

1.9 YAFFA (Yeast Analysis by Field Flow Fractionation) Analyse und online Motoring von Hefezellen durch Feldflussfraktionierung

Dipl.-Ing. (FH) Matthias Niederhofer
Prof. Dr.-Ing. Ulrich Hochberg

Das Projekt Yaffa „Yeast Analysis by Field Flow Fractionation“ ist ein Verbundprojekt der Hochschule Offenburg und der Hochschule Wiesbaden in Kooperation mit der Forschungsanstalt Geisenheim, der Université Limoges, mehreren Industriepartnern der Weinbaubranche sowie der Postnova Analytics GmbH.

Ziel ist es, für die Weinherstellung ein praxistaugliches und wirtschaftliches Analyseverfahren mit Feldflussfraktionierung zu entwickeln. Das Analyseverfahren soll zur Qualitätsüberwachung des Weinfermentationsprozesses eingesetzt werden, wodurch z. B. Gärstörungen rechtzeitig erkannt und geeignete Gegenmaßnahmen eingeleitet werden können.

Feldflussfraktionierung

Die Feldflussfraktionierung (FFF) ist eine analytische Methode, die es ermöglicht, organische, anorganische oder biologische Substanzen zu separieren. Die Größe der separierbaren Partikel kann hierbei von wenigen nm bis zu etwa 100 µm reichen. Die Grundlagen der Feldflussfraktionierung wurden bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts von J. C. Giddings gelegt. Seit dieser Zeit sind eine Reihe von Varianten der FFF entstanden, die die Probenmoleküle nach unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften auftrennen. Allen FFF-Methoden gemeinsam ist die Verwendung eines speziellen Trennkanals, dessen Trägerstrom ein laminares Strömungsprofil ausbildet.

Die eigentliche Auftrennung der Partikel erfolgt durch ein Kraftfeld, das senkrecht zum laminaren Strömungsprofil angelegt wird. Dieses Kraftfeld kann eine weitere physikalische Kraft sein.

Je näher ein Partikel aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften unter Einwirkung der Querkraft an die Wand gedrückt wird, desto kleiner wird seine Geschwindigkeit. Die getrennten Größenfraktionen werden zeitversetzt aus

