072	0,117	0,129	0,145	0,155	0,123	0,000
3. Probe im Triplikat	0	0,045	0,101	0,17	0,405	0,269	0,475	0,67	0,852	0,951	0,545	0,041
	20	0,05	0,116	0,202	0,499	0,331	0,583	0,814	1,024	1,125	0,637	0,042
	40	0,053	0,13	0,236	0,589	0,393	0,687	0,948	1,166	1,267	0,728	0,042
	60	0,058	0,144	0,269	0,678	0,455	0,785	1,061	1,28	1,378	0,813	0,042
	80	0,062	0,16	0,304	0,761	0,516	0,88	1,154	1,371	1,464	0,899	0,042
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00021	0,00073	0,001675	0,0045	0,0031	0,0051	0,0061	0,0065	0,0064	0,0044	0,0000
	R^2	0,995	0,999	1,000	1,000	1,000	0,999	0,993	0,985	0,982	1,000	0,500
	A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,00	0,02	0,04	0,10	0,07	0,12	0,14	0,15	0,15	0,10	0,000
Mittelwerte	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0007	0,0017	0,0044	0,0031	0,0050	0,0059	0,0062	0,0064	0,0051	0,00002
	R^2	0,997	1,000	1,000	0,999	1,000	0,999	0,992	0,984	0,981	0,999	0,425
	A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{s})$	0,005	0,016	0,039	0,101	0,072	0,117	0,136	0,144	0,148	0,117	0,000
	A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$	0,30	0,97	2,31	6,07	4,31	7,00	8,15	8,61	8,90	7,03	0,02
	Abweichung	0,01	0,07	0,08	0,46	0,01	0,04	0,36	0,43	0,39	0,77	0,02

In Abb. 19 und 20 sind die berechneten Enzymaktivitäten sowie die gemessenen Temperaturen präsentiert. Um den maximalen Aufschlussgrad zu ermitteln, erfolgte der Zellaufschluss in zwei Passagen. Für einen detaillierteren Kurvenverlauf wurden die Zellen über 10 Druckstufen in einem Bereich von 50 bis 1800 bar aufgeschlossen. Um den prozessbedingten Temperaturanstieg zu minimieren, wurde ein Wärmetauscher am Auslass zugeschaltet. In Anhang 11 sind die OD_{600} -Messwerte angegeben.

In Abb. 20a festzustellen, dass die Enzymaktivitäten mit ansteigenden Druckwerten zunehmen, wobei die Werte im Bereich von 1000 bar bis 1600 bar sich annähern, jedoch kein eindeutiges Plateau bilden. Abgesehen von dem Messwert von $4,31 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 600 bar nimmt die Enzymaktivität von $0,30 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 50 bar auf $8,90 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 1600 bar kontinuierlich zu. Bei dem Maximaldruck von 1800 bar ist ein Rückgang der Enzymaktivität auf $7,03 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ zu beobachten. Die Enzymaktivität der intakten Hefeprobe beträgt $0,02 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ und ist vergleichbar mit anderen Werten niedrig. Bei den Ergebnissen der zweiten Passage ist ebenfalls ein Anstieg der Enzymaktivität von $0,44 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ auf $7,24 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ festzustellen, gefolgt von einem Rückgang auf $5,58 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 600 bar (s. Abb. 19b). Im weiteren Verlauf nähern sich die Werte im Bereich von 800 bar bis 1600 bar an und liegen somit zwischen $8,49 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ und $8,28 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$. Bei dem Maximaldruck von 1800 bar ist eine Abnahme auf einen Wert von $7,42 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ zu sehen.



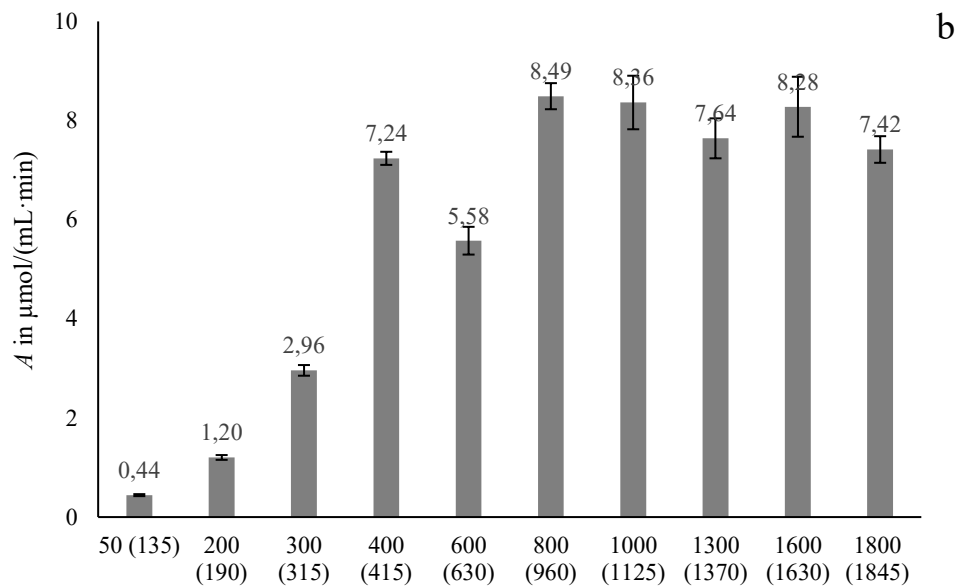
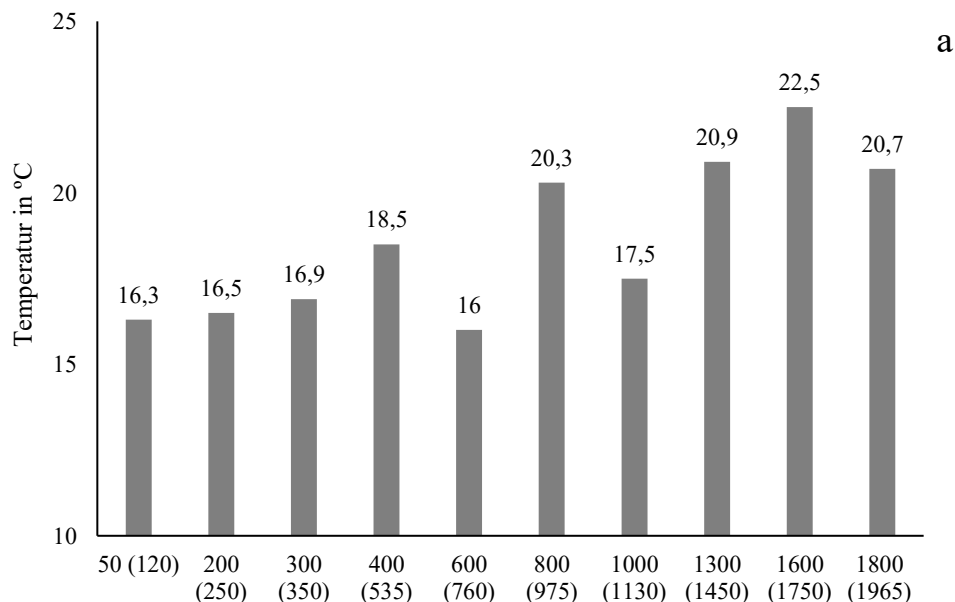


Abb. 19. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH über 10 Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung am Auslass. Dargestellt sind die berechneten Enzymaktivitäten der Proben (A) $\mu\text{mol}/(\text{mol}\cdot\text{min})$ inklusive Fehlerbalken, aufgetragen gegen die Solldrücke für a) die erste Passage und b) die zweite Passage. In Klammern sind jeweils die gemessenen Ist-Druckwerte angegeben. Die Skalierung der x-Achse ist in bar.

Abb. 20 zeigt die gemessenen Temperaturen während des Aufschlusses. In Abb. 20a steigen die Werte von 16,3 °C auf 22,5 °C an, wobei bei 600 bar und 1000 bar Rückgänge auftreten. Abb. 20b zeigt einen ähnlichen Verlauf, jedoch steigt die Temperatur im oberen Druckbereich und erreicht einen Wert von 24,6 °C bei 1800 bar.



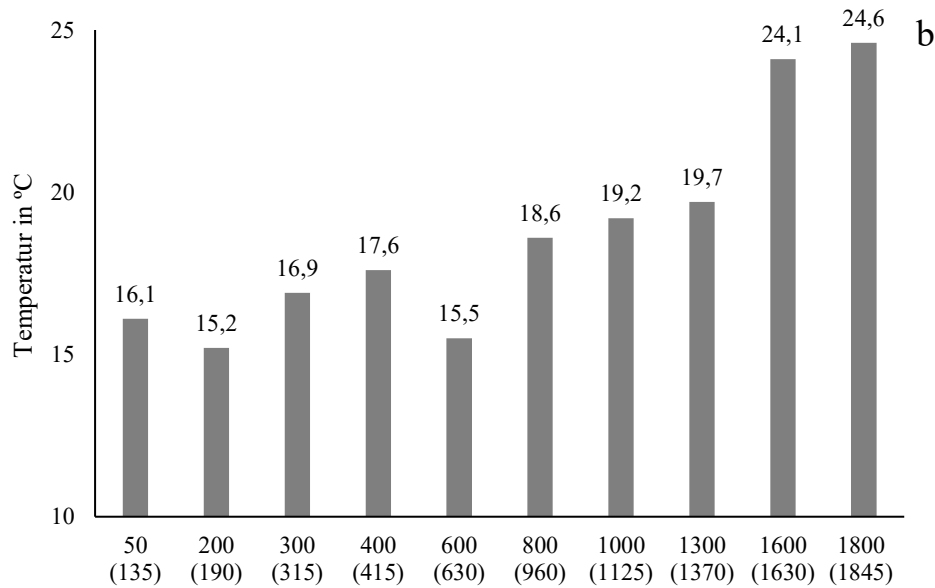


Abb. 20. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH über 10 Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung am Auslass. Dargestellt sind die gemessenen Temperaturwerte der Proben in °C, aufgetragen gegen die Soll-drücke für a) die erste Passage und b) die zweite Passage. In Klammern sind jeweils die gemessenen Ist-Druckwerte angegeben. Die Skalierung der x-Achse ist in bar.

In Tab. 11a und Tab. 11b sind die während der Proteinbestimmung erfassten Extinktionen (Rohdaten und die berechneten Daten) für die Mikrotiterplatte 1 und 2 (Passage 1) dargestellt. Die Pipettierschemas für die Passagen 1 und 2 sind im Anhang 7 und 8 aufgeführt. Die Roh- und die berechneten Werte der Proteinbestimmung inklusive der Standardkurven für die zweite Passage sind im Anhang 9 zu finden.

In Abb. 21 sind die Standardkurven abgebildet, über die die Proteinkonzentrationen der Proben nach der ersten Passage berechnet wurde. Die Rohdaten sind im Anhang 8 aufgeführt. Mithilfe der Extinktionswerten der Standardlösungen wurden eine Standardkurve für jede der zwei Mikrotiterplatten ermittelt. Jede Standardkurve wurde hinsichtlich des Linearitätsbereiches mit einem Wert $R^2 > 0,99$ untersucht. Über die Gleichung der jeweiligen Regressionsgeraden wurden anschließend die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

Tab. 11a. Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, Passage 1, mit Kühlung: Berechnung der Proteinkonzentrationen aus Rohdaten (Mikrotiterplatte 1: Proben von 50 bar bis 800 bar)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,512	1,346	1,138	0,916	0,716	0,445	0,29	0,175	0,138	0,096	0,084	0,085
	B	1,49	1,409	1,06	0,909	0,679	0,429	0,276	0,171	0,156	0,093	0,081	0,083
	C	0,528	0,504	0,488	0,186	0,188	0,183	0,138	0,136	0,135	0,109	0,112	0,111
	D	1,014	0,971	0,943	0,306	0,309	0,304	0,21	0,207	0,212	0,139	0,151	0,15
	E	1,351	1,27	1,231	0,42	0,422	0,419	0,273	0,27	0,276	0,171	0,177	0,185
	F	2,226	1,995	1,986	0,817	0,807	0,778	0,5	0,531	0,52	0,306	0,318	0,34
	G	1,963	1,85	1,788	0,655	0,622	0,634	0,412	0,422	0,421	0,241	0,254	0,27
	H	2,384	2,252	2,232	0,978	0,995	0,98	0,642	0,641	0,647	0,384	0,387	0,409
Leerwert abgezogen	A	1,429	1,263	1,055	0,833	0,633	0,362	0,207	0,092	0,055	0,013	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,407	1,326	0,977	0,826	0,596	0,346	0,193	0,088	0,073	0,010		
	C	0,445	0,421	0,405	0,103	0,105	0,100	0,055	0,053	0,052	0,026	0,029	0,028
	D	0,931	0,888	0,860	0,223	0,226	0,221	0,127	0,124	0,129	0,056	0,068	0,067
	E	1,268	1,187	1,148	0,337	0,339	0,336	0,190	0,187	0,193	0,088	0,094	0,102
	F	2,143	1,912	1,903	0,734	0,724	0,695	0,417	0,448	0,437	0,223	0,235	0,257
	G	1,880	1,767	1,705	0,572	0,539	0,551	0,329	0,339	0,338	0,158	0,171	0,187
	H	2,301	2,169	2,149	0,895	0,912	0,897	0,559	0,558	0,564	0,301	0,304	0,326
Berechnung über die Gleichung* in µg/mL	C	378,14	354,10	338,08	35,59	37,60	32,59	-12,48	-14,49	-15,49	-41,53	-38,53	-39,53
	D	864,92	821,85	793,80	155,78	158,79	153,78	59,63	56,63	61,63	-11,48	0,54	-0,47
	E	1202,46	1121,33	1082,26	269,97	271,97	268,97	122,73	119,73	125,74	20,57	26,58	34,59
	F	2078,86	1847,49	1838,47	667,60	657,59	628,54	350,09	381,14	370,13	155,78	167,80	189,84
	G	1815,44	1702,25	1640,16	505,34	472,29	484,31	261,95	271,97	270,97	90,68	103,70	119,73
	H	2237,11	2104,90	2084,87	828,86	845,89	830,86	492,32	491,32	497,33	233,91	236,91	258,95

