

Dipl.-Ing. Jens-Michael Hilmer, Hannover

In-situ-Bioprozeßkontrolle am Beispiel der In-vivo- Biolumineszenz und der 2D- Fluoreszenzspektroskopie

Reihe **17**: Biotechnik

Nr. **150**

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2 THEORIE.....	2
2.1 Biolumineszenz	2
2.1.1 Grundlagen.....	2
2.1.2 Biolumineszenz höherer Lebewesen.....	2
2.1.3 Bakterielle Biolumineszenz.....	3
2.1.3.1 Organismen.....	3
2.1.3.2 Die bakterielle Luziferase.....	3
2.1.3.3 Reaktionsmechanismus	3
2.1.3.4 Der Autoinduktor	5
2.1.3.5 Die Regulation	5
2.1.3.6 Beeinflussung der Biolumineszenz	7
2.1.4 Analytische Anwendungen.....	7
2.1.4.1 In-vitro-Biolumineszenz.....	7
2.1.4.2 In-vivo-Biolumineszenz.....	8
2.2 Kulturfluoreszenz	9
2.2.1 Fluoreszenz	9
2.2.1.1 Grundlagen	9
2.2.1.2 Fluoreszenzintensität.....	9
2.2.1.3 Einflüsse auf die Fluoreszenz	9
2.2.2 Biogene Fluorophore.....	13
2.2.3 Streulicht.....	14
2.2.4 NAD(P)H-abhängige Kulturfluoreszenz.....	14
2.2.5 Kommerzielle Fluoreszenzsensoren für die Bioprozeß-Beobachtung.....	15
2.2.6 Stand der Technik der Kulturfluoreszenzmessungen.....	15
2.2.7 Entwicklung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie	17
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Das verwendete Kultivierungssystem	19
3.2 Kultivierungen.....	21
3.2.1 Vorkultur.....	21
3.2.2 Hauptkultur.....	21
3.2.3 Pulsversuche und Begasungswechsel	21

3.3 Verwendete Mikroorganismen	22
3.3.1 <i>Biolumineszenz-Versuche</i>	22
3.3.1.1 Plasmide.....	23
3.3.2 <i>Fluoreszenz-Versuche</i>	24
3.4 Stammhaltung	26
3.5 Plasmidpräparation	26
3.6 Transformation	26
3.7 Immobilisierung	26
3.7.1 <i>Immobilisierung</i>	26
3.7.2 <i>Durchführung</i>	27
3.7.3 <i>Der Festbettreaktor</i>	28
3.8 Probenahme	28
3.8.1 <i>Off-line-Probenahme</i>	28
3.8.2 <i>On-line-Probenahme</i>	28
3.8.2.1 Das In-situ-Modul ESIP (Eppendorf).....	28
3.8.2.2 Das Bypass-Modul ASEP (Applikon)	29
3.9 Analytische Methoden	30
3.9.1 <i>On-line-Messungen</i>	30
3.9.1.1 NAD(P)H-Kulturfluoreszenz	30
3.9.1.2 Biolumineszenz.....	30
3.9.1.3 Glucose	31
3.9.1.4 Abgas (CO ₂ , O ₂).....	31
3.9.1.5 Gelöstsauerstoff.....	32
3.9.1.6 pH-Wert	32
3.9.1.7 Säure-/Laugedosierung	32
3.9.1.8 Optische Dichte.....	32
3.9.2 <i>Off-line-Messungen</i>	32
3.9.2.1 Optische Dichte (OD).....	32
3.9.2.2 Biotrockenmasse (BTM).....	33
3.9.2.3 Glucose	33
3.9.2.4 Acetat.....	34
3.9.2.5 Glycerin	34
3.9.2.6 Amidase.....	34
3.9.2.7 Zellaufschluß.....	35
3.9.2.8 Zellzahlen	35
3.10 Die Datenaufnahme	35
3.10.1 <i>Fermentationsdaten</i>	35
3.10.2 <i>2D-Fluoreszenzdaten</i>	36
3.10.2.1 Datenaufnahme mit BioView-Programm	36
3.10.2.2 Datenverarbeitung mit Excel-Makro.....	36
3.11 Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren	37
3.11.1 <i>Möglichkeiten der Auswertung</i>	37
3.11.2 <i>Differenzspektren</i>	37

3.11.3 Glättung der Fluoreszenzdaten	39
4 ENTWICKLUNG DES 2D-PROZESSFLUOROMETERS.....	41
4.1 Die Basiseinheit.....	41
4.2 Lichtleiter.....	42
4.2.1 Materialien.....	42
4.2.2 Der verwendete Lichtleiter.....	43
4.3 Der Fluorometereinschub.....	44
4.3.1 Die Lichtleiterhalterung	44
4.3.2 Die Lichtleiterdurchführung.....	45
4.4 Die Meßzelle.....	45
4.5 Meßbedingungen	46
5 PRAKTISCHER TEIL I: IN-VIVO-BIOLUMINESZENZ	47
5.1 Kultivierungen in Satzkultur	47
5.1.1 Kultivierung in TB-Medium.....	47
5.1.2 Kultivierung in LB-Medium.....	49
5.1.3 Kultivierung mit Minimalmedium	51
5.2 Einfluß des Leuchtplasmids	53
5.3 Kontinuierliche Kultivierung.....	56
5.4 Festbett-Kultivierung	59
5.5 Pulsversuche	62
5.5.1 Glucosepuls.....	62
5.5.2 Acetatpuls	63
5.5.3 Glycerinpuls.....	64
5.5.4 Aldehydpuls.....	65
5.5.5 Mediapuls.....	66
5.5.6 pH-Änderung.....	66
5.5.7 Begasungsstop.....	67
5.6 Plasmidstabilität	68
5.7 Zusammenfassung	69
6 PRAKTISCHER TEIL II: IN-SITU PROZESSFLUORIMETRIE.....	70
6.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (FABP), Messung in Durchflußküvette	70

6.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Prolipase).....	76
6.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (FABP).....	84
6.4 Kultivierung von <i>E. coli</i> 5K (pHM12).....	90
6.5 Kultivierung von <i>Sphingomonas spec.</i>	98
6.6 Kultivierung von <i>Tetrahymena thermophila</i>	105
6.7 Kultivierung von <i>Claviceps purpurea</i>	112
6.8 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
6.9 Substratpulse und aerob/anaerob-Übergang.....	126
6.9.1 Glucose	126
6.9.2 Ethanol	129
6.9.3 Begasungswechsel.....	131
6.10 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit	134
6.11 Berechnete Korrelationen	135
6.12 Zusammenfassung	136
7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	138
8 ANHANG	141
8.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	141
8.2 Kulturmedien und Puffer.....	142
8.3 Verwendete Chemikalien	145
8.4 Verwendete Geräte.....	145
8.5 Das Meßprogramm für 2D-Fluoreszenzspektren	146
8.6 Kalibrierungen	149
8.6.1 Kalibrierung der Fluorosensoren	149
8.6.2 Kalibrierung des Prozeßfluorometers	150
8.6.3 Ergotamin-Fluoreszenz.....	151
8.6.4 Transmissionskurve des Flüssig-Lichtleiters	152
8.7 Photos und Zeichnungen.....	152
8.7.1 Die Kultivierungsanlage.....	152
8.7.2 Der Fluorometereinschub.....	154
8.7.3 Leuchtende <i>E. coli</i> (pChv1)	155
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	156