

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN
DEPARTMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT INSTI-
TUT FÜR CHEMIE UND BIOTECHNOLOGIE

Praktikumsbericht Batchverfahren mit *S. cerevisiae*

Von:

Bettina Kritzer

Livio König

Nurdzane Memeti

Bachelor Studiengang 2016

Studienrichtung Biotechnologie

Abgabedatum: 10.05.2018

Fachkorrektoren:

Dr. Iris Poggendorf

Zusammenfassung

In der Biotechnologie ist *Saccharomyces cerevisiae*, auch Bäckerhefe genannt, ein beliebter Kultivierungsorganismus. Dadurch, dass die Bäckerhefe fakultativ anaerob ist und Diauxie betreiben kann, ist sie einfach kultivierbar und wird oft in grossen Mengen kultiviert. Um die Diauxie sichtbar zu machen, wird die Hefe oft in einem Batchverfahren kultiviert. In einem Batchverfahren werden während des Prozesses keine zusätzlichen Stoffe mehr beigegeben, es gehört zu den diskontinuierlichen Verfahren. Dieser Bericht beschreibt die Kultivierung von *S.cerevisiae* in einem Batchverfahren. Der Schwerpunkt lag in dem Praktikum darauf, den Bioreaktor kennenzulernen und eigenständig ein Batchversuch daran durchzuführen. Der Versuch wurde am Bioreaktor «Retrofit 5» während 12 Stunden durchgeführt. Alle 30, 45 oder 60 Minuten wurde eine Probe gezogen und OD-Wert, Biotrockenmasse und pH-Wert, sowie O₂ und CO₂ in der Abluft gemessen. Der Glucose- und der Ethanolgehalt wurde über HPLC bestimmt. Die maximale spezifische Wachstumsrate der Trockensubstanz betrug in der ersten Wachstumsphase 0.602 h⁻¹ und in der zweiten Wachstumsphase 0.09 h⁻¹. Die maximale spezifische Wachstumsrate des OD betrug 0.373 h⁻¹ und 0.117 h⁻¹. Der Ausbeutekoeffizient der Glucose ergab einen Wert von 0.433 gg⁻¹ und der Ausbeutekoeffizient von Ethanol 0.644 gg⁻¹.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Hintergrund	5
2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2	Batchverfahren	5
2.3	Diauxie	5
3	Methoden	6
3.1	Vorbereitung	6
3.2	Durchführung	6
3.2.1	Abweichungen	8
3.3	Aufräumen	8
4	Resultate	9
4.1	Wachstumskurve	9
4.2	pO ₂ -Kurve	10
4.3	Kohlenstoffdioxid im Abgas	11
4.4	Optische Dichte und Biotrockenmasse	12
4.5	Vergleich der Glucosebestimmungen	13
4.6	Vergleich der Ethanol- und Glucosekonzentrationen	14
4.7	Maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit	15
4.8	Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$	17
4.9	Sättigungskonstante K_s	19
5	Diskussion	20
5	Literaturverzeichnis	23
6	Abbildungsverzeichnis	23

1 Einleitung

Im Praktikum Bioverfahrenstechnik 2 wurde ein Batchversuch am Bioreaktor durchgeführt. Dafür wurde der Kultivierungsorganismus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Vor Kultivierungsstart wurde der Reaktor zusammengebaut, die pH-Sonde und die pO_2 -Sonde kalibriert, ein Druckhaltetest durchgeführt und eine Sterilisation durchgeführt. Weiter wurde das Medium D1% hergestellt und das Inokulum vorbereitet. Nach dem Start des Batchs wurde in 30 – 60-minütigen Abständen Proben genommen und analysiert. Je nach Verlauf des Versuches wurden nachträglich noch Kultivierungsparameter, wie Begasung oder Rührerdrehzahl, angepasst.

Im ersten Kapitel dieses Berichts wird kurz auf den Kultivierungsorganismus, das Batchverfahren, sowie auf die Diauxie eingegangen. Im zweiten Teil werden die Methoden des Versuches kurz aber reproduzierbar aufgezeigt. In den Resultaten werden die erhaltenen Daten ausgewertet und graphisch dargestellt und anschliessend im letzten Kapitel der Arbeit umfassend diskutiert.

2 Hintergrund

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, besser bekannt als Bäckerhefe, ist ein Modellorganismus in der Biotechnologie. Sie gehört zu den Eukaryoten und ist damit der Säugerzelle ähnlich, was sie in der Forschung und Produktion von rekombinanten Proteinen sehr interessant macht. Auch werden sie für die Biotransformation, sowie als Biomasse für die Lebensmittelproduktion verwendet. Ihr Vorteil liegt darin, dass sie, mit einer Generationszeit von circa 3 Stunden, sehr schnell wachsen. Auch haben sie ein gutes Expressionssystem und ihre Gensequenz ist bekannt. Da die Bäckerhefe zur Diauxie (siehe Kapitel 2.3 Diauxie) fähig ist, ist sie leicht zu kultivieren (Rohrer, 2017).

2.2 Batchverfahren

Das Batchverfahren ist ein geschlossenes und diskontinuierliches System. Anfangs werden das Medium und die Biomasse zugegeben, welche dann bis zum Ende ungehindert wachsen können. Während dem Prozess werden keine Medien- oder Biomassekomponenten mehr zugegeben oder entnommen. Der Batch ist zu Ende, wenn der Kultivierungsorganismus aufgrund einer Limitation einer oder mehrerer Mediumkomponenten nicht mehr wachsen kann. Das Produkt wird erst am Ende des Verfahrens gewonnen. Meistens sind komplett geschlossene Batchverfahren nicht realisierbar, da die Biomasse durch Stoffwechselvorgänge Gas produziert, muss ein Gasaustausch möglich sein. Die Prozesse werden deshalb oft nur für die Flüssigphase geschlossen, während die Gasphase offen bleibt (Eibl et al, 2017).

2.3 Diauxie

Als Diauxie bezeichnet man das zweiphasige Wachstum von chemotrophen Mikroorganismen. In Anwesenheit von zwei Kohlenstoffquellen in Medium, wird zuerst nur die einte Energiequelle abgebaut. Erst wenn diese komplett verbraucht ist, schaltet der Metabolismus des Mikroorganismus um und produziert Enzyme um auch die zweite Kohlenstoffquelle benutzen zu können. Während dieser Umstellung erkennt man in der Wachstumskurve eine kurze *lag*-Phase bevor die Biomasse weiter zunimmt. Im Falle dieses Praktikums hat die Hefe erst Glucose abgebaut, welche nach circa sieben Stunden verbraucht war. Nach einer kurzen Umstellphase verarbeitete die Hefe danach Ethanol als Kohlenstoffquelle (Eibl et al, 2017).

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die Materialien und Methoden beschrieben, welche für den Versuch verwendet wurden. Die Anleitung zu den beschriebenen Methoden befindet sich im Skript «Hygienesign, Containment und Qualitätssicherung einer aseptischen Anlage, Teil 1-4» (Eibl et al., 2017).

3.1 Vorbereitung

Die Vorbereitung des Batchversuches wurde an zwei Praktikumstagen durchgeführt.

Am ersten Tag wurde der Versuch theoretisch besprochen und im praktischen Teil der Reaktor auf Dichtigkeit und Mängel überprüft. Danach wurde der Reaktor zusammengebaut und alle Anschlüsse richtig verbunden. Durch einen Begasungs- und einen Druckhaltetest wurde das korrekte Zusammenbauen überprüft. Mit Hilfe dem Druckhaltetest wurde entdeckt, dass bei den einten Anschlüssen die Dichtungen vergessen wurden. Diese wurden nachträglich noch eingebaut und der Druckhaltetest nochmals durchgeführt.

Am zweiten Praktikumstag wurden die pH-Sonde und die pO_2 -Sonde gewartet und kalibriert. Danach wurde zur Sicherheit nochmals ein Druckhaltetest mit Wasser durchgeführt, bevor sterilisiert wurde. Für die Sterilisation wurden die entsprechenden Ventile geöffnet, damit der Schleichdampf austreten konnte.

3.2 Durchführung

Die Kultivierung wurde im Bioreaktor «Retrofit 5» während 12 Stunden durchgeführt. Vor Beginn des Versuches wurden alle Kultivierungsparameter nach Anleitung «Hygienesign, Containment und Qualitätssicherung in aseptischen Anlagen» (Eibl et al, 2017) eingestellt. Am Anfang des Prozesses wurde alle 60 Minuten eine Probe gezogen und analysiert. Zum Zeitpunkt des exponentiell wachsenden Glucoseverbrauches wurde nach 30 Minuten bereits die nächste Probe analysiert. Ab dem Zeitpunkt der Diauxie, als alle Glucose verbraucht war, wurde wieder auf eine Probe alle 60 Minuten umgestiegen. Die Proben wurden nach dem folgenden Schema in Abbildung 1 analysiert.