Tab. 11b. Aufschluss mit dem HDH: Berechnung der Proteinkonzentrationen aus Rohdaten (Mikrotiterplatte 1: Proben von 1000 bar bis 1800 bar, intakte Hefe).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,711	1,597	1,283	1,06	0,804	0,493	0,321	0,191	0,148	0,101	0,09	0,09
	B	1,682	1,556	1,256	1,026	0,764	0,477	0,298	0,189	0,142	0,103	0,09	0,089
	C	2,489	2,551	2,49	1,359	1,346	1,258	0,85	0,85	0,848	0,481	0,495	0,511
	D	2,592	2,539	2,482	1,403	1,432	1,396	0,919	0,92	0,923	0,516	0,529	0,538
	E	2,641	2,624	2,543	1,484	1,492	1,479	1	0,987	1,009	0,567	0,582	0,587
	F	2,706	2,717	2,564	1,731	1,716	1,67	1,119	1,142	1,15	0,622	0,656	0,701
	G	0,483	0,461	0,449	0,174	0,181	0,171	0,132	0,13	0,131	0,104	0,115	0,11
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,048	0,047	0,049	0,053	0,049	0,049	0,049	0,046
Leerwert abgezogen	A	1,621	1,507	1,193	0,970	0,714	0,403	0,231	0,101	0,058	0,011	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,592	1,466	1,166	0,936	0,674	0,387	0,208	0,099	0,052	0,013		
	C	2,399	2,461	2,400	1,269	1,256	1,168	0,760	0,760	0,758	0,391	0,405	0,421
	D	2,502	2,449	2,392	1,313	1,342	1,306	0,829	0,830	0,833	0,426	0,439	0,448
	E	2,551	2,534	2,453	1,394	1,402	1,389	0,910	0,897	0,919	0,477	0,492	0,497
	F	2,616	2,627	2,474	1,641	1,626	1,580	1,029	1,052	1,060	0,532	0,566	0,611
	G	0,393	0,371	0,359	0,084	0,091	0,081	0,042	0,040	0,041	0,014	0,025	0,020
	H	-0,043	-0,042	-0,043	-0,043	-0,042	-0,043	-0,041	-0,037	-0,041	-0,041	-0,041	-0,044
Berechnung über die Gleichung* in µg/mL	C	2002,04	2055,20	2002,90	1033,25	1022,10	946,66	596,86	596,86	595,15	280,51	292,51	306,23
	D	2090,35	2044,91	1996,04	1070,97	1095,84	1064,97	656,02	656,88	659,45	310,51	321,66	329,37
	E	2132,36	2117,78	2048,34	1140,42	1147,28	1136,13	725,46	714,32	733,18	354,24	367,10	371,38
	F	2188,09	2197,52	2066,34	1352,18	1339,32	1299,88	827,49	847,21	854,07	401,39	430,54	469,12
	G	282,22	263,36	253,07	17,30	23,30	14,73	-18,71	-20,42	-19,56	-42,71	-33,28	-37,57
	H	2002,04	2055,20	2002,90	1033,25	1022,10	946,66	596,86	596,86	595,15	280,51	292,51	306,23

In Tab. 12 sind die einzelnen Extinktionen mit den bekannten Konzentrationen der BSA-Lösung dargestellt. Anhand dieser Daten wurden die Standardkurven gebildet (Abb. 21). Bei jeder Standardkurve wurde ein linearer Bereich mit einem Wert $R^2 > 0,99$ ermittelt. Mithilfe der Gleichung der jeweiligen Regressionsgeraden (gestrichelte Trendlinie) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

Tab. 12. Proteinbestimmung (HDH über zehn Druckstufen, Passage 1, mit Kühlung): Die während der Messung erfassten Messpunkte der Standardkurve 1 und 2. Fett hervorgehoben ist der lineare Bereich, der zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet wurde.

1	Endkonzentration von BSA in µg/ml	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
	OD ₄₉₂	1,418	1,294	1,016	0,829	0,614	0,354	0,200	0,090	0,064	0,011
2	Endkonzentration von BSA in µg/ml	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
	OD ₄₉₂	1,607	1,487	1,180	0,953	0,694	0,395	0,220	0,100	0,055	0,012

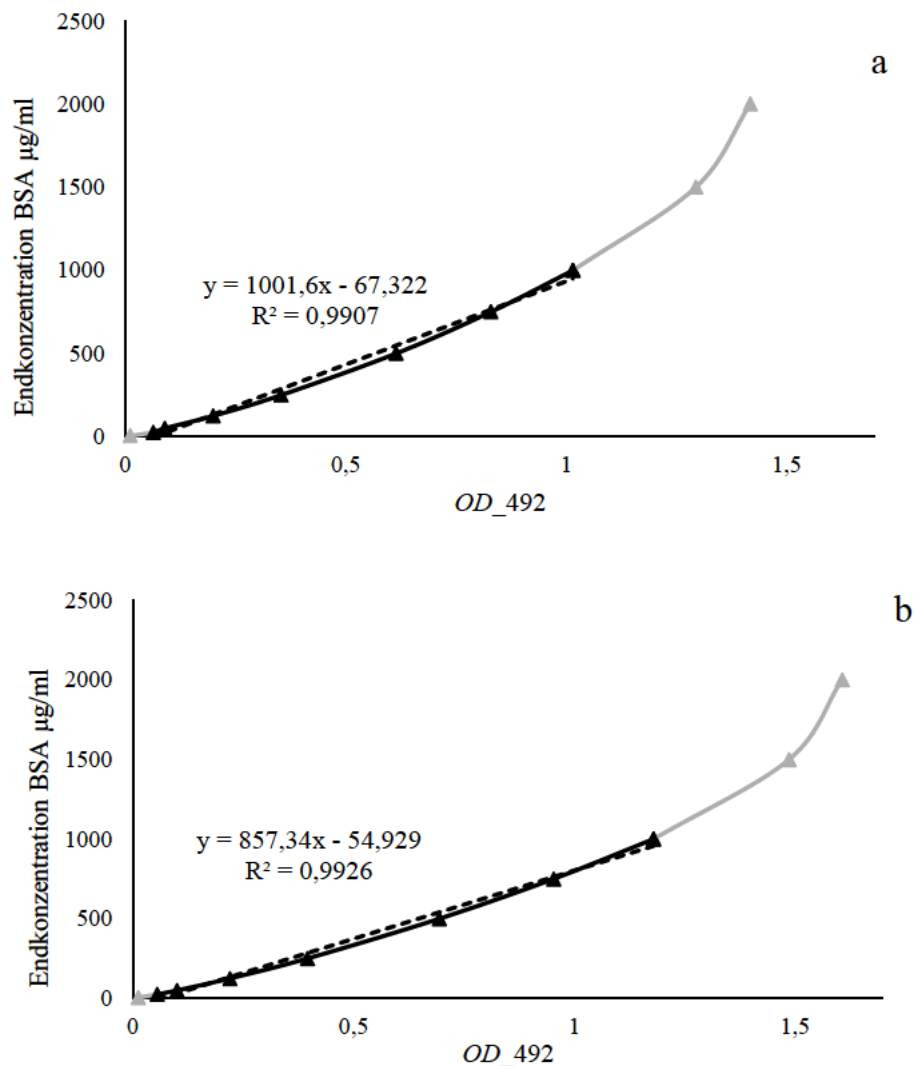


Abb. 21. Standardkurven zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind die Regressionsgeraden mit dem jeweils definiertem linearen Bereich für: a) Proben der Druckstufen 50 bar bis 800 bar (Mikrotiterplatte 1) sowie b) Proben der Druckstufen 1000 bar und 1800 bar sowie der intakten Hefe (Mikrotiterplatte 2). Die einzelnen Messpunkte der Standardkurven sind im Anhang 8 zu finden.

In Tab. 13 sind die berechneten Proteinkonzentrationen dargestellt.

Tab. 13. Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufe, in zwei Passagen, mit Kühlung: Die unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe berechneten Proteinkonzentrationen.

Soll- Druck in bar	Ist-Druck in bar (Passage 1)	Proteinkonzentration in mg/mL	Abweichung	Ist-Druck in bar (Passage 2)	Proteinkonzentration in mg/mL	Abweichung
50	120	0,71	0,04	135	0,87	0,06
200	150	1,65	0,07	190	1,59	0,07
300	350	2,70	0,02	315	3,21	0,03
400	535	6,51	0,20	415	8,64	1,20
600	660	4,87	0,17	630	5,70	0,07
800	975	8,35	0,09	960	12,32	0,04
1000	1130	11,93	0,02	1125	15,66	0,01
1300	1450	13,15	0,04	1370	16,46	0,01
1600	1750	14,49	0,19	1630	16,47	0,02
1800	2000	16,86	0,28	1845	18,99	0,02
intakte Hefe	intakte Hefe	0,53	0,03			

In Abb. 22 sind die Proteinkonzentrationen der Proben im Zusammenhang mit den Druckstufen in der ersten sowie in der zweiten Passage dargestellt. In Abb. 22a ist eine konsequente Zunahme an Proteinmenge mit steigenden Arbeitsdrücken festzustellen. Die Werte erhöhen sich von 0,71 mg/mL bei 50 bar auf 16,86 mg/mL bei 1800 bar, wobei die Proteinkonzentration bei 600 bar auf einen Wert von 4,87 mg/mL absinkt. Die intakte Hefeprobe zeigte einen Messwert von 0,53 mg/mL und stellt somit den geringsten Wert dar. In der zweiten Passage ist ebenfalls ein Anstieg der Proteinkonzentration mit zunehmenden Druckwerten zu erkennen (Abb. 22b). Die Werte steigen von 0,87 mg/mL auf einen Maximalwert von 18,99 mg/mL, wobei der Wert bei 600 bar einen Rückgang auf 5,70 mg/mL aufweist und sich die Werte zwischen 1000 bar und 1600 bar annähern.

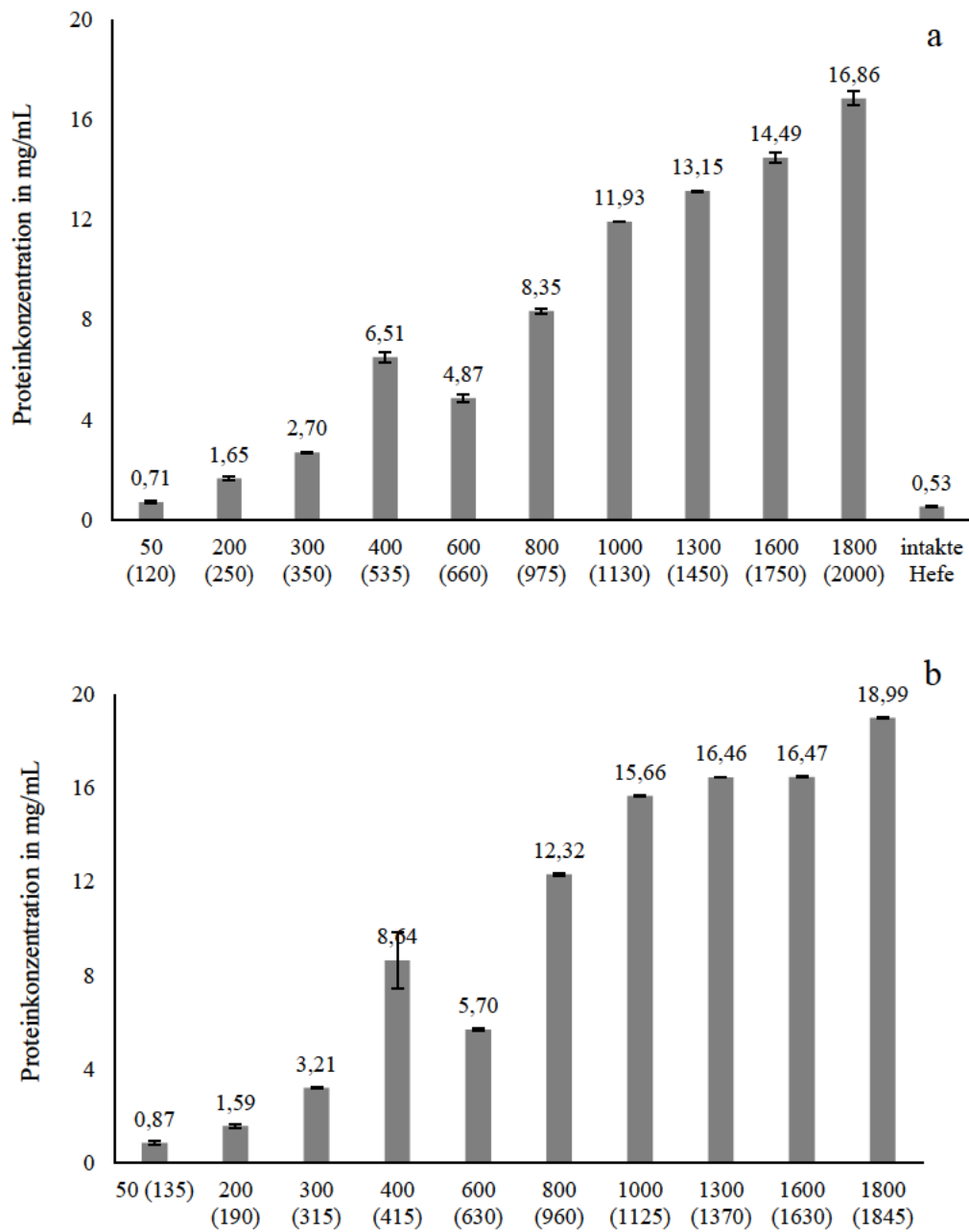


Abb. 22. Ergebnisse des Zellaufschlusses mit dem HDH über 10 Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung am Auslass. Dargestellt sind die berechneten Proteinkonzentrationen der Proben in mg/mL inklusive Fehlerbalken, aufgetragen gegen die Solldrücke für a) die erste Passage und b) die zweite Passage. In Klammern sind jeweils die gemessenen Ist-Druckwerte angegeben. Die Skalierung der x-Achse ist in bar.

