

Analyse von Stoffwechselprozessen mit der Fermentationskalorimetrie

Dr. Martin Meier-Schneiders, Ulrich Grosshans, Claudia Busch und Prof. Dr.-Ing. Gerhart Eigenberger
 Institut für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart

Biologische Aktivität ist mit der Freisetzung von Wärmeenergie verbunden. Die Wärmeproduktion ist dabei proportional zur gesamten Stoffwechselaktivität. Da Wärme kontinuierlich entsteht, eignet sie sich zur Nutzung als On-line-Signal. Kalorimetrische Methoden werden in den Biowissenschaften bereits seit Jahrzehnten verwendet. Fermentationskalorimetrie ist eine neu entwickelte Meßtechnik, die insbesondere für die kalorimetrische Vermessung biotechnisch relevanter Fermentationen im Labormaßstab gedacht ist.

Was ist Fermentationskalorimetrie?

Mit „Fermentation“ bezeichnet man in der Biotechnik die Umsetzung eines Substrats im Stoffwechsel eines Organismus zu einem mehr oder weniger breiten Spektrum an Produkten. Die Umsetzungen finden gewöhnlich in speziellen und für diesen Zweck mit besonderen Vorrichtungen ausgestatteten Gefäßen statt, dem Fermenter. Dieser verfügt über die zur Fermentation erforderlichen Funktionen wie Sterilisieren des Gefäßes, Temperieren, Mischen und Begasen der Kultursuspension, pH-Regelung und Antischaumdosierung. Probennahmen sind ebenso möglich wie die Zugabe von Nährstoffen.

Ein „Fermenter-Kalorimeter“ verfügt über die genannten Spezifikationen eines Fermenters und dient gleichzeitig zum Messen von Wärmemengen. Der Vorteil der Kopplung aus Fermenter und Kalorimeter besteht in dem Zusammenhang zwischen Stoffwechselaktivität und Wärmeproduktion. Kontrollmessungen von Substrat, Produkt, Biomasse und die Wärmemessung beziehen sich auf ein und dasselbe Gefäß und erlauben eine vollständige Bilanzierung einer Fermentation. Diese Methode bezeichnen wir als Fermentationskalorimetrie.

Kommerziell verfügbare Kalorimeter

Die erste dokumentierte, kalorimetrisch motivierte Messung einer Fermentation wurde 1856 am Beispiel der alkoholischen Vergärung von 2,56 t Melasse durchgeführt. Mangels geeigneter Meßverfahren wurde ein großes Eichenfaß (21 m³) benutzt und die wäh-

rend der Fermentation auftretende Temperaturerhöhung bestimmt (10 °C). Der Autor berichtet aufgrund der starken Kohlendioxidproduktion auch folgenden Befund: „Die Experimente haben mitunter beeindruckend geendet, indem die von uns verwendeten Fässer explodierten . . . Nichtsdestotrotz werden wir diese Versuche fortführen“ [3].

Die Meßtechnik hat sich seit diesen Anfängen der Kalorimetrie vielfältig entwickelt. Ausführlichere Informationen als an dieser Stelle möglich bietet die zitierte Literatur [1, 5, 9, 11, 15]. Mikrokalorimeter sind in den Biowissenschaften weit verbreitet. Dies ist in der hohen Sensitivität und dem geringen Bedarf an Probenvolumen begründet (Tab. 1). Die Miniaturisierung der Meß-



zelle birgt jedoch auch Nachteile, da aufgrund fehlender Probennahmemöglichkeiten keine direkte Korrelation von Wachstumsparametern mit der Wärmeproduktion möglich ist. Ein Reaktionskalorimeter ist aufgrund des großen Arbeitsvolumens von 1 bis 2 L weniger anfällig für Außeneinflüsse, außerdem kann man es zu einem Fermenter umrüsten und als Biokalorimeter betreiben [11].

Reaktionskalorimeter werden in der Chemie vielfach zur Untersuchung und Optimierung von zumeist stark exothermen Reaktionen benutzt. Die Sensitivität von 100 bis 200 mW/L ist für diesen Zweck völlig ausreichend, für biologische Reaktionen mit vergleichsweise geringer Wärmeproduktion hingegen insbesondere mit Blick auf die Bilanzierung problematisch [11]. Da umgerüstete Reaktionskalorimeter kommerziell nicht verfügbar sind, muß den zeit- und kostenaufwendigen Umbau jeder potentielle Anwender selbst durchführen. Mikrokalorimeter und Reaktionskalorimeter sind für biotechnische Zwecke also nur eingeschränkt verwendbar.