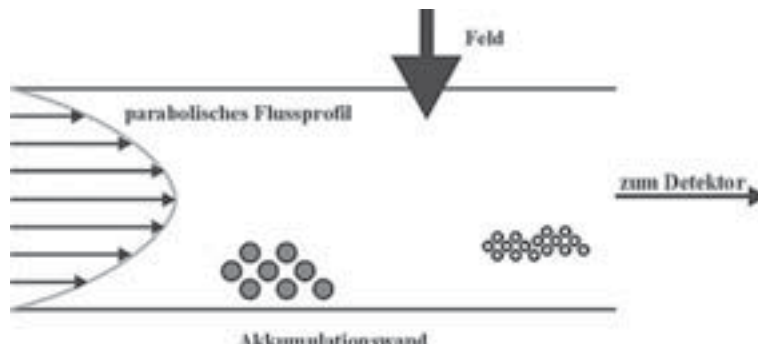


Abb. 1.9-1: Funktionsprinzip der Feldflussfraktionierung

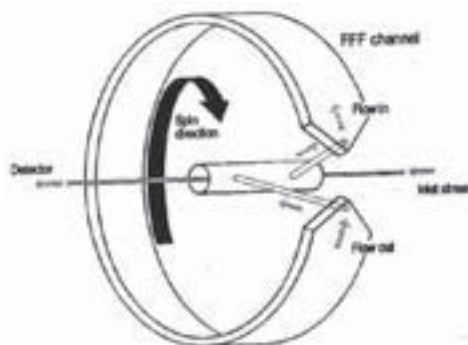


Abb. 1.9-2: Schematischer Aufbau eines Sedimentations-FFF-Kanals

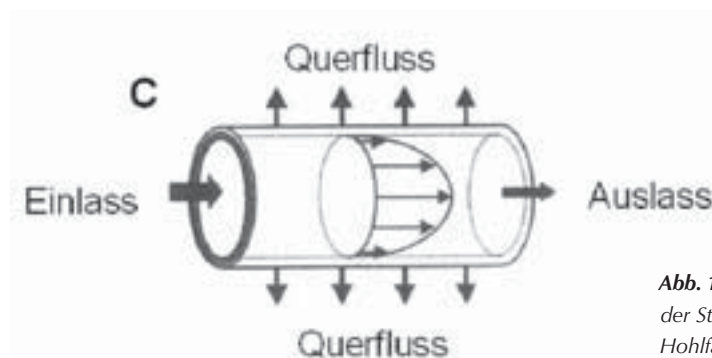


Abb. 1.9-3: Darstellung der Strömungsprofile bei Hohlfasern-FFF

dem Kanal ausgetragen und können dort detektiert oder fraktioniert gesammelt werden (vgl. Abbildung 1.9-1).

Bei größeren Partikeln wirkt ein zusätzlicher Trenneffekt: Große Partikel im Bereich hoher Gradienten der Strömungsgeschwindigkeit erfahren eine Kraft in Richtung der höheren Strömungsgeschwindigkeit infolge des dort niedrigeren statischen Drucks. Auch dieser Effekt kann bei der Feldflussfraktionierung ausgenutzt werden.

An der Hochschule Offenburg werden im Rahmen des Vorhabens YAFFA insbesondere zwei unterschiedliche FFF-Verfahren untersucht.

Sedimentations-FFF

Bei der *Sedimentations-FFF* wird ein Zentrifugalfeld als Trennkraft verwendet, indem der ringförmige Kanal zum Rotieren gebracht wird. Partikel im Größenbereich von 50 nm bis 100 µm werden aufgrund ihrer Durchmesser und Dichten getrennt (vgl. Abbildung 1.9-2).

Hohlfasern-FFF

Bei der Hohlfasern-FFF wird die Trennkraft über eine semipermeable Wand erzeugt, durch die ein Teil des Trägerstroms abfließt und die Teilchen dadurch in unterschiedliche Geschwindigkeitsbereiche des parabolischen Strömungsprofils gelangen (vgl. Abbildung 1.9-3).

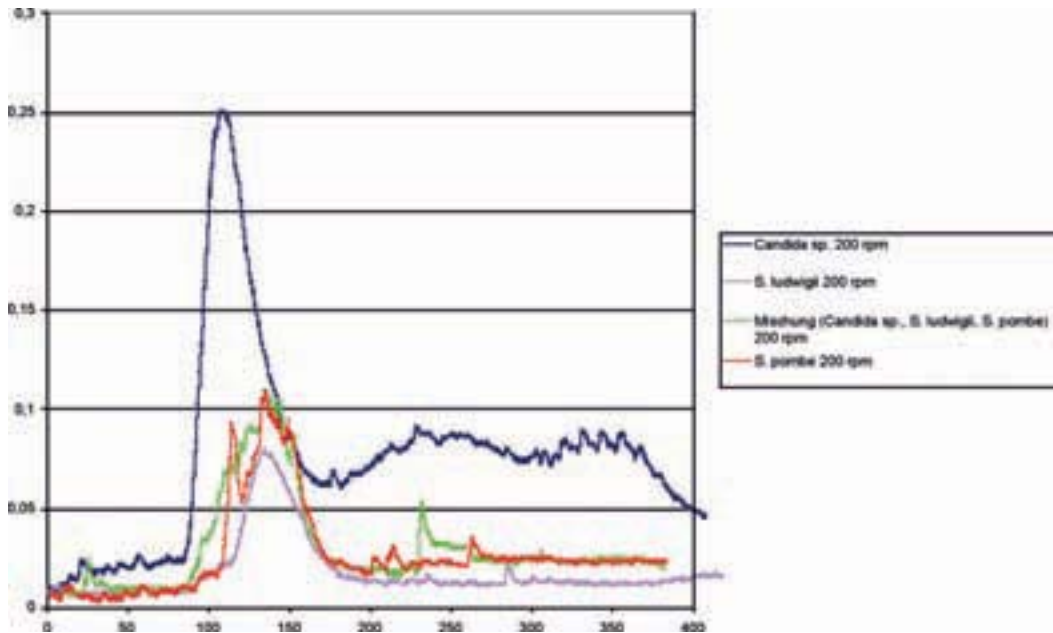


Diagramm 1: Durch Sd-FFF Methode erhaltene Faktogramme unterschiedlicher Hefestämme