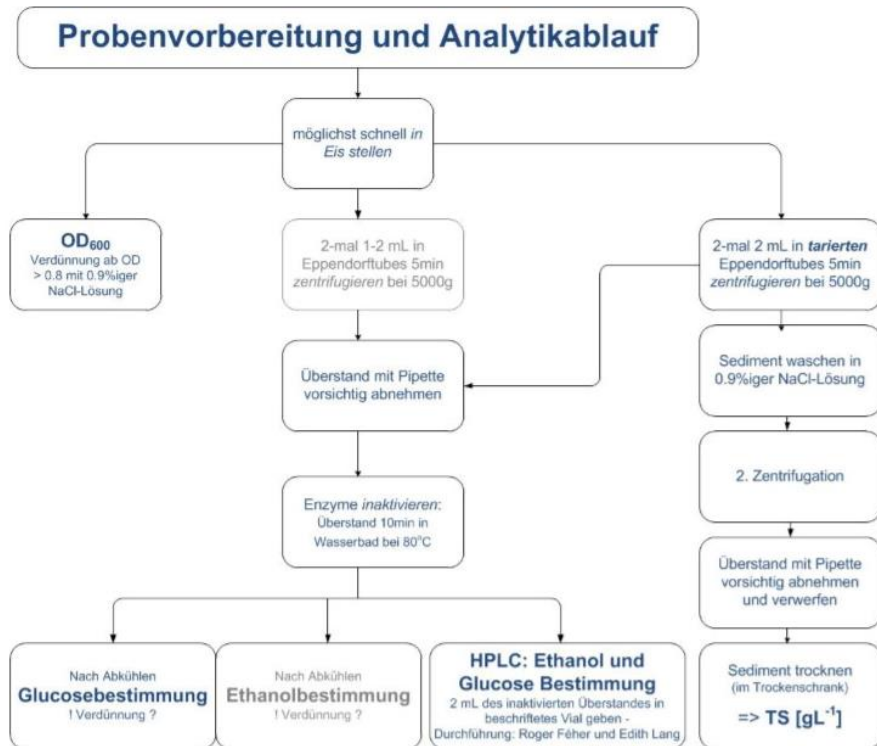


Abbildung 1: Anleitung zum Ablauf der Probenanalytik im Bioverfahrenstechnik2 Praktikum Kultivierung (Hahnemann & Poggendorf, 2017).

Bei der stündlichen Probenahme wurde erst ein Vorlauf von 10-20 ml abgelassen und die genaue Menge notiert. Der Vorlauf konnte danach weggeschüttet werden. Danach wurde die richtige Probe entnommen. Die Menge von 15-25 ml wurde notiert und die Probe kurz auf Eis gelegt. Nach der Probenahme wurde die Entnahmeverrichtung während 3 – 5 Minuten sterilisiert. Mit der Probe wurde der OD_{600nm} gemessen. Dabei musste die Probe soweit mit NaCl verdünnt werden, dass der OD-Wert nicht über 0.8 war. Die Verdünnungen im durchgeführten Versuch reichten von 1:1 bis zu 1:8. Mit der entnommenen Probeflüssigkeit wurden noch zwei tarierte und getrocknete Eppendorf-tubes mit 2 ml befüllt und für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in zwei neue untarierte Eppendorf-Tubes gegeben und für 10 Minuten ins Wasserbad bei 80°C inaktiviert. Währenddessen wurde das Pellet aus der Zentrifugation mit 1 ml NaCl gewaschen und nochmals während 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Tube mit dem Pellet in den Trockenschrank gelegt. Der Überstand aus dem Wasserbad wurde dafür verwendet ein Vial für die Ethanol- und Glucosebestimmung via HPLC vorzubereiten. Auch wurde mit dem Überstand eine offline Glucosemessung im Bioprofile YSI vorgenommen.

3.2.1 Abweichungen

Die Kalibration der O₂-Sonde wurde nach der Sättigung des Kulturmediums mit Sauerstoff versäumt. Somit stimmt die 100% Sauerstoffsättigung des Kultivierungsmedium nicht überein mit den Prozentangaben in der abgebildeten Grafik. Die Prozentangaben sind somit nur relativ und nicht absolut zu interpretieren.

Durch ein Missverständnis wurde anfangs eine Begasung von 1 L/min eingestellt. Erst nach der zweiten Probenahme wurde der Fehler bemerkt und behoben. Die Abweichung ist durch einen Ausreisser in der CO₂-Grafik klar erkennbar (Abbildung 4).

Bei der Probenahme 14 wurde der Überstand der zentrifugierten Röhrchen im Wasserbad bei 80°C vergessen. Dadurch konnte mittels HPLC keine Ethanolkonzentration mehr gemessen werden. Dieser fehlerhafte Wert wurde aus allen Diagrammen gestrichen.

Die Inaktivierung des Batchs wurde zu früh vollzogen. Es wurde nicht abgewartet bis die Hefezellen vollständig das zweite Substrat aufgebraucht haben. Dadurch ist der abschliessende Peak in der ersichtlichen Grafik vom Kohlenstoffdioxid im Abgas abgeschnitten.

3.3 Aufräumen

Der Batchversuch wurde inaktiviert. Dabei wurde ein Heizprogramm über die Steuerungssoftware angewählt. Dabei wurde das Kultivierungsmedium auf 80°C erhitzt. Die Hefezellen sterben somit ab. Das Kultivierungsmedium wurde abgelassen und entsorgt. Der Reaktor abgebaut und mit Reinstwasser ausgespült. Die angeschlossenen Sonden und Gerätschaften am Reaktor wurden abgebaut und gereinigt. Größere Verunreinigungen und Verfärbungen wurden entfernt. Die Kühlwasserschläuche, Schläuche für den Lufteintrag und Abluft wurden entfernt. Der Arbeitsplatz wurde aufgeräumt hinterlassen.

4 Resultate

In diesem Kapitel werden die Daten des Batchversuches ausgewertet und graphisch dargestellt. Bei jeder Probenahme werden folgende Parameter bestimmt: OD₆₀₀-Messung, Biotrockenmasse, pO₂, pH, O₂ und CO₂ in der Abluft, Ethanol- und Glucosekonzentration. Die Glucosekonzentration wurde mit dem Bioprofile YSI, sowie über HPLC bestimmt. In folgenden Unterkapiteln werden die Daten ausgewertet und in Diagrammen dargestellt.

4.1 Wachstumskurve

Die Kultivierung der Hefe, auch *Saccharomyces cerevisiae* genannt, wurde während 12 Stunden durchgeführt. In der folgenden Abbildung (Abbildung 2) sind die Wachstumskurve und die gemessenen Parameter nach der Zeit ersichtlich. Der Kultivierungsprozess wurde in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase findet ein logarithmisches Wachstum der Hefe mit Hilfe von Glucose als Kohlenstoffquelle statt. In der Erholungsphase, hier lag-Phase, findet kein Biomassenwachstum statt, da die Kohlenhydrate aufgebraucht und die Bäckerhefe sich auf das neue Substrat umstellen musste. Das zweiphasige Wachstum der *S. cerevisiae* zwei verschiedene Energiequellen zu verwenden, nennt man Diauxie. Die zweite Wachstumsphase ist durch einen fermentativeren Stoffwechsel gekennzeichnet. Auffallend ist der Peak am Anfang, welcher während der Durchführung korrigiert wurde. Ebenfalls ist ein kleiner Peak in der 2. Wachstumsphase zu sehen, dass die Umwandlung von Pyruvat zum giftigen Acetaldehyd darstellt.

