

**Fermentative Gewinnung von
Paramylon durch *Euglena gracilis* in
konditioniertem Kartoffelfruchtwasser**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Michael Felski

geboren am 12. Dezember 1968

in Detmold

Juli 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Warum <i>Euglena gracilis</i> als Organismus für dieses Projekt?	1
1.2	Warum Kartoffelfruchtwasser (KFW) als Medium für die Fermentation?	2
1.3	Zielsetzung	3
1.4	Aussichten bezüglich der Wertschöpfung	4
1.5	Problemstellung	4
2	Theoretischer Hintergrund	6
2.1	<i>Euglena</i> – Eine kurze Übersicht über den Organismus	6
2.1.1	Beschreibung und Taxonomie	6
2.2	Gründe für die Popularität der Eugleniden	11
2.2.1	Signifikanz für die Forschung	11
2.3	Auswirkung von durch <i>Euglena gracilis</i> produzierten Produkten auf die Menschheit	14
2.4	Aufnahmeweg der Glucose in den Stoffwechsel von <i>Euglena gracilis</i>	15
2.5	Kartoffelfruchtwasser, was ist das?	19
2.6	Was sind Glykoalkaloide?	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Geräte	23
3.2	Chemikalien	25
3.3	Versuchsstämme	27
3.4	Stammhaltung	27
3.4.1	Kultivierung im Schüttelkolben	27
3.5	Kultivierung im Bioreaktor	28
3.5.1	Aufbau der Bioreaktoren	28
3.5.2	Messtechnik	30
3.5.3	Digitale Steuereinheit	31
3.5.4	Sterilisation und Kultivierung	32
3.5.5	Probenahme	32
3.6	Nährmedium für die Anzucht von <i>Euglena gracilis</i> nach Hutner	33
3.7	Analytik	35
3.7.1	Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
3.7.2	Zellaufschlussverfahren	37
3.7.3	Methode zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) und der Paramylontrockenmasse (PTM)	38
3.7.3.1	Bestimmung der Biotrockenmasse von <i>Euglena gracilis</i>	38
3.7.3.2	Bestimmung der Paramylontrockenmasse von <i>Euglena gracilis</i>	39
3.7.4	Untersuchungen zur Veränderung der Osmolalität in NL und KFW	40
3.7.4.1	Messprinzip	40
3.7.4.2	Wirkungsweise und Durchführung des Verfahrens	40
3.7.4.3	Durchführung einer Messung/Eichung	41
3.7.5	Methode zur Simultanbestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel mit dem Elementaranalysator vario EL	42
3.7.5.1	Substanzaufschluss	42
3.7.5.2	Trennung der Reaktionsgase	43
3.7.5.3	Nachweis	44

3.7.6	Bestimmung der Zellzahl in mikrobiologischen Proben	45
3.7.6.1	Zellzahlbestimmung mittels Thoma-Kammer	45
3.7.6.2	Zellzahlbestimmung mittels CASY® 1	49
3.7.7	Glucosebestimmung von Proben aus der Fermentation	50
3.7.7.1	Glucose-Test Infinity Sigma, enzymatisch	51
3.7.7.2	Glucosebestimmung mit dem GL _{super} ambulance von RLT	53
3.7.8	Bestimmung der löslichen Trockenmasse (SDW)	55
3.7.9	Wachstum von Mikroorganismen, Formeln	56
3.7.10	Response Surface Modelling	58
3.7.11	Bestimmung des Glucosegehalts in Paramylon	59
4	Ergebnisse und Diskussion	60
4.1	Versuche in definiertem Medium	60
4.1.1	Glucose	72
4.1.2	Vitamine	78
4.1.3	pH-Wert / Ammonium	81
4.1.4	Osmolalität	84
4.1.5	Einfluss von Solanin und Chaconin auf das Wachstum von <i>Euglena gracilis</i>	86
4.1.6	Einfluss von Antibiotika auf das Wachstum von <i>Euglena gracilis</i>	90
4.1.7	Vergleich zweier Probenahmeverfahren zur Bestimmung ihrer Genauigkeit	102
4.2	Behandlung des Kartoffelfruchtwassers	106
4.2.1	Medienoptimierung des Kartoffelfruchtwassers	111
4.2.2	Verdünnung des KFW	115
4.2.3	Einfluss von der essentiellen Vitamine B ₁ und B ₁₂ auf das Wachstum	140
4.2.4	Einfluss von alternativen Vitaminquellen auf das Wachstum	141
4.2.5	Veränderung der Aminosäurekonzentration im KFW während einer Fermentation	146
4.2.6	Änderung der Aminosäurezusammensetzung in KFW während einer Fermentation	149
4.2.7	Satzweise Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i>	150
4.2.8	Fermentation von <i>Euglena gracilis</i> im Zulaufverfahren	153
4.2.9	Semikontinuierliche Fermentation von <i>Euglena gracilis</i>	156
4.3	Aufarbeitung des Paramylons	162
4.3.1	Separation von Zelltrümmern und Paramylon-Granulae	162
4.3.2	Paramylonaufarbeitung	164
4.3.3	Nachweis / Reinheit des Paramylons	168
4.3.4	Einsatz von SDS zur Aufreinigung des Produkts Paramylon	170
5	Zusammenfassung	172
6	Literaturverzeichnis	174
7	Schriftenverzeichnis	180
8	Curriculum vitae	181

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α	alpha
β	beta
μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
Abw.	Abweichung
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CSL	Corn steep liquor
Da	Dalton
DDC	direct digital control unit
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DW	Dry weight
Glc	Glucose
GOD	Glucoseoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HDH	Hochdruckhomogenisator
HE	Hefeextrakt
HPLC	high performance liquid chromatography
Int.	Intervall
kDa	Kilo Dalton
KFW	Kartoffelfruchtwasser
kKFW	Konzentriertes Kartoffelfruchtwasser
LF	Leitfähigkeit
Mio.	Millionen
NaCl	Natriumchlorid
NADH + H ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogen
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natronlauge
NL	chemisch definierte Nährlösung / Medium
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O-Konzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppb	Parts per Billion
ppm	Parts per Million
P _t	Produktivität
PTM	Paramylontrockenmasse
PW	Prozesswasser
RKFW	Restkartoffelfruchtwasser

RNS	Ribonukleinsäure
S_0	Substratkonzentration bei Versuchsstart
SAG	Sammlung der Algen Göttingen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDW	soluble dry weight / lösliche Trockenmasse
T	Temperatur
t	Zeit
t_d	Verdopplungszeit
UDP	Uridyldiphosphat
US	Ultraschall
UTP	Uridyltriphosphat
V	Volumen
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
X	Konzentration der Biomasse
$Y_{P/S}$	Ausbeutekoeffizient bezogen auf Produkt
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient bezogen auf Biomasse

1 Einleitung und Zielsetzung

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse gezeigt, die bei der Forschung mit der Alge *Euglena gracilis* gewonnen worden sind. Die Alge *Euglena gracilis* wurde in den folgenden Medien kultiviert: Chemisch definiertes Medium (NL) und konditioniertem Kartoffelfruchtwasser (KFW) als Medium. Während der Kultivierung von *Euglena gracilis* auf chemisch definiertem Medium wurde der Effekt einer pH-Korrektur auf die Zunahme der Biomasse und die Paramylonsynthese untersucht. Ebenfalls wurden Versuche mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen und unterschiedlich hohen Glucosekonzentrationen durchgeführt. Das Hauptziel der Kultivierung von *Euglena gracilis* in konditioniertem Kartoffelfruchtwasser war es, die optimalen Medienzusammensetzungen und Kultivierungskonditionen zu finden, die mit der maximalen Biomasse und Paramylonausbeute verbunden sind. Während dieser Untersuchung wurde ebenfalls der Effekt unterschiedlicher Vitaminquellen auf das Wachstum von *Euglena gracilis* und die Paramylonproduktion erforscht. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von *Euglena gracilis* auf verschiedenen Medien wurde untersucht und in weiteren Experimenten wurde die Zellzerstörung und die Paramylonaufreinigung, sowie der Reinheitsgrad des gewonnenen Paramylons nachgeprüft.

1.1 Warum wurde *Euglena gracilis* als Produktionsorganismus für dieses Projekt gewählt?

Euglena gracilis wurde ausgewählt, weil bekannt war, dass der Organismus bedingt auf KFW wächst (BÄUMER, 1999) und ein wirtschaftlich interessantes Produkt liefert, nämlich Paramylon, ein β -1,3-Glucan. Einsatzgebiete für dieses Glucan liegen im Bereich der Medizin (Krebsbehandlung, direkt und indirekt), der Pharmazie (Stärkung der Immunabwehr durch orale Applikation von β -Glucan, Wundauflagen für Verbrennungswunden) und der Kosmetik (als Zusatzstoff für Cremes zur Minderung von Fältchen). Die Stärkung der Immunabwehr kann auch über die Zugabe von β -Glucan zu den verschiedensten Lebensmittel erreicht werden, was ebenfalls untersucht wurde (Teigwaren, Brot/ Brötchen und feine Backwaren).

1.2 Warum Kartoffelfruchtwasser (KFW) als Medium für die Fermentation?

Bei KFW handelt es sich um ein Nebenprodukt aus der Kartoffelstärkeindustrie, welches neben geringen Mengen an Reststärke noch alle Inhaltsstoffe der ursprünglichen Kartoffelknolle enthält. Eine gewisse Menge an Zucker ist vorhanden, ebenso ein breites Spektrum an Aminosäuren, Makro- und Spurenelementen. Auch vorhanden sind für einen möglichen Einsatz als Fermentationsmedium das Wachstum hemmende Substanzen, wie die Glycoalkaloide der Kartoffel (*Solanum tuberosum*).

Aufgrund der Menge des ‚Abwassers‘, der positiven Inhaltsstoffe und der ersten Ergebnisse von Dr. BÄUMER (1999) wurde es als Medium für den Einsatz als Ersatz für ein definiertes, relativ kostspieliges Medium interessant.

Vor- und Nachteile des KFW:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| + Zucker : ~ 5 g/l (Glucose/Fructose) | - Belastung mit Bakterien/Hefen |
| + Aminosäuren (18 AS waren nachweisbar) | - Glycoalkaloide (Solanin / Chaconin) |
| + Makro - und Spurenelemente | - Protein (Patatin) |

Ziel des Projektes zwischen der Universität Bielefeld und der Emslandstärke in Emlichheim war es, eine Möglichkeit zu finden aus dem Nebenprodukt Kartoffelfruchtwasser (KFW) ein Medium für die Fermentationstechnologie zur Anzucht eines Mikroorganismus zu erzeugen. Während der Voruntersuchungen wurden neben *Euglena gracilis* auch noch *Ashbya gossipii* (produziert Riboflavin), *Chlorella protothecoides* (produziert β -Carotin), *Saccharomyces cerevisiae* (als Futterhefe, bzw. als gentechnisch zu verändernden Organismus), *Escherichia coli* (als klassischen Organismus der Genetik) und *Corynebacterium glutamicum* (z. B. zur Produktion von Glutamat, Methionin) auf ihre Verwendbarkeit in KFW als Medium untersucht. Die Versuche mit Bakterien und Hefen führten jedoch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen in Hinsicht auf ihre Ausbeuten. Als Produkt einer Fermentation mit *Euglena gracilis* kam das marktwirtschaftlich interessante Paramylon für eine Fermentationsanwendung am ehesten in Frage.

1.3 Zielsetzung

Im Jahr 1997 wurden allein in Deutschland 3,8 Mio. Tonnen Kartoffeln für die Kartoffelstärkeherstellung verarbeitet. Diese Stärkekartoffeln enthalten etwa 20 % Stärke und 2 % Protein. Bei der Stärkeproduktion in Deutschland fallen jährlich 80.000 Tonnen Kartoffelprotein an. Ein Großteil des Proteins wird in den bekannten Verfahren durch Erhitzen ausgefällt, eingengt oder getrocknet, und als Tierfutter verwertet. Auf Grund des hohen Energieaufwands ist die Wertschöpfung verhältnismäßig gering.

Das als Reststoff anfallende Kartoffelfruchtwasser besteht im Wesentlichen aus Zellsaft und enthält deshalb das gesamte aus der Kartoffelknolle stammende Grundspektrum an lebensnotwendigen, wasserlöslichen Substanzen. Hervorzuheben sind Mineralsalze (vgl. Tab. 1.1), niedermolekulare Kohlenhydrate, Vitamine und Proteine. Die momentan einzige Verwertung dieses Reststoffes liegt in der überregionalen Ausbringung als Dünger auf landwirtschaftlichen Flächen. Auf Grund der interessanten Inhaltsstoffe des Kartoffelfruchtwassers wurde nach Möglichkeiten einer besseren Nutzung gesucht. Nach einer Entfernung des Proteins durch Hitzeagulation (zumeist Patatin) kann dann das proteinarme Rest-KFW als Fermentationsmedium für Mikroorganismen verwendet werden. Bestimmte Mikroorganismen sind in der Lage Stoffwechselprodukte zu bilden, die als Zusätze zur Herstellung von Lebensmitteln mit einem gesundheitsfördernden Aspekt (Functional Food, → cholesterinsenkende Stoffe, insulinregulierende Stoffe, Antioxidantien, Vitamine)(WAYGOOD et al. 1980), von Futtermitteln (Biomasse, bzw. Proteine) oder Kosmetika (Antioxidantien, Vitamine) geeignet sind.

1.4 Aussichten bezüglich der Wertschöpfung

Durch die Produktion eines hochreinen β -1,3-Glucans durch den Eugleniden *Euglena gracilis* Klebs in Kartoffelfruchtwasser kann man zu einer Nutzung dieses Nebenproduktes kommen. β -1,3-Glucan kann gezielt zur Verbesserung der menschlichen Lebensqualität eingesetzt werden. Hierbei steht sicherlich die medizinische, bzw. ernährungsphysiologische Wirkung des Glucans im Vordergrund. Japanische und amerikanische Untersuchungen (KAHLON, 1993) zeigten einen Cholesterinspiegel senkenden Effekt bei der Einhaltung spezieller Diäten. Des Weiteren ist aus japanischen Studien (SAITÔ, H., YOSHIOKA, Y., YOKOI, M. und YAMADA, J., 1990) die Wirkung von β -1,3-Glucan auf Krebszellen bekannt. Direkt an Tumore verabreichtes β -Glucan verringerte deren Wachstum, brachte es zum Stillstand oder wirkte sogar positiv bei der Rückbildung des Tumorgewebes. Außerdem wird β -1,3-Glucan eine Insulin regulierende Wirkung nachgesagt.

1.5 Problemstellung

Aufgrund der sehr komplexen Zusammensetzung des KFW ist es schwierig alle Parameter die eine Fermentation beeinflussen zu verfolgen. Erste Versuche zeigten jedoch, dass ein Wachstum von *Euglena gracilis* in KFW möglich ist. Hierzu musste jedoch eine Kohlenhydratquelle zugeführt werden, da im KFW für eine sinnvolle Fermentation eine zu geringe Glucosekonzentration vorliegt. Im KFW findet man Zucker in einer Größenordnung von ca. 5 g Liter⁻¹ vor (~4g Fructose, ~0.6g Glucose und ~ 0.4g Lactose). Durch Optimierung der Zuckerkonzentration und anderer Parameter sollte das KFW soweit optimiert werden, dass die Ausbeuten in einem sinnvollen Bereich liegen (Nutzen-Kosten-Verhältnis im Labormaßstab).

Tab. 1.1: Veränderung der Inhaltsstoffe des KFW über die Kampagnen (DT = Detmold; KFW₂ = Bielefeld).

Nährstoffe (mg/l)	KFW DT ₁₉₉₉	KFW DT ₂₀₀₀	KFW ₂₀₀₁	KFW ₂₀₀₂
Kalium	1500	1000-1500	1500	1500
Phosphat	500	500	100	500
Sulfat	400	400	800	400
Nitrat	25	1200	500	500
pH-Wert	5,85	5,5	5,00	5,37

In Tabelle 1.1 sind einige leicht zu verfolgende Parameter des KFW exemplarisch dargestellt. Über die vier hier verfolgten Kampagnen (1999/2000, 2000/2001, 2001/2002 und 2002/2003) konnten immer wieder Veränderungen in unterschiedlichen Bereichen festgestellt werden, was einen Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Kampagnen erschwert. Selbst innerhalb einer Kampagne kann es zu großen Schwankungen dieser Parameter kommen. Alleine durch die unterschiedlichen Sorten und Lagerungsbedingungen ist dies zu erklären, was jedoch auch einen problematischen Punkt bei der Verwendung von KFW darstellt.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 *Euglena* – Eine kurze Übersicht über den Organismus

Euglena ist der Genus von einzelligen, freilebenden, Süßwasser bevorzugenden Organismen die Chloroplasten enthalten und sowohl pflanzliche als auch tierische Eigenschaften aufweisen.

1830 wurden die ersten Zellen der Familie *Euglena* durch C.G. Ehrenberg entdeckt. Bis heute wurden insgesamt 250 Arten beschrieben. Die tatsächliche Anzahl an Arten ist aber wahrscheinlich kleiner, denn die Größe und Form einer bestimmten Art kann in Abhängigkeit von ihrem Ernährungszustand, der Zellwachstumsphase (lag, exponentiell, stationär) und durch Umweltfaktoren, wie z. B. pH-Wert, Quantität und Qualität des Lichts, stark variieren. Daraus resultiert, dass wahrscheinlich einige der beschriebenen Arten nur Größenvarianten einer anderen Art sind.

Alle bekannten Arten von *Euglena* vermehren sich asexuell. Eine Vielzahl an Literatur beschäftigt sich mit der Morphologie, Physiologie und Biochemie von *Euglena*, aber die meisten Informationen sind über die Gattung *Euglena gracilis* erhältlich, was auf die einfachen Anzuchtbedingungen zurückzuführen ist.

2.1.1 Beschreibung und Taxonomie

Morphologie

Die einzelligen *Euglena*-Arten sind in einem Größenbereich von 12 µm Länge x 5 µm Breite bei *E. minuta* bis 530 µm x 40 µm zu finden. Zirka 70 % aller beschriebenen Arten liegen jedoch in einem Bereich von 25 bis 100 µm Länge. Sie variieren stark zwischen einer sphärischen bis nahezu zylindrischen Gestalt. Die meisten Organismen sind jedoch spindelförmig. Die Fortbewegung wird durch eine ‚schlagende‘ Flagelle erzielt.

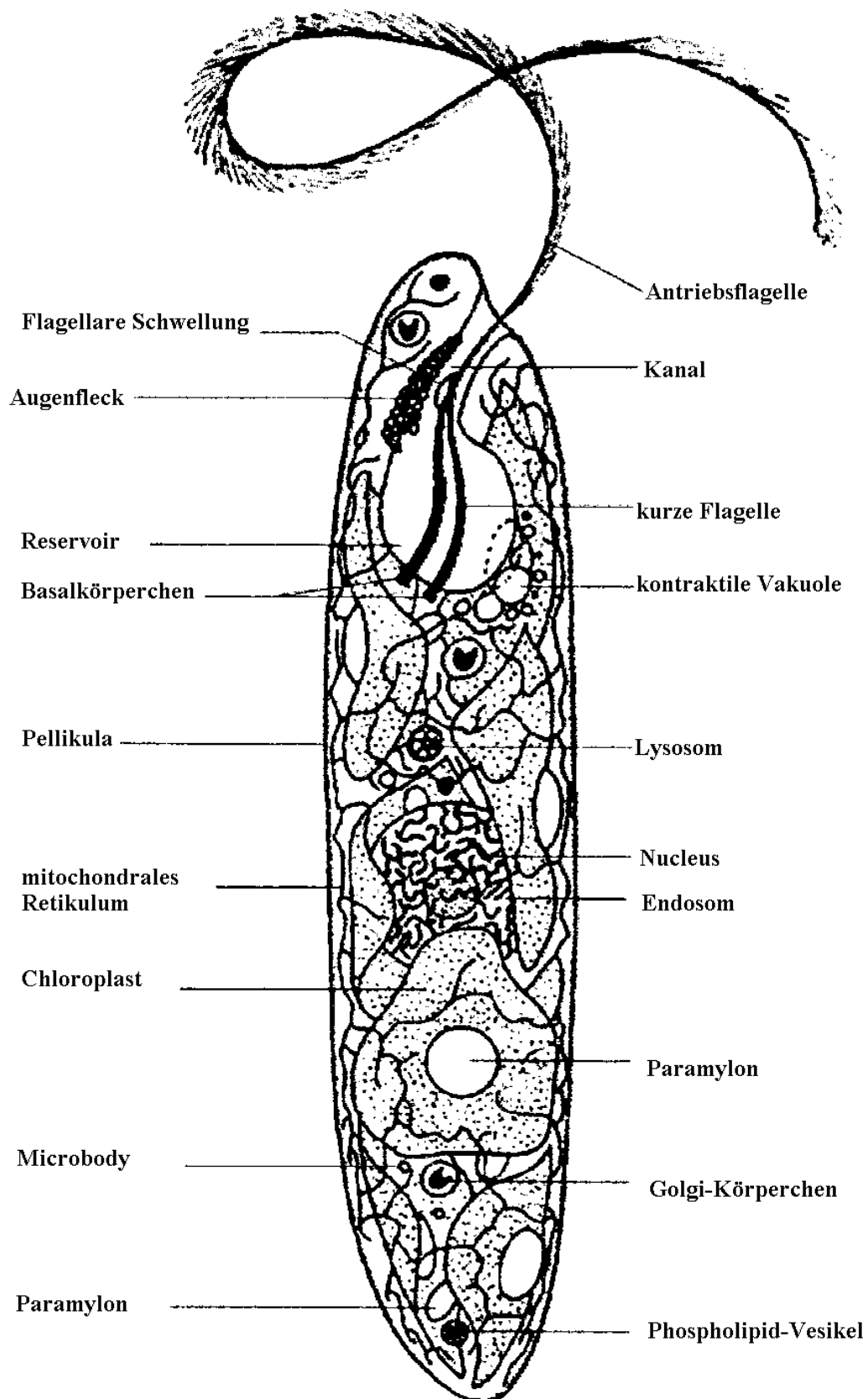


Abb. 2.1: Schematische Skizze von *Euglena gracilis* (BUETOW, 1999).

In Abbildung 2.1 ist *Euglena gracilis* mit den wichtigsten Organellen zu sehen. *Euglena gracilis* – Zellen haben eine durchschnittliche Größe von 50 µm Länge und 10 µm Breite und haben spindelförmige Gestalt. Die Mehrzahl der *Eugleniden* ist grün. In ihren Chloroplasten befinden sich Chlorophyll a und b (letzteres jedoch in geringerem relativem Anteil als bei grünen Pflanzen) und als Hauptcarotinoid Diadinoxanthin sowie einige andere, wie z. B. das beta-Carotin. Diese Pigmentzusammensetzung ähnelt der aller grünen Pflanzen, gleicht ihr aber nicht. Das Reserveprodukt Paramylon liegt in besonderen Aggregaten frei im Cytosol vor, obwohl es direkt über den Pyrenoiden (in den Chloroplasten) gebildet wird.



Abb. 2.2: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Pellikula von *Euglena gracilis* (H. QUADER, 1983, unveröffentlicht).

Den Abschluss der Zellen zum sie umgebenden Medium bildet bei *Euglena gracilis* keine Zellwand, sondern eine Pellikula. Die Pellikula setzt sich aus der außen liegenden, gefalteten Membran, ihr unterlagerten Mikrotubuli (in Abbildung 2.2 querschnitten und daher als Ringe erkennbar) und einer Anzahl von noch nicht charakterisierten Filamentsystemen zusammen. Unterhalb dieser Transversalfilamente liegt tubuläres Endoplasmatisches Retikulum, das mit den Mikrotubuli in Verbindung steht.

Viele Arten sind in der Lage sich einzukapseln. Dieser Mechanismus tritt auf, wenn die Umweltbedingungen ungünstig für den Organismus werden (Nährstoffmangel, ungenügende Sauerstoffversorgung, pH-Wert der Umgebung, etc.).

Ökologie

Die Mitglieder der Familie *Euglena* sind in der Natur sehr weit verbreitet. Die Arten sind freilebend und besiedeln Frischwasserbecken, Sammelbecken und Seen. Es gibt jedoch keine Salzwasserformen, auch wenn *Euglena* im marinen Sediment zu finden ist und einige in der Lage sind in bis zu 40%-igem Meerwasser zu überleben. *Euglena*-Arten sind generell aerob, aber einige tolerieren anaerobe Bedingungen für unterschiedlich lange Zeiten. *E. gracilis* kann anaerob in Pfützen wachsen, andere Arten dienen als Anzeiger für den Verschmutzungsgrad von organisch belasteten Gewässern (PALMER, 1969) und sind in der Lage hohe Dosen freier

Radionukleide in ihrer Umwelt zu tolerieren. *Euglena gracilis* überlebt hohe Dosen von hochenergetischer ionisierter Strahlung, z. B. 10^6 Röntgen von Cobalt-60. Ein ungewöhnlicher Grad der Anpassung an unterschiedlichste Lebensräume charakterisiert diese Familie mit Arten, die in Kannenpflanzen, auf Schnee, in Hochgebirgsseen, auf Borke und in saurem Kohleminenwasser mit einem niedrigen pH-Wert von 0,9 leben können.

E. gracilis ist in der Lage in einem Temperaturbereich von 1 bis zu 38 °C und bei pH-Werten von 2,3 bis 11 zu überleben.

Ernährung

Die Familie *Euglena* ist sowohl in der Lage Photosynthese zu betreiben, als auch die heterotrophe, oxidative Assimilation als Energiequelle zu nutzen. Im heterotrophen Zustand müssen den Organismen jedoch hohe Mengen an organischem Kohlenstoff zur Verfügung stehen. Außerdem brauchen sie einige anorganische Salze und Phosphat-, Sulfat-, Nitratquellen, Mineralien, die Vitamine B₁ und B₁₂. Auf komplexen Medien sind sie in der Lage bis zu hohen Dichten von $1,6 \times 10^7$ Zellen je Milliliter anzuwachsen (KOREN und HUTNER, 1967).

Taxonomie

Die Einordnung von *Euglena* war lange Zeit ein Problem. Der Genus wurde als photosynthetische Protozoe von den Zoologen und als Alge von den Botanikern eingeordnet. Aufgrund der Diversität der Zellform und des Baus der Organellen von *Euglena* (LEEDALE, 1978) scheint dieser Genus taxonomisch isoliert zu stehen und die Zuordnung zu den Protozoen oder Algen nicht mehr gerechtfertigt zu sein. Dieser Schluss konnte durch phylogenetische Beweise auf Basis der Nukleotidsequenzen der Gene getroffen werden, die für eine kleine Untereinheit der ribosomalen RNA kodieren. Diese molekulare Analyse (SOGIN et al., 1986) zeigte, dass sich *Euglena gracilis* schon lange von der gemeinsamen eukaryotischen Linie getrennt hatte, noch bevor die evolutionäre Entwicklung die Algen, Pflanzen, Tiere und Pilze hervorbrachte. Cavalier-Smith (1993) stellt *Euglena* in eine einzigartige Gruppe, in das Zwischenreich Euglenozoa. Interessanterweise sind die freilebenden Organismen des Genus *Euglena* phylogenetisch am nächsten zu den entfernten parasitischen Trypanosomen (CAVALIER-SMITH, 1993). Der hohe Grad an Übereinstimmungen in den ribosomalen RNAs von *Euglena gracilis* und *Trypanosoma brucei*

unterstützt diesen Schluss und legt nahe, dass zum einen eine entfernte Verwandtschaft zwischen den beiden Organismen vorliegt, aber auch eine lange Trennung in der evolutionären Geschichte (SOGIN et al.,1986).

2.2 Gründe für die Popularität der Eugleniden

Euglena gracilis war eine der ersten photosynthetischen, eukaryotischen Mikroorganismen die für Laborzwecke angezogen wurde. Die Wachstumsbedingungen sind relativ einfach und verschiedene Stämme zeigen eine Generationszeit zwischen 10 und 25 Stunden.

Die biochemische und physiologische Flexibilität dieser Art, gekoppelt mit einer morphologischen Flexibilität die leicht sichtbar zu machen ist mittels Lichtmikroskopie oder Elektronenmikroskopie, tragen zu der Popularität weiterhin bei. Sie eignen sich sowohl für Einzellerstudien, als auch für Untersuchungen im größeren Maßstab einer Fermenterkultur.

Diese Art ist auch das wohl bekannteste Beispiel dafür, dass circadiane und infradiane Rhythmen existieren und auch an Einzellern untersucht werden können. Außerdem kann man durch den Aufbau der Pellikula *Euglena gracilis* sehr leicht auftrennen und somit leicht den Zellkern, Chloroplasten, Mitochondrien, Flagellen und Pellikula präparieren.

2.2.1 Signifikanz für die Forschung

Studien am Genus *Euglena*, insbesondere an *Euglena gracilis*, waren signifikant für das Verständnis der Biochemie und molekularen Biologie der Kernbestandteile und der subzellularen Organellen.

Zellkern

Der Kern (Nucleus) von *Euglena* konnte isoliert und seine Ultrastruktur umfassend untersucht werden. Die Anzahl der Chromosomen variiert mit den Arten, z.B. hat *E. gracilis* 45 während die höher ploide *E. spirogyra* 86 Chromosomen hat. Anders als bei den Zellen höherer Pflanzen erscheinen die Chromosomen zu allen Zeiten des Zellzyklusses kondensiert.

Die Zellteilung bei *Euglena* ist eine Mitose, aber eigentümlicherweise eine bei der die Kernhülle während des gesamten Prozesses bestehen bleibt. Der Zellkern (auch als Endosom bezeichnet) bleibt auch bestehen, verlängert sich entlang der Zellteilungsachse (senkrecht zur Längsachse der Zelle) und teilt sich in zwei Tochterzellkerne. Die Chromosomen ordnen sich während der Metaphase parallel zur Teilungsachse an.

Mitochondrien

Das mitochondriale System von *E. gracilis* und scheinbar von anderen *Euglena*-Arten ist normalerweise ein einzelnes Reticulum, das sich durch die ganze Zelle verzweigt (siehe Abbildung 2.1). Der Grad der Verzweigungen und die Dicke der Zweige variiert bei verschiedenen Ernährungsbedingungen und während verschiedener Phasen der Zellteilung. Die äußere Mitochondrienmembran ist stark gewellt und die der Cristae, anders als die der meisten Eukaryoten aber ähnlich denen der Trypanosomen, ist discoid und zusammengezogen an ihrer Basis.

Die Mitochondrien-DNS von *Euglena* hat eine Molmasse von 40×10^6 Da, einen niedrigen G + C -Gehalt (25 %) und liegt als eine komplexe Mixtur aus zirkulären und heterogenen linearen Molekülen, ähnlich dem mitochondrialen Genom höherer Pflanzen (BUETOW, 1999) vor.

Chloroplast

Anders als in den Chloroplasten höherer Pflanzen wird bei *Euglena* keine Stärke gespeichert, sie reduzieren keinen Schwefel und beinhalten keine NADP⁺-abhängige Malatdehydrogenase. Der Schwefelmetabolismus und die Dehydrogenase sind in den Mitochondrien von *Euglena* zu finden.

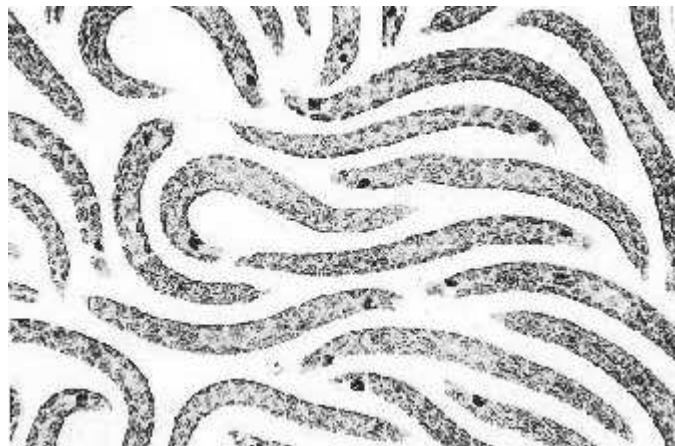


Abb. 2.3: *Euglena gracilis* in einer lichtmikroskopischen Aufnahme in photoautotrophen Zustand (CANTERLUND, 1984).

Die Chloroplasten sind von einer Dreifachmembran umgeben, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass sie diese durch Endosymbiose mit eukaryotischen grünen Algen gewonnen haben (GIBBS, 1981). Unter Dauerdunkelbedingungen verlieren die Chloroplasten von

Euglena ihre typische Struktur. Es bleiben farblose Proplastiden erhalten, die sich bei Belichtung in voll funktionsfähige Chloroplasten differenzieren.

2.3 Auswirkung von durch *Euglena gracilis* produzierte Produkte auf die Menschheit

Euglena gracilis benötigt geringe Mengen an Vitamin B₁₂ für das Wachstum. Deshalb war auch der erste Einsatz dieser Organismen im medizinischen Bereich um den B₁₂-Gehalt in biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen. *Euglena gracilis* hat auch gute Aussichten als Lieferant für Einzeller-Protein (HOSOYA und KITAOKA, 1977). Der Stamm *Euglena gracilis* Z dient als Basis eines Bioassays, in dem sowohl künstliche, ultraviolette und natürliche Sonnenstrahlung überwacht wird. Außerdem dient dieser Stamm der Bestimmung toxischer Effekte von Schwermetallionen und organischer Verunreinigungen (HÄDER et al., 1997). *Euglena gracilis* stellt auch ein effizientes und kostengünstiges System für die Reinigung und Wiederaufarbeitung von landwirtschaftlichen und städtischen Abwässern dar (WAYGOOD et al., 1980) und kann als „Bioreaktor“ für die Produktion von Wachsesteren (TANI et al., 1987) und Vitamin E (TANI und TSUMURA, 1989) und für die Biotransformation von Terpenen und verwandten Stoffen (NOMA und ASAKAWA, 1998) dienen.

Für diese Arbeit standen aber eher andere Aspekte im Vordergrund, die mit der Wirkung des Paramylons auf den Menschen zusammenhängen:

1. stimulierender Einfluss auf das menschliche Immunsystem
2. Blut - Cholesterinspiegel senkende Wirkung
3. Regulation des Blutglucosespiegels und der Insulin-Antwort
4. Antitumorwirkung
5. sulfonierte Derivate von Paramylon beeinflussen signifikant HIV-1 und HIV-2 (human immunodeficiency virus)

2.4 Aufnahmeweg der Glucose in den Stoffwechsel von *Euglena gracilis*

In Abwesenheit von Licht ist *Euglena* in der Lage, Glucose aus dem Medium aufzunehmen und in den Stoffwechsel einzuschleusen (CRAMER und MYERS, 1952). Neben einigen Umweltfaktoren ist für die Glucoseaufnahme auch noch der Stamm wichtig.

- Bei *Euglena gracilis* wird durch einen erhöhten CO₂-Partialdruck das Wachstum stimuliert, wenn man die Werte bis auf 5 % erhöht (HURLBERG und RITTENBERG, 1962).
- Der pH-Wert spielt eine wichtige Rolle, denn bei pH-Werten um 4,5 wird Glucose ohne weiteres aufgenommen, bei erhöhten pH-Werten von 6,8 – 7,0 kann Glucose nicht aufgenommen werden (HURLBERG und RITTENBERG, 1962; COOK und HEINRICH, 1965; BARRY, 1962).
- Die Glucosekonzentration im Medium spielt eine weitere wichtige Rolle. Bei Glucosekonzentrationen unter 0.2 % (= 2 g/l) ist kein Wachstum festzustellen, bei höheren Glucosekonzentrationen steigt die Wachstumsgeschwindigkeit mit dem Anstieg der Glucosekonzentration bis 3 % stetig an (BARRAS und STONE, 1965).
- Ein weiterer wichtiger Faktor für das Wachstum der Zellen ist die Geschichte der Zellen. Die Wachstumsphase und auch die Versorgung mit einer externen Kohlenhydratquelle spielen für folgende Versuche eine wichtige Rolle (PRINGSHEIM, 1955). Je nach dem vorherigen „Ernährungszustand“ adaptieren sich die Zellen schneller oder langsamer an ein neues Medium (YADEN, 1965).

Euglena gracilis ist in der Lage mit Glucose oder Fructose als primärer Kohlenhydratquelle zu wachsen, jedoch wurde mit Galaktose, Mannose oder den Zuckeralkoholen Glycerin und Mannitol kein Wachstum nachgewiesen. Neben der Aufnahme von Stärke durch *Euglena gracilis* wurden keine anderen polymeren Kohlenhydrate gefunden, die als Substrat dienen könnten (LWOFF und DUSI, 1934, diskutiert von HUTNER und PROVASOLI, 1951).

Der Aufnahmeweg der Zucker über die Membran kann als ein ‚aktiver‘ und selektiver Prozess beschrieben werden (CIRILLO, 1961; TAYLOR, 1969a, b). Aber selbst nach der Passage der Membran werden die Moleküle nur metabolisiert, wenn die nötigen Hilfsenzymssysteme für den Eintritt in den vermittelnden Stoffwechsel bereitstehen. Selbst nach der Aufnahme spielen noch Umweltfaktoren in der Kultur eine wichtige Rolle, ob die aufgenommenen Stoffe tatsächlich verarbeitet werden oder aber ob die Einschleusung in den Stoffwechsel verhindert wird.

Bei der Aufnahme der von außen kommenden Glucose in den Stoffwechsel von *Euglena gracilis* spielen die Enzyme Hexokinase, Phosphoglucomutase und Laktatdehydrogenase eine Schlüsselrolle. Hexokinase konnte ‚labil‘ auch bei photosynthetisch aktiven Zellen festgestellt werden, jedoch erst der Wechsel in ein glucosehaltiges Medium induziert die vermehrte Produktion von Hexokinase und den nötigen Transportmechanismen über die Membran (BELSKY, 1957).

Wie man aus der Literatur entnehmen kann, wächst *Euglena gracilis* auf einer großen Anzahl von nicht-Kohlehydrat Kohlenstoffquellen. Ihr Eintritt in den Stoffwechsel von *Euglena gracilis* und der Weg bis zum für dieses Projekt wichtigen Paramylon soll hier dargestellt werden. Am besten erforscht sind die Aufnahmewege für Acetat (HUTNER *et al.*,1966), Ethanol (HUTNER *et al.*,1966) und Succinat (WOLKEN, 1961) (siehe Abbildung 2.4) und die Aufnahme der Kohlenstoffatome dieser Substrate in Kohlenhydrate (Hexosephosphate oder Paramylon) (siehe Abbildung 2.5).

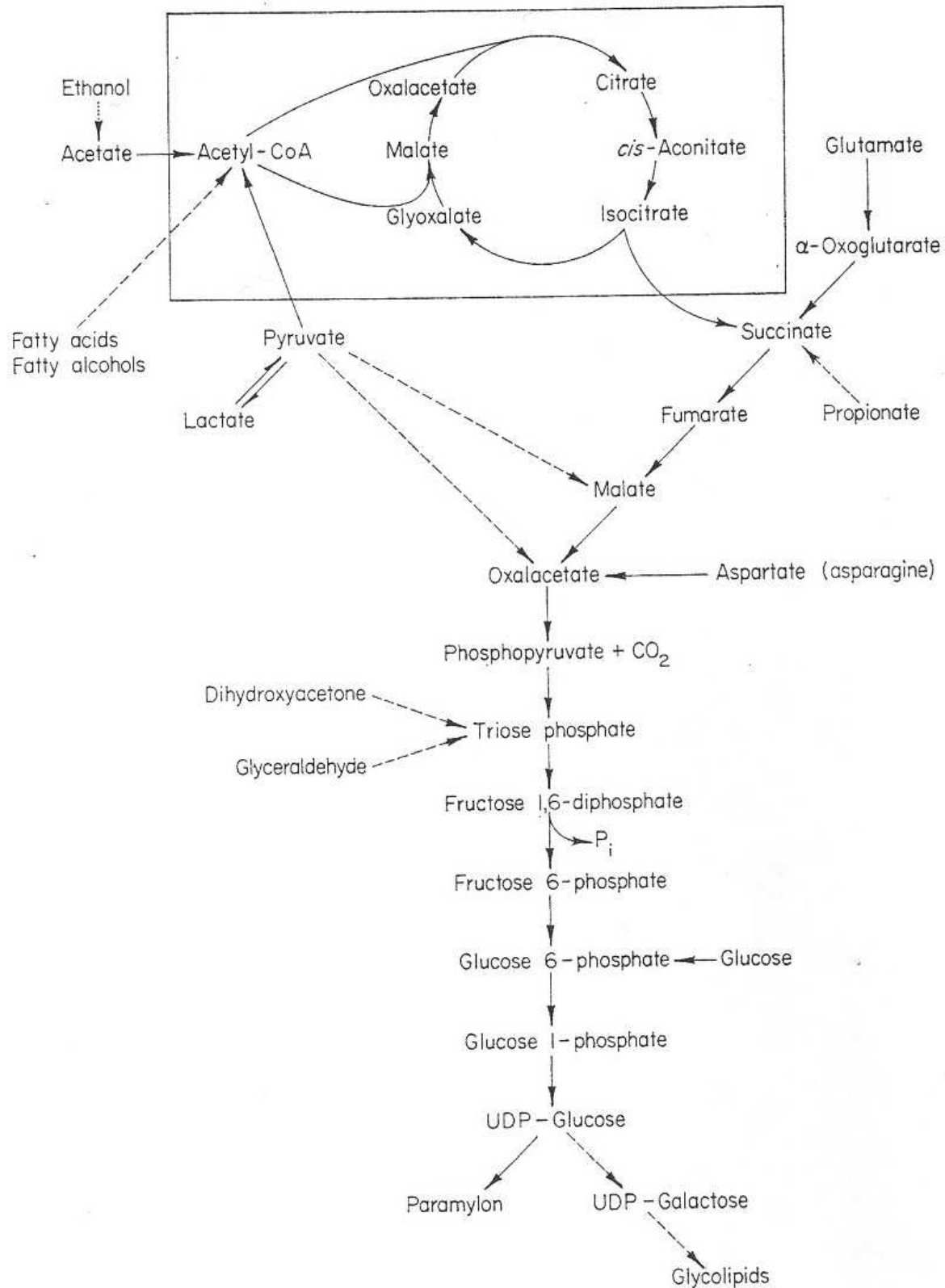


Abb.2.4: Generelle Stoffwechselwege der Gluconeogenese. Durchgezogene Pfeile stellen Reaktionen oder Reaktionsschritte dar die in Eugleniden bekannt sind, während die gestrichelten Pfeile Reaktionen oder Reaktionsschritte darstellen, die nicht in Eugleniden gefunden werden konnten. Der Citronensäurezyklus ist eingerahmt (BARRAS und STONE, 1965).

Da die Vorversuche mit unterschiedlichen Zuckern klar deutlich gemacht haben, dass eine Verwendung von anderen Zucker als Glucose sich nicht für die Paramylonausbeute rentiert, soll hier folgend (siehe Abbildung 2.5) ein genauerer Blick auf den Aufnahme- und Weiterverarbeitungsweg von externer Glucose durch *Euglena gracilis* geworfen werden.

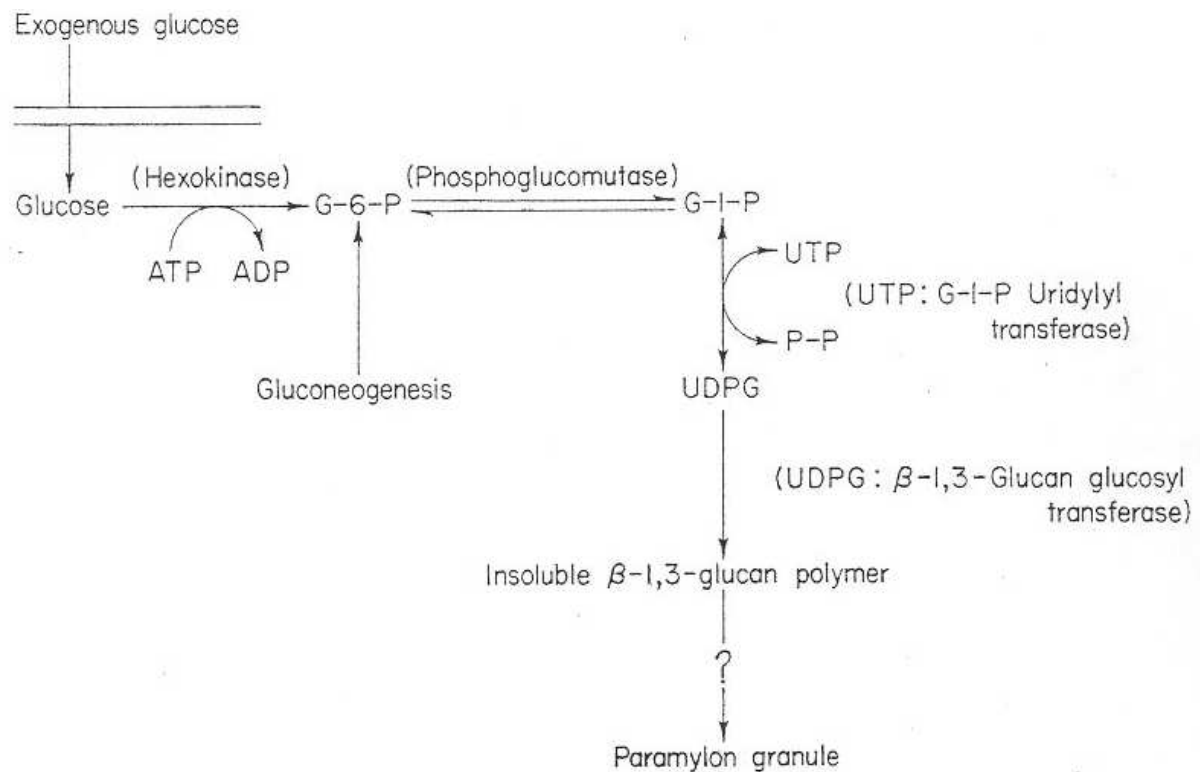


Abb. 2.5: Abriss der Reaktionen, die zur Synthese von Paramylon führen (BARRAS und STONE, 1965).

In einem ersten Schritt wird die von den Zellen inkorporierte Glucose durch Hexokinase in Anwesenheit von ATP phosphoryliert und dann durch eine Phosphoglucomutase der Phosphatrest innerhalb des Moleküls verschoben ($G-6-P \leftrightarrow G-1-P$). Unter UTP-Verbrauch wird durch eine Uridylyltransferase der Phosphatrest vom G-1-P abgespalten und mit einem Phosphatrest des UTP als Diphosphat freigesetzt, wobei UDPG entsteht. Durch eine β -1,3-Glucan Glycosyltransferase kommt es zur Abspaltung des UDP und zu einer Polymerisierung der Glucosemoleküle in 1,3-Richtung. Der letzte Schritt, das Entstehen der hochgeordneten Paramylongranula ist bisher noch nicht hinreichend geklärt (SOMMER und BLUM, 1965).

Als optimale Temperatur für die Produktion von Paramylon stellte sich nach diversen Versuchen eine Temperatur zwischen 27 °C und 28 °C heraus (siehe auch COOK, 1966). Niedrigere Temperaturen führen zwar pro Zelle zu einem höheren Paramylongehalt, höhere Temperaturen zu mehr Zellen, bei einer Temperatur von 27,5 °C ist jedoch die höchste Ausbeute an Paramylon je Liter Medium zu erwarten.

2.5 Kartoffelfruchtwasser, was ist das ?

Wenn man es ganz einfach betrachtet, dann kann man die obige Frage am besten wie folgt beantworten: Die Stärkekartoffel besteht aus 17,4 % Stärke-Trockenmasse, 1,8 % Fasern und 76,4 % Kartoffelfruchtwasser mit 2,5 % Rohprotein, 1,3 % Salzen, 0,5 % Kohlenhydraten und 0,1 % Fett (STROOT, 1991). Kartoffelfruchtwasser ist also alles das was übrig bleibt, nachdem man die Kartoffelstärke aus den Kartoffelknollen geholt hat.

Nun folgend eine kurze Beschreibung der Prozesse, die schließlich zu diesem Nebenprodukt der Stärkegewinnung führen.

Die Kartoffelstärke-Gewinnung beruht auf der Zerstörung der Kartoffel durch mechanische Zerkleinerung (Reiben) und der anschließenden physikalischen Trennung der Stärke von den löslichen und unlöslichen Bestandteilen der zerkleinerten Kartoffel. Die Hauptaufgabe ist dabei die Herauslösung der Stärkekörner aus den Kartoffelzellen und die anschließende Trennung der Stärkekörner von den übrigen Kartoffelreststoffen.

Die Verfahren die hierfür nötig sind, kann man grundlegend wie folgend beschreiben:

1. Waschen der Kartoffeln
2. Zerkleinern mit Ultrareiben (Rohstoffaufbereitung)
3. Trennung der Stärke und Fasern vom Kartoffelfruchtwasser
4. Trennung der Stärke von Fasern und Entwässerung (Extraktion)
5. Zweistufige Raffination der Kartoffelstärke

Große Volumenströme mit organisch hoch belastetem Wasser entstehen bei dieser Verarbeitung zwischen den Schritten 2 und 4. Es handelt sich einerseits um das Reibsel (→ Feststoffe der Kartoffel), abgetrenntes konzentrierte Kartoffelfruchtwasser (kKFW) und das bei der Stärkegewinnung aus dem Reibsel freiwerdende sogenannte Prozesswasser (PW).

Das kKFW gelangt im Werk der Emsland Stärke in Emlichheim in die Umkehrosmose-Anlage-I (UO-I), dort erfolgt eine Aufkonzentrierung durch Membrantrennverfahren. Dem kKFW wird durch dieses Verfahren Wasser entzogen und das Retentat (KFW) geht in die Eiweißgewinnung, das Permeat gelangt als relativ sauberes Wasser in die Kartoffelwäsche. Durch diese Vorkonzentrierung mittels der UO-I des KFW werden stündlich während der Kampagne 140 m³ Kartoffelfruchtwasser in 80 m³/h Retentat und 60 m³/h Permeat aufgetrennt.

Das so entstandene KFW enthält ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen, die für eine weiterführende Verwendung als Medium für die Fermentationstechnologie interessant sind.

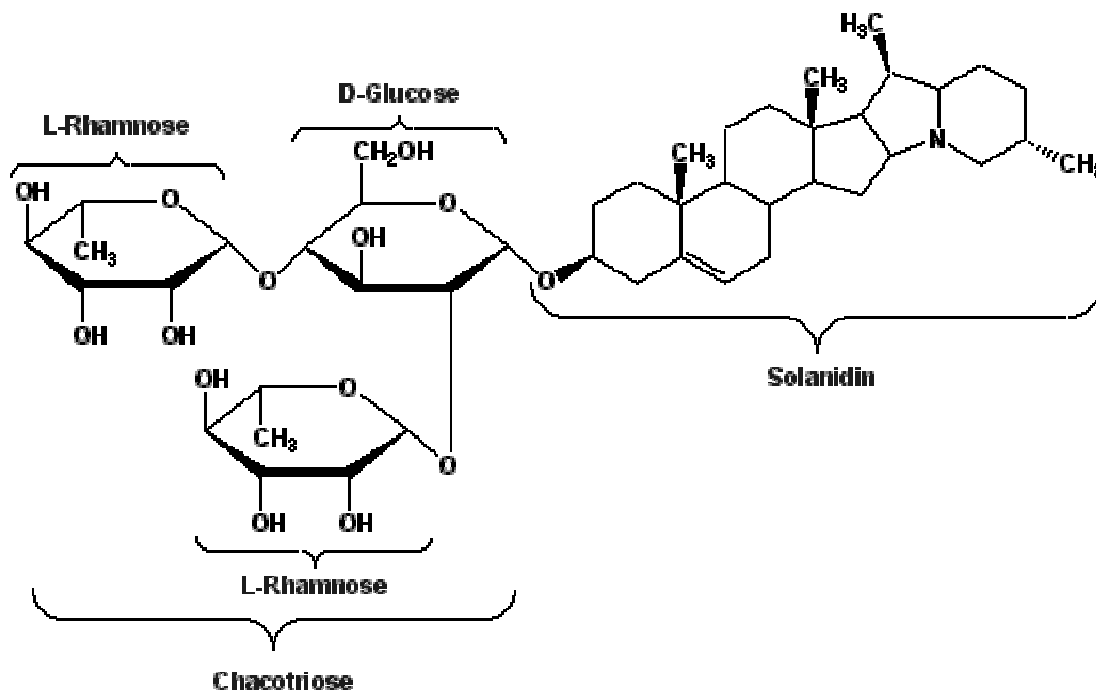
Tab. 2.1: Inhalt des KFW und Permeats nach der Celluloseacetat Membran der UO-I (STROOT, 2001)

Bestandteil	KFW	Permeat
Trockensubstanz (g/l)	50,8	0,45
Mineralstoffe (g/l)	12,7	0,2
Kjeldahl-N (g/l)	4,78	<0,1
org. Säuren (g/l)	3,20	0,39
Natrium (mg/l)	396	4,5
Kalium (mg/l)	5.510	95
Ammonium (mg/l)	206	15
Chlorid (mg/l)	800	4,1
Sulfat (mg/l)	1.830	95
Phosphat (mg/l)	667	1,3
LF (μ s/cm)	12.000	284 - 500

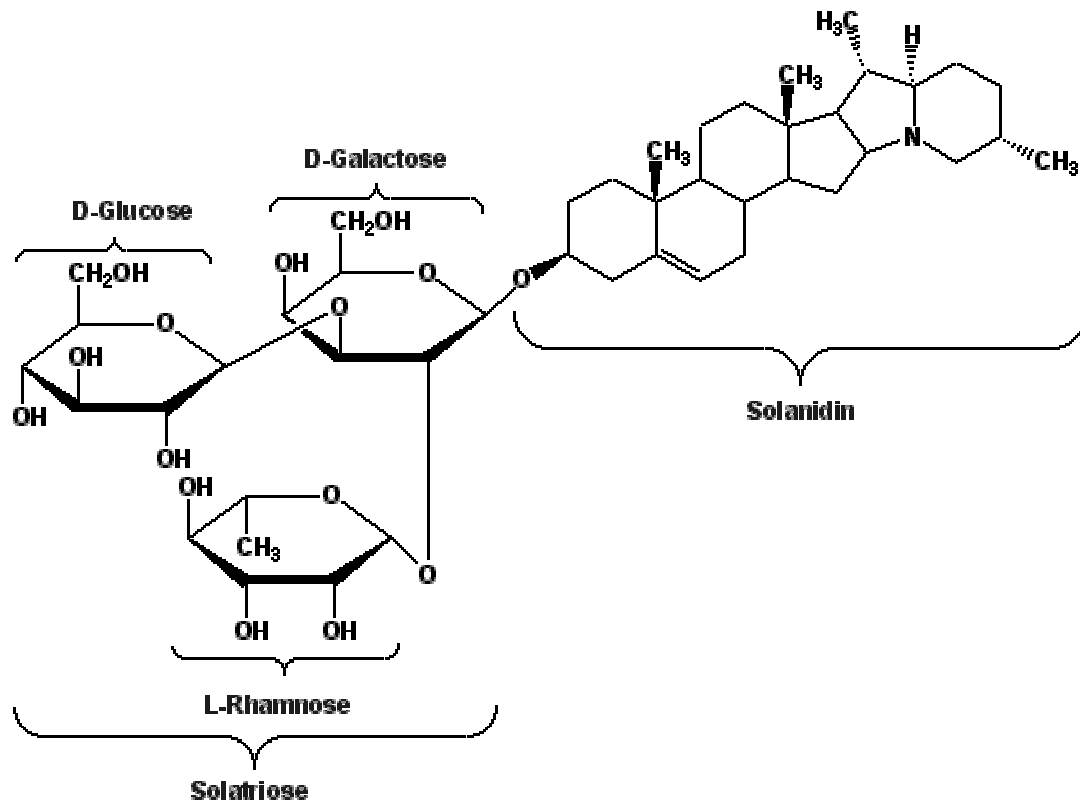
Neben den in Tabelle 2.1 aufgeführten Substanzen findet man im KFW noch die Glycoalkaloide der Kartoffel (Solanin und Chaconin) und Protein (Hauptanteil als Patatin, RACUSEN, D. und FOOTE, M., 1980).

2.6 Was sind Glykoalkaloide ?

Glykoalkaloide sind natürlich vorkommende toxische Pflanzenstoffe, die aus einer Alkaloid- und mehreren Zuckereinheiten (Monosaccharide) bestehen. In der Kartoffel sind die beiden Glykoalkaloide α -Chaconin und α -Solanin vorherrschend. Sie bestehen aus dem Alkaloid Solanidin und drei Monosacchariden. Beim α -Chaconin sind dies zwei Rhamnose- und eine Glucoseeinheit enthalten, bei α -Solanin die Monosaccharide Glucose, Galaktose und Rhamnose.



α -Chaconin (Quelle: <http://www.biosite.dk/staabi/chaconin.htm>)



α -Solanin (Quelle: <http://www.biosite.dk/staabi/solanin.htm>)

Zwischen den einzelnen Kartoffelsorten bestehen häufig erhebliche Unterschiede im Alkaloidgehalt und Witterungseinflüsse wie Hagel, Frostschäden, oder kalte Vegetationsabschnitte können zu einer Erhöhung des Alkaloidgehaltes führen. Weitere Faktoren die zur Erhöhung des Alkaloidgehaltes führen können, sind der Reifezustand der Kartoffeln (nimmt mit dem Reifezustand ab), mechanischen Verletzungen (verletzte Kartoffeln enthalten mehr Alkaloide als unverletzte), Lichteinfluss (ergrünte Kartoffeln enthalten erheblich mehr Alkaloide) und nicht zuletzt die Lagerung und Temperatur (lange Lagerung und zu niedrige Temperatur erhöhen den Alkaloidgehalt) (KUPFER, H.: 1989).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Abgasanalyzesystem	Hartmann und Braun URAS10E
Ammoniummessung	CONSORT Microcomputer Ionmeter Ammonium-Elektrode
Autoklaven	KSG 112 Zirbus VST 50 / 70
Bioreaktor	MBR Bioreaktor 7 L MBR Bioreaktor 30 L Datenerfassung Advantech VisiDAQ 3.11
Brutschrank	AQUALYTIC Thermostatschrank Mettler Thermostatschrank
Elementaranalysator	Elementaranalysator vario EL
Filtermodul	Typ Omega 1 Mda Typ Omega 5 kDa
Gefriertrocknungsanlage	Christ Beta 1-8K
Glucosemessgerät	RLT Super _{GL} ambulance
Hochdruckhomogenisator	Rannie High Pressure Laboratory Homogeniser Mini-Lab 8.30H
Magnetrührer	IKA Labortechnik IKAMAG [®] REO
Mikroskop Olympus	Bx40 (10-, 20-, 100-fache Vergrößerung) mit Phasenkontrasteinrichtung Bx-PHD mit Videokamera JVC TK-C1381 und Sony Trinitron Color Video Monitor PVM-14NSE
Osmometer	VOGEL Osmometer OM-802
pH-Meter	Metrohm, 691
Photometer	Pharmacia Biochrom 4060
Pilzheizhauben	Wittmann GmbH, Typ RM 1001
Rotationsschüttler	B. Braun, Certomat R N(°)ctua K15/500 Infors HT
Sterilarbeitsbank	Heraeus Laminair HB 2448 Woerden Clean Air DLF/RS4

Sterilfilter	PALL Gelman Laboratory Aerodisc [®] Syringe
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge 15
Trübungssonde	Aquasant
Ultrafiltrationsanlage	PALL FILTRON Zentrasette PALL FILTRON Miniset
Ultraschallgerät	Branson, Sonifier 450
Vakuum-Trockenschrank	Heraeus, VT 5042 EK
Vortex-Mischer	Vortex Genie2, Bender & Hobein
Waagen	Mettler, AE 260 Deltarange, 0,1mg-1,5 g Kern, Serie 822-33, 1,5-250 g Mettler, PM34-K Deltarange, >250 g
Wasserbad	Julabo F 10-HC / 8
Zellzähler	Schärfe System CASY [®] 1
Zentrifugen	Eppendorf 5415 C Heraeus Biofuge 15 Braun Sigma 3K20 Braun Sigma 6K10

3.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a..

Aceton	Merck, Darmstadt
D,L-Äpfelsäure	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Ammoniumeisen(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniummolybdat	Merck, Darmstadt
L-Asparaginsäure	ROTH, Karlsruhe
Borsäure	J. T. Baker, Holland
α -Chaconin	ROTH, Karlsruhe
Cobaltchlorid	Merck, Darmstadt
Cynocobalamin	Merck, Darmstadt
Diammoniumhydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J. T. Baker, Holland
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucoseoxidase (200 U/l)	Sigma, Steinheim
Glucose-Pufferlösung (für Ambulance)	RLT, Möhnensee-Dreihausen
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Bioferm, Hampshire, England
INFINITY-Glucose-Reagenz	Sigma Diagnostics, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Holland
Kalziumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kobaltsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumcarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	J. T. Baker, Holland
Mangansulfat-Monohydrat	Merck, Darmstadt

Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J. T. Baker, Holland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumnitrat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumsuccinat	Sigma, Steinheim
Natriumthiosulfat	Fluka, Schweiz
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	J. T. Baker, Holland
Silbernitrat	Heraeus, Langenselbold
α -Solanin	ROTH, Karlsruhe
Thiamin (Vitamin B ₁)	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Merck, Darmstadt

3.3 Versuchstämme

Als Versuchsorganismus wurde *Euglena gracilis* strain Z (Klebs 1224-5/25) aus der Sammlung der Algen Göttingen (SAG), Deutschland verwendet. Bei dem hier verwendeten Stamm handelt es sich um den Wildtypen.

In den Vorversuchen wurde *Ashbya gossipii* (DSM 3499, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland), *Chlorella protothecoides* (SAG 211-10a), *Saccharomyces cerevisiae* LBG 1022 (ATCC 32167), *Escherichia coli* (DSM 30083, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) und *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) verwendet.

3.4 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die heterotrophen *Euglena gracilis* Zellen in einem leicht modifizierten Nährmedium von HUTNER (1966) [siehe Kapitel 3.6] im Dunkeln bei 25 °C in 300 ml Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml auf einem Schüttler mit einer Schüttelfrequenz von 120 min⁻¹ und einer Auslenkung von 15 mm kultiviert. Alle zwei bzw. drei Tage wurde eine frische Dauerkultur angelegt, bei der jeweils 5 ml Stammkultur auf 100 ml frisches Medium (NL) steril umgeimpft wurden. Durch Verwendung dieser Zeitabstände konnte sichergestellt werden, dass sich der größte Teil der Kultur in der exponentiellen Phase befindet (BÄUMER, 1999).