Qualitative Laborarbeiten an der Hochschule Offenburg und der Universität Limoges zeigten, dass das Sedimentationsfeldflussfraktionierungsverfahren für die Trennung von Hefezellen geeignet ist (vgl. IAF Bericht 2007). Aufbauend auf den Ergebnissen von Prof. Zahoransky, wurden systematische Untersuchungen mit dem an der Hochschule Offenburg vorhandenen Sedimentationsfeldfraktionierungs-Versuchsaufbaus durchgeführt. Dabei konnten unterschiedliche Absorptionskurven für verschiedene Hefestämme detektiert werden (vgl. Diagramm 1).

Zur Unterscheidung von stoffwechselaktiven (vitalen) und inaktiven (letal) Hefezellen wurden drei verschiedene Methoden zur Färbung von Hefezellen untersucht. Als Methode zur Lebendzellzahlbestimmung hat sich die Methyleneblau-Färbung bewährt, da sie sehr eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Bei der Untersuchung der Beständigkeit von Weinhefen gegen Zentrifugalkräfte wurde festgestellt, dass das während der Messung aufzubringende Zentrifugalfeld keinen Einfluss auf die Vitalität der Hefezellen während der Messung hat.

Bei den Versuchsmessungen zeigte sich, dass je nach verwendetem Hefestamm Memory-Effekte im Strömungskanal auftreten.

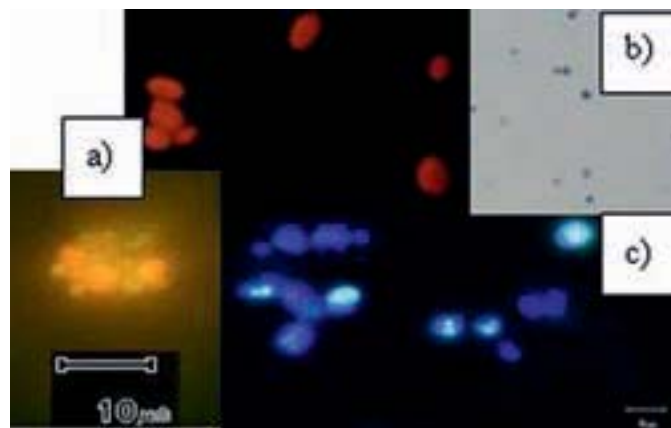


Abb. 1.9-4: Mikroskopaufnahmen von verschiedenen eingefärbten Hefezellen

a) We inhefen angefärbt mit Acridinorange mit 200-facher (unten) und 1000-facher Vergrößerung (oben)

b) Methyleneblau angefärbte Weinhefen mit 200-facher Vergrößerung

c) Mit DAPI angefärbte Weinhefen, 1000-fache Vergrößerung

Beim Memory-Effekt verbleibt eine bestimmte Fraktion von Zellen im Messkanal und wird über eine lange Zeit langsam ausgespült. Der Effekt ist abhängig von der Kanalgeometrie, den eingesetzten Hefestämmen und den eingestellten Versuchparametern. Das erfordert eine umfangreiche Methodenentwicklung, um reproduzierbare Ergebnisse bei der Hefezellenfraktionierung zu erhalten. Bei der Methodenentwicklung zeigte sich, dass es nicht möglich sein wird, ein kommerzielles System zu entwickeln, das in kleineren Weinkellereien eingesetzt werden kann. Folgende Details sprechen dagegen:

- Aufwendige Versuchsvorbereitung
- Anspruchsvolle Rotationsdichtungen
- Aufwendige Maßnahmen zur Erzielung einer CE-Konformität (große bewegte Teile)
- Hoher Preis des Gesamtsystems

An der Hochschule Offenburg wird daher zurzeit die Erfolg versprechende Hohlfasern-FFF weiterentwickelt.