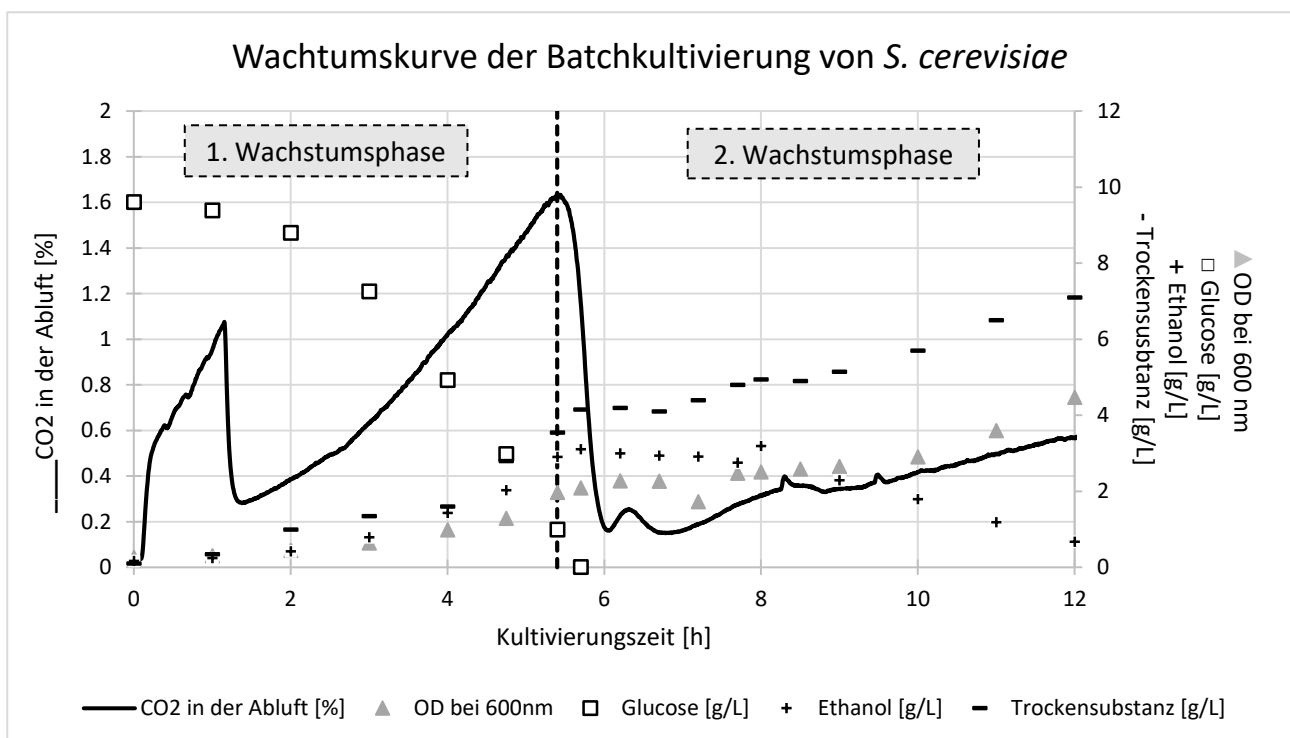


Abbildung 2: Wachstumskurve der Batchkultivierung von *S. cerevisiae*. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Kohlenstoffdioxid, der Biotrockenmasse, der Ethanol- und Glucosekonzentration, sowie der OD bei 600 nm. Das Diagramm ist in zwei Wachstumsphasen unterteilt. In der ersten Wachstumsphase diente Glucose als Kohlenstoffquelle, in der zweiten Wachstumsphase Ethanol.

4.2 pO₂-Kurve

Es wurde der Sättigungsgrad an Sauerstoff im Kultivierungsmedium online gemessen. Der Prozentsatz sagt aus, wieviel Sauerstoff bezogen auf den Gesamtdruck in der Abluft vorhanden ist. Die Abbildung 3 illustriert den linearen Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes, der bis über die zweite Wachstumsphase gemessen wurde. Eine kleine Ausnahme macht der Peak am Anfang der Kurve, der aufgrund einer Änderung der Belüftungsrate zu erklären ist. In der zweiten Wachstumsphase sinkt der Sauerstoffpartialdruck bis er sich einpendelt. Die Grafik enthält nicht aufgezeichnete Werte, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden können. Da unser Bioreaktor etwas früher angehalten wurde, können wir den Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes nicht weiter beschreiben.

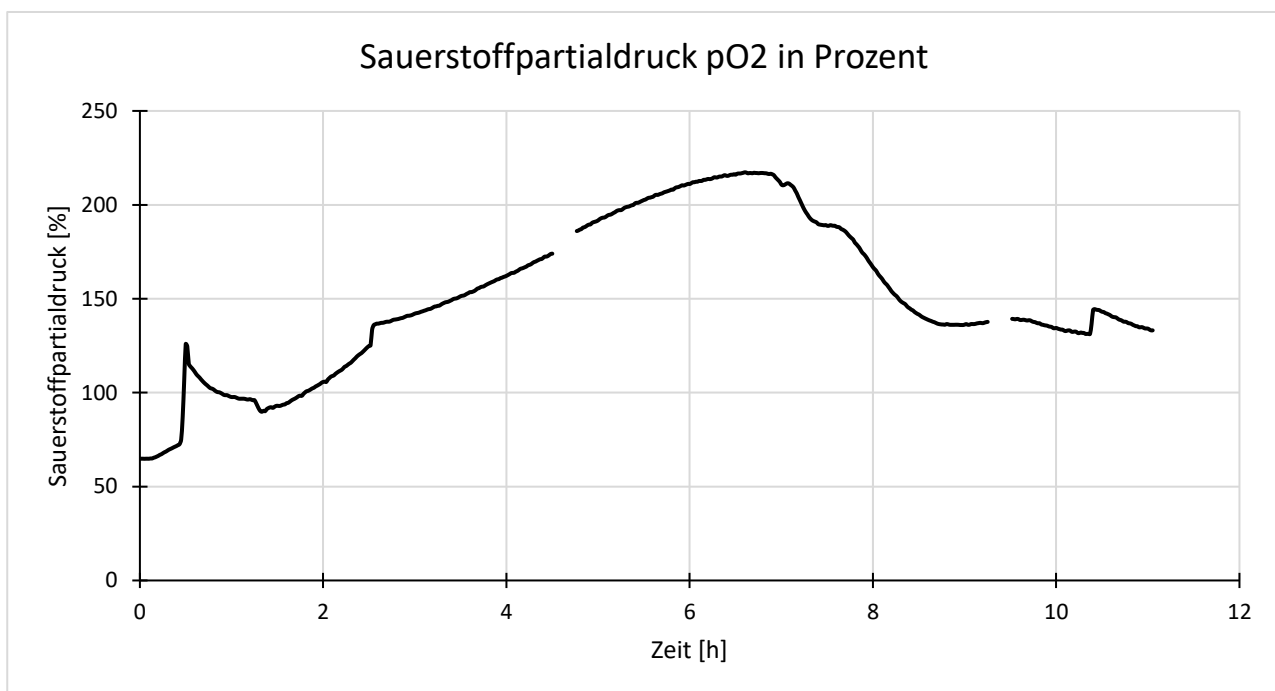


Abbildung 3: Prozentsatz vom Sättigungsgrad an O₂ im Kultivierungsmedium. In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes des gemessenen Sauerstoffes im Kultivierungsmedium. Man erkennt die erste Wachstumsphase des *S. cerevisiae*. Es ist ersichtlich, dass der Sättigungsgrad mit Sauerstoff bis zur siebten Probe (nach circa fünf Stunden) kontinuierlich zunimmt.

4.3 Kohlenstoffdioxid im Abgas

Während der ganzen Kultivierung wurde der Prozentsatz des Kohlenstoffdioxids im Abgas online gemessen. In der Abbildung 4 ist ersichtlich, dass in den ersten sechs Stunden des Batchversuches Kohlenstoffdioxid exponentiell von der Bäckerhefe gebildet wurde und in der Abluft vorhanden war. Dabei unterscheiden wir zwei Substratquellen, welche in der Abbildung 2 näher beschrieben wurde. In der ersten Wachstumsphase wird Glucose als Substratquelle verwertet, währenddessen in der zweiten Wachstumsphase das Ethanol in der fakultativen Gärung verwertet wurde. Leider kann man das Ende der Verstoffwechslung nicht weiter bestimmen, da uns die Daten fehlen. Weitere Beschreibungen der Peaks sind im Kapitel 4.1 aufgeführt.