3.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Zur Herstellung von Inokulationskulturen für Fermentationen im 7 L-Bioreaktor wurden 250 ml NL-Medium mit 12,5 ml Stammkultur versetzt und die Kultur wurde für zwei Tage auf einem Rotationsschüttler ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Auslenkung $n_A = 25 \text{ mm}$) inkubiert. Der Bioreaktor wurde mit dieser Inokulationskultur angeimpft.

3.5 Kultivierung im Bioreaktor

Die Satz- (Batch-) und Zulauf- (Fed-Batch-) Kultivierungen wurden in einem 7 Liter- oder einem 30 Liter-Rührkessel der Firma MBR (Wetzikon, Schweiz) durchgeführt.

3.5.1 Aufbau der Bioreaktoren

Die Bioreaktoren besaßen standardisierte Abmessungen, die die DECHEMA-Norm für Bioreaktoren (DECHEMA 1991) erfüllten. Der 7 L-Bioreaktor wies ein Höhe-Durchmesser-Verhältnis von 3:1 auf. Der Rührer war an die Reaktorhöhe angepaßt. Die geometrischen Abmessungen des 7 bzw. 30 L-Rührkessels sind in Abb. 3.1 mit der dazugehörigen Tabelle (Tab. 3.1) dargestellt.

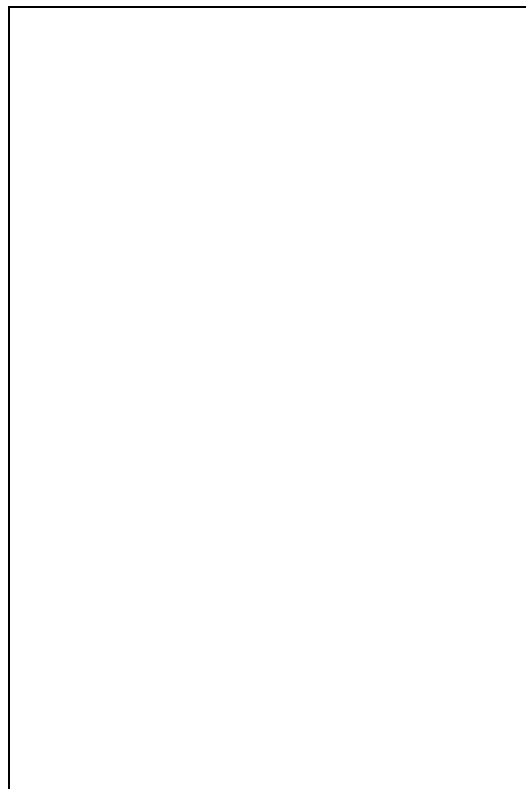


Abb. 3.1: Abmessungen von Bioreaktoren.

Abb. 3.2 zeigt schematisch den Aufbau der Bioreaktoren mit deren Peripherieausrüstung. Der 7 Liter-Rührkessel bestand aus einem doppelwandigen Stahlunterteil, mit Ansatzstützen für

die Mess-Sonden und einem Glaszylinder als Oberteil. Der 30 Liter-Bioreaktor bestand aus einem durchgehenden doppelwandigen Stahlgefäß. Der Deckel beider Bioreaktoren bestand aus Edelstahl und enthielt Durchgänge für die Zuluftleitung, die Abluftkühlung, sowie diverse Stutzen zum Anschluss von Mess-Sonden und zur Ankopplung von Vorlagegefäßen zur Dosierung von Säure, Base, Antischaummittel und Nährlösungen. Die Bioreaktoren enthielten seitlich 4 Stromstörer und zwei (7 Liter-Bioreaktor) bzw. drei 6-Blatt-Scheibenrührer. Die Rührerwelle war über eine Magnetkupplung mit dem Rührermotor verbunden. Die Temperierung der Reaktoren erfolgte über die Doppelmäntel durch Kühlwasser bzw. Einblasen von Heißdampf. Die Begasung des Kulturmediums erfolgte über einen Begasungsring. Keimfreie Bedingungen wurden durch Sterilfilter in der Zuluft- und Abluftstrecke gewährleistet. Die Abluftstrecke enthielt zusätzlich ein Nadelventil zur Regelung des Reaktorinnendrucks.

Tab. 3.1: Abmessungen der in Abb. 3.1 dargestellten Bioreaktoren.

	MBR 7 L-Laborreaktor	MBR 30 L-Laborreaktor
Reaktordurchmesser (D)	150 mm	240 mm
Reaktorhöhe (H)	400 mm	700 mm
Rührerdurchmesser (d)	70 mm	79 mm
Breite der Blätter (a)	15 mm	20 mm
Höhe der Blätter (b)	14 mm	14 mm
Scheibendurchmesser (c)	50 mm	50 mm
Anzahl der Blätter	6	6
Anzahl der Rührer	2	3
Abstand d. Bodenrührers v. Boden	125 (110) mm	120 mm
Abstand d. 2. Rührers v. Boden	250 (220) mm	240 mm
Abstand zwischen den Rührern (k)	125 mm	120 mm
Abstand Rührerblatt-Luftverteilung	60 mm	60 mm
Rührerwellendurchmesser	20 mm	20 mm
Anzahl der Stromstörer	4	4
Höhe (g)	330 mm	550 mm
Breite (e)	20 mm	20 mm
Wandabstand (f)	3 mm	5 mm
Abstand v. Fermenterboden (h)	5 mm	5 mm

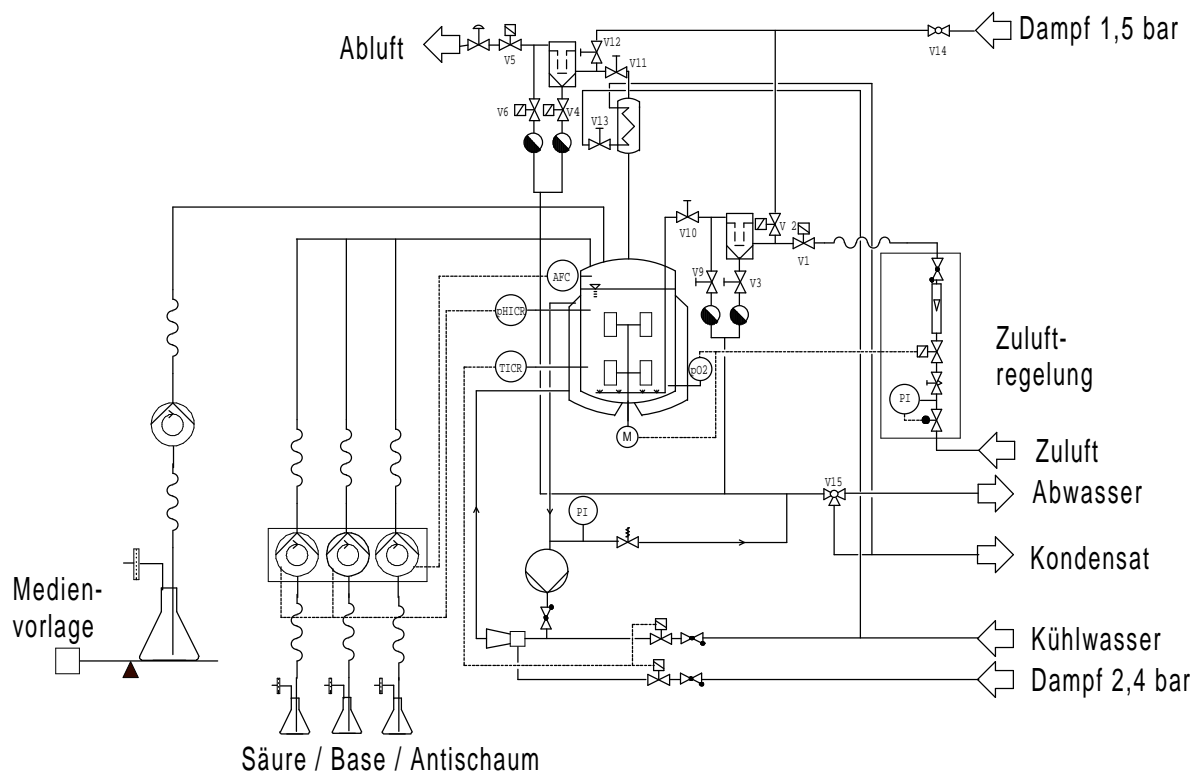


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Bioreaktoren.

3.5.2 Messtechnik

Die Bioreaktoren waren mit einer Reihe verschiedener Mess-Sonden und Mess-Instrumente ausgerüstet. Standardmäßig erfolgte die Messung des Reaktorinnendrucks über einen Druckaufnehmer und die der Temperatur über ein PT100-Widerstandsthermometer. Eine konduktometrisch arbeitende Schaumsonde diente zur Schaumkontrolle. Für die Überwachung des pH-Wertes diente eine hitzesterilisierbare pH-Einstabmeßkette (Fa. Mettler Toledo), die vor der Sterilisation mit Pufferlösungen von pH 7,0 und 4,0 geeicht und mit einem Überdruck von ca. 2 bar versehen wurde. Die relative Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) wurde mit Hilfe eines polarographischen O_2 -Sensors der Firma Mettler Toledo gemessen, der durch Begasung des Mediums im Reaktor mit Stickstoff (0 %) und Luft (100 %) unter Kultivierungsbedingungen geeicht wurde. Die Kontrolle des Luftvolumenstroms erfolgte über eine Zuluft-Regelungseinheit (*Massflow-Box*).

Die Bestimmung der Sauerstoff- und der Kohlendioxidkonzentration in der Bioreaktorabluft erfolgte mit Hilfe des kombinierten Abgasanalysestems URAS10E (Hartmann und Braun). Dabei wurde die Kohlendioxidkonzentration mit Hilfe der Absorption von Licht im

Infrarotbereich ermittelt, während die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration über die paramagnetischen Eigenschaften des Moleküls vorgenommen wurde. Die Kalibrierung wurde durch das System automatisch durchgeführt.

3.5.3 Digitale Steuereinheit

Die Steuerung der Bioreaktoren geschah durch eine direkte, digitale Steuereinheit (*direct digital control unit*, DDC), die analoge Mess- und Regeleinschübe besaß, in Verbindung mit einem VME-Bus-Prozessrechner. Die wichtigsten Funktionen der DDC waren die Erfassung und Regelung von Temperatur, pH, pO_2 , Rührerdrehfrequenz, Reaktorinnendruck, Luftvolumenstrom und Zugabe von Antischaummittel.

Der VME-Bus-Rechner übernahm die übergeordnete Steuerung des Prozesses. Digitale Steuereinheit, Abgasanalytik und Pumpen waren mit diesem Rechner verbunden, so dass alle Prozessparameter und Prozessdaten kontinuierlich erfasst, gespeichert und entsprechend visualisiert werden konnten. Die Eingaben der Sollwerte erfolgten ebenfalls über diesen Prozessrechner. Außerdem wurden sowohl die Säure-, Base-, Antischaum-Pumpen als auch die Zulaufpumpe angesteuert und der pO_2 z.B. über die Rührerdrehfrequenz geregelt.

Der VME-Bus-Rechner war als Steckkartensystem aufgebaut und mit dem PME 68-25M-Prozessor der Firma Motorola mit einer Taktfrequenz von 25 MHz und 4 MB Arbeitsspeicher ausgerüstet. Der Rechner verfügte über ein Analogeingangsmodul XVME-560 (Fa. XYCOM) mit 32 Analogeingängen, über zwei Analogausgangsmodule XVME-530 mit je 8 Analogausgängen, zwei Digitalausgangsmodule TSVME-400 bzw. 401 mit je 32 digitalen Ausgängen und ein serielles Ein/Ausgangsmodul IASCM-XVME-428/1 mit 8 seriellen RS232-Schnittstellen.

Die Visualisierung erfolgte auf einem VT340-Terminal mit 2 voneinander getrennten, umschaltbaren Benutzerebenen. Das Betriebssystem des Rechners war OS9, während die Prozessführung vom Prozessleitsystem Caroline II (Fa. PCS, Schweiz) ausgeführt wurde. Für die Programmierung und Änderung dieses Systems stand ein UMACS-Compiler zur Verfügung.

3.5.4 Sterilisation und Kultivierung

Die Hitzesterilisation des mit Kulturmedium gefüllten Bioreaktors wurde für 25 min bei 121 °C automatisch durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte auch eine Sterilisation der Zulauf- und der Abluftstrecke. Nach dem Abkühlen wurde das gewünschte Kulturvolumen durch Zulauf von kondensiertem Wasserdampf über die Abluftstrecke eingestellt. Die sterilfiltrierten hitzeempfindlichen Medienbestandteile (Glucose, Ammoniumsalze, Magnesiumsulfat und Kanamycin) wurden durch Septen im Deckel des Bioreaktors injiziert. Über weitere Septen wurden die getrennt autoklavierten pH-Korrekturflüssigkeiten, Antischaummittel und Zulaufmedien angeschlossen.

Nach Einstellung der Sollwerte der Betriebsbedingungen wurde die Kultivierung durch Animpfen mit einer Inokulationskultur (10 Volumenprozent des Arbeitsvolumens des Bioreaktors) durch ein Septum gestartet.

3.5.6 Probenahme

Die Probenahme erfolgte manuell über ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil. Es wurden zuerst ca. 20 ml als Vorlauf verworfen und anschließend ca. 20 ml Probe entnommen. Um weiteres Wachstum zu verhindern, wurden die Proben sofort aufgearbeitet.

3.6 Nährmedium für die Anzucht von *Euglena gracilis* (heterotroph) nach HUTNER, verändert

Im heterotrophen Zustand benötigt *Euglena gracilis* neben einer Kohlenstoffquelle im Medium noch einige andere Substanzen. Diese im photoautotrophen Zustand durch die Lichtreaktion und deren Folgereaktionen produzierten Substanzen müssen im heterotrophen Zustand dem Medium zugesetzt werden. Als besonders essentiell sind hierbei die beiden Vitamine Thiamin und Cyanocobalamin und die drei Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure zu nennen. Die vorliegende Mediumzusammensetzung für die Anzucht heterotropher Zellen von *Euglena gracilis* beruht auf der Mediums-Rezeptur von HUTNER (1966), lediglich die vorgelegte Menge an Glucose wurde auf 15 g/l erhöht.

Stammlösungen:

	Konzentrat	Dosierung
1. Vitamin B ₁ (Thiamin)	10 mg / 100 ml	6 ml/l
2. Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	10 mg / 100 ml	0,5 ml/l
3. KH ₂ PO ₄	40 g / l	10 ml/l
4. MgSO ₄ * 7 H ₂ O	14 g / l	10 ml/l
5. Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ * 6 H ₂ O (Ammoniumeisen(II)-sulfat)	2,1g / l	10 ml/l
6. Mikroelemente:		
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1,1 g / l	} ⇒ 10 ml/l
MnSO ₄ + H ₂ O	0,58 g / l	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,18 g / l	
CoSO ₄ * 7 H ₂ O	0,024 g / l	
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,077 g / l	
H ₃ BO ₃	0,029 g / l	
NaNO ₃ * 4 H ₂ O	0,074 g / l	
7. Feste Bestandteile		
MgCO ₃		0,4 g/l
Glucose		15 g/l
Harnstoff		0,4 g/l
L-Glutaminsäure		5 g/l
D,L-Asparaginsäure		2 g/l
D,L-Äpfelsäure		5 g/l
Glycin		2,5 g/l
Na-Succinat (Bernsteinsäure)		0,1 g/l
CaCO ₃		0,1 g/l

Bei der Herstellung der Stammlösungen ist darauf zu achten, dass die beiden Vitaminlösungen dunkel gelagert werden, da sie lichtempfindlich sind. Alle Stammlösungen werden bei 4 °C gelagert. Für die Mikroelemente-Stammlösung werden die oben aufgeführten Substanzen in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst. 10 ml dieser Stammlösung werden dann für einen Liter frisches Medium verwendet.

Alle Substanzen sollten auch in dieser Reihenfolge in ausreichendem deionisiertem Wasser gelöst werden, da sonst Bestandteile ausfallen können. Da sich einige Feststoffe nur schlecht lösen (MgCO_3 , CaCO_3), sollte die Lösung auf dem Magnetrührer bei max. 60 °C leicht erwärmt werden. Fertiggestelltes Medium (NL) wird bei 121 °C autoklaviert und kann bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden.

Für die Aufrechterhaltung der Dauerkultur verwendet man 100 ml Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit Silikonkappe und impft jeweils steril mit 3 ml der alten Stammlösung an. Dieser Prozess wird alle zwei bis drei Tage durchgeführt, um die Zellen in der gleichen, exponentiellen Wachstumsphase zu halten.

3.7 Analytik

3.7.1 Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12%iges SDS-Gel mit einem diskontinuierlichen Puffersystem gewählt.

Sammelgel	775 μ l H ₂ O 0,25 ml Tris (0,25 M), pH 6,8 425 μ l Bis-Acrylamid (8 g/l) 425 μ l Acrylamid (300 g/l) 50 μ l SDS-Lösung (50 g/l) 25 μ l Ammoniumpersulfat (100 g/l) 2,5 μ l TEMED (1 g/l)
Trenngel	1,5 ml H ₂ O 2,8 ml Tris (1 M), pH 8,0 3,0 ml Bis-Acrylamid (8 g/l) 3,0 ml Acrylamid (300 g/l) 150 μ l SDS-Lösung (50 g/l) 37,5 μ l Ammoniumpersulfat (100 g/l) 2,5 μ l TEMED (1 g/l)
Elektroden- puffer	25 mM Tris 50 mM Glycerin 10 g/l SDS
2-fach Probenpuffer	250 mM Tris 80 g/l SDS 400 g/l Glycerin 0,056 mM Bromphenolblau 2,5 M Mercaptoethanol

Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen 2-fach Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf das Gel gegeben. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 10 bis 15 mA. Für die anschließende Trennung im elektrischen Feld wurde für 45 bis 60 min eine konstante Stromstärke von 18 bis 25 mA angelegt.

Silberfärbung der 12 %igen Polyacrylamidgele

Die Färbung der Proteingele erfolgte nach einer modifizierten Methode von DAMERVAL *et al.* (1987). Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

Entfärberlösung	10 Vol.-% Essigsäure 45 Vol.-% Methanol
Farmers Reducer	30 mM Kaliumhexacyanoferrat-(III) 32 mM Natriumthiosulfat
Entwickler	23 mM Natriumcarbonat-Lösung 0,1 % Formaldehyd-Lösung

Nach der Proteintrennung wurde das Gel vorsichtig von der Trägerplatte abgelöst, für 15 min in Entfärberlösung gelegt und anschließend für 2 min mit Farmers Reducer inkubiert. Nach vollständiger Entfärbung durch mehrere Waschschrte mit Wasser wurde das Gel für 30 min in Silbernitratlösung (1 g/l) fixiert und anschließend für jeweils 30 s mit Wasser und Natriumcarbonat-Lösung behandelt. Die Entwicklung erfolgte durch Überführen des Gels in Entwicklerlösung. Die Farbentwicklung wurde bei der gewünschten Bandenintensität durch einen Waschschrte mit Essigsäurelösung (10 %) abgestoppt.

3.7.2 Zellaufschlussverfahren

Ultraschallaufschluss

Der Zellaufschluss von 1 ml Kulturbrühe erfolgte mit einem Ultraschallgerät der Firma Branson, Typ Sonifier 450 (Abb. 3.3, links) zweimal für 30 s auf Stufe 8, gekoppelt mit einem sehr dünnen Horn (Spitzendurchmesser etwa 3 mm) direkt im eisgekühlten Eppendorf-Gefäß.

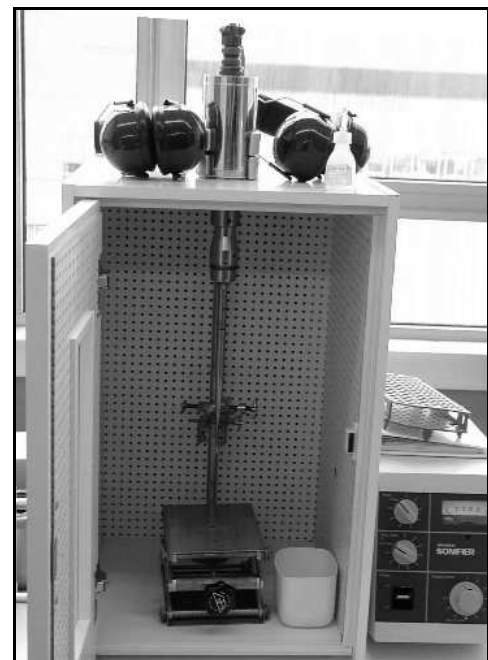


Abb. 3.3: Links: Hochdruckhomogenisator; rechts: Ultraschallsonde mit Steuereinheit

Hochdruckhomogenisation (HDH)

Der Zellaufschluss von größeren Mengen Kulturbrühe (> 100 ml) erfolgte mit einem Hochdruckhomogenisator der Firma Rannie [High Pressure Laboratory Homogeniser Mini-Lab 8.30H]. Bei den meisten Versuchen wurde die Kulturbrühe in den Vorlagetrichter des HDH (siehe Abb. 3.3) gegeben und bei Drücken über 250 bar im Kreislauf gepumpt, das heißt, die aufgeschlossene Kulturbrühe wurde erneut in den Vorlagetrichter gepumpt, wie modellhaft in der Abbildung zu erkennen ist.

3.7.3 Methode zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) und der Paramylontrockenmasse (PTM)

3.7.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse von *Euglena gracilis*

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) von Mikroorganismen dient der Kontrolle des Wachstums und der Produktivität. Bei Bakterien und Hefen kommt häufig folgende Methode zum Einsatz:

5 ml der Kulturprobe ($V = 5 \text{ ml}$) werden in einem vorher getrockneten und gewogenen Eppendorfgesäß (max. 1,5 ml Volumen) bei 13.000 min^{-1} portionsweise abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die Probe wird dann im Vakuumtrockenschrank bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gewichtskonstant getrocknet. Nach dem Abkühlen der Probe im Exsikator auf Raumtemperatur wird das Eppendorfhütchen inklusive der Probe gewogen. Aus der Differenz von gefülltem (m_{voll}) und leerem Eppendorfgesäß (m_{leer}) kann dann die BTM-Konzentration berechnet werden.

$$X_{TM} = \left(\frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \right) \quad (1)$$

Dieses Verfahren wurde zunächst auch für Versuche mit *Euglena gracilis* in Nährlösung (NL) verwendet. Leider zeigte sich, dass es bei längeren Kultivierungen in Schüttelkolben (länger als 3 Tage) zu einer Art Zellagglomeration innerhalb der Suspension kam. Durch diese Agglomerationen kam es zu ungleichen Verteilungen der Zellen in der Lösung, was unterschiedliche Zelldichten in den einzelnen Proben zur Folge hatte. Unter dem Mikroskop konnte man gut dokumentieren, dass in zwei gleichen Volumina unterschiedlich hohe Zellkonzentrationen und somit BTM zu finden waren, weshalb eine andere Form der Probenahme etabliert werden musste.

Um eine statistisch gleichverteilte Probe nehmen zu können musste aufgrund der gemachten Erfahrungen eine Umstellung der Versuche durchgeführt werden. Für jeden Versuchstag werden nun n ($n = \text{Anzahl der Versuchstage}$) Erlenmeyerkolben mit dem gleichen Arbeitsvolumen (hier: 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml NL) angeimpft und bebrütet. Für jeden Versuchstag wurde nun ein kompletter Kolben geerntet. Nach fünfminütigem zentrifugieren bei 5000 min^{-1} (Braun Sigma 6K10) in vorher getrockneten, gewogenen Zentrifugengefäßen (500 ml Volumen) wurden diese wieder im Vakuumtrockenschrank über Nacht getrocknet und wie oben beschrieben ausgewogen ($n = 100 \text{ ml}$).

3.7.3.2 Bestimmung der Paramylontrockenmasse von *Euglena gracilis*

Bei den ersten Untersuchungen wurden BTM und PTM aus zwei Proben unabhängig voneinander bestimmt. Daraus ergab sich teilweise ein Unterschied zwischen den einzelnen Ergebnissen. Anhand mikroskopischer Untersuchungen der jeweiligen Proben konnte man nachweisen wie diese Unterschiede zustande kamen, teilweise kam es zu Zellverklumpungen und somit zu unterschiedlichen Zellkonzentrationen in den jeweiligen Proben ($V = 5 \text{ ml}$). Somit konnte bei zwei Proben nicht gewährleistet werden, dass die BTM und die PTM statistisch ähnlich waren. Eine unterschiedlich hohe Zellzahl konnte mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden.

Die neue Methode schließt dies aus, da aus der BTM-Probe in einem zweiten Schritt der PTM-Gehalt bestimmt wird. Zunächst wird die BTM bestimmt. Nach dem Auswiegen der Probe wurde das Pellet mit 1% SDS-Lösung resuspendiert. Dann wurde die Probe auf dem Vortexer gut durchmischt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht auf einem Schüttler inkubiert (150 min^{-1}) [Infors HT]. Am folgenden Tag wurde die Probe abzentrifugiert (fünf Minuten bei 5.000 min^{-1}) [Eppendorf 5415 C], der Überstand wurde verworfen und zweimal mit demin. Wasser resuspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde noch zwei mal mit Aceton resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand entsorgt. Die folgende Trocknung erfolgte wie bei der Bestimmung der BTM im Vakuumtrockenschrank unter den gleichen Bedingungen.

Durch den Einsatz dieser Methodenänderung kam es nicht mehr zu erhöhten PTM-Werten, die Werte sind somit genauer. Durch eine Bestimmung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Probenahme (Thoma-Kammer oder CASY[®]1, Model DT, der Firma Schärfe System GmbH) kann dann zusätzlich die Paramylonkonzentration je Zelle berechnet werden.

3.7.4 Untersuchungen zur Veränderung der Osmolalität in NL und KFW

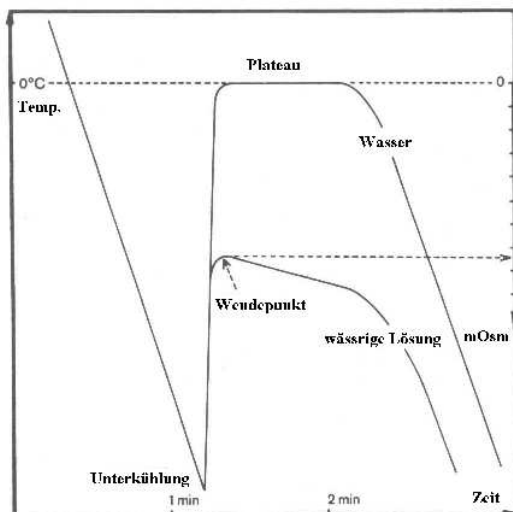
Um mehr über die Veränderung der Ionenkonzentration im Medium (NL) bzw. KFW zu erfahren wurden Untersuchungen mit dem Osmometer OM-802 der Firma VOGEL durchgeführt. Dadurch sollte es zu einer weiteren Aufklärung der Stoffumsätze im Medium während der Fermentation kommen.

3.7.4.1 Messprinzip

Im Osmometer OM 802 wird der Gefrierpunkt von wässrigen Lösungen gemessen. Die Gefrierpunktniedrigung im Vergleich zu reinem Wasser stellt ein direktes Maß für die osmotische Konzentration dar. Reines Wasser gefriert bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, eine wässrige Lösung mit der Osmolalität von 1 Osmol/kg Wasser bei $-1,858\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1 Mol Substanz in 1 kg Wasser gelöst ergibt nur dann eine Lösung mit der osmotischen Konzentration von 1 Osmol/kg Wasser, wenn es eine ideale Lösung ist und wenn die Substanz nicht dissoziiert.

Typische Abkühlkurve von Wasser und wässrigen Lösungen



Prinzipschaltbild

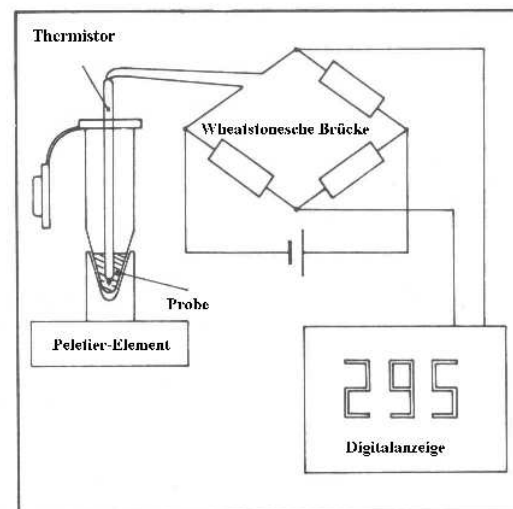


Abb. 3.4: Messprinzip des Osmometers OM 802

3.7.4.2 Wirkungsweise und Beschreibung des Verfahrens

Die Probe wird in ein Kunststoffgefäß gefüllt (Eppendorfhütchen) und mit diesem gekühlt. Zur Kühlung wird ein Peletier-Element benutzt. Die Temperatur im unteren Kühlsystem wird dynamisch geregelt und den jeweiligen Erfordernissen der einzelnen Messphasen angepasst. Vor und nach einer Messung wird die Temperatur des Kühlsystems auf $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt.

Beim Erreichen einer definierten Unterkühlung wird die Kristallisation automatisch eingeleitet. Dies geschieht mit einer Edelstahlnadel, deren untere Spitze zuvor an einem zweiten Kühlsystem so weit abgekühlt wurde, dass infolge kondensierter Luftfeuchtigkeit winzige Eiskristalle daran haften.

Diese Stahlnadel wird kurzzeitig in die unterkühlte Probenlösung eingetaucht, sodass die Kristallisation einsetzt (Gefriervorgang). Dabei wird die Temperatur mit Hilfe eines Thermistors mit einer Auflösung von $1,858 \times 10^{-3} \text{ °C}$ gemessen. Wegen des linearen Zusammenhangs zwischen Osmolalität und Gefrierpunkt ist die Messung der Gefriertemperatur auch gleichzeitig eine Messung der Osmolalität. Die Anzeige erfolgt dann direkt in Osmol/kg.

3.7.4.3 Durchführung einer Messung/Eichung

Das Gerät benötigt eine Aufwärmzeit von 2 Minuten bevor Messungen möglich sind. 50 µl Probe werden in das Probengefäß pipettiert und das Probengefäß wird dann auf den Messkopf gesteckt. Nun wird der Messkopf mit dem Probengefäß in die Kühlöffnung eingefahren. Nach ca. 45 Sekunden kann dann der Messwert abgelesen werden. Die automatische Auslösung der Messung wird akustisch durch einen Summton und optisch durch eine Leuchtdiode in der Digitalanzeige angezeigt.

Nach einer Messung wird der Messkopf aus der Kühlöffnung herausgenommen und das Probengefäß wird entfernt.

Vor den Messungen von Proben sollte immer eine Eichung mit destilliertem Wasser (für den Nullpunkt) und mit der mitgelieferten NaCl-Lösung (300 mOsmol) durchgeführt werden. Der Messwert einer Kalibrierungsmessung wird automatisch übernommen.

3.7.5 Methode zur Simultanbestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel mit dem Elementaranalysator vario EL

Zur Klärung der Veränderungen der Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefelkonzentrationen während der Fermentation wurde die Elementanalyse eingesetzt. Durchgeführt wurden diese Arbeiten in dem Labor von Dr. Tom Steinlein in der Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.

Der vollautomatische Analysenablauf (siehe Abb. 3.5) basiert auf der oxidativen Aufschlussmethode, wobei als Detektor eine Wärmeleitfähigkeitsmesszelle eingesetzt wird. Als Träger- und Spülgas dient Helium.

3.7.5.1 Substanzaufschluss

Die zu analysierende Substanz wird durch oxidative Verbrennung aufgeschlossen. Der quantitative Substanzaufschluss beruht auf der explosionsartigen Verbrennung in mit Sauerstoff hoch angereicherter Heliumatmosphäre im leeren Verbrennungsrohr bei einer Temperatur von ca. 1150 °C.

Zum Aufschluss wird die Probe in Zinnschiffchen mit einem WO_3 -Zuschlag eingewogen, wobei sich die Höhe des Zuschlags nach der Einwaage und der Applikation richtet (ca. 5 mg). Das zusammengefaltete Schiffchen wird dann mittels automatischem Probengeber in das mit Helium und Sauerstoff gefüllte, senkrechte angeordnete Verbrennungsrohr aus Quarzglas eingeworfen.

Bei der oxidativen Verbrennung entstehen aus den Elementen C, H, N und S neben molekularem Stickstoff die Oxidationsprodukte CO_2 , H_2O , NO, NO_2 , SO_2 , SO_3 sowie flüchtige Halogenverbindungen, falls die Probe Halogene enthält.

Die Stickoxide und Schwefeloxide werden an einem nachgeschalteten Kupferkontakt (Reduktionsrohr) bei 850 °C quantitativ zu molekularem Stickstoff und SO_2 reduziert. Außerdem wird überschüssiger Sauerstoff am Kupferkontakt gebunden.

Die flüchtigen Halogenverbindungen werden hinter dem Kupferkontakt an geeigneten Absorptionsmitteln (z. B. Silberwolle) chemisch gebunden und damit aus dem Gasstrom entfernt.

Die letztendlich entstandene Gasmischung aus den Komponenten Helium, CO_2 , H_2O , N_2 und SO_2 wird nachfolgend einem Trenn- und Meßsystem zugeführt.

Zur Verhinderung der Bindung von H_2SO_4 aus SO_2 und H_2O und zur Vermeidung von Wasserkondensation in den Rohrleitungen sind sämtliche Rohrverbindungen bis zum Trennsystem beheizt.

3.7.5.2 Trennung der Reaktionsgase

Da die Wärmeleitfähigkeitsmesszelle (WLD) nicht spezifisch zwischen den verschiedenen Komponenten des Gasgemisches unterscheiden kann, müssen die Reaktionsprodukte CO_2 , H_2O , N_2 und SO_2 einzeln und nacheinander von dem Trägergas Helium in die Messzelle gespült werden. Diese Trennung der Komponenten erfolgt in U-förmigen Trennsäulen nach gaschromatographischen Prinzipien.

Zunächst durchströmt das Gasgemisch, bestehend aus CO_2 , H_2O , N_2 , SO_2 und Helium eine Adsorptionssäule bei einer Temperatur von 50 °C . Mit dieser Säule wird das Wasser quantitativ entfernt. Trotz optimaler Auslegung des Adsorbenten lässt sich nicht verhindern, dass auch SO_2 -Spuren an dieser Säule adsorbiert werden.

Der Rest des Gasgemisches durchströmt anschließend eine zweite Adsorptionssäule. Mit dieser Säule wird das SO_2 quantitativ aus dem Gasstrom entfernt. Zuletzt durchströmt die Gasmischung, bestehend aus CO_2 , N_2 und Helium, eine dritte Adsorptionssäule. Mit dieser Säule wird das CO_2 quantitativ aus dem Gasstrom entfernt.

Der von den Adsorptionssäulen unbeeinflusste Stickstoff tritt mit dem Trägergas Helium in die Wärmeleitfähigkeitsmesszelle ein.

Wenn die Messung des Stickstoffsanteils beendet ist, wird die mit CO_2 beladene Adsorptionssäule auf ca. 130 °C geheizt, wodurch CO_2 rasch desorbiert und von Helium in den WLD gespült wird.

Nach der Beendigung der Messung des CO -Anteils wird die SO_2 -Adsorptionssäule auf ca. 140 °C geheizt, wobei das SO_2 unter Umgehung der CO_2 -Adsorptionssäule in den WLD gespült wird.

Ist die SO_2 -Desorption von der SO_2 -Säule beendet, muss zunächst noch das sich auf der H_2O -Säule befindliche Rest- SO_2 gemessen werden. Dazu wird die H_2O -Säule für einen bestimmten Zeitraum auf ca. 75 °C geheizt. Bei dieser Temperatur wird das SO_2 desorbiert, während H_2O noch auf der Säule verbleibt. Die Ausspülung des Rest- SO_2 und des nachfolgenden desorbierten H_2O erfolgt unter Umgehung der SO_2 - und der CO_2 -Adsorptionssäule.

Wenn die Messung des SO_2 -Anteils beendet ist, wird die nun nur noch mit Wasser beladene H_2O -Säule auf ca. 280 °C geheizt, wobei die Desorption des Wassers erfolgt. Das Wasser wird vom Trägergas Helium in Form von Wasserdampf in die Messzelle gespült. Nach

Beendigung der H_2O -Messung wird die H_2O -Adsorptionssäule zunächst auf ca. $50\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt, bevor ein neuer Analysenablauf gestartet wird.

3.7.5.3 Nachweis

Als Detektionseinheit dient eine besonders empfindliche, hinsichtlich des Trägergases Helium optimierte Wärmeleitfähigkeitsmesszelle mit großem dynamischen Bereich.

Der Wärmeleitfähigkeitsdetektor besteht aus zwei Kammern mit je einem Themistor. Eine Kammer wird von einem Heliumgasstrom mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit (Referenzstrom) durchströmt, die andere von Helium mit dem zu messenden Fremdgasanteil (Messstrom).

Die zwei Kammern bilden eine Messbrücke, deren elektrische Verstimmung ein direktes Maß für den Fremdgasanteil im Trägergas darstellt. Die Zellenausgangsspannung in Form eines Peaks wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet, digitalisiert, integriert und als Integralzeit dargestellt.

Vor Beginn jeder Messung erfolgt ein automatischer Nullabgleich, so dass eine mögliche Nullpunktdrift des Detektors kompensiert wird.

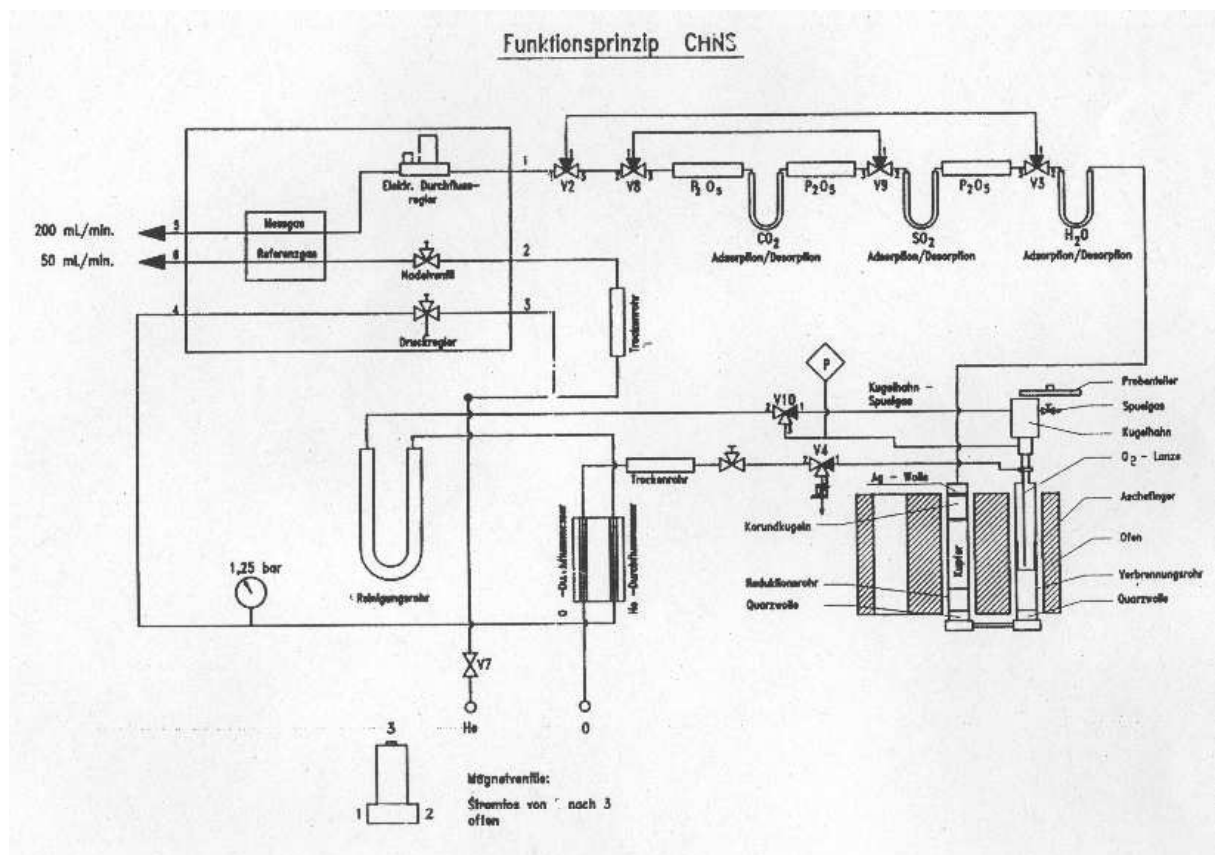


Abb. 3.5: Verrohrungsschema vario EL zur C-, H-, N- und S-Bestimmung

3.7.6 Bestimmung der Zellzahl in mikrobiologischen Proben

Die Bestimmung der Zellzahl gibt einen guten Überblick über den Vitalitätsgrad einer Zellsuspension. Aus den zeitlich aufeinanderfolgenden Werten der Zellzahl lässt sich somit relativ einfach die Verdopplungsgeschwindigkeit/Generationszeit (t_d) von Mikroorganismen bestimmen.

Um die Anzahl an Zellen pro Volumen zu bestimmen gibt es zwei gängige Verfahren die mit geringem Aufwand durchgeführt werden können:

1. Mikroskopische Zählungen von Mikroorganismen in der Thoma-Kammer
2. Partikelmessung mittels CASY[®] 1, Model DT von Schärfe System GmbH über das Widerstandsmessprinzip

Beide Meßsysteme finden ihren Einsatz im Laboralltag und sind mit Vor- und Nachteilen versehen. Für die Verwendung der Thomakammer spricht sicherlich ihre schnelle Lieferung von Ergebnissen bei geringem operativem Aufwand. Andererseits ist ein hohes Maß an Übung für eine Zählung von Nöten und es ist hinderlich, dass sich die Zellen unter dem Deckgläschen noch bewegen und eine Auszählung somit erschweren. Für das zweite, elektronische Meßsystem spricht hingegen die höhere Durchsatzrate, da passend vorbereitete Proben nur noch vorgelegt werden müssen und das Gerät die Messung ohne menschliche Unterstützung durchführt. Insgesamt ist jedoch für eine Einzelprobe der Aufwand recht hoch.

3.7.6.1 Zellzahlbestimmung mittels Thoma-Kammer

Die mikroskopische Untersuchung von Zellsuspensionen ist eine übliche und relativ alte Methode. In den meisten Laboratorien ist sie mit geringen Mitteln durchführbar, da nur ein Lichtmikroskop und ein spezieller Objektträger (Thoma-Kammer) mit dazugehörigem Deckglas nötig ist. Bei der Betrachtung einer Zählkammer gegen das Licht sind kreuzförmig eingeritzte Linien erkennbar (siehe Abb. 3.6), die das Zählfeld in 16 Großquadrate teilen. Unter dem Mikroskop lässt sich erkennen, dass jedes Großquadrat aus 16 Kleinquadraten besteht. Die Kleinquadrate haben eine Seitenlänge von 0,05 mm. Da zwischen dem korrekt aufgelegten eingeschliffenen Deckglas und dem Gitternetz ein Abstand von 0,1 mm besteht, ergibt sich folgendes Volumen über dem Kleinquadrat:

$$0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 \quad (2)$$

Dieses Volumen muss mit dem sogenannten Kammerfaktor = 4×10^6 multipliziert werden, um auf die übliche Bezugsgröße von 1 ml (= 1 cm^3) zu kommen. Für die Bestimmung gilt also: Durchschnittliche Zahl der Mikroorganismen pro Kleinquadrat multipliziert mit 4×10^6 ergibt die Bakterienzahl pro ml.

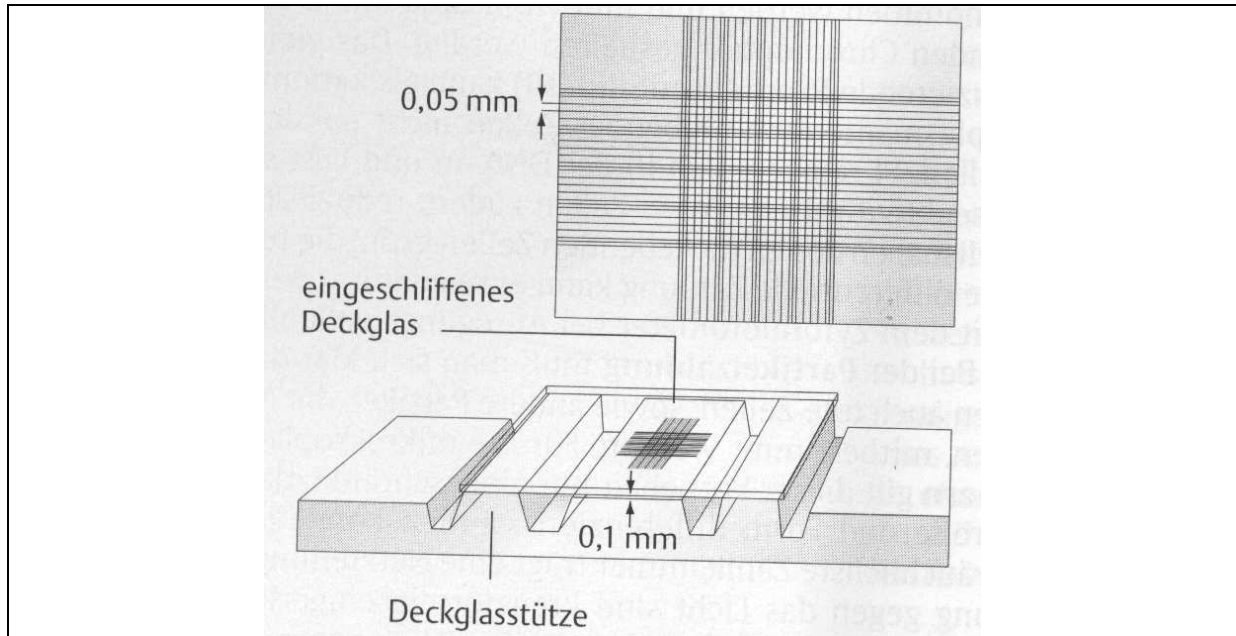


Abb. 3.6: Zählkammer nach THOMA (aus SÜSSMUTH *et al.* 2. Aufl. 1999)

Bei der Durchführung einer Zellzählung ist darauf zu achten, dass die zu messende Zellsuspension nicht zu viele Mikroorganismen enthält, da sonst eine Zählung nicht möglich ist. Bei zu starker Zellkonzentration ist eine Verdünnung anzufertigen. Der Verdünnungsfaktor ist dann später bei der Berechnung der Zellkonzentration mit in die obige Formel (2) einzubeziehen. Außerdem muss bei Untersuchungen mit der Thoma-Kammer darauf geachtet werden, dass die Zellen möglichst wenig mobil sind, da sonst eine Zählung schwer fällt. Bei *Euglena gracilis* wird der Zellsuspension ein Tropfen verdünnter HCl zugefügt, was die Zellen sofort bewegungsunfähig macht.

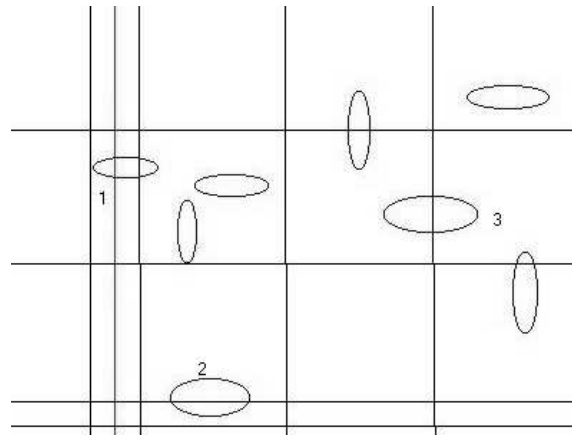


Abb. 3.7: Ausschnitt aus einem Großquadrat einer Thoma-Kammer

Neben der Beweglichkeit der Zellen ist auch ihre Lage auf dem Objektträger ein Problem, welches hier kurz dargestellt werden soll. Da die Zellen oft über die Grenzen eines Kleinquadrats hinaus liegen, muss vor einer Zählung festgelegt werden zu welchem Kleinquadrat eine Zelle gehört und welche Zellen evtl. nicht mitgezählt werden dürfen.

In Abbildung 3.7 sind solche Fälle aufgeführt.

1. Diese Zelle liegt am Rand des Großquadrats und hat nur einen kleinen Anteil am Kleinquadrat. Diese Zelle sollte nicht mitgezählt werden!
2. Der größte Teil der Zelle liegt im zu zählenden Kleinquadrat. Sie kann mitgezählt werden.
3. Bei dieser Zelle ist zu entscheiden welchem Kleinquadrat sie zuzuordnen ist. Man sollte sich vor dem Zählen auf zwei Außenlinien eines Kleinquadrats festlegen, die noch mitgezählt werden sollen, falls Zellen dies berühren, beispielsweise die rechte und die obere Linie.

Bei einer Vereinbarung wie sie unter 3 beschrieben ist ergäbe das für das in Abb. 3.7 gezeigten Großquadratausschnitt folgendes Ergebnis:

0	0	1
2	2	0
0	0	1

Die Zellen 1 und 2 würden somit aus der Messung herausfallen.

Diese Entscheidung, welche Zellen noch mitgezählt werden dürfen und welche nicht und die gewählte Verdünnung sind auch gleichzeitig der größte Fehlerquelle dieser Meßmethode. Da die Objektträger mit Thoma-Kammer immer über zwei mit eingeritzten Linien versehene Bereiche verfügen, ist es auch empfehlenswert in beiden Kammern eine Zählung

durchzuführen. Kommt man bei beiden Zählungen zu vergleichbaren Ergebnissen, so kann diese Messung angenommen werden. Bei zu großen Abweichungen sollte die Messung wiederholt werden und gegebenenfalls die Verdünnung überprüft werden.

3.7.6.2 Zellzahlbestimmung mittels CASY[®] 1

Messprinzip

Hierbei kommt es zum Einsatz des Widerstandsmessprinzips aus der Partikelmesstechnik welches mit einer modernen Methode der Signalauswertung, der Pulsflächenanalyse, verbunden wurde. Zur Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Die Präzisionsmesspore ist als Bohrung in einem Rubin realisiert, der in den Kapillarkörper eingegossen ist. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar.

Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Die Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Voraussetzung für dieses Messverfahren ist, dass die Zellen die Messpore einzeln passieren. Das Messsignal wird von CASY[®] 1 mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet. CASY[®] 1 erfasst nicht nur die Amplitude des Messsignals, sondern den gesamten Signalverlauf. Aus den Einzelmessungen berechnet CASY[®] 1 das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse). Über zwei einstellbare Bereichsgrenzen kann der Messbereich in drei Teilbereiche eingeteilt werden, die von CASY[®] 1 Model DT gleichzeitig gezählt werden.

Je nach zu erwartender Größe des zu zählenden Mikroorganismus kommt es zur Verwendung unterschiedlicher Kapillardurchmesser. Für das CASY[®] 1 sind folgende Kapillaren erhältlich:

1. 45 μm
2. 60 μm
3. 150 μm
4. 200 μm

Für Untersuchungen mit *Euglena gracilis* wurde deshalb eine Kapillare mit einem Durchmesser von 150 μm gewählt.

3.7.7 Glucosebestimmung von Proben aus der Fermentation

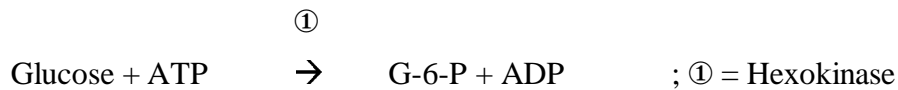
Um einen Einblick in den Umsatz an Kohlenhydrat während der Fermentation mit *Euglena gracilis* zu bekommen werden regelmäßig Proben genommen und einer Zuckermanalytik zugeführt. Dabei haben sich zwei Testansätze durchgesetzt:

1. Glucose-Test Infinity von Sigma, enzymatisch
2. Glucose-Messung mit dem GL_{super} ambulance der Firma Ruhrtal Labor Technik (RLT)

Beide Testmethoden haben ihre Vor- und Nachteile, die jedoch hauptsächlich auf die Handhabbarkeit zurückzuführen sind. Für beide Systeme kann eine zuvor eingefrorene Probe verwendet werden. Die Probenvorbereitung ist denkbar einfach: 1 ml der homogenen Zellsuspension wird in einem ausreichend großen Eppendorfhütchen bei 13.000 U/min. [Eppendorf 5415 C] zentrifugiert. Der Überstand wird dekantierend in ein geeignetes Probengefäß überführt, das Pellet im zentrifugierten Eppendorfhütchen kann verworfen werden. Die Probe kann nun direkt gemessen werden oder aber auch bei -18 °C gelagert werden. Für Proben die direkt gemessen werden müssen, wenn also schnell Daten benötigt werden, empfiehlt sich die erste Methode. Werden jedoch größere Mengen an Proben gemessen, so ist die Glucosemessung mit dem GL_{super} ambulance vorzuziehen, da außer einem Beladen mit Proben und einer Kontrolle der Reaktionslösungen nur wenige Handgriffe nötig sind, bevor das System selbstständig arbeitet. Bei beiden Methoden ist auf die zu erwartende Zuckerkonzentration zu achten, damit die Probelösungen in ihrer Verdünnung im Messbereich des jeweiligen Tests liegen. Gegebenenfalls sind vor der Messung Verdünnungen anzufertigen, die nach der Messung wieder in den erhaltenen Wert zurückzurechnen sind.

3.7.7.1 Glucose-Test Infinity von Sigma, enzymatisch

Mit dem Glucose-Test Infinity der Fa. Sigma kann man enzymatisch die Glucosekonzentration im zellfreien Medium bestimmen. Auf folgender enzymatischer Reaktion beruht das Prinzip bei der Bestimmung der Glucose:



In einer durch Hexokinase-katalysierten Reaktion wird zuerst die Glucose durch Adenosintriphosphat (ATP) zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von ADP phosphoryliert. In Gegenwart von NAD^+ wird das so entstandene G-6-P von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) zu 6-Phosphogluconat (6-PG) oxidiert, wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht. Direkt proportional zur umgesetzten Glucosemenge wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet, welches durch die Messung des Absorptionsanstiegs bei 340 nm bestimmt werden kann.

Durchführung

1. Pulver des Glucose-Reagenz in 20 ml demineralisiertem Wasser lösen.
2. Der Test wird in einer Halbmikroküvette durchgeführt.
 - Referenz => H_2O
 - Leerwert => 1 ml Reagenzlösung + 10 μl H_2O
 - Probe => 1 ml Reagenzlösung + 10 μl Probe
3. Mit Kunststoffspatel gut durchmischen.
4. Mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Bei 340 nm messen.
6. Referenz auf Null einstellen und dann Leerwert und Proben messen.
7. Bei großen Abweichungen vom Erwartungswert Verdünnungsstufe überprüfen und/oder erneut ansetzen

Berechnung der tatsächlichen Glucosekonzentration:

$$\Delta A = A_p - A_L \quad (3)$$

$$C_{Glc} (g \times L^{-1}) = \frac{\Delta A \times TV \times MW \times VF}{\epsilon \times LP \times SV} \quad (4)$$

- ΔA = Absorptionsänderung bei 340 nm
 A_p = Absorptionswert der Probe bei 340 nm
 A_L = Absorptionswert der Nullprobe bei 340 nm
 C_{Glc} = Glucosekonzentration ($g\ l^{-1}$)
 TV = Gesamtvolumen des Ansatzes ($\rightarrow 1.01\ ml$)
 MW = Molmasse von Glucose ($\rightarrow 180.16\ g\ mol^{-1}$)
 VF = Verdünnungsfaktor
 ϵ = Absorptionskoeffizient von NAD bei 340 nm
 LP = Schichtdicke der Küvette
 SV = Probenvolumen ($\rightarrow 0.01\ ml$)

Das Reagenz ist bei Raumtemperatur 14 Tage haltbar. Bei der Messung ist darauf zu achten, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 liegt, da außerhalb keine Linearität der Messergebnisse zu erwarten ist. Bei Verdünnungen ist der Verdünnungsfaktor nach der Berechnung der Glucosekonzentration mit einzurechnen. Ist im unverdünnten Zustand der Probe eine Absorption unter 0,1 gemessen worden, so sind diese Werte trotzdem zu verwenden, da dann die Glucosekonzentration gegen Null geht. Es empfiehlt sich immer einen Glucosestandard mitzumessen (0,500 g/l, liegt als Standard vor) um die Genauigkeit des Tests festzustellen. Bei großen Abweichungen vom zu erwartenden Messwert wurden die Messungen wiederholt.

3.7.7.2 Glucosebestimmung mit dem GL_{super} ambulance von RLT

Die Messung mit dem GL_{super} ambulance zeigte sich im Laufe der Forschungsarbeit als die für dieses Medium genauere Methode, weshalb auch die Methode unter 3.7.7.1 nur bei den ersten Untersuchungen angewendet wurde.

Mess- und Funktionsprinzip

Die Bestimmung der Glucose mit der vom GL_{super} ambulance verwendeten Enzymkassette erfolgt nach dem enzymatisch-amperometrischen Messprinzip (Abb. 3.8).

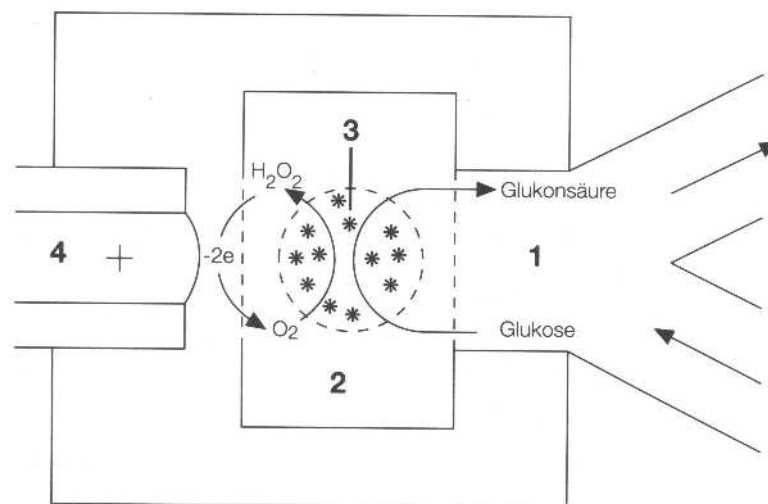
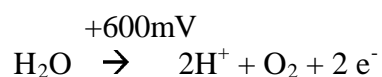
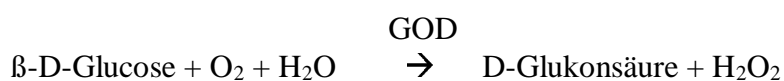


Abb. 3.8: In der als Durchflusszelle angelegten Messzelle befindet sich die Messkammer (1), die auf einer Seite von der Enzymmembran (2) begrenzt wird. In der Messzelle liegt das Enzym Glucoseoxidase (GOD) (3) immobilisiert vor ((4) Platinelektrode).

Ein Messzyklus beginnt mit dem Eintauchen der Probenkanüle in eine Probe, wobei Probelösung in die Messzelle befördert wird. Die bei der Probennahme in die Messkammer gelangte Glucose trifft nach Durchtritt durch die erste Membrangrenzschicht auf die immobilisierte GOD und wird mit Hilfe derer katalytischen Wirkung gemäß der unten angegebenen Reaktionsgleichung zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgesetzt. Nach Diffusion durch die zweite Membrangrenzschicht wird H₂O₂ an der Platinelektrode (4) bei +600mV oxidiert.



Das so erhaltene Meßsignal wird während der Probenahme fortlaufend differenziert. Das Maximum der differenzierten Kurve kennzeichnet den maximalen Anstieg der Strom-Zeit-Kurve (Abb. 3.9). Das hierzu gehörige Meßsignal (Maximum der differenzierten Kurve) wird in einen Spannungswert umgewandelt. Dieser Messwert ist der Glucosekonzentration der Probe proportional.

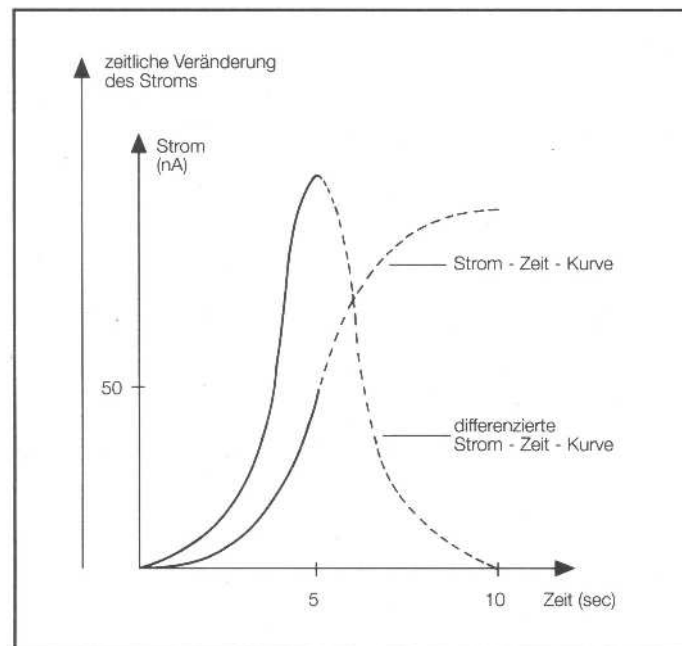


Abb. 3.9: Strom-Zeit-Kurve

Nach Erreichen des beschriebenen Meßsignals wird die Probenahme beendet. Nach Absinken des Meßsignals auf einen festgelegten Schwellenwert in der Nähe der Basislinie, beginnt der nächste Meßzyklus.

3.7.8 Bestimmung der löslichen Trockenmasse (SDW)

Um einen gewissen Aufschluss über die Aufnahme von löslichen Bestandteilen des Mediums durch *Euglena gracilis* zu haben, wurde von Fermentationsbrühen die lösliche Trockenmasse als Größe herangezogen. Die folgende Methode wurde sowohl für definiertes Medium als auch für Kartoffelfruchtwasser angewendet.

Für die Messung der löslichen Bestandteile der jeweiligen Proben wurden 10 ml zellfreies Medium in vorher getrocknete und ausgewogene Keramikschälchen pipettiert. Bei 60 °C wurden die Proben für 24 h schonend im Trockenschrank [Heraeus, VT 5042 EK] eingedampft. Die im Exsikator auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden dann erneut gewogen [Mettler, AE 260 Deltarange].

Für die Berechnung der löslichen Trockenmasse wurde folgende Formel herangezogen;

$$\rho_{SDW} = \frac{m_{SDW}}{V_{Probe}} \quad (6)$$

ρ_{SDW} = lösliche Trockenmassekonzentration (g/ml)

m_{SDW} = lösliche Trockenmasse + Keramikschälchen

V_{Probe} = Volumen der Probe (ml)

Der so erhaltene Wert ergibt die lösliche Trockenmasse für 1 ml zellfreien Medium.