	Mikrokalorimeter	Reaktionskalorimeter
Vorteile:	hohe Sensitivität (0,05–0,2 µW/mL)	großes Arbeitsvolumen (1–2 mL)
	geringes Arbeitsvolumen (einige mL)	unempfindlich gegen äußere Störeinflüsse
		alle Fermenterfunktionen möglich
Nachteile:	miniaturisierte Meßzelle erlaubt keine Probenahme	geringe Sensitivität (100–200 mW/L)
	fehlende Kontrolle von Wachstumsparametern in der Meßzelle (pH, gelöster Sauerstoff)	als Biokalorimeter kommerziell nicht verfügbar
	Begasung schwierig, keine Abgasanalyse möglich	
	Viskositätsänderungen nicht erfassbar	

Tab. 1: Vor- und Nachteile von Mikro- und Reaktionskalorimetern für die biotechnische Nutzung

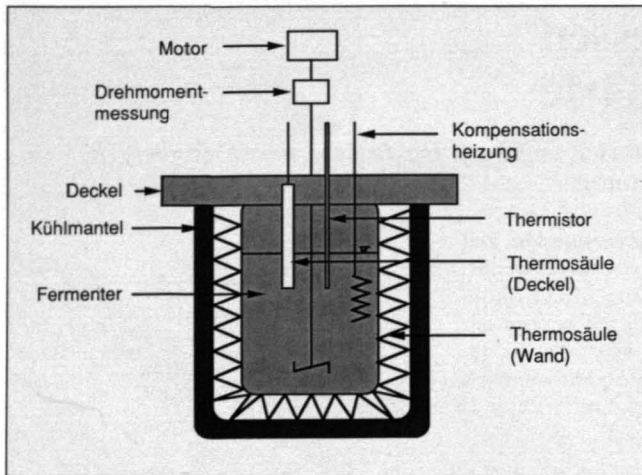


Abb. 1: Schematische Darstellung des Fermenter-Kalorimeters. Das Meßprinzip beruht auf konstantem Wärmefluß und Leistungskompensation. Alle Funktionen eines Laborfermenters sind gewährleistet.

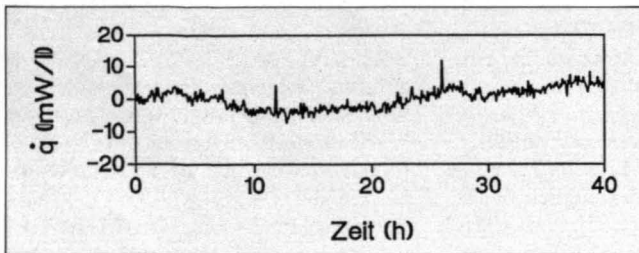


Abb. 3: Langzeitstabilität der Basislinie. Die Sensitivität ist besser als 20 mW/L.

Das Konzept des Fermenter-Kalorimeters

In der Literatur wird seit langem das Potential der Biokalorimetrie zur Untersuchung, Optimierung und Führung von biotechnisch relevanten Prozessen betont [1, 2, 5, 11, 14, 15]. Bis in die 80er Jahre hinein gab es jedoch kaum Ansätze zur Nutzung des Wärmesignals – offenbar wegen der für diesen Zweck unzureichenden Meßapparaturen. Daher wurde an unserem Institut der Prototyp eines zweckbestimmt konstruierten, sensitiven Kalorimeters mit gleichzeitig allen Fermenterfunktionen entwickelt und bei einer Reihe von aeroben und anaeroben Fermentationen getestet [4, 7, 8, 8, 10].