Zunächst wurden Strömungssimulationsrechnungen an einer Hohlfasermembran mit ANSYS Workbench 11 durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Strömungsprofile einer laminaren Strömung

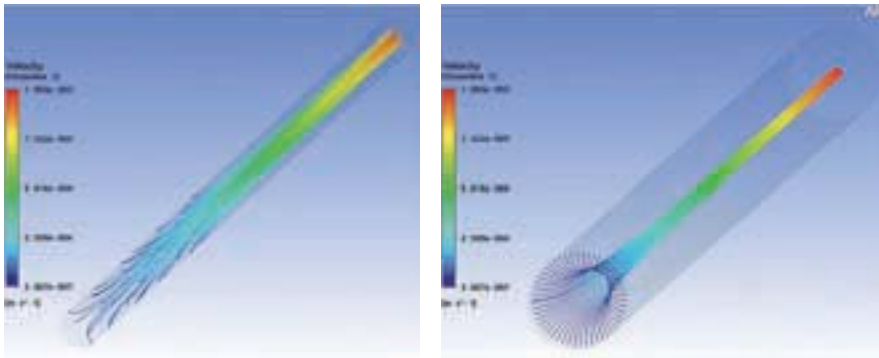


Abb. 1.9-5: Stromlinien innerhalb der Hohl-faser bei 100% Abströmung über die Außenwand



Abb. 1.9-6: Versuchsaufbau zum Einsatz von Hohl-fasermembranen

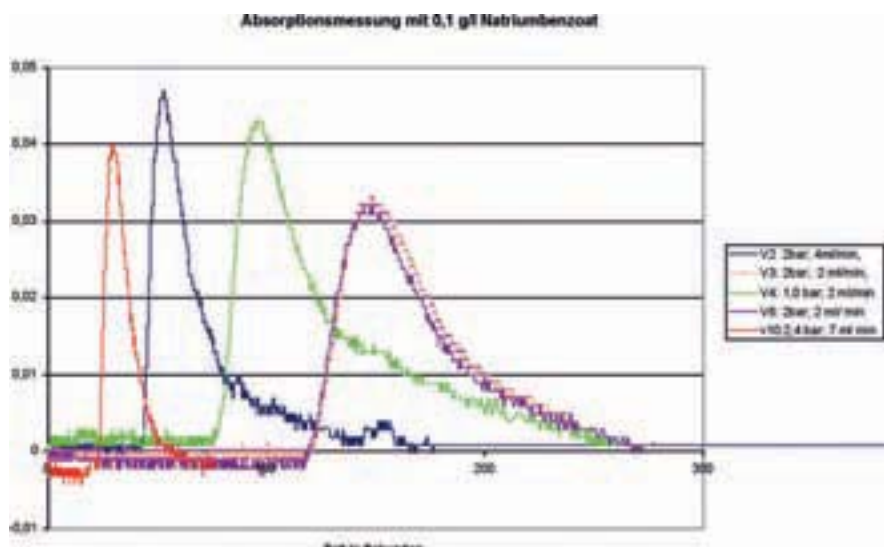


Diagramm 2: Absorptionsmessung unter Verwendung einer PP-Hohl-fasermembran bei verschiedenen Versuchsparametern

mung durch eine Kapillare mit semipermeabler Wand simuliert und der abströmende Massenstrom über die Außenwand variiert. Zusätzlich wurde den simulierten Strömungsprofilen eine kugelförmige Punktquelle am Eintritt auf-geprägt und deren Verhalten untersucht.

Der Versuchsstand für symmetrische Hohl-faser Feldflussfraktionierungs-verseuche ist aufgebaut und erste Test-lösungen wurden injiziert (vgl. Abbildung 1.9-7 und Diagramm 2).

Dabei ist es gelungen, reproduzierbare Absorptionskurven zu erhalten. Bei Vari-ation der Versuchsparameter über einen weiten Bereich sind signifikante unter-schiede in den Absorptionskurven er-kenubar.

Die ersten Ergebnisse sind vielverspre-chend, die Untersuchungen werden voraussichtlich Ende nächsten Jahres ab-geschlossen werden.