3.7.9 Wachstum von Mikroorganismen, Formeln

In der Biotechnologie spielt das Wachstum von Mikroorganismen eine zentrale Rolle und eine Untersuchung von Faktoren, die das Wachstum beeinflussen ermöglicht einen besseren Einblick in die laufenden Prozesse einer Fermentation. Um verschiedene Verfahren miteinander vergleichen zu können, ist es von Nöten einige vergleichbare Kriterien zu erarbeiten. Dazu gehören z. B. die Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeiten und die Analyse der Umwandlung von Substrat in Biomasse. Für die Auslegung von biotechnologischen Verfahren ist eine Beschreibung dieser Vorgänge mit mathematischen Formulierungen unumgänglich (BERGTER, 1983). Aus diesem Grund werden folgend einige wichtige Formeln dargestellt, die in Kapitel 4 ihre Anwendung finden.

Verdopplungszeit

Als Verdopplungszeit, abgekürzt t_d , wird die Zeit bezeichnet, in der sich die Biomasse verdoppelt. Sie steht mit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ folgendermaßen in Zusammenhang:

$$t_d \text{ ist vergangen, wenn } X = 2X_0 \quad (7)$$

$$2X_0 = 2X_0 \cdot e^{\mu t_d} \quad (8)$$

Kürzen durch X_0

$$2 = e^{\mu t_d} \quad (9)$$

$$\ln 2 = \mu t_d \quad (10)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu} \quad \mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0,69}{t_d} \quad (11), (12)$$

μ = spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$] = [h^{-1}]

t_d = Verdopplungszeit [h]

X_0 = Konzentration der Biomasse [g l^{-1}] zum Zeitpunkt $t = 0$

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ

Zur Berechnung von μ zwischen zwei Datenpunkten kann die folgende Formel herangezogen werden:

$$\mu = \frac{\ln X_{t_{n+1}} - \ln X_n}{t_{n+1} - t_n} \quad (13)$$

Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ (auch Ertragskoeffizient genannt) zeigt wie viel Biomasse aus einer gegebenen Menge an Substrat gebildet werden kann. Da er während der Fermentation nicht konstant ist (Veränderung der Physiologie des Organismus, bzw. Änderung der Substratzusammensetzung im Verlauf einer Kultivierung) ist es üblich $Y_{X/S}$ während der exponentiellen Phase zu bestimmen, da er dort als konstant anzusehen ist.

Zur Beurteilung des Substratumsatzes in Biomasse kann folgende Formel verwendet werden:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{erzeugte Biomasse [g]}}{\text{Verbrauchte Substratmenge [g]}} \quad (14)$$

Dies ergibt einen durchschnittlichen Ausbeutekoeffizienten und dient einer Abschätzung des Ertragskoeffizienten. Es erlaubt jedoch keine Aussage über die Änderung des Koeffizienten während der Fermentation.

Ertragskoeffizienten von höher als 1 werden gefunden, wenn neben dem Substrat, auf das sich der Koeffizient bezieht, noch weitere Nährstoffe zur Biomassebildung vorliegen und genutzt werden.

Produktivität (Raum – Zeit – Ausbeute)

Die Produktivität bezeichnet die gebildete Menge des gewünschten Produkts pro Volumen und Zeiteinheit und ist nicht mit der Produktbildungsgeschwindigkeit zu verwechseln. Das primäre Produkt in den in dieser Arbeit ausgeführten Experimenten war Paramylon, so dass sich die Produktivität, wenn nicht anders vermerkt, auf die Paramylonkonzentration während der Fermentation und kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$P_t = \frac{\text{Paramylon – Konzentration}}{\text{Kultivierungszeit}} = \frac{X_t}{t} [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad (15)$$

Zur Berechnung der Raum – Zeit – Ausbeute einer Satzkultivierung müssten eigentlich auch die Totzeiten des Bioreaktors (Entleeren, Füllen, Sterilisieren) berücksichtigt werden, für diese Arbeit wurde das aber außer acht gelassen.

3.7.10 Response Surface Modelling

Der Begriff der Response Surface Modelling (RSM) wurde für die statistische Methodik vorgesehen, welche

- (1) das Design von Studien der Oberflächenantworten,
- (2) der aktuellen Abschätzung von Oberflächenantworten, und
- (3) der Interpretation der Resultate dienen.

Die Methodik der Oberflächenanalyse wurde generell für zwei prinzipielle Zwecke entwickelt,

- (1) um eine Beschreibung der Reaktionsmodelle in der Region der beobachteten Studien zuzulassen,
- (2) und sie sollen bei der Suche nach Regionen in denen optimale Antworten auftreten (z. B. wo die Antwort im Maximum oder Minimum ist) unterstützen.

Das ‚zentrale zusammengesetzte Muster‘ („central composite design“, BOX und DRAPER, 1987) wurde entwickelt um genug Versuchskombinationen zur Verfügung zu stellen um die Abschätzung der Parameter in einem quadratischen Vorhersagemodell zu erlauben, während man beträchtlich weniger Experimente benötigt.

3.7.11 Bestimmung des Glucosegehalts in Paramylon

Das von *Euglena gracilis* als Speicherkohlenhydrat hergestellte Paramylon besteht aus 100 % Glucose. Die Glucosemoleküle sind β -glykosidisch verbunden. Um den Glucosegehalt des in dieser Arbeit erhaltenen Produkts festzustellen wurde eine Methode von CLARKE und STONE (1960) verwendet.

Dabei wurde 1 g zu untersuchendes Paramylon in 50 ml heißer 90 % iger Ameisensäure in einem Rundkolben gelöst. Nachdem sich das Glucan in der heißen Ameisensäure unter Rühren gelöst hatte, wurde 50 ml 3N H₂SO₄ vorsichtig zugegeben. Am Rückflusskühler wurde die Lösung nun für eine Stunde gekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde die Probe 1:10 verdünnt und gut gemischt. Die so erhaltenen Proben wurden nun wie unter 3.7.7.2 beschrieben mit dem super GL_{Ambulance} auf ihren Glucosegehalt gemessen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Versuche in definiertem Medium

Zu Beginn des Projektes war es nötig, einige wichtige Parameter festzustellen und ihren Einfluss auf die Paramylonausbeute zu dokumentieren. Als Parameter stand die Temperatur im Vordergrund, bei der *Euglena gracilis* fermentiert werden sollte. Wie bereits beschrieben wurde, ist *Euglena gracilis* bei niedrigen Temperaturen um 20 °C in der Lage große Mengen an Paramylon zu bilden (BUETOW, 1999, BARSANTI et al., 2001). Bei höheren Temperaturen geht die Produktion von Paramylon, dem Hauptspeicherkohlenhydrat der Eugleniden, stark zurück und die Zellteilung nimmt einen immer größeren Anteil an den Stoffwechselprozessen ein. Dagegen nimmt der absolute Paramylongehalt pro Zelle ab. Für eine fermentative Produktion von Paramylon war es nun wichtig, die optimale Temperatur zu finden, bei der die höchste Ausbeute an Paramylon erzielt werden kann. Denn nicht die Paramylonkonzentration pro Zelle ist für einen fermentationstechnischen Prozess von Interesse, sondern die Raum-Zeit-Ausbeute.

Bei Temperaturen zwischen 20 °C und 32,5 °C wurden Versuche erstellt (folgend beschrieben) und die Ausbeuten und andere wichtige Parameter wurden dokumentiert. Alle Versuche in diesem Zusammenhang wurden mit NL als Medium und, wenn nicht anders erwähnt, einer Glucosekonzentration von 15 g/l durchgeführt. Das definierte Medium sollte sicherstellen, dass in allen Versuchen die Rahmenbedingungen gleich waren. Angeimpft wurden die einzelnen Proben mit 5 ml Stammkultur auf 100 ml NL in 300 ml Erlenmeyerkolben und je Versuchstemperatur wurden 3 Kolben parallel angeimpft.

Auf einem Schüttler mit einer Auslenkung von 15 mm und einer Schüttelfrequenz von 120 min⁻¹ wurden diese Kolben im Brutschrank (AQUALYTIC Thermostatschrank) unter kontrollierten, heterotrophen Bedingungen (Temperaturgenauigkeit von ± 0,5 °C) inkubiert. Alle 24 Stunden wurde unter sterilen Bedingungen eine Probe entnommen (BTM/PTM, Zellzahl), der pH-Wert bestimmt (Überstand der BTM-Proben), die Glucosekonzentration im Medium überprüft (Überstand der BTM-Proben) und die lösliche Trockenmasse (Überstand der BTM- und PTM Probe, hier nur 5 ml) ermittelt. Für die hier folgenden Versuche wurden für die Bestimmung der BTM, respektive PTM jeweils 5 ml Fermentationsbrühe in getrocknete, leer gewogene Eppendorfgläser überführt (siehe Kapitel 3.7.3.1), schrittweise abzentrifugiert und der Überstand wie oben beschrieben weiterverwendet. BTM- und PTM-

Proben wurden im Vakuum Trockenschrank (Heraeus, VT 5042 EK) über Nacht bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, ebenso wurde mit den SDW-Proben verfahren.

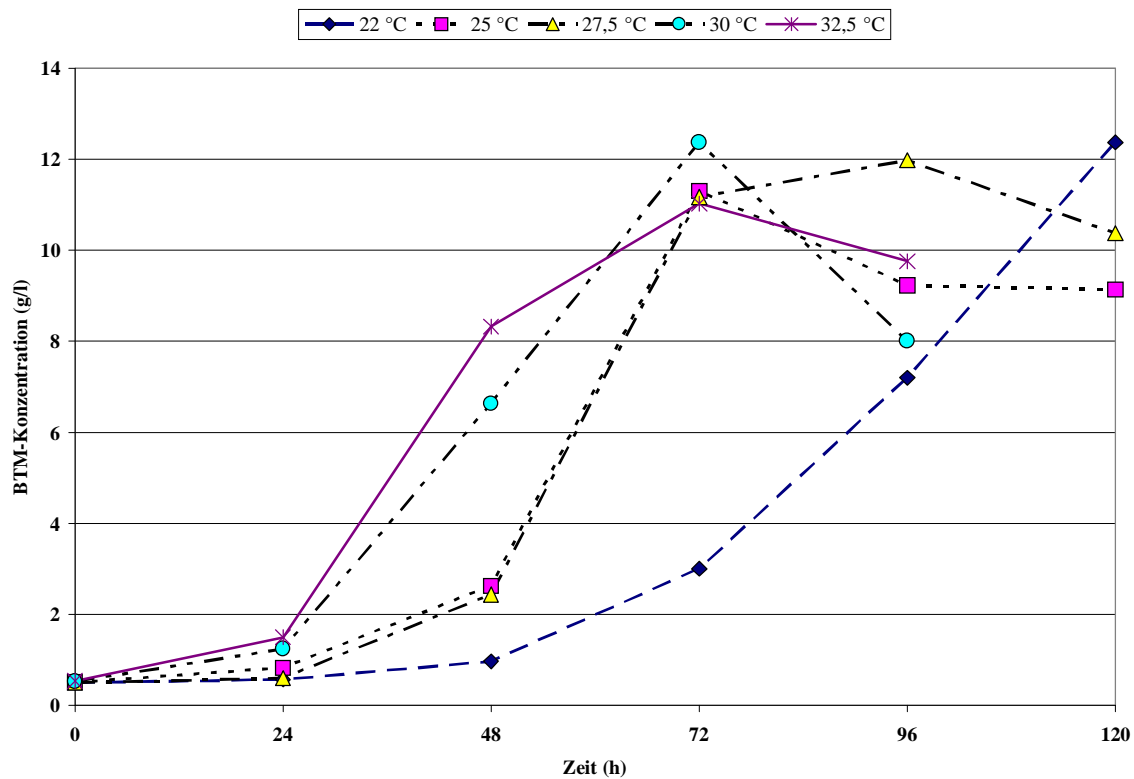


Abb. 4.1: Veränderung der BTM während der Fermentation bei unterschiedlichen Temperaturen. Mit zunehmender Temperatur verschiebt sich der Zeitpunkt zu der die maximale BTM festgestellt werden kann hin zu einer geringeren Versuchsdauer.

In Abb. 4.1 und 4.2 ist deutlich zu erkennen, dass es mit zunehmender Temperatur zu einer Beschleunigung des Wachstums kommt. Die Biomassekonzentrationen sind zwischen 25 °C und 30 °C am höchsten, bei 22 °C ist erst nach fünf Tagen eine gleich hohe BTM zu finden wie bei den Versuchen mit höheren Bruttemperaturen. Nach 72 Stunden ist bei den Versuchen mit 25 °C, 30 °C und 32,5 °C die Biomassekonzentration am höchsten, bei 27,5 °C nach 96 Stunden und bei 20 °C sogar erst nach 120 Stunden. Die Versuche bei 30 °C und 32,5 °C wurden nur 96 Stunden lang durchgeführt, da sich deutlich abzeigte, dass keine höheren Werte für die Biomasse zu erwarten waren, denn nach 96 Stunden hatten diese Versuchsreihen ihre maximale BTM überschritten und die BTM nahm ab (Absterbephase).

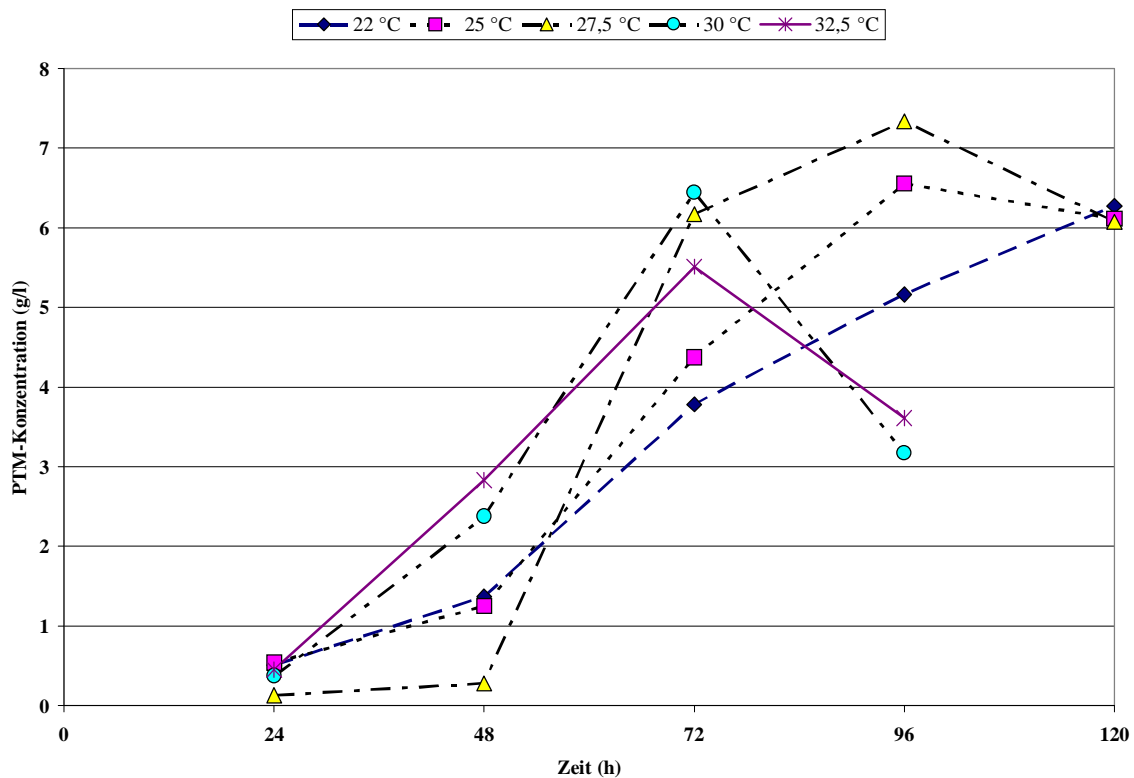


Abb. 4.2: Veränderung der Paramylonmasse während der Fermentation bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei 25 °C ist am 4. Tag die höchste PTM zu finden.

Ähnlich der BTM sind auch die höchsten Paramylonkonzentrationen bei 30 °C und 32,5 °C schon nach 72 Stunden zu messen, bei 25 °C und 27,5 °C erst nach 96 Stunden und bei 20 °C sogar erst nach 120 Stunden. Die höchste Paramylonkonzentration ist hier nach 96 Stunden bei 27,5 °C zu verzeichnen.

Neben der BTM und PTM waren für die Aufklärung der Vorgänge während der Fermentation auch noch andere untersuchte Parameter von Wichtigkeit. So ist in Abbildung 4.3 die Abnahme der Medienbestandteile während der Fermentation erkennen und es wird gezeigt (Abb. 4.3) wie weit das Medium verbraucht wird. Interessanterweise ist am 5. Tag bei allen Temperaturen die gleiche Menge an Feststoffen des Mediums verbraucht worden. Von den eingewogenen 34 g an Nährstoffen (siehe Kapitel 3.6) wurden bei allen Versuchstemperaturen bis zum fünften Versuchstag ca. 25 g aufgenommen und verstoffwechselt. Das in allen Versuchen etwa die gleiche Menge an Substanzen verbraucht wurde deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt alle unter diesen Bedingungen verwertbaren Substanzen verbraucht waren oder aber nicht in verwertbarer Form zur Verfügung standen.

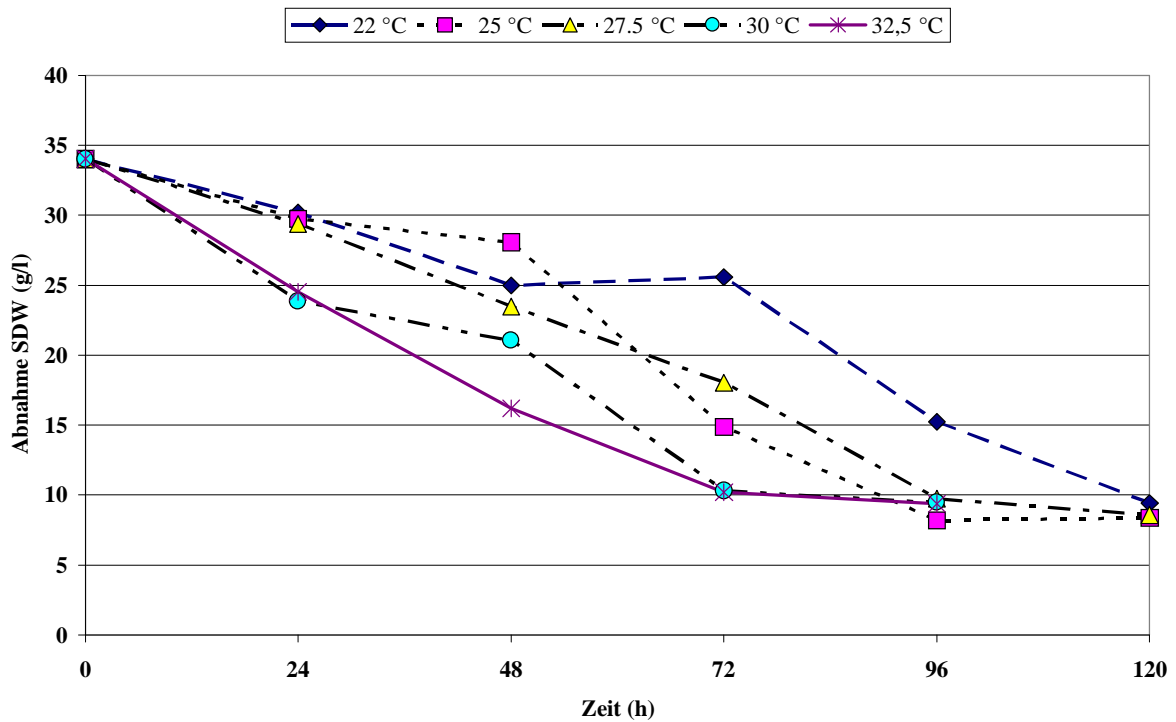


Abb. 4.3: Dargestellt ist die Abnahme der SDW über den Versuchszeitraum. Bei der Bruttemperatur von 32,5 °C werden die Medienbestandteile am schnellsten aufgenommen, bei den jeweils niedrigeren Temperaturen verringert sich die Aufnahmegeschwindigkeit mit der Versuchszeit.

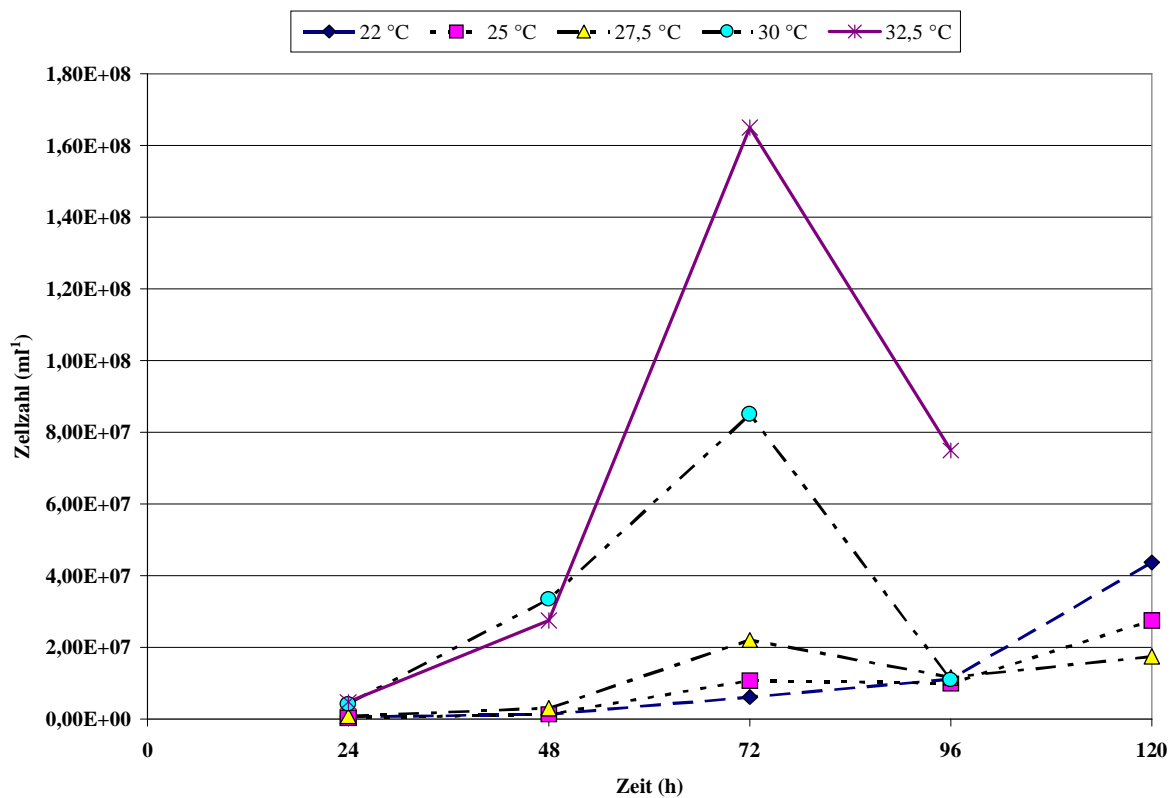


Abb. 4.4: Darstellung der Zellzahlen im Versuchszeitraum bei verschiedenen Bruttemperaturen. Je niedriger die Bruttemperatur war, desto länger dauerte es bis zur maximalen Zellzahl.

Auch bei den Zellzahlen (Abbildung 4.4) zeigt sich deutlich, dass mit der Steigerung der Bruttemperatur die Zellteilungsrate zunimmt. Am extremsten ist dies bei 32,5 °C zu verfolgen, wo nach 72 Stunden $1,65 \cdot 10^8$ Zellen ml^{-1} gefunden werden konnten. Bei 30 °C und bei 27,5 °C kann auch hier am dritten Versuchstag die maximale Zellzahl festgestellt werden, lediglich die Versuche mit einer Bruttemperatur von 25 °C, respektive 20 °C zeigten ihre maximale Zellzahl erst am fünften Versuchstag nach 120 Stunden. Die hier dann erzielten Zellzahlen übersteigen dabei die Zellzahlen die bei 27,5 °C erreicht werden konnten. Die Abnahme der Zellzahl bei 30 °C und 32,5 °C nach 96 Stunden geht auch einher mit der Abnahme der Biomasse (Abbildung 4.1).

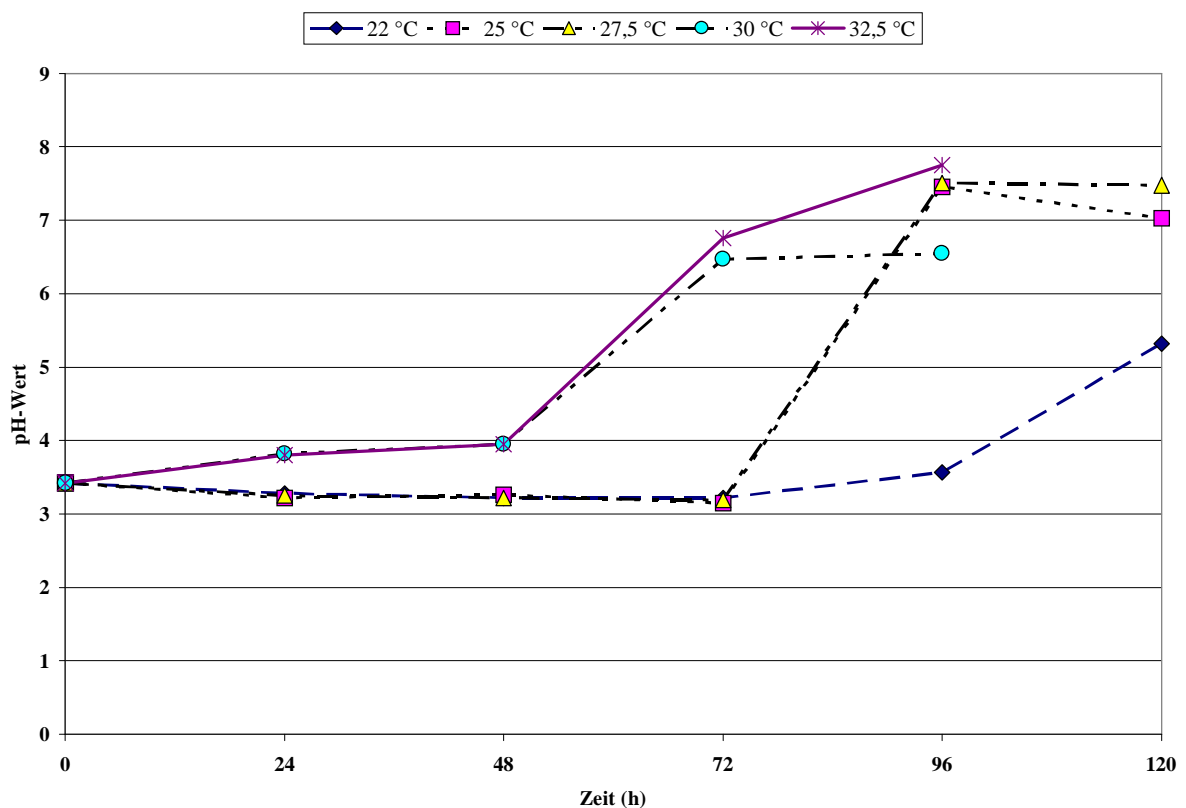


Abb. 4.5: Veränderung des pH-Wertes während der Fermentation bei unterschiedlichen Temperaturen. In allen Versuchen steigt der pH-Wert zu dem Zeitpunkt sprunghaft an, an dem auch die maximale BTM/PTM erreicht wurde. Bei 20 °C ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen Temperaturen.

Die Veränderung des pH-Wertes während der Fermentation wie sie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, ist für *Euglena gracilis* Z typisch und spiegelt wichtige Stoffwechselforgänge wieder. Die Veränderung des pH-Wertes ist wohl hauptsächlich auf die Veränderung des Ammoniumspiegels zurückzuführen (siehe auch Kapitel 4.1.3).

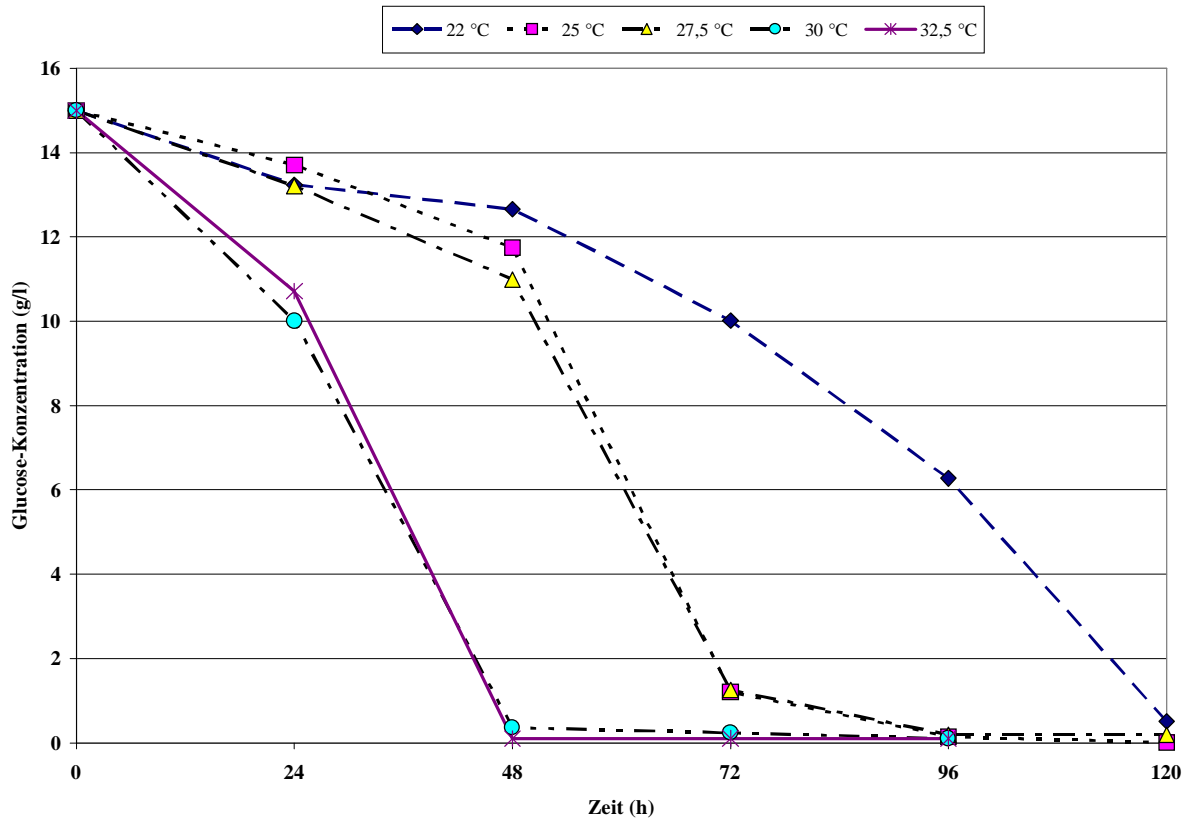


Abb. 4.6: Die Änderung der Glucosekonzentration spiegelt den Verlauf des Wachstums gut wieder. Mit zunehmender Temperatur wird die Glucose schneller aufgenommen.

Die Aufnahme und Verstoffwechslung der angebotenen Glucose kann bei den fünf Temperaturen in Abbildung 4.6 verfolgt werden. Je höher die Bruttemperatur in den Versuchen war, desto schneller wurde die Glucose aus dem Medium aufgenommen. Es zeigt sich, dass nach 48 Stunden bei 30 °C und 32,5 °C die kompletten, vorgelegten 15 g Glucose aus dem Medium verbraucht wurden. Bei 25 °C und 27,5 °C ist erst nach 72 Stunden fast die gesamte Glucose verbraucht und bei 20 °C erst nach 120 Stunden. Neben der Glucose werden auch die anderen Nährstoffe mit steigender Temperatur schneller aufgenommen (siehe auch Abbildung 4.3) und somit kommt es zum Erliegen des Wachstums aufgrund von Nährstoffmangel, was sich deutlich in der BTM darstellt.

Durch die in den Abbildungen 4.2 bis 4.4 erhaltenen Daten kann man die These, dass *Euglena gracilis* bei niedrigen Temperaturen mehr Paramylon je Zelle bildet, unterstützen. Sehr hohe Zellzahlen sind dafür verantwortlich, dass bei höheren Temperaturen eine hohe Paramylonausbeute zu finden ist.

Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Versuchen in Nährlösung wurden die späteren Versuche in KFW bei 27,5 °C durchgeführt.

Zur Verdeutlichung der obigen Daten werden folgend einige Bilder gezeigt, die die Veränderungen während der fünf Versuchstemperaturen anzeigen. In Abbildung 4.7 ist die Abnahme der löslichen Trockenmasse gut an der Abnahme der Feststoffe in den Keramischälchen nach dem Trocknen zu erkennen. In der rechten Keramischale sind nur noch geringe Rückstände zu erkennen, wohingegen nach 24 Stunden (links) deutlich mehr lösliche Trockenmasse zu erkennen ist.



Abb. 4.7: Abnahme der löslichen Trockenmasse bei 27,5 °C über fünf Tage (Start links).

Auf den folgenden Seiten sind exemplarisch jeweils zwei Bilder von *Euglena gracilis* bei den untersuchten Temperaturen zu sehen. Das jeweils erste Bild zeigt die Zellen zum Zeitpunkt der maximalen Biomasse, das zweite jeweils 24 Stunden später. Aufgenommen wurden die lichtmikroskopischen Bilder mit einer Digitalkamera bei einer, wenn nicht anders explizit erwähnt, 400-fachen Vergrößerung und im JPEG-Format gespeichert.



Abb. 4.8: *Euglena gracilis* bei 20 °C am vierten Versuchstag. Die Zellen weisen eine gute, vitale Form auf. Die Zellen sind gut mit Paramylongranulae gefüllt (400-fache Vergrößerung).



Abb. 4.9: Auch am fünften Versuchstag sind die Zellen bei 20 °C von guter und vitaler Form. Die Zellen sind mit Paramylongranulae gefüllt (400-fache Vergrößerung).

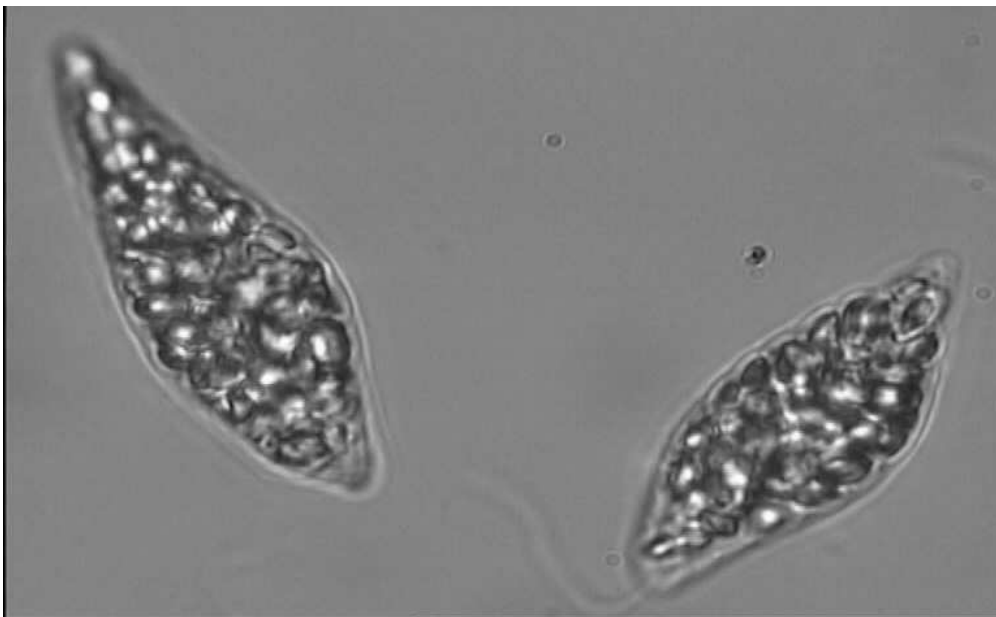


Abb. 4.10: Bei 25 °C zeigen die Zellen nach 96 Stunden eine hohe Anzahl an Paramylongranulae. Zur Verdeutlichung werden hier 1000-fach vergrößerte Aufnahmen gezeigt. Bei der rechten Zelle ist gut die Antriebsgeißel zu erkennen.



Abb. 4.11: Nach 120 Stunden nimmt die Anzahl der Paramylongranulae im Versuch bei 25 °C leicht ab. Einige Zellen sind noch prall gefüllt, andere erscheinen aufgrund des abgebauten Paramylons schon leicht durchscheinend (400-fache Vergrößerung).



Abb. 4.12: Die 1000-fache Vergrößerung bei 27,5 °C zeigt auch hier nach 96 Stunden eine hohe Anzahl an Paramylongranulae. Die Zellen selbst erscheinen etwas größer zu sein als bei 25 °C.



Abb. 4.13: Nach 120 Stunden sind die Zellen bei 27,5 °C im Vergleich zu denen bei 25 °C immer noch etwas dichter mit Paramylon versehen. Einige Zellen runden sich ab (400-fache Vergrößerung).



Abb. 4.14: Bei 30 °C und 1000-facher Vergrößerung kann man am dritten Versuchstag auch eine hohe Anzahl an Paramylongranulae erkennen, die Dichte der einzelnen Granulae ist jedoch geringer als dies bei 25 °C und 27,5 °C der Fall ist.



Abb. 4.15: Nach 96 Stunden sind die Zellen bei 30 °C nicht mehr so vital wie nach 72 Stunden. Auch ist die Anzahl der einzelnen Paramylongranulae stark zurückgegangen (400-fache Vergrößerung).

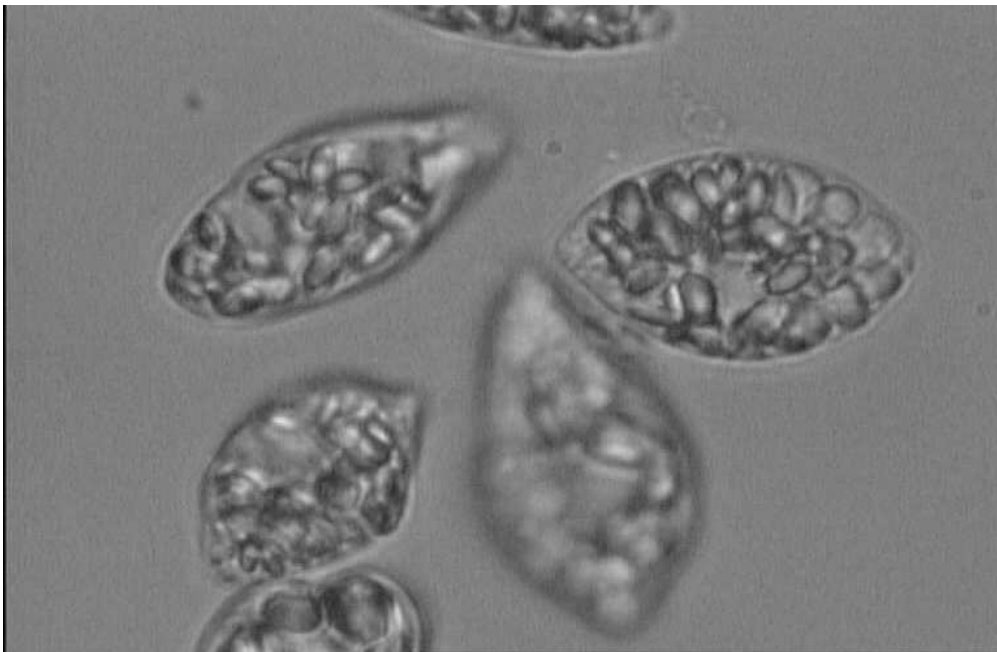


Abb. 4.16: *Euglena gracilis* bei 32,5 °C nach 72 Stunden, 1000-fache Vergrößerung. Die Zellen erscheinen stark abgerundet, was auf hohen Zellstress hindeutet.

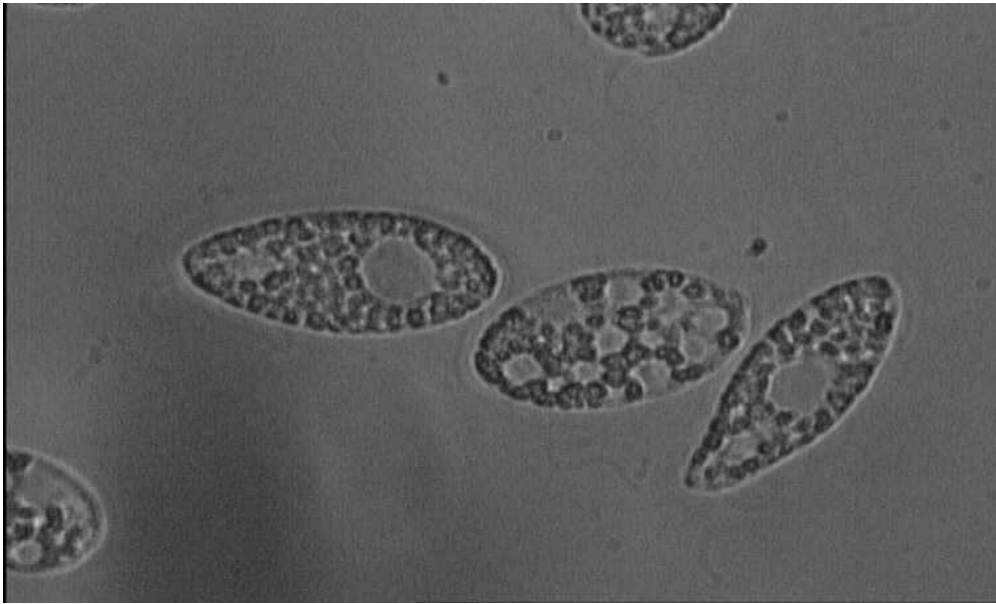


Abb. 4.17: Nach 96 Stunden zeigen die Zellen deutliche Abbauerscheinungen des Paramylons. Die Zellen sind weniger spindelförmig und die Granulaeverteilung ist stark unterbrochen (1000-fache Vergrößerung).

4.1.1 Glucose

Neben der Temperatur bei den *Euglena gracilis* den besten Umsatz von Substrat in das Speicherkohlenhydrat Paramylon erreicht, war es auch von Interesse zu untersuchen, bei welcher Menge an vorgelegtem Substrat dieser Umsatz am sinnvollsten wäre. Dazu wurden Experimente bei 22 °C, 25 °C und 27,5 °C durchgeführt und die vorgelegte Menge an Glucose wurde in vier Versuchsansätzen, ausgehend von der ‚normalen‘ Konzentration von 15 g/l in NL, jeweils um 5 g/l bis auf 30 g/l erhöht. Neben der zu erzielenden Menge an Paramylon war auch die Versuchszeit bei diesen Experimenten wichtig. In Hinsicht auf eine spätere industrielle Anwendung sind kurze Versuchszeiten kosteneffektiver (MUTZALL, 1991).

Da die hier verwendeten Konzentrationen an Glucose bisher nur von wenigen anderen Wissenschaftlern (COOK und HEINRICH, 1965) untersucht wurden, waren die zu erzielenden Ergebnisse im voraus nur schwer abzuschätzen.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse der erzielten BTM und PTM dieser Versuche in drei Grafiken zusammengefasst worden. Zum besseren direkten Vergleich der verschiedenen Versuchstemperaturen wurden alle drei Abbildungen mit der selben Y-Achsen-Skalierung dargestellt.

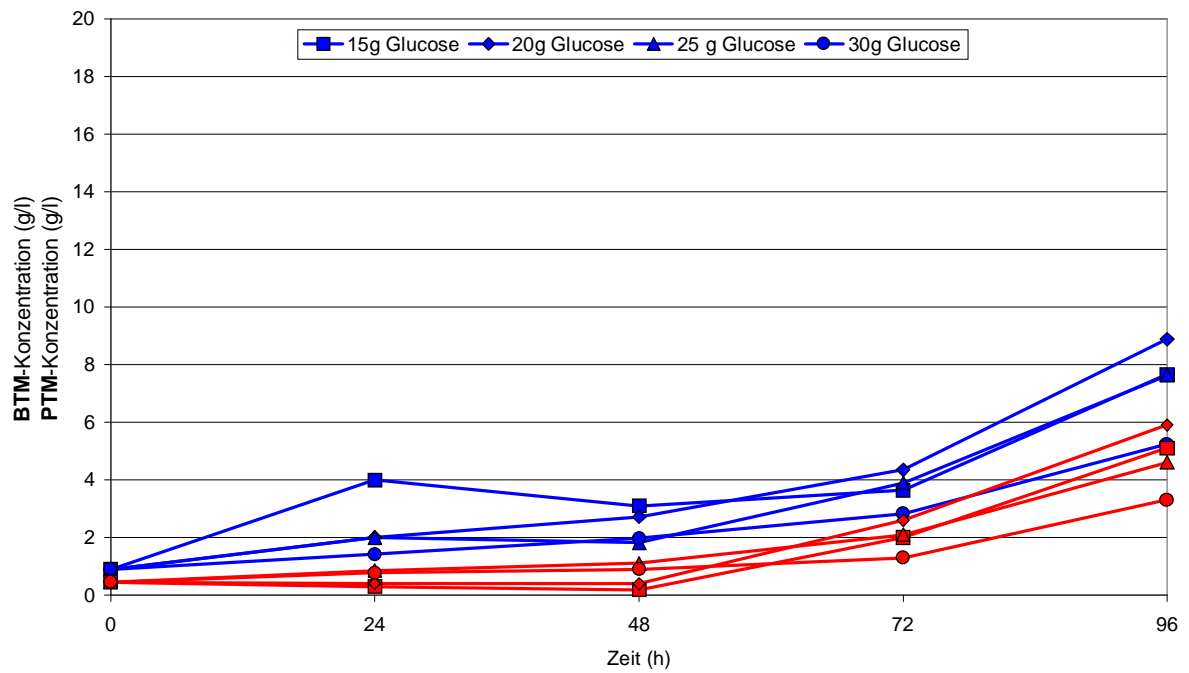


Abb. 4.18: Bei 22 °C wird am 4. Tag mit einer Glucosekonzentration von 20 g/l die höchste Ausbeute an BTM und PTM erzielt. 15 und 30 g/l Glucose erreichen ähnliche BTM, PTM ist jedoch bei 15 g/l höher.

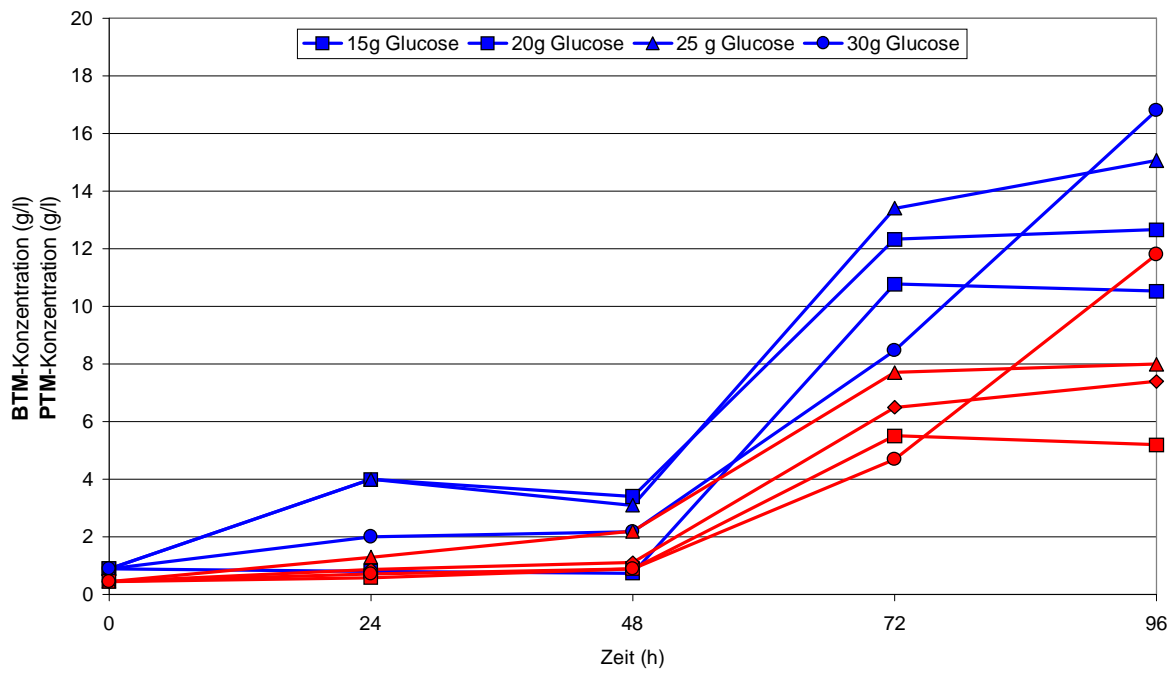


Abb. 4.19: Bei 25 °C wird erst am 4. Tag das Maximum an BTM/PTM erreicht. Die BTM/PTM bei 15, bzw. 20 g/l ist ab dem 3. Tag konstant, steigt bei 25 g/l noch leicht und bei 30 g/l stark zum 4. Tag hin an.

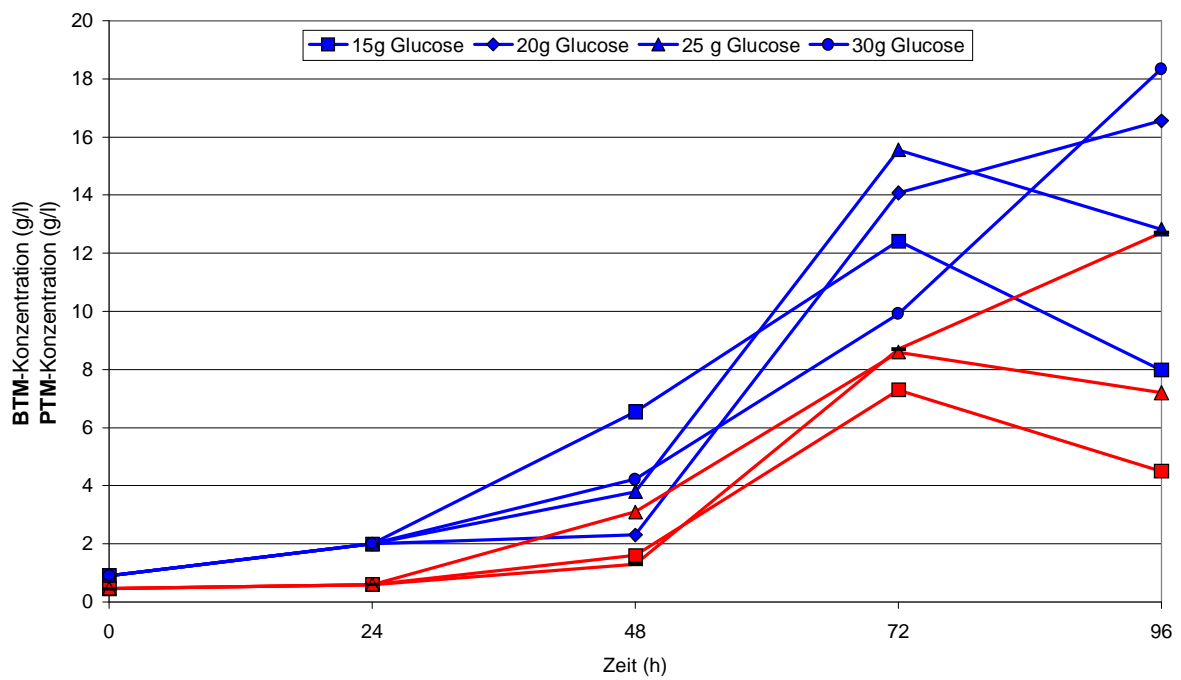


Abb. 4.20: Bei 27,5 °C ist das Maximum für 25, bzw. 30 g/l auch erst am 4. Versuchstag zu finden, wohingegen bei 15 bzw. 20 g/l das Maximum schon am 3. Versuchstag zu finden ist.

Die höchsten Ausbeuten bei den verschiedenen Temperaturen unterscheiden sich sehr stark. So ist bei 22 °C (Abb. 4.18) nur eine maximale BTM von 8,88 g/l und eine PTM von 5,9 g/l zu erreichen, wohingegen bei den beiden anderen untersuchten Temperaturen, die Ausbeuten erheblich ansteigen. Bei 25 °C (Abb. 4.19) werden schon fast doppelt so hohe BTM bzw. PTM erreicht (16,8 g/l / 11,8 g/l) und bei 27,5 °C (Abb. 4.20) noch einmal etwas höhere Werte (18,34 g/l / 12,7 g/l). Da diese Werte jedoch nur wenig Aussagekraft besitzen, wurden einige wichtige Kriterien untersucht und Berechnungen dazu angestellt. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ , die Verdopplungszeit t_d und die Produktivität P_t wurden auf Grund ihrer Aussagekraft gewählt (siehe Tabelle 4.1).

Tab. 4.1: Zusammenstellung einiger wichtiger Kriterien zu den Versuchen aus Abbildung 4.18 - 4.19.

Temperatur	Glucose	μ [h⁻¹]	t_d [h]	P_t [kg m⁻³ h⁻¹]
22 °C	15 g	0,03	22,4	0,08
	20 g	0,03	23,4	0,09
	25 g	0,03	21,8	0,08
	30 g	0,03	27,2	0,05
25 °C	15 g	0,08	9,2	0,15
	20 g	0,05	12,9	0,13
	25 g	0,06	11,4	0,16
	30 g	0,04	16,3	0,18
27,5 °C	15 g	0,06	11,0	0,17
	20 g	0,08	9,2	0,17
	25 g	0,06	11,8	0,22
	30 g	0,03	22,6	0,25

Da *Euglena gracilis* im Vergleich zu anderen Mikroorganismen sehr langsam wächst, ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ hierbei weniger aussagefähig als die Verdopplungszeit t_d oder die Produktivität P_t . Anhand der hier ermittelten Verdopplungszeiten wird klar, wie sich die Versuchstemperatur auf die Zellvermehrung von *Euglena gracilis* auswirkt. Bei höheren Temperaturen ist, wie schon in Kapitel 4.1.1 vermerkt, eine höhere Zellteilungsrate zu messen. Auch auf die Produktivität wirkt sich dies aus und es wird anhand der Daten in Tabelle 4.1 deutlich, dass bei 27,5 °C eine höhere und somit bessere P_t erzielt werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von COOK und HEINRICH (1965) in ihren Experimenten gefunden (siehe Tab 4.2). Auch wenn diese Versuche bei 30 °C und in dem Medium von CRAMER und MYERS durchgeführt wurden, so ist doch auch anhand dieser Daten eindeutig

eine Verlangsamung der Zellteilungsraten hin zu höheren Glucosekonzentrationen zu erkennen.

Tab. 4.2: Einfluss der Substratkonzentration auf die Generationszeit (t_d) [Auszug aus COOK und HEINRICH, 1965].

Konz. (M)	0,05 M	0,1 M	0,15 M	0,2 M	0,3 M
Glucose (g/l)	9	18	27	36	54
t_d (h)	13	14	15	17	28

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass bei 27,5 °C und 25 g/l Glucose im definierten Medium eine besonders gute und schnelle Umsetzung des vorgelegten Substrats in Paramylon möglich war.

4.1.2 Vitamine

Neben Aminosäuren sind auch noch zwei Vitamine für das Wachstum von *Euglena gracilis* essentiell. Es sind die beiden Vitamine B₁ und B₁₂, auch als Thiamin und Cyanocobalamin bekannt (HUTNER und PROVASOLI, 1951, SHIGEOKA et al., 1986, TAKEYAMA, H. et al., 1996). Im definierten Medium wird *Euglena gracilis* die benötigte Menge an Vitaminen zur Verfügung gestellt, womit ein normales und somit nicht durch Vitaminmangel limitiertes Wachstum ermöglicht wird. Versuche mit einer höheren Vorlage an Vitaminen wurden durchgeführt, um zu klären, ob durch ein erhöhtes Vitaminangebot eine höhere Ausbeute erzielt werden kann.

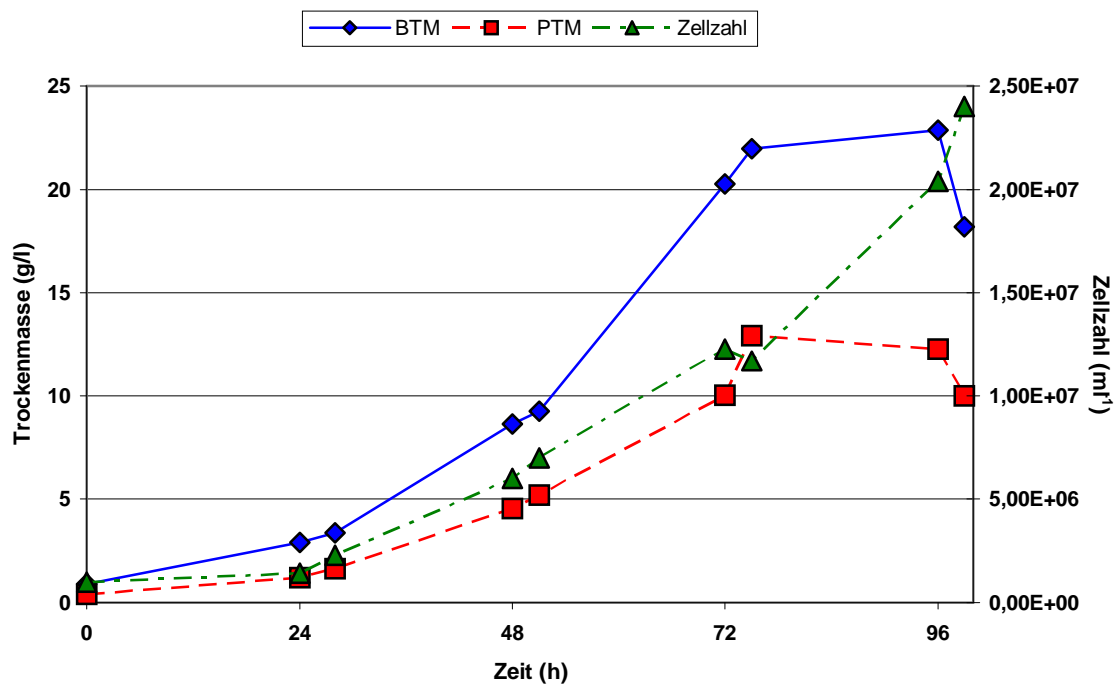


Abb. 4.21: Wachstumskurve mit doppelter Vitamin B₁₂-Vorlage im Vergleich zur Empfehlung von HUTNER und PROVASOLI (1951) in definiertem Medium mit 25 g/l Glucose bei 27,5 °C Bruttemperatur.

Eine erhöhte Zugabe an Vitamin B₁₂ (Abb. 4.21) führt eindeutig zu einer Steigerung der Biomasse und Zellzahl. In keinem anderen Versuch dieser Untersuchung war es möglich so hohe Zellzahlen wie mit einer erhöhten Vitamin B₁₂-Konzentration zu erzielen.

Die Auswirkung einer Zugabe von Vitamin B₁ (Abb. 4.22) konnte in den Versuchen nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu einer Wachstumskurve ohne eine erhöhte Zugabe an Vitaminen (Abb. 4.23) kommt es zu einer Steigerung des Wachstums. Der Versuch, der in Abbildung 4.21 dargestellt ist, wurde bei 27,5°C in NL mit 25 g/l Glucose durchgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dann bei später durchgeführten Versuchen mit KFW

versucht eine alternative Vitaminquelle zu finden, da die beiden in NL zugegebenen Vitamine relativ teuer sind.

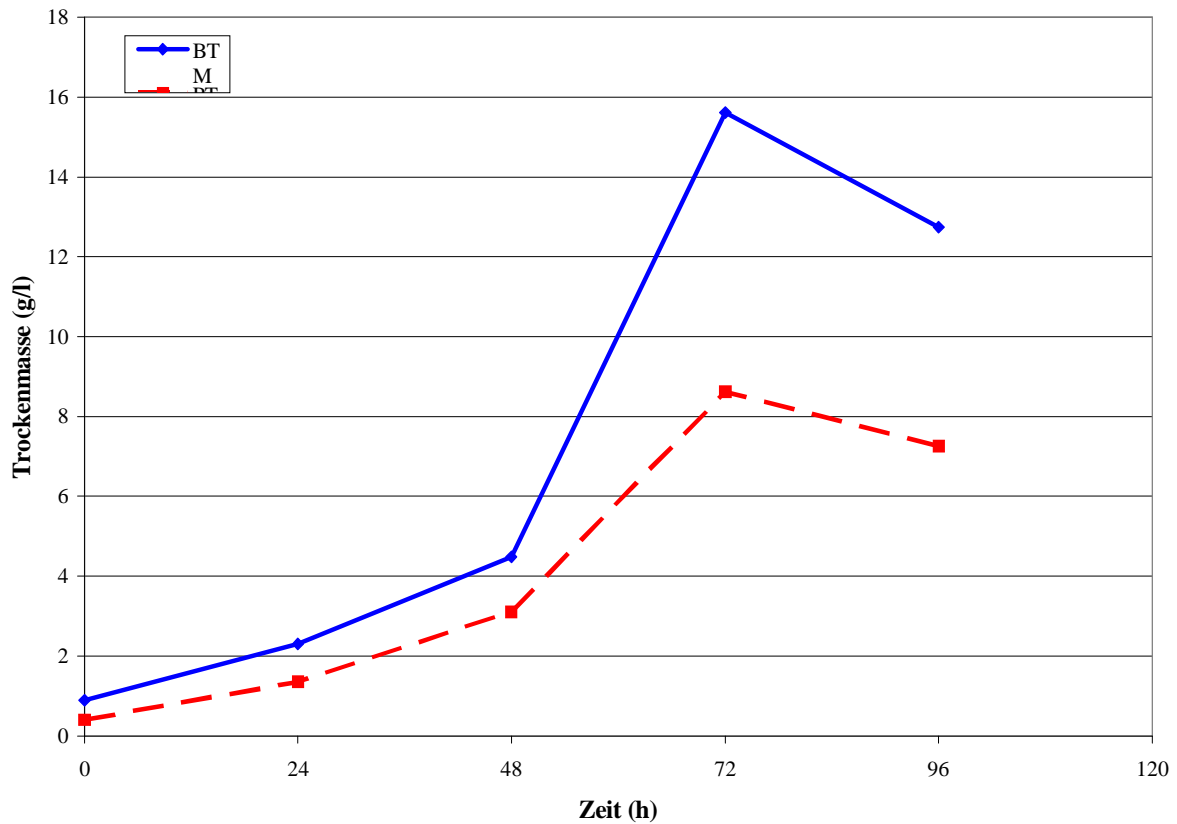


Abb. 4.22: Die Verdopplung der Vitamin B₁-Konzentration in Bezug auf die NL hat keinen Einfluss auf das Wachstum. Dargestellt ist der Verlauf der Biomasse und der Paramylonkonzentration über 96 h.