Die Bestimmung des OD₆₀₀-Messwertes im linearen Bereich erfolgte über eine serielle Verdünnungsreihe. Während der Messung der unverdünnten Probe 3,71 ergab, wurde durch Verdünnung 1:200 ein Messwert von 0,67 ermittelt. Daraus ergibt sich ein rechnerischer Wert von 134 für die Ausgangssuspension. Die Rohdaten sind im Anhang 12 aufgeführt.

4.3.3 Vergleich der Ergebnisse FP vs. HDH

Die Zellaufschlüsse sowohl mit dem HDH als auch mit der FP zeigen mit zunehmendem Arbeitsdruck einen Anstieg der Proteinkonzentration sowie der Enzymaktivität (s. Tab. 10). Erkennbar ist, dass der HDH bereits bei geringeren Druckstufen höhere Messwerte erzielt als die FP. Während mit der FR ihre maximale Enzymaktivität von $7,09 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei einem Arbeitsdruck von 2000 bar erreicht wird, liefert der HDH bei einem Solldruck von 1600 bar ein Maximum von $8,49 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 2000 bar. Ähnlich ist es ebenfalls bei der Proteinbestimmung: Hier erreicht die FP bei dem maximalen Druck von 2500 bar eine Konzentration von $8,02 \text{ mg/mL}$. Mit dem HDH wird eine maximale Proteinkonzentration von $16,86 \text{ mg/mL}$ bereits bei einem Solldruck von 1800 bar erreicht.

Hinsichtlich der Enzymaktivität tritt die Plateaubildung bei dem HDH im Vergleich zu der FP bei niedrigeren Druckstufen ein. Bei der FP wird das Plateau erst an der oberen Grenze des Messbereiches. Bei den Druckstufen im höheren Bereich ist bei den Beiden Geräten eine Abnahme der Enzymaktivität zu beobachten, wobei dieser bei dem HDH ausgeprägter ist.

Der Temperaturverlauf ist bei den beiden Systemen ähnlich und während des Aufschlusses ohne Kühlung ungefähr gleiche Werte erreicht werden. Der Temperaturbereich bei der FP liegt im Bereich zwischen $21,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $34,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei dem HDH ohne Kühlung ist dieser Bereich von $24,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $36,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Versuche mit dem HDH mit Kühlung am Auslass liefern die Temperaturwerte im Bereich von $12,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in der ersten Passage und mit einem maximalen Wert von $24,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in der zweiten Passage. Im Vergleich bei ähnlichen Solldruckwerten liegen sowohl die Enzymaktivitäten als auch die Proteinkonzentrationen bei dem Einsatz des HDH über den Werten der FP.

Tab. 10. Vergleich der Hauptprozessparameter im Einsatz des HDH und der FP.

Parameter	French Press (FP)	Hochdruckhomogenisator (HDH)
Untersuchter Druckbereich	250 bar -2500 bar	50 bar -1800 bar
Max. Enzymaktivität	7,09 $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 2000 bar	8,90 $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bei 1600 bar (1. Passage)
Max. Proteinkonzentration	8,02 mg/mL bei 2500 bar	16,86 mg/mL bei 1800 bar (1. Passage) 18,99 mg/mL bei 1800 bar (2. Passage)
Temperaturbereich	21,5 °C – 34,4 °C	24,1 °C – 36,6 °C (1. Passage ohne Kühlung) 12,4 °C – 20,7 °C (1. Passage mit Kühlung) 16,1 °C – 24,6 °C (2. Passage mit Kühlung)

4.3.4 Reproduzierbarkeit und Handhabung im Praktikum

Hinsichtlich der Handhabung im Laboralltag zeigten sich verfahrensbedingte Unterschiede zwischen dem Hochdruckhomogenisator und der French Press. Während die FP ein manuelles Befüllen und Entlüften der Messzelle erforderte, ermöglichte der HDH eine kontinuierliche Probenführung. Ein wesentlicher Unterschied lag in den benötigten Suspensionsvolumina: Die French Press erlaubte die Verarbeitung nur kleiner Volumina, wohingegen der Hochdruckhomogenisator auf größere Volumina angewiesen war. Da bei der FP das für die Probenahme benötigte Volumen in kurzer Zeit verarbeitet wurde, stellte die Einstellung des Probenventiles eine Herausforderung dar, wobei die Druckeinstellung einwandfrei lief. Bei dem HDH war die exakte Druckeinstellung mittels Ventiles hingegen problematisch, jedoch ermöglichte die digitale Anzeige eine Überwachung der Soll- und Ist-Druckwerte. Da die gemessenen Ist-Druckwerte nach der Zufuhr der Hefesuspension von den Soll-Drücken häufig abwichen, konnten dank der digitalen Anzeige genaue Versuchsbedingungen dokumentiert werden, was eine bessere Auswertung der Reproduzierbarkeit erlaubte. Außerdem trug das größere Probenvolumen bei dem HDH zur Stabilisierung des Systems bei, da die Druckschwankungen während des Betriebes besser kompensiert werden konnten.

5. Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse

Der Vergleich der Systeme verdeutlicht die signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aufschlusseffizienz von *S. cerevisiae*. Während die French Press eine maximale Proteinkonzentration von 8,02 mg/mL erst bei dem Betriebsdruck von 2500 bar erreicht, schafft der HDH auf vergleichbare Werte bereits bei Arbeitsdrücken im mittleren Messbereich ab ca. 1000 bar zu kommen. Diese Beobachtung lässt sich auf die unterschiedlichen physikalischen Prinzipien der Geräte zurückführen. Bei der FP tritt die Hefesuspension aus der Messzelle durch das Nadelventil aus, wodurch starke Scherkräfte entstehen, die die Zellwände zerstören. Die Ventilgeometrie des HDH erzeugt eine Kombination aus Scher- sowie Prallkräften und Druckdifferenzen zwischen dem eingestelltem Druck und dem Umgebungsdruck. Die dabei entstehenden Turbulenzen und der hoher Energieeintrag sind hoch, und somit in der Lage, die robuste Zellwand von der Bäckerhefe effektiver zu destabilisieren.

Ein zentraler Kernpunkt der Interpretation der Ergebnisse stellt der Verlauf der G6PDH-Enzymaktivität. Auffällig ist, dass das Plateau bei dem HDH bereits ab einem Arbeitsdruck von ca. 1000 bar eintritt. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Versuchsbedingungen der Großteil der intrazellulären Enzyme bereits freigesetzt wurde. Oberhalb des Plateaus sinkt die Enzymaktivität wieder ab. Ein weiterer Anstieg des Arbeitsdruckes führt somit nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Ausbeute führt, sondern steigert lediglich die mechanische und thermische Belastung der Suspension. Dies resultiert in einer Inaktivierung bzw. Denaturierung der Proteine. Im Gegensatz dazu zeigt die French Press einen kontinuierlichen Anstieg der Enzymaktivität bis zum Messbereichsende, ohne dass ein deutlicher Abfall eintritt. Dies lässt darauf schließen, dass das volle Potenzial der French Press bei 2500 bar noch nicht ausgeschöpft war und die Zellen weniger stark beansprucht wurden als bei dem Hochdruckhomogenisator.

Bemerkenswert ist zudem die Korrelation von Temperatur- und Enzymaktivität. Da der mechanische Aufschluss ein energieintensiver Prozess ist, wird ein Großteil der Energie in Wärme umgewandelt. Trotz der Kühlung am Auslass beim HDH steigt die Temperatur mit zunehmendem Druck moderat an. In den Versuchen ohne Kühlung stieg die Temperatur bei der French Press um 60,0 % und bei dem Hochdruckhomogenisator um 51,8 % an. Die Untersuchung zeigt, dass die Abnahme der Enzymaktivität bei einer einmaligen Passage primär durch die mechanische Beanspruchung und weniger durch die erzeugte Wärme hervorgerufen

wurde. Dies wird dadurch belegt, dass die Enzymaktivitäten bei ähnlichen Druckstufen unabhängig von der Kühlung nahezu deckungsgleiche Werte aufwiesen. Daraus lässt sich folgen, dass die prozessbedingte Temperaturerhöhung bei einer Einzelpassage noch keinen kritischen Parameter für eine thermische Inaktivierung erreicht und die Kühlung für die Ergebnisse des Aufschlusses mit einer Passage keine signifikante Rolle spielt.

Der Aufschluss in zwei Passagen liefert wichtige Informationen zur Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Abb. 17 zeigt, dass die maximale Enzymaktivität von $8,90 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ bereits im ersten Durchgang bei einem Druck von 1600 bar erreicht wird. Im zweiten Durchlauf werden restliche intakte Hefezellen aufgeschlossen, was zu einem weiteren Anstieg der Proteinkonzentration um 12,6 % führt. Gleichzeitig führt dies zur Abnahme der Enzymaktivität. Die erneute mechanische Beanspruchung führt zwar zum Zuwachs an neu freigesetztem Protein, zerstört allerdings das bereits freigesetzte Produkt. Ab diesem Punkt überbietet die Zerstörung des Zielproduktes den Gewinn durch den Aufschluss. Dementsprechend lässt sich schließen, dass eine zweite Passage für *S. cerevisiae* wirtschaftlich nicht zielführend ist.

Während der Versuchsreihe traten einige Faktoren wie Druckentspannung, lautes Quietschen und stoßartige Vibrationen auf, die die Datenqualität beeinflussten. Während des Aufschlusses in zwei Passagen kam es durch eine plötzliche Ventillockerung zu einer Druckentspannung. Dies spiegelt sich in dem Rückgang der Enzymaktivität, der Temperatur und der Proteinkonzentration wider (s. Abb. 19, 20, 22). Trotz der Nachjustierung auf einen Ist-Druckwert von 660 bar konnte für diesen Druckpunkt vorgesehene Beanspruchung nicht vollständig gewährleistet werden.

Im Vergleich zu Leitungswasser wurde bei der Verwendung der Hefesuspension ein höherer Widerstand im System beobachtet. Die Freisetzung von Proteinen erhöht die Viskosität des Mediums, was zu einer Druckerhöhung während des Aufschlusses führt. Während der zweiten Passagen bauten sich im Vergleich zur ersten Passage niedrigere Ist-Drücke auf. Vermutlich führt der initiale Temperaturanstieg zur Abnahme der Viskosität. Zudem können kleinere Zellfragmente und eine homogenere Verteilung der Partikel zu einem geringeren Strömungswiderstand beitragen.

Durch die Wahl der Druckstufen wurde erreicht, die Freisetzung der Zellinhalte möglichst über den gesamten Arbeitsbereich anschaulich abzubilden. Da Vorversuche mit Anfangsdruckbereich von 200 bar einen sprunghaften Anstieg zeigten, wurde die Druckspanne

erweitert. Mit der Aufnahme niederer Druckstufen von 50 bar bis zum Maximaldruck von 1800 bar wurde gelang es, den Kurvenverlauf von der initialen Freisetzung bis zum Erreichen des Plateaus und der anschließender Abnahme der Enzymaktivität detailliert zu erfassen.

Alle während der OD600-Messung erfassten Messdaten liegen nah beieinander. Dies spricht für eine reproduzierbare Probenvorbereitung und dafür, dass die angesetzten Hefesuspensionen ähnliche Konzentrationen auswiesen.

5.2 Eignung des Hochdruckhomogenisators als Ersatz der French Press im Praktikum

Ein entscheidendes Kriterium für die Eignung des Hochdruckhomogenisators als Ersatz der French Press im Praktikum ist die Effizienz des Aufschlusses. Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem HDH bereits mit ca. 1000 bar eine Proteinkonzentration erreicht werden kann, für die die French Press einen Arbeitsdruck von 2500 bar benötigt. Dies deutet darauf hin, dass der HDH in der Lage ist, die widerstandsfähige Zellwand von *S. cerevisiae* effektiver zu destabilisieren. Für das Praktikum bedeutet das, dass die Lernziele in einem technisch günstigeren Druckbereich erreicht werden können, ohne das Gerät jedes Mal an die Belastungsgrenze zu bringen. Des Weiteren zeigte der Aufschluss mit der FP einen kontinuierlichen Anstieg ohne ein eindeutiges Plateau, wobei der HDH eine Darstellung eines detaillierteren Prozessverlaufes erlaubte. Die Druckspanne von 50 bar bis 1800 bar liefert einen vollständigen Ablauf des Aufschlusses, indem die Freisetzung gleichmäßig ansteigt, in ein Plateau übergeht und im hohen Druckbereich aufgrund der mechanischen und thermischen Belastung wieder absinkt. Diese Informationen hinsichtlich der Proteindenaturierung ist für Studierende didaktisch wertvoll, da sie die Grenzen des Prozesses zeigen.

Die physikalischen Prinzipien des HDH wie Kombination aus Druckdifferenzen und Scher- sowie Prallkräften sorgen im Vergleich zur FP zu einer sicheren Stabilität während des Aufschlusses. Der Druck wird bei der FP mit einem Hebel eingestellt und läuft einwandfrei. Der Erfolg des Aufschlusses bei der FP ist jedoch stark von dem manuellen Nachjustieren des Probeventiles abhängig, wodurch ein weiterer Prozessparameter in den Prozess eingebracht wird, der die Ergebnisse beeinflusst. Bei dem HDH ist hingegen das Ventil zur Einstellung der Druckstufe mit Feintuning verbunden, wobei die Ventilgeometrie automatisiert ist. Dies wird aber durch die Anzeige der Druckänderung (Soll-/Istwert) kompensiert. Die Möglichkeit, die Prozessbedingungen zu dokumentieren, kann die Auswertung der Ergebnisse erleichtern. Zudem wird bei dem HDH mit größeren Suspensionsvolumina gearbeitet. Dies alles spricht für

eine geringere Fehleranfälligkeit und eine stabilere Reproduzierbarkeit des HDH im Vergleich zur FP.

Der ungekühlte Aufschluss zeigten ähnliche Werte für Enzymaktivität und die Temperatur sowohl bei der FP als auch bei dem HDH, jedoch erzielte der HDH eine fast doppelt so hohe Proteinkonzentration. In Versuchen mit Wärmeabfuhr lieferte der HDH hinsichtlich der Enzymaktivität sowie der Proteinkonzentration im Vergleich zu Versuchen ohne Kühlung vergleichbare quantitative und qualitative Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass die Kühlung während des Aufschlusses von *S. cerevisiae* in einer Passage keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis hat. Dennoch spricht die optionale Kühlung am Auslass des HDH für seine vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten.