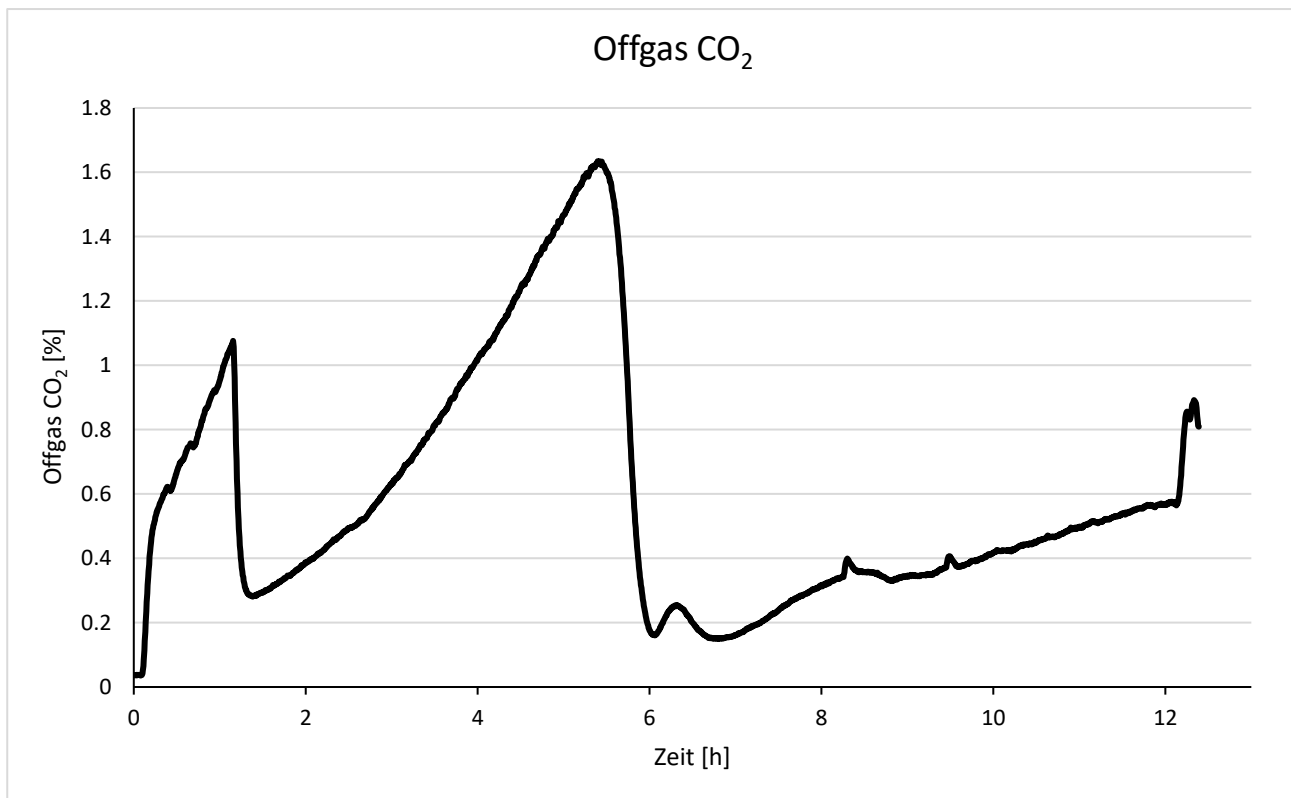


Abbildung 4: Prozentsatz von CO₂ in der Abluft. In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes des gemessenen Kohlenstoffdioxids in der Abluft. Man erkennt die erste und zweite Wachstumsphase des *S. cerevisiae*. Es ist ersichtlich, dass das Kohlenstoffdioxid bis zur siebten Probe (nach circa 5.5 Stunden) exponentiell aus Glucose umgewandelt wird. Nachdem sich die Mikroorganismen den neuen Substrat Ethanol angepasst haben, steigt die Kohlenstoffdioxidkonzentration linear.

4.4 Optische Dichte und Biotrockenmasse

In der Abbildung 5 wurden die OD-Werte und die Werte der Biotrockenmasse nach der Kultivierungszeit aufgetragen und dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die beiden Grössen im Laufe des Praktikums zunehmen. Wie im Kapitel 2.3 angedeutet, findet beim *S. cerevisiae* das Phänomen Diauxie statt, für welche zwei Energiequellen verwendet werden. Die Abbildung 5 stellt einen exponentiellen Anstieg der 1. Wachstumsphase dar. Die Umstellungsphase tritt in unserem Versuch kurz vor der sechsten Stunde und dauert etwa eine Stunde. In der Umstellungsphase ist ein Ausreisser-Wert in der 7.2 Stunden zu sehen, der wahrscheinlich nur Wasser enthalten hat. Wir können den Ausgang der Diauxie nicht weiter beurteilen. Anzumerken ist, dass die OD-Messungen ab der vierten Stunde etwas tiefer als die Messwerte der Biotrockenmasse liegen.

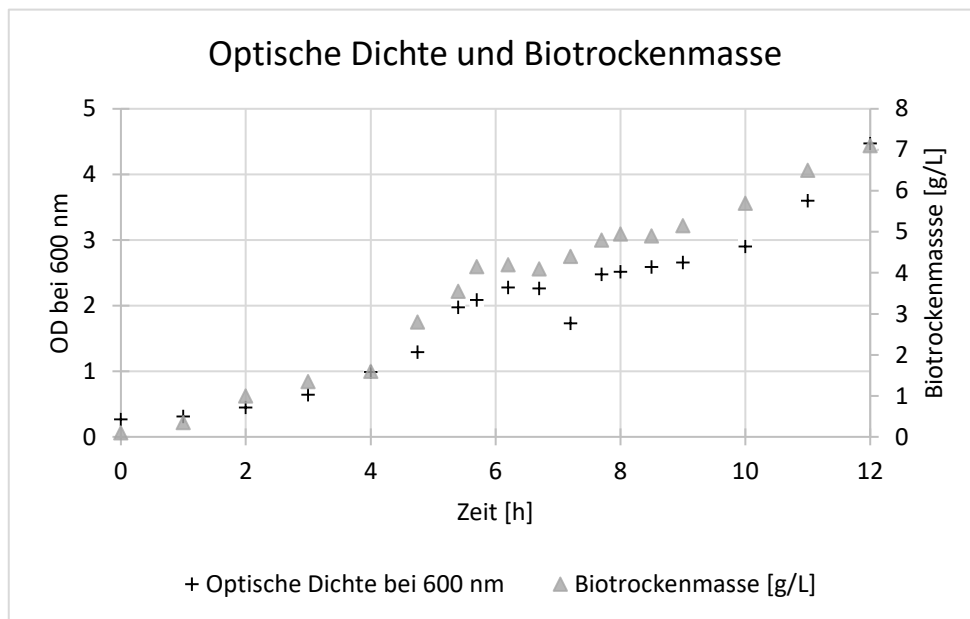


Abbildung 5: Darstellung der optischen Dichte bei 600 nm und der Biotrockenmasse in g/L.

4.5 Vergleich der Glucosebestimmungen

Die Abbildung 6 zeigt eine Absenkung der Glucosekonzentration während dem Praktikum bei circa 5.7 h mittels dem Bioprofile YSI und HPLC. In der folgenden Abbildung (Abbildung 6) sind die Glucosekonzentration nach der Zeit aufgetragen. Die Bestimmung von Glucose erfolgte mit dem Gerät Bioprofile YSI und dem HPLC, für welches die 18 Proben im Verlauf des Tages gesammelt und nach dem Praktikum in einem anderen Labor von der Praktikumsleiterin gemessen wurden. Die Werte, welche vom HPLC gemessen wurden, liegen etwas höher bis sie am Ende der Glucosekonzentration fast identisch liegen. der Verlauf der Kurve ist regelmässig dargestellt.

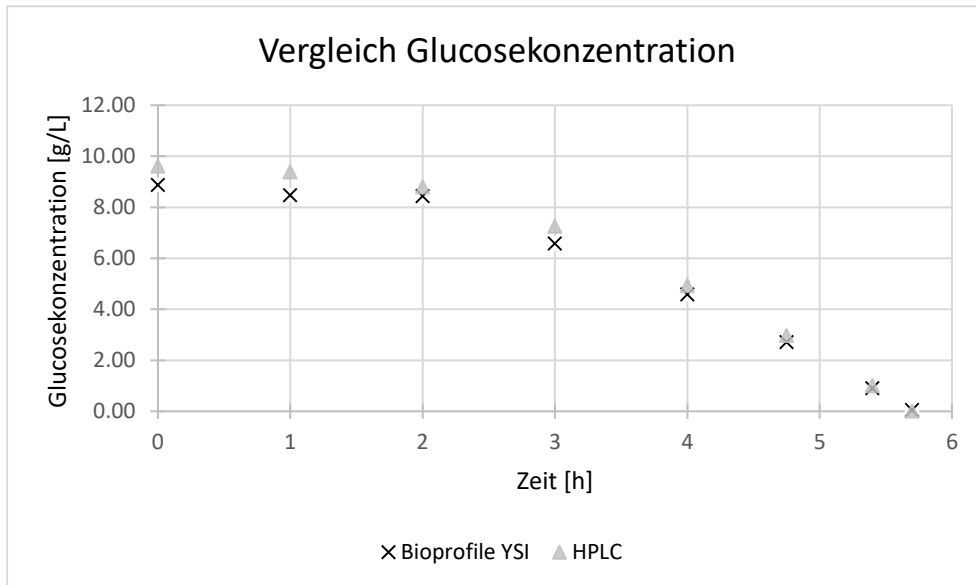


Abbildung 6: Der Vergleich der Glucosebestimmung in g/L pro Zeiteinheit, welche mittels Bioprofile (x) und HPLC (▲) gemessen wurden. In der horizontalen Achse ist die Zeit in Stunden und in der vertikalen Achse die Glucosekonzentration in g/L dargestellt. Der Glucoseverbrauch ist in der Abbildung gut ersichtlich. Auch kann kein signifikanter Unterschied innerhalb der zwei Methoden Bioprofile YSI und HPLC festgestellt werden.