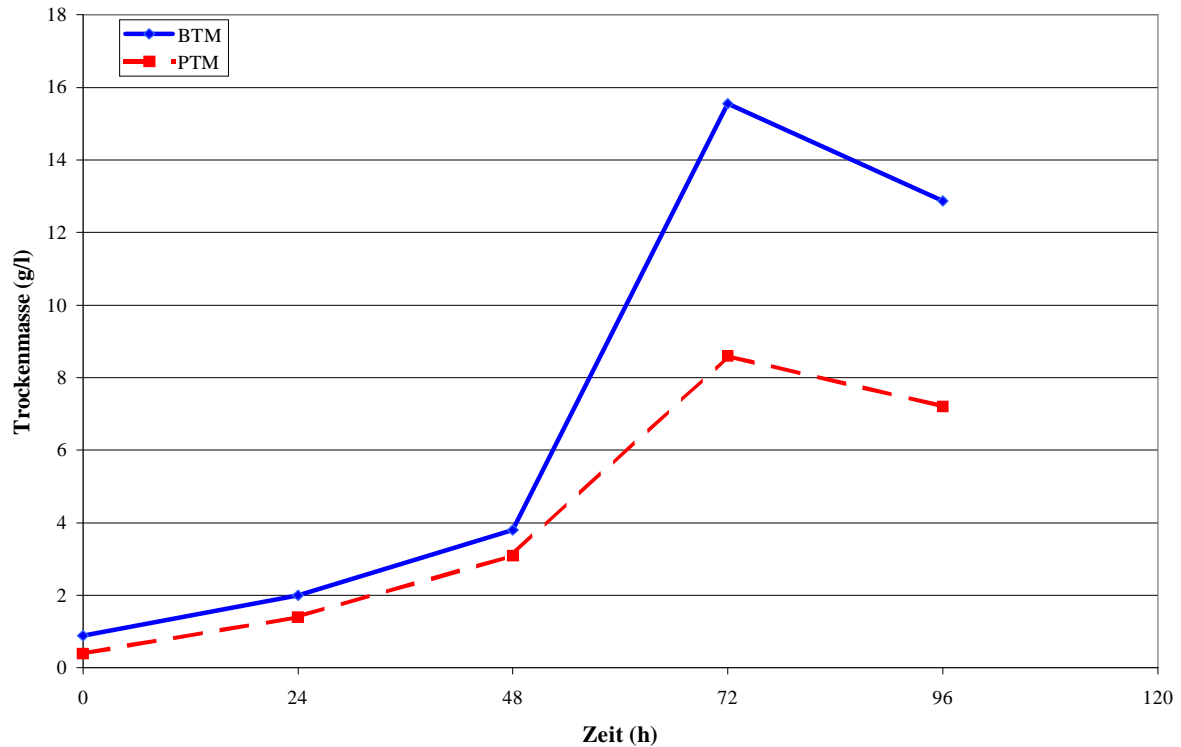


Abb. 4.23: Wachstum in NL bei von HUTNER (1966) empfohlener Vitaminkonzentration. Die Ausbeuten an BTM/PTM sind bei 27,5 °C und 25 g/l Glucose niedriger als bei doppelt hoher Vitamin B₁₂-Gabe.

Die Auswirkung einer erhöhten Vitamin B₁₂-Supplementierung beträgt ungefähr eine Steigerung der Produktivität von 25% im Vergleich zu einer standardmäßigen Konzentration an Vitamin B₁₂ im Medium (Abb. 4.23). Eine weitere Erhöhung der Vitaminkonzentration ergab keine weitere Steigerung der Ausbeute an BTM bzw. PTM.

4.1.3 pH-Wert / Ammonium

Während der Fermentation mit *Euglena gracilis* in NL zeigte sich eine charakteristische Verschiebung des pH-Wertes. Innerhalb der ersten drei Tage kam es zu einer leichten Veränderung des pH-Wertes und zum vierten Versuchstag hin dann zu einem sprunghaften Anstieg von pH 3,4 auf pH 6,5. Dieser starke Anstieg des pH-Wertes (Abb. 4.23) geht einher mit einer Steigerung der Ammoniumkonzentration im Medium zum Ende der Fermentation

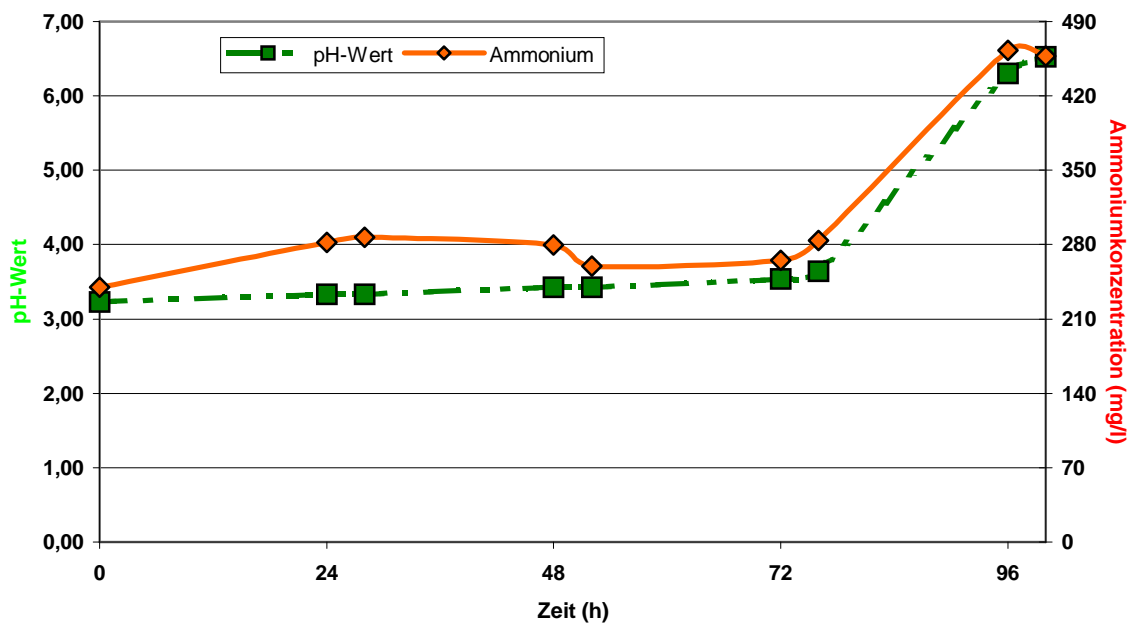


Abb. 4.24: Veränderung der Ammoniumkonzentration (Rauten) in Abhängigkeit des pH-Wertes (Quadrate) während einer Fermentation von *Euglena gracilis* in NL mit 15 g/l Glucose und einer Bruttemperatur von 27,5 °C.

Der Anstieg der Ammoniumkonzentration ist die Folge der StoffwechsellLeistungen von *Euglena gracilis*, die Ammonium als Stoffwechselendprodukt aus der Zelle ausschleust (BUETOW, 1999). Zu Beginn der Fermentation benötigen die Zellen Ammoniumstickstoff für ihr Wachstum, so dass die Konzentration leicht abnimmt (BÄUMER, 1999), was man in Abbildung 4.24 auch nach 24 Stunden feststellen kann. Durch die Verstoffwechsellung der Aminosäuren wird aber auch ständig Ammonium freigesetzt, so dass es während der exponentiellen Wachstumsphase zu einem deutlichen Anstieg der Ammoniumkonzentration kommt. Diese hohen Ammoniumkonzentrationen wiederum führen zu Ammoniumstress für *Euglena gracilis* (SUMIDA, 1987), der wiederum zum Abbau von Paramylon führt. Dies ist auch deutlich in Abbildung 4.2 zum Ende der Fermentation hin zu erkennen.

Da das später verwendete KFW einen pH-Wert von 5,4 hat, sollte auch untersucht werden, wie sich der Start pH-Wert, bzw. die Einstellung eines bestimmten pH-Wertes auf das Wachstum von *Euglena gracilis* auswirkt.

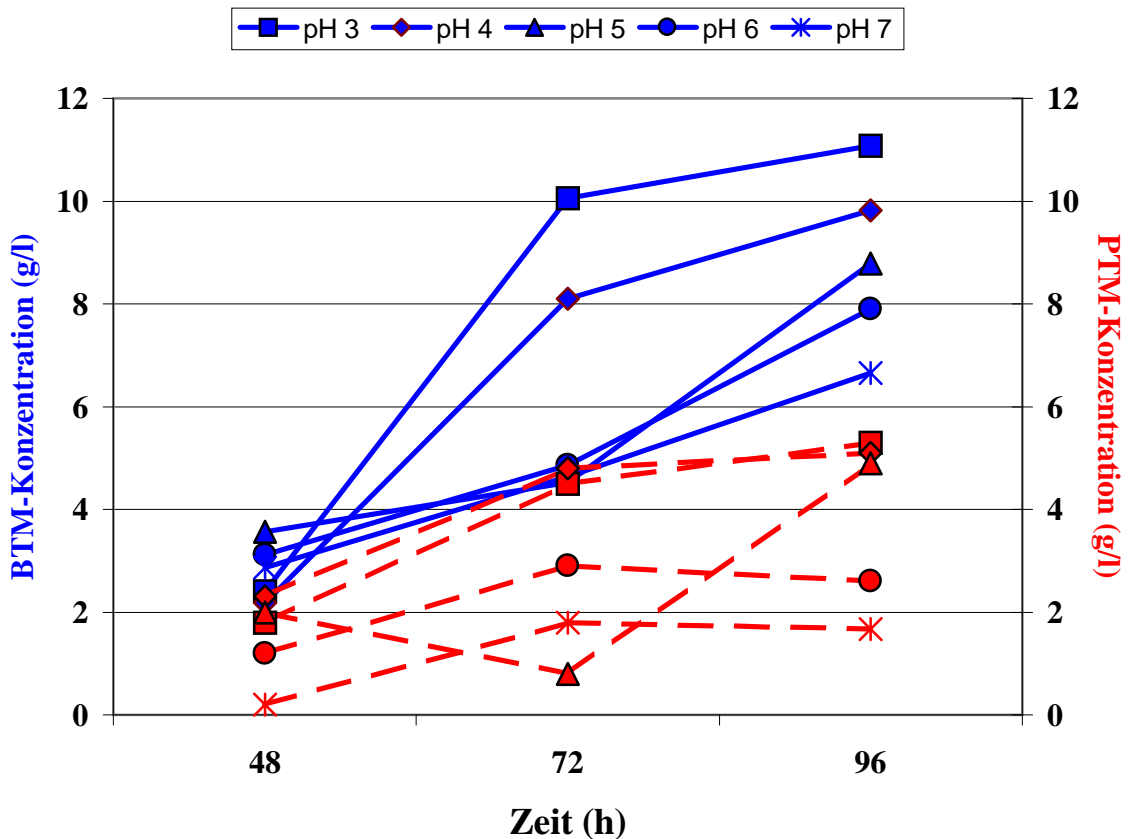


Abb. 4.25: Der Einfluss des am Start der Fermentation eingestellten pH-Wertes ist sehr deutlich zu erkennen. Je höher der Anfangs-pH-Wert, desto geringer sind die Ausbeuten an BTM und PTM. pH-Wert eingestellt mit H_2SO_4 bzw. NaOH.

Beim definiertem Medium (NL) ist der Effekt des Start-pH-Wertes sehr klar zu erkennen (Abb. 4.25). Mit einem steigenden pH-Wert in Richtung 7 nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit stark ab und die Konversion der Kohlenstoffquelle in Paramylon wird immer schlechter. Dies mag an verschiedenen Faktoren liegen, die hier jedoch nicht näher untersucht worden sind.

Tab. 4.1: Tabelle wichtiger Wachstumsparameter. Die pH_0 -Werte geben den pH zum Start des Experiments wieder.

pH_0	3	4	5	6	7
$\mu [h^{-1}]$	0,064	0,063	0,037	0,039	0,035
$t_d [h]$	10,87	11,05	18,57	17,9	19,68

Die Parameter in Tabelle 4.1 zeigen deutlich an, wie die Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmendem pH-Wert abnimmt. Am besten ist das an der Verdopplungszeit t_d der einzelnen Versuche zu erkennen. Bei pH 3 ist eine Verdopplungszeit von 10,9 h beinahe doppelt so schnell wie bei pH 7 mit einer Verdopplungszeit von 19,68 h. Besonders auffällig ist der Sprung im Wert für μ und t_d zwischen pH 4 und pH 5. Dies bestätigt die Beobachtungen von PROVASOLI (1948) und HUTNER (1949), welche die beste Aufnahme von Glucose bei niedrigen pH-Werten beobachteten und bei pH-Werten ab 6,8 keine weitere Aufnahme zeigten (HURLBERT und RITTENBERG, 1962; COOK und HEINRICH, 1965, OLAVESON, M. M., NALEWAJKO, C., 2000).

4.1.4 Osmolalität

Da neben der Abnahme der Glucosekonzentration viele andere Nährelemente aufgrund der Komplexität nicht analysiert werden konnten (auch hinsichtlich des später verwendeten sehr komplexen KFW), wurde auf die Veränderung der Osmolalität zurückgegriffen. Bei einem über vier Tage andauernden Versuch bei 27,5 °C in NL mit einer Glucosekonzentration von 15 g/l wurden 300 ml Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml verwendet. Unter heterotrophen Bedingungen wurden die Proben auf dem Schüttler bewegt und vor Lichteinfall geschützt.

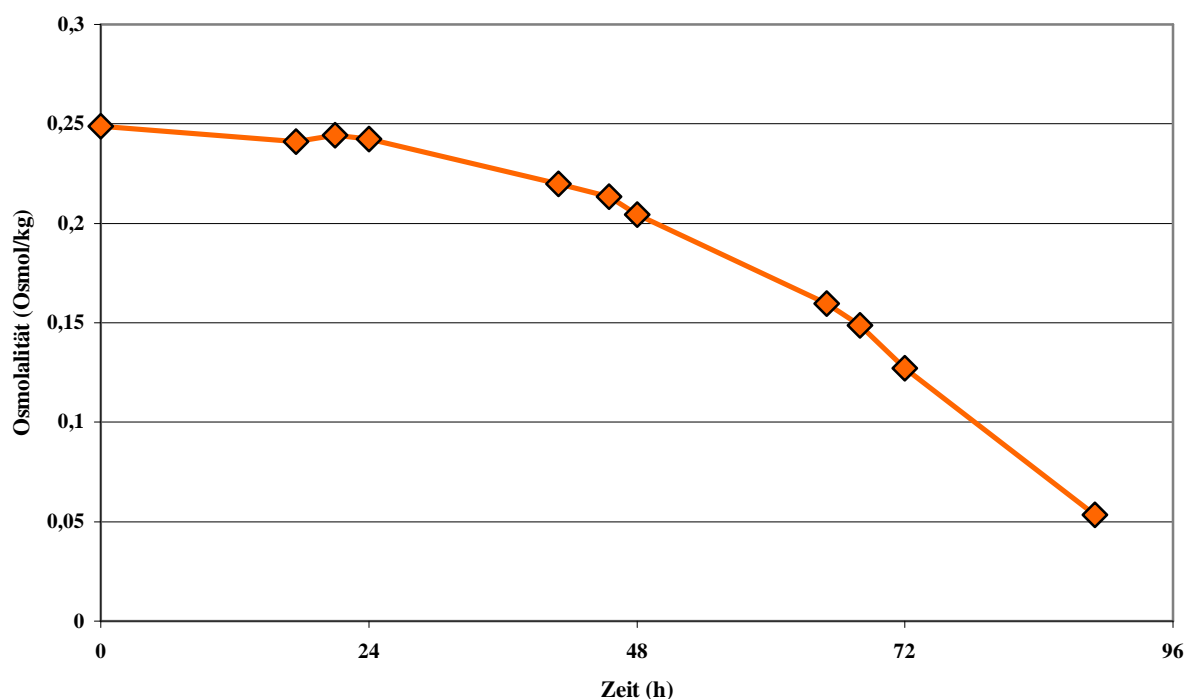


Abb. 4.26: Abnahme der Osmolalität in NL bei 27,5 °C und 15 g/l Glucose. Der Verbrauch der Inhaltsstoffe ist gut nachzuvollziehen.

Je Probenahme wurden mehrere Messungen der Osmolalität durchgeführt und der Mittelwert wurde in Abbildung 4.26 aufgetragen. Gut zu erkennen ist die Abnahme der Osmolalität mit der Zeit. Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass eine längere Fermentation nicht unbedingt zu einer Verbesserung der Ausbeute führen muss, da wahrscheinlich wichtige Nährstoffe nicht mehr vorhanden sind oder in einer nicht mehr aufnehmbaren Form vorliegen. Daraus ergibt sich, dass neben der Glucose auch noch andere Elemente dazu beitragen, dass die Fermentation nach 3-5 Tagen zum Ende kommt. Der osmotische Wert der Lösung sinkt soweit ab, dass die NL für die Zellen wahrscheinlich eine hypotonische Konzentration

erreicht und somit möglicherweise Wasser aus der NL in die Zellen eindringt und ein hoher Zellturgor entsteht. Dies bedeutet zusätzlichen Stress für die Zellen, was wiederum mit dazu beiträgt, dass die Kultur nicht weiter wächst und Paramylon abgebaut wird.

4.1.5 Einfluss von Solanin und Chaconin auf das Wachstum von *Euglena gracilis*

Da es in diesem Projekt um die Verwendung von Kartoffelfruchtwasser für die Fermentation von *Euglena gracilis* geht, sollte ein möglicher Einfluss von Glykoalkaloiden aus der Kartoffel auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in diesem Medium untersucht werden. Glykoalkaloide sind für die meisten Zellen, ob tierischen oder pflanzlichen Ursprungs schädlich. In dem hier verwendeten KFW waren etwa 90 bis 140 ppm an Glykoalkaloiden zu finden. Diese teilen sich in α -Solanin (45 bis 70 ppm), α -Chaconin (25 bis 60 ppm) und β -Chaconin (15 bis 20 ppm) auf [LOTZ, schriftliche Mitteilung]. Der mögliche Einfluss auf das Wachstum von *Euglena gracilis* sollte in diesen Versuchen geklärt werden. Da das später verwendete Medium nur 40 % KFW enthielt, wurde auch der Anteil an Glykoalkaloiden in der NL so berechnet, dass er damit übereinstimmt und ein möglicher Einfluss nicht entfernter Glykoalkaloide nachgewiesen werden konnte. Verwendet wurden jeweils 25 ppm α -Solanin und 25 ppm α -Chaconin, der Einfluss von β -Chaconin konnte nicht untersucht werden, da dies nicht frei im Handel erhältlich war.

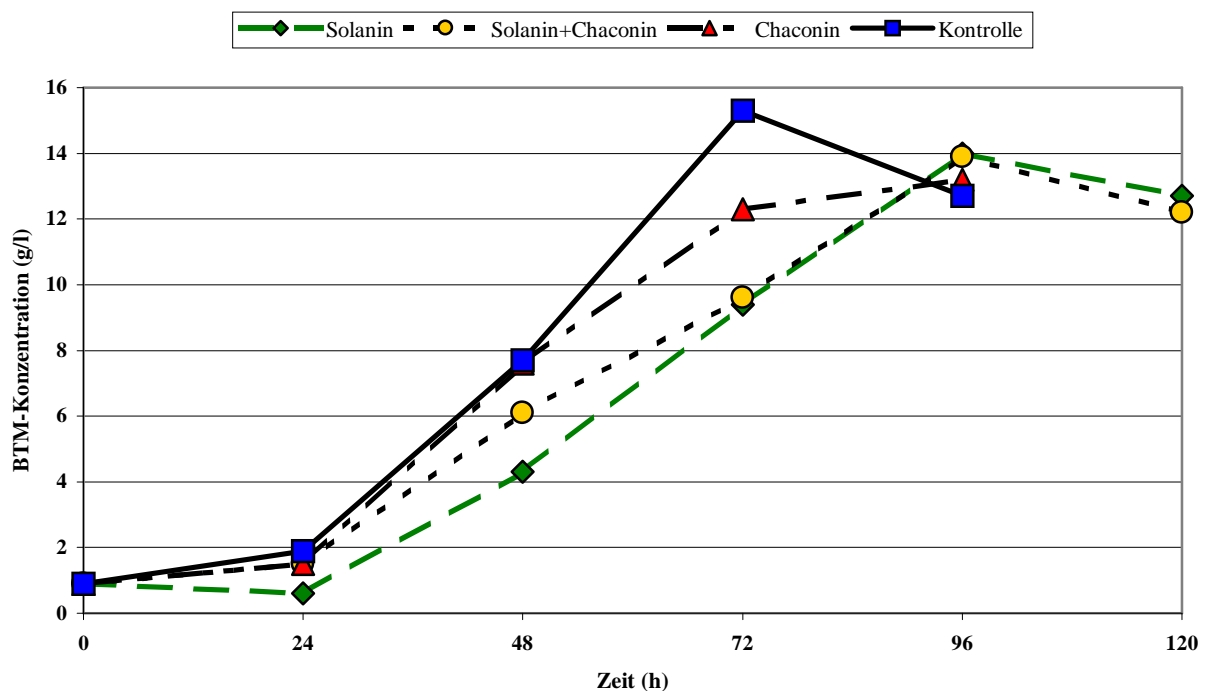


Abb. 4.27: Die Auswirkung von Solanin und Chaconin auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in NL mit 25 g/l Glucose und einer Bruttemperatur von 27,5 °C zeigt sich besonders bei der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ .

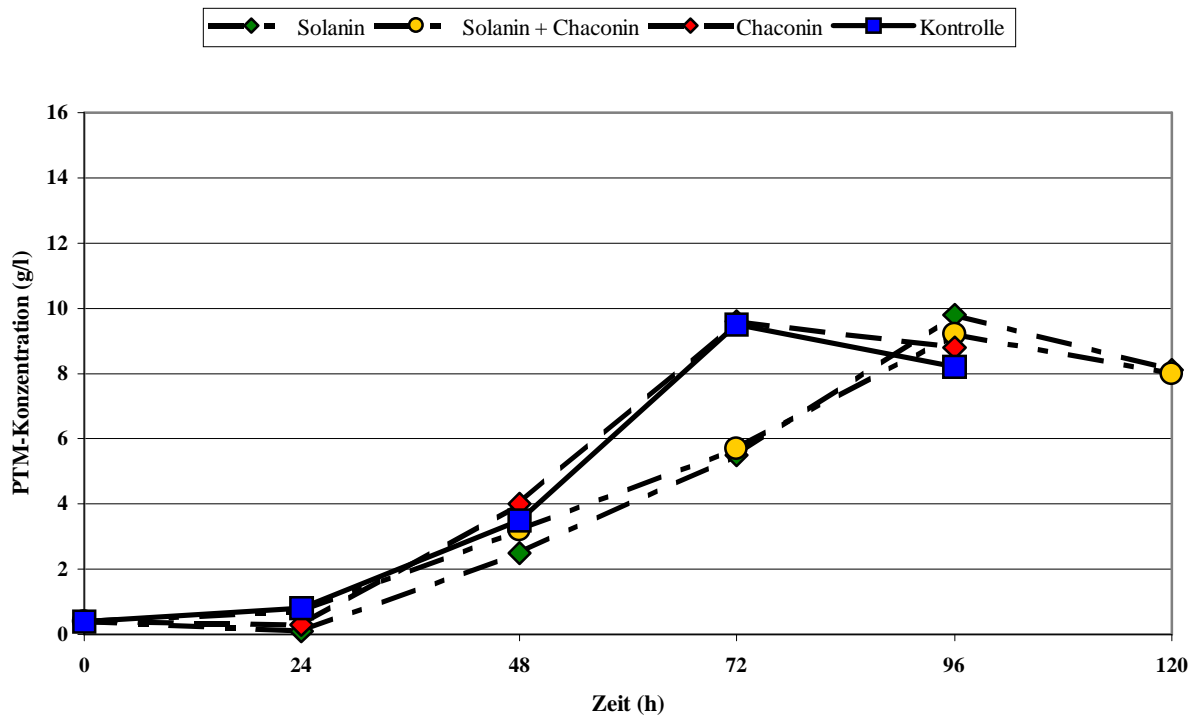


Abb. 4.28: Die Paramylonausbeute der drei Glycoalkaloid-Versuche ist vom Maximalwert her gesehen kaum vom Kontrollwert zu unterscheiden, lediglich die Zeit bis zum Maximum unterscheidet sich stark.

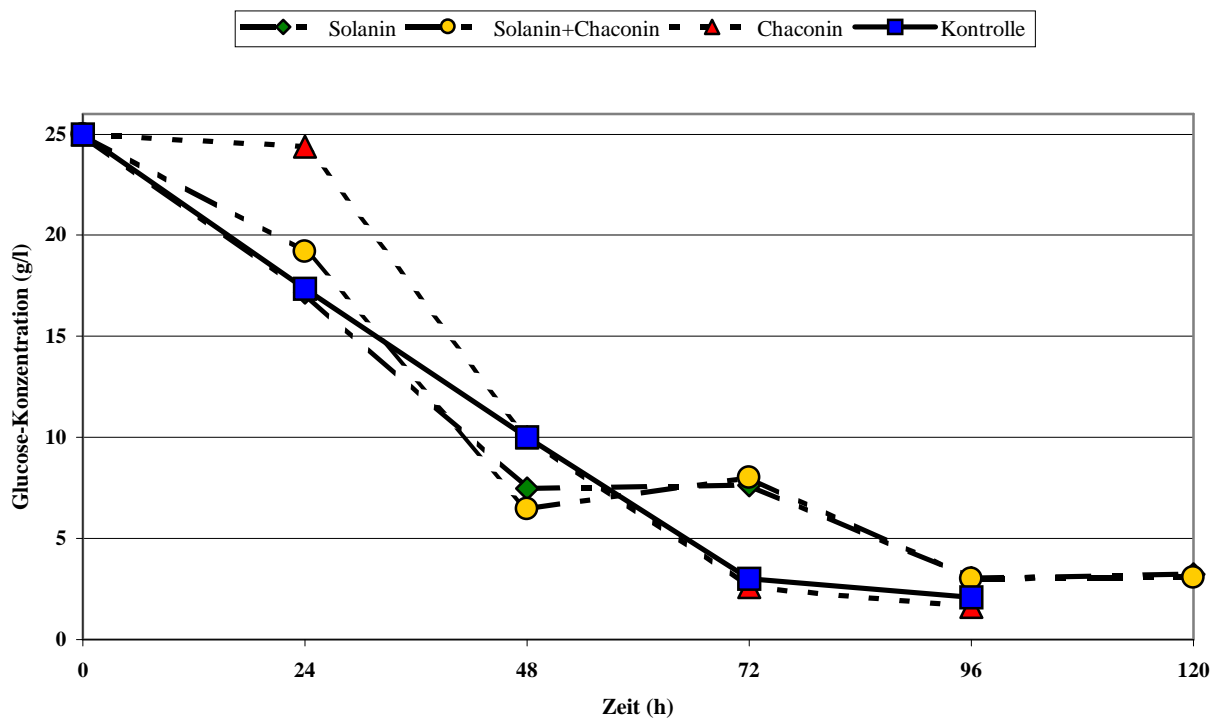


Abb. 4.29: Die Abnahme der Glucosekonzentration erfolgt in allen Fällen bis zu einem Minimalwert von ca. 2 bis 2,5 g/l ab. Bei Anwesenheit von Solanin im Medium verlangsamt sich die Glucoseaufnahme.

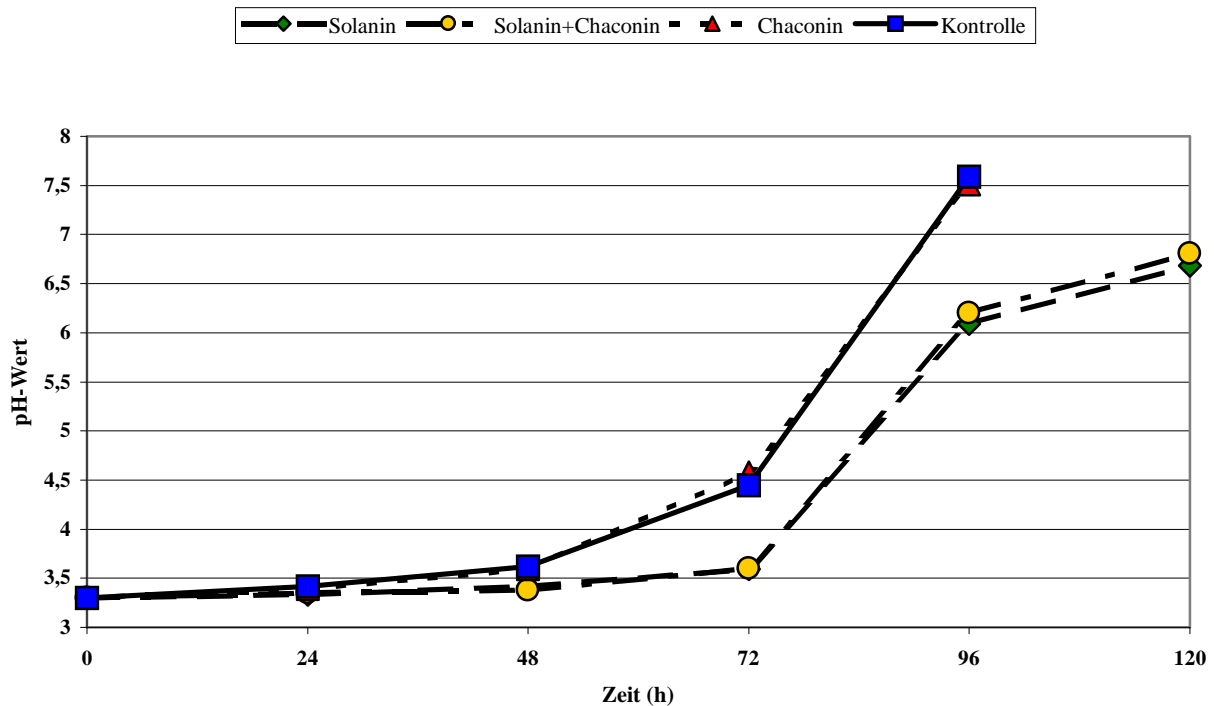


Abb. 4.30: Auch das langsamere Wachstum bei Solaninzugabe spiegelt sich im Anstieg des pH-Wertes wieder und verlagert diesen auf einen späteren Zeitpunkt. Bei Anwesenheit von Solanin im Medium ist auch der maximale pH-Wert um 24 Stunden verschoben, im Vergleich zur Kontrolle, bzw. dem Versuch mit Chaconin im Medium.

Bei den Experimenten mit einer Zugabe an Chaconin und Solanin (Abb. 4.27 – 4.30) konnten zum Teil klare Einflüsse auf das Wachstum von *Euglena gracilis* festgestellt werden. In Abbildung 4.27 wird dies schon deutlich an den maximal erzielten Biomasseausbeuten. Während die Kontrolle ohne Glykoalkaloide schon nach 72 Stunden ihren Höchstwert erreicht hatte, benötigten die Versuche mit Solanin und Chaconin 24 Stunden länger um zu ihrem Höchstwert zu gelangen. Dieser liegt bei allen drei Experimenten zirka 1-2 g unter dem Wert der Kontrolle (15,3 g/l). Der Aufbau von Biomasse scheint also direkt durch die Anwesenheit der Glykoalkaloide beeinflusst zu sein. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Paramylonausbeute (Abb. 4.28). In den Versuchen mit Solanin im Medium kann auch hier eine klare Verschiebung des Maximalwertes der Paramylonausbeute um 24 Stunden festgestellt werden. Anders jedoch als bei der Biomasse unterscheiden sich die absoluten Werte kaum voneinander (9,2 – 9,8 g/l). Auch bei der Aufnahme der Glucose setzt sich dieses Phänomen fort. Durch Solanin im Medium kommt es nach 48 Stunden zu einem Stopp der Glucoseaufnahme und erst nach 96 Stunden wurde die restliche Glucose aufgenommen. Der im Vergleich zu den anderen Versuchen vergleichsweise hohe Glucose-Wert nach 24 Stunden bei dem Versuch mit Chaconin ist eigentlich nur auf einen Messfehler zurückzuführen, da er

sich in keinem anderen gemessenen Parameter sonst wiederholt. Insgesamt betrachtet werden in dem Versuchszeitraum 22,5 g/l bis 23 g/l Glucose in allen Versuchen verbraucht. Beim pH-Wert (Abb. 4.30) zeigt sich ein ähnliches Bild wie schon bei den anderen Parametern. Auch hier kann der Einfluss des Solanins deutlich anhand der Verschiebung des Maximums um 24 Stunden festgestellt werden.

In den Experimenten (Abb. 4.27 – 4.30) mit Chaconin als Glycoalkaloid im Medium konnte kaum ein Einfluss auf das Wachstum von *Euglena gracilis* festgestellt werden. Lediglich eine etwas niedrigere BTM am dritten Versuchstag weist möglicherweise auf einen Effekt des Chaconins hin. Da die Ausbeuten an Paramylon jedoch an allen Versuchstagen quasi identisch mit denen der Kontrolle (NL ohne Zusatz) sind, kann hier kein Einfluss auf die Paramylonsynthese festgestellt werden. Möglicherweise ist dies ein Zeichen für die Adaption von *Euglena gracilis* an die Anwesenheit von Chaconin.

Der Einfluss des Solanins hingegen ist sehr deutlich. Die Zeit für das Anwachsen auf die maximale Biomasse ist um einen Tag länger und die Wachstumsgeschwindigkeiten sind je nach Inhaltsstoff stark unterschiedlich (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Darstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten in der exponentiellen Phase.

	μ [h ⁻¹]	t_d [h]	P_t [kg m ⁻³ h ⁻¹]	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
Solanin	0,029	24,246	0,146	0,637	0,446
Solanin+Chaconin	0,029	24,310	0,145	0,632	0,418
Chaconin	0,036	19,134	0,170	0,564	0,410
Kontrolle	0,039	17,615	0,212	0,668	0,415

Für die Berechnung von μ und t_d in Tabelle 4.3 wurden die Werte der am Anfang und Ende der jeweiligen exponentiellen Wachstumsphase herangezogen. Zur Berechnung von P_t wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Biomasse verwendet und auch bei der Berechnung von $Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$ fand dies seine Anwendung.

Die Werte verdeutlichen, was in Abbildung 4.27 schon zu erkennen ist, nämlich dass es zu einem unterschiedlich schnellen Wachstum bei der Zugabe von Glycoalkaloiden kommt. Der nur geringe Effekt von Chaconin auf das Wachstum von *Euglena gracilis* wird in Tabelle 4.3 deutlich. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ liegt nur knapp unter dem Wert der Kontrolle, liegt jedoch deutlich höher als bei den Versuchen mit einer Zugabe an Chaconin. Bei der Verdopplungszeit t_d wird dies noch deutlicher und der Wert für den Versuch mit Solanin und Chaconin zeigt eine Akkumulation der das Wachstum beeinflussenden Effekte auf. Auch bei der Produktivität P_t wird der Einfluss von Solanin wieder deutlich. Im

Vergleich zur Kontrolle liegt die Produktivität bei dem Versuch mit Chaconin bei 80 %, bei der Zugabe von Solanin sogar nur noch bei 68 % des Wertes der Kontrolle. Die Ertragskoeffizienten des Produkts (Paramylon) $Y_{P/S}$ liegen hingegen alle sehr dicht beieinander, lediglich die Zeiten zum Erreichen der maximalen Paramylon-Konzentration sind bei der Zugabe von Solanin um 24 Stunden länger.

Sollte man also in großtechnischen Versuchen nicht in der Lage sein die gesamten Glykoalkaloide aus dem KFW zu entfernen, so wäre nur mit einer Verlängerung der Fermentationszeit zu rechnen, nicht aber mit einer niedrigeren Ausbeute.

4.1.6 Einfluss von Antibiotika auf das Wachstum von *Euglena gracilis*

Das bei der Emsland Stärke als Nebenprodukt bei der Kartoffelstärkeproduktion entstehende Kartoffelfruchtwasser enthält eine relativ hohe Keimdichte. Aufgrund dieser hohen Keimdichte wird dem aus den Ultrareiben kommenden Reibsel gleich Natriumbisulfit-Lösung zugesetzt, um somit eine Hemmung des bakteriellen Wachstums zu erzielen und die Wirksamkeit oxidativer Enzyme (Tyrosinase) möglichst zu unterdrücken.

Durch die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Aufarbeitung des KFW (siehe Kapitel 4.2.2) werden die Mikroorganismen komplett aus dem KFW entfernt. Das bei 4 °C gelagerte, aufgearbeitete KFW kann so über Monate steril gehalten werden. Da dies aber auf keinem Fall den Bedingungen in einem Produktionsbetrieb wie der Emsland Stärke entspricht, sollte überprüft werden, ob es durch eine Zugabe von Antibiotika zum Medium zur Verhinderung des Wachstums von Fremdorganismen zu einer Hemmung des Wachstums von *Euglena gracilis* kommt.

Um kontrollierte Bedingungen für diesen Versuch zu haben, wurden die Versuche, aufbauend auf den Daten von HURLBERT und BATES (1971), mit definiertem Medium (NL) durchgeführt. Die Antibiotika Tetracyclin (30 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Gentamycin (10 µg/ml) wurden eingesetzt und ihre Wirkung auf die Biomassezunahme wurde über vier Tage dokumentiert (Abb. 4.31).

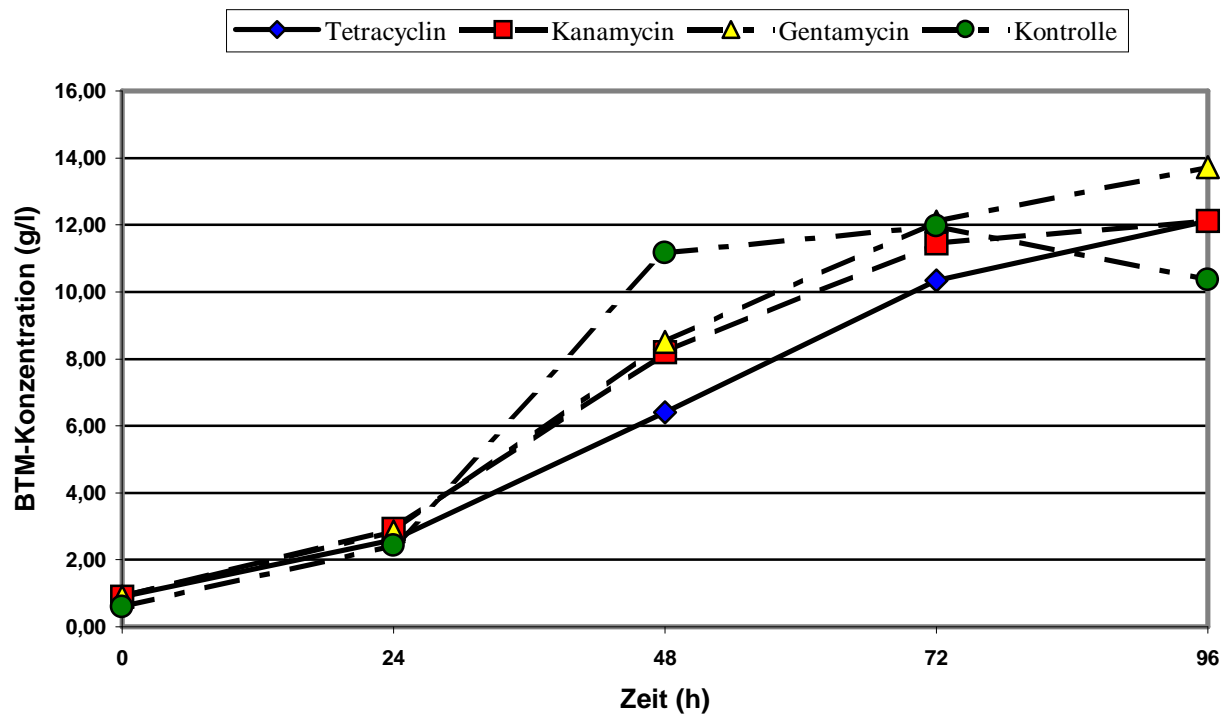


Abb. 4.31: Auswirkung von Antibiotika auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in NL bei 27,5 °C und 15 g/l Glucose. Die verwendeten Antibiotika verlangsamten das Wachstum.

Tab. 4.4: Wachstumsgeschwindigkeit μ und Teilungsgeschwindigkeit t_d deuten klar auf einen Einfluss der Antibiotika auf die Wachstumsgeschwindigkeit hin.

	Tetracyclin	Kanamycin	Gentamycin	NL
μ [h^{-1}]	0,037	0,043	0,045	0,063
t_d [h]	18,5	16,2	15,2	10,9

$Y_{X/S}$	0,83	0,91	0,99	0,95
P_t [$\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$]	0,12	0,13	0,14	0,17

Die in diesem Versuch erzielten Daten bestätigen und ergänzen die von HURLBERT und BATES (1971) gemachten Untersuchungen. Wie die auch dort untersuchten Antibiotika Streptomycin und Chloramphenicol führten die hier verwendeten Antibiotika Tetracyclin, Kanamycin und Gentamycin zu einem verzögerten Wachstum, welches aber am vierten Tag zu einer mit dem Wachstum in NL vergleichbaren Biomasse, Zellzahl und Glucoseaufnahme führte.

Tab. 4.5: Dargestellt sind die Messgrößen Zellzahl und Glucosekonzentration nach 96 Stunden. Es ist kein erkennbarer Einfluss der Antibiotika auf die Zellzahl und Glucoseaufnahme zu erkennen.

	Zellzahl (ml ⁻¹)	Glucose (g/l)
NL	1,14E+07	2,29
Tetracyclin	1,36E+07	1,62
Kanamycin	1,75E+07	1,62
Gentamycin	1,36E+07	1,16

Die Stärke des jeweiligen Einflusses der Antibiotika wird am besten durch die in Tabelle 4.4 dargestellte t_d dargestellt. Das μ wurde aus den Wachstumskurven in Abbildung 4.31 zwischen der 24. und 48. Stunde berechnet. Zu diesem Zeitpunkt wächst die Kultur mit Tetracyclin 69 %, mit Kanamycin 48 % und mit Gentamycin 39 % langsamer als in der Kultur ohne Zugabe an einem Antibiotikum. Dies spiegelt sich auch ganz klar im Ertragskoeffizienten $Y_{X/S}$ wieder, der bei Tetracyclin am niedrigsten ausfällt. Wichtiger als $Y_{X/S}$ scheint in diesem Fall jedoch die Produktivität zu sein, hier durch P_t als Raum-Zeit-Ausbeute dargestellt. Die Ertragskoeffizienten werden durch den Einfluss der Zeit relativiert, da in der Nährlösung die maximale Biomasse schon nach 72 Stunden erreicht ist und nicht erst nach 96 Stunden wie bei den Versuchen mit Antibiotikazugabe.

Da neben den messbaren Parametern auch die Zellgestalt ein gewisses Maß über den Zustand der Zellen während der Fermentation liefert, wurden zu jeder Probenahme lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht. Folgend werden die Aufnahmen von *Euglena gracilis* am dritten und vierten Versuchstag gezeigt.

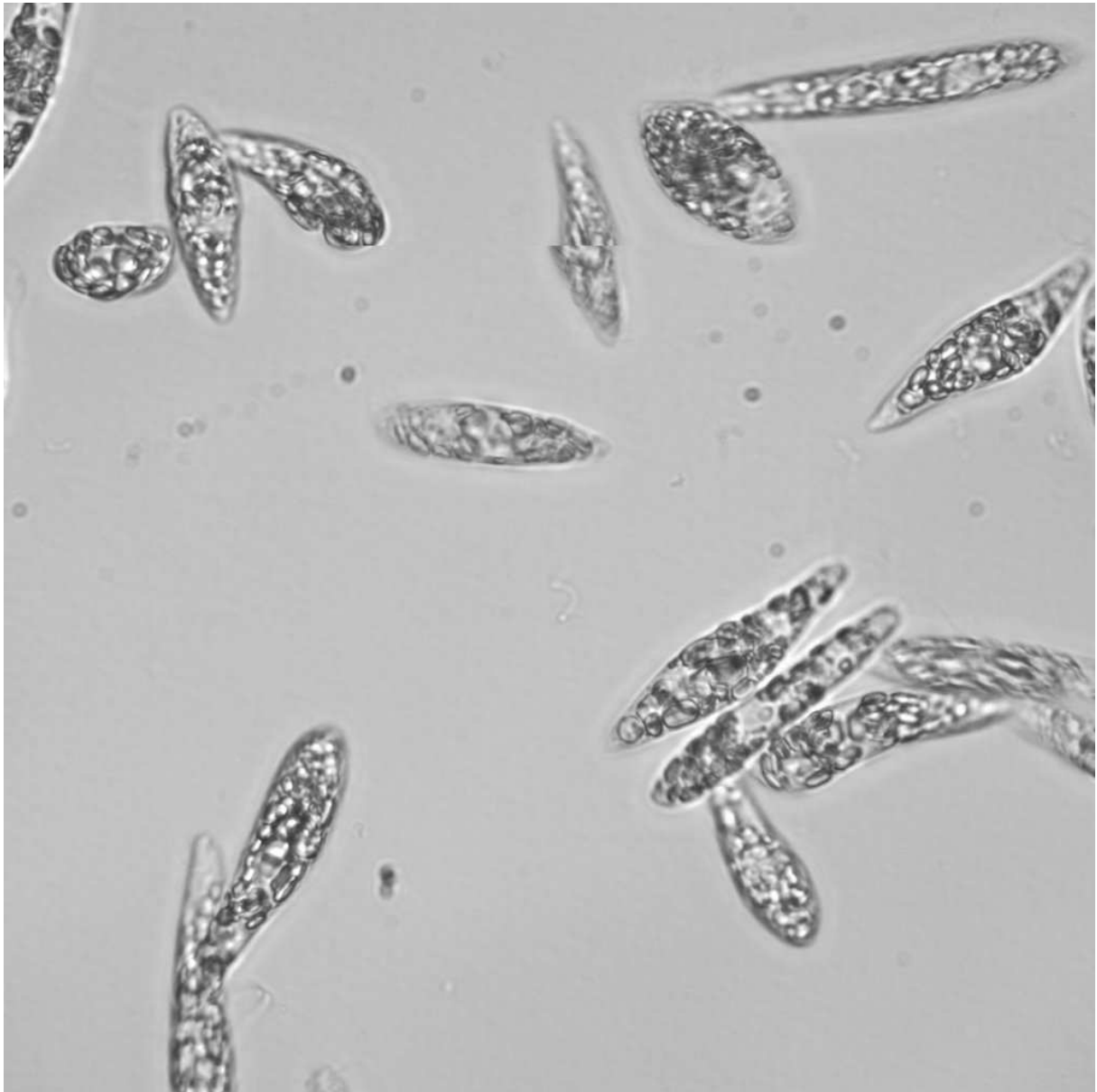


Abb. 4.32: Mikroskopische Aufnahme von *Euglena gracilis* nach 72 Stunden bei 400-facher Vergrößerung. Das Antibiotikum Kanamycin hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Zellform.

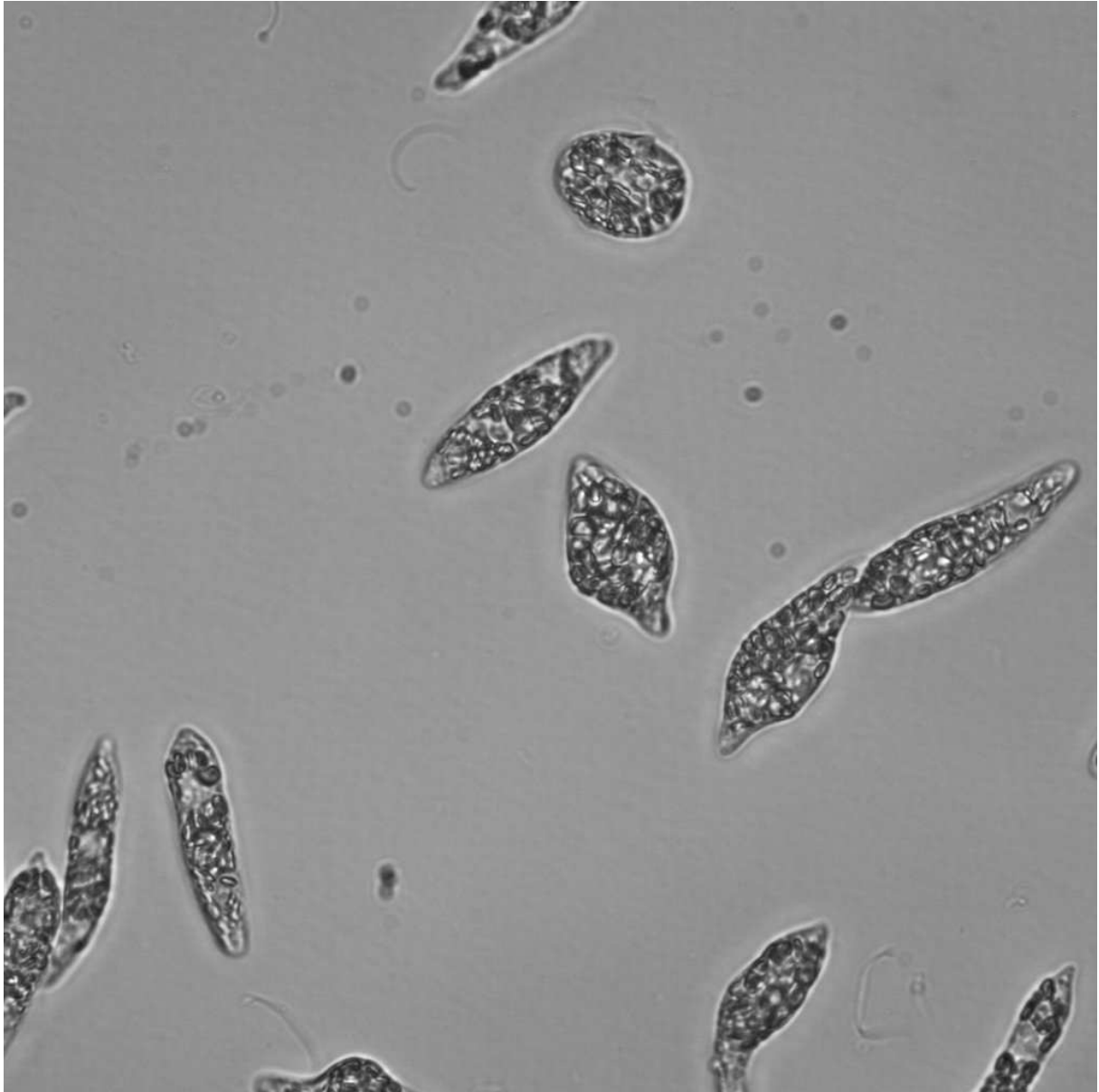


Abb. 4.33: Mikroskopische Aufnahme von *Euglena gracilis* bei 400-facher Vergrößerung. Auch nach 96 Stunden ist kein Einfluss von Kanamycin auf Form oder Größe der Zellen feststellbar.

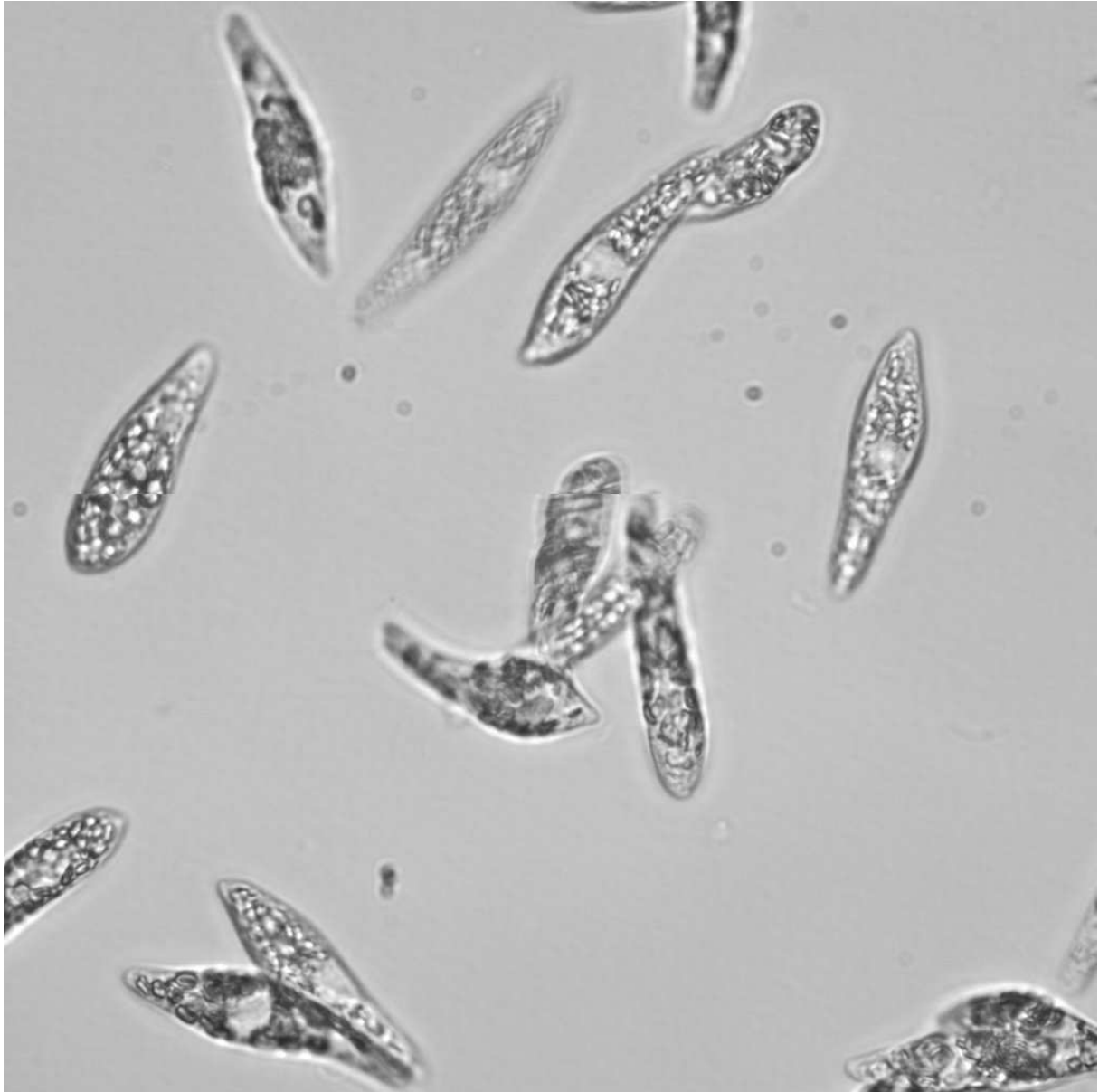


Abb. 4.34: Tetracyclin hat nach 72 Stunden keinen Einfluss auf die Zellen zu haben (*Euglena gracilis* bei 400-facher Vergrößerung).

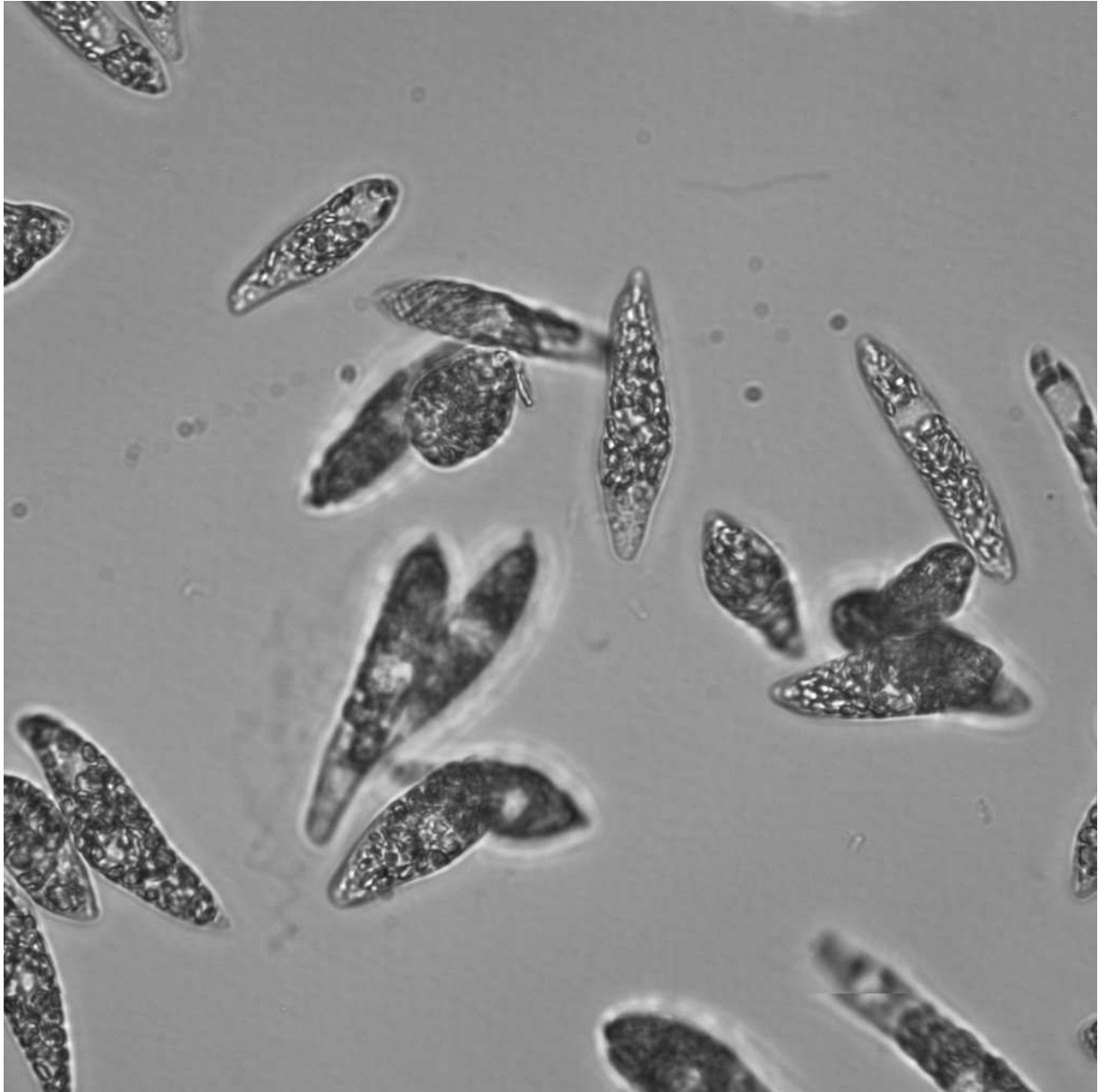


Abb. 4.35: Nach 96 Stunden hat Tetracyclin keinen Einfluss auf die Zellen zu haben (*Euglena gracilis* bei 400-facher Vergrößerung).

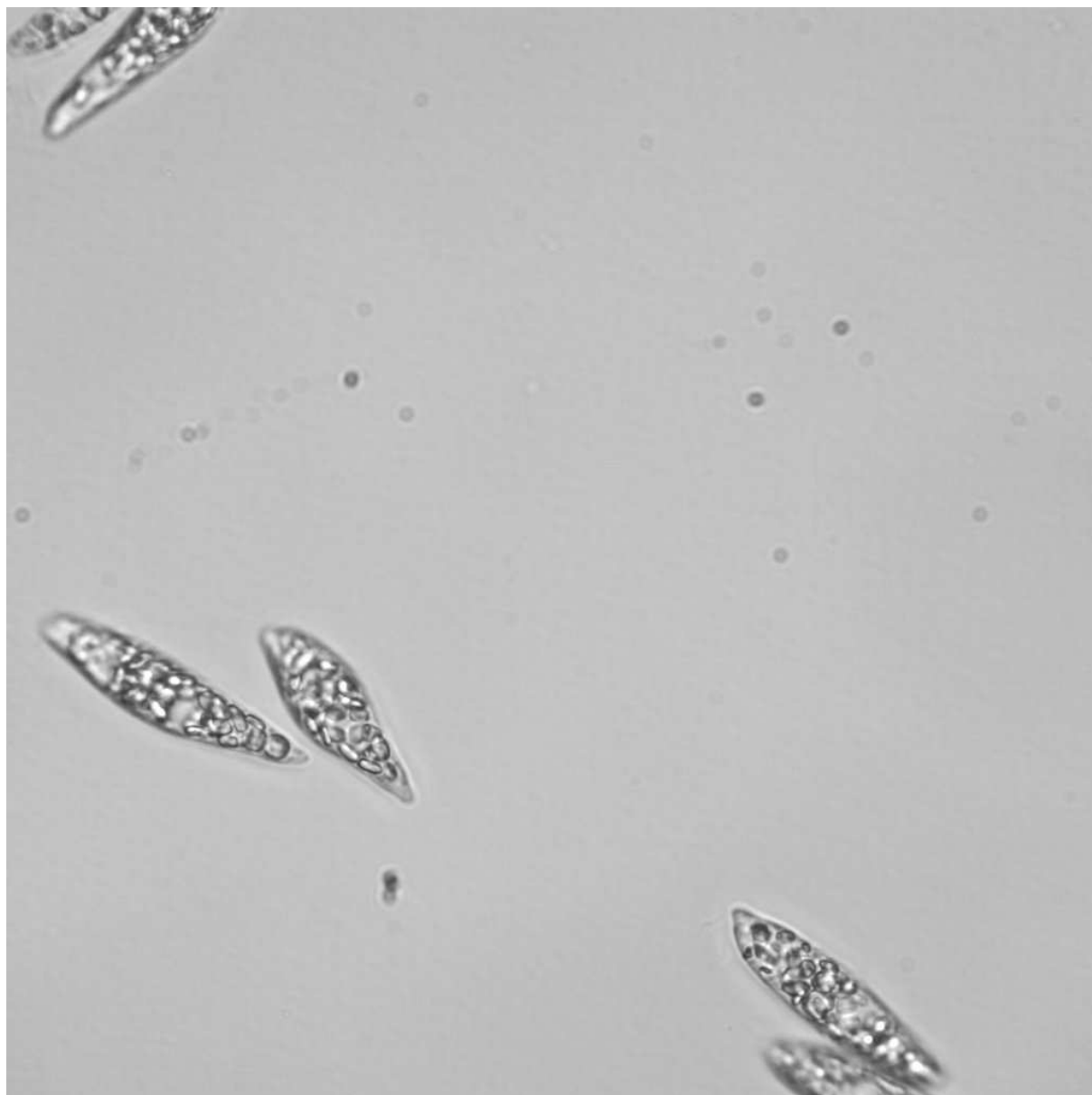


Abb. 4.36: Gentamycin zeigt nach 72 Stunden keinen optisch nachweisbaren Effekt auf die Form von *Euglena gracilis* (400-fache Vergrößerung).