Der Hochruckhomogenisator eignet sich hervorragend als Ersatz für die French Press im Praktikum. Das Gerät verfügt über eine höhere Aufschlusseffizienz sowie eine bessere Reproduzierbarkeit, liefert wichtige Informationen über Ausbeutegrenzen und modernisiert damit den gesamten Versuchsablauf.

5.3 Implementierung im Praktikum: Grenzen und mögliche Optimierungen des Versuches

Ein Kernaspekt der Implementierung des HDH im Praktikum ist seine mechanische Zuverlässigkeit im Dauerbetrieb. Während der Versuchsreihen traten ab einem Druck von ca. 600 bar Unregelmäßigkeiten in Form einer spontanen Ventillockerung auf, die zu plötzlicher Druckentspannung führte. Außerdem waren während des Betriebes kurzzeitiges Quietschen und stoßartige Vibrationen zu beobachten.

Wie in den Ergebnissen dargestellt, beeinflussen diese Druckschwankungen die Qualität der Messdaten direkt. Für den Einsatz im Praktikum stellt dies einen kritischen Punkt dar, da Studierende ohne praktische Erfahrung mit dem Gerät während des Versuches Schwierigkeiten hinsichtlich der Handhabung haben und dementsprechend Abweichungen sowie fehlerhafte Datenreihen erfassen können. Dies könnte den Erfolg des Zellaufschlusses infrage stellen. Die Ursache für diese Instabilität konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, deutet jedoch auf ein technisches wartungsrelevantes Problem im Inneren des Gerätes hin. Um eine einwandfreie Implementierung des HDH zu gewährleisten, ist eine fachtechnische Überprüfung des Gerätes zwingend erforderlich. Die Revision durch einen Techniker der Firma GEA Soavi ist für den Sommer 2026 geplant.

Die methodische Herangehensweise könnte zudem eine Optimierung hinsichtlich der zeitversetzten Probenprozessierung erfordern. Während die initiale Aktivierung der Hefe mit Glycerin ca. 10 Minuten festgelegt war, führte der sequentielle Aufschluss über mehrere Druckstufen dazu, dass spätere Proben im Laufe einer längeren Inkubationszeit ausgesetzt waren. Theoretisch könnte dies die Werte für Enzymaktivitäten sowie der Proteinkonzentrationen beeinflussen. Jedoch liegt der Fokus des Praktikumsversuches auf dem Erlernen der technischen Handhabung des Gerätes und dem Gesamtverlauf des Aufschlusses und dem qualitativen Gesamtverlauf des Aufschlusses und weniger auf der exakten quantitativen Bestimmung einzelner Parameter. Daher blieb die Vergleichbarkeit der Proben innerhalb der Datenreihen gewahrt. Eine theoretische Optimierungsmöglichkeit wäre das separate zeitversetzte Ansetzen der Hefesuspensionen vor jeder Druckstufe mit jeweiliger Inkubationszeit von 10 Minuten. Diese Vorgehensweise ist jedoch aufgrund des engen Zeitrahmens der nachfolgenden Analytik bedingt realistisch. Alternativ könnte in Vorversuchen geprüft werden, ob die Inkubationszeit über einen Zeitraum von beispielsweise zwei Stunden überhaupt eine signifikante Änderung bewirkt.

6. Fazit und Ausblick

6.1 Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen dieser Abschlussarbeit ist es gelungen, den Versuch aus dem ARV Praktikum „Zellaufschluss von *S. cerevisiae*“ erfolgreich von der French Press auf den Hochdruckhomogenisator zu übertragen. Dabei wurden sowohl technische Aspekte berücksichtigt als auch eine fundierte Methodik für den zukünftigen Einsatz im ARV Praktikum entwickelt. Der wissenschaftliche Vergleich der beiden Systeme zeigte, dass der HDH einen effizienteren Zellaufschluss bei nahezu gleichen Versuchsbedingungen erzielt als die French Press.

Durch die systematische Untersuchung der Prozessparameter wie Anzahl der Druckstufen sowie der Passagen und der Einsatz der Kühlung am Auslass konnte eine reproduzierbare Methodik etabliert werden. Diese spiegelt den gesamten Aufschlussverlauf wider, beginnend bei der initialen Freisetzung der Zellinhalte bei niedrigen Drücken bis hin zur prozessbedingten Inaktivierung der Proteine (am Beispiel der G6PDH). Dabei wurde ebenfalls das Prozessoptimum bestimmt, welches einen wirtschaftlichen Kompromiss zwischen Produktmenge bzw. -qualität und dem erforderlichen Energiebedarf darstellt.

Es ist hervorzuheben, dass die aufgetretenen mechanische Instabilitäten des HDH, wie spontane Ventillockerung, lautes Quietschen und Stoßvibrationen, die entwickelte Methodik nicht entwerten. Diese mechanischen Auffälligkeiten wurden als singuläre, wartungsbedingte Phänomene identifiziert, die technisch behoben werden können. Trotz der technischen Einschränkung belegen die Ergebnisse eine klare, reproduzierbare Tendenz und bestätigen somit die Eignung des HDH als Ersatz für die FP im Praktikum. Damit liefert diese Abschlussarbeit die wissenschaftliche Basis, um den Versuch auf ein effizienteres und moderneres System zu übertragen.

6.2 Ausblick und mögliche Weiterentwicklungen des Versuches

Basierend auf den ermittelten Erkenntnissen bieten sich verschiedene Ansätze an, die den bestehenden Versuch zukünftig erweitern könnten. Beispielsweise könnten weitere Versuchsreihen mit mehreren Passagen ohne aktive Kühlung durchgeführt werden. Diese würde wichtige Informationen über die Korrelation zwischen dem Energieeintrag und der thermischen Inaktivierung der Proteine liefern. Im Laufe dieses Versuches könnten Studierende die Abhängigkeit der Enzymaktivität von mechanischer und thermischer Belastung genauer zu dokumentieren.

Eine weitere Entwicklung könnte eine Prozessanpassung zur gezielten Geräteschonung darstellen. Da der Hochdruckhomogenisator im Vergleich zur French Press bereits im niedrigeren Druckbereich eine hohe Aufschlusseffizienz zeigt, wäre eine Versuchsreihe mit mehreren Passagen unterhalb von 1000 bar sinnvoll. Hierbei könnte untersucht werden, ob eine zweifache Passage bei beispielsweise 400 bar eine vergleichbare Ausbeute wie eine Einzelpassage bei 800 bar erzielt. Ein dauerhafter Betrieb im niedrigeren Druckbereich würde die mechanische Belastung auf das Ventil und die Dichtungen des Gerätes signifikant reduzieren und somit eine längere Lebensdauer der Verschleißteile gewährleisten.

Auch wäre der Einsatz einer kombinierten Aufschlussmethode für Studierende interessant. Beispielsweise könnte es mittels einer enzymatischen Vorbehandlung der Hefesuspension mit lytischen Enzymen untersucht werden, ob der benötigte Arbeitsdruck gesenkt werden kann, um bei vergleichbarer Ausbeute eine höhere Produktqualität zu erhalten. Durch die Kombination zweier unterschiedlicher Aufschlussmethoden könnten wertvolle prozesstechnische Erkenntnisse gewonnen werden. Zusätzlich würde der Betrieb bei niedrigeren Druckstufen eine langfristige Schonung des Gerätes ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

Anspach, B., Cornelissen, G., WS25/26. ARV Praktikumsskript.

ARV Skript WS23/24, n.d.

Cazzanelli, G., Pereira, F., n.d. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and Their Role in Human Tumorigenesis.

Chmiel, H., Takors, R., Weuster-Botz, D., n.d. Bioprozesstechnik, 4th ed. Springer Spektrum.

Cornelissen, WS23/24. ARV Vorlesungsskript.

de Oca, M., 2016. YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE.

Gomes, T.A., Zanette, C.M., Spier, M.R., 2020. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 50, 635–654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>

Hinnen, A., Hicks, J., Fink, G., 1978. Transformation of yeast.

Jach, M.E., Serefko, A., Ziaja, M., Kieliszek, M., 2022. Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites* 12, 63. <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>

Kurzweil, P., Kurzweil, L., 2023. *Chemische Analytik und Bioanalytik in Theorie und Praxis*. Springer Vieweg.

Lesage, G., Bussey, H., 2006a. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.

Lesage, G., Bussey, H., 2006b. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317–343. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-05>

Lubran, M.M., n.d. The measurement of total serum proteins by the Biuret method.

Mesa, J., Hinestroza-Córdoba, L.I., Barrera, C., Seguí, L., Betoret, E., Betoret, N., 2020. High Homogenization Pressures to Improve Food Quality, Functionality and Sustainability. *Molecules* 25, 3305. <https://doi.org/10.3390/molecules25143305>

Middelberg, A.P.J., 2000. 2 Microbial Cell Disruption by High-Pressure Homogenization, in: Desai, M.A. (Ed.), *Downstream Processing of Proteins, Methods in Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-027-8_2

Orlean, P., 2012. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* 192, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>

Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A.-S., Hatziloukas, E., 1 Molecular Biology laboratory, Department of Biological applications and Technology, University of Ioannina, Ioannina, Greece, 2 Genetics laboratory, Department of Biological applications and Technology, University of Ioannina, Ioannina, Greece, # These two authors contributed equally, 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* 6, 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Reece, Urry, Cain, Wasserman, Mironsky, Jackson, n.d. Campbell Biologie. PEARSON.

Roti Quant Biuret, n.d.

TeSlaa, T., Ralser, M., Fan, J., Rabinowitz, J.D., 2023. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat Metab* 5, 1275–1289. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00863-2>

Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., Verstrepen, K.J., 2022.

Saccharomyces cerevisiae as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *IJMS* 23, 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>

Walker, G., Stewart, G., 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2, 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

Wojciech, F., 2010. Eine eIF2 verursachte Störung der Translationsinitiation verändert Glukose-gesteuerte Prozesse in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Seligenstadt.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Werken entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.



Diana Belsch

Hamburg, den 06.05.2026

9. Anhang

Anhang 1: Aufschluss mit der FP - Pipettierschema (Proteinbestimmung)

Mikrotiterplatte 1

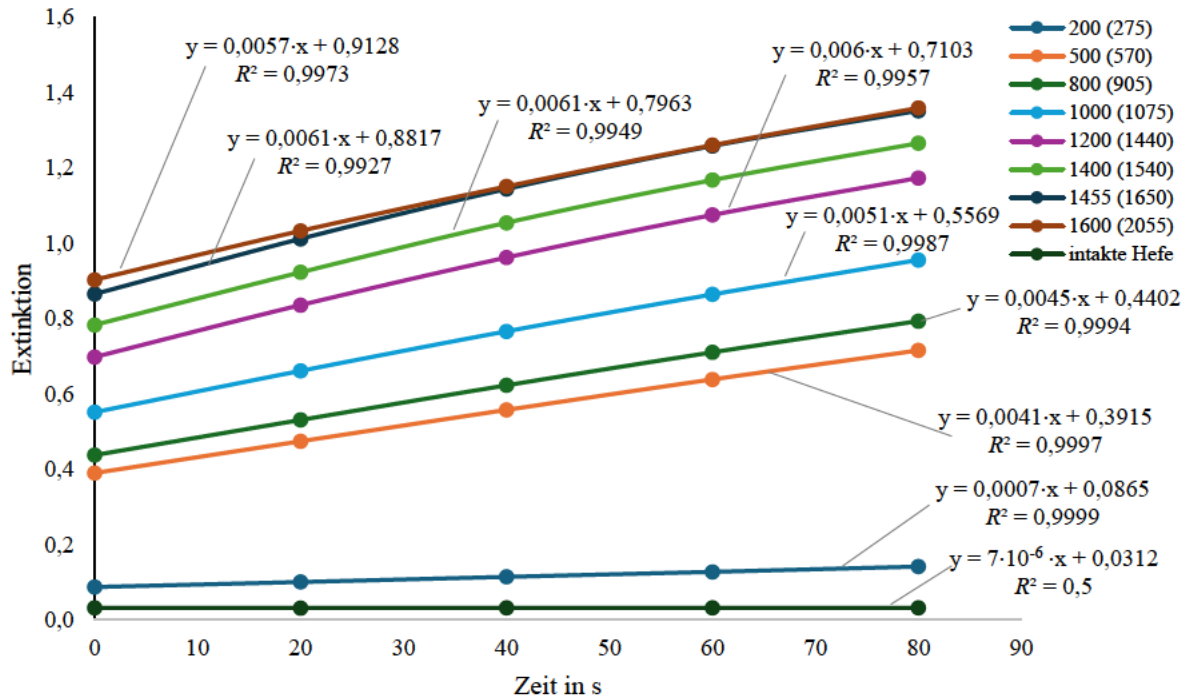
		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,545	1,43	0,993	0,824	0,626	0,388	0,258	0,165	0,131	0,099	0,094	0,096
	B	1,487	1,224	0,963	0,783	0,604	0,374	0,247	0,158	0,122	0,096	0,088	0,095
<i>250 bar</i>	C	0,382	0,362	0,35	0,234	0,244	0,236	0,162	0,156	0,156	0,129	0,128	0,133
<i>500 bar</i>	D	0,258	0,246	0,238	0,17	0,174	0,169	0,126	0,125	0,123	0,106	0,108	0,113
<i>750 bar</i>	E	0,322	0,304	0,297	0,202	0,205	0,204	0,138	0,144	0,142	0,113	0,117	0,123
<i>1000 bar</i>	F	0,37	0,365	0,346	0,211	0,213	0,212	0,141	0,141	0,143	0,116	0,118	0,125
<i>1200 bar</i>	G	0,442	0,429	0,423	0,27	0,276	0,276	0,173	0,177	0,175	0,137	0,142	0,152
<i>1500 bar</i>	H	0,716	0,671	0,643	0,416	0,429	0,421	0,247	0,246	0,245	0,176	0,18	0,195
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 2 : Rot markiert: zusätzliche Verdünnung 1:200 (F1-3: 250 bar, F4-6: 500 bar, F7-9: 750 bar, F10-12: 1000 bar, G1-3: 1200 bar, G4-6: 1500 bar, G7-9: 2000 bar, G10-12: 2500 bar, H1-4: intakte Hefe)