4.6 Vergleich der Ethanol- und Glucosekonzentrationen

Die Proben für die Bestimmung der Ethanol- und Glucosekonzentration wurden während dem Batchversuch am zweiten Tag gesammelt und danach in Vials für die Messung mittels HPLC gefüllt. In der Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Glucosekonzentration im Verlauf der Durchführung abgebaut wird, während Ethanol langsam produziert wird. Die Ethanolkonzentration nimmt in der ersten Phase Wachstumsphase stark zu und erreicht den Peak bei 5.8 h mit einer Konzentration von 3.11 g/L.

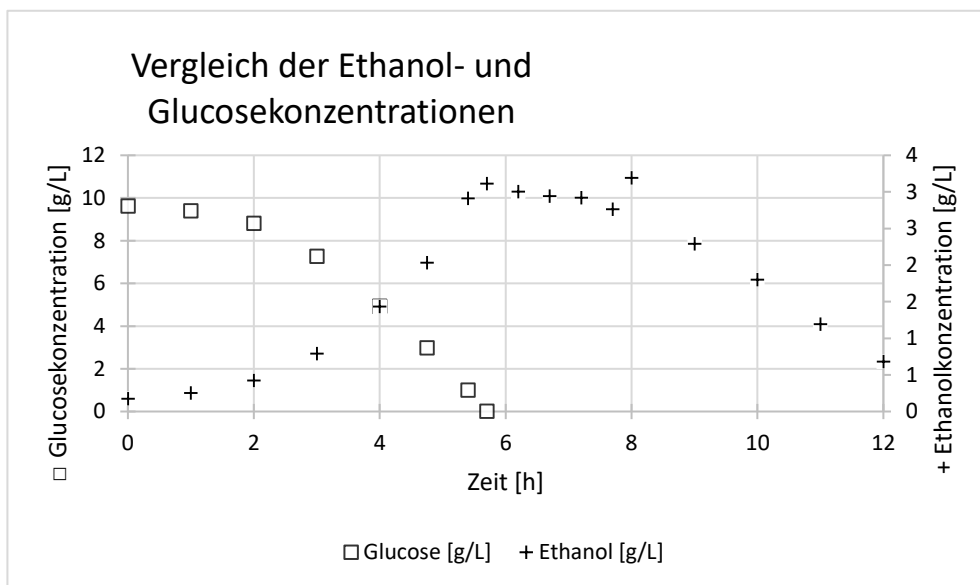


Abbildung 7: Vergleich der Ethanol- und Glucosekonzentrationen in g/L mittels der HPLC Messung. In der x-Achse ist die Zeit in Stunden und in der primären Ordinate die Glucosekonzentration in g/L angegeben. In der sekundären Ordinate ist die Ethanolkonzentration in g/L dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Glucose abgebaut, währenddessen der Ethanolgehalt steigt.

4.7 Maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit

Um die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} zu berechnen, wurden der exponentiellen Bereichen der Werte der Trockensubstanz logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen.

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(x_{t_2}) - \ln(x_{t_1})}{t_2 - t_1}$$

Dies wurde jeweils für die erste und zweite exponentielle Phase durchgeführt. Grund dafür ist die Diauxie von *S. Cerevisiae*. Daraus resultieren zwei unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde mittels der Software Excel berechnet. Die berechneten Werte sind für die erste exponentielle Phase μ_{Gluc} 0.602 h^{-1} und für die zweite exponentielle Phase μ_{EtOH} 0.090 h^{-1} . Da es sich um ein Batch-Verfahren handelt, und K_s nicht limitierend ist, gilt $\mu = \mu_{\max}$. Die Werte sind also μ_{\max_Gluc} 0.602 h^{-1} und μ_{\max_EtOH} 0.090 h^{-1} .

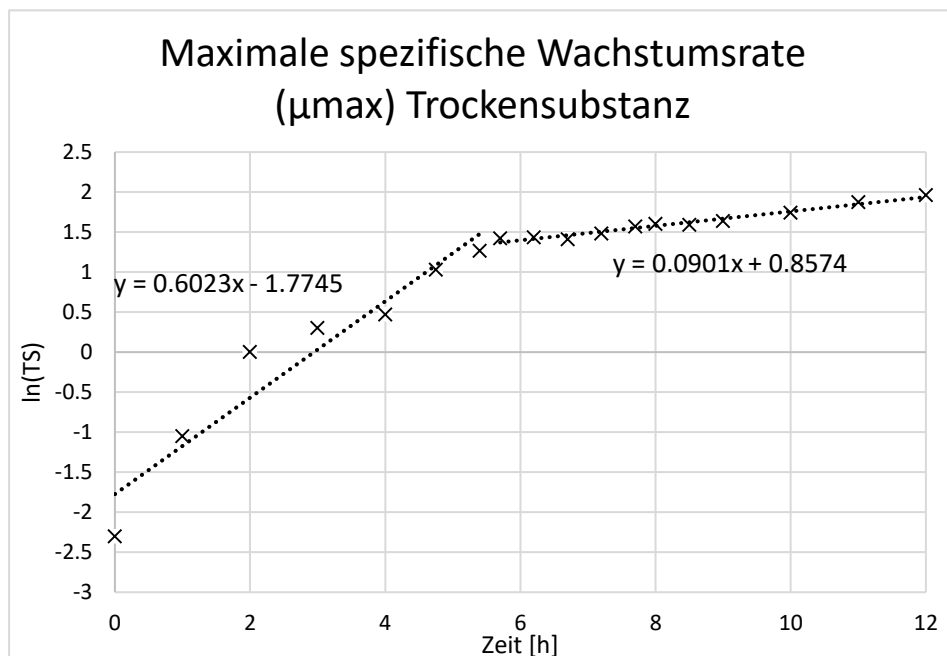


Abbildung 8: Der logarithmierte Wert der Trockensubstanz ist aufgetragen gegen die Zeit. Es wurden zwei lineare Trendlinie eingefügt mit den Funktionen $y=0.6023 \cdot x - 1.7745$ und $y=0.0901 \cdot x + 0.8574$. Die Steigung der ersten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_Gluc} : 0.602 h^{-1} . Die Steigung der zweiten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_EtOH} : 0.090 h^{-1} .

Die gleichen Berechnungen wurden auch mit den Werten der OD-Messungen durchgeführt. Die Werte sind also μ_{\max_Gluc} 0.373 h^{-1} und μ_{\max_EtOH} 0.117 h^{-1} . Sie sind leicht höher als die μ_{\max} der Berechnung über die Trockensubstanz.

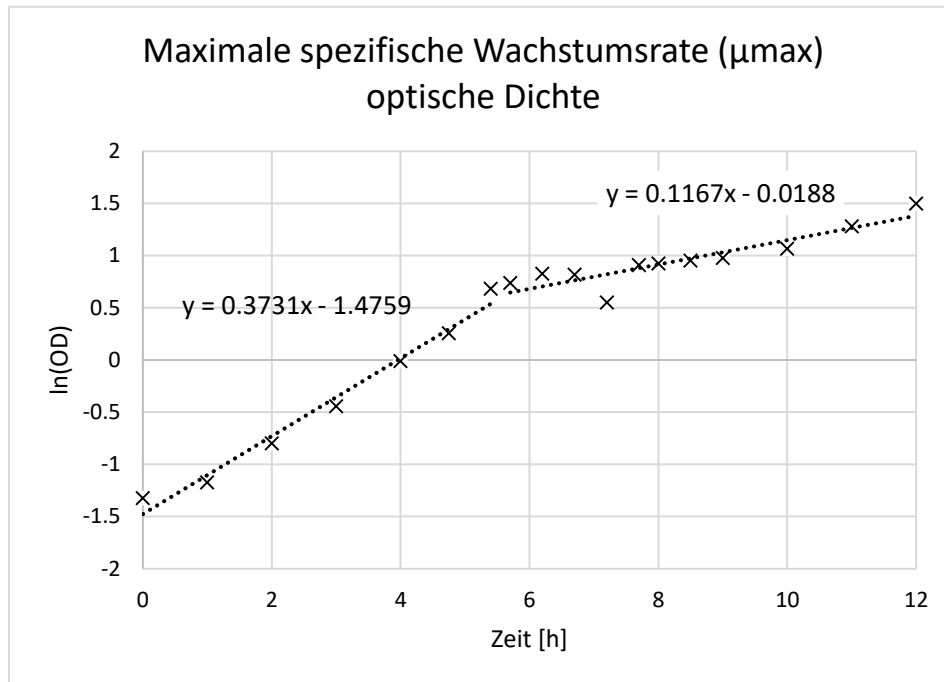


Abbildung 9: Der logarithmierte Wert der OD-Messung ist aufgetragen gegen die Zeit. Es wurden zwei lineare Trendlinie eingefügt mit den Funktionen $y=0.3731 \cdot x - 1.4759$ und $y=0.1167 \cdot x - 0.0188$. Die Steigung der ersten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_Gluc} : 0.373 h^{-1} . Die Steigung der zweiten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_EtOH} : 0.117 h^{-1} .