Das Gerät besteht aus zwei Glasgefäßen (Abb. 1 und 2). Das innere Gefäß mit einem Arbeitsvolumen von 2 L dient als Fermenter und das äußere als Kühlmantel. Das Meßprinzip beruht auf konstantem Wärmefluß zwischen dem Innengefäß und dem Kühlmantel in Verbindung mit einer elektrischen Lei-

stungskompensation. Die Temperaturdifferenz zwischen Fermentergefäß und Mantel wird dazu mit Hilfe einer im Luftspalt zwischen Fermenter und Mantel eingebauten Thermosäule integral über den Umfang gemessen und konstant gehalten. So entsteht ein definierter, konstanter Wärmefluß.

Der Wärmeentzug aus dem Fermenter wird durch eine elektrische Heizung ausgeglichen, wobei die Fermentertemperatur über einen Thermistor hochgenau gemessen und auf einen konstanten Wert geregelt wird. Um undefinierte Wärmeverluste zu vermeiden, wird der Deckel mit Hilfe einer weiteren Temperaturregelung auf Fermentertemperatur gehalten. Im eingeschwungenen Zustand sind Reaktortemperatur und Wärmefluß konstant. Eine Wärmeproduk-

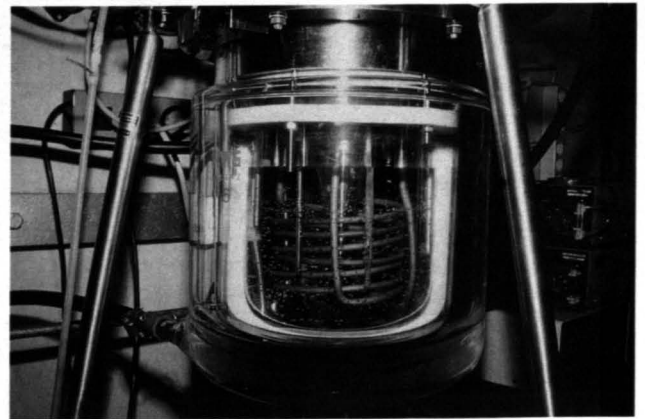


Abb. 2: Detailansicht des Fermenter-Kalorimeters (Arbeitsvolumen 2 Liter)

tion im Fermenter reduziert die Heizleistung der Kompensationsheizung und liefert direkt das Meßsignal.

Physikalisch-chemische Tests

Das geringe Rauschen des Meßsignals und die gute Langzeit Konstanz der Basislinie zeigt Abb. 3. Daher können auch kleine Wärmemengen von 10 bis 20 mW/L gemessen werden. Die Ansprechzeit variiert mit der Filterung zwischen 30 s und 8 min. Aufgrund der hohen Sensitivität sind auch Prozesse mit geringen Enthalpieänderungen analysierbar, wie Abb. 4 beispielhaft für das Lösen und Entgasen von Kohlendioxid in einem Wasserversuch zeigt. Das Fermenter-Kalorimeter funktioniert also auch als sensitives Reaktionskalorimeter.

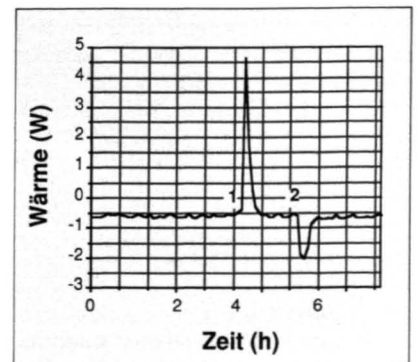


Abb. 4: Das Kalorimeter ist auch als sensitives Reaktionskalorimeter nutzbar. 1 = Lösen von Kohlendioxid in Wasser, 2 = Entgasen (30 °C, 500 UPM, Wechsel von 1 bar CO₂ auf 1 bar N₂)

Wissenschaftliches Antiquariat
Dr. Martin Sändig GmbH
 Chemie, Physik, Mathematik,
 Ing.-Wissenschaften.
 Erbitten Angebote. Katalog auf Anfrage.
 Sonnenberger Straße 64a · Postf. 51 20
 D-65041 Wiesbaden
 Telefon (06 11) 52 10 29