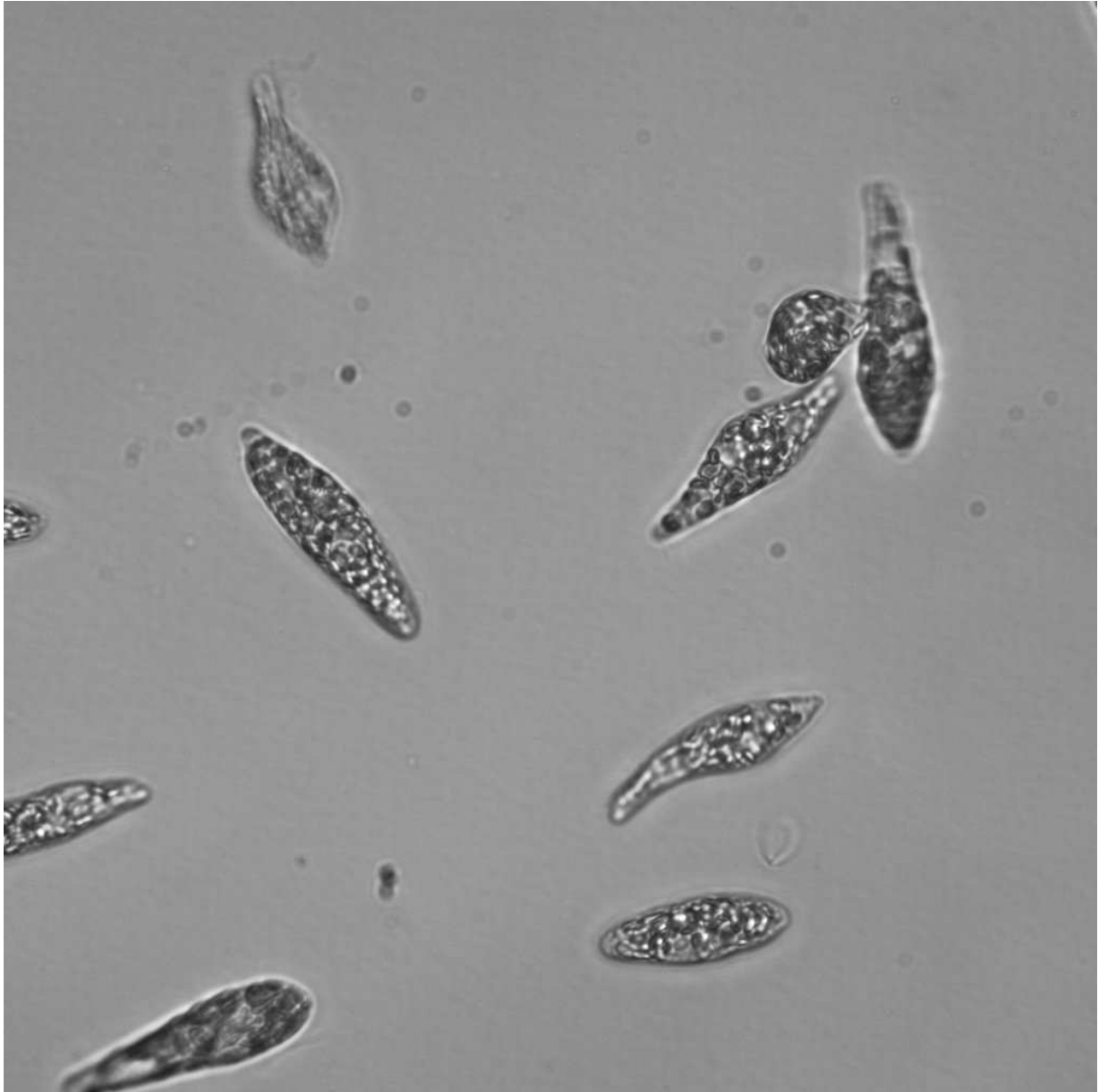


Abb. 4.37: Die Zellen erscheinen bei 400-facher Vergrößerung dicht gepackt, wie es bei einem Wachstum ohne Antibiotikum zu erwarten war. Selbst nach 96 Stunden zeigt sich in Anwesenheit von Gentamycin kein Einfluss auf die Zellen.

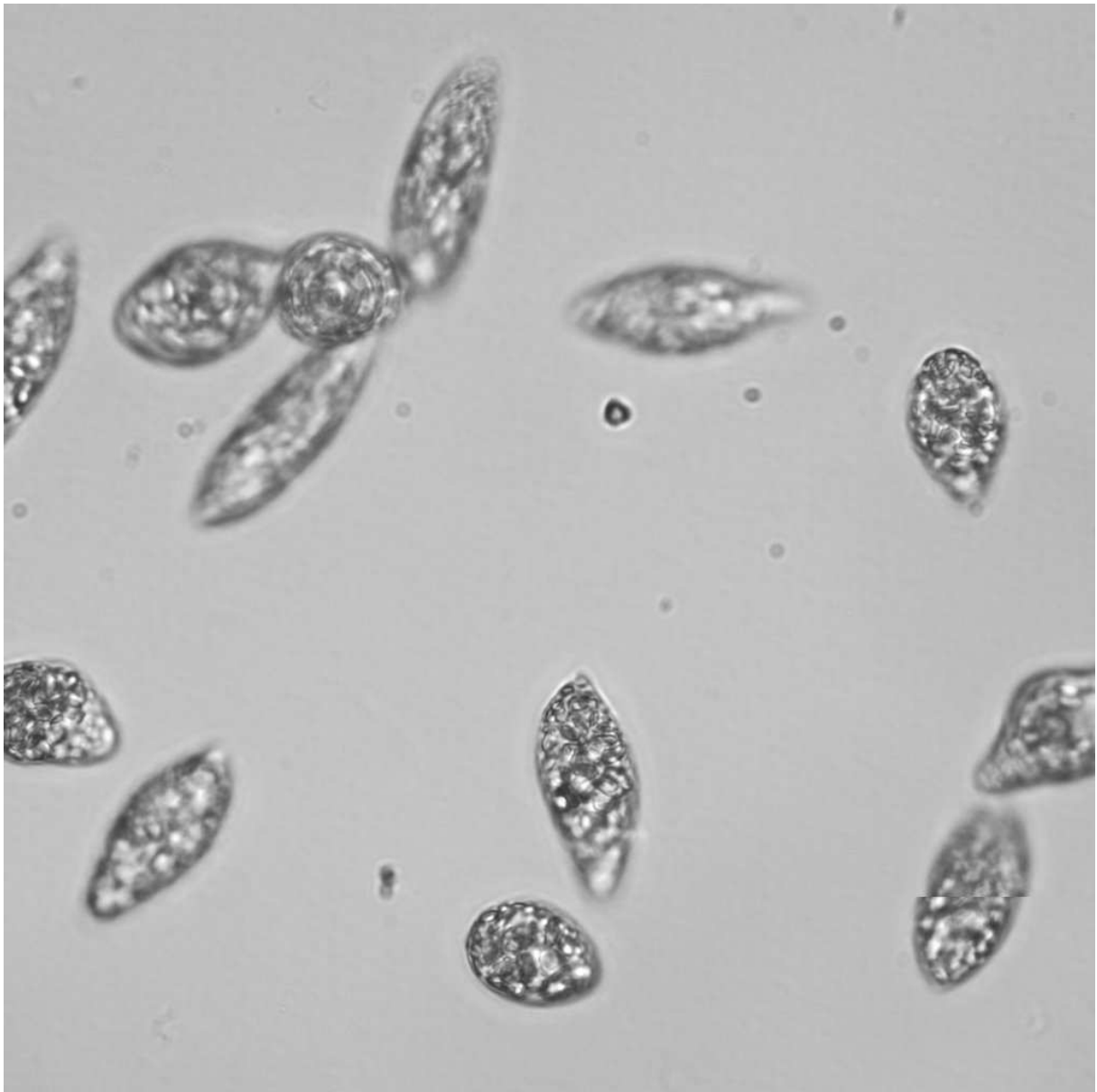


Abb. 4.38: In Nährlösung ohne die Zugabe von Antibiotika zeigen sich nach 72 Stunden bei 400-facher Vergrößerung die *Euglena gracilis* Zellen als dicht gepackt mit Paramylon.

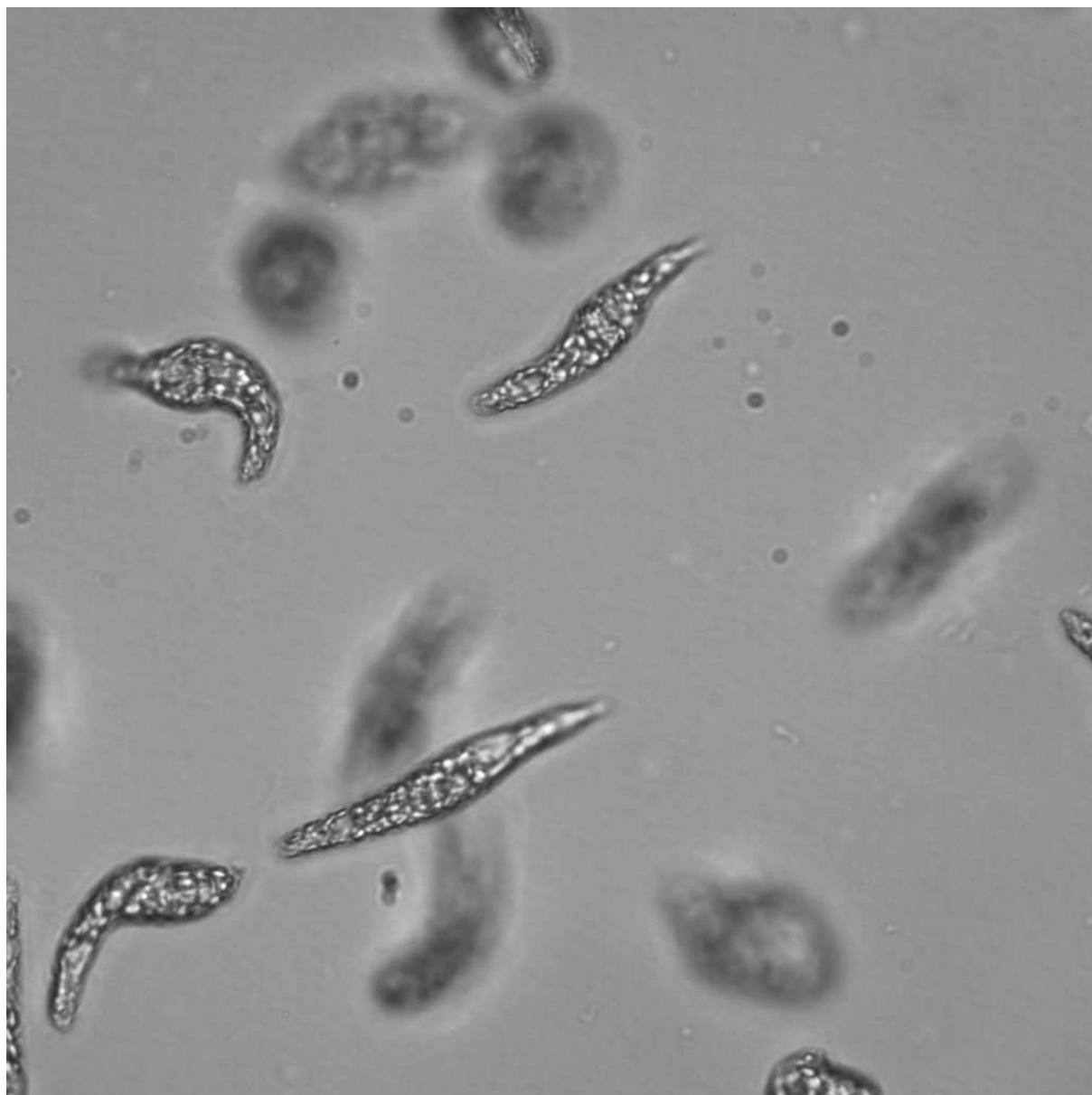


Abb. 4.39: In NL sind auch nach 96 Stunden die Zellen noch von guter Gestalt, die Größe hat jedoch leicht abgenommen (400-fache Vergrößerung).

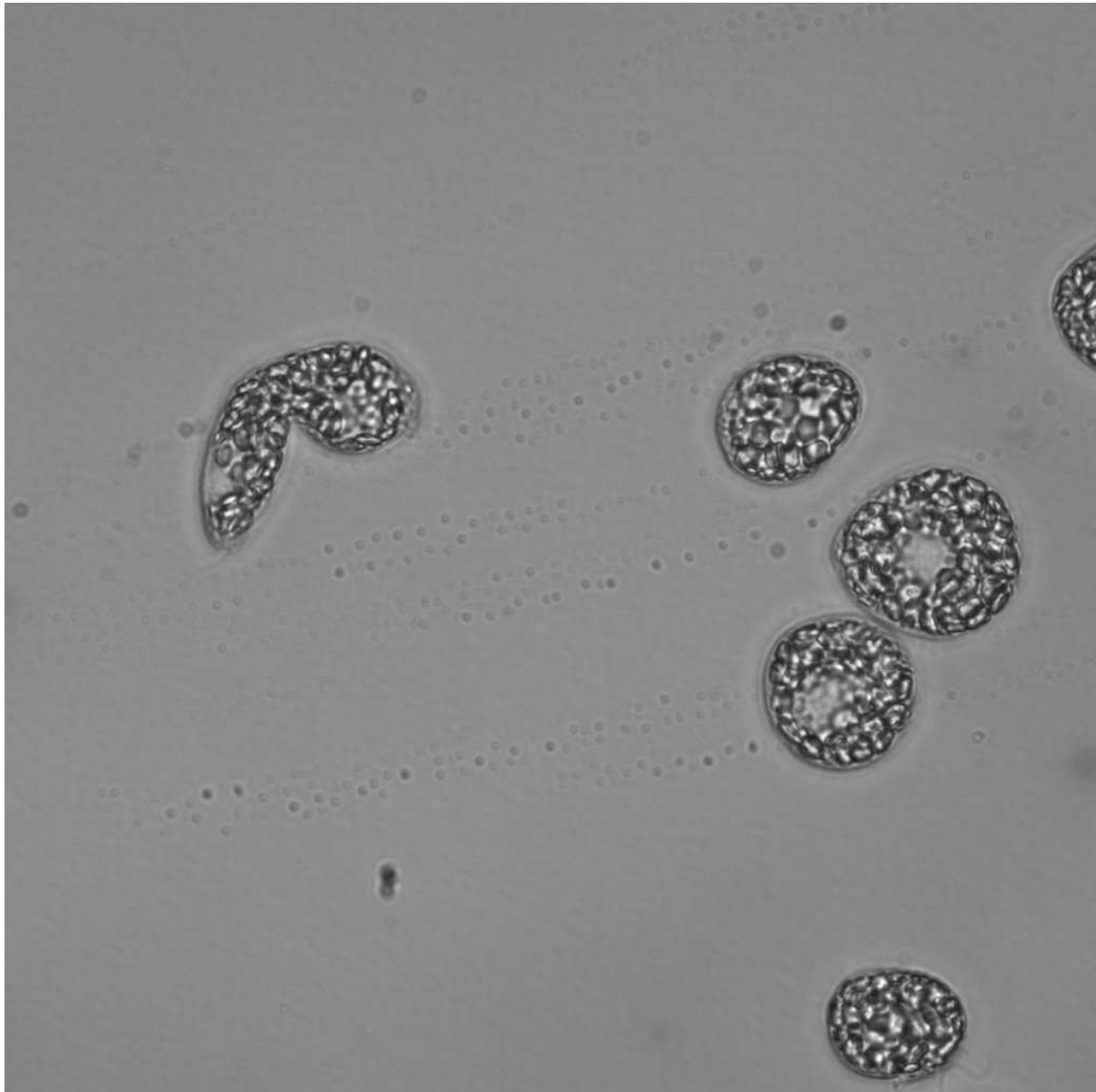


Abb. 4.40: Nur in den ersten 24 Stunden der Fermentation zeigte sich ein Einfluss von Antibiotika auf die Zellen. Die Zellen sind stark abgerundet, jedoch prall mit Paramylon gefüllt und beweglich. Der Einfluss war jedoch nur in den ersten 24 Stunden feststellbar, hier am Beispiel des Gentamycins.

Einflüsse auf die Vitalität der Zellen konnten nur am ersten Versuchstag festgestellt werden und sind in Abbildung 4.40 exemplarisch für Gentamycin dargestellt. Die Zellen sind stark abgerundet, aber trotzdem beweglich. Ab dem zweiten Versuchstag ist kein Einfluss auf die Zellen mehr nachweisbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass die verwendeten Antibiotika entweder nicht stabil im Medium vorlagen und somit während der Fermentation ihre volle Wirkung verloren oder dass sich *Euglena gracilis* relativ schnell an die verwendeten Antibiotika angepasst hat.

4.1.7 Vergleich zweier Probenahmeverfahren zur Bestimmung ihrer Genauigkeit

Als übliche Methode zur Bestimmung der BTM in der Biotechnologie wird jeweils ein Volumen von 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert und das Zellpellet wird bei geeigneter Temperatur meist über Nacht getrocknet. Die in dieser Arbeit verwandte Methode verwendet eine Trocknungstemperatur von 60° C in einem Vakuumtrockenschrank. Die Proben werden in mehreren Schritten aufkonzentriert: zunächst werden zweimal 2 ml und dann 1 ml in einem großen Eppendorfhütchen abzentrifugiert, so dass man auf ein Probenvolumen von 5 ml kommt (2+2+1). Dieses Verfahren findet allgemeine Anwendung bei der Bestimmung der Biotrockenmasse verschiedenster Organismen.

Eine Grundvoraussetzung dafür ist jedoch, dass der zu untersuchende Organismus in der Probenlösung gleichmäßig verteilt vorliegt und es möglichst zu keinen Zellagglomerationen kommt. Zellagglomerationen (Zellverklumpungen) führen bei der Probenahme zu unterschiedlichen Zellzahlen, was wiederum zu unterschieden in der BTM, respektive PTM führen kann. Durch mikroskopische Untersuchungen während der Fermentation im Schüttelkolben konnte jedoch festgestellt werden, dass es ab dem dritten Tag der Fermentation zu Verklumpungen kam. Um festzustellen, wie sich dies auf die Probenahme bzw. Genauigkeit der Bestimmung auswirkte wurde ein Versuch angestrebt, welcher als Zielsetzung die Klärung dieser Frage hatte.

In der einen Versuchsreihe wurde wie bisher an jedem Tag eine Probe mit einem Volumen von 5 ml entnommen und getrocknet. In einer zweiten Versuchsreihe wurden für jeden Versuchstag zu Beginn des Experiments ein Kolben mit 100 ml Medium angeimpft. Jeden Tag wurde nun der ganze Inhalt des Kolbens abzentrifugiert und getrocknet. Die Wachstumsbedingungen wurden in beiden Versuchsreihen gleich gestaltet (Medium/Temperatur/Bewegung/Animpfdichte).

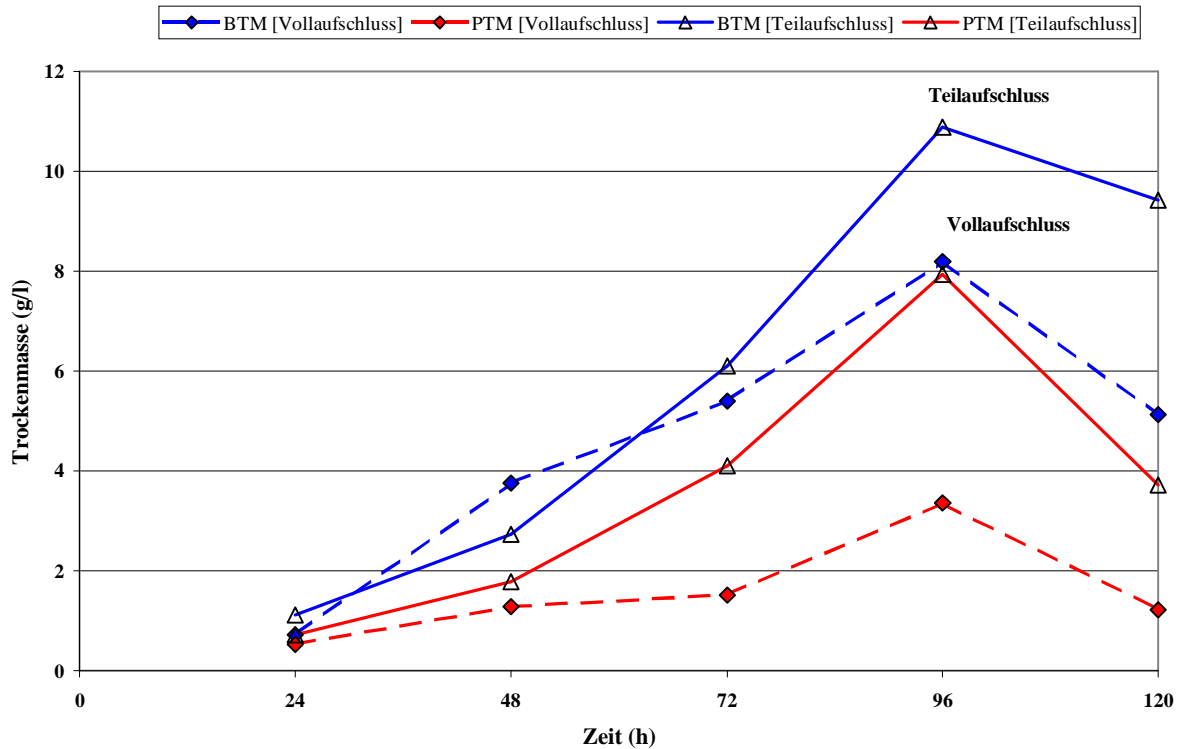


Abb. 4.43: Dargestellt sind die beiden Probenahmeverfahren des Teilaufschlusses (\blacktriangle) und des Vollaufschlusses (\diamond).

Die Abbildung 4.43 zeigt recht deutlich, dass die beiden Verfahren einander im Verlauf der Wachstums- und Ausbeutekurven sehr ähneln, es aber absolut gesehen zu Abweichungen ab dem dritten Tag (Verklumpungen) kommt.

Dieses Ergebnis führte dazu, dass alle Versuche die nach dieser Entdeckung gemacht wurden, nur noch mit Totalaufschlüssen durchgeführt wurden. Des weiteren zeigte sich jedoch, dass dieser Effekt des Verklumpens nur in den Schüttelkolbenkulturen zu erkennen war. Sowohl in den Kulturen im 1 Liter Blasensäulenfermenter, als auch im 5 bzw. 30 Liter Rührkessel-Fermenter wurde während der Fermentation keine Verklumpung der Zellen beobachtet. Möglicherweise verhindert der höhere Durchmischungsgrad im Fermenter eine Zellverklumpung wie sie im Schüttelkoben auftritt.

Die Abbildungen 4.44 und 4.46 zeigen im lichtmikroskopischen Bild die Agglomeration von *Euglena gracilis*-Zellen am vierten Versuchstag. Zu dieser Aneinanderheftung der Zellen bei hohen Zelldichten kommt es wahrscheinlich aufgrund der Anreicherung von Wachsestern auf der Oberfläche von *Euglena gracilis* aufgrund von Mangelerscheinungen im Medium. Im Fermenter kommt es zur gleichen Zeit nicht zu solchen Agglomerationen, wie Abbildung 4.44 deutlich macht. Möglicherweise ist die bessere Durchmischung und die bessere Versorgung der Zellen mit Sauerstoff hierfür ausschlaggebend.

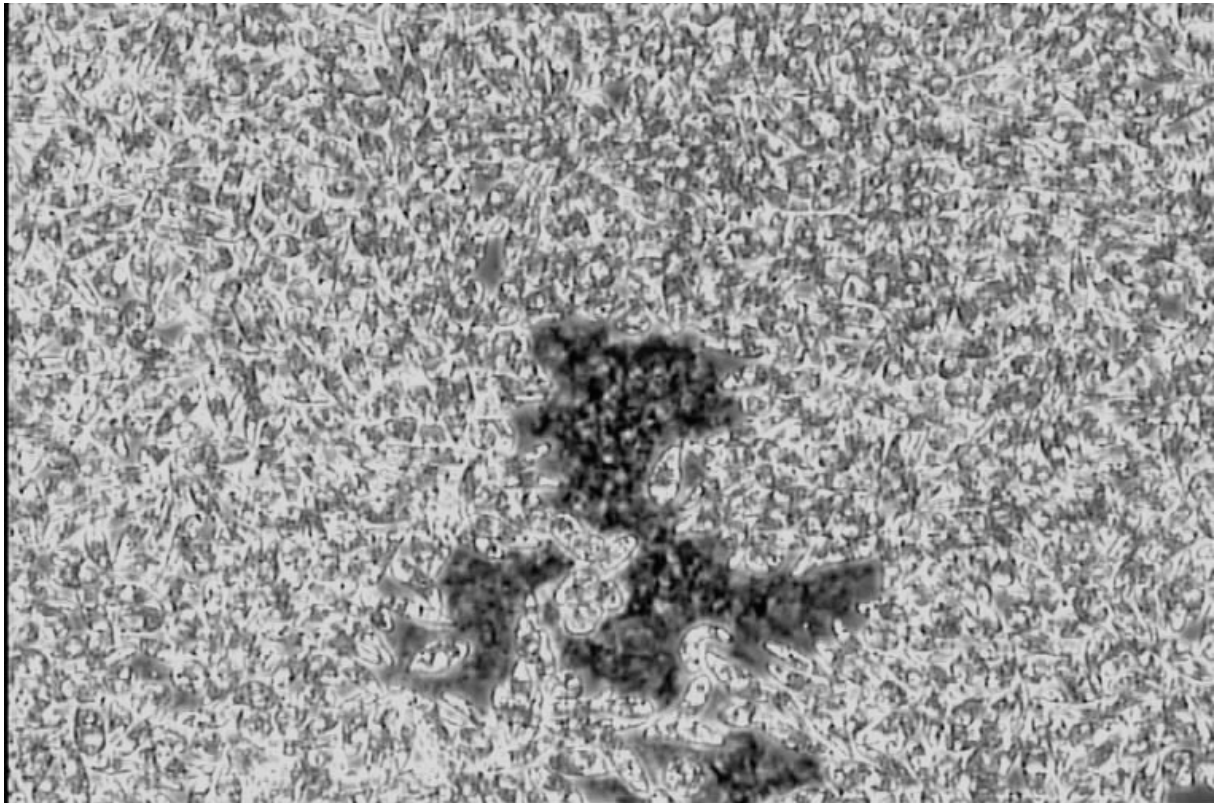


Abb. 4.44: Zellagglomeration während der Fermentation im Schüttelkolben, 4. Versuchstag. (200-fach)

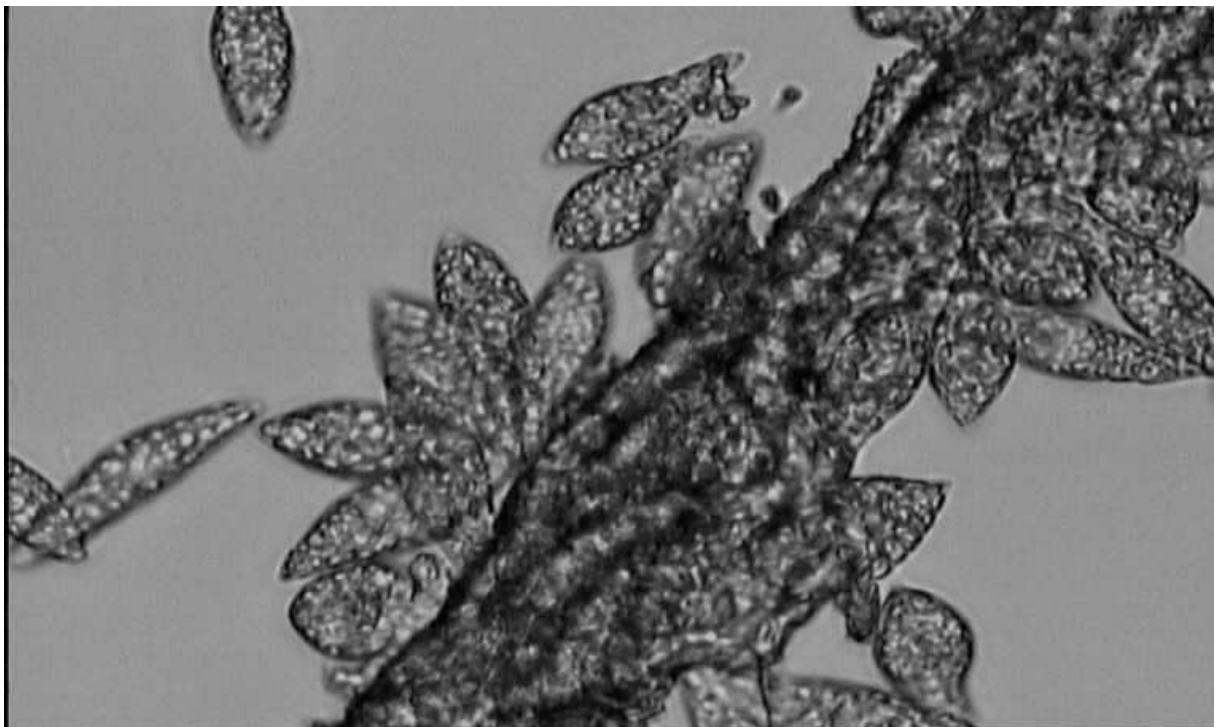


Abb. 4.45: Zellagglomeration während der Fermentation im Schüttelkolben, 4. Versuchstag. (400-fach)

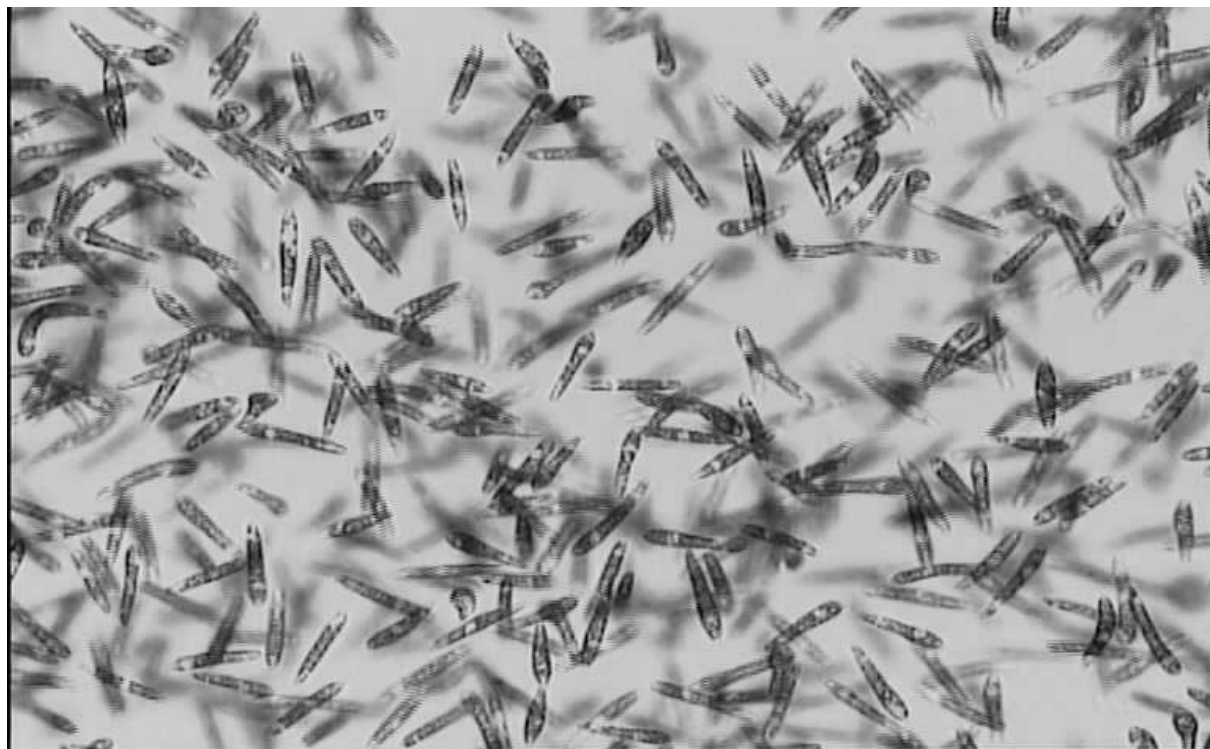


Abb. 4.46: Zellen am vierten Versuchstag im Fermenter (200-fach).

4.2 Behandlung des Kartoffelfruchtwassers

Das von der Emslandstärke GmbH in Emlichheim zur Verfügung gestellte Kartoffelfruchtwasser (KFW) enthält eine große Menge an Protein und anderen unerwünschten Inhaltsstoffen (Glycolakaloide und Mikroorganismen). Das KFW, welches nun als Medium für die Fermentation verwendet werden sollte, wurde aus dem Produktionsfluss der Emslandstärke entnommen. Im KFW nach der Proteinausfällung ist jedoch immer noch soviel Protein enthalten, dass es nach dem Autoklavieren ausfällt und somit eine Verwendung als Medium nicht zulässt (Abb. 4.47).



Abb. 4.47: Erster Versuch der Fermentation von *Euglena gracilis* in nicht vom KFW-Protein bereinigten Medium (15 g/l Glucose). Die Zelle zeigt eine stark deformierte Form. Das Medium ist stark mit Reststoffen belastet.

Anfangs wurde das KFW autoklaviert und dann über einen Glasfaserfilter in einem Büchnertrichter das Protein vom flüssigen Anteil des rohKFWs getrennt. Um jedoch eine möglichst industriennahe Aufarbeitung des rohKFWs zu erreichen, wurde in einem neuen Verfahren das rohKFW anders aufgearbeitet bzw. konditioniert.

Roh KFW (enteiweißt)

↓ Autoklavieren bei 121 °C für 25 Minuten

KFW (mit ausgefällten Proteinen)

↓ Klarfiltration

KFW (Proteinarm, keine festen Bestandteile)

↓ Verdünnung (z. B. auf 40 %);

↓ Zugabe von Glucose (z. B. 25 g/l);

↓ Autoklavieren (z. B. im Fermenter)

steriles, konditioniertes KFW

↓ Animpfen (5 ml Stammkultur auf 100 ml)

Fermentation

Das rohKFW wurde wie schon zuvor im Autoklaven autoklaviert und dadurch das Protein ausgefällt. Des weiteren werden Glykoalkaloide an die Proteine gebunden und somit auch von dem flüssigen Medium getrennt (Glykoalkaloidgehalt gemessen als α -Solanin lag unter 5 ppb). Die Proteine wurden während der Kampagne 2000/2001 mittels Watte über einen Büchnertrichter grob abfiltriert um die Filter nicht zu stark zu belasten. Das aus den folgenden Kampagnen stammende rohKFW enthielt weniger Protein und konnte direkt nach dem Autoklavieren der Filtration zugeführt werden.

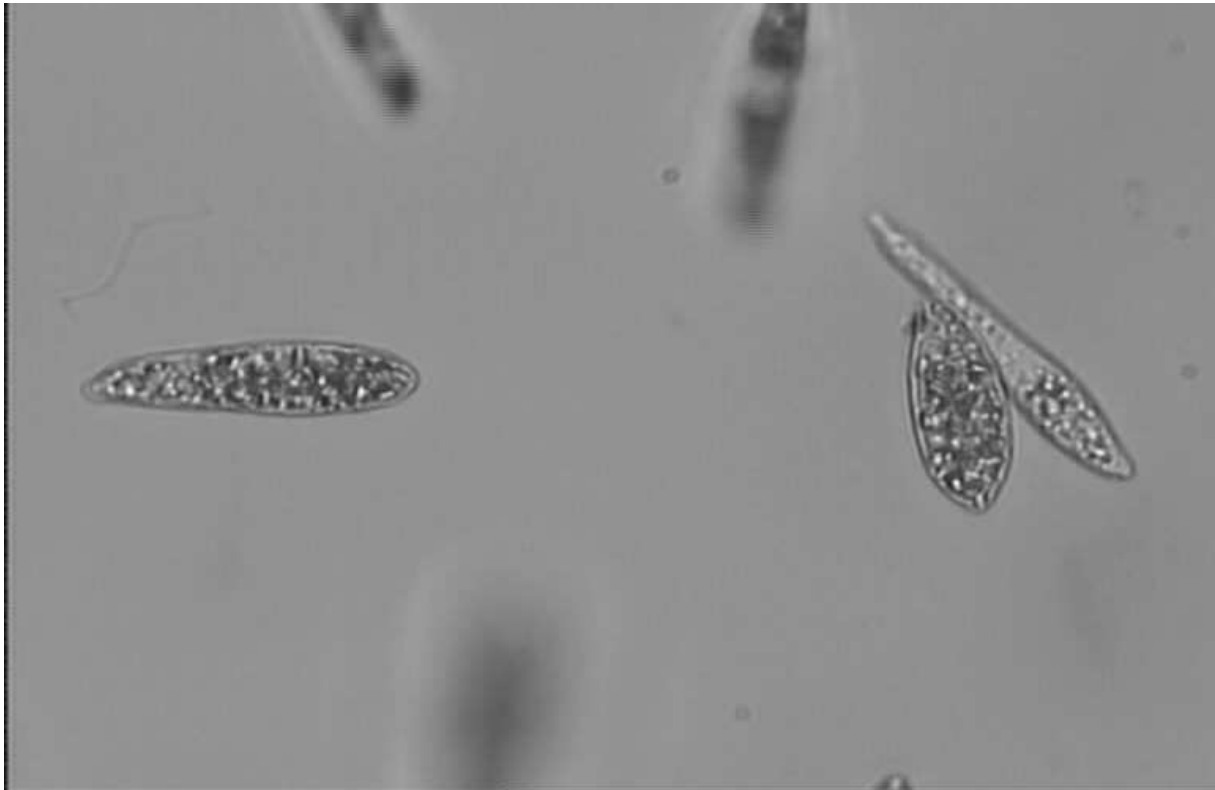


Abb. 4.48: Wachstum von *Euglena gracilis* in KFW nach der CFM. Die Zellen zeigen eine normale Form und Vitalität. Die Paramylon-Granula ist bei den älteren Zellen gut zu erkennen, wohingegen die junge Zelle rechts im Bild erst wenig Granula enthält.

Durch die Verwendung der Klarfiltration war es möglich, schnell große Mengen an KFW zu verarbeiten. Das so entstandene Produkt enthält keine unlöslichen Proteine mehr. Insgesamt ist das neue Medium (KFW_{2n}) klarer in der Farbe (hellbraun) und neutraler im Geruch. Ein Wachstum von *Euglena gracilis* in diesem Medium ist ohne Probleme möglich (Abb. 4.48).

Eine Charakterisierung des Proteins aus dem angelieferten KFW (Kampagne 2002/2003) ergab im SDS-Gel 3 Fraktionen, die zu erkennen sind. Ein relativ großer Anteil bei 10 kDa, ein weiterer bei ~40 kDa und ein letzter als nur noch schwach erkennbare Bande im Gel bei 70 kDa. Aufgrund der Größen kann man zumindest die Fraktion bei 40 kDa als Patatin (Abb. 4.49) identifizieren, die beiden anderen Banden wurden nicht weiter charakterisiert.

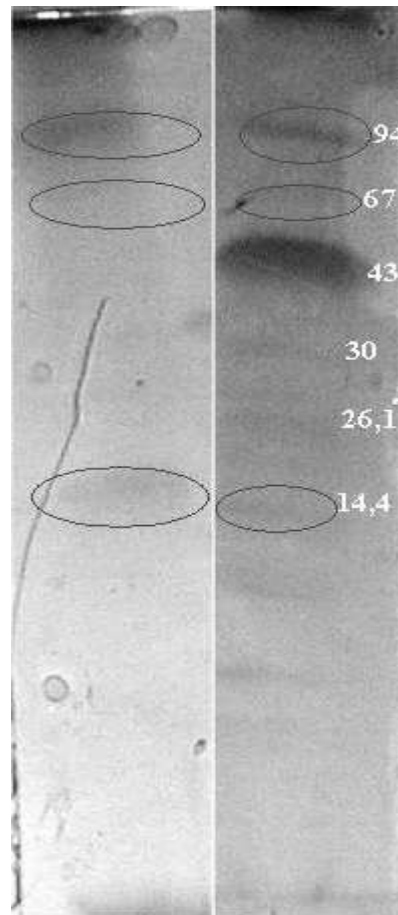


Abb. 4.49: SDS-Proteingel des Proteins aus Kartoffelfruchtwasser (rechts Größenstandard, links KFW-Protein).

Das proteinfreie KFW enthält ungefähr 1,52 g/l an Glucose was man in Tabelle 4.5 gut erkennen kann. Die Messungen wurden mit dem Glucoseanalysator Super GL_{ambulance} der Firma RLT durchgeführt,

Tab. 4.5: Glucosebestimmung in KFW_{2n} (n=10).

Probe	Messwert	Glucose (g/l)
1	171	1,71
2	144	1,44
3	166	1,66
4	142	1,42
5	153	1,53
6	154	1,54
7	154	1,54
8	149	1,49
9	149	1,49
10	135	1,35
	Mittelwert =	1,52

Durch die Filtration wird das gesamte koagulierte Protein aus dem KFW entfernt. Ein nach einer 1 MDa, 50 kDa und 5 kDa Filtration durchgeführte Bestimmung des Proteingehalts

mittels SDS-Gelelektrophorese, bzw. der Bradford-Test ergaben kein nachweisbares Protein im so konditionierten KFW_{2n}.

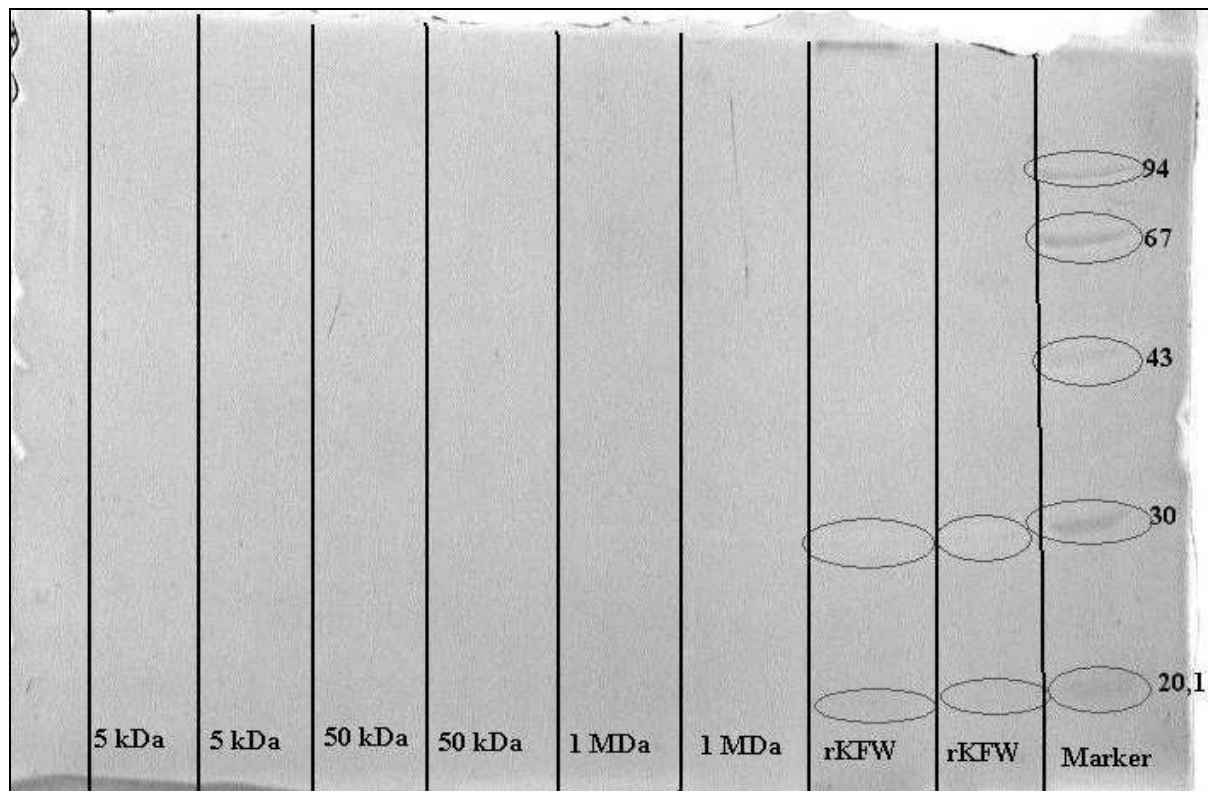


Abb. 4.50: SDS-Gelelektrophorese von unterschiedlich gefiltertertem KFW. Rechts ist ein Größenstandard aufgetragen, daneben in zwei Spuren Protein aus rohKFW. In KFW aus der 5 kDa, 50 kDa und 1 MDa Filtration konnte kein Protein nachgewiesen werden.

Abbildung 4.50 zeigt ähnlich wie schon in Abbildung 4.49 wieder die beiden Banden bei 10 kDa und bei 40 kDa an. Die dritte Bande ist in diesem Versuch nicht zu erkennen. Das mit der Klarfiltration aufgearbeitete, zuerst autoklavierte KFW ist offensichtlich in allen drei Filtrationsstufen als proteinfrei zu bezeichnen.

4.2.1 Medienoptimierung des Kartoffelfruchtwassers

Erste Versuche im KFW zeigten, dass ein Wachstum in proteinarmen KFW möglich ist. Die Ausbeuten waren jedoch sehr gering und somit für einen Fermentationsbetrieb nicht wünschenswert.

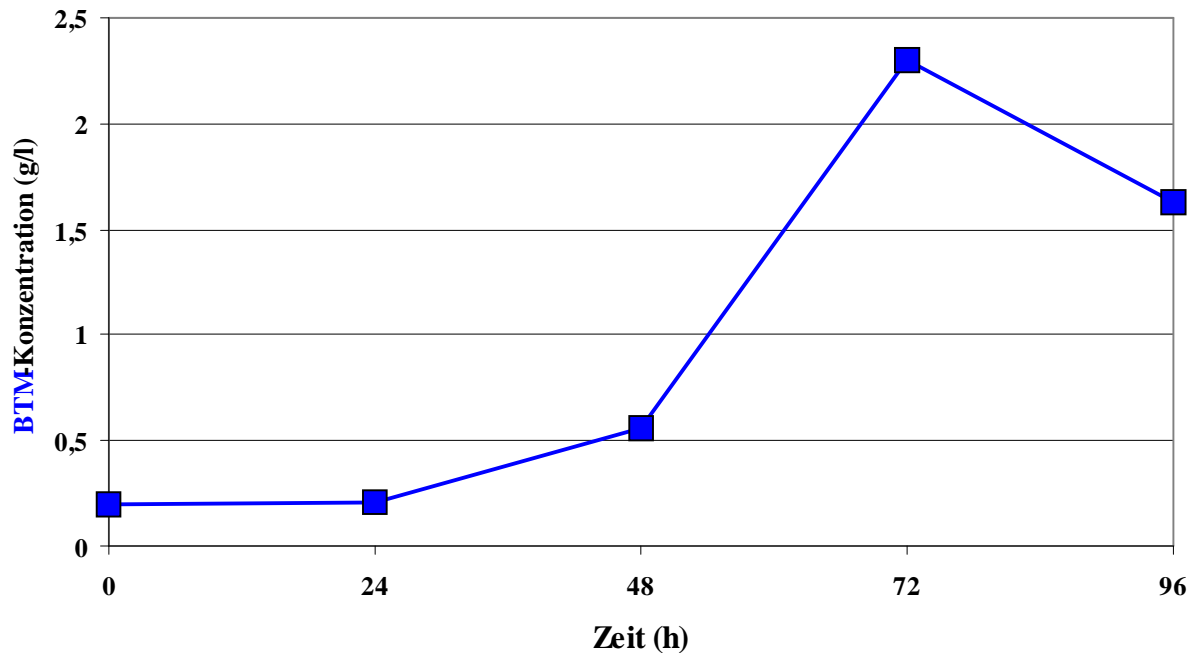


Abb. 4.51: Fermentation im Schüttelkolben in KFW ohne eine zusätzliche Glucosequelle ($n = 7$). Ein Wachstum bis zu einer BTM von 2,5 g/l konnte erreicht werden. Nach 72 Stunden nimmt die maximale BTM wieder stark ab.

Durch diesen Versuch (siehe Abb. 4.51) konnte nachgewiesen werden, dass in dem nach dem hier verwendeten Verfahren konditionierten KFW eine BTM von bis zu 2,5 g/l ohne eine Supplementierung anderer Stoffe zu erreichen war. Dies lag weit unter den Biomassen, die in definiertem Medium möglich waren (12 bis 15 g/l). Eine Zugabe von Glucose als primäre Kohlenhydratquelle zu dem KFW wurde als nächstes untersucht. Ähnlich wie in NL musste auch hier die für dieses Medium und den Organismus optimale Glucosekonzentration ermittelt werden.

Um an die Ergebnisse in definiertem Medium anzuknüpfen wurden Versuche mit 15 g/l bis 30 g/l Glucose durchgeführt, um Vergleiche mit den Ergebnissen in definiertem Medium anzustellen.

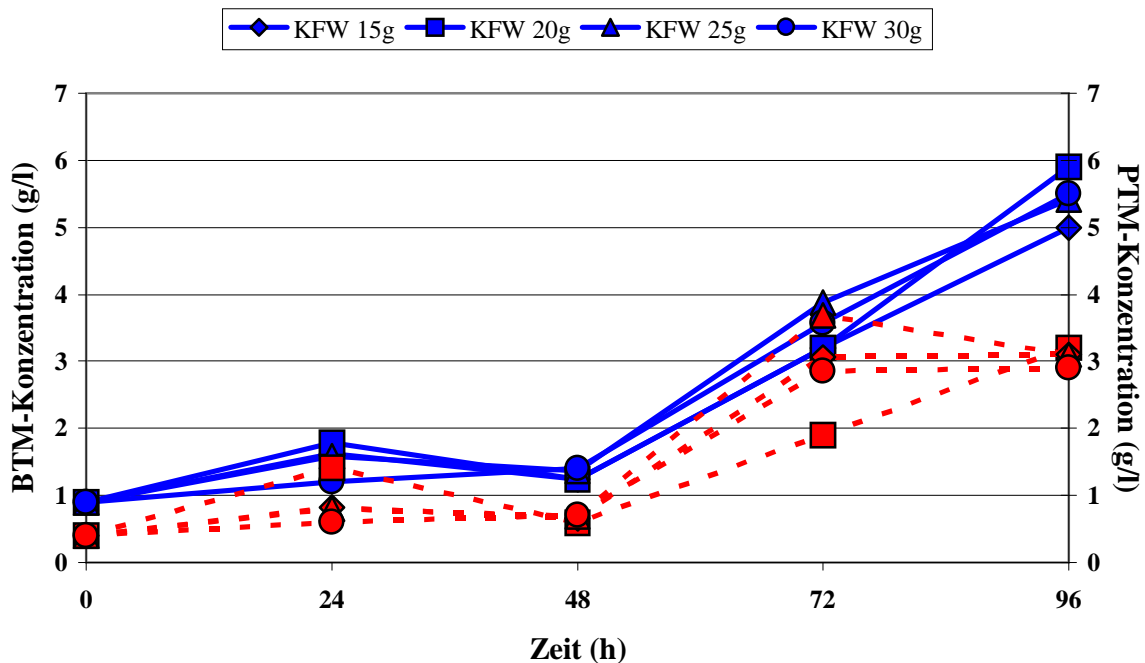


Abb. 4.52: Durch die Zugabe einer Kohlenhydratquelle zu konditioniertem KFW kann die Ausbeute an Biomasse und Paramylon im Vergleich zum nicht-supplementierten Versuche (Abb. 4.51) gesteigert werden. Sie bleibt dennoch weit hinter den in NL erreichten Ausbeuten zurück.

Tab. 4.6: Vergleich von BTM/PTM, μ , t_d und P_t aus Versuchen in NL und KFW mit Zugabe an Glucose als primäre Kohlenhydratquelle. Zur Berechnung von μ und P_t wurde jeweils die Startbiomasse und die maximale Biomasse verwendet! In NL ist in allen Fällen ein besseres Wachstum festzustellen.

NL _{Glucose}	BTM (g/l)	PTM (g/l)	μ [h ⁻¹]	t_d [h]	P_t [kg m ⁻³ h ⁻¹]
15 g/l	12,58	6,7	0,0275	25,23	0,131
20 g/l	13,3	9	0,0281	24,71	0,139
25 g/l	18	10,8	0,0312	22,21	0,188
30 g/l	15,46	6,7	0,0296	23,4	0,161

KFW _{Glucose}	BTM (g/l)	PTM (g/l)	μ [h ⁻¹]	t_d [h]	P_t [kg m ⁻³ h ⁻¹]
15 g/l	5	3,1	0,0179	38,8	0,052
20 g/l	5,9	4,2	0,0196	35,39	0,061
25 g/l	5,42	3,1	0,0187	37,06	0,056
30 g/l	5,5	2,9	0,0189	36,76	0,057

Durch die Zugabe von Glucose zum Medium (Abb. 4.52) konnte eine Erhöhung der Ausbeute an BTM und PTM erzielt werden. Wie aus Tabelle 4.6 deutlich wird, konnte die Ausbeute an Biomasse und Paramylon im Vergleich zum nicht supplementierten KFW (Abb. 4.51) um das bis zu 2,5-fache gesteigert werden. Dazu mussten jedoch 20 g/l Glucose zum KFW gegeben werden, was im Vergleich zum definierten Medium nur zu einer Ausbeute an Biomasse von 44 % des vergleichbaren Wertes in NL führte. Eine Supplementierung des KFW mit einer zusätzlichen Kohlenhydratquelle kann deshalb als sinnvoll angesehen werden. Es scheint jedoch, dass die vorgelegte Glucose nicht gut in Biomasse, respektive Paramylon umgesetzt wird, sondern hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels des Organismus verwendet wird, ohne dass vergleichbar zum definierten Medium mit mehr Glucose mehr Biomasse / Paramylon aufgebaut wird. In Tabelle 4.6 spiegelt sich das auch gut in den erreichten Ausbeuten begleitenden Werten für die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, die Verdopplungszeit und die Produktivität wieder. Die Produktivitäten in definiertem Medium sind um das bis zu dreifache höher als die im supplementierten KFW erreichten Werte. Auch in der Verdopplungszeit ist dies gut wiederzuerkennen.

In Tabelle 4.6 sind die Werte hervorgehoben worden, bei der die höchsten Ausbeuten erzielt werden konnten. Angenommen wurde, dass sich die Maximalwerte, sowohl in NL als auch in KFW, bei den gleichen Glucosekonzentrationen finden lassen würden. Sieht man sich nun nur die absoluten Werte an, so zeigt sich, dass in NL die Maximalwerte bei 25 g/l Glucose zu finden sind, in KFW aber die Maximalwerte bei 20 g/l Glucose zu finden sind. Der auf den ersten Blick unlogisch erscheinende Aspekt kann aber schnell mit Blick auf Tabelle 4.6 aufgeklärt werden. In dem hier verwendeten KFW ist eine Glucosekonzentration von ca. 1,52 g/l nachzuweisen, begleitet von einer Fructosekonzentration von ca. 3,5 g/l. Somit enthält das in diesen Experimenten verwendete KFW schon im konditionierten, nicht mit Glucose supplementierten Zustand eine Kohlenhydratkonzentration von ungefähr 5 g/l. Da *Euglena gracilis* auch in den Lage ist Fructose aufzunehmen und in den Stoffwechselweg einzuschleusen (Gluconeogenese, Abb. 2.4) kann also auch diese zusätzliche Kohlenhydratquelle ohne weiteres genutzt werden. Daraus ergibt sich, dass die Daten, die bei einer Glucose-Supplementierung von 20 g/l in KFW ermittelt wurden mit denen in definiertem Medium mit 25 g/l zu vergleichen sind. Dies wiederum ergibt eine gute Übereinstimmung mit den schon in Kapitel 4.1 erzielten Erkenntnissen, dass *Euglena gracilis* für eine maximale absolute Paramylonausbeute am besten bei einer Glucosekonzentration von 25 g/l wächst. Dass es bei gleicher Kohlenhydratkonzentration nicht zu annähernd gleichen Ergebnissen in KFW kam war unerwartet und wurde weiter untersucht.

Da ein Einfluss der Inokulationsdichte auf die Fermentation bisher nicht untersucht wurde, sollte nun noch überprüft werden, ob eine Änderung der Animpfdichte die Ausbeute in KFW beeinflussen würde. Animpfdichten zwischen 2 ml und 8 ml je 100 ml KFW-Medium wurden gewählt.

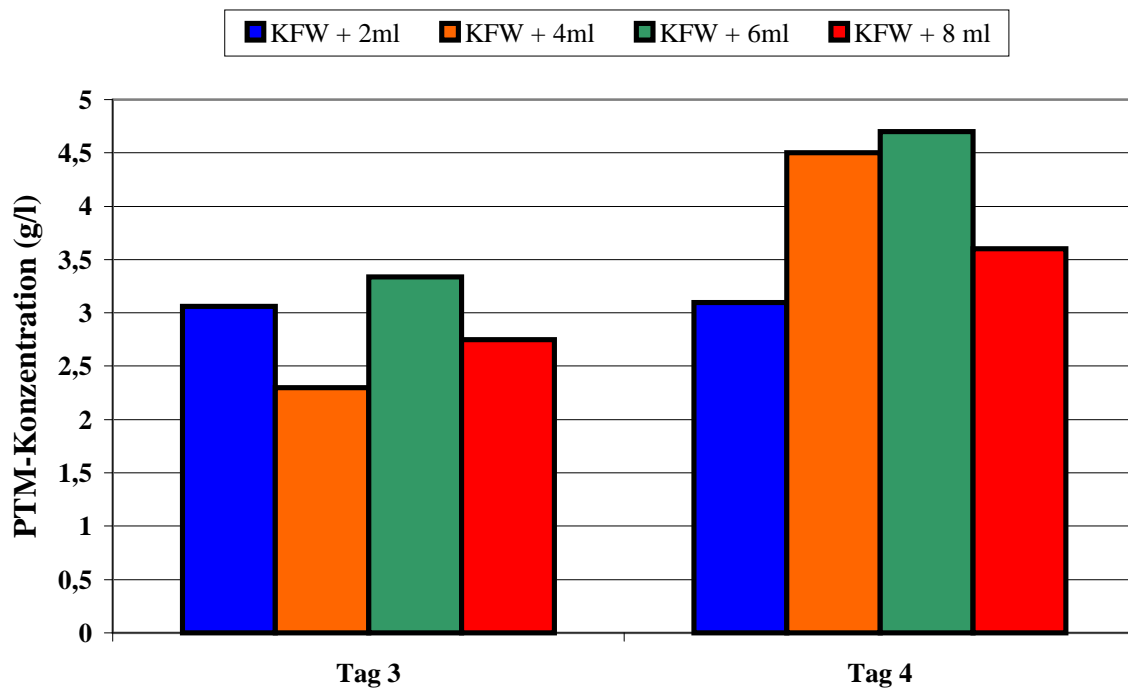


Abb. 4.53: Einfluss der Animpfdichte auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in KFW_{2n} mit 15 g/l Glucose. Dargestellt sind die Paramylonausbeuten am dritten und vierten Versuchstag (Maximalwerte).

Wie auch schon bei den Experimenten mit definiertem Medium beeinflusst die Animpfdichte die Ausbeute an PTM. Es konnte gezeigt werden, dass in den über 96 Stunden laufenden Experimenten sich ein Inokulum zwischen 4 und 6 ml auf 100 ml Medium als am sinnvollsten darstellte (Abb. 4.53). Alle weiteren Versuche wurden deshalb auch weiterhin mit 5 ml Stammsuspension auf 100 ml Medium angeimpft, was einem Inokulum von 4,8 % entspricht.

4.2.2 Verdünnung des KFW

Da bei gleichen Voraussetzungen hinsichtlich der Glucosekonzentration in KFW trotzdem keine einigermaßen ähnlichen Ergebnisse erzielt werden konnten wie in NL, wurde die Zusammensetzung des KFW näher betrachtet. Dabei fielen zunächst die relativ hohen Werte für einige Inhaltsstoffe des KFW (Tabelle 1.1 und Abbildung 4.47) auf. Ein Einfluss so hoher Mengen an Aminosäuren und Nährstoffen konnte nicht ausgeschlossen werden, weshalb die Überlegung angestellt wurde das KFW mit demineralisiertem Wasser zu verdünnen, um möglichst keine weiteren Ionen bei der Verdünnung einzutragen. Dazu wurde das KFW zunächst in Fünferschritten verdünnt. Durch die Ermittlung der Osmolalität wurde sichergestellt, dass sich die Verdünnung auch proportional in der Osmolalität wiederfinden lässt. Das verwendete KFW wurde mit 25 g/l Glucose supplementiert.