4.8 Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$

Um den Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/\text{Gluc}}$ und $Y_{X/\text{EtOH}}$ zu berechnen, wurde das Δ der Trockensubstanz x durch das Δ der Substratkonzentration s von Glukose und Ethanol geteilt.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{x(t) - x_0}{s_0 - s(t)}$$

Die Datenpunkte wurden mittels einer linearen Trendlinie verbunden und die deren Funktion mittels der Software Excel berechnet. Die so erhaltene Steigung entspricht dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$. Der Ausbeutekoeffizienten von $Y_{X/\text{Gluc}}$ beträgt 0.347 g g^{-1} . der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/\text{EtOH}}$ 0.375 g g^{-1} . Die erste Wachstumsphase entspricht dem exponentiellen Bereich des Glucoseverbrauchs.

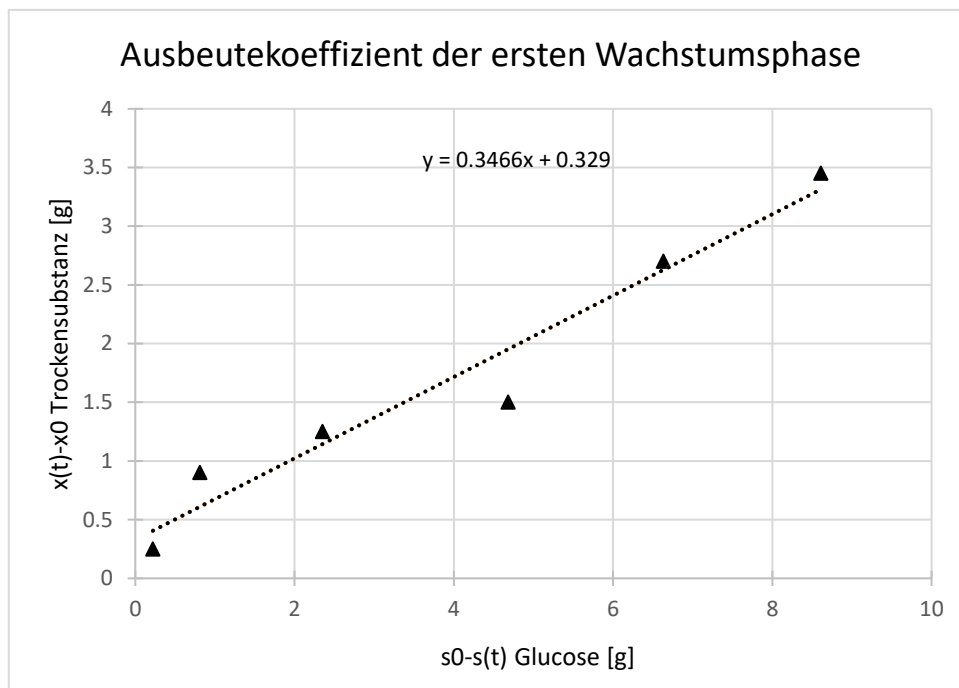


Abbildung 10: Aufgetragen ist die Trockensubstanz der ersten Wachstumsphase gegenüber die Glucose. wurde eine lineare Trendlinie eingefügt deren Funktion $y=0.3466 \cdot x + 0.329$. Deren Steigung entspricht dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/\text{Gluc}}$ von 0.347 g g^{-1} .

Die folgende Grafik beschreibt den Ausbeutekoeffizienten der zweiten Wachstumsphase. Die zweite Wachstumsphase wurde ab dem Zeitpunkt der tiefsten Glucosekonzentration definiert. Dementsprechend der höchsten Ethanolkonzentration.

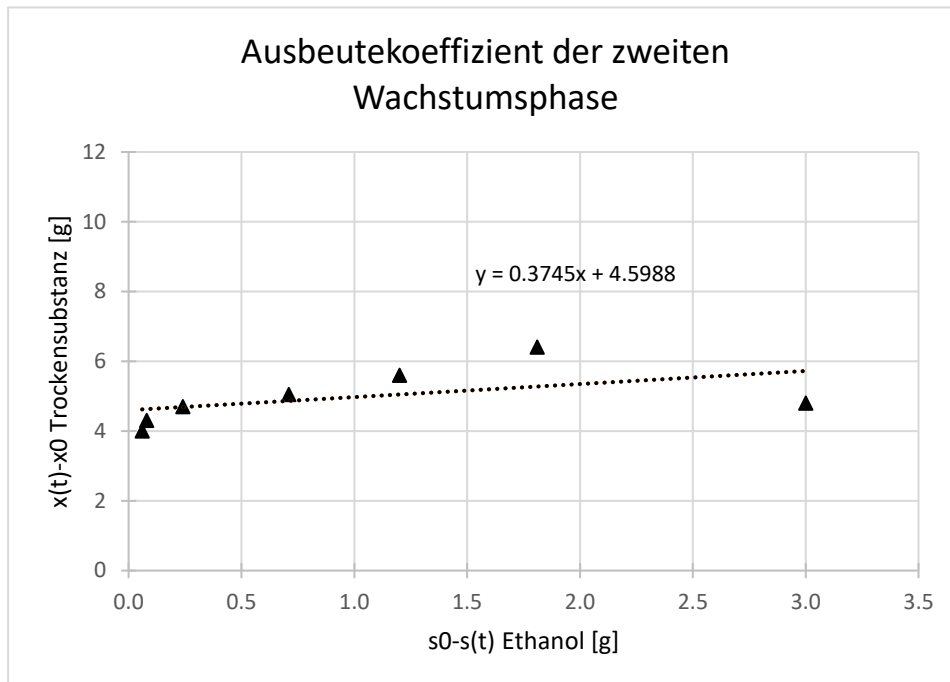


Abbildung 11: Aufgetragen ist die Trockensubstanz der ersten Wachstumsphase gegenüber die Glucose. wurde eine lineare Trendlinie eingefügt deren Funktion $y=0.3745 \cdot x + 4.5988$. Deren Steigung entspricht dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/EtOH}$ von 0.375 g g^{-1} .

4.9 Sättigungskonstante K_s

Die Berechnungskonstante erfolgt über die Darstellung des Kehrwerts der Wachstumsgeschwindigkeit über dem Kehrwert der Substratkonzentration. Dazu wurde die Wachstumsgeschwindigkeit μ_{Gluc} und μ_{EtOH} , wie im Kapitel 4.7 beschrieben, in den jeweiligen exponentiellen Phasen des Wachstums berechnet und grafisch dargestellt. Für die ausgewählten Datenpunkte wurde eine Trendlinie erstellt. Der Schnittpunkt der Trendlinie der ersten Wachstumsphase mit der x-Achse wurde über die Funktion der Trendline $y = 0.2692x + 1.1888$ berechnet. Der Schnittpunkt ist der negative Kehrwert von $K_{s_Gluc} = 0.226 \text{ g L}^{-1}$.

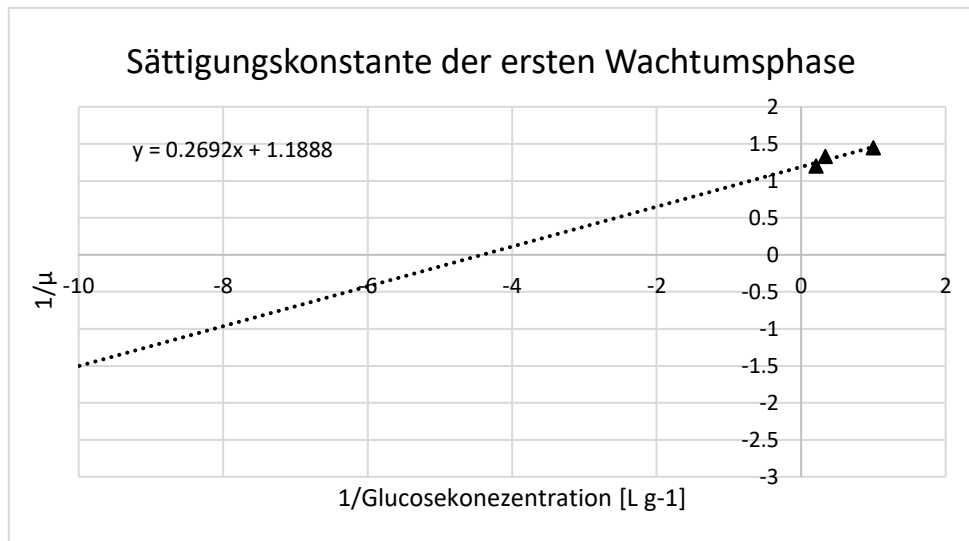


Abbildung 12: Kehrwert der Wachstumsgeschwindigkeit ist aufgetragen gegen den Kehrwert der Glucosekonzentration. Der Schnittpunkt der x-Achse Trendlinie mit der Funktion $y = 0.2692x + 1.1888$ beschreibt den negativen Kehrwert der Sättigungskonstante K_{s_Gluc} der ersten Wachstumsphase.