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,614	1,326	1,045	0,856	0,658	0,413	0,285	0,177	0,157	0,108	0,204	0,09
	B	1,494	1,282	1,019	0,848	0,631	0,4	0,228	0,17	0,154	0,105	0,107	0,097
<i>2000 bar</i>	C	0,899	0,818	0,827	0,516	0,534	0,527	0,306	0,314	0,317	0,204	0,225	0,241
<i>2500 bar</i>	D	0,936	0,873	0,852	0,527	0,541	0,538	0,307	0,318	0,321	0,217	0,234	0,254
<i>Intakte Hefe</i>	E	0,192	0,183	0,179	0,14	0,137	0,136	0,114	0,114	0,103	0,106	0,12	0,101
	F	0,12	0,121	0,118	0,105	0,109	0,106	0,111	0,112	0,103	0,113	0,124	0,114
	G	0,133	0,127	0,126	0,145	0,148	0,146	0,169	0,168	0,167	0,176	0,191	0,194
	H	0,108	0,106	0,103	0,111	0,045	0,045	0,045	0,048	0,045	0,045	0,045	0,045
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Anhang 2: Aufschluss mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Enzymkinetik (inkl. Rohdaten)

Gesamtdarstellung der Messpunkte mit linearen Regressionsgeraden



Tabellarische Darstellung der berechneten Extinktionswerte (ermittelt aus Mittelwerten der Rohmesswerte)

Zeit in s	200 (275)	500 (570)	800 (905)	1000 (1075)	1200 (1440)	1400 (1540)	1455 (1650)	1600 (2055)	intakte Hefe
0	0,087	0,389	0,437	0,551	0,697	0,783	0,865	0,903	0,031
20	0,100	0,474	0,530	0,661	0,835	0,922	1,011	1,032	0,031
40	0,114	0,557	0,622	0,766	0,962	1,054	1,144	1,150	0,032
60	0,127	0,638	0,710	0,864	1,075	1,167	1,258	1,260	0,032
80	0,141	0,715	0,793	0,955	1,173	1,265	1,352	1,359	0,032

Die aus gemessenen Extinktionen berechneten Parameter - die Enzymaktivität $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$

	Zeit in s / Parameter	200 (275)	500 (570)	800 (905)	1000 (1075)	1200 (1440)	1400 (1540)	1455 (1650)	1600 (2055)	intakte Hefe
1. Probe im Triplikat	0	0,086	0,412	0,467	0,570	0,709	0,852	0,974	1,072	0,033
	20	0,100	0,498	0,563	0,674	0,840	0,996	1,115	1,209	0,033
	40	0,114	0,581	0,657	0,773	0,961	1,126	1,243	1,333	0,035
	60	0,129	0,663	0,746	0,866	1,070	1,235	1,353	1,438	0,034
	80	0,144	0,738	0,831	0,954	1,165	1,327	1,441	1,530	0,034
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0007	0,0041	0,0046	0,0048	0,0057	0,0059	0,0059	0,0057	0,0000
	R^2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,32
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,02	0,09	0,11	0,11	0,13	0,14	0,14	0,13	0,00
2. Probe im Triplikat	0	0,092	0,382	0,410	0,553	0,699	0,693	0,752	0,767	0,030
	20	0,105	0,464	0,499	0,665	0,839	0,814	0,890	0,888	0,030
	40	0,119	0,545	0,585	0,773	0,967	0,942	1,021	0,995	0,030
	60	0,131	0,625	0,668	0,873	1,081	1,054	1,136	1,105	0,031
	80	0,145	0,703	0,745	0,966	1,180	1,154	1,238	1,207	0,031
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0007	0,0040	0,0042	0,0052	0,0060	0,0058	0,0061	0,0055	0,0000
	R^2	1,000	1,000	0,999	0,999	0,995	0,998	0,996	0,999	0,750
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,015	0,093	0,097	0,120	0,140	0,135	0,141	0,127	0,000
3. Probe im Triplikat	0	0,082	0,374	0,434	0,530	0,684	0,803	0,868	0,869	0,031
	20	0,095	0,459	0,529	0,643	0,827	0,957	1,029	1,000	0,030
	40	0,108	0,545	0,625	0,751	0,957	1,094	1,167	1,123	0,030
	60	0,121	0,626	0,716	0,852	1,073	1,213	1,285	1,237	0,030
	80	0,134	0,704	0,803	0,946	1,174	1,315	1,376	1,340	0,030
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00065	0,004135	0,004625	0,005205	0,00613	0,0064	0,00636	0,005895	-0,00001
	R^2	1,000	1,000	1,000	0,999	0,995	0,994	0,989	0,998	0,500
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,015	0,096	0,107	0,121	0,142	0,148	0,147	0,137	0,000
Mittelwerte	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0007	0,0041	0,0045	0,0051	0,0060	0,0061	0,0061	0,0057	0,000007
	R^2	1,000	1,000	0,999	0,999	0,996	0,995	0,992	0,997	0,524
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{min}$)	0,94	5,67	6,20	7,03	8,28	8,41	8,49	7,93	0,01
	Abweichung	0,06	0,08	0,32	0,31	0,30	0,43	0,35	0,29	0,02

Anhang 3: Aufschluss mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Pipettierschema (Proteinbestimmung)

Mikrotiterplatte 1

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,592	1,374	1,139	0,947	0,723	0,449	0,304	0,181	0,135	0,096	0,087	0,088
	B	1,556	1,349	1,096	0,913	0,686	0,444	0,291	0,18	0,129	0,094	0,083	0,087
<i>200 bar</i>	C	0,843	0,800	0,802	0,287	0,284	0,284	0,194	0,197	0,193	0,139	0,135	0,139
<i>500 bar</i>	D	2,067	1,911	1,952	0,785	0,787	0,782	0,504	0,502	0,496	0,294	0,301	0,317
<i>800 bar</i>	E	2,145	2,038	2,018	0,894	0,901	0,881	0,555	0,548	0,549	0,32	0,335	0,346
<i>1000 bar</i>	F	2,179	2,064	2,13	0,997	1,01	1,002	0,646	0,64	0,639	0,366	0,365	0,399
<i>1200 bar</i>	G	2,153	2,126	2,026	1,169	1,165	1,166	0,763	0,767	0,764	0,424	0,423	0,438
<i>1400 bar</i>	H	2,132	2,076	2,121	1,286	1,212	1,01	0,855	0,829	0,859	0,477	0,469	0,515
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 2

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,61	1,456	1,193	0,951	0,762	0,492	0,319	0,196	0,145	0,1	0,091	0,088
	B	1,603	1,431	1,162	0,956	0,774	0,477	0,292	0,189	0,151	0,098	0,09	0,086
<i>1455 bar</i>	C	2,012	2,068	2,101	1,264	1,381	1,313	0,843	0,873	0,863	0,471	0,483	0,496
<i>1600 bar</i>	D	2,11	2,157	2,232	1,345	1,458	1,396	0,916	0,946	0,943	0,51	0,532	0,552
<i>intakte Hefe</i>	E	2,266	0,402	0,401	0,162	0,17	0,164	0,127	0,131	0,129	0,106	0,106	0,105
<i>Probe, unbekannt</i>	F	2,099	2,09	2,151	1,229	1,322	1,259	0,791	0,829	0,825	0,44	0,45	0,477
	G	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,045	0,046	0,046	0,052	0,045	0,046	0,045
	H	0,047	0,046	0,046	0,046	0,045	0,046	0,046	0,046	0,045	0,045	0,045	0,045
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 1: Proben von 200 bar bis 1400 bar

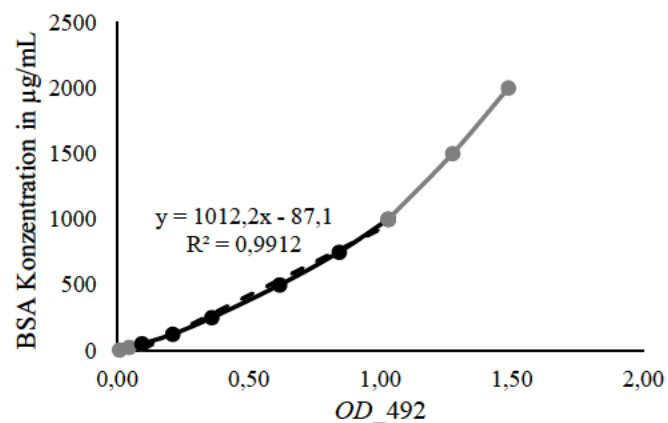
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,592	1,374	1,139	0,947	0,723	0,449	0,304	0,181	0,135	0,096	0,087	0,088
	B	1,556	1,349	1,096	0,913	0,686	0,444	0,291	0,18	0,129	0,094	0,083	0,087
	C	0,843	0,8	0,802	0,287	0,284	0,284	0,194	0,197	0,193	0,139	0,135	0,139
	D	2,067	1,911	1,952	0,785	0,787	0,782	0,504	0,502	0,496	0,294	0,301	0,317
	E	2,145	2,038	2,018	0,894	0,901	0,881	0,555	0,548	0,549	0,32	0,335	0,346
	F	2,179	2,064	2,13	0,997	1,01	1,002	0,646	0,64	0,639	0,366	0,365	0,399
	G	2,153	2,126	2,026	1,169	1,165	1,166	0,763	0,767	0,764	0,424	0,423	0,438
	H	2,132	2,076	2,121	1,286	1,212	1,01	0,855	0,829	0,859	0,477	0,469	0,515
Leerwert abgezogen	A	1,506	1,288	1,053	0,861	0,637	0,363	0,218	0,095	0,049	0,010	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,470	1,263	1,010	0,827	0,600	0,358	0,205	0,094	0,043	0,008		
	C	0,757	0,714	0,716	0,201	0,198	0,198	0,108	0,111	0,107	0,053	0,049	0,053
	D	1,981	1,825	1,866	0,699	0,701	0,696	0,418	0,416	0,410	0,208	0,215	0,231
	E	2,059	1,952	1,932	0,808	0,815	0,795	0,469	0,462	0,463	0,234	0,249	0,260
	F	2,093	1,978	2,044	0,911	0,924	0,916	0,560	0,554	0,553	0,280	0,279	0,313
	G	2,067	2,040	1,940	1,083	1,079	1,080	0,677	0,681	0,678	0,338	0,337	0,352
	H	2,046	1,990	2,035	1,200	1,126	0,924	0,769	0,743	0,773	0,391	0,383	0,429
Berechnung über die Gleichung* µg/mL	C	678,88	635,36	637,38	116,10	113,06	113,06	21,96	25,00	20,95	-33,71	-37,76	-33,71
	D	1917,82	1759,91	1801,41	620,17	622,20	617,14	335,75	333,72	327,65	123,18	130,27	146,47
	E	1996,77	1888,46	1868,22	730,50	737,59	717,35	387,37	380,28	381,30	149,50	164,68	175,82
	F	2031,18	1914,78	1981,58	834,76	847,92	839,82	479,48	473,41	472,39	196,06	195,05	229,47
	G	2004,86	1977,53	1876,31	1008,86	1004,81	1005,82	597,91	601,96	598,92	254,77	253,76	268,94
	H	1983,61	1926,92	1972,47	1127,29	1052,38	847,92	691,03	664,71	695,08	308,42	300,32	346,88

Mikrotiterplatte 2: Proben von 1455 bar bis 1600 bar, intakte Hefe und unbekannte Probe (Reihe F)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Rohdaten	A	1,61	1,456	1,193	0,951	0,762	0,492	0,319	0,196	0,145	0,1	0,091	0,088
	B	1,603	1,431	1,162	0,956	0,774	0,477	0,292	0,189	0,151	0,098	0,09	0,086
	C	2,012	2,068	2,101	1,264	1,381	1,313	0,843	0,873	0,863	0,471	0,483	0,496
	D	2,11	2,157	2,232	1,345	1,458	1,396	0,916	0,946	0,943	0,51	0,532	0,552
	E	2,266	0,402	0,401	0,162	0,17	0,164	0,127	0,131	0,129	0,106	0,106	0,105
	F	2,099	2,09	2,151	1,229	1,322	1,259	0,791	0,829	0,825	0,44	0,45	0,477
	G	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,045	0,046	0,046	0,052	0,045	0,046	0,045
	H	0,047	0,046	0,046	0,046	0,045	0,046	0,046	0,046	0,045	0,045	0,045	0,045
Leerwert abgezogen	A	1,521	1,367	1,104	0,862	0,673	0,403	0,230	0,107	0,056	0,011	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,514	1,342	1,073	0,867	0,685	0,388	0,203	0,100	0,062	0,009		
	C	1,923	1,979	2,012	1,175	1,292	1,224	0,754	0,784	0,774	0,382	0,394	0,407
	D	2,021	2,068	2,143	1,256	1,369	1,307	0,827	0,857	0,854	0,421	0,443	0,463
	E	2,177	0,313	0,312	0,073	0,081	0,075	0,038	0,042	0,040	0,017	0,017	0,016
	F	2,010	2,001	2,062	1,140	1,233	1,170	0,702	0,740	0,736	0,351	0,361	0,388
	G	-0,043	-0,043	-0,043	-0,043	-0,043	-0,044	-0,043	-0,043	-0,037	-0,044	-0,043	-0,044
	H	-0,042	-0,043	-0,043	-0,043	-0,044	-0,043	-0,043	-0,043	-0,044	-0,044	-0,044	-0,044
Berechnung über die Gleichung* µg/mL	C	1407,82	1449,46	1474,00	851,57	938,57	888,01	538,49	560,80	553,36	261,85	270,78	280,44
	D	1480,70	1515,65	1571,42	911,80	995,84	949,73	592,78	615,09	612,86	290,86	307,22	322,09
	E	1596,70	210,54	209,80	32,07	38,01	33,55	6,04	9,01	7,52	-9,58	-9,58	-10,32
	F	1472,52	1465,82	1511,19	825,54	894,70	847,85	499,82	528,08	525,11	238,80	246,24	266,32
	G	-54,20	-54,20	-54,20	-54,20	-54,20	-54,94	-54,20	-54,20	-49,74	-54,94	-54,20	-54,94
	H	-53,45	-54,20	-54,20	-54,20	-54,94	-54,20	-54,20	-54,20	-54,94	-54,94	-54,94	-54,94