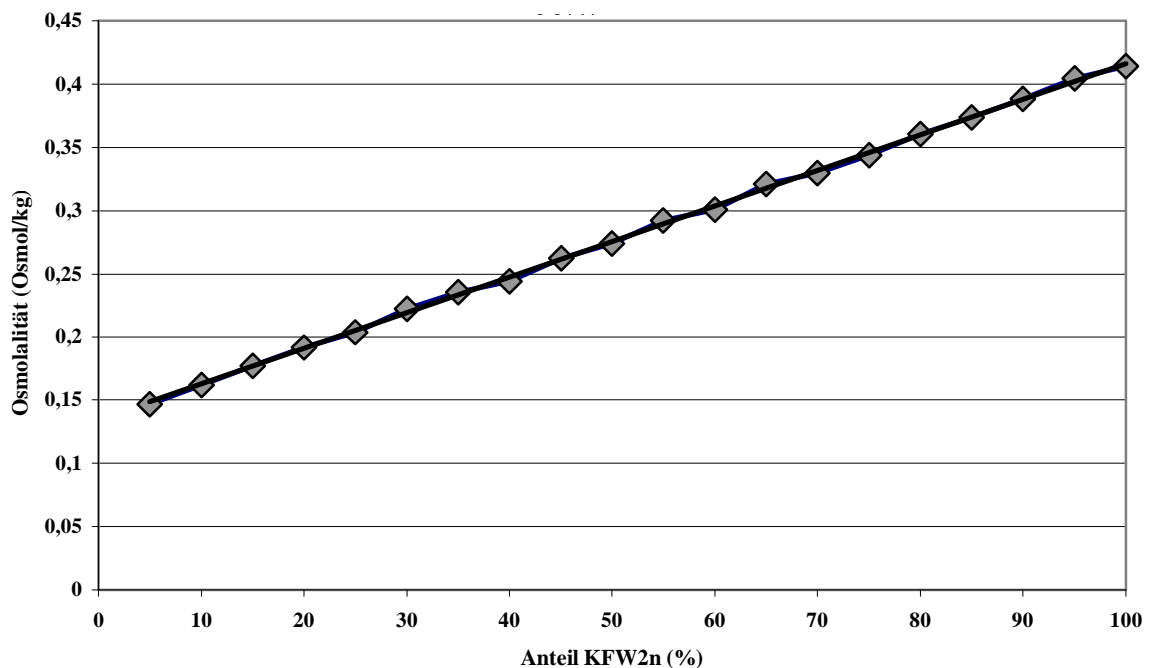


Abb. 4.54: Osmolalität von verdünntem KFW mit einer Glucosesupplementierung von 25 g/l.

Die in Abbildung 4.54 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass alle Inhaltsstoffe gleichmäßig verdünnt wurden und somit eine Abnahme der hohen Konzentrationen an einigen Stoffen verringert werden konnte. Die aus Abbildung 4.54 scheinbar für deionisiertes Wasser (KFW_{2n}-Anteil = 0 %) hervorgehende Osmolalität von 0,1345 Osmol/kg lässt sich leicht durch die dem KFW zugesetzte Glucose erklären, die natürlich auch einen Einfluss auf die Osmolalität ausübt.

Durch diesen Verdünnungsversuch konnte nachgewiesen werden, dass sich das verwendete KFW ohne weiteres samt seiner Inhaltstoffe in Bezug auf die gemessene Osmolalität linear verdünnen ließ.

In einem Versuchsdesign sollte geklärt werden, bei welcher KFW- und Glucosekonzentration die größte Ausbeute an Paramylon zu erzielen wäre. Mit Hilfe des Software-Pakets MODDE 6.0 wurde mit einem RSM (Response Surface Modelling) und einer D-optimalen, quadratischen Funktion eine Modellierung von Experimenten zur Optimierung der Ausbeute an Paramylon aus *Euglena gracilis* in den Temperaturbereichen 25 °C, 27,5 °C und 30 °C angestrebt. Als Variablen dienten neben der Konzentration an KFW_{2n} die Glucosekonzentration und der Start-pH-Wert. Der Start-pH-Wert wurde ausgewählt, da der pH des KFW mit einem Wert zwischen 5 und 5,5 um bis zu zwei Einheiten höher lag als dies im definierten Medium (optimaler pH-Bereich für das Wachstum von *Euglena gracilis*) der Fall ist. Die Versuchsdauer wurde auf 5 Tage festgelegt. Erfahrungen aus vorhergehenden Versuchen hatten gezeigt, dass eine längere Versuchsdauer nicht von Nöten ist, da die verwertbaren Nährstoffe und die vorhandene Glucose bis zum fünften Versuchstag meist vollständig aufgenommen wurden.

Bei den drei verwendeten Temperaturbereichen wurden folgende, in Tabelle 4.7 dargestellten unabhängigen Parameter ausgewählt: die Glucosekonzentration im Medium, der Anteil des KFW am Medium und der eingestellte pH-Wert zum Start der Versuche.

Tab. 4.7: Versuchsparameter für die drei Temperaturbereiche von 25 °C, 27,5 °C und 30 °C, die mit MODDE optimiert wurden.

25 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)	Start-pH
1	20	25	4,3
2	20	48,6	3
3	20	75	5
4	26,7	25	3
5	33	75	5
6	40	25	5
7	40	75	3
8	40	75	4,3

27,5 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)	Start-pH
1	20	25	5
2	20	50	4
3	20	75	3
4	30	50	3
5	30	50	5
6	33	42	5
7	40	25	3
8	40	58	4
9	40	75	5
30 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)	Start-pH
1	20	25	3
2	20	58	3
3	20	75	5
4	27	25	5
5	33	75	3
6	40	25	4,3
7	40	42	3
8	40	58	5
9	40	75	3,67

Folgende Parameter wurden an allen Versuchstagen gemessen:

- Glucose-Konzentration,
- pH-Wert,
- Biotrockenmasse (BTM) und
- Paramylontrockenmasse (PTM)

Die kompletten Grafiken zu den folgenden Versuchen finden sich im Anhang in Kapitel 7. Auf den nächsten Seiten sind die 3D-Grafen der maximalen Ausbeuten an Biomasse und Paramylon dargestellt.

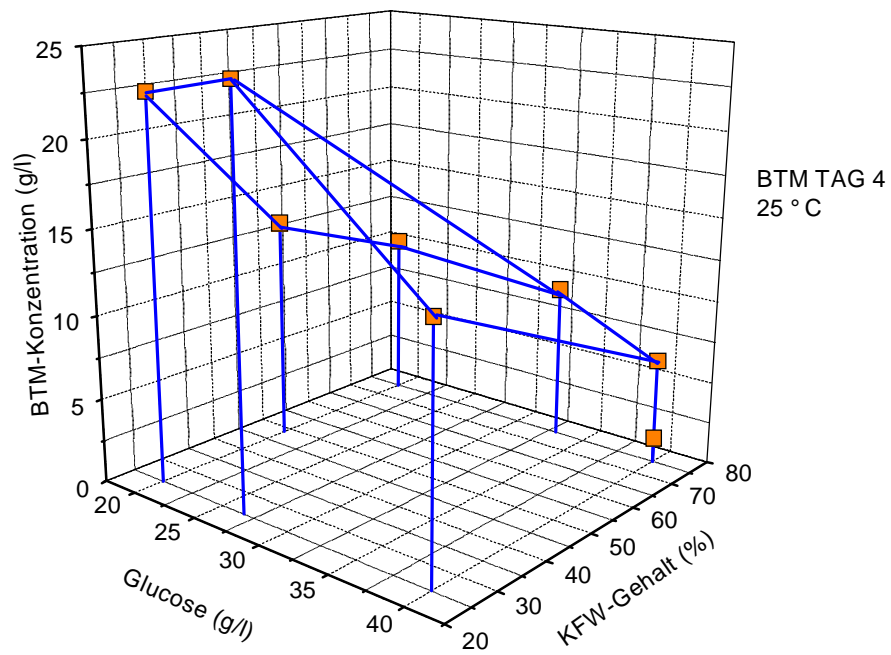


Abb. 4.55: Biotrockenmasse am vierten Tag der Fermentation bei einer Kultivierung bei 25 °C.

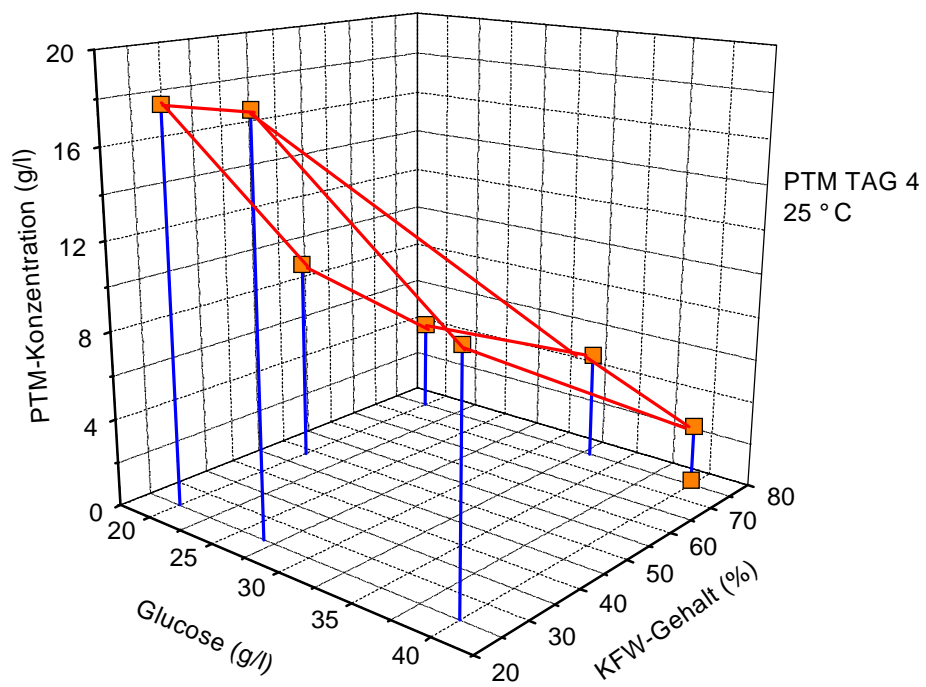


Abb. 4.56: Paramylontrockenmasse am vierten Versuchstag der Fermentation.

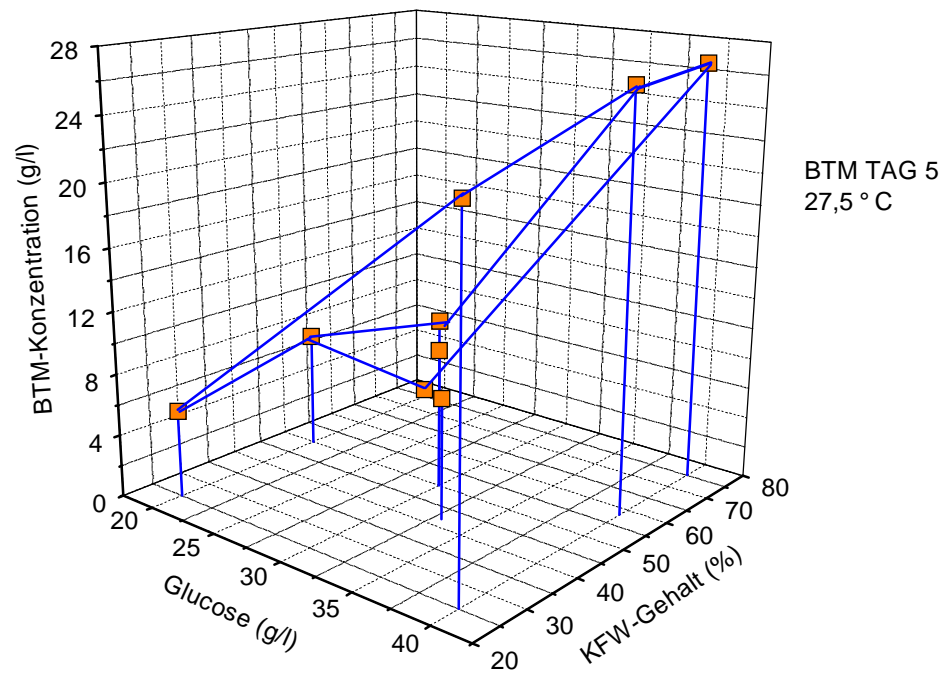


Abb. 4.57: Biotrockenmasse am fünften Versuchstag der Fermentation bei einer Kultivierung bei 27,5 °C.

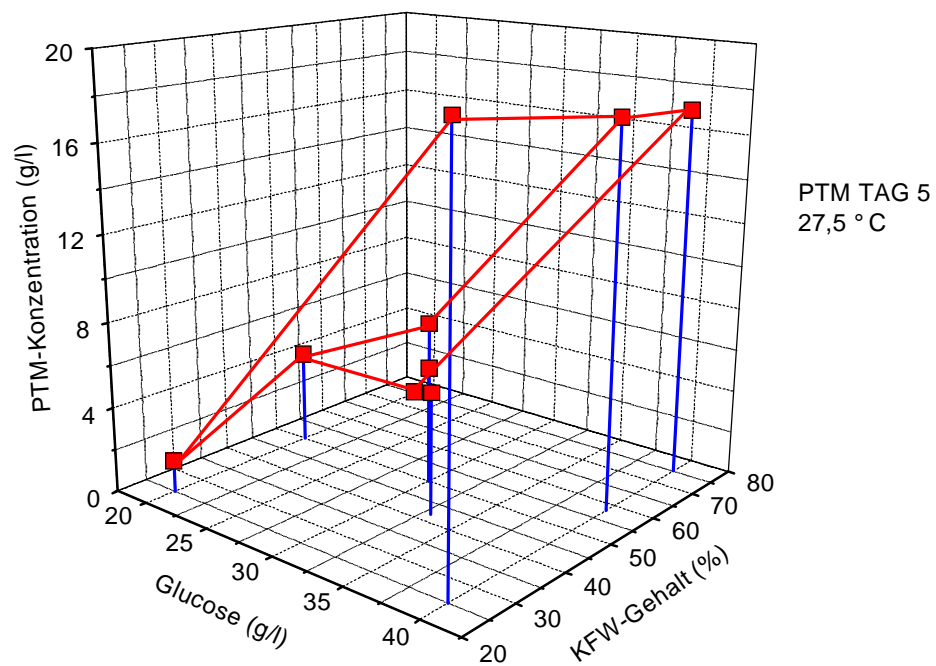


Abb. 4.58: Paramylontrockenmasse am fünften Tag der Fermentation bei 27,5 °C.

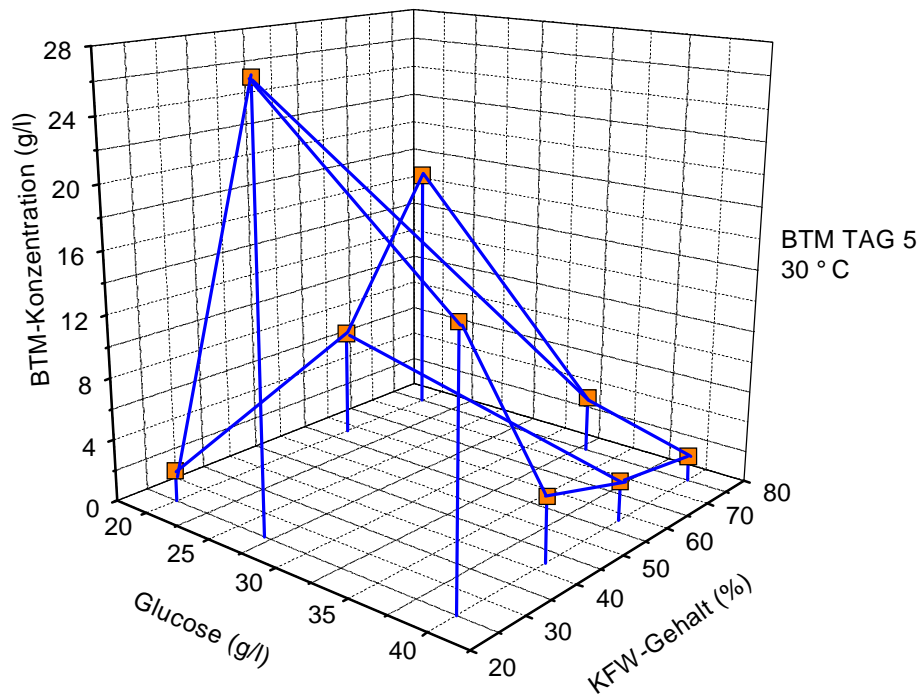


Abb. 4.59: Biotrockenmasse nach fünf Tagen Fermentation bei einer Kultivierung bei 30 °C.

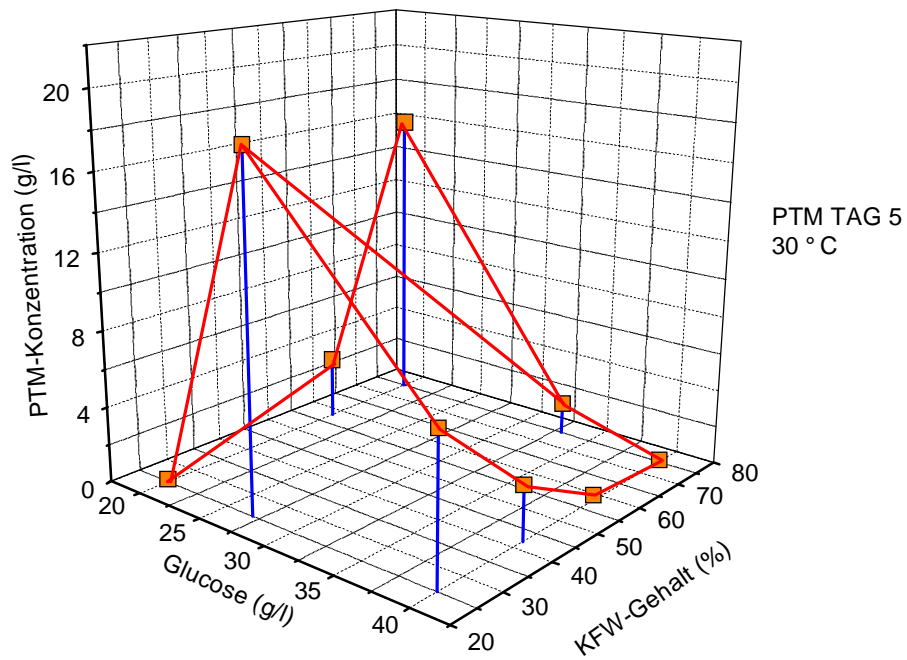


Abb. 4.60: Paramylontrockenmasse nach fünf Tagen bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C.

In 16 der 26 Versuche wurde eine starke Abnahme der Glucose-Konzentration bis zum 3. bzw. 4. Tag des Versuch festgestellt. Nahezu die gesamte Glucose wurde bis zu diesem Zeitpunkt von *Euglena gracilis* aufgenommen, was auch durch eine gesteigerte PTM-Konzentration in den Zellen am nächsten Versuchstag festgestellt werden konnte. In zehn Versuchen konnte ein nur geringes Wachstum festgestellt werden, was daraus resultierend auch nur zu einer geringen Abnahme der Glucose-Konzentration führte.

Im Rahmen dieses Versuches zeigte sich, dass eine BTM zwischen 23 g/l (25 °C, Tag 4) und 27 g/l (30 °C, Tag 5) und eine PTM zwischen 17 g/l (25 °C, Tag 4) und 18 g/l (27,5 °C und 30 °C, Tag 5) als Maximum erreichen konnte.

Die 3D-Darstellung der erzielten Daten lassen, wenn man die entstehenden Oberflächen betrachtet eine gewisse Deutung der Ergebnisse zu. In Abbildung 4.55, respektive 4.56 zeigt sich bei einer Bruttemperatur von 25 °C bei der Beobachtung der Oberflächenstruktur eine Fläche, die von niedrigen KFW-Konzentration im Medium zu hohen Konzentrationen hin abfällt. Die Glucose-Konzentration an sich hat dabei auch einen, wenn auch geringeren Einfluss auf die Ausbeute. Es zeigt sich jedoch, dass bei niedrigem KFW-Gehalt des Mediums mittlere, bzw. niedrige Glucose-Konzentrationen zu höheren Ausbeuten führten.

Bei einer nur um 2,5 °C höheren Bruttemperatur von 27,5 °C zeigte sich jedoch ein ganz anderes Bild. Die in den Abbildungen 4.57 und 4.58 dargestellten 3-D-Graphen sehen von ihrer Oberflächenstruktur wie eine Spiegelung der Werte bei 25 °C aus. Hier ist das Maximum der Ausbeuten bei hohen KFW-Gehalten und hoher Glucose-Konzentration des Mediums festzustellen. Bei niedrigen bis mittleren Glucose-Konzentrationen kommt es nur zu geringen Ausbeuten. Anders als bei den Versuchen bei 25 °C sind hier aber auch die maximalen Ausbeuten erst nach 120 Stunden erreicht worden, also ca. 24 Stunden später.

Bei 30 °C zeigt sich nun eine Oberflächenstruktur (siehe Abb. 4.59 und 4.60), die mit den beiden vorherigen auf den ersten Blick keine Gemeinsamkeiten hat. Die niedrigsten Ergebnisse sind bei hohem KFW-Gehalt und hoher Glucose-Konzentration des Mediums zu finden, jedoch auch bei der niedrigsten Glucose-Konzentration und niedrigem KFW-Gehalt. Die Maximalwerte der Ausbeute liegen bei niedrigem KFW-Gehalt und mittleren bis hohen Glucose-Konzentrationen des Mediums. Ein vergleichsweise hoher Wert bei niedriger Glucose-Konzentration und hohem KFW-Gehalt macht es jedoch schwer die so erhaltene Oberflächenstruktur eindeutig zu bewerten. Auch bei 30 °C konnte die maximale Ausbeute erst nach 120 Stunden erreicht werden.

Bisher wurden bei diesen 3D-Graphen lediglich die beiden Parameter Glucose-Konzentration und KFW-Gehalt gegen die erzielte Ausbeute als BTM/PTM aufgetragen und der eingestellte pH-Wert wurde außer acht gelassen.

Betrachtet man nun die erzielten Daten unter dem Aspekt der Ausbeuten, so ist in den unterschiedlichen Temperaturbereichen eine Schwankung der Ausbeuten zwischen 1 g und 24 g zu finden. Doch wie lassen sich diese starken Schwankungen erklären? Um diesem Problem auf den Grund zu gehen, wurden die gemessenen Daten absteigend nach dem Start-pH-Wert angeordnet. Auf Anhieb fallen hier klar die absteigenden Ausbeuten auf, hohe Ausbeuten treten eher bei pH-Werten von 5 auf und die niedrigsten werden bei pH 3 gefunden.

Betrachten wir zunächst die Daten bei 25 °C und sortieren diese nicht nach dem pH-Wert, sondern nach der Ausbeute. Dies ist in Tabelle 4.8 zu sehen.

Tab. 4.8: Darstellung der Ausbeute und der sie beeinflussenden Parameter bei 25 °C.

BTM (g/l)	Start-pH	Glucose-Konz. (g/l)	KFW-Verdünnung (%)
23,94	3	26,7	25
22,58	4,3	20	25
14,16	5	40	25
13,5	3	20	48,6
10,18	5	20	75
9,36	5	33	75
6,36	4,3	40	75
1,52	3	40	75

Bei dieser Anordnung fällt sofort ins Auge, dass der Start-pH-Wert nicht, wie eventuell zu erwarten gewesen wäre, mit der Ausbeute abnimmt. Es scheint bei dieser Art der Anordnung keinen direkten Zusammenhang zwischen Ausbeute und Start-pH-Wert zu geben. Betrachtet man die KFW-Verdünnung, so zeigt sich nun, dass die Ausbeuten mit dem Anstieg des KFW-Anteils im Medium abnehmen. Eine Berechnung des Maßkorrelationskoeffizienten nach Pearson bestätigt diese Hypothese mit einem r von $-0,866$. Das negative Vorzeichen von r ergibt sich aus der Steigung einer Geraden durch die Messpunkte (BTM gegen KFW, siehe auch Abbildung A) und deutet darauf hin, dass die Zunahme des einen Merkmals (BTM) mit der Abnahme des anderen (KFW-Verdünnung) einhergeht (KÖHLER, SCHACHTEL, VOLESKE, 1996).

Formel für die Berechnung des Maßkorrelationskoeffizienten r nach Pearson:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 * (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i) * (\sum y_i)}{n}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}) * (\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n})}}$$

- Wobei x_i der Messwert des Merkmals X_1 am i -ten Individuum,
 y_i der Messwert des Merkmals X_2 am i -ten Individuum,
 \bar{x} , (bzw. \bar{y}) das arithmetische Mittel von X_1 (bzw. X_2),
 n die Anzahl der Wertepaare,
 i der Laufindex von 1 bis n .

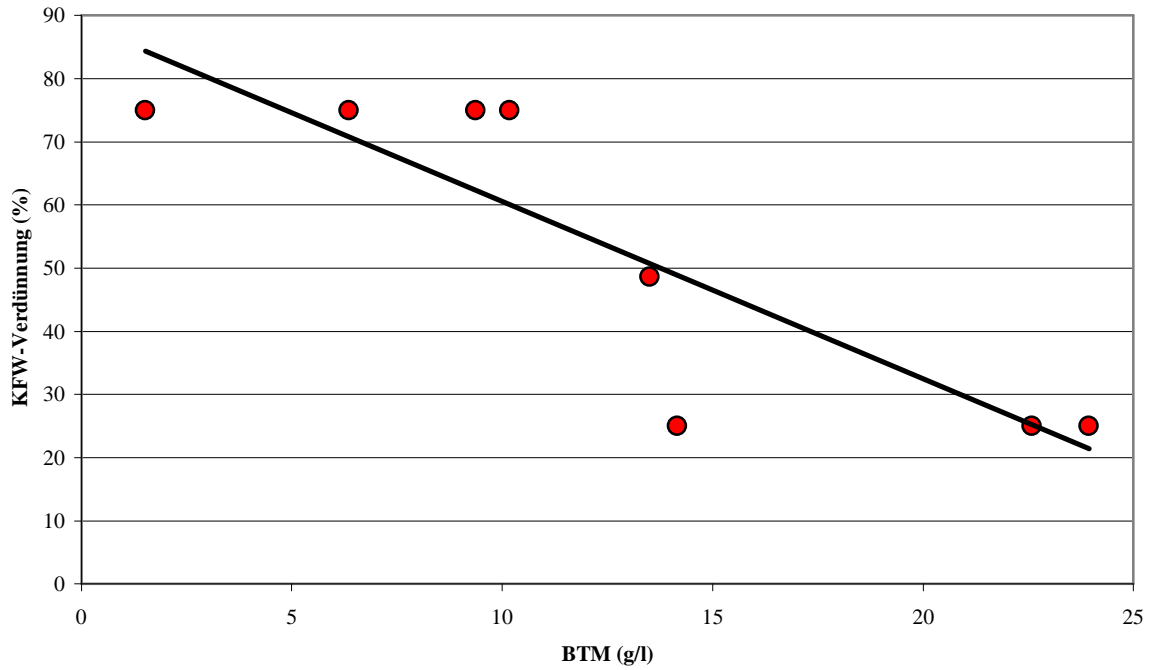


Abb. 4.61: Messdaten bei 25 °C, 96 Stunden. Mit der Abnahme des KFW-Gehalts im Medium nimmt die BTM zu.

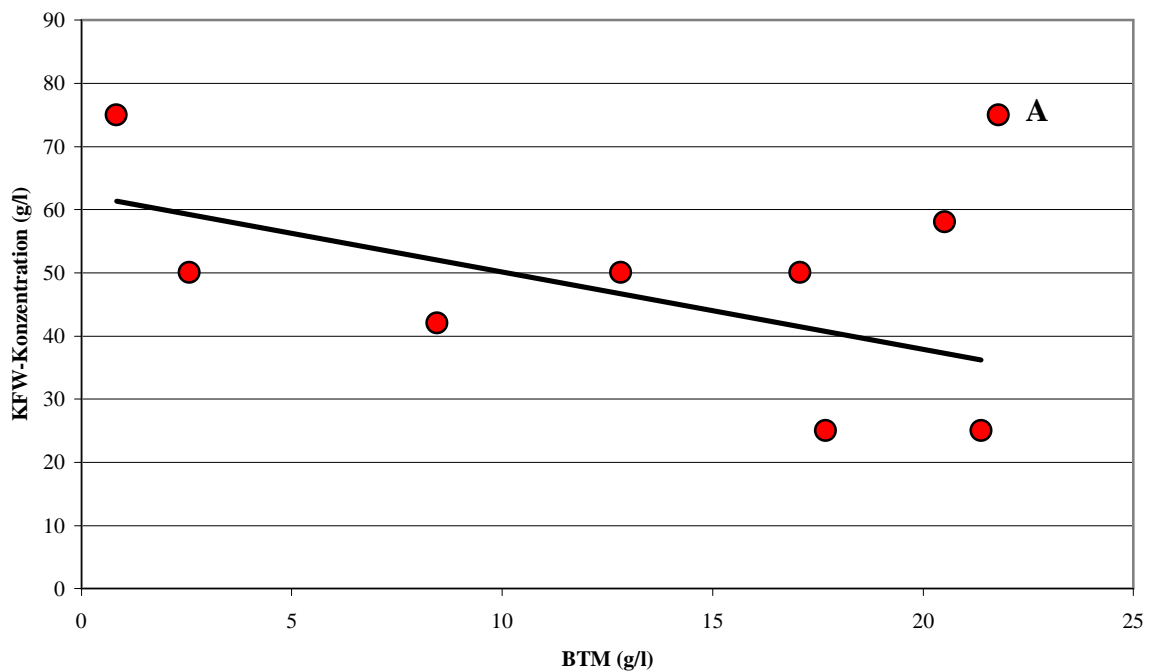


Abb. 4.62: Messdaten bei 27,5 °C, 120 Stunden. Der höchste BTM-Wert bei 75 % KFW, pH 5 und 40 g/l Glucose wurde hier bei der Ermittlung der Trendlinie außer acht gelassen (A).

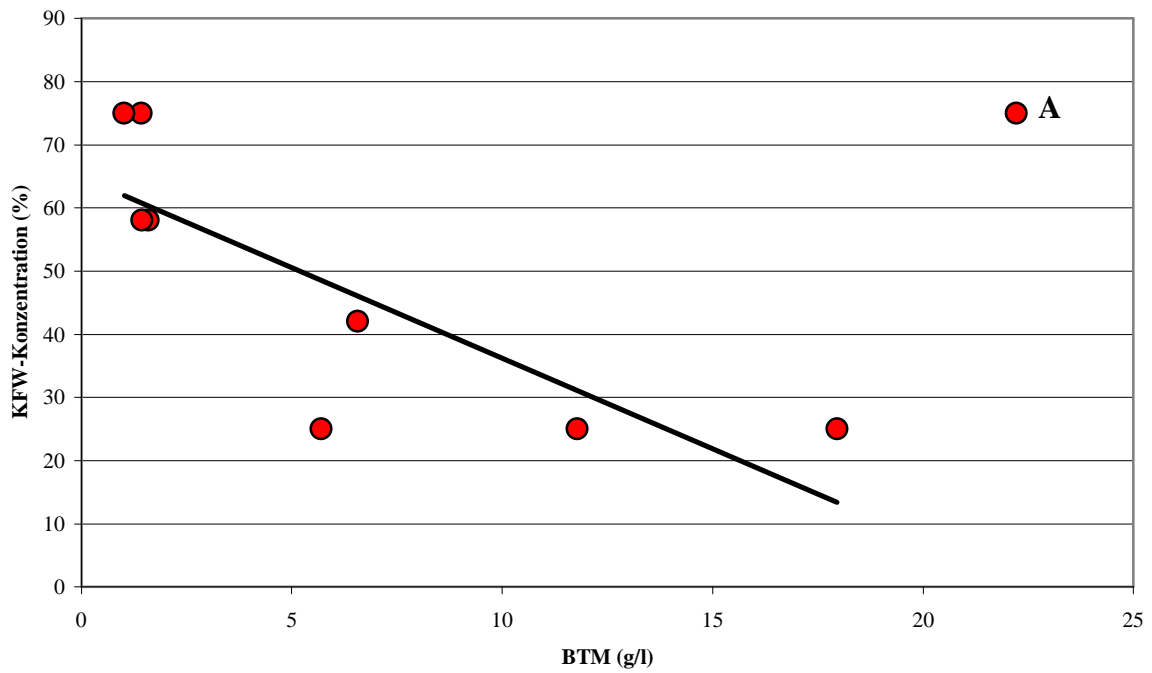


Abb. 4.63: Messdaten bei 30 °C, 120 Stunden. Das Wertepaar für den höchsten BTM-Wert (A) von 22,22 g/l bei einer KFW-Konzentration von 75 %, pH 5 und 20 g/l Glucose wurde auch hier nicht in die Ermittlung der Trendlinie einbezogen.

Tab. 4.9: Auflistung der Ergebnis aus dem modellierten Versuch bei 25 °C, sortiert nach aufsteigendem KFW-Anteil. Mit zunehmendem KFW-Anteil im Medium nimmt die Ausbeute an BTM ab.

	BTM	Start-pH	Glucose-Konz. (g/l)	KFW-Verdünnung (%)
I	14,16	5	40	25
	22,58	4,3	20	25
	23,94	3	26,7	25
	13,5	3	20	48,6
II	10,18	5	20	75
	9,36	5	33	75
	6,36	4,3	40	75
	1,52	3	40	75

Tab. 4.10: Daten aus dem modellierten Versuch bei 27,5 °C, sortiert nach aufsteigendem KFW-Anteil. Der Start-pH-Wert scheint einen höheren Einfluss auf die BTM zu haben als die Glucosekonzentration.

	BTM	Start-pH	Glucose-Konz. (g/l)	KFW-Verdünnung (%)
III	21,38	5	20	25
	17,68	3	40	25
	8,46	5	33	42
IV	17,08	4	20	50
	12,82	5	30	50
	2,56	3	30	50
V	20,52	4	40	58
	21,8	5	40	75
	0,84	3	20	75

Tab. 4.11: Auch die Daten bei 30 °C wurden nach aufsteigendem KFW-Anteil angeordnet. Hier zeigt sich, dass der größte Einfluss vom Start-pH-Wert ausgeht.

	BTM	Start-pH	Glucose-Konz. (g/l)	KFW-Verdünnung (%)
VI	17,96	5	27	25
	11,78	4,3	40	25
	5,7	3	20	25
	6,56	3	40	42
VII	1,6	4	40	58
	1,44	3	20	58
	22,22	5	20	75
VIII	1,42	3,67	40	75
	1,02	3	33	75

-
- I** Bei 25 °C zeigt sich, dass bei niedrigem KFW-Anteil im Medium, nicht korrigiertem pH-Wert und hoher Glucosekonzentration es zu einer vergleichsweise niedrigeren BTM-Ausbeute kommt als das bei auf pH 3 korrigiertem Medium der Fall war.
- II** Auch zeigt sich bei den Versuchen bei 25 °C, dass bei einem hohen KFW-Anteil im Medium, geringerer Glucosekonzentration und nicht korrigiertem pH-Wert eine für 75 % KFW-Anteil im Medium hohe BTM erzielt werden konnte. Auch ist klar zu erkennen, dass bei hohem KFW-Anteil, hoher Glucosekonzentration und auf pH 3 korrigiertem Medium eine schlechte Ausbeute zu erzielen war.
- III** Bei den Versuchen mit einer Bruttemperatur von 27,5 °C ist zu erkennen, dass sich auch bei niedrigen KFW-Konzentrationen der pH-Wert stark beeinflussend bemerkbar macht, denn hohe Glucosekonzentrationen im Medium führen nicht zu den erwarteten hohen BTM-Ausbeuten, sondern eher die niedrigen von 20 g/l.
- IV** Ein niedrigem eingestelltem pH-Wert bei mittleren KFW-Konzentrationen im Medium und einer mittleren Glucosekonzentration führt zu niedriger BTM-Ausbeute. Ein ‚mittlerer‘ pH-Wert und eine hohe Glucosekonzentration bei ‚mittlerem‘ KFW-Gehalt des Mediums führten zur höchsten BTM. Eine halb so hohe Glucosekonzentration führte jedoch zu ähnlich hohen BTM-Ausbeuten. Bei unverändertem pH-Wert (pH 5) führte eine ‚mittlere‘ Glucosekonzentration bei ‚mittlerer‘ KFW-Konzentration im Medium zu einer höheren BTM als bei etwas höherer Glucosekonzentration (33 g/l) und niedriger KFW-Konzentration (42% KFW).
- V** Hier konnte eine hohe BTM bei unverändertem pH-Wert (pH 5), hoher Glucosekonzentration und hohem KFW-Anteil im Medium erzielt werden. Jedoch wurde hier auch die niedrigste BTM gemessen, bei hohem KFW-Anteil, einem Start-pH von 3 und niedriger Glucosekonzentration.
- VI** Bei 30 °C zeigte sich, dass der eingestellte pH-Wert im Medium bei niedriger KFW-Konzentration (25 % KFW) einen höheren Einfluss auf die BTM hat, als die Glucose.
- VII** In diesem Bereich führten ein unveränderter pH-Wert und eine niedrigere KFW-Konzentration zu besseren Ergebnissen. In dem Fall, dass der KFW-Anteil relativ hoch (58 % KFW) und der eingestellte pH-Wert niedrig ist (pH 3), so scheint die vorgelegte Glucosekonzentration zu niedrig zu sein, um eine hohe BTM zu begünstigen.
- VIII** Bei hohem KFW-Anteil im Medium ist der Einfluss des Start-pH-Wertes auf die BTM-Ausbeute klar zu erkennen, der Einfluss der Glucosekonzentration scheint weniger wichtig zu sein.

Tab. 4.12: Pearson-Korrelationen der einzelnen Teilbereiche der Tabellen 4.9, 4.10 und 4.11.

25 °C		BTM/pH	BTM/Glucose
	<i>I</i>	-0,8438	-0,8943
	<i>II</i>	0,9941	-0,7583
27,5 °C			
	<i>III</i>	1	-1
	<i>IV</i>	0,2716	0,1125
	<i>V</i>	1	1
30 °C			
	<i>VI</i>	0,9845	0,3404
	<i>VII</i>	-0,4760	0,5236
	<i>VIII</i>	0,9496	-0,9328

Tab. 4.13: Pearson-Korrelationen der gesamten Datenmenge bei 25 °C, 27,5 °C und 30 °C.

	BTM/pH	BTM/Glucose	BTM/KFW
25 °C	-0,0838	-0,5743	-0,8661
27,5 °C	0,4981	0,3416	-0,2696
30 °C	0,8271	-0,3508	-0,2568

Aus Tabelle 4.13 lässt sich anhand der ermittelten r -Werte gut erkennen, dass sich die Abhängigkeiten vom Medium mit der Bruttemperatur stark verändert haben. Bei 25 °C hat die KFW-Konzentration im Medium einen klaren Einfluss. Mit zunehmendem KFW-Anteil im Medium nahm die Biomasseausbeute bei dieser Temperatur ab. Der negative Wert für r zeigt dies deutlich an. Auch die Glucosekonzentration im Medium zeigt eine schwach negative Korrelation zur ermittelten Biomasse, was durch den r -Wert von $-0,5743$ deutlich gemacht wird. Ein Einfluss des Start-pH-Wertes auf das Wachstum in dieser Versuchsanordnung konnte bei der Betrachtung der gesamten Daten bei 25 °C nicht festgestellt werden.

Bei 27,5 °C fällt die Betrachtung der Daten hinsichtlich einer Korrelation der unabhängigen Variablen Start-pH, Glucose und KFW bezogen auf die abhängige Variable BTM schwer. Zu erkennen ist, dass der pH-Wert im Medium zum Start des Versuchs mehr Einfluss aufweist, als das bei 25 °C der Fall war. Das ermittelte r von $0,4981$ zeigt eine schwache positive Korrelation zwischen dem pH-Wert und der BTM-Ausbeute an.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von KFW ist anzunehmen, dass das Medium eine hohe Pufferkapazität aufweist. Der pH-Wert des KFW beträgt etwa 5,15 und bleibt auch bei Verdünnung mit demineralisiertem Wasser einigermaßen konstant (siehe auch Tabelle 4.14). Um einen pH-Wert von 3 einzustellen, benötigt man auf 100 ml unverdünntem KFW 1,86 ml 1N H₂SO₄, bei 100 ml 75%-igem KFW immerhin noch 1,74 ml und bei 100 ml 35%-igem KFW nur noch 0,83 ml. Dies gibt zum einen die starke Pufferkapazität des KFW wieder, zum anderen zeigt es aber auch, dass mit steigendem KFW-Anteil im Medium bei einem eingestellten pH von 3 mehr 1N H₂SO₄ nötig ist, um den gewünschten pH-Wert zu erreichen. Daraus resultiert, dass bei hohem KFW-Gehalt des Mediums auch eine höhere Belastung an Sulfat zu finden ist.

Tab. 4.14: Benötigte Mengen an Schwefelsäure (1 N) in unterschiedlich konzentriertem KFW zur Einstellung eines pH-Wertes von ~3.

KFW-Gehalt (%)	Start pH-Wert	Ziel pH-Wert	Milliliter 1N H ₂ SO ₄ je 100 ml KFW
35	5,25	3,02	0,825
75	5,15	3,02	1,74
100	5,14	2,98	1,8575

Da der Sulfatgehalt bei dem in diesen Versuchen verwendeten KFW (Kampagne 2001) bei 800 mg/l lag, bedeutete dies für das 75%-ige KFW eine zusätzliche Sulfatbelastung nach der pH-Wert-Einstellung von 853 mg/l. Da in dem 75%-igen KFW schon 600 mg/l Sulfat vorhanden waren (75 % von 800 mg/l), ergab das eine Sulfatkonzentration in dem so eingestellten KFW von 1453 mg/l, respektive 1711 mg/l in 100%-igen KFW und 685 mg/l in 35%-igen KFW (Tabelle 4.15). Diese hohen Sulfatkonzentrationen bei 75 % und 100 % KFW führen sicherlich zu einer Beeinflussung des Wachstums von *Euglena gracilis* in KFW.

Tab. 4.15: Unterschiedliche KFW-Konzentrationen und der Sulfatgehalt bei einem pH-Wert von 3.

KFW-Gehalt (%)	Sulfat im KFW (mg/l)	Sulfat aus H ₂ SO ₄ (mg/l)	Gesamt-Sulfat (mg/l)
35	280	405	685
70	600	853	1453
100	800	911	1711

Durch die hohen Konzentrationen an Sulfat im Medium ist eine Reaktion mit im Medium vorhandenem Eisen(II)-Ionen nicht auszuschließen. Es entsteht das in wässrigen Lösungen gut lösliche Eisensulfat. Durch teilweise Oxidation mit Luftsauerstoff des Eisen(II)-sulfat

entsteht Eisen(III)-sulfat und somit ist das vorhandene Eisen(II) in Eisen(III) oxidiert worden und liegt nun in einer für *Euglena gracilis* nicht mehr verwertbaren Form vor.

Beim Vergleich dieser Konzentrationen an Sulfat im KFW-Medium mit den Sulfatkonzentrationen des definierten Mediums (Tabelle 4.16) fällt auf, dass im 100%-igen KFW eine 100 mal höhere Sulfatkonzentration vorliegt. 1711 mg Sulfat je Liter stehen hier 17,85 mg/l Sulfat in NL gegenüber und schon alleine diese Zahlenwerte machen einen möglichen Einfluss dieser immens erhöhten Sulfatkonzentration deutlich.

Tab. 4.16: Sulfathaltige Verbindungen im definierten Medium und der jeweilige Sulfatanteil. Insgesamt enthält NL eine Sulfatkonzentration von 17,85 mg/l.

Summenformel	Konzentration in NL (mg/l)	Konzentration SO ₄ (mg/l)
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ x 6 H ₂ O	21	10,4958
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	11	3,674
MnSO ₄ x H ₂ O	5,8	3,29614
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,24	0,082008
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,77	0,296681

An möglichen Einflussgrößen steht sicherlich der erhöhte osmotische Druck der von dieser relativ hohen Sulfatkonzentration ausgeht an erster Stelle. Sulfat liegt im KFW in erhöhter Konzentration als in den Zellen vor. Über die Zellmembran von *Euglena* entsteht ein sehr großer Gradientenunterschied zwischen dem umgebenden Medium und dem Zellinneren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nun weitere Versuchsparameter durch das Modellierungsprogramm MODDE 6.0 berechnet, um geringere Glucose-Konzentrationen als die bisher untersuchten abzuklären. Da sich in den Versuchen der ersten Reihe gezeigt hatte, dass eine pH-Einstellung zum Start keinen positiven Einfluss auf die Fermentation hatte, wurde dies in den weiteren Versuchen vernachlässigt. 17 weitere Versuche wurden entworfen und durchgeführt:

25 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)
1	10	50
2	10	23,3
3	16,7	10
4	23,3	10
5	30	50
6	30	10

27,5 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)
1	16,7	30
2	10	10
3	20	50
4	20	30
5	23,3	50
6	30	30

30 °C	Glucose (g/l)	KFW2n (%)
1	10	50
2	10	10
3	23,3	50
4	30	50
5	30	10

Diese Versuche ergaben folgende Maximalwerte bei einer Fermentation im Schüttelkolben:

Temperatur (°C)	BTM (g/l)	PTM (g/l)	Δt (h)
25	11	~ 7	96
27,5	23	~ 20	96
30	17,5	~ 13,5	96

Die besten Resultate konnten bei 27,5 °C mit 23,3 g/l Glucose in 50 % KFW2_n erzielt werden. Alle bisher vorgestellten Versuche beziehen sich auf 300 ml Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml und einer Silikonkappe, bewegt auf einem Kreisschüttler

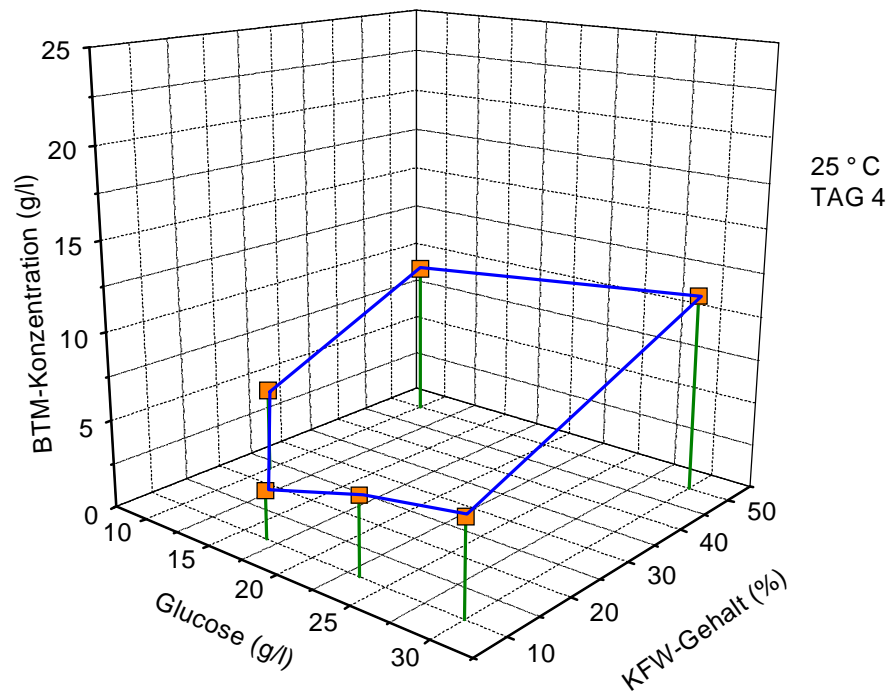


Abb. 4.64: Ergebnisse des erweiterten Versuchsschemas am 4. Tag der Fermentation bei 25 °C.

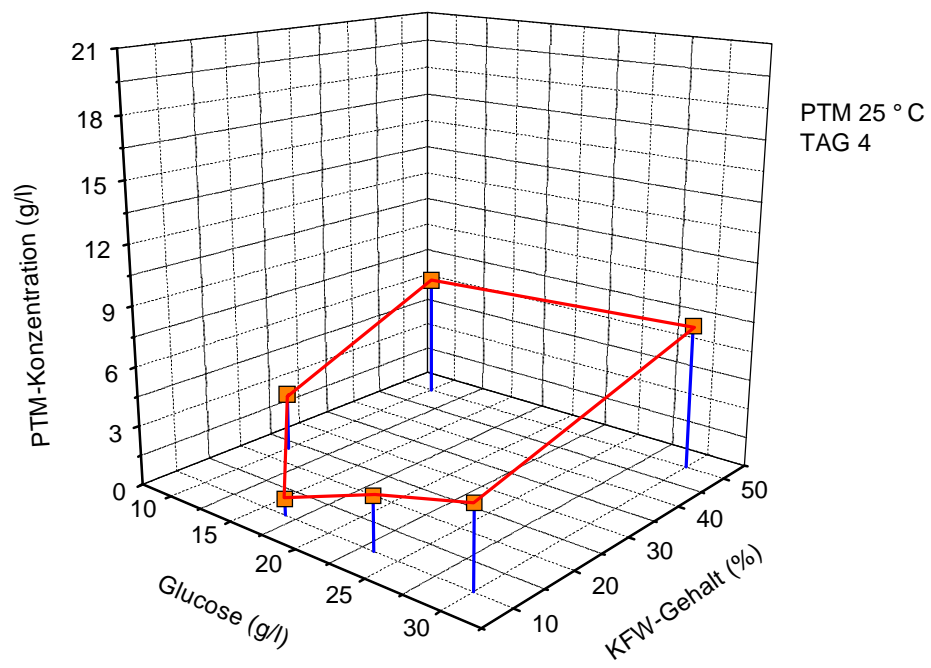


Abb. 4.65: Paramylon-Konzentration am 4. Versuchstag bei 25 °C.

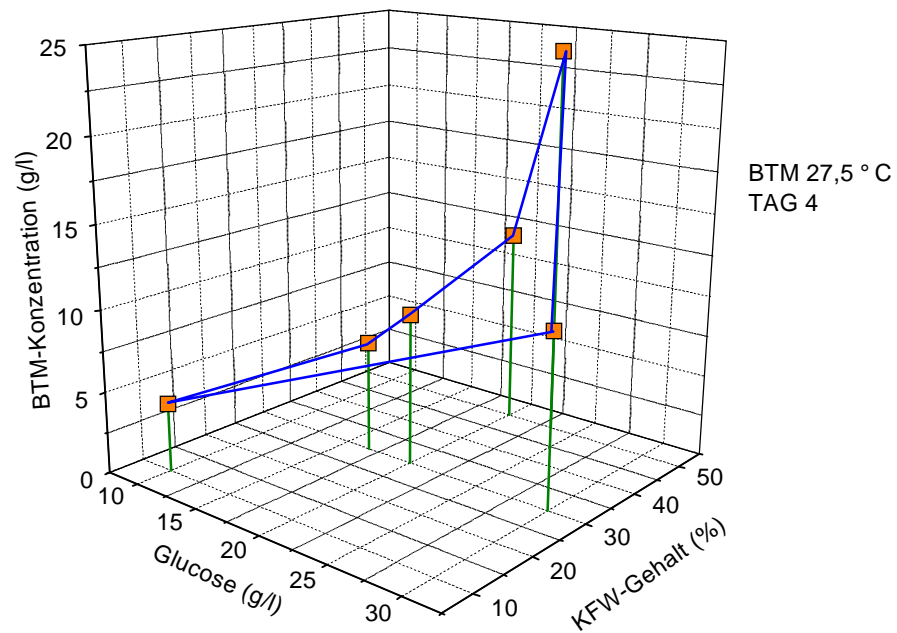


Abb. 4.66: Biotrockenmasse bei 27,5 °C. Maximale BTM bei 23,3 g/l Glucose und 50 % KFW.

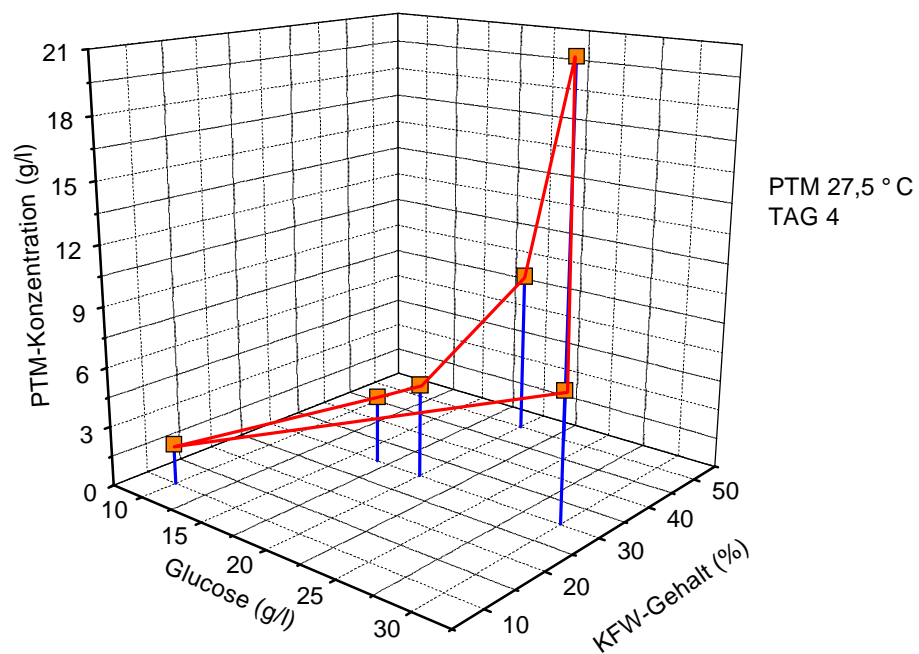


Abb. 4.67: Paramylontrockenmasse bei 27,5 °C. Auch die maximale PTM ist bei 23,3 g/l Glucose und 50 % KFW zu finden.

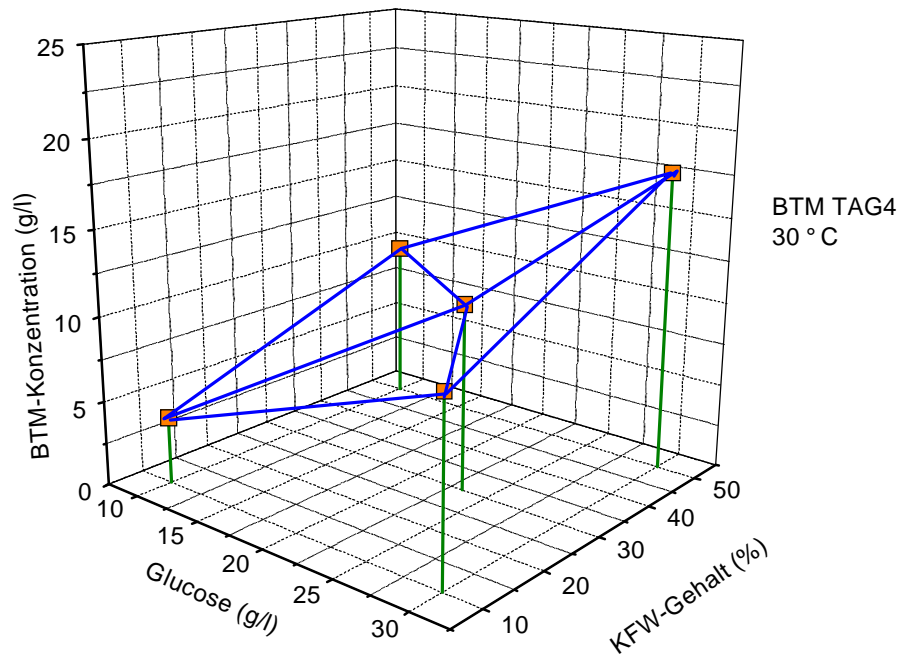


Abb. 4.68: Biotrockenmasse bei 30 °C. Hier liegt die maximale BTM bei 30 g/l Glucose und einem KFW-Gehalt von 50 %.

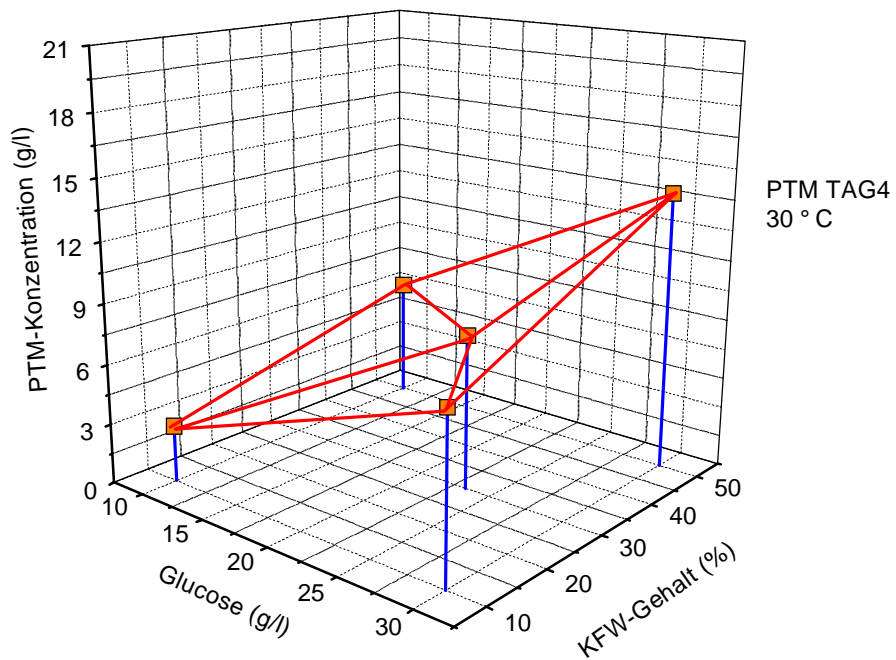


Abb. 4.69: PTM bei 30 °C. Die höchste Paramylonmasse liegt fast 7 g unter der bei 27,5 °C erreichten.

Der pH-Wert des KFW beträgt pH 5,4 und liegt damit um ca. 2 Einheiten höher als dies im definierten Medium der Fall ist. Versuche im Schüttelkolben und im Fermenter wurden mit einer Korrektur des Anfangs-pH-Wertes durchgeführt. Da ein Einfluss des höheren pH-Wertes in KFW auf das Wachstum von *Euglena gracilis* nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde in einem Experiment versucht, mit unterschiedlichen pH-Werten bei verschiedenen Glucose und KFW-Konzentrationen zu arbeiten.

Tab. 4.6: Einfluss des Start pH-Wertes auf das Wachstum von *Euglena* (COOK und MYERS, 1965) in NL.

pH	t _d (h)	Zellzahl (ml ⁻¹ x10 ⁶)
3	11,50	4,2
4	11,50	3,7
5	12	3,8
6	12	3,6
7	13	3,3
8	16	3,2
9	26	3,4

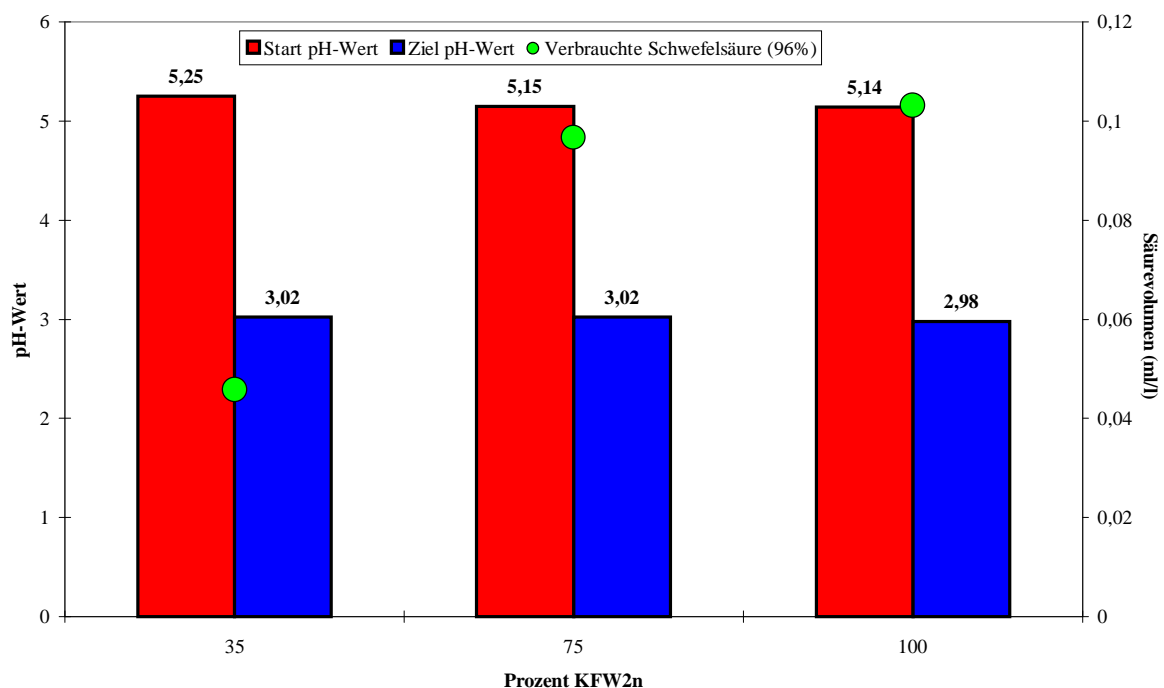


Abb. 4.70: Deutlich zeigt sich (grüne Punkte), dass mit der Abnahme der KFW-Verdünnung die Pufferkapazität zunimmt. Deshalb musste mehr Schwefelsäure eingesetzt werden, um den gewünschten pH-Wert einzustellen.

Aufgrund der recht großen Pufferkapazität von KFW musste jedoch relativ viel Säure zugegeben werden, was sich negativ auf das Wachstum auswirkte. Fermentationen ohne pH-Kontrolle/-Korrektur zeigten durchwegs bessere Ergebnisse auf, weshalb auch später in Batch, Fed-Batch und semikontinuierlichen Batches auf eine pH-Korrektur verzichtet wurde (siehe Abb. 4.70).

Aufgrund der Tatsache, dass sich das KFW im Laufe einer Kampagne und vor allem auch von Kampagne zu Kampagne stark in seiner Zusammensetzung verändert, wurde zum Ende des Untersuchungszeitraums eine weitere Versuchsreihe entworfen, um die bisher erzielten Daten zu bestätigen, bzw. zu erweitern. Als variable Größen wurden erneut die Konzentrationen an KFW und Glucose gewählt. Die Versuche wurden schon wie erwähnt in 300 ml Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml bei einer Bruttemperatur von 27,5 °C unter heterotrophen Bedingungen durchgeführt. Die Glucosekonzentrationen wurden dabei zwischen 12,5 und 43,75 g/l, die KFW-Gehalte des Mediums zwischen 25 und 87,5 % (siehe Tab 4.7) variiert.

Tab 4.7: Auflistung der Variablen Glucose und KFW-Gehalt.

Glucose _{Start} (g/l)	KFW (%)
12,5	25
25	25
37,5	25
18,75	37,5
31,25	37,5
43,75	37,5
12,5	50
25	50
37,5	50
18,75	62,5
31,25	62,5
43,75	62,5
12,5	75
25	75
37,5	75
18,75	87,5
31,25	87,5
43,75	87,5

Neben der Proben für die BTM/PTM-Bestimmung wurden noch die Glucosekonzentration, der pH-Wert, die Zellzahl und die SDW bestimmt. Diese erweiterten Parameter dienen

hauptsächlich der Kontrolle des Versuchsverlaufs und werden folgend nicht graphisch dargestellt, sondern gegebenenfalls erwähnt.

In Abbildung 4.71 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Mit dem in diesem Versuch verwendeten KFW der Kampagne 2002/2003 stellte sich heraus, dass bei Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab die maximale Ausbeute an BTM/PTM am fünften Versuchstag erzielt werden konnten. In Abbildung 4.71 sind die Daten der erzeugten Biomasse in einer 3D-Darstellung dargestellt.