Um den K_s der zweiten Wachstumsphase zu bestimmen, wurde das selbe mit der Trendlinie $y = 1.3839x + 1.4922$ der zweiten Wachstumsphase wiederholt. Somit ist der $K_{s_EtOH} = 3.110 \text{ g L}^{-1}$.

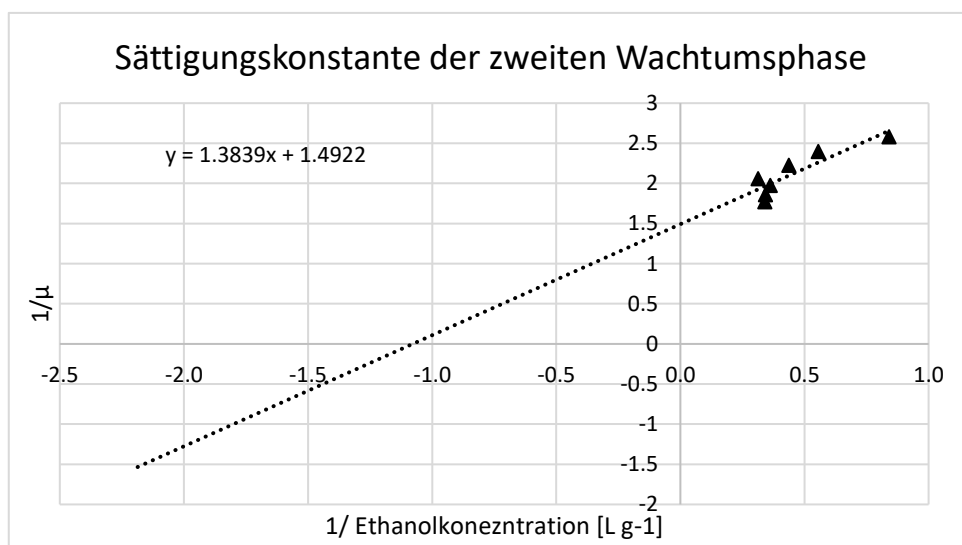


Abbildung 13: Kehrwert der Wachstumsgeschwindigkeit ist aufgetragen gegen den Kehrwert der Glucosekonzentration. Der Schnittpunkt der x-Achse Trendlinie mit der Funktion $y = 1.3839x + 1.4922$ beschreibt den negativen Kehrwert der Sättigungskonstante K_{s_EtOH} der ersten Wachstumsphase.

5. Diskussion

In diesem Kapitel werden die Resultate und Diagramme umfassend diskutiert.

In Abbildung 3 wurde der Sauerstoffpartialdruck während des Batchprozesses beschrieben. Da vor dem Versuchsstart vergessen wurde die pO_2 -Sonde zu kalibrieren, stimmt die 100%-Marke nicht mit den realen 100% Sauerstoffpartialdruck überein. Die Prozentangaben sind somit nur relativ und nicht absolut zu interpretieren. Der erste Peak bei circa 30 Minuten entstand, da fälschlicherweise eine Begasung von 1 L/min anstatt 1 vvm eingestellt wurde. Der Peak entstand, da der prozentuale Anteil von Sauerstoff im Abgas gestiegen ist, als die Begasung richtig eingestellt wurde. Danach steigt der pO_2 konstant an und fällt bei der Umstellung zu der Ethanolverwertung ab. Diesen Verlauf konnten wir uns nicht erklären, eigentlich sollte der Sauerstoffpartialdruck immer circa auf dem gleichen Niveau bleiben oder gegebenenfalls sinken. Gegen Ende des Versuches, nach 9 Stunden, musste die Rührergeschwindigkeit auf 700 rpm erhöht werden, da der pO_2 zu tief sank.

Der CO_2 -Gehalt ist in Abbildung 4 ersichtlich. In dieser Grafik ist der anfängliche Peak, welcher bereits bei der O_2 -Kurve sichtbar war, noch ausgeprägter. Der Peak entstand, da durch die mangelhafte Zugabe an Sauerstoff der prozentuale Anteil von CO_2 im Abgas signifikant zunahm. Nach 5 Stunden ist der höchste Punkt des Glucose-Peaks ersichtlich, Der Peak entsteht, da bei der Verwertung von Glucose bei *S. cerevisiae* CO_2 entsteht. Der starke Abfall der Kurve zeigt die Umstellung der Hefe auf die Ethanolverwertung. Bei dieser verbraucht die Bäckerhefe auch CO_2 , somit sinkt das CO_2 im Abgas stark. Der abschliessend vergleichlich kleine Peak nennt man Pyruvat-Peak. Später sollte noch ein Acetat-Peak folgen, da die Hefe das Ethanol schlussendlich zu Acetat verwertet. Dieser ist aber auf unserem Diagramm nicht ersichtlich. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich im verfrühten Abbruch des Batchs.

Im nächsten Diagramm (Abbildung 5) wurde die Biotrockenmasse mit der optische Dichte verglichen. Wie erwartet steigen beide Kurven analog zueinander an. Je mehr Zellwachstum stattfindet, desto höher wird die Zelldichte und dadurch das Medium trüber. Ebenfalls ist in dieser Grafik die Diauxie der Hefe ersichtlich. Zwischen den Zeitpunkten 6 h und 8 h gibt es eine kurze Zeitspanne, in welcher weder die Zellzahl, noch die Zelldichte zunahm. Dies war die Umstellungszeit von der Glucoseverwertung zur Ethanolverwertung. Der Anfangswert der Biotrockenmasse lag bei 0.1 g/L und der maximale Wert bei 7.1 g/L, was eine Differenz von 7 g/L ergibt. Die Hefe hat sich während 12 Stunden durchschnittlich $0.6 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ vermehrt. Dieser Wert ist ein Hinweis, dass die Kultivierung erfolgreich verlaufen ist. Der Ausreisser der optischen Dichte beim Zeitpunkt 7.2 h entstand wahrscheinlich durch eine zu starke Verdünnung. Dies kann bereits bei der Probenahme geschehen sein, dass noch ein wenig Kondenswasser im Probenahmeventil war und dieses Wasser in die Probe gelangt ist.

In Abbildung 6 wurden die zwei verschiedenen Methoden zur Glucosebestimmung verglichen. Zum einen wurde die Glucose mit einem Bioprofile YSI gemessen und die zweite Bestimmung erfolgte über HPLC. Die Differenz der beiden Messungen ist sehr gering. Bei höheren Konzentrationen ist noch ein kleiner Unterschied sichtbar, welcher dann bei tieferen Konzentrationen kaum mehr auszumachen ist. Der prozentuale Unterschied der beiden Werte bleibt immer bei maximal $\pm 10\%$. Die Werte der HPLC sind genauer und aus diesem Grund wurden für die Auswertungen der Glucosekonzentrationen die Werte der HPLC-Messungen verwendet.

Der Substratverbrauch von Glucose und Ethanol wurde in Abbildung 7 dargestellt. Die Glucose ist nach 5.8 Stunden komplett verwertet. Während der Glucoseverwertung produziert die Hefe eine kleine Menge an Ethanol, welche beim Zeitpunkt 5.8 h ihre maximale Konzentration von 3.11 g/L erreicht hat. Danach schaltet die Hefe ihren Stoffwechsel auf Ethanolverwertung um, da keine Glucose mehr im Medium vorhanden ist. Somit sinkt in der zweiten Wachstumsphase der Ethanolgehalt stetig. Während den 12 Stunden Kultivierung wurde das Ethanol nicht komplett verbraucht. Ein Ausreisser in der Ethanolkonzentration beim Zeitpunkt 8 h kann nur schwer erklärt werden. Am wahrscheinlichsten ist es, dass ein Röhrchen falsch beschriftet oder verwechselt wurde. Auch der Vergleich dieses Zeitpunktes mit anderen Diagrammen gab kein Aufschluss über eine mögliche Abweichung. Bei dem fehlenden Punkt bei Zeitpunkt 8.4 h handelte es sich um einen Überstand, welcher über mehrere Stunden im Wasserbad bei 80°C vergessen wurde. Der gemessene Ethanolwert betrug somit 0 g/L, da der Ethanol aus der Probe verdampft ist. Dieser Wert wurde bei allen Auswertungen nicht beachtet.