Aufschluss mit dem HDH über acht Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung – Standardkurven (Proteinbestimmung)

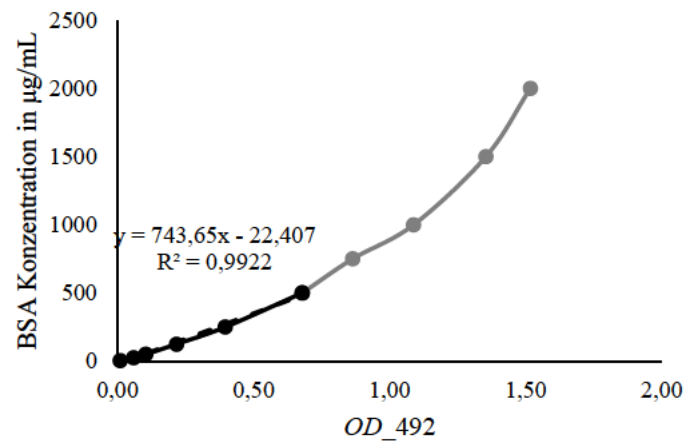
Standardkurve 2 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Mikrotiterplatte 1)



Messpunkte der Standardkurve 1:

BSA Konz. in $\mu\text{g/mL}$	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD ₄₉₂	1,49	1,28	1,03	0,84	0,62	0,36	0,21	0,09	0,05	0,01

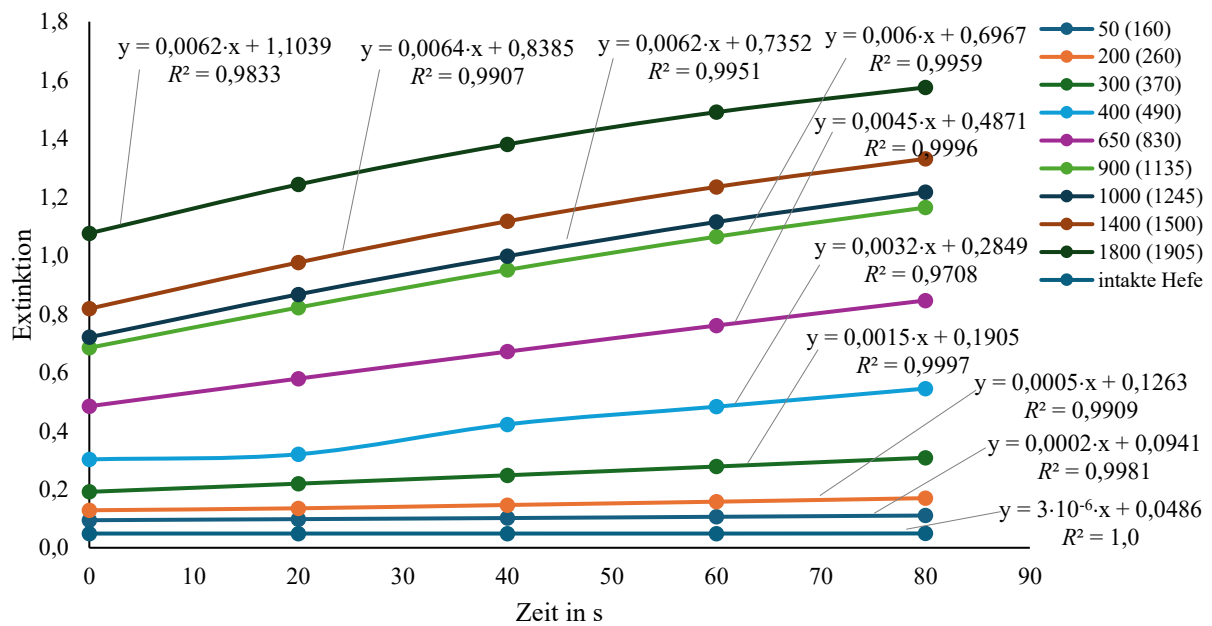
Standardkurve 2 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Mikrotiterplatte 1)



Messpunkte der Standardkurve 2:

BSA Konz. in $\mu\text{g/mL}$	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD ₄₉₂	1,52	1,35	1,09	0,86	0,68	0,40	0,22	0,10	0,06	0,01

Anhang 4: Aufschluss mit dem HDH über neun Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung – Enzymkinetik (tabellarische Darstellung der Mess- und der berechneten Werte)



Tabellarische Darstellung der berechneten Extinktionswerte (ermittelt aus Mittelwerten der Rohmesswerte)

Zeit in s	50 (160)	200 (260)	300 (370)	400 (490)	650 (830)	900 (1135)	1000 (1245)	1400 (1500)	1800 (1905)	intakte Hefe
0	0,09	0,13	0,19	0,30	0,48	0,68	0,72	0,82	1,08	0,05
20	0,10	0,14	0,22	0,32	0,58	0,82	0,87	0,98	1,24	0,05
40	0,10	0,15	0,25	0,42	0,67	0,95	1,00	1,12	1,38	0,05
60	0,11	0,16	0,28	0,48	0,76	1,06	1,11	1,23	1,49	0,05
80	0,11	0,17	0,31	0,54	0,85	1,16	1,22	1,33	1,58	0,05

Die aus Extinktionen berechneten Parameter - die Enzymaktivität $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$

	Zeit in s / Parameter	50 (160)	200 (260)	300 (370)	400 (490)	650 (830)	900 (1135)	1000 (1245)	1400 (1500)	1800 (1905)	intakte Hefe
1. Probe im Triplikat	0	0,093	0,136	0,196	0,269	0,507	0,761	0,794	0,891	1,056	445
	20	0,097	0,146	0,224	0,322	0,602	0,895	0,942	1,05	1,211	0,053
	40	0,1	0,158	0,253	0,375	0,694	1,025	1,073	1,189	1,336	0,053
	60	0,105	0,17	0,282	0,429	0,783	1,135	1,189	1,305	1,436	0,052
	80	0,109	0,184	0,313	0,483	0,87	1,233	1,288	1,399	1,512	0,052
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0006	0,0015	0,0027	0,0045	0,0059	0,0062	0,0064	0,0057	-4,449
	R^2	0,995	0,997	1,000	1,000	1,000	0,996	0,994	0,990	0,982	0,500
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL}\cdot\text{s}$)	0,005	0,014	0,034	0,062	0,105	0,137	0,143	0,147	0,132	-
2. Probe im Triplikat	0	0,094	0,121	0,179	0,289	0,481	0,652	0,733	0,76	1,109	0,048
	20	0,097	0,131	0,205	0,289	0,576	0,787	0,881	0,911	1,28	0,048
	40	0,101	0,143	0,232	0,399	0,667	0,913	1,017	1,042	1,421	0,048
	60	0,105	0,153	0,26	0,458	0,756	1,023	1,138	1,159	1,532	0,048
	80	0,109	0,164	0,287	0,516	0,841	1,119	1,244	1,26	1,617	0,048
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,00054	0,00136	0,00312	0,0045	0,00585	0,00640	0,0062	0,0063	0
	R^2	0,997	0,999	1,000	0,947	1,000	0,995	0,996	0,994	0,982	1,000
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL}\cdot\text{s}$)	0,004	0,013	0,031	0,072	0,104	0,136	0,148	0,145	0,147	0,000
3. Probe im Triplikat	0	0,096	0,128	0,199	0,349	0,465	0,64	0,634	0,803	1,063	0,045
	20	0,1	0,128	0,229	0,349	0,558	0,784	0,778	0,967	1,238	0,045
	40	0,104	0,138	0,259	0,493	0,652	0,914	0,903	1,12	1,384	0,045
	60	0,108	0,15	0,292	0,561	0,742	1,035	1,017	1,24	1,503	0,046
	80	0,113	0,161	0,324	0,635	0,827	1,14	1,118	1,333	1,596	0,047
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0004	0,0016	0,0039	0,0045	0,0063	0,0060	0,0067	0,0067	0,00003
	R^2	0,998	0,935	1,000	0,945	1,000	0,997	0,995	0,988	0,985	0,781
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL}\cdot\text{s}$)	0,005	0,010	0,036	0,091	0,105	0,145	0,140	0,154	0,154	0,001
Mittelwerte	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0002	0,0005	0,0015	0,0032	0,0045	0,0060	0,0062	0,0064	0,0062	-1,4832
	R^2	0,997	0,977	1,000	0,964	1,000	0,996	0,995	0,990	0,983	0,891
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL}\cdot\text{min}$)	0,28	0,73	2,03	4,50	6,29	8,35	8,62	8,93	8,66	0,00
	Abweichung	0,01	0,11	0,15	0,88	0,03	0,30	0,25	0,31	0,69	0,00

Anhang 5: Aufschluss mit dem HDH über neun Druckstufen, in einer Passage, ohne Kühlung – Pipettierschema (Proteinbestimmung)

Mikrotiterplatte 1

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,614	1,454	1,123	0,897	0,7	0,411	0,266	0,16	0,122	0,089	0,075	0,079
	B	1,499	1,392	1,064	0,89	0,659	0,393	0,253	0,156	0,115	0,082	0,073	0,075
<i>50 bar</i>	C	0,583	0,557	0,598	0,186	0,187	0,181	0,13	0,139	0,131	0,098	0,104	0,103
<i>200 bar</i>	D	0,837	0,785	0,753	0,251	0,25	0,25	0,169	0,168	0,169	0,118	0,118	0,121
<i>300 bar</i>	E	1,295	1,219	1,164	0,389	0,382	0,388	0,243	0,243	0,245	0,153	0,16	0,16
<i>400 bar</i>	F	1,991	1,85	1,916	0,637	0,657	0,61	0,397	0,407	0,403	0,237	0,245	0,253
<i>650 bar</i>	G	2,383	2,308	2,278	0,913	0,897	0,898	0,552	0,576	0,563	0,322	0,325	0,351
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,049	0,047	0,048	0,048	0,049	0,049	0,049	0,046
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 2

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,715	1,473	1,138	0,925	0,73	0,44	0,279	0,166	0,129	0,087	0,079	0,077
	B	1,472	1,326	1,13	0,881	0,662	0,421	0,261	0,16	0,122	0,085	0,08	0,075
<i>900 bar</i>	C	2,343	2,231	2,223	1,1	1,097	1,072	0,681	0,701	0,702	0,391	0,397	0,417
<i>1000 bar</i>	D	2,347	2,232	2,21	1,095	1,075	1,033	0,698	0,707	0,712	0,409	0,409	0,434
<i>1400 bar</i>	E	2,39	2,315	2,319	1,154	1,122	1,136	0,775	0,771	0,776	0,427	0,427	0,446
<i>1800 bar</i>	F	2,46	2,394	2,355	1,311	1,278	1,238	0,833	0,861	0,867	0,474	0,473	0,504
<i>Hefe, intakt</i>	G	0,448	0,435	0,428	0,158	0,155	0,156	0,119	0,118	0,115	0,096	0,095	0,095
	H	0,047	0,048	0,047	0,048	0,048	0,047	0,048	0,048	0,05	0,049	0,05	0,047
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Aufschluss mit dem HDH über neun Druckstufen, in einer Passage, mit Kühlung –
Standardkurven (Proteinbestimmung)

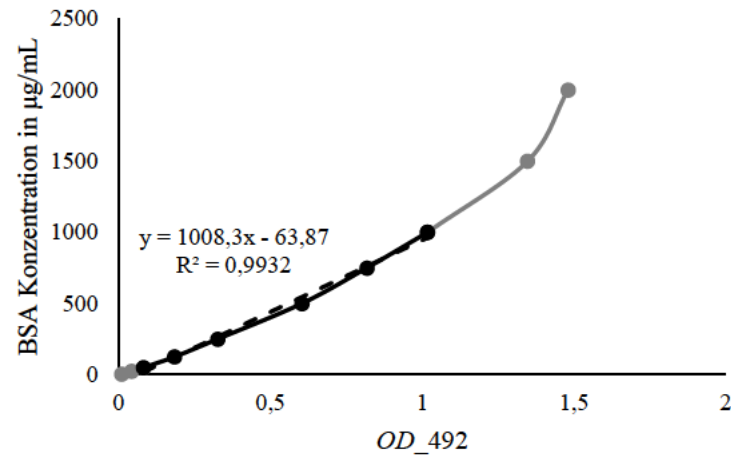
Mikrotiterplatte 1: Proben von 50 bar bis 650 bar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Rohdaten	A	1,614	1,454	1,123	0,897	0,700	0,411	0,266	0,16	0,122	0,089	0,075	0,079
	B	1,499	1,392	1,064	0,89	0,659	0,393	0,253	0,156	0,115	0,082	0,073	0,075
	C	0,583	0,557	0,598	0,186	0,187	0,181	0,13	0,139	0,131	0,098	0,104	0,103
	D	0,837	0,785	0,753	0,251	0,25	0,25	0,169	0,168	0,169	0,118	0,118	0,121
	E	1,295	1,219	1,164	0,389	0,382	0,388	0,243	0,243	0,245	0,153	0,16	0,16
	F	1,991	1,85	1,916	0,637	0,657	0,61	0,397	0,407	0,403	0,237	0,245	0,253
	G	2,383	2,308	2,278	0,913	0,897	0,898	0,552	0,576	0,563	0,322	0,325	0,351
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,049	0,047	0,048	0,048	0,049	0,049	0,049	0,046
Leerwert abgezogen	A	1,539	1,379	1,048	0,822	0,625	0,336	0,191	0,085	0,047	0,014	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,424	1,317	0,989	0,815	0,584	0,318	0,178	0,081	0,040	0,007		
	C	0,508	0,482	0,523	0,111	0,112	0,106	0,055	0,064	0,056	0,023	0,029	0,028
	D	0,762	0,710	0,678	0,176	0,175	0,175	0,094	0,093	0,094	0,043	0,043	0,046
	E	1,220	1,144	1,089	0,314	0,307	0,313	0,168	0,168	0,170	0,078	0,085	0,085
	F	1,916	1,775	1,841	0,562	0,582	0,535	0,322	0,332	0,328	0,162	0,170	0,178
	G	2,308	2,233	2,203	0,838	0,822	0,823	0,477	0,501	0,488	0,247	0,250	0,276
	H	-0,029	-0,028	-0,029	-0,029	-0,027	-0,029	-0,028	-0,028	-0,027	-0,027	-0,027	-0,030
Berechnung über die Gleichung* in µg/mL	C	447,84	421,63	462,97	47,55	48,56	42,51	-8,92	0,16	-7,91	-41,18	-35,13	-36,14
	D	703,95	651,52	619,25	113,09	112,08	112,08	30,41	29,40	30,41	-21,02	-21,02	-17,99
	E	1165,75	1089,12	1033,66	252,23	245,17	251,22	105,02	105,02	107,04	14,27	21,33	21,33
	F	1867,53	1725,36	1791,91	502,29	522,46	475,07	260,30	270,38	266,35	98,97	107,04	115,10
	G	2262,78	2187,16	2156,91	780,58	764,45	765,46	416,58	440,78	427,68	184,68	187,70	213,92
	H	-92,61	-91,60	-92,61	-92,61	-90,59	-92,61	-91,60	-91,60	-90,59	-90,59	-90,59	-93,61