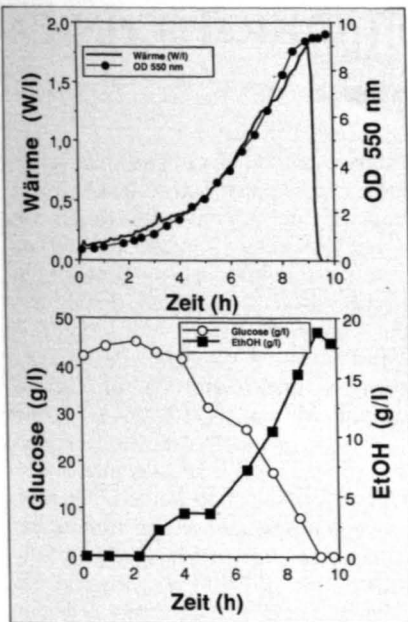


Abb. 5: Anaerobe Batch-Fermentation mit *Zymomonas mobilis* in Komplexmedium (pH = 5,5, 30 °C, Rührgeschwindigkeit 500 UPM). Verlauf von optischer Dichte und Wärmeentwicklung (oberes Diagramm) sowie Glucose- und Ethanolkonzentration im Medium (unteres Diagramm)

Organismenspektrum

Wir konzentrierten uns bisher auf aerobe Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus licheniformis*, *Alcaligenes eutrophus* und anaerobe Versuche mit *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* und *Lactobacillus casei*. Es zeigte sich, daß mit Hilfe der Fermentationskalorimetrie Stoffwechselaktivitäten und ihre Veränderungen sehr genau und schnell erfaßt werden können (Abb. 5).

On-line-Analyse von Fermentationen

Abb. 5 zeigt den typischen Verlauf einer Batchfermentation mit *Zymomonas mobilis* im komplexen Medium. Die begleitende Analytik per HPLC erfaßt Substrate wie Glucose und Stoffwechselprodukte wie Ethanol und organische Säuren. Den Verbrauch von Nährsalzen bestimmen wir ionenchromatographisch. Die entstandene Biomasse

wird aus der optischen Dichte (OD) der Suspension anhand einer Eichkurve aus OD und Trockengewicht ermittelt.

Die Entwicklung der optischen Dichte und die Wärmeproduktion verlaufen weitgehend parallel, solange die Kultur logarithmisch wächst und noch ausreichend Substrat in der Suspension vorhanden ist. Wärmeproduktion und Biomasseentwicklung sind offensichtlich zumindest in der logarithmischen Phase eng miteinander korreliert. Auch zwischen Wärmentswicklung und Substratverbrauch und Produktbildung ist ein linearer Zusammenhang erkennbar. (Abb. 5, unteres Diagramm). Der entscheidende Vorteil des Wärmesignals ist klar ersichtlich: Ist die Korrelation der Wärmeproduktion mit den Wachstumsparametern für eine gegebene Fermentation etabliert, so erschließt das Thermogramm bei allen nachfolgenden Fermentationen dieselbe Information wie analytische Messungen. Da Probenahme, Aufarbeitung und Analyse entfallen, reduziert sich der experimentelle Aufwand.

Fermentationsbilanz

Im Grunde sind bei Batchfermentationen Probenahmen nur noch dann nötig, wenn eine Energie- und Stoffbilanz gewünscht wird. Zur Berechnung der Stoffbilanz reicht es aus, die Anfangs- und Endkonzentration von Edukten und Produkten zu messen. Im Fall der Energiebilanz wird aus den gemessenen Konzentrationen die Verbrennungsenthalpie der Substanzen berechnet und zu dem um Neutralisationswärme und Verdampfungskälte korrigierten Integral der entstandenen Wärme addiert. Auf diese Weise kommt man mit dem Fermenter-Kalorimeter zu einer quantitativ nutzbaren Bilanz.

Am Beispiel mehrfach wiederholter aerober und anaerober Fermentationen mit *S. cerevisiae* in definiertem Medium konnten wir zeigen, daß die Versuche reproduzierbar zum gleichen Ergebnis führen. Die Energiebilanz hat einen nur geringen Fehler von etwa 1%. Daraus läßt sich folgendes Nutzungspotential ableiten: Da aerobe Prozesse in der Regel abwärmeintensiv sind, wird im Vorfeld einer industriellen Fermentation nach besonders energieeffizienten Stämmen gesucht (möglichst kleine Verlustwärme führt zu hoher Produktbildung und reduziert gleichzeitig die Kosten für Kühleinrichtungen). Ein er-