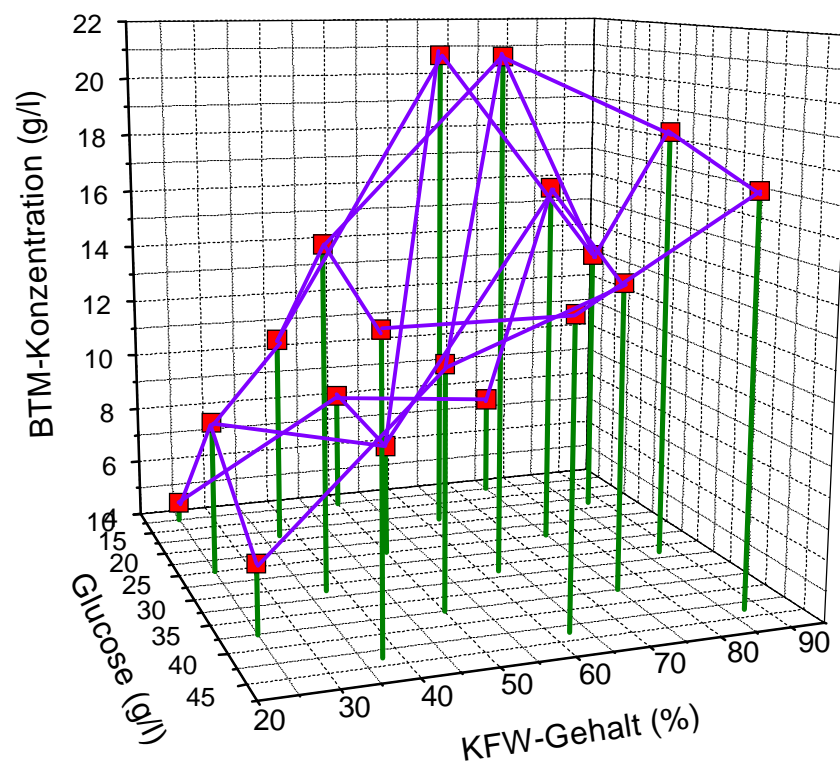


Abb. 4.71: Dreidimensionale Darstellung der Fermentationsdaten in KFW der Kampagne 2002/2003. Die Oberfläche zeigt ein deutliche Maximum bei mittleren KFW -Konzentrationen.

Wie schon zuvor bei den Versuchen mit dem KFW aus der Kampagne 2000/2001 zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass bei höheren KFW-Konzentrationen und mittleren Glucosekonzentrationen die höchsten Ausbeuten zu erzielen waren. Da der KFW-Anteil im Medium bei diesen neuen Versuchen erweitert wurde, konnten Daten gewonnen werden, die über den 50 % KFW des zweiten Versuchs lagen.

Tab. 4.8: Ergebnisse aus den Versuchen mit KFW der Kampagne 2002/2003.

Glucose _{Start} (g/l)	KFW (%)	BTM (g/l)
12,5	25	4,646
25	25	9,146
37,5	25	6,26
18,75	37,5	11,13
31,25	37,5	15,386
43,75	37,5	13,826
12,5	50	8,18
25	50	14,23
37,5	50	11,973
18,75	62,5	20,893
31,25	62,5	21,13
43,75	62,5	13,893
12,5	75	7,56
25	75	16,46
37,5	75	14,156
18,75	87,5	13,513
31,25	87,5	18,56
43,75	87,5	17,31

Die so erhaltenen Daten (Tabelle 4.8) zeigen deutlich an, dass man mit einer KFW-Konzentration von 62,5 % im KFW aus der Kampagne 2002/2003 und Glucosekonzentrationen zwischen 18,75 und 31,25 g/l die höchsten BTM-Ausbeuten erzielen konnte. Ein weiteres interessantes Ergebnis war, dass innerhalb einer KFW-Konzentration die Glucosekonzentration maßgeblich für die Ausbeute verantwortlich war. Das alleine ist nichts ungewöhnliches, betrachtet man sich jedoch Tabelle 4.8 genauer, dann fällt auf, dass jeweils die mittleren Glucosekonzentrationen der jeweiligen Versuche die höchsten Ausbeuten erzielten. Für die Versuche mit *Euglena gracilis* im KFW der Kampagne 2002/2003 waren Glucosekonzentrationen zwischen 25 und 31,25 g/l für die jeweils höchsten Ausbeuten verantwortlich.

Da die Zusammensetzungen des KFW stark von den verwendeten Kartoffelsorten und ihrer Lagerung bis zur Stärkegewinnung abhängig ist, war während einer Kampagne bei der Emslandstärke GmbH eine Veränderung der Inhaltsstoffe des KFW zu erwarten und ist auch festgestellt worden. Veränderungen dieser Art wirken sich direkt auf die weitere Verarbeitung des KFW zu Medium für die Fermentation von *Euglena gracilis* aus. Somit ist im Laufe einer Kampagne zu erwarten, dass sich bei gleichen Aufarbeitungsschritten des KFW zum fertigen

Medium die Ausbeute an BTM respektive PTM variiert. Aufgrund der Komplexität des Mediums ist eine Kontrolle der Konzentrationen der Inhaltsstoffe kaum möglich und die Varianz der Ausbeuten über eine Kampagne ist zu akzeptieren. Um während der kampagnefreien Zeit trotzdem mit KFW als Medium für die fermentative Gewinnung von Paramylon arbeiten zu können, können verschiedene Wege beschritten werden. Das Einfrieren großer Mengen an KFW erscheint für den Labormaßstab noch als sinnvoll, für einen Produktionsmaßstab aber jedoch nicht. Die Gefriertrocknung des konditionierten, noch nicht mit Glucose supplementierten KFW wurde ebenfalls in Betracht gezogen und die Ergebnisse im Wasser gelösten, lyophilisierten KFW zeigten ähnlich gute Ergebnisse wie das frische KFW. Auch hier ist wieder der Kostenfaktor der wichtigste Punkt gegen eine Verwendung der Gefriertrocknungstechnik. Alternativ zum KFW kann sicherlich PPL verwendet werden, die hier jedoch nicht dargestellten Ergebnisse zeigten jedoch, das dieses Konzentrat sich nur bedingt als Medium für die Fermentation von *Euglena gracilis* eignet. Eine Verwendung anderer, ganzjährig verfügbarer Abfallprodukte als Grundlage für ein Medium wurden ebenfalls untersucht und Truthahnextrakt als Beispiel für ein Fleischextrakt wurde untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse lagen jedoch weit unter den niedrigsten in KFW möglichen und auch diese Richtung wurde verworfen. Um eine ganzjährige Versorgung der Fermenter mit Medium zu gewährleisten empfiehlt sich, in der kampagnenfreien Zeit entweder nicht zu fermentieren oder aber die Zeit, in der KFW nicht zur Verfügung steht mit definierter Nährlösung (nach HUTNER) als Medium zu arbeiten.

Verschiedene Kohlenhydratquellen wurden auf ihren Einfluss auf das Wachstum von *Euglena gracilis* hin untersucht. Z. B. zeigte Laktose einen klaren Effekt auf die Zellteilungsrate, was sich jedoch nicht unbedingt positiv in der Biotrockenmasse (BTM) widerspiegelte (da viele kleine Zellen entstanden). Glucose zeichnete sich als effektivste Kohlenhydratquelle unter den untersuchten aus (Fructose, Laktose, Saccharose, Malat, lösliche Stärke, Galaktose, Mannose und Glucose). Für optimale Ausbeuten an BTM und PTM wurden zwischen 2 % und 4 % Glucose zugegeben. Es zeigte sich, dass höhere Glucosekonzentrationen eher einen negativen Einfluss auf das Wachstum hatten (osmotischer Wert der Glucose im Medium ↔ in der Zelle). Im Fermenter konnte am Besten mit einer Glucosekonzentration von 25 g/l (→ 2,5 %) gearbeitet werden.

4.2.3 Einfluss der essentiellen Vitamine B₁ und B₁₂ auf das Wachstum

Da bekannt war, dass *Euglena gracilis* für ein heterotrophes Wachstum die beiden Vitamine B₁ und B₁₂, auch als Thiamin und Cyanocobalamin bekannt, benötigt wurden diese zugesetzt, da die Konzentrationen im KFW unbekannt waren. Die Zugabe an Vitamin B₁₂ ergab eine leichte Steigerung der Ausbeute. Da die verwendeten Vitamine relativ teuer sind, wurde nach Alternativen gesucht. Hierzu wurden Hefeextrakt (HE), Molke und Corn Steep Liquor (CSL) verwendet, da sie als preiswerte Zusatzstoffe für Fermentationen aus der Literatur bekannt sind und einen relativ hohen Anteil an den gesuchten Vitaminen bieten.

Im definierten Medium wird *Euglena gracilis* die benötigte Menge an Vitaminen zur Verfügung gestellt, womit ein normales, nicht durch Vitaminmangel limitiertes Wachstum möglich ist. Versuche mit einer höheren Vorlage an Vitaminen werden nun folgend dargestellt.

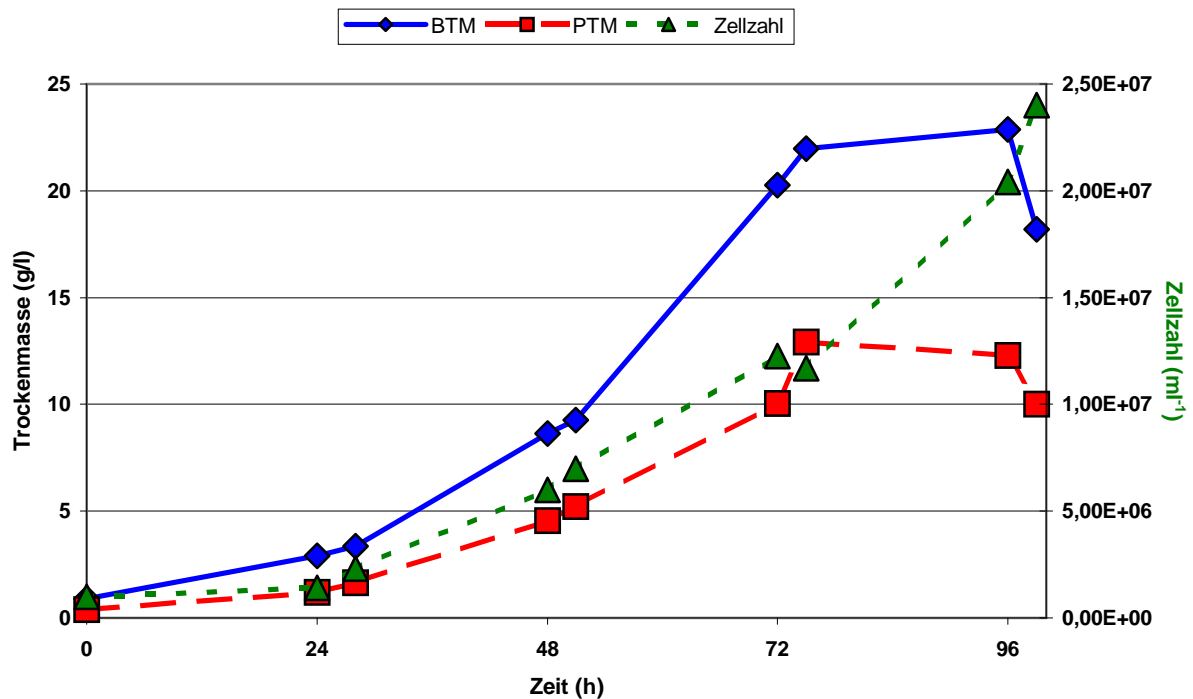


Abb. 4.72: Einfluss einer Vitamin B₁₂-Vorlage, die doppelt so hoch war wie in definiertem Medium, Doppelbestimmung.

Die Auswirkung einer Zugabe von Vitamin B₁ konnte in den Versuchen nicht nachgewiesen werden, weshalb diese Ergebnisse auch hier nicht dargestellt werden. Der Versuch, der in Abbildung 4.72 dargestellt ist, wurde bei 27.5 °C in NL mit 25 g/l Glucose durchgeführt.

4.2.4 Einfluss von alternativen Vitaminquellen auf das Wachstum

Wie schon die Versuche mit NL als Medium gezeigt haben, hat die Menge der vorhandenen Vitamine B₁ und B₁₂ einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von *Euglena*. In einigen Versuchen in KFW wurde ebenfalls eine Supplementierung des Mediums mit Vitaminen vorgesehen. Der positive Einfluss auf das Wachstum in KFW konnte wieder beobachtet werden. Da die beiden benötigten Vitamine jedoch aus ökonomischen Gründen nicht unbedingt eingesetzt werden sollten (hohe Kosten), wurde nach anderen Stoffgemischen mit einem hohen Anteil an den gewünschten Vitaminen gesucht. Dabei zeigten sich drei alternative Vitaminquellen als nachforschenswert: CSL (Corn steep liquor), Hefeextrakt (HE) und Molke.

Zuerst eine kurze Definition der Produkte und ihrer Herkunft:

Molke-Trockenpulver: Süßmolke wurde von der Firma Brackmann, Deutschland, mit einem Vitamin B₁-Gehalt von 8 mg / 100 g und einem Vitamin B₁₂-Gehalt von 5 mg / 100 g verwendet. Da Molke einen relativ hohen Anteil an Protein enthält, musste dieser Anteil zunächst durch Hitzeokoagulation entfernt werden. Die nun klare Flüssigkeit wurde dann über einen Sterilfilter dem Medium zugefügt.

Hefeextrakt: Verwendet wurde ein Hefeextrakt der Firma OHLY, Deutschland. Das Hefeextrakt (HE) wurde bei der Medienbereitung zugegeben.

Tab. 4.9: Vitamin- und Mineralzusammensetzung von Hefeextrakt der Firma OHLY.

Vitamine (je 100 g)	Mineralien (je 100 g)
Thiamin – B ₁ : 3 mg	Kalzium 120 mg
Riboflavin – B ₂ : 11,9 mg	Magnesium 200 mg
Niacin: 68 mg	Kalium 3,3 g
B ₆ : 2,3 mg	Natrium < 0,5 g
Folsäure: 3,1 mg	Eisen 5 mg
Ca-Pantothenat: 30 mg	Phosphor 1,8 g
Biotin: 0,25 mg	

Tab. 4.10: Aminosäurezusammensetzung des Hefeextrakts der Firma OHLY.

Aminosäuren	% im Produkt	% freie Aminosäuren im Produkt
Asparaginsäure	6,66	2,49
Threonin	3,20	2,02
Serin	3,28	2,35
Glutaminsäure	9,18	6,01
Glycin	3,17	1,11
Alanin	5,53	4,78
Cystein	0,45	--
Valin	4,09	3,30
Methionin	1,12	1,08
Isoleucin	3,38	2,64
Leucin	4,83	4,34
Tyrosin	1,92	1,46
Phenylalanin	2,80	2,72
Histidin	1,63	1,80
Lysin	5,51	3,08
Arginin	1,71	0,24

CSL: Corn steep liquor (Maisquellwasser) wurde von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland bezogen. Es handelt sich um ein viskoses Konzentrat von Maisquellwasser, welches reich an Vitaminen, Aminosäuren, Mineralien und anderen Wachstumsstoffen ist. Enthält 50 % Feststoffe und wurde während der Medienbereitung zugegeben. Der Proteingehalt ist relativ niedrig und es konnte kein Einfluss der Proteine auf das Wachstum festgestellt werden wie dies bei den Proteinen des Kartoffelfruchtwassers der Fall war.

In einem über fünf Tage laufenden Versuch bei 27,5 °C wurden 37,5%-igem KFW mit einer Glucosekonzentration von 25 g/l unterschiedliche Mengen an Molkepulver, Hefeextrakt und CSL zugesetzt, um ihren möglichen positiven Einfluss auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in KFW-Medium zu untersuchen.

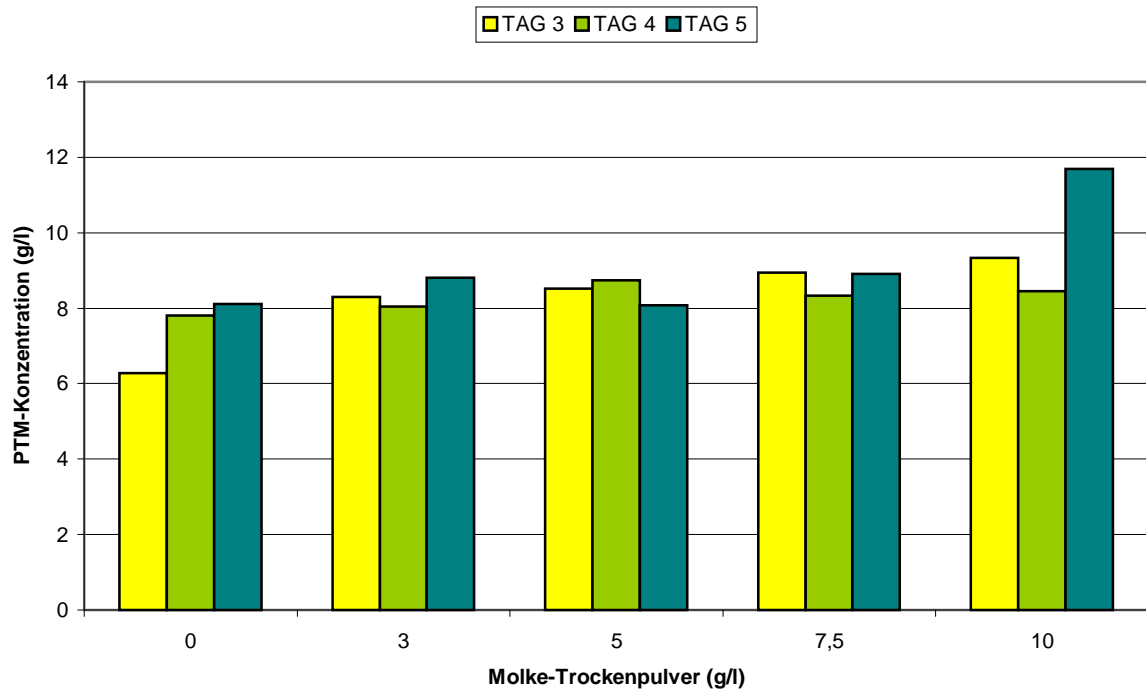


Abb. 4.73: Molke-Trockenpulver als Zusatz zu 37,5%igem KFW mit 25 g/l Glucose hat nur einen geringen Einfluss auf die Paramylonbildung.

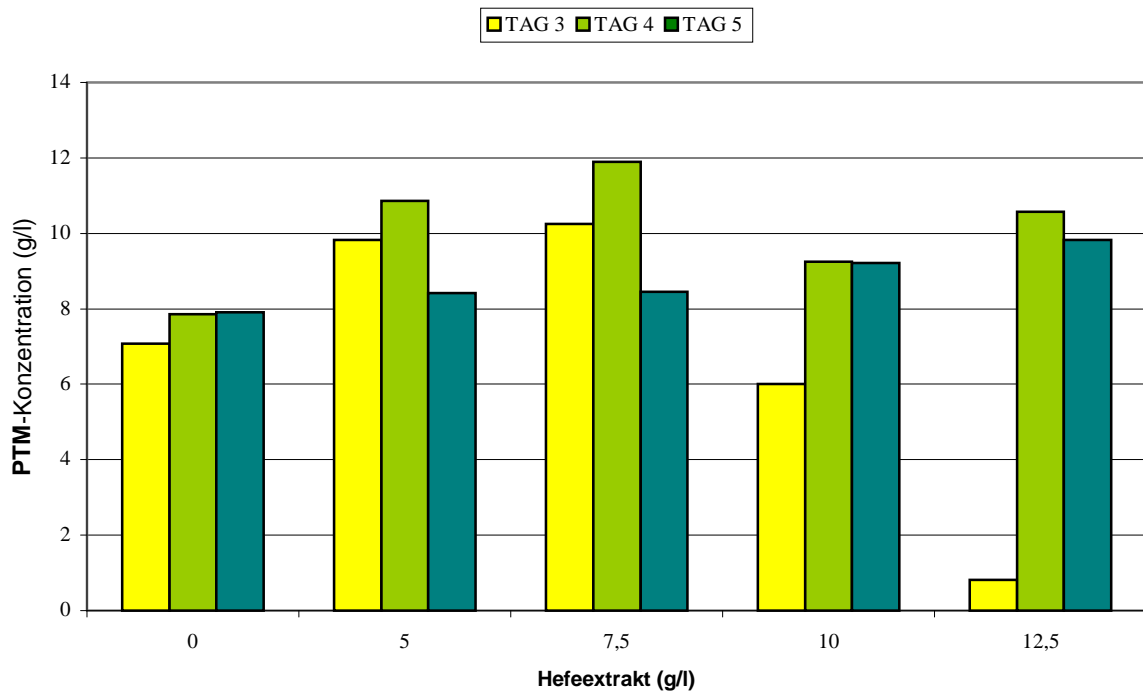


Abb. 4.74.: Hefeextrakt als Zusatz zu 37,5%igem KFW mit 25g/l Glucose zeigt eine Steigerung der Paramylonbildung im Vergleich mit der Null-Probe.

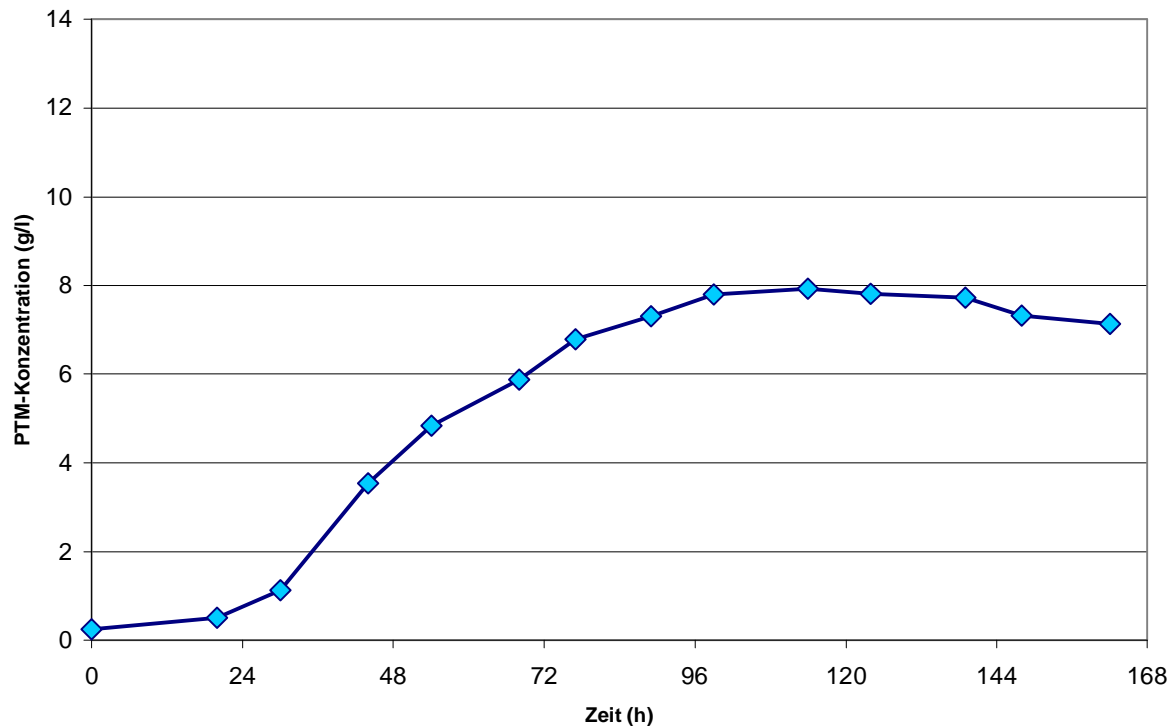


Abb. 4.75: Der Zusatz an CSL als zusätzliche Vitaminquelle hat keine Auswirkung auf die Paramylonbildung durch *Euglena gracilis* in KFW.

Molkepulver

Aufgrund des hohen Anteils an Laktose, ist wohl der hauptsächliche Effekt des Molkepulvers eine Stimulierung des Wachstums von *Euglena gracilis*, was in einer höheren Zellteilungsrate resultiert (Abb. 4.73).

Hefeextrakt

Die Verwendung von Hefeextrakt als zusätzliche Vitaminquelle zeigte verschiedene, gute Effekte. Eine, die hier nicht dargestellt wurde, war die Pufferung des pH-Wertes während der Fermentation und eine anderer, wie in Abbildung 4.74 zu sehen, war die Steigerung der Paramylonausbeute. Mehr Untersuchungen wurden durchgeführt, jedoch werden an dieser Stelle nur die besten Resultate dargestellt.

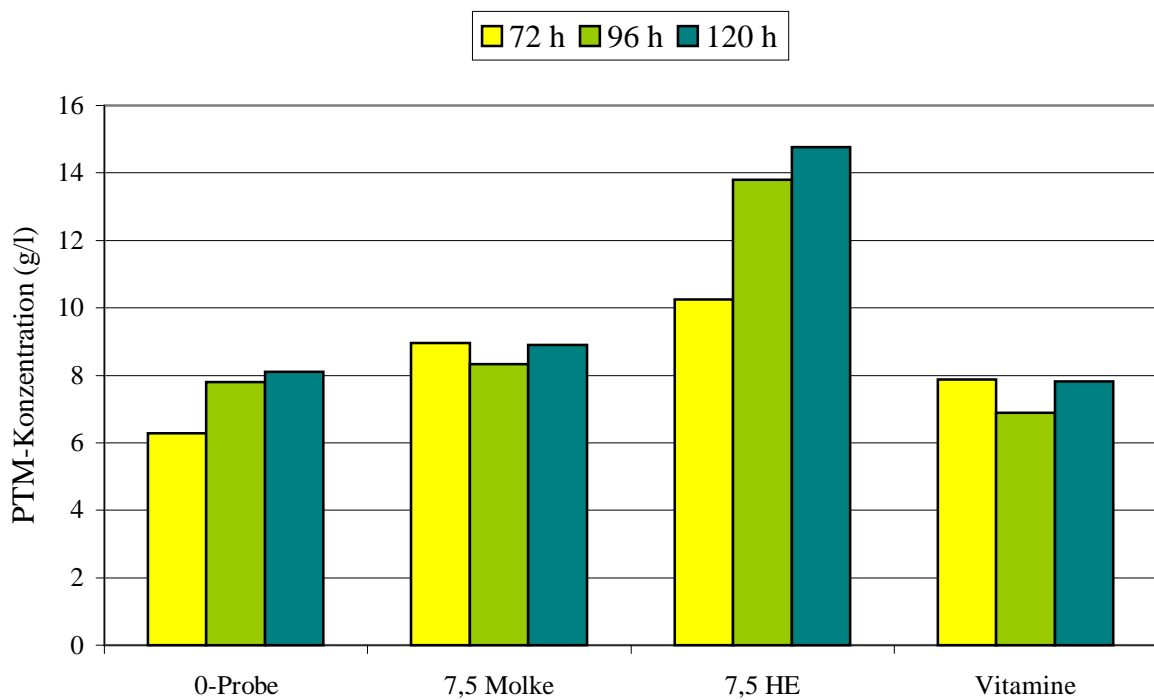
Corn Steep Liquor (CSL)

Die Zugabe von CSL hatte mehr oder weniger keinen Einfluss auf die Paramylonbildung durch *Euglena gracilis*. Eine β -1,3-Glucan-Ausbeute von nur 8 g/l konnte durch die Zugabe von CSL erreicht werden. Auch hier wurden noch andere Konzentrationen außer der in Abbildung 4.75 gezeigten untersucht, diese spiegeln jedoch die besten Resultate wieder.

Tab. 4.11: Einfluss von Vitaminen auf das Wachstum von *Euglena gracilis* in KFW. Versuchsdauer betrug in allen Fällen 4 Tage.

Medium	KFW	KFW + Vitamine	KFW + CSL	KFW + HE	KFW + Molke
KFW [% v/v]	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
BTM _{END} [g/l]	13,18	15,22	13,72	16,47	10,64
PTM _{END} [g/l]	9,72	12,14	7,93	11,26	8,45
PTM _{END} /BTM _{END} [g/g]	0,74	0,80	0,58	0,68	0,79
Glucose S ₀ [g/l]	26,07	23,11	26,02	25,00	29,88
Glucose S _{END} [g/l]	3,02	2,58	5,57	0,78	8,08
Ausbeute Y _{P/S}	0,41	0,58	0,38	0,45	0,38

Wie aus Tabelle 4.11 ersichtlich wird, führte eine Zugabe von reinen Vitaminen zu einer Steigerung der Ausbeute, die mit alternativen Vitaminquellen nicht erreichbar waren (HE, CSL, Molke). Bei allen weiteren Versuchen wurde aufgrund dieser Ergebnisse auf die Zugabe von Vitaminen oder Vitaminquellen verzichtet.

**Abb. 4.76:** Vergleich der Ergebnisse aus der Zugabe von Vitaminen bzw. alternativen Vitaminquellen zu KFW. Der deutlichste Einfluss ist bei HE zu erkennen.

4.2.5 Veränderung der Aminosäurekonzentration im KFW während einer Fermentation

Eine Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung (Abb. 4.77) des autoklavierten, von Proteinen befreiten KFW zeigte, dass ein breites Spektrum an Aminosäuren mit der verwendeten S3 Opa24-Methode nachweisbar war.

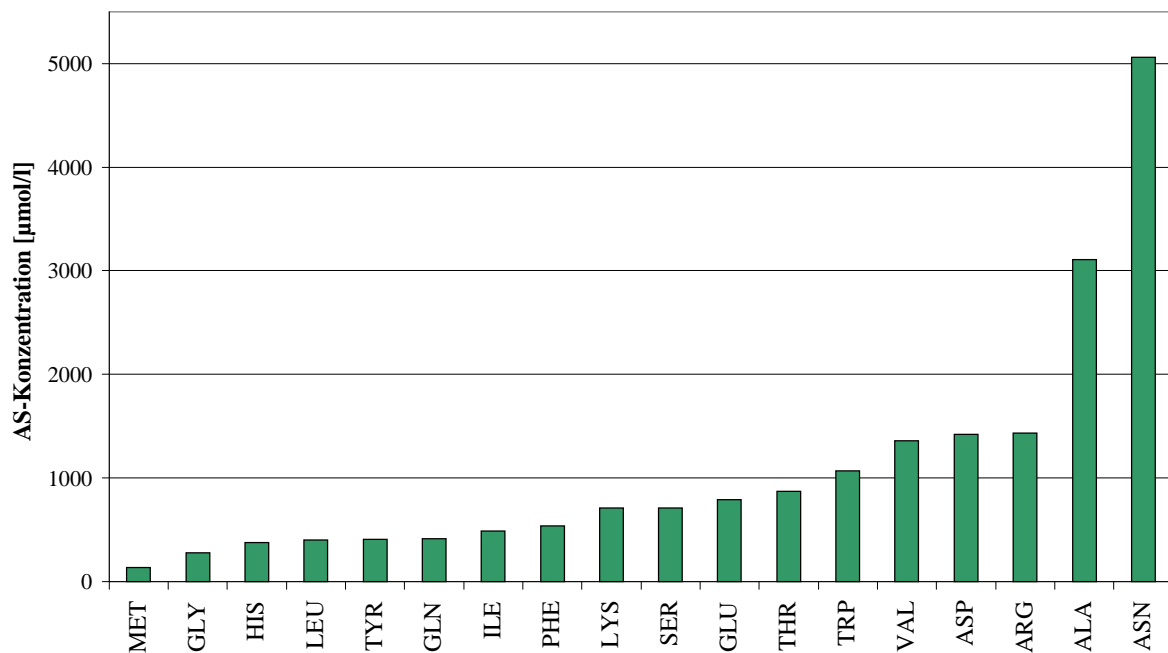


Abb. 4.77: Aminosäurespektrum in 1 MDa filtriertem KFW, bestimmt nach der S3 Opa24-Methode

Glutaminsäure (GLU), Asparaginsäure (ASP) und Glycin (GLY) konnten nachgewiesen werden und sind auch in ausreichender Konzentration vorhanden (im Vergleich zum definierten Medium nach HUTNER). Die Untersuchung des KFW ergab besonders hohe Konzentrationen (>1 mmol/l) an ASP, TRP, ARG, ALA, VAL und ASN (>5 mmol/l).

Das Fehlen der beiden Aminosäuren Cystein und Cystin ist etwas ungewöhnlich, aber für die Anzucht von *Euglena gracilis* nicht nachteilig. Möglicherweise liegt das aber daran, dass mit der verwendeten Methode diese beiden Aminosäuren nicht nachgewiesen werden können oder aber die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der Methode liegen. Von *Euglena* werden im heterotrophen Zustand nur 3 Aminosäuren essentiell benötigt. Dies sind GLU (Glutaminsäure), ASP (Asparaginsäure) und GLY (Glycin), die alle in ausreichend hohen Konzentrationen im untersuchten KFW_{2n} vorlagen. Eine negative Wirkung hoher Aminosäurekonzentrationen auf Algen wurde bisher noch nicht untersucht, ist jedoch nicht auszuschließen (RAY, K., und LEVANDOWSKY, M., 2000).

Die Tabellen 4.12 und 4.13 geben einen möglichen Aufschluss über den Verbleib der Aminosäuren, bzw. ihre Nutzung durch *Euglena gracilis*. Nach BUETOW (1966), KEMPNER und MILLER (1965) können sie entweder als zusätzliche Stickstoffquelle dienen, benötigte Aminosäuren für das Wachstum von *Euglena* ergänzen oder aber einfach als Kohlenstoffskelett für den Kohlenhydratstoffwechsel dienen.

Tab. 4.12: Aminosäuren als Stickstoffquelle für *Euglena gracilis* (BUETOW, 1966).

Neutrale aliphatische Aminosäuren
Glycin
Alanin
Valin
Leucin
Isoleucin
Serin
Threonin
Dicarbonaminsäuren und ihre Amide
Asparaginsäure
Asparagin
Glutaminsäure
Glutamin

Tab 4.13: Verbleib exogener Aminosäuren, ^{14}C -markiert (KEMPNER und MILLER, 1965).

Aminosäure im Medium	In Proteinhydrolysat gefundene Aminosäure
Alanin	Alanin
Asparaginsäure	Asparagin Glycin Serin Alanin Isoleucin Threonin
Glycin	Glycin Serin Cystein Lysin
Histidin	Histidin
Prolin	Prolin
Phenylalanin	Phenylalanin
Serin	Serin Glycin Cystein
Threonin	Threonin Isoleucin Leucin Glycin
Tyrosin	Tyrosin
Valin	Valin

4.2.6 Änderung der Aminosäurezusammensetzung in KFW während einer Fermentation

Da *Euglena gracilis* unter heterotrophen Bedingungen Aminosäuren aus dem umgebenden Medium aufnehmen kann, war es von Interesse die Veränderung der Aminosäurekonzentrationen im Verlauf der Fermentation zu verfolgen. Die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure sind für *Euglena gracilis* essentiell und somit lag auf diesen drei Aminosäuren ein besonderes Interesse.

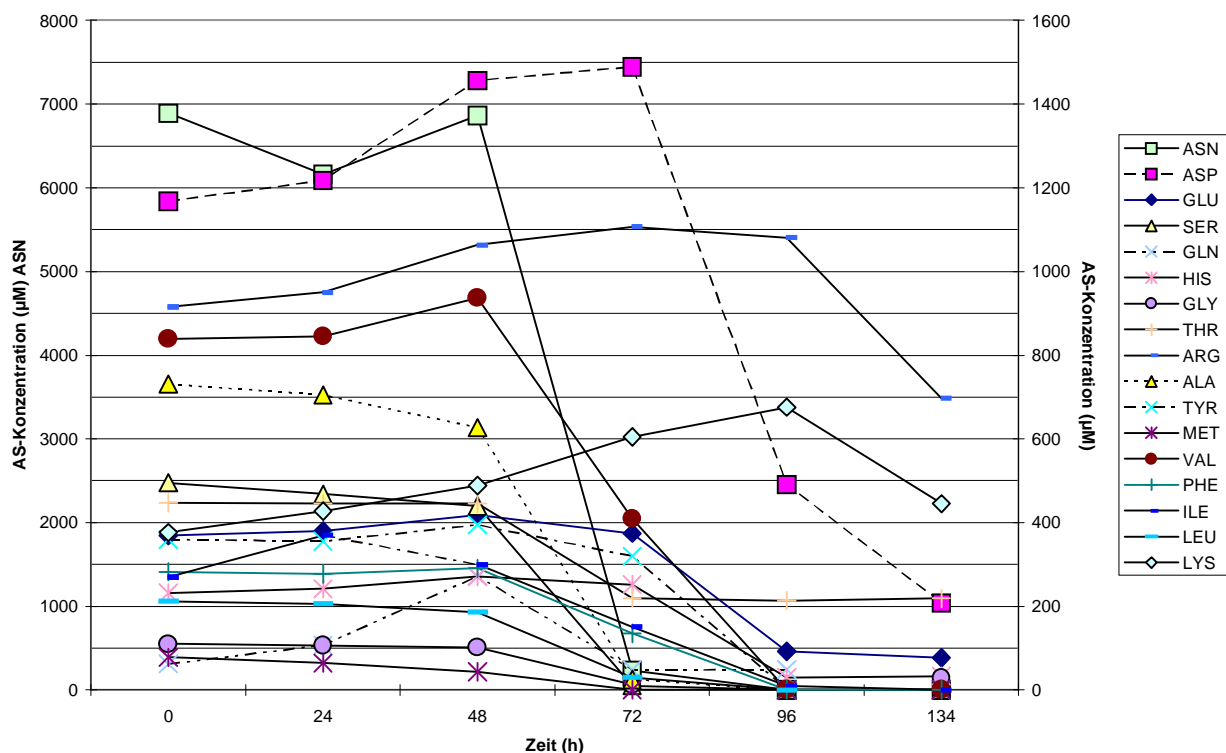


Abb. 4.78: Abnahme der AS-Konzentration in KFW_{2n} während einer Fermentation im 30 Liter Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 14 Litern.

Die Abnahme der drei wichtigen Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glycin (Abbildung 4.78) bis auf quasi Null am dritten bzw. vierten Versuchstag machen es deutlich, wie wichtig diese Aminosäuren für den Stoffwechsel und Biomasseaufbau von *Euglena gracilis* sind. Interessant sind auch die gemessenen anderen 14 Aminosäuren, die teilweise sogar im Laufe der Fermentation aufgebaut wurden, um dann ab dem vierten Versuchstag wieder abgebaut zu werden. Als Hypothese wäre es denkbar, dass diese Aminosäuren von *Euglena gracilis* umgebaut wurden, um die drei fehlenden, essentiellen Aminosäuren zu ersetzen. Es wird jedoch auch berichtet, dass einige Aminosäuren als Wachstumsfaktoren dienen (HUTNER *et al*, 1966; WOLKEN, 1961; KEMPNER und MILLER, 1965).

4.2.7 Satzweise Kultivierung von *Euglena gracilis*

Nachdem klassische Versuche im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt worden sind, um wichtige Eckdaten zu erhalten, wurden im nächsten Schritt Fermentationen im gerührten 7 Liter Fermenter durchgeführt. Bei allen hier gezeigten Fermentationen (Batch, Fed Batch, repeated Batch) wurde bei einer Temperatur von 27,5° C und einem Nutzvolumen von 5 Litern gearbeitet. Die folgend präsentierten Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Herrn Dr. Santek erzielt und freundlichst für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

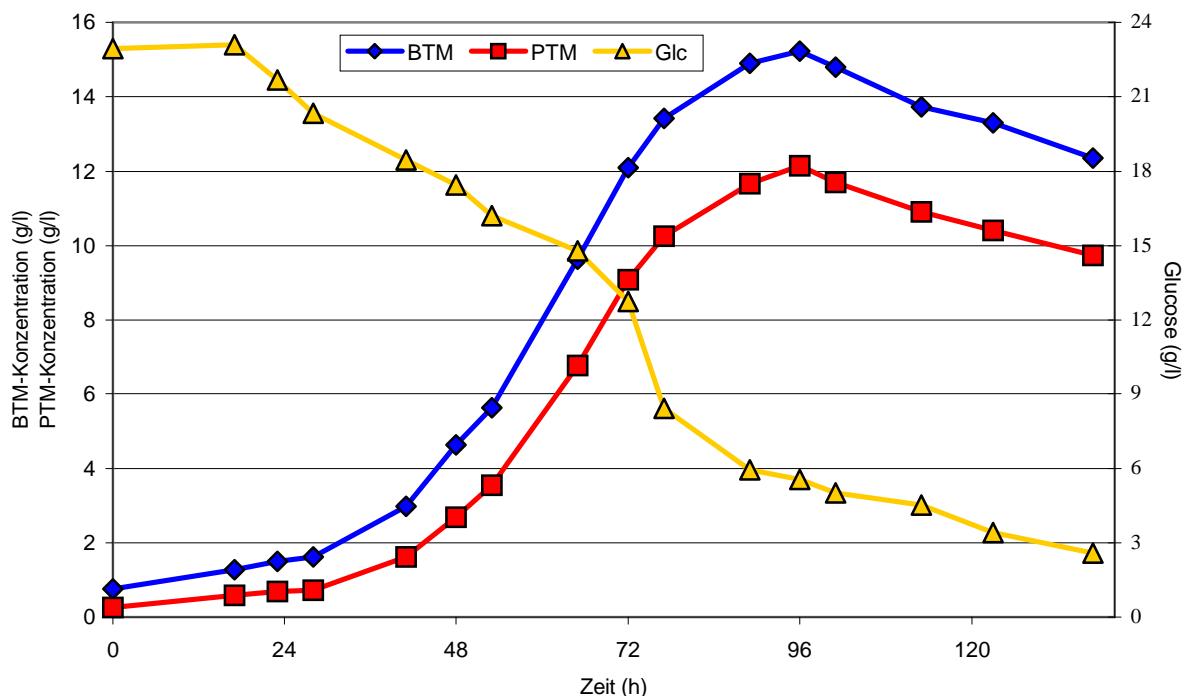


Abb. 4.79: Batch-Kultivierung mit *E. gracilis* in 37,5 % KFW mit 25 g/l Glucose im 7 Liter Fermenter mit 5 Liter Medium. Temperatur 27,5° C, Rührerdrehzahl 250 min⁻¹, Zuluft = 2,5 l·min⁻¹. [Ergebnisse von Dr. Santek zur Verfügung gestellt, 2002]

Zu Beginn des Versuchs wurden im Medium 23 g/l Glucose vorgelegt. Zum Zeitpunkt der maximalen Biomasse, nach 96 Stunden, wurde eine BTM von 15,22 g/l erreicht und 17,46 g/l Glucose wurden bis zu diesem Zeitpunkt von *Euglena gracilis* verbraucht. Der Aufbau von Biomasse und dem Speicherkohlenhydrat Paramylon konnte während dieser Fermentation gut verfolgt werden und mit der Abnahme der Glucosekonzentration im Medium stiegen die Werte für die BTM/PTM stetig an. Subtrahiert man von der gemessenen SDW in Abbildung

4.79 die jeweils aktuelle Glucosekonzentration, so erkennt man, dass im Verlauf der Fermentation neben der Glucosekonzentration auch die gelöste Trockenmasse um 3,87 g/l abnimmt. Daraus folgt, dass während der Fermentation 17,46 g/l Glucose und weitere 3,87 g/l an anderen nicht weiter definierten Stoffen aus dem Medium aufgenommen worden sind und in 15,22 g/l Biomasse und 12,14 g/l Paramylon umgesetzt worden sind.

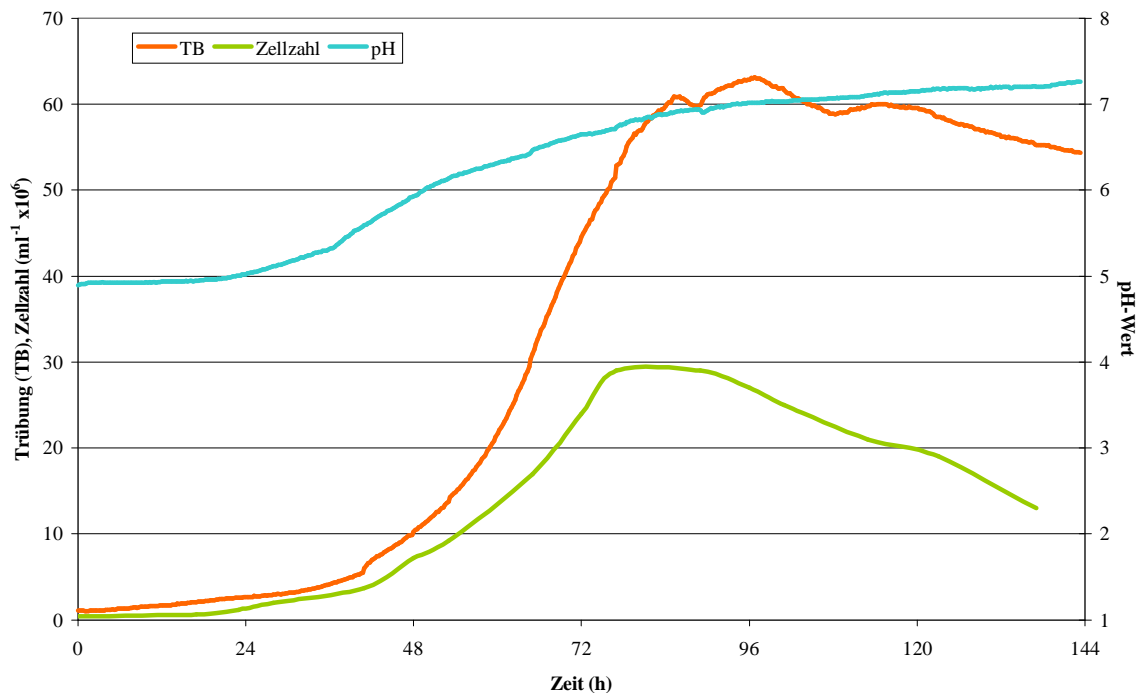


Abb. 4.80: Mit der Zunahme des pH-Wertes auf pH-Werte über 7 nimmt auch die Trübung im Fermenter zu.

Die Zellzahl im Verlauf des Versuchs konnte gut mit dem durch den Trübungssensor gemessenem Signal im Fermenter korreliert werden (Abb. 4.80). Im gleichen Maße wie die Zellzahl zunimmt, steigt auch das Trübungssignal an. Auch der pH-Wert der Fermentationsbrühe zeigt deutlich einen mit dem Wachstum der Kultur verbundenen Verlauf an. Zum Zeitpunkt der maximalen Biomasse nach 96 Stunden ist ein pH-Wert von 7,1 erreicht worden. Es kam zur Veränderung des pH-Wertes von pH 4,9 auf pH 7,1, nur durch das Wachstum der Population und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten. Dieser pH-Wert von 7,1 ist für das Wachstum von *Euglena gracilis* zwar nicht lebensbedrohlich, entspricht jedoch nicht den für die Vermehrung und Paramylonsynthese optimalen pH-Bereich. Das Wachstum der Population nimmt ab der 78 Stunde ab und erreicht eine stationäre Phase. Zum Zeitpunkt der maximalen BTM nimmt die Zellzahl schon leicht ab und ein weiterer Anstieg des pH-Wertes bis zum Versuchsende auf pH 7,26 ist zu verzeichnen. Da die Zellen zum Versuchsende von der Gestalt her größer sind, als dies zu Beginn des Versuchs der Fall war,

ist auch die etwas weniger starke Abnahme des Trübungswertes im Vergleich zur abnehmenden Zellzahl zu verstehen. Auch sind zum Endes des Versuchs hin Zelltrümmer im Medium, die den Trübungswert ebenfalls erhöhen.

Dieser Versuch zeigte, dass eine Fermentation mit dem hier verwendeten KFW als Medium und einer zusätzlichen Kohlenhydratquelle in Form von 25 g/l Glucose zu guten Ergebnissen führt. Ähnlich wie auch im Schüttelkolbenmaßstab konnten BTM bzw. PTM von 15,22 g/l und 12,14 g/l erreicht werden. Da Batch-Fermentationen nicht die optimalste Form der Fermentation darstellen, sollte dies als Grundlage für weitere Versuche dienen.

4.2.8 Fermentation von *Euglena gracilis* im Zulaufverfahren

Aufgrund der Daten aus den Batch-Fermentationen wurde nun eine Strategie verfolgt, bei der in der maximalen Wachstumsphase frisches Medium zugefüttert wurde. Hohe Konzentrationen an KFW und Glucose wurden dabei zugefüttert, um mit möglichst wenig

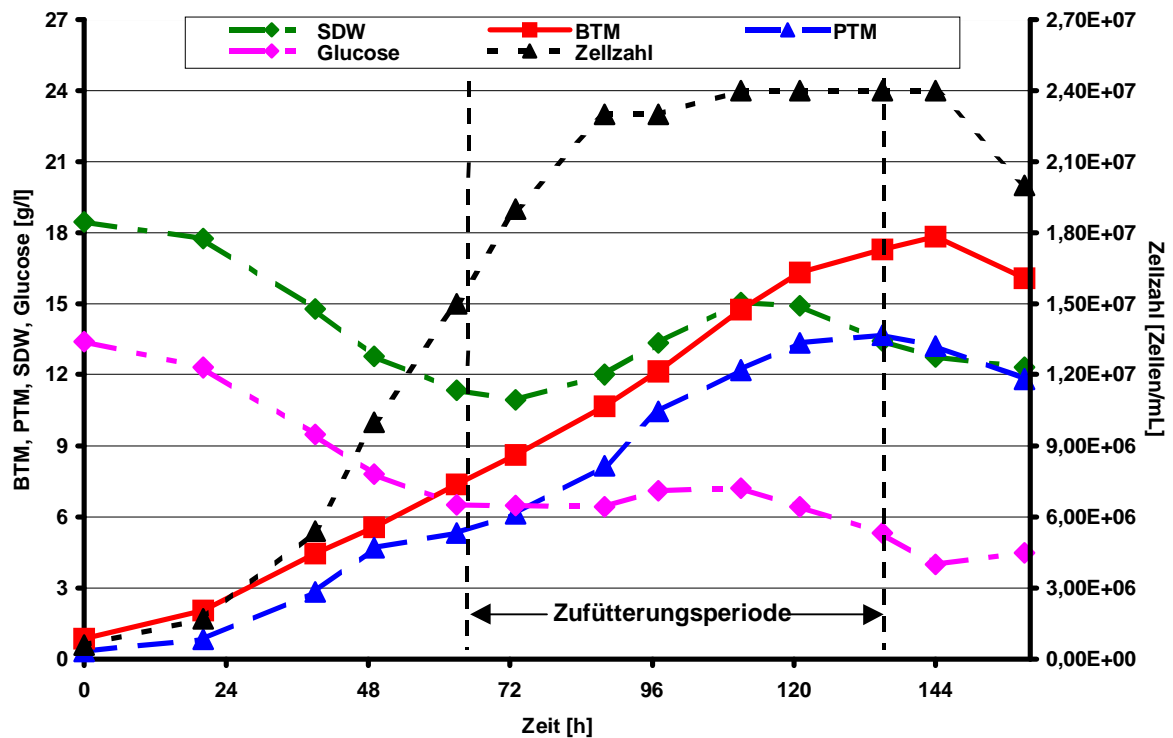


Abb. 4.81: Fedbatch-Kultivierung von *Euglena gracilis* in Medium mit 25 % v/v KFW und 15 g/l Glucose. Zusammensetzung des Zufütterungsmediums: 100 % KFW mit 66,7 g/l Glucose. [Ergebnisse von Dr. Santek zur Verfügung gestellt, 2002]

Zulauf-Volumen ein Maximum an Inhaltsstoffen zu transportieren. Wie in Abb. 4.81 deutlich zu erkennen ist, steigt die Zellzahl auf bis zu $2,44 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ an, der erhoffte Effekt auf die BTM bzw. PTM zeichnete sich jedoch nicht ab. Die Glucosekonzentration wurde nahezu konstant bei einer Konzentration von 6,5 g/l gehalten und fiel erst nach Ende der Zufütterungsperiode weiter ab. Nach ca. 144 Stunden wurde die maximale Ausbeute an BTM/PTM erreicht, welche trotz des angewandten Zulaufverfahrens nur wenig über den Ausbeuten der Satzkultivierung lagen (BTM = 17,83 g/l ; PTM = 13,2 g/l).

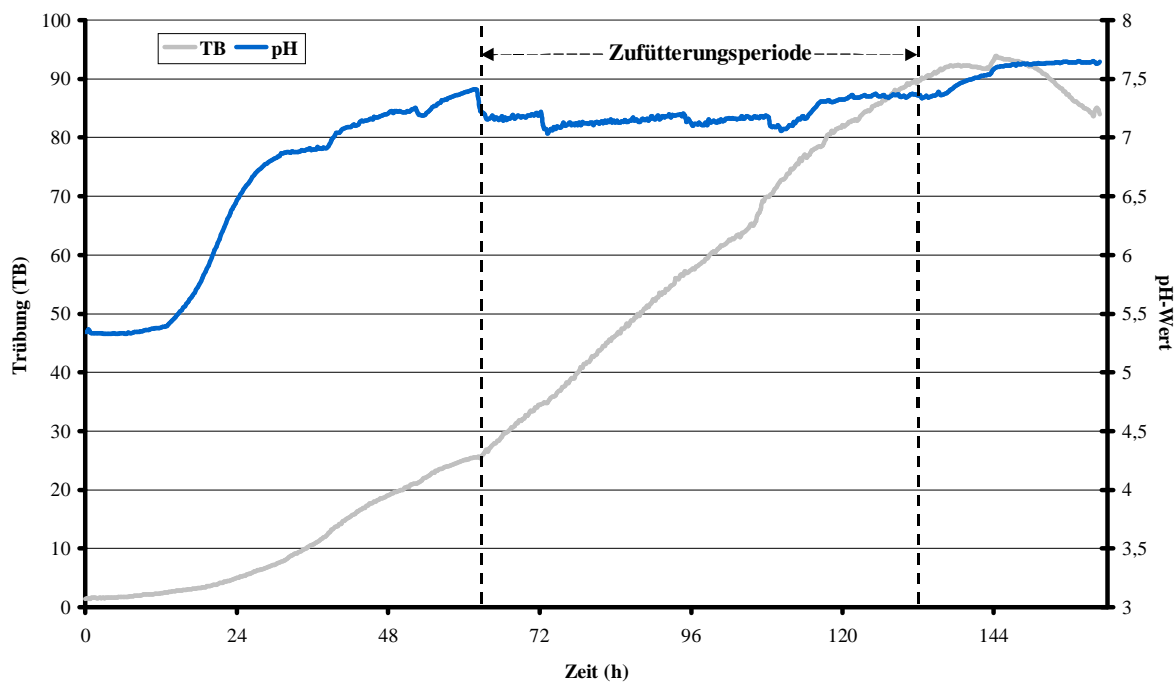


Abb. 4.82: Auftragung des pH-Wertes und der gemessenen Trübung im Verlauf eines Versuchs mit Zufütterung von KFW und Glucose.

Die Zufütterungsperiode wurde so gewählt, dass eine sehr hohe Zelldichte und auch eine möglichst hohe Paramylonkonzentration je Zelle zu erwarten war. Wie man aus Abbildung 4.82 gut erkennen kann, steigt der pH-Wert bis zum Beginn der Zufütterungsphase schon auf Werte über pH 7 an und steigt im Laufe der Versuchszeit mit Zufütterung kaum weiter an. Das zulaufende Medium mit der Glucose ist somit kaum in der Lage den pH-Wert in irgendeiner Art zu senken. Bei pH-Werten um den Neutralwert ist die Aufnahme von Glucose für *Euglena gracilis* erschwert, was eine mögliche Erklärung für die insgesamt nur geringe Ausbeutesteigerung in diesem Zulaufversuch darstellt. Auch der Verlauf der Zellzahl in Bezug auf die tatsächliche Biomasse (siehe Abb. 4.83) liefert für diese Hypothese gute Argumente. Die Zellzahl erreicht nach ungefähr 88 Stunden ihr Maximum und schwankt bis zum Ende des Versuchs zwischen 23 und 24 Millionen Zellen je Milliliter.

Die Biomasse und Paramylonausbeute steigt bis zum Ende der Zufütterung nahezu konstant an, die Zellzahl ist jedoch schon 15 Stunden nach Zufütterungsbeginn auf ihrem Maximum. Die Zufütterung führt zu einer Zunahme des Gewichts der einzelnen Zellen (im Vergleich mit dem normalen Batch), Glucose und andere Nährsubstanzen werden von *Euglena gracilis* in Biomasse und Paramylon umgesetzt. Nach Ende der Zufütterung wurde zwar noch weiter Biomasse aufgebaut, was aber ganz klar auf Kosten des gespeicherten Paramylons ging.

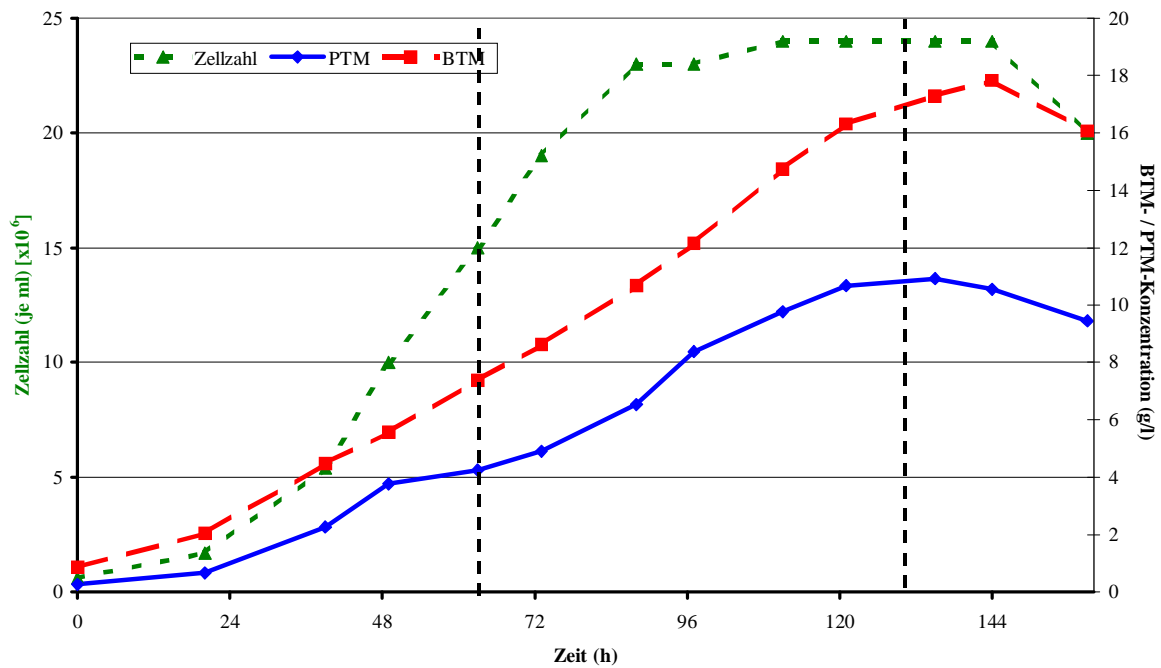


Abb. 4.83: Während die Biomasse und Paramylonkonzentration bis zum Ende der Zufütterung ansteigt, ist die Zellzahl schon 15 Stunden nach Versuchsbeginn auf ihrem maximalen Wert angelangt.

Die hier durchgeführte Zufütterung mit KFW und Glucose führte nicht zu dem erwarteten Ziel, nämlich einer höheren Biomasse und Paramylonausbeute als dies im Batch Versuch der Fall war. Die Zeitdauer bis zum Erreichen der maximalen Ausbeuten an BTM und PTM waren sogar länger als bei der Batchfermentation.

4.2.9 Semikontinuierliche Fermentation von *Euglena gracilis*

Aufgrund der gezeigten Problematik bei Fedbatch-Fermentationen und dem normalen Zulaufverfahren mit *Euglena gracilis* wurde nach einer Alternative gesucht. Ein Versuch mit semikontinuierlichen Batches über ~460 Stunden wurde dazu durchgeführt. Regelmäßig wurden Proben genommen, um wichtige Parameter der Fermentation festzuhalten. In Abb. 4.84 ist der Wachstumsverlauf anhand der BTM und PTM zu sehen. Zugefüttert wurden

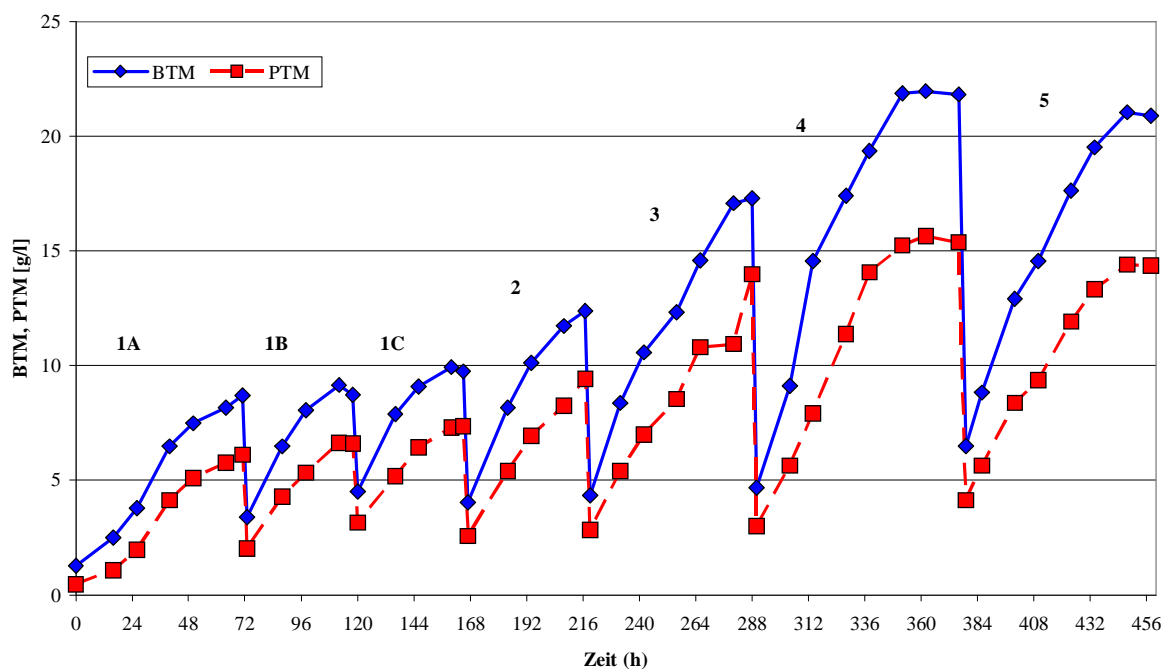


Abb. 4.84: Semikontinuierliche Fermentation mit *E. gracilis*. Mediumzusammensetzung am Start war 37,5 % KFW und der Gehalt nahm im Versuchsverlauf zu. [Ergebnisse von Dr. Santek zur Verfügung gestellt, 2002].

jeweils 3,5 Liter KFW mit steigender KFW-Konzentration bei gleichbleibender Glucosekonzentration von 20 g/l. Es zeigte sich, dass mit steigender KFW-Konzentration auch eine gesteigerte BTM- bzw. PTM-Ausbeute möglich war. Im Verlauf des Versuches war es möglich, mit dem weniger verdünnten KFW der Fermentation wieder genügend Nährstoffe zuzuführen. Es stellte sich jedoch, wie schon in vorherigen Versuchen beobachtet, heraus, dass höhere KFW-Konzentrationen zu einer Verlängerung der Fermentationsdauer führten. Die 100 % KFW-Versuche zeigten indes, dass bei zu hohen KFW-Konzentrationen ein negativer Effekt auftritt. Die BTM und PTM sinkt deutlich unter den Wert des Versuchs mit weniger KFW [1A, 1B, 1C gleiche Konzentrationen, dann zunehmender Gehalt an KFW von 2 bis 5].