Mikrotiterplatte 2: Proben von 900 bar bis 1800 bar, intakte Hefe

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,715	1,473	1,138	0,925	0,73	0,44	0,279	0,166	0,129	0,087	0,079	0,077
	B	1,472	1,326	1,13	0,881	0,662	0,421	0,261	0,16	0,122	0,085	0,08	0,075
	C	2,343	2,231	2,223	1,1	1,097	1,072	0,681	0,701	0,702	0,391	0,397	0,417
	D	2,347	2,232	2,21	1,095	1,075	1,033	0,698	0,707	0,712	0,409	0,409	0,434
	E	2,39	2,315	2,319	1,154	1,122	1,136	0,775	0,771	0,776	0,427	0,427	0,446
	F	2,46	2,394	2,355	1,311	1,278	1,238	0,833	0,861	0,867	0,474	0,473	0,504
	G	0,448	0,435	0,428	0,158	0,155	0,156	0,119	0,118	0,115	0,096	0,095	0,095
	H	0,047	0,048	0,047	0,048	0,048	0,047	0,048	0,048	0,05	0,049	0,05	0,047
Leerwert abgezogen	A	1,637	1,395	1,060	0,847	0,652	0,362	0,201	0,088	0,051	0,009	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,394	1,248	1,052	0,803	0,584	0,343	0,183	0,082	0,044	0,007		
	C	2,265	2,153	2,145	1,022	1,019	0,994	0,603	0,623	0,624	0,313	0,319	0,339
	D	2,269	2,154	2,132	1,017	0,997	0,955	0,620	0,629	0,634	0,331	0,331	0,356
	E	2,312	2,237	2,241	1,076	1,044	1,058	0,697	0,693	0,698	0,349	0,349	0,368
	F	2,382	2,316	2,277	1,233	1,200	1,160	0,755	0,783	0,789	0,396	0,395	0,426
	G	0,370	0,357	0,350	0,080	0,077	0,078	0,041	0,040	0,037	0,018	0,017	0,017
	H	-0,031	-0,030	-0,031	-0,030	-0,030	-0,031	-0,030	-0,030	-0,028	-0,029	-0,028	-0,031
Berechnung über die Gleichung* µg/mL	C	2166,38	2055,86	2047,97	939,80	936,84	912,17	526,34	546,07	547,06	240,17	246,09	265,83
	D	2170,33	2056,85	2035,14	934,87	915,13	873,69	543,11	552,00	556,93	257,93	257,93	282,60
	E	2212,76	2138,75	2142,70	993,09	961,51	975,33	619,10	615,15	620,08	275,69	275,69	294,44
	F	2281,84	2216,71	2178,23	1148,02	1115,45	1075,98	676,33	703,96	709,88	322,07	321,09	351,68
	G	296,42	283,59	276,68	10,25	7,29	8,27	-28,24	-29,22	-32,18	-50,93	-51,92	-51,92
	H	2166,38	2055,86	2047,97	939,80	936,84	912,17	526,34	546,07	547,06	240,17	246,09	265,83

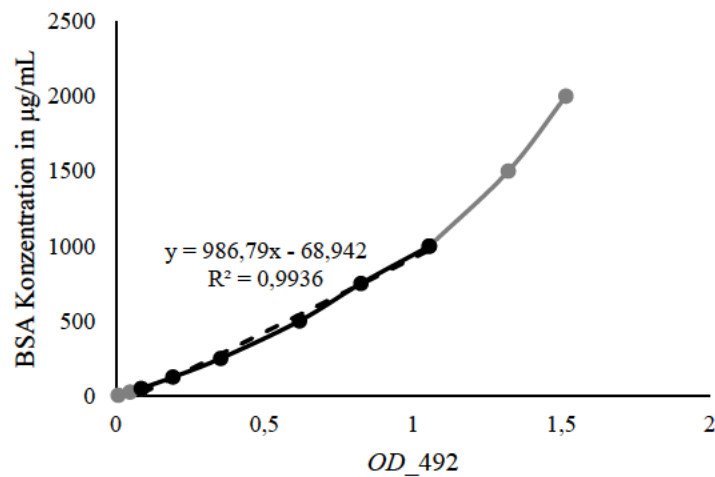
Standardkurve 1 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Mikrotiterplatte 1)



Messpunkte der Standardkurve 1:

BSA Konz. in µg/mL	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD ₄₉₂	1,481	1,3475	1,018	0,818	0,604	0,3265	0,184	0,0825	0,043	0,01

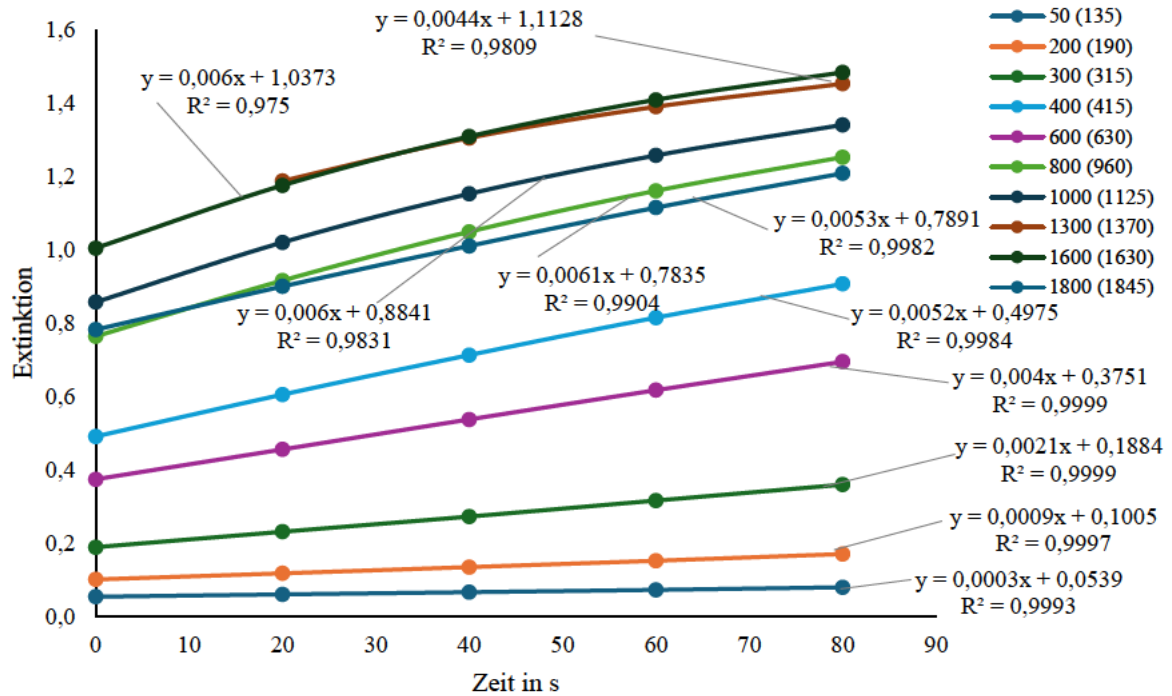
Standardkurve 2 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Mikrotiterplatte 2)



Messpunkte der Standardkurve 2:

BSA Konz. in µg/mL	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD ₄₉₂	1,52	1,32	1,06	0,83	0,62	0,35	0,19	0,09	0,05	0,01

Anhang 6: Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Enzymkinetik Passage 2 (inkl. Rohdaten)



Tabellarische Darstellung der berechneten Extinktionswerte (ermittelt aus Mittelwerten der Rohmesswerte)

Zeit in s	50 (135)	200 (190)	300 (315)	400 (415)	600 (630)	800 (960)	1000 (1125)	1300 (1370)	1600 (1630)	1800 (1845)
0	0,05	0,10	0,19	0,49	0,37	0,76	0,86		1,00	0,78
20	0,06	0,12	0,23	0,60	0,46	0,92	1,02	1,19	1,17	0,90
40	0,07	0,13	0,27	0,71	0,54	1,05	1,15	1,30	1,31	1,01
60	0,07	0,15	0,32	0,81	0,62	1,16	1,26	1,39	1,41	1,11
80	0,08	0,17	0,36	0,91	0,69	1,25	1,34	1,45	1,48	1,21

Passage 2: Die aus gemessenen Extinktionen berechneten Parameter - die Enzymaktivität $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Enzymaktivität A in $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$

	Zeit in s / Parameter	50 (135)	200 (190)	300 (315)	400 (415)	600 (630)	800 (960)	1000 (1125)	1300 (1370)	1600 (1630)	1800 (1845)
1. Probe im Triplikat	0	0,054	0,108	0,203	0,533	0,403	0,781	1,002	0,1033	0,93	0,855
	20	0,061	0,126	0,246	0,651	0,489	0,93	1,169	1,185	1,108	0,98
	40	0,067	0,143	0,29	0,759	0,573	1,059	1,299	1,292	1,25	1,095
	60	0,074	0,161	0,335	0,863	0,656	1,167	1,397	1,368	1,357	1,203
	80	0,081	0,181	0,379	0,957	0,738	1,257	1,472	1,425	1,438	1,297
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0003	0,0009	0,0022	0,0053	0,0042	0,0059	0,0058	0,0141	0,0063	0,0055
	R^2	0,999	0,999	1,000	0,998	1,000	0,990	0,976	0,659	0,977	0,997
2. Probe im Triplikat	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,008	0,021	0,051	0,123	0,097	0,138	0,135	0,328	0,147	0,128
	0	0,054	0,1	0,187	0,466	0,353	0,773	0,799	1,046	1,048	0,768
	20	0,06	0,116	0,228	0,578	0,428	0,925	0,955	1,217	1,221	0,883
	40	0,066	0,133	0,27	0,685	0,507	1,056	1,083	1,344	1,356	0,989
	60	0,072	0,15	0,314	0,786	0,582	1,167	1,182	1,437	1,459	1,089
	80	0,079	0,168	0,357	0,873	0,655	1,258	1,26	1,506	1,535	1,18
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00031	0,00085	0,0021	0,0051	0,0038	0,0061	0,0057	0,0057	0,0061	0,0052
3. Probe im Triplikat	R^2	0,999	1,000	1,000	0,998	1,000	0,990	0,982	0,970	0,976	0,998
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,007	0,020	0,049	0,118	0,088	0,140	0,133	0,132	0,140	0,119
	0	0,054	0,095	0,177	0,473	0,366	0,736	0,769	0,997	1,034	0,722
	20	0,06	0,111	0,219	0,585	0,449	0,891	0,934	1,158	1,195	0,835
	40	0,066	0,128	0,257	0,693	0,531	1,03	1,073	1,276	1,318	0,945
	60	0,072	0,145	0,299	0,794	0,612	1,146	1,19	1,362	1,408	1,05
	80	0,079	0,162	0,342	0,889	0,69	1,24	1,287	1,424	1,475	1,146
Mittelwerte	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,00031	0,00084	0,0021	0,0052	0,0041	0,0063	0,0065	0,0053	0,0055	0,0053
	R^2	0,999	1,000	1,000	0,999	1,000	0,991	0,989	0,967	0,972	0,999
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{s}$)	0,01	0,02	0,05	0,12	0,09	0,15	0,15	0,12	0,13	0,12
	$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	0,0003	0,0009	0,0021	0,0052	0,0040	0,0061	0,0060	0,0084	0,0060	0,5366
	R^2	0,999	1,000	1,000	0,998	1,000	0,990	0,982	0,865	0,975	0,909
	A in $\mu\text{mol}/$ ($\text{mL} \cdot \text{min}$)	0,44	1,20	2,96	7,24	5,58	8,49	8,36	7,64	8,28	7,42
	Abweichung	0,02	0,05	0,11	0,13	0,28	0,26	0,54	0,40	0,60	0,27

Anhang 7: Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Pipettierschemas Passage 1 (Proteinbestimmung)

Mikrotiterplatte 1

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,512	1,346	1,138	0,916	0,716	0,445	0,29	0,175	0,138	0,096	0,084	0,085
	B	1,49	1,409	1,06	0,909	0,679	0,429	0,276	0,171	0,156	0,093	0,081	0,083
<i>50 bar</i>	C	0,528	0,504	0,488	0,186	0,188	0,183	0,138	0,136	0,135	0,109	0,112	0,111
<i>200 bar</i>	D	1,014	0,971	0,943	0,306	0,309	0,304	0,21	0,207	0,212	0,139	0,151	0,15
<i>300 bar</i>	E	1,351	1,27	1,231	0,42	0,422	0,419	0,273	0,27	0,276	0,171	0,177	0,185
<i>400 bar</i>	F	2,226	1,995	1,986	0,817	0,807	0,778	0,5	0,531	0,52	0,306	0,318	0,34
<i>600 bar</i>	G	1,963	1,85	1,788	0,655	0,622	0,634	0,412	0,422	0,421	0,241	0,254	0,27
<i>800 bar</i>	H	2,384	2,252	2,232	0,978	0,995	0,98	0,642	0,641	0,647	0,384	0,387	0,409
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 2