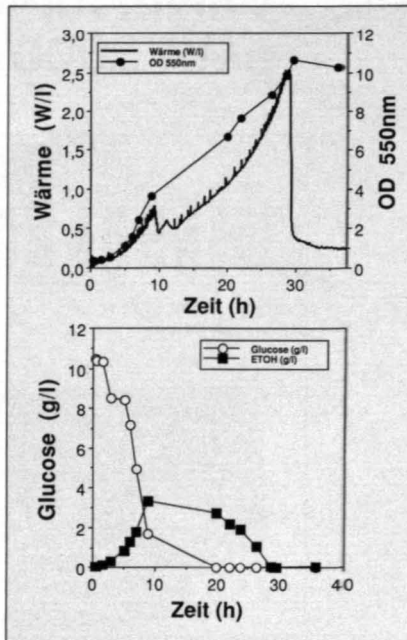


Abb. 6: Diauxisches Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 auf Glucose und Ethanol. Verlauf von optischer Dichte und Wärmeproduktion (oberes Diagramm) sowie Glucoseverbrauch und intermediäre Ethanolbildung (unteres Diagramm)

ster Versuch zur Übertragbarkeit von kalorimetrischen Labordaten auf eine größere Anlage wurde für 60 m³-Schüttelflaschen und einen Rührkessel mit 2 m³ Volumen beschrieben [12]. Aufgrund der einfachen Laborapparatur beträgt der Fehler der berechneten Wärmemengen etwa 25%. Mit Hilfe des Fermenter-Kalorimeters sollten bessere Ergebnisse zu erzielen sein.

Thermogramme zeigen Wechsel des Stoffwechselwegs an

Bei biotechnisch genutzten Fermentationen können erwartete oder unerwartete Veränderungen auftreten, z. B. infolge eines Wechsels des Stoffwechselwegs, durch Substratveränderungen oder bei Kontaminationen.

Abb. 6 zeigt den Wechsel eines Stoffwechselwegs am klassischen Beispiel der Backhefefermentation mit *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Organismus veratmet Glucose bei ausreichender Begasung und niedriger Glucosekonzentration (<100 mg/L) quantitativ zu Kohlendioxid und Wasser. Bei höheren Glucosegehalten wird intermediär

Ethanol gebildet. Erst beim Unterschreiten der genannten Schwellenkonzentration wird der Alkohol endoxidiert. Der damit verbundene Wechsel des Stoffwechselweges prägt sich im Biomassezuwachs aus. Führt man das Experiment im Fermenter-Kalorimeter durch, so „sieht“ man das Wachstum der Hefe auf zwei Substraten deutlich im Thermogramm (Abb. 6).

Wir untersuchen solche Stoffwechseltransitionen derzeit an zwei praxisbezogenen Beispielen. In beiden Fällen arbeitet man mit komplexen technischen Medien, so daß die Analyse von Substraten und Produkten schwierig ist, während die Thermogramme sehr einfach zu erhalten sind und klar Auskunft über den stoffwechselphysiologischen Zustand geben, sofern die Beziehung mit anderen Wachstumsparametern einmal etabliert ist.

Bacillus licheniformis produziert eine als Waschmittelzusatz gebräuchliche alkalische Protease. Es soll geprüft werden, ob die Fermentationskalorimetrie in Verbindung mit anderen Analysemethoden zur Optimierung der Fermentation im Labormaßstab genutzt werden kann und sich die Ergebnisse zur Steuerung eines Produktionsfermenters verwenden lassen.

Alcaligenes eutrophus bildet Polymere der Buttersäure (PHB), die sich als „Biokunststoff“ nutzen lassen [vgl. CLB 44 (1993) 378]. Gegenwärtig prüfen wir, inwieweit sich die von der C- und N-Versorgung abhängige, intrazelluläre Akkumulation von PHB im Thermogramm abzeichnet. Sofern zwischen PHB-produzierendem Wildstamm und einer PHB-freien Mutante deutliche Unterschiede im Thermogramm bestehen, lassen sich mit dieser Methode auch Regulationsphänomene untersuchen.