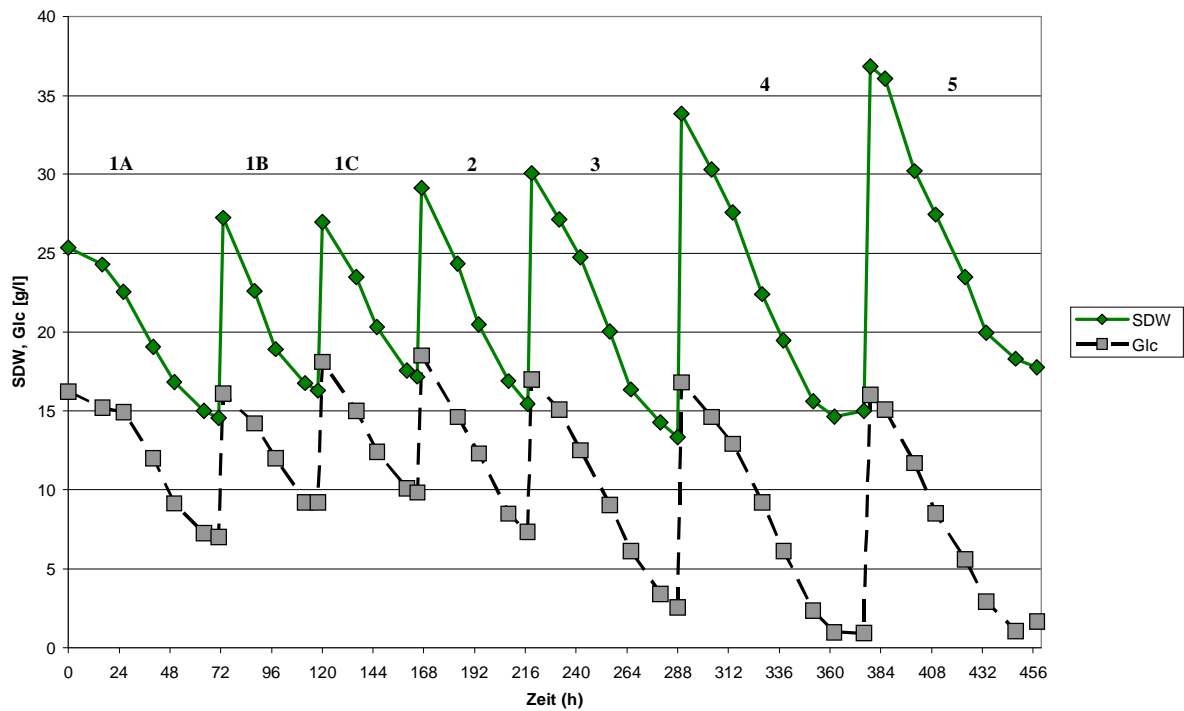


Abb. 4.85: Veränderung der Glucose- und der Feststoffkonzentration im Medium während der Fermentation [Ergebnisse von Dr. Santek zur Verfügung gestellt, 2002].

Wie Abbildung 4.85 zeigt, werden während der Fermentation nahezu immer gleichviel Inhaltsstoffe des Mediums verbraucht. Die Glucose wird hingegen in den ersten Versuchen nicht gänzlich verbraucht. Erst mit der Verwendung von weniger stark verdünntem KFW kommt es auch zu einer weiteren Verwertung der vorgelegten Glucose. Bei den Fermentationen mit hohen KFW-gehalten wird die Glucose fast völlig verstoffwechselt.

Tab. 4.14: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und Verdopplungszeit.

t_n	X_n	t_{n+1}	X_{n+1}		μ	t_μ	t_d
26	3,78	40	6,48		0,0385	33	18,004
73	3,4	88	6,48		0,043	80,5	16,121
120	4,51	136	7,88		0,0349	128	19,874
167	4,03	184	8,16		0,0415	175,5	16,703
219	4,34	232	8,38		0,0506	225,5	13,695
304	9,12	314	14,56		0,0468	309	14,817
379	6,49	386	8,82		0,0438	382,5	15,817

Tab. 4.15: Ausbeutekoeffizienten und Produktivität der semikontinuierlichen Fermentation (BTM).

Zeit (Δt)	Versuch	BTM _{Min.}	BTM _{Max.}	BTM _{Diff.}	Glu _{Max.}	Glu _{Min.}	Glu _{Diff.}	$Y_{X/S}$ BTM	P_t
71	1A	1,26	8,71	7,45	16,2	7,02	9,18	0,812	0,123
45	1B	3,4	9,15	5,75	16,1	9,19	6,91	0,832	0,203
40	1C	4,51	9,93	5,42	18,1	9,82	8,28	0,655	0,248
50	2	4,03	12,38	8,35	18,5	7,32	11,18	0,747	0,248
69	3	4,34	17,29	12,95	17	2,52	14,48	0,894	0,251
72	4	4,67	21,96	17,29	16,8	0,902	15,898	1,088	0,305
69	5	6,49	21,04	14,55	16	1,04	14,96	0,973	0,305

Tab. 4.16: Ausbeutekoeffizienten und Produktivität der semikontinuierlichen Fermentation (PTM).

Zeit (Δt)	Versuch	PTM _{Min.}	PTM _{Max.}	PTM _{Diff.}	Glu _{Max.}	Glu _{Min.}	Glu _{Diff.}	$Y_{X/S}$ PTM	P_t
71	1A	0,47	6,16	5,69	16,2	7,02	9,18	0,620	0,087
45	1B	2,04	6,63	4,59	16,1	9,19	6,91	0,664	0,147
40	1C	3,17	7,37	4,2	18,1	9,82	8,28	0,507	0,184
50	2	2,57	9,41	6,84	18,5	7,32	11,18	0,612	0,188
69	3	2,83	13,98	11,15	17	2,52	14,48	0,770	0,203
72	4	3,01	15,64	12,63	16,8	0,902	15,898	0,794	0,217
69	5	4,14	14,4	10,26	16	1,04	14,96	0,686	0,209

Wenn man sich die Raum-Zeit-Ausbeute bezogen auf die Biomasse aus Tabelle 4.14 anschaut, so erkennt man einen stetigen Anstieg des Wertes bis auf 0,305 [kg m⁻³ h⁻¹] bei der Fermentation in Versuch 4, bzw. bis auf 0,217 [kg m⁻³ h⁻¹]. Bei der Batchfermentation mit 100%igem KFW nahm der P_t -Wert nicht weiter zu. Die Osmolalität der Lösung hat möglicherweise eine für *Euglena gracilis* ungünstige Konzentration erreicht. Trotz erhöhter Inhaltsstoffe kommt es zu keiner weiteren Zunahme der Raum-Zeit-Ausbeute, bei den auf Paramylon bezogenen Werten nimmt er sogar ab.

Der gleiche Effekt zeigt sich auch bei den Ausbeutekoeffizienten.

Tab. 4.17: Tatsächliche Trockenmasse (SDW) in KFW beim Start der jeweiligen Batches. Hochrechnung auf 100% KFW.

Zeit (h)	Versuch	SDW-Glc (g/l)	SDW (g/l) KFW 100%
0	1A	9,133	24,35
73	1B	8,417	22,45
120	1C	8,85	23,6
167	2	10,65	21,3
219	3	13,067	20,1
290	4	17,05	21,31
379	5	20,833	20,83

Tabelle 4.17 zeigt, dass zum Start der jeweiligen Fermentation ungefähr gleiche Bedingungen in Bezug auf den Feststoffgehalt im Medium herrschten. Die zugesetzte Glucose wird in der dritten Spalte herausgerechnet, um den Anteil des KFW-SDW zu bestimmen (siehe auch

Abbildung 4.86). In der vierten Spalte sind die aus der Verdünnung hochgerechneten Feststoffkonzentrationen dargestellt worden. Schwankungen in der Konzentration lassen sich wahrscheinlich auf Verdünnungsfehler zurückführen (Kondensat).

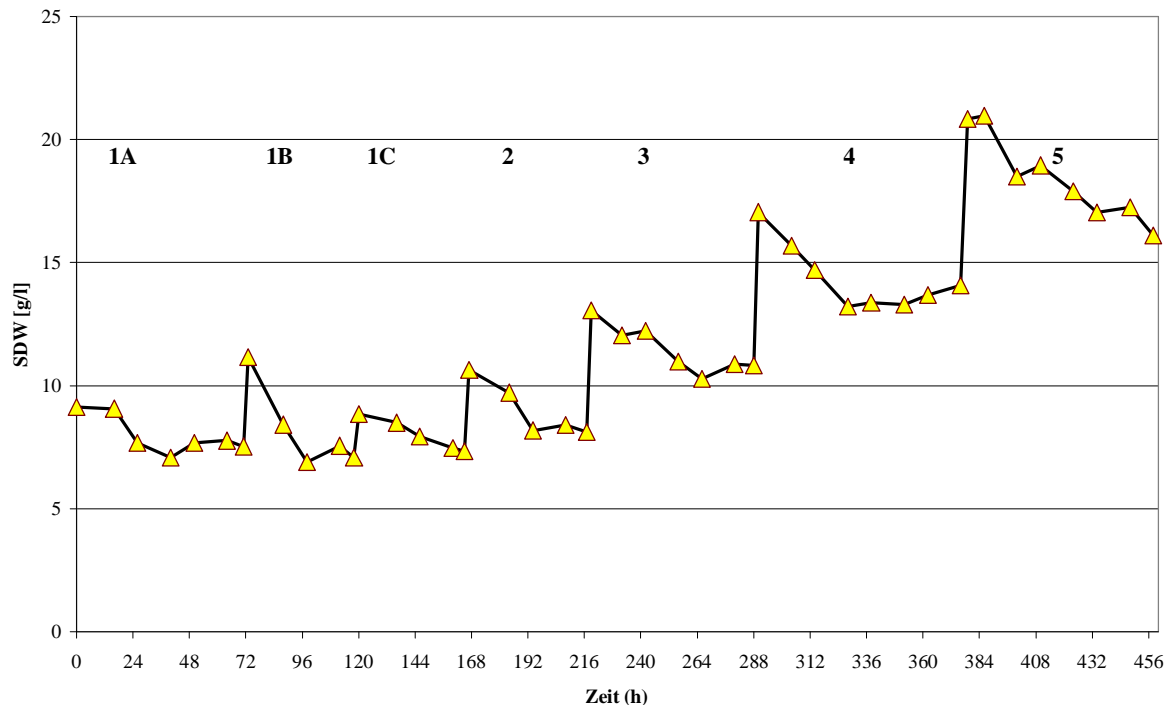


Abb. 4.86: Veränderung der Feststoffkonzentrationen im KFW während der Fermentation. Die höheren KFW-Konzentrationen sind in Form höherer SDW gut zu erkennen.

Da sich in diesen Versuchen zeigte, dass es im Verlauf der Fermentation nicht nur zu einer Veränderung der Ausbeuten mit unterschiedlich konzentriertem KFW kommt, sondern auch zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten, wurde nun im folgenden Schritt versucht den Einfluss des Inokulums auf eine semikontinuierliche Fermentation zu untersuchen. Die äußeren Bedingungen wurden hierbei konstant gehalten, die Konzentration des KFW lag beim optimalen Wert mit einer Glucosekonzentration im Zufütterungsmedium von 25 g/l. Unterschiedliche Inokula wurden gewählt, um den Einfluss des Startinokulums auf die Fermentationsdauer und die Ausbeute hin zu untersuchen. In Tabelle 4.18 sind die unterschiedlichen Startinokula zu erkennen, das Fermentationsvolumen wurde konstant gehalten, es wurden nur Proben zum Ende der Fermentation genommen. Der Endpunkt einer Fermentation wurde durch das Erreichen einer Trübung von 50 angenommen. Dieser Wert resultiert auf vorherigen Fermentationen, die hier nicht gezeigt werden.

Tab. 4.18: Fermentation im 7 Liter Bioreaktor mit unterschiedlichen Inokula. Ausbeutekoeffizienten und Produktivität bezogen auf Biomasse und Paramylon.

Inokulum (%)	BTM _{Ende}	BTM _{Diff.}	Glucose _{Diff.}	Δt (h)	$Y_{X/S}BTM$	P_tBTM
20	16,22	12,59	13,06	69,75	0,96	0,18
60	14,54	3,19	7,00	28,00	0,46	0,11
90	9,44	-3,65	4,07	19,25	-0,90	-0,19
10	11,28	10,34	13,50	83,50	0,77	0,12
30	13,45	10,07	12,18	59,00	0,83	0,17
60	11,14	3,07	7,24	74,50	0,42	0,04
Inokulum (%)	PTM _{Ende}	PTM _{Diff.}	Glucose _{Diff.}	Δt (h)	$Y_{X/S}PTM$	P_tPTM
20	10,88	7,60	13,06	69,75	0,58	0,11
60	9,70	2,08	7,00	28,00	0,30	0,07
90	7,47	-1,26	4,07	19,25	-0,31	-0,07
10	6,98	6,23	13,50	83,50	0,46	0,07
30	11,42	9,33	12,18	59,00	0,77	0,16
60	8,50	1,65	7,24	74,50	0,23	0,02

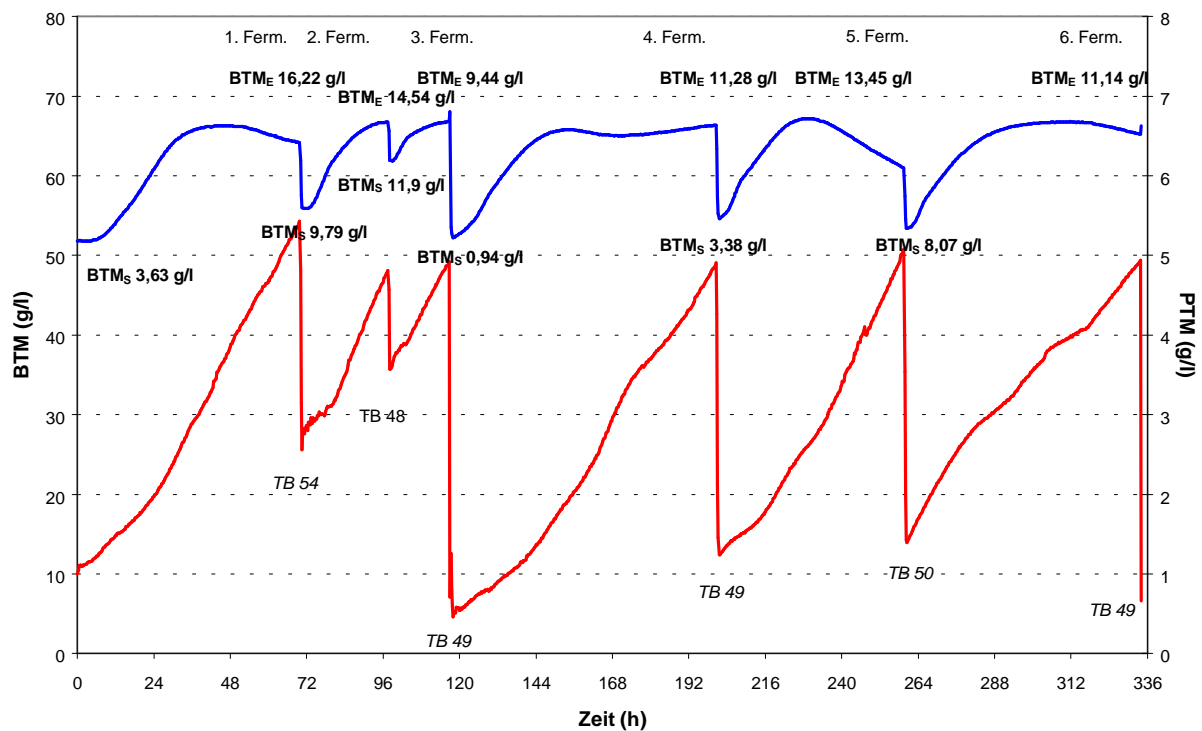


Abb. 4.87: Semikontinuierlicher Versuch im 7 Liter Fermenter mit optimaler KFW-Konzentration als Medium.

Die erzielten Daten (siehe Abb. 4.87) zeigen deutlich an, dass es einen Einfluss des Inokulums auf die zu erzielende Ausbeute gibt. Um möglichst wenig Einflüsse durch eine Probenahme während der Fermentation zu haben, wurde auf diese verzichtet. Proben wurden nur zum Ende der Fermentation genommen, um das Volumen während des Versuchs möglichst konstant zu halten. Niedriges Inokulum führt zu langen Versuchszeiten, jedoch auch zu hohen Ausbeuten.

4.3 Aufarbeitung des Paramylons

4.3.1 Separation von Zelltrümmern und Paramylon-Granulä

Da das von *Euglena gracilis* gebildete Paramylon in den Zellen im Cytosol in Granulae gespeichert wird (siehe auch Abb. 2.1), müssen die Zellen nach der Fermentation erst zerstört werden, um an das Paramylon zu gelangen und anschließend das Paramylon von restlichen Zellbestandteilen zu trennen (durch Zentrifugation bzw. Auflösen der organischen Bestandteile mittels SDS bzw. Enzym).

Um zu klären, unter welchen Bedingungen die Zellen nach der Fermentation mittels Hochdruckhomogenisation (HDH) am günstigsten aufzubrechen wären, wurden Versuche mit konzentrierter Biomasse durchgeführt (Konzentration durch Zentrifugation). Der Druck wurde dabei bei den Einfach-Passagen jeweils um 50 bar erhöht und der Aufschlussgrad durch lichtmikroskopische Untersuchung (durch Zählung noch vorhandener Zellen) festgestellt (siehe Abbildung 4.88).

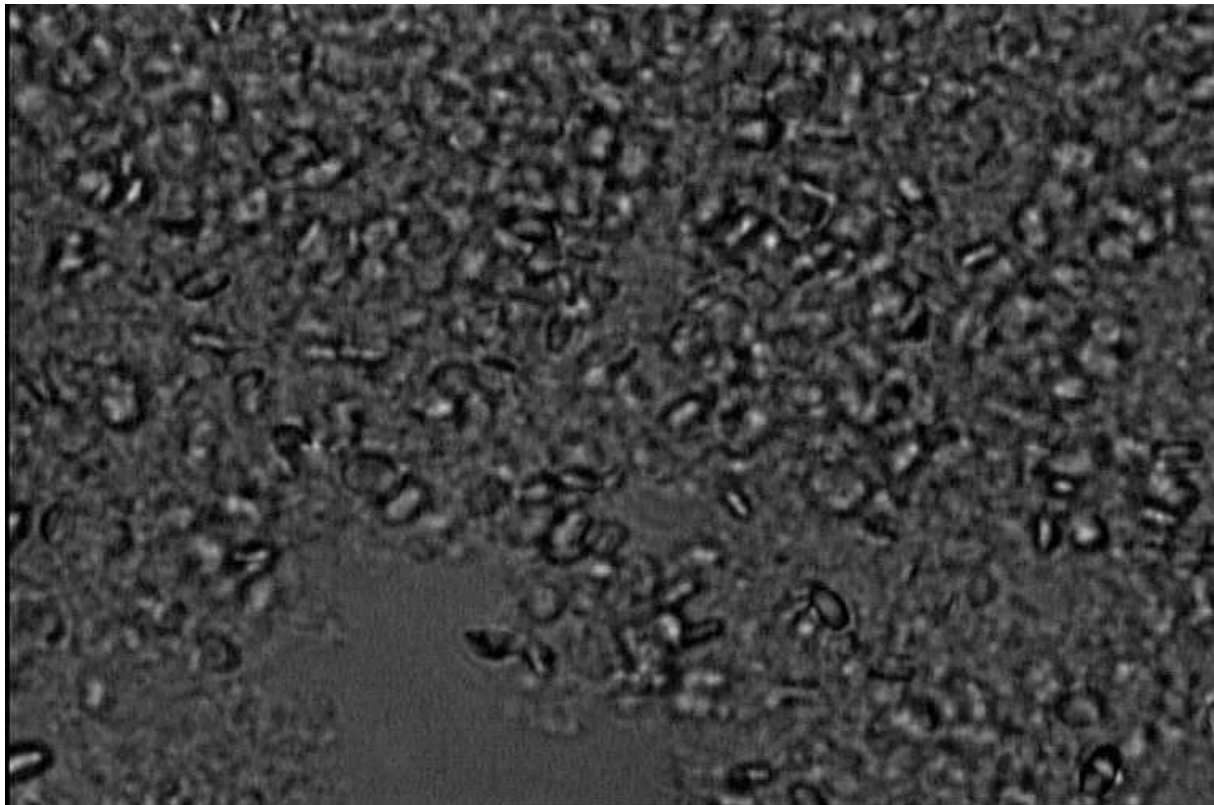


Abb. 4.88: 100% Zellaufschluss mittels der HDH bei 350 bar. Nur die Granula und Zelltrümmer sind zu erkennen. Es konnten keine intakten Zellen mehr gefunden werden.

Tab. 4.17: Ergebnisse der HDH Versuche mit unterschiedlichem Druck und Passageanzahl. N_0 steht hierbei für die Zellzahl vor der HDH-Passage, N_{1x} , N_{2x} und N_{3x} für die erste, zweite bzw. dritte Passage.
[Daten aus Zusammenarbeit mit Dr. Santek]

Druck [bar]	100	150	200	250	300	350	400
BTM [g/l]	149,50	122,10	128,00	134,90	128,20	102,50	149,20
N_0 [Zellen/ml]	$2,5 \times 10^8$	$4,27 \times 10^8$	$2,78 \times 10^8$	$3,65 \times 10^8$	$3,28 \times 10^8$	$3,45 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
N_{1x} [Zellen/ml]	$4,1 \times 10^7$	$3,95 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$6,25 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
Aufschluss [%]	83,60	90,75	91,71	98,29	97,71	99,71	95,31
N_{2x} [Zellen/ml]	$1,8 \times 10^7$	$9,00 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	0	0	0	0
Aufschluss [%]	92,80	97,89	99,20	100	100	100	100
N_{3x} [Zellen/ml]	$1,1 \times 10^7$	$2,50 \times 10^6$	0	0	0	0	0
Aufschluss [%]	95,60	99,41	100	100	100	100	100

Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden in Tabelle 4.17 zusammenfassend dargestellt und zeigten, dass eine einfache Passage durch den HDH mit 250 bar Druck schon einen Aufschlussgrad von 98,29 % erzielte und Mehrfachpassagen auch bei niedrigerem Druck zu dem gewünschten Ziel des Zellaufschlusses führten.

Daraus konnte geschlossen werden, dass für einen Produktionsprozess im Industriemaßstab der Einsatz eines HDH schon bei relativ niedrigen Drücken möglich wäre. Eine Aufkonzentrierung der Biomasse vor der HDH wäre durch die Verwendung eines Separators sicherlich ohne Probleme möglich. Eine Aufkonzentrierung ist deshalb ratsam, da durch konzentrierte Biomasse ein höherer Durchsatz an Biomasse der HDH gewährleistet werden kann.

4.3.2 Paramylonaufarbeitung

Im Laufe des Projekts wurde die Aufarbeitung des Paramylons aus den Zelltrümmern mehrmals überarbeitet. Zunächst wurde die von BÄUMER (1999) etablierte Methode verwendet, bei der die Zellen durch Ultraschall zerstört wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das so erhaltene Pellet mit 1 % SDS-Lösung versetzt und resuspendiert. Die so hergestellte Paramylon-SDS-Lösung wurde nun für ca. 1 Stunde am Rückfluss gekocht. Danach wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand aus SDS-Lösung und aufgelösten Zellbestandteilen wurde verworfen. Das so erhaltene Pellet enthielt schon jetzt einen sehr hohen Anteil an Paramylon, der jedoch noch leicht mit SDS verunreinigt war. Um diese Verunreinigung zu entfernen wurde eine Kombination aus mehrmaligem Waschen mit demineralisiertem Wasser (bis die Lösung klar war) und weiteren Waschschritten mit Aceton, um letzte Spuren von SDS zu entfernen, angewandt. Anschließend wurde dann das Paramylon für 12 Stunden im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet.

Diese Methode wurde gleich zu Anfang des Projekts insoweit abgeändert, dass die Zerstörung der Zellen nicht mehr durch eine Ultraschallsonde vorgenommen wurde, sondern durch einen Hochdruckhomogenisator. Dies hatte den Vorteil, dass größere Mengen an Zellsuspension ohne Problem aufgearbeitet werden konnten und somit eine angestrebte industriennahe Methodik entwickelt werden konnte. Die Ergebnisse aus beiden Zellzerstörungsverfahren konnten zu 100 % verglichen werden, so dass die Verwendung des HDH ohne Schwierigkeiten möglich war. Die restliche Methode von BÄUMER wurde ebenfalls modifiziert. Das Kochen der Paramylon-SDS-Lösung am Rückfluss bedeutet einen enormen Energieaufwand und so wurde hierfür nach einer Alternative gesucht. Diese konnte in Form der einfachen Bewegung der Lösung über Nacht auf einem Kreisschüttler bei 120 min^{-1} realisiert werden. Danach wurde mit der Aufarbeitung der Probe wie von BÄUMER beschrieben fortgefahren, lediglich wurde zum Trocknen ein Vakuumtrockenschrank mit einer Temperatur von 60 °C verwendet.

Da die Verwendung von Aceton als Reinigungsmittel mit gewissen Problemen belastet ist (entflammbar, gesundheitsschädlich, benötigt bestimmte Voraussetzungen zur Lagerung und Handhabung), wurde nach Alternativen gesucht, um die Verwendung von Aceton zu umgehen. 1975 beschrieb SCHWARTZBACH eine Methode zur Aufarbeitung von Paramylon mit einer 1 % (w/v) SDS-Lösung, versetzt diese jedoch zusätzlich mit 5 % (w/v) $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung. Das $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ dient in dieser Lösung der Abpufferung zweiwertiger Ionen

(persönliche Rücksprache mit Prof. SCHWARTZBACH) und inhibiert somit die meisten abbauenden Enzyme, so dass das Paramylon selbst auch nicht durch Organismen eigene Enzyme bei der Aufarbeitung abgebaut wird. Dieser Effekt ist jedoch so gering, dass er vernachlässigbar ist. In dieser SDS-Na₂-EDTA-Lösung wird das abzentrifugierte Pellet nach der Zellertrümmerung aufgenommen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Paramylon wurde durch 10 min. Zentrifugation bei 1000g wieder gewonnen. Die SDS-Na₂-EDTA-Behandlung wurde danach wiederholt und das Pellet wurde dann zweimal mit heißem demineralisiertem Wasser (70 °C) gewaschen. Nach dem zweiten Waschen mit demineralisiertem Wasser wurde das Paramylon auf einem Glasfaserfilter abgesetzt und über Nacht bei 90 °C bis zur Gewichtsbestimmung getrocknet.

Darauf aufbauend wurde zunächst eine Reihe an Reinigungsschritten mit Enzymen, anderen Lösungsmitteln und heißem Wasser durchgeführt.

Tab. 4.18: Aufreinigung nach der Zellerstörung mit Enzymen und heißem Wasser. Alternative Verwendung einer Ultraschallsonde (= US) zur HDH. [* erst 2 Stunden Alkalase, dann Zugabe von Lipozym]

Enzym	Menge [% v/v]	T [°C]	t [h]	V _L [ml]	DW [g/l]	Reinigung
Alkalase	1,50	55	2	130	128,1	6 X H ₂ O 2 X CH ₃ OH
Alkalase + Lipase	1,50 + 1,50	40	2	120	140,0	6 X H ₂ O
Alkalase + Lipozym	2,00 + 3,50	40	2	160	107,4	12 X H ₂ O heiß 1 X C ₂ H ₅ OH
Alkalase + Lipozym	2,00 + 3,50	50	3	160	117,8	9 X H₂O heiß
Alkalase + Lipozym	2,00 + 3,50	55	2	130	117,8	9 X H ₂ O heiß
Alkalase + Lipozym*	2,50 + 3,50	50	2+2	150	162,45	9 X H ₂ O heiß
US (10 min / Int. 2) – ohne Enzym				150	108,65	9 X H ₂ O heiß 2 X C ₂ H ₅ OH
Alkalase + Lipozym + US (10 min/Int. 2)	2,50 + 3,50	50	3	130	108,65	4 – 5 X H ₂ O heiß

Die Verwendung von Enzymen anstatt von 1 % SDS-Lösung war angedacht worden, um die mögliche Problematik von SDS-Rückständen im Produkt zu verhindern. Wie aus Tabelle 4.18 hervorgeht, war es zwar möglich mit Alkalase und Lipozym (rot hervorgehoben) zu einem der SDS-Behandlung vergleichbaren Ergebnis zu kommen, jedoch musste neun Mal mit heißem Wasser gewaschen werden, um die Enzymrückstände wieder gänzlich aus dem Paramylon zu entfernen. Andererseits zeigte diese Versuchsreihe auf, dass es möglich war ganz auf die Verwendung von Lösungsmitteln zu verzichten.

Da sich nach diesen Versuchen herausstellte, dass die Verwendung und Entfernung von SDS genauso leicht möglich war, wurde auf die Verwendung von Enzymen aus Kostengründen

verzichtet. Die Verwendung der bisherigen Methodik mit SDS-Lösung wurde beibehalten, nur die Aufreinigung des Paramylons wurde nun nicht mehr mit Aceton durchgeführt, sondern mit heißem Wasser (vier Mal).

Aber auch diese Methode wurde zum Ende des Projekts weiterentwickelt und so kam es zu einer neuen Wendung im Aufarbeitsverfahren, als direkt nach der Zellzerstörung mehrere Reinigungsschritte mit demineralisiertem Wasser durchgeführt wurden.

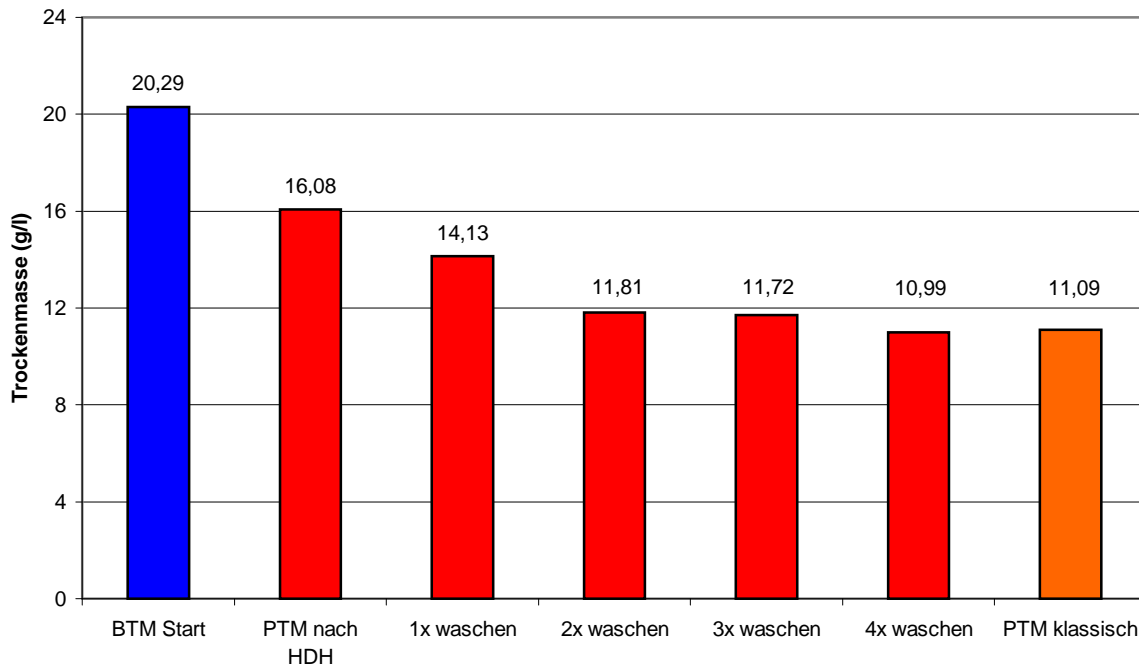


Abb. 4.89: Aufarbeitung von BTM (blau) durch HDH. Durch anschließendes Zentrifugieren und Waschen in mehrmaligen Schritten konnte die Biomasse ganz vom Paramylon (rot) getrennt werden.

Wie Abbildung 4.89 zeigt, wurde eine Probe mit einer BTM von 20,29 g/l mittels HDH aufgearbeitet. Direkt danach wurde ein Teil abzentrifugiert und die Trockenmasse wurde bestimmt (PTM nach HDH). Hieran ist zu erkennen, dass ungefähr 40 % der Zelltrümmer alleine schon durch die Zellerstörung vom Paramylon abgetrennt werden konnten. Durch mehrfaches Waschen und zentrifugieren konnte der Anteil an Zelltrümmern im Paramylon-Pellet soweit minimiert werden, dass der erreichte Wert dem einer Bestimmung mit SDS (= PTM klassisch) gleicht. Das nach vierfachem Waschen mit demineralisiertem Wasser erhaltene Paramylon ist optisch von gleichem Weißegrad wie das mit SDS aufgearbeitete Paramylon. Bei mehrfachem Waschen des Paramylons mit Wasser kann es natürlich nach dem Zentrifugieren immer zu geringen Verlusten an Paramylon kommen (dekantierendes Abgießen des Überstandes), diese Verluste sind aber, wie hier erkennbar wurde,

verschwindend gering (0,1 g/l). Eine Messung des Glucosegehalts der vierfach gewaschenen Proben mit der Methode nach CLARKE und STONE ergab einen Glucosegehalt von nahezu 100 %, ähnlich den Ergebnissen aus der Aufarbeitung mit SDS-Lösung.

Somit konnte zum Ende des Projektzeitraums noch eine neue Methode zur Aufreinigung des Paramylons entwickelt werden, welche auch mögliche Ansätze für eine Umsetzung im industriellen Maßstab gibt.

4.3.3 Nachweis / Reinheit des Paramylons

Das von *Euglena gracilis* als Speicher für Kohlenhydrate produzierte Paramylon (Abb.4.90) besteht zu 100 % aus Glucosemolekülen, die linear β -glykosidisch untereinander verbunden sind.

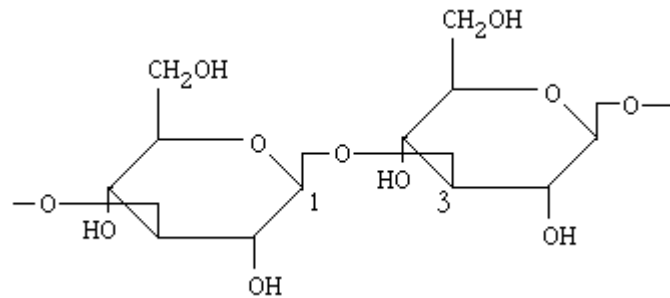


Abb. 4.90: Beta-1,3-glykosidische Verbindung von Glucosemolekülen. Ausschnitt aus einem Paramylonmolekül.

Das aus der Fermentation von *Euglena gracilis* durch Aufarbeitung stammende weiße Pulver sollte deshalb zu 100 % aus Glucose bestehen, wenn es sich tatsächlich um ein β -1,3-Glucan (Paramylon) handelt. Da sich Paramylon nicht in Wasser und eigentlich nur gut in Natronlauge löst, wurde eine alternative Möglichkeit der Glucosebestimmung gesucht, da herkömmliche Tests immer in Wasser als Lösungsmittel arbeiten. Eine Methode von CLARKE und STONE [aus BARNAS und CLARKE; Carbohydrate Composition and Metabolism in *Euglena*, New York: Academic Press, 1960] wurde hierfür verwendet.

Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode zu verdeutlichen wurde mit ausgesuchten, optisch reinen Proben von Paramylon aus der Fermentation in KFW gearbeitet. Ein Vergleich der eingewogenen Menge an Paramylon und der später mit der Glucosebestimmung durch das Super_{GL} ambulance von RLT gemessenen Ergebnisse des Glucosegehalts wurde durchgeführt. Drei Paramylonproben aus unterschiedlichen Fermentationen wurden verwendet, um eine möglichst breite Basis für diese Untersuchung zu bieten. Insgesamt wurden 16 Messungen durchgeführt und die Ergebnisse sind in Abbildung 4.91 dargestellt worden.

Da nicht auszuschließen war, dass das verwendete Paramylon einen gewissen Wassergehalt hat, wurde hier Paramylon verwendet, welches direkt aus dem Vakuumtrockenschrank kam. Dies scheint auch sinnvoll, da einige Wochen gelagertes Paramylon einen Wassergehalt von bis zu 7 % haben kann. Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurde die Probe einer Feuchtigkeitsbestimmung unterzogen (2 Stunden bei 130 °C).

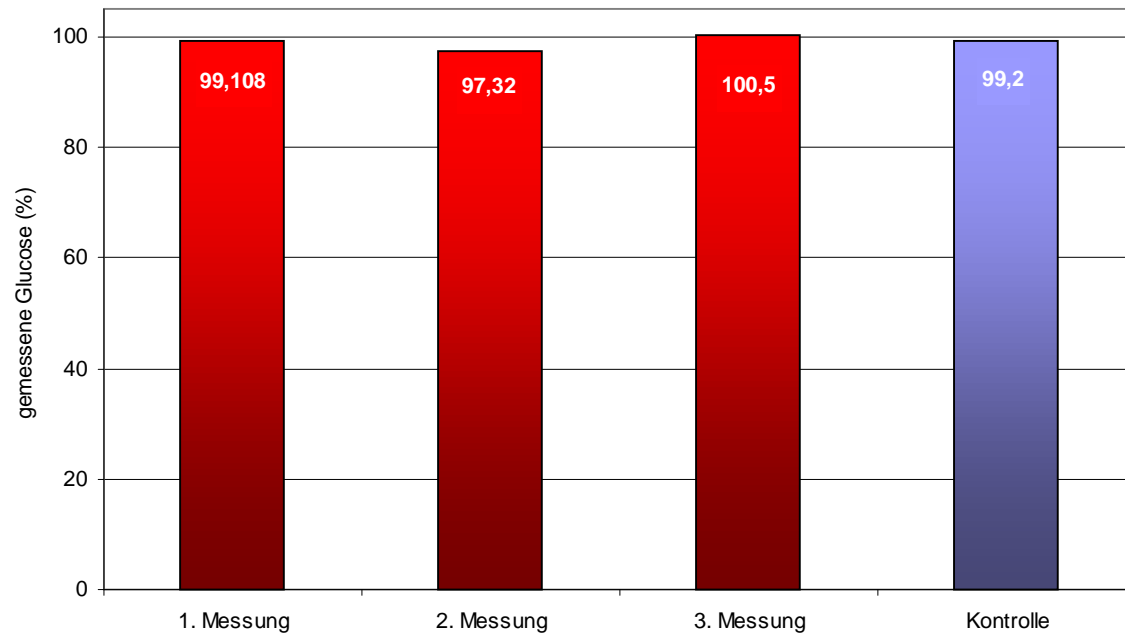


Abb. 4.91 Ergebnisse der Glucosemessung aus Paramylon und einer Kontrolle mit Glucose (Einwaage 1 g) nach der Methode von CLARKE und STONE, abgewandelt von FELSKI, 2002.

Die angewandte Methode liefert somit eine Genauigkeit bezogen auf die eingewogene Menge an Paramylon von 99 %. Dass über die hier dargestellten Messungen keine 100 % Genauigkeit gefunden werden konnten, ist auf die üblichen Fehlerquellen bei solch einer Bestimmung zurückzuführen. Pipettierfehler bei der Vorbereitung der Proben und Messfehler des Glucosemessgeräts sind die wohl wahrscheinlichsten Quellen für diese geringe Ungenauigkeit. Trotzdem bestätigen diese Untersuchungen die Behauptungen von BUETOW (1966), SCHWARTZBACH (1967, 1980) und BÄUMER (1999), dass es sich bei dem nach der Aufreinigung erhaltenen weißen Pulver um Paramylon, das Speicherkohlenhydrat von *Euglena gracilis* handelt.

4.3.4 Einsatz von SDS zur Aufreinigung des Produkts Paramylon

Nachdem die abgeernteten *Euglena gracilis* -Zellen durch Ultraschall oder HDH zerstört worden sind, werden die restlichen Proteine und Zellrückstände mit SDS-Lösung versetzt, geschüttelt (150 min^{-1}) und verbleiben ca. 24 Stunden in dieser Lösung. Da bisher immer 100 ml 1%ige SDS Lösung zum Aufarbeiten von Biomasse aus 100 ml Fermentationsbrühe verwendet wurde, sollte nun überprüft werden, ob dieses Volumen minimiert werden kann.

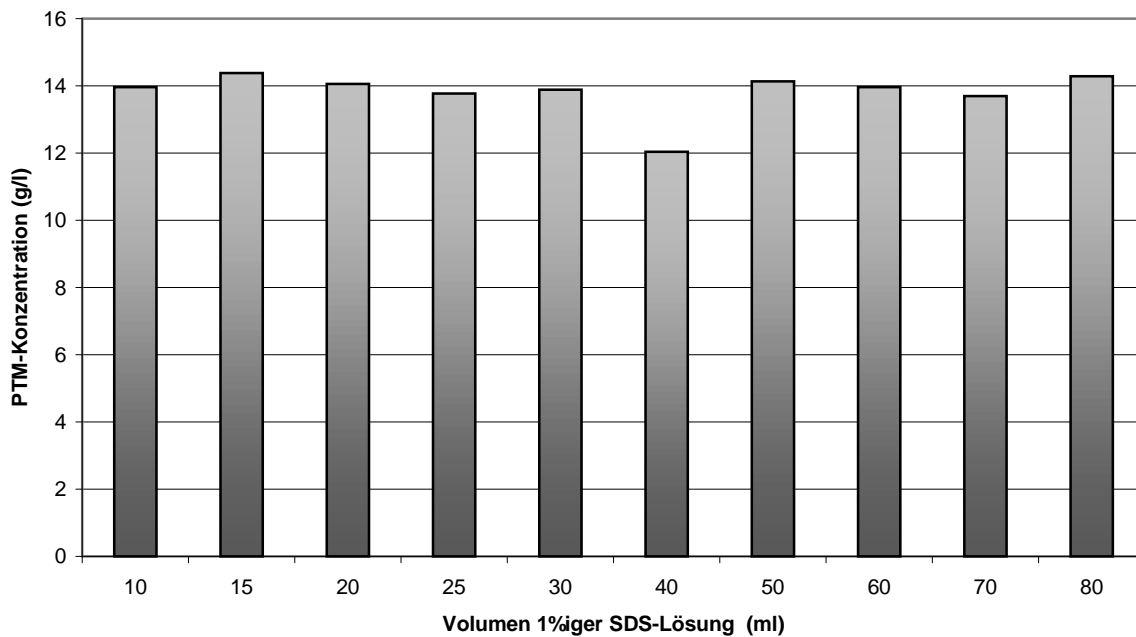


Abb. 4.92: Aus Schüttelkolbenversuchen mit NL und 25 g/l Glucose bei 25 °C aufgearbeitetes Paramylon mit unterschiedlichen Volumina an 1% SDS. Schon 10 ml SDS sind ausreichend, um die Rückstände zu entfernen.

Aus Abbildung 4.92 wird deutlich, dass schon 10 ml 1%iger SDS-Lösung ausreichend sind, um die Biomasse (aufkonzentriert auf ca. 22 g) aus 100 ml aufzuarbeiten. Die Konzentration von 1% SDS-Lösung hat sich in einem weiteren Versuch als am sinnvollsten erwiesen. Höhere SDS-Konzentrationen ergaben keine höhere Ausbeute und niedrigere erlaubten es nicht, die Biomasse sauber vom Paramylon abzutrennen.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die eingesetzte SDS-Lösung wiederverwendet werden kann. Zu diesem Zweck wurde wieder die Biomasse aus 100 ml Fermentationsbrühe je Ansatz eingesetzt. Beim Einsatz von 100 ml 1%iger SDS-Lösung konnte man diese Lösung dreimal wiederverwenden und somit insgesamt 4 Proben aufarbeiten. Bei der dritten Verwendung der SDS-Lösung zeigte sich jedoch schon eine Klumpenbildung im aufgereinigten Paramylon, die auf eine Verunreinigung hindeutet. Insgesamt zeigt sich aber, dass die SDS-Lösung bedingt wiederverwertbar ist. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass

hierbei 100 ml der SDS-Lösung zum Einsatz kommen und bei einmaliger Verwendung von SDS nur 10 ml nötig sind. Bei einer Verwendung von 10 ml 1%iger SDS-Lösung für die Aufarbeitung von 100 ml Fermentationsbrühe ist es nicht möglich die SDS-Lösung wiederzuverwerten, da sie keine reinigende Wirkung mehr zeigt.

5 Zusammenfassung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Produktion von reinem Paramylon durch *Euglena gracilis* in konditioniertem Kartoffelfruchtwasser als Mediumsgrundlage. Durch Aufarbeitung und Zugabe von Glucose als Kohlenhydratquelle konnten ähnliche Ausbeuten an Paramylon erzielt werden, wie dies auch mit chemisch definiertem Medium der Fall ist.

Das aus der Kartoffelstärkegewinnung stammende Nebenprodukt Kartoffelfruchtwasser konnte durch die Verwendung einfachster Methoden (erhitzen, filtrieren und sterilisieren) und durch die Zugabe einer zusätzlichen Kohlenhydratquelle zumindest im Labormaßstab einfach hergestellt werden. Durch die unterschiedlich starke Verdünnung des KFW konnten verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten und Ausbeuten an Biomasse und Paramylon erzielt werden.

Die im Labormaßstab erzielten Ausbeuten an Paramylon lassen den Schluss zu, dass durch ein Scale-Up auf Industriemaßstab eine marktwirtschaftlich akzeptable Fermentation möglich ist. Dafür sprechen auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der semikontinuierlichen Fermentation über fünf Wochen. Des weiteren ist von Vorteil, dass bis auf die zusätzliche Kohlenstoffquelle in Form von Glucose keine weiteren kostenintensiven Zusätze wie Vitamine zugesetzt werden müssen. Unter normalen Laborbedingungen war auch die Sterilität der Fermentation über mehrer Wochen kein Problem.

Die Ernte der Biomasse und die Aufarbeitungsschritte, um an das in den Zellen enthaltene Paramylon zu gelangen, sind technisch gut durchführbar. Im Labormaßstab konnte mit Laborzentrifugen gearbeitet werden, so dass auch eine Verwendung von Separatoren für den industriellen Standard ohne Probleme möglich zu sein scheint (persönliche Korrespondenz mit H. RYLL, Universität Hannover).

Durch die im Laufe des Projekts entwickelte Methode der Paramylonaufreinigung ist es nun leicht möglich, das von *Euglena gracilis* als Reservekohlenhydrat produzierte Paramylon zu extrahieren und aufzureinigen. Durch das mehrfache Waschen direkt nach dem Aufbrechen der Zellen konnten große Mengen an organischen Bestandteilen und anderen Zelltrümmern vom Paramylon separiert werden. Die Verwendung von SDS-Lösung zum Entfernen der verbleibenden organischen Substanzen zeigte sich als am unproblematischsten. Der Einsatz von Enzymen zum Abbau der Zelltrümmer nach der Zerstörung der Zellen durch Hochdruckhomogenisation wurde erprobt, jedoch aufgrund des höheren Arbeitsaufwandes im Vergleich zur Aufarbeitung mit SDS verworfen.

Als Schlusssatz ist noch zu erwähnen, dass bei der hier verwendeten Methode keine schädlichen Abwässer entstehen und die Konditionierung und Aufarbeitung für einen Einsatz in der Industrie sehr geeignet erscheinen.

Aber neben den äußerst positiven Ergebnissen sind auch ein paar wenige Probleme aufgetreten. Für einen industrienahen Produktionseinsatz ist es sicherlich von Nachteil, dass die Qualität des Kartoffelfruchtwassers stark im Laufe einer Kampagne und von Kampagne zu Kampagne schwankt. Daraus resultierten in dieser Arbeit unterschiedliche Qualitäten des konditionierten KFW (z. B. änderte sich der Proteingehalt im Laufe des Projekts sehr stark), was zu Schwankungen in den Ausbeuten während der Fermentation führte.

Auch die Abhängigkeit von dem Kampagneprodukt Stärkekartoffel ist als negativer Aspekt zu sehen. Eine Arbeit mit KFW über das ganze Jahr ist nur dann möglich, wenn das KFW entweder gelagert oder auf alternative Medien zurückgegriffen werden kann.

6 Literatur

BARNAS und CLARKE, 1960. Carbohydrate Composition and Metabolism in *Euglena*, Academic Press, New York.

BARRAS und STONE, 1965. Carbohydrate composition and metabolism in *Euglena*. The Biology of *Euglena*, Vol. II, Buetow, D. E., ed.), pp. 149-187. Academic Press, New York.

BARRY, S. C., 1962. J. Protozool. 9, 395.

BÄUMER, D., 2000, Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthese aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa), 171 Seiten auf 2 Mikrofiches, Reihe Biologie, Band 212, 200 ISBN 3-8288-0866-2

BARSANTI, L., VISMARA, R., PASSARELLI, V. UND GUALTIERI, P., 2001. Paramylon-content in wild type and WSZL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. Journal of Applied Phycology. 13: 59-65. Kluwer Academic Publishers.

BELSKY, 1957. Bacteriol. Proc. 57 (Seite 47),123.

BERGTER, F., 1983, Wachstum von Mikroorganismen : Experimente u. Modelle . - 2., überarb. Aufl. . - Weinheim [u.a.] : Verl. Chemie

BOX, G. E. P., DRAPER, N.R., 1987: Emperical Model-Building and Response Surfacees, John Wiley & Sons.

BUETOW, D. E., 1968, The biology of *Euglena*, Vol. II, Biochemistry, Academic Press, New York and London, 159-161.

CANTER-LUND, H. / LUND, J.: Freshwater algae - their microscopic world explored. Biopress 1995, 360p. 0-948737-25-5. Pds. 50.

CAVALIER-SMITH, 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiological Reviews 57: 953-994.

CIRILLO, V. P., 1961. Sugar transport in Microorganisms, *Ann. Rev. Microbiol.* 15, 197.

COOK, J. R. und HEINRICH, B., 1965, Glucose vs. Acetate Metabolism in *Euglena*. *J. Protozool.* 12(4), 581-584.

CRAMER, L. und MYERS, J., 1952, Growth and photosynthetic characterization of *Euglena gracilis*. *Arch. Mikrobiol.* 17, 384-402.

DAMERVAL, J.E., GUILLIOUX, M., BLAISOMEAU, J., VIENNE, D., 1987, Simplification of Heukeshoven and Derrik's silver stain of proteins. *Electrophoresis.* 8, 158-159.

GIBBS, S. P., 1981. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Annals of the New York Academy of Sciences* 361: 193 -207.

HÄDER et al., 1997. The Erlanger flagellate test (EFT): photosynthetic flagellates in biological dosimeters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 40: 23-28.

HOSOYA und KITAOKA, 1977. Determination of the nutritive value of *Euglena gracilis* protein by in vitro digestion experiments and rat feeding tests. *Journal of the Agricultural Chemistry Society of Japan* 51: 483-488.

HURLBERG und RITTENBERG, 1962 . *J. Protozool.* 9, 170.

HURLBERT, R. E. und BATES, R. C., 1971 Glucose Utilization by *Euglena gracilis* var. *bacillaris* at Higher pH. *Journal of Protozoology*, 18(2), 298-306.

HUTNER *et al.*, 1966. In „Methods in Cell Physiology“, Vol. 2, S217. Academic Press, New York.

HUTNER und PROVASOLI, 1951. In „Biochemistry and Physiology of Protozoa“, Vol. 1, S27. Academic Press, New York

HUTNER, S. H., ZAHALSKY, A. C., AARONSEN, S., BAKER, H. FRANK, O., 1966. Culture media for *Euglena gracilis*. Methods Cell. Physiol. 2, 217-228.

JEZEQUEL, 1998. Curdlan: A new functional β -Glucan. Cereal Foods World 43: 361-363.

KAHLON, T.S., et al., 1993. Cholesterol-lowering effects in Hamsters of β -Glucan-enriched Barley fraction, dehulled whole Barley, Rice Bran, and Oat Bran and their combinations, Cereal Chemistry 70: 435-440.

KISS, J. Z., AUREA, C. VASCONCELOS, A. C. & TRIEMER, R.E., 1987, Structure of the euglenoid storage carbohydrate paramylon. Amer. J. Bot. 74(6), 877-882.

KLEBS, G., 1883, In: The Biology of *Euglena*, BUETOW, D.E. (eds.), Vol. II, Biochemistry, , Academic Press New York and London, 159.

KLOPFENSTEIN, C. F., 1988, The role of cereal beta-glucans in nutrition and health, Cereal Foods World 33: 865-869.

KNUCKLES, B. E., HUSON, C. A., CHIU, M. M. and SAYRE, R. N., 1997. Effect of beta-Glucan Barley Fractions in High-Fiber Bread and Pasta. Cereal Foods World 42: 94-99.

KOREN und HUTNER, 1967. High yield media for photosynthesizing *Euglena gracilis* Z. Journal of Protozoology 14 (supplement): 17

KUPFER, H., 1989, SuB Heft 5/85, Seite III-13 ; FÜLGRAFF, Georges: Lebensmitteltoxikologie, UTB-Verlag.

LEEDALE, G. F., 1978. Phylogenetic criteria in eugleoid flagellates. BioSystems 10: 183-187.

LEEDALE, G. F., 1964; In: The Biology of *Euglena*, BUETOW, D.E. (eds.), Vol. II, Biochemistry, , Academic Press New York and London, 159.

LWOFF und DUSI, 1934. La suppression expérimentale des chloroplastes chez *Euglena mesnili*. C R Soc. Biol. Paris 119: 1092-1095.

MUTZALL, K., 1991, Einführung in die Fermentationstechnik, Behr's Verlag, S. 251 ff

NOMA und ASAKAWA, 1998. *Euglena gracilis* Z.: biotransformation of terpenoids and related compounds. *Biotechnology in Agriculture Forestry* 41: 194-237.

PALMER, 1969. A composite rating of algae-tolerating organic pollution. *Journal of Phycology* 5: 78-82.

OLAVESON, M. M., NALEWAJKO, C., 2000. Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologica* 433: (1-3) 39-56.

PRINGSHEIM, E.G. 1955. Über *Ochromonas danica* n. sp. und andere Arten der Gattung. *Arch. Mikrobiol.* 23:181-92.

QUADER, 1983, unveröff. (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d25/14.htm>)

QUESADA, L. A., de LUSTIG, E.S., MARECHAL, L. R. & BELOCOPITOW, E., 1976, Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice. *Gann.* 67, 455-459.

RACUSEN, D. und FOOTE, M., 1980. A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Biochemistry* 4 (1980) 43-52. Food & Nutrition Press, Inc., Westport, Connecticut.

RAY, K., und LEVANDOWSKY, M., 2000. Chemosensory Responses of *Euglena* to Amino Acids, Amines and Potential Carbon Sources. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53rd Annual Meeting, June 25-28, 2000.

SAITÔ, H., YOSHIOKA, Y., YOKOI, M. and YAMADA, J., 1990. Distinct gelation mechanism between linear and branched (1,3)- β -D-glucans as revealed by high-resolution solid-state ^{13}C -NMR. *Biopolymers* 29: 1689-1698.

SHIGEOKA, S., ONISHI, T., NAKANO, Y. und KITAOKA, S., 1986. Requirement for Vitamin B₁ for growth of *Euglena gracilis*. *Journal of General Microbiology*, 133, 25-30.

SOGIN et al, 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83: 1383-1387.

SOMMER und BLUM, 1965, In: The Biology of *Euglena*, BUETOW, D.E. (eds.), Vol. II, Biochemistry, Academic Press New York and London, 159.

STROOT, S., 1991, Dissertationsschrift: Eine praxisbezogene Labormethode zur Ermittlung der Wirksamkeit von Pektinasen für die Sekundärmembran-Minderung bei Membrantrenn-Prozessen. Universität Oldenburg.

SUMIDA, S., EHARA, T., OSAFUNE, T. und HASE, E., 1987, Ammonia- and lightinduced degradation of paramylum in *Euglena gracilis*. Plant. Cell. Physiol. 28(8), 15787-1592.

TAKEYAMA, H., KANAMARU, A., YOSHIO, Y., KAKUTA, H., KAWAMURA, Y. und MATSUNAGA, T., 1996. Production of Antioxidant Vitamins, β -Carotene, Vitamin C and Vitamin E by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 53, Pp. 185-190. John Wiley & Sons, Inc.

TANI et al., 1987. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. Agricultural and Biological Chemistry 53: 305-312.

TANI und TSUMURA, 1989. Liquid wax ester production by *Euglena gracilis*. Agricultural and Biological Chemistry 51: 225-230.

TAYLOR, 1960a. Proc. Roy. Soc. B151, 400.

TAYLOR, 1960b. Proc. Roy. Soc. B151, 483.

WAYGOOD et al., 1980 Purification and reclamation of farm and urban wastes by *Euglena gracilis*: photosynthetic capacity, effects of pH, temperature, acetate and whey. Environmental Pollution (Series A) 23: 179-215.

WOLKEN, 1961. „*Euglena*. An Experimental Organism for Biochemical and Biophysical Studies.” Rutgers Univ. Press, New Brunswick, New Jersey.

YADEN, 1965. Ph. D. Thesis, Univ. of Minnesota, Minneapolis, Minnesota.

YRJÖ MÄLKKI et al., 1992. Oat Bran Concentrates: Physical properties of β -Glucan and hypocholesterolemic effects in rats, *Cereal Chem.* 69(6): 647-653.

7 Schriftenverzeichnis

Betsche, T., Fretzdorff, B., Kersting, H. J., Darwish, S., Felski, M., Mack, H. und Flaschel, E.: Wertschöpfende Nutzung von Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelprotein – High gain commercial utilisation of potato juice and potato protein with regard to environmental protection. Internetpublikation, http://www.bagkf.de/Jahresberichte/index_1999.htm

Felski, M.; Betsche, T.; Flaschel, E.; Lotz, M.: Kartoffelfruchtwasser als nachwachsender Rohstoff für biotechnologische Verfahren. 2. Workshop Biokonversion nachwachsender Rohstoffe 1999; FAL Braunschweig, S. 33

Felski, M.; Betsche, T.; Flaschel, E.; Lotz, M.: Kartoffelfruchtwasser als biotechnologisches Medium für die fermentative Gewinnung von Paramylon und sekundären Pflanzenstoffen aus Einzellern. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung/DGQ. Vortragstagung 35. 2000 (2001) S. 157-161 (7323)

Felski, M.; Betsche, T.; Flaschel, E.; Lotz, M.: Vom Abfallstoff zum Wertstoff - Kartoffelfruchtwasser als biotechnologisches Medium für die fermentative Gewinnung von Paramylon. 19. DECHEMA-Jahrestagung 2001. Posteraustellung

Felski, M., Flaschel, E., Friehs, K., Santek, B., Lotz M.: Fermentation von *Euglena gracilis* in konditioniertem Kartoffelfruchtwasser (KFW) mit dem Ziel der Paramylon-Produktion / Mikroorganismen / Fermentation / *Chemie Ingenieur Technik* 2002, 74, No. 5, 600-601

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Michael Felski
Geburtsdatum- und ort	12.12.1968 in Detmold
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1975-1979	Grundschule Bachschule in Detmold
1979-1985	Heinrich-Drake-Realschule in Detmold
1985-1988	Stadtgymnasium in Detmold abgeschlossen mit Abitur

Bundeswehr

1988-1989	Grundwehrdienst
-----------	-----------------

Berufsausbildung

1989-1991	BTA-Ausbildung an der höheren Berufsfachschule des HSK in Olsberg mit Abschluß
-----------	--

Berufliche Tätigkeiten

1991-1992	Arbeit als BTA an der BAGKF Detmold
1998-1999	Arbeit als wiss. Mitarbeiter an der BAGKF Detmold

Studium

1992-1998	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
1997-1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ökologie der Biologischen Fakultät der Universität Bielefeld, Abschluß: Diplom-Biologe
2000-2003	Promotion am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, Abschluß: Dr. rer. nat.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2000 bis Juli 2003 in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die wissenschaftliche Betreuung und seine Gesprächsbereitschaft.

Herrn Privat-Dozent Dr. Karl Friehs danke ich für seine fachliche Unterstützung, für die stete Gesprächsbereitschaft und die vielen hilfreichen Tipps.

Dem Industriepartner, der Emsland Stärke GmbH und dort insbesondere Herrn Dr. Martin Lotz gilt mein besonderer Dank, da ohne die Zusammenarbeit, Hilfe und Unterstützung ihrerseits diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei allen Mitgliedern der AG Fermentationstechnik bedanke ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und für die gute Laboratmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Ing. Thomas Schäffer, der mich immer wieder gerne bei den Fermentationen unterstützt hat. Außerdem danke ich Frau Galina Beck für ihre Mitarbeit an diesem Projekt, ohne die vieles nicht so gelaufen wäre.

Herrn Doktor Božidar Šantek vom Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, Kroatien gilt mein herzlichster Dank, denn ohne sein fachliches Wissen und seine immerwährende Bereitschaft für neue Experimente, würde ich immer noch im Labor stehen.

Außerdem danke ich ganz besonders Herrn Dipl. Inform. Frank Bettenworth für die Hilfe in Computerfragen, Herrn Dipl. Phys. Matthias Fricke für die Hilfe bei diversen mathematischen Problemen und zu guter letzt Herrn Dipl. Biol. Olaf Brockmann-Gretza für die vielen fachlichen Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern, die mir durch ihre in jeder Hinsicht tatkräftige Unterstützung das Studium und die Promotion ermöglicht haben.