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,711	1,597	1,283	1,06	0,804	0,493	0,321	0,191	0,148	0,101	0,09	0,09
	B	1,682	1,556	1,256	1,026	0,764	0,477	0,298	0,189	0,142	0,103	0,09	0,089
<i>1000 bar</i>	C	2,489	2,551	2,49	1,359	1,346	1,258	0,85	0,85	0,848	0,481	0,495	0,511
<i>1300 bar</i>	D	2,592	2,539	2,482	1,403	1,432	1,396	0,919	0,92	0,923	0,516	0,529	0,538
<i>1800 bar</i>	E	2,641	2,624	2,543	1,484	1,492	1,479	1	0,987	1,009	0,567	0,582	0,587
<i>Hefe, intakt</i>	F	2,706	2,717	2,564	1,731	1,716	1,67	1,119	1,142	1,15	0,622	0,656	0,701
	G	0,483	0,461	0,449	0,174	0,181	0,171	0,132	0,13	0,131	0,104	0,115	0,11
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,048	0,047	0,049	0,053	0,049	0,049	0,049	0,046
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Anhang 8: Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Pipettierschemas Passage 2 (Proteinbestimmung)

Mikrotiterplatte 1:

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,829	1,567	1,261	1,025	0,798	0,496	0,332	0,197	0,155	0,103	0,094	0,093
	B	1,707	1,523	1,157	0,999	0,736	0,467	0,3	0,183	0,141	0,104	0,09	0,093
<i>50 bar</i>	C	0,707	0,648	0,642	0,226	0,229	0,224	0,167	0,163	0,167	0,121	0,128	0,129
<i>200 bar</i>	D	1,152	1,052	0,971	0,327	0,341	0,341	0,224	0,226	0,225	0,153	0,155	0,162
<i>300 bar</i>	E	1,792	1,619	1,546	0,534	0,527	0,532	0,355	0,344	0,355	0,21	0,224	0,227
<i>400 bar</i>	F	2,432	2,392	2,339	1,042	1,02	0,995	0,658	0,662	0,672	0,373	0,388	0,414
<i>600 bar</i>	G	2,4	2,273	2,201	0,838	0,826	0,823	0,534	0,531	0,538	0,302	0,309	0,331
<i>800 bar</i>	H	2,452	2,442	2,398	1,367	1,348	1,363	0,882	0,883	0,887	0,497	0,506	0,526
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Mikrotiterplatte 2:

		Measurement count: 1 Filter: 492										<i>Leerwert</i>	
		A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	G 7	H 8	I 9	K 10	11	12
<i>Standard lösungen</i>	A	1,884	1,596	1,28	1,063	0,815	0,51	0,333	0,203	0,16	0,11	0,1	0,099
	B	1,773	1,56	1,233	1,024	0,77	0,484	0,307	0,193	0,149	0,106	0,094	0,101
<i>1000 bar</i>	C	2,374	2,436	2,402	1,477	1,452	1,427	0,981	0,967	0,975	0,533	0,555	0,587
<i>1300 bar</i>	D	2,569	2,471	2,493	1,549	1,523	1,528	1,02	1,011	1,014	0,568	0,582	0,625
<i>1800 bar</i>	E	2,45	2,528	2,523	1,556	1,569	1,539	1,023	1,007	1,017	0,562	0,577	0,605
<i>Hefe, intakt</i>	F	2,423	2,518	2,404	1,76	1,739	1,684	1,134	1,143	1,154	0,68	0,68	0,736
	G	0,048	0,048	0,047	0,047	0,052	0,048	0,05	0,048	0,049	0,049	0,05	0,048
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,049	0,047	0,048	0,048	0,05	0,05	0,05	0,046
		1:10			1:20			1:50			1:100		

Anhang 9: Aufschluss mit dem HDH über zehn Druckstufen, in zwei Passagen, mit Kühlung – Standardkurven Passage 2 (Proteinbestimmung)

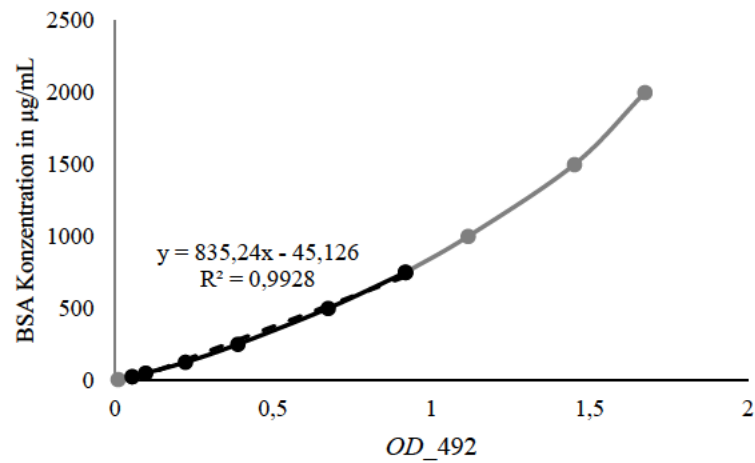
Mikrotiterplatte 1: Proben von 50 bar bis 800 bar

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,829	1,567	1,261	1,025	0,798	0,496	0,332	0,197	0,155	0,103	0,094	0,093
	B	1,707	1,523	1,157	0,999	0,736	0,467	0,3	0,183	0,141	0,104	0,09	0,093
	C	0,707	0,648	0,642	0,226	0,229	0,224	0,167	0,163	0,167	0,121	0,128	0,129
	D	1,152	1,052	0,971	0,327	0,341	0,341	0,224	0,226	0,225	0,153	0,155	0,162
	E	1,792	1,619	1,546	0,534	0,527	0,532	0,355	0,344	0,355	0,21	0,224	0,227
	F	2,432	2,392	2,339	1,042	1,02	0,995	0,658	0,662	0,672	0,373	0,388	0,414
	G	2,4	2,273	2,201	0,838	0,826	0,823	0,534	0,531	0,538	0,302	0,309	0,331
	H	2,452	2,442	2,398	1,367	1,348	1,363	0,882	0,883	0,887	0,497	0,506	0,526
Leerwert abgezogen	A	1,737	1,475	1,169	0,933	0,706	0,404	0,240	0,105	0,063	0,011	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,615	1,431	1,065	0,907	0,644	0,375	0,208	0,091	0,049	0,012		
	C	0,615	0,556	0,550	0,134	0,137	0,132	0,075	0,071	0,075	0,029	0,036	0,037
	D	1,060	0,960	0,879	0,235	0,249	0,249	0,132	0,134	0,133	0,061	0,063	0,070
	E	1,700	1,527	1,454	0,442	0,435	0,440	0,263	0,252	0,263	0,118	0,132	0,135
	F	2,340	2,300	2,247	0,950	0,928	0,903	0,566	0,570	0,580	0,281	0,296	0,322
	G	2,308	2,181	2,109	0,746	0,734	0,731	0,442	0,439	0,446	0,210	0,217	0,239
	H	2,360	2,350	2,306	1,275	1,256	1,271	0,790	0,791	0,795	0,405	0,414	0,434
Berechnung über die Gleichung* in µg/mL	C	468,13	418,85	413,84	66,38	68,88	64,71	17,10	13,76	17,10	-21,32	-15,47	-14,64
	D	839,81	756,29	688,63	150,74	162,43	162,43	64,71	66,38	65,54	5,41	7,08	12,92
	E	1374,36	1229,87	1168,90	323,63	317,79	321,96	174,12	164,94	174,12	53,01	64,71	67,21
	F	1908,92	1875,51	1831,24	747,93	729,56	708,68	427,20	430,54	438,90	189,16	201,69	223,40
	G	1882,19	1776,11	1715,98	577,55	567,52	565,02	323,63	321,13	326,97	129,86	135,70	154,08
	H	1925,62	1917,27	1880,52	1019,39	1003,52	1016,05	614,30	615,13	618,47	292,73	300,25	316,95

Mikrotiterplatte 2: Proben von 1000 bar bis 1800 bar, intakte Hefe und unbekannte Probe

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rohdaten	A	1,884	1,596	1,280	1,063	0,815	0,510	0,333	0,203	0,160	0,110	0,100	0,099
	B	1,773	1,560	1,233	1,024	0,77	0,484	0,307	0,193	0,149	0,106	0,094	0,101
	C	2,374	2,436	2,402	1,477	1,452	1,427	0,981	0,967	0,975	0,533	0,555	0,587
	D	2,569	2,471	2,493	1,549	1,523	1,528	1,02	1,011	1,014	0,568	0,582	0,625
	E	2,45	2,528	2,523	1,556	1,569	1,539	1,023	1,007	1,017	0,562	0,577	0,605
	F	2,423	2,518	2,404	1,76	1,739	1,684	1,134	1,143	1,154	0,68	0,68	0,736
	G	0,048	0,048	0,047	0,047	0,052	0,048	0,05	0,048	0,049	0,049	0,05	0,048
	H	0,047	0,048	0,047	0,047	0,049	0,047	0,048	0,048	0,05	0,05	0,05	0,046
Leerwert abgezogen	A	1,786	1,498	1,182	0,965	0,717	0,412	0,235	0,105	0,062	0,012	(Der lin. Bereich ist unten angegeben)	
	B	1,675	1,462	1,135	0,926	0,672	0,386	0,209	0,095	0,051	0,007		
	C	2,276	2,338	2,304	1,379	1,354	1,329	0,883	0,869	0,877	0,435	0,457	0,489
	D	2,471	2,373	2,395	1,451	1,425	1,430	0,922	0,913	0,916	0,470	0,484	0,527
	E	2,352	2,430	2,425	1,458	1,471	1,441	0,925	0,909	0,919	0,464	0,479	0,507
	F	2,325	2,420	2,306	1,662	1,641	1,586	1,036	1,045	1,056	0,582	0,582	0,638
	G	-0,051	-0,051	-0,052	-0,052	-0,047	-0,051	-0,049	-0,051	-0,050	-0,050	-0,049	-0,051
	H	-0,052	-0,051	-0,052	-0,052	-0,050	-0,052	-0,051	-0,051	-0,049	-0,049	-0,049	-0,053
Berechnung über die Gleichung* µg/mL	C	2157,71	2218,60	2185,21	1276,79	1252,24	1227,69	789,68	775,93	783,79	349,72	371,32	402,75
	D	2349,21	2252,97	2274,57	1347,50	1321,97	1326,88	827,98	819,15	822,09	384,09	397,84	440,07
	E	2232,34	2308,95	2304,04	1354,37	1367,14	1337,68	830,93	815,22	825,04	378,20	392,93	420,43
	F	2205,83	2299,13	2187,17	1554,72	1534,09	1480,08	939,94	948,78	959,58	494,08	494,08	549,08
	G	-126,59	-126,59	-127,57	-127,57	-122,66	-126,59	-124,62	-126,59	-125,61	-125,61	-124,62	-126,59
	H	-127,57	-126,59	-127,57	-127,57	-125,61	-127,57	-126,59	-126,59	-124,62	-124,62	-124,62	-128,55

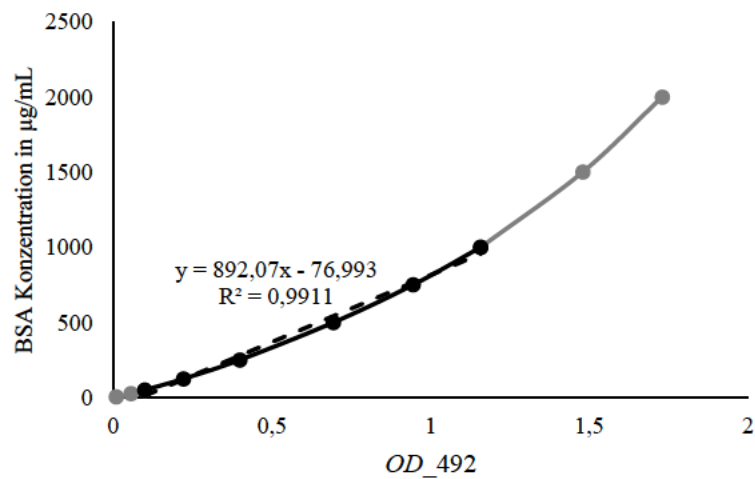
Standardkurve 1 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Passage 2- Mikrotiterplatte 1)



Messpunkte der Standardkurve 1 (Passage 2):

BSA Konz. in µg/mL	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD_492	1,68	1,45	1,12	0,92	0,67	0,39	0,22	0,10	0,06	0,01

Standardkurve 2 zur Berechnung der Proteinkonzentration (Passage 2 - Mikrotiterplatte 2)



Messpunkte der Standardkurve 2 (Passage 2)

BSA Konz. in µg/mL	2000	1500	1000	750	500	250	125	50	25	5
OD_492	1,73	1,4795	1,158	0,945	0,694	0,3985	0,2215	0,0995	0,056	0,0095

Anhang 10: Einwaagen

Ansätze der Chemikalien der durchgeführten Aufschlüsse

Versuchs-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	
$V_{\text{Hefesuspension}}$ in L		0,2	1	0,8	1,5	1,6	1,6	1,6	Mittelwert g/L + Abweichung
KH ₂ PO ₄	Soll- /Istwert in g	1,3609 (1,368)	6,8045 (6,8026)	5,4436 (5,4556)	10,267 (10,2614)	10,8872 (10,883)	10,8872 (10,9005)	10,8872 (10,8936)	6,82
NaOH (1 M)	Istwert in g	8,368	38,96	46,912	31,2675	67,6	68,221	59,278	43,30
Hefe	Soll- /Istwert in g	40 (40,206)	200 (200,048)	160 (160,728)	300 (300,21)	320 (320,063)	320 (320,626)	320 (320,079)	200,37
Glycerin	Soll- /Istwert in g	8 (8,772)	40 (40,0884)	32 (32,1142)	60 (60,302)	64 (64,1102)	64 (64,0481)	64 (64,3407)	40,66

Anhang 11: *OD*₆₀₀-Messung.

Verdünnungsstufe	FP	HDH-1	HDH-2	HDH-3
unverdünnt	3,71	-	-	-
1:5	3,00	3,02	3,08	2,99
1:25	1,98	2,00	2,01	2,00
1:50	1,44	1,54	1,54	1,56
1:100	0,99	1,10	-	-
1:200	0,67	-	0,69	0,76