Die Fermentationskalorimetrie könnte in diesem Fall eine auch für den Genetiker interessante Methode sein: Bei Einbau- und Funktionsprüfungen von Genen bestimmt man bisher zeitaufwendig die Metabolite und/oder gelelektrophoretisch das exprimierte Enzym. Bei hoher Kopienzahl des gewünschten Gens in der Zelle sollte sich das chemisch oder thermisch induzierbare An- und Abschalten der Gene bei einer Fermentation im Fermenter-Kalorimeter dagegen direkt auf die Wärmeproduktion auswirken und daher die Funktionsprüfung erleichtern.

Ausblick

Das Konzept des Fermenter-Kalorimeters hat sich bei unseren bisherigen Versuchen bei der On-line-Analyse von Fermentationen bewährt. Als derzeitige Einsatzgebiete sehen wir Untersuchungen zur Substrat- und Verfahrensoptimierung in der Mikrobiologie, Zellbiologie, Biotechnik und Bodensanierung. Das Fermenter-Kalorimeter wird gegenwärtig fortentwickelt, so daß zukünftig auch tierische Zellen und Abwasserkulturen untersucht werden können. Das längerfristige Ziel besteht darin, dieses neuartige Meßgerät als Standardinstrument für das Biotechniklabor bereitzustellen.

Literatur:

- [1] Battley, E. H. (1987): *Energetics of microbial growth*. John Wiley & Sons, New York
- [2] Beaubien, A., Jolicœur, C. (1985): Applications of flow microcalorimetry to process control in biological treatment of industrial wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 57 (1), 95-100.
- [3] Dubrunfaut, M. (1856): Note sur la chaleur et le travail produits par la fermentation vineuse. *C. R. Acad. Sci.* 42, 945-948.
- [4] Eigenberger, G. (1987): Reaktionskalorimeter zur schnellen Erfassung von mikrobiellen Stoffwechseländerungen. In: *Finanzierungsantrag des Zentralen Schwerpunktprojektes Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart*, 509-520. Koordinationsstelle des ZSP Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- [5] Gustafsson, L. (1991): Microbiological calorimetry. *Thermochim. Acta* 193, 145-171.
- [6] Hübner, U. (1991): Entwicklung neuer On-line-Analysenmethoden zur Steuerung und Regelung von Proteasefermentationen. Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover.
- [7] Meier-Schneiders, M., Grosshans, U., Busch, C., Eigenberger, G. (1992): Investigation and control of fermentation processes using fermenter-calorimetry. In: *Dechema-Biotechnol. Conf.*, 5, 403-407. G. Kreysa, A. J. Driesel (eds.), VCH-Publishers, Weinheim, FRG.
- [8] Meier-Schneiders, M., Grosshans, U., Busch, C., Eigenberger, G. (1993): Analyse von Stoffwechselprozessen mit Hilfe der Fermenter-Kalorimetrie. In: *InCom-Tagungsband*, S. 2. W. Günther, D. Kneucker, G. Wulff (Hrsg.), Vogel-Verlag, Würzburg, FRG.
- [9] Meier-Schneiders, M., Eigenberger, G. (1993): Biokalorimetrie - Methoden und Nutzungspotential. *Biotec* 4/1993, 1-6.
- [10] Ott, J., Meier, M., Eigenberger, G. (1991): Development of a laboratory fermenter-calorimeter for aerobic and anaerobic fermentations. In: *Biochemical Engineering - Stuttgart*, 352-356. M. Reuss, H. Chmiel, E. D. Gilles, H. J. Knackmuss (Hrsg.), G. Fischer-Verlag, Stuttgart, FRG.
- [11] von Stockar, U., Marison, I. W. (1989): The use of calorimetry in biotechnology. *Adv. Biochem. Eng.* 40, 92-136.
- [12] Sumino, Y., Sonoi, K., Doi, M. (1993): Scale-up of a purine nucleoside fermentation from a shaking flask to a stirred tank fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 581-585.
- [13] Steinbüchel, A. (1991): Polyhydroxyfettsäuren - thermoplastisch verformbare Ester aus Bakterien. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 39, 1112-1124.
- [14] Traore, S. A., Belaich, J. P. (1981): Microcalorimetric study of a well defined mixed culture. *Entropie* 98, 55-59.
- [15] Wadsö, I. (1988): Progress and problems in microcalorimetric work on mammalian cell systems. *Thermochim. Acta.* 137, 1-10.