In Abbildung 8 und Abbildung 9 wurde die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} bestimmt. Zu beobachten sind zwei Wachstumsphasen, die typisch sind für Diauxie der Hefe. Die maximalen spezifischen Wachstumsraten der Hefe wurden mit der Literatur verglichen. In der Literatur sind 0.44 h^{-1} auf Glucose und 0.13 h^{-1} auf Ethanol angegeben (Paalme et al, 1997). Die von uns bestimmten Werte von 0.373 h^{-1} für Glucose und 0.117 h^{-1} kommen den Werten der Literatur sehr nahe und sind somit plausibel. Bei der Bestimmung der maximalen Wachstumsrate mittels OD-Messungen weicht die 11. Messung ab. Den Ausreisser ist damit zu erklären, dass die zu bestimmende Probe nicht sofort gemessen wurde und somit Zeit zum Absetzen der Schwebstoffe und Hefezellen hatte.

Die berechneten Werte der Ausbeutekoeffizienten der Biomasse $Y_{\frac{x}{s}}$, dargestellt in Abbildung 10 und Abbildung 11, bezogen auf die Glucose und Ethanol sind mit $Y_{\frac{x}{G}} = 0.347 \text{ g g}^{-1}$ und $Y_{\frac{x}{EtOH}} = 0.375 \text{ g g}^{-1}$ tiefer als die in der Literatur angegeben mit $Y_{\frac{x}{G}} = 0.57 \text{ g g}^{-1}$ und $Y_{\frac{x}{EtOH}} = 0.68 \text{ g g}^{-1}$ (Paalme et al, 1997). Dies könnte daran liegen, dass die Definierung der exponentiellen Phase bei uns ungenau durchgeführt wurde. Die, vom Excel, berechneten Funktionen haben beide einen sehr hohen Y-Achsenabschnitt. Dies würde aussagen, dass bei keinem Substrat Biomasse erzeugt wird. Dies ist jedoch nicht logisch und somit müssten die Y-Achsenabschnittswerte gleich Null sein.

In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Halbsättigungskonzentrationen K_s dargestellt. Es wurde keine Werte in der Literatur gefunden, jedoch konnten wir die Werte mit einer weiteren Arbeitsgruppe des BVT Kultivierungspraktikums vergleichen. Die Arbeitsgruppe bekam einen K_G von 0.05 g L^{-1} und K_{EtOH} von 0.093 g L^{-1} . Diese Werte korrelierten nicht mit unseren Werten von $K_G 0.226 \text{ g L}^{-1}$ und $K_{EtOH} 3.11 \text{ g L}^{-1}$. Auch nach weitere Vergleiche mit anderen Arbeitsgruppen konnte keine zufriedenstellenden Ähnlichkeiten festgestellt werden. Weitere Abklärungen über die Berechnungsgrundlagen wären zwingend von Nöten.

5 Literaturverzeichnis

Eibl, D., & Hahnemann, U., & Obrecht, F., & Poggendorf, I. (2017) Biotechnologie. In Unterrichtsunterlagen ZHAW, *Skript Hygienesdesign, Containment und Qualitätssicherung einer aseptischen Anlage*, unveröffentlicht.

Hahnemann, U., & Poggendorf, I. (2017). Biotechnologie. In Unterrichtsunterlagen ZHAW, *Vorlesung Hygienesdesign, Containment und Qualitätssicherung einer aseptischen Anlage*, unveröffentlicht.

Paalme, T., & Elken, R., & Vilu, R., & Korhola, M. (1997), *Growth efficiency of Saccharomyces cerevisiae on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat)*.

Rohrer J. (2017) Biotechnologie. Zellbiologie. In Unterrichtsunterlagen ZHAW, *Skript Einführung Zellkulturtechnik*, unveröffentlicht.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anleitung zum Ablauf der Probenanalytik im Bioverfahrenstechnik2 Praktikum Kultivierung (Hahnemann & Poggendorf, 2017). 7

Abbildung 2: Wachstumskurve der Batchkultivierung von *S. cerevisiae*. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Kohlenstoffdioxid, der Biotrockenmasse, der Ethanol- und Glucosekonzentration, sowie der OD bei 600 nm. Das Diagramm ist in zwei Wachstumsphasen unterteilt. In der ersten Wachstumsphase diente Glucose als Kohlenstoffquelle, in der zweiten Wachstumsphase Ethanol. 9

Abbildung 3: Prozentsatz vom Sättigungsgrad an O₂ im Kultivierungsmedium. In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes des gemessenen Sauerstoffes im Kultivierungsmedium. Man erkennt die erste Wachstumsphase des *S. cerevisiae*. Es ist ersichtlich, dass der Sättigungsgrad mit Sauerstoff bis zur siebten Probe (nach circa fünf Stunden) kontinuierlich zunimmt. 10

Abbildung 4: Prozentsatz von CO₂ in der Abluft. In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes des gemessenen Kohlenstoffdioxids in der Abluft. Man erkennt die erste und zweite Wachstumsphase des *S. cerevisiae*. Es ist ersichtlich, dass das Kohlenstoffdioxid bis zur siebten Probe (nach circa 5.5 Stunden) exponentiell aus Glucose umgewandelt wird. Nachdem sich die Mikroorganismen den neuen Substrat Ethanol angepasst haben, steigt die Kohlenstoffdioxidkonzentration linear. 11

Abbildung 5: Darstellung der optischen Dichte bei 600 nm und der Biotrockenmasse in g/L. 12

Abbildung 6: Der Vergleich der Glucosebestimmung in g/L pro Zeiteinheit, welche mittels Bioprofile (×) und HPLC (▲) gemessen wurden. In der horizontalen Achse ist die Zeit in Stunden und in der

vertikalen Achse die Glucosekonzentration in g/L dargestellt. Der Glucoseverbrauch ist in der Abbildung gut ersichtlich. Auch kann kein signifikanter Unterschied innerhalb der zwei Methoden Bioprofile YSI und HPLC festgestellt werden. 13

Abbildung 7: Vergleich der Ethanol- und Glucosekonzentrationen in g/L mittels der HPLC Messung. In der x-Achse ist die Zeit in Stunden und in der primären Ordinate die Glucosekonzentration in g/L angegeben. In der sekundären Ordinate ist die Ethanolkonzentration in g/L dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Glucose abgebaut, währenddessen der Ethanolgehalt steigt. 14

Abbildung 8: Der logarithmierte Wert der Trockensubstanz ist aufgetragen gegen die Zeit. Es wurden zwei lineare Trendlinie eingefügt mit den Funktionen $y=0.6023 \cdot x - 1.7745$ und $y=0.0901 \cdot x + 0.8574$. Die Steigung der ersten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_Gluc} : 0.602 h^{-1} . Die Steigung der zweiten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_EtOH} : 0.090 h^{-1} 15

Abbildung 9: Der logarithmierte Wert der OD-Messung ist aufgetragen gegen die Zeit. Es wurden zwei lineare Trendlinie eingefügt mit den Funktionen $y=0.3731 \cdot x - 1.4759$ und $y=0.1167 \cdot x - 0.0188$. Die Steigung der ersten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_Gluc} : 0.373 h^{-1} . Die Steigung der zweiten Trendlinie entspricht der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max_EtOH} : 0.117 h^{-1} 16

Abbildung 10: Aufgetragen ist die Trockensubstanz der ersten Wachstumsphase gegenüber die Glucose. wurde eine lineare Trendlinie eingefügt deren Funktion $y=0.3466 \cdot x + 0.329$. Deren Steigung entspricht dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/Gluc}$ von 0.347 g g^{-1} 17

Abbildung 11: Aufgetragen ist die Trockensubstanz der ersten Wachstumsphase gegenüber die Glucose. wurde eine lineare Trendlinie eingefügt deren Funktion $y=0.3745 \cdot x + 4.5988$. Deren Steigung entspricht dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/EtOH}$ von 0.375 g g^{-1} 18

Abbildung 12: Kehrwert der Wachstumsgeschwindigkeit ist aufgetragen gegen den Kehrwert der Glucosekonzentration. er Schnittpunkt der x-Achse Trendlinie mit der Funktion $y = 0.2692 \cdot x + 1.1888$ beschreibt den negativen Kehrwert der Sättigungskonstante K_{s_Gluc} der ersten Wachstumsphase. 19

Abbildung 13: Kehrwert der Wachstumsgeschwindigkeit ist aufgetragen gegen den Kehrwert der Glucosekonzentration. er Schnittpunkt der x-Achse Trendlinie mit der Funktion $y = 1.3839 \cdot x + 1.4922$ beschreibt den negativen Kehrwert der Sättigungskonstante K_{s_EtOH} der ersten Wachstumsphase. 19