



**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**

**Fakultät Life Sciences**

Etablierung und Charakterisierung von kontinuierlichen Kultivierungen

mit *Escherichia coli*.

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

**Ann Noela Thies**



Hamburg

am 23. Juli 2021

Gutachter: Professor Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)

Gutachter: Professorin Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

## Vorwort

Die vorliegende Bachelorarbeit zum Thema kontinuierliche Kultivierung wurde von April bis Juli 2021 an der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg an der Fakultät Life Sciences durchgeführt. Ich habe dieses Thema gewählt, da es mir ein Anliegen war, mein Wissen im Bereich der Fermentation- und Bioreaktortechnik weiter zu vertiefen.

Die praktischen Arbeiten wurden im Labor für Bioverfahrenstechnik am Standort Bergedorf durchgeführt. Betreut wurde die Arbeit von Herrn Professor Doktor Christian Kaiser, bei dem ich mich sehr für die intensive Unterstützung bedanken möchte.

Im Labor stand mir Petra Derr stets mit Rat und Tat zur Seite. Dafür möchte ich an dieser Stelle von Herzen danken. Bei auftretenden Fragestellungen hatte Petra immer einen Tipp parat.

Auch gilt mein Dank Herrn Florian Schiffel, aus dem Labor der Mikrobiologie, der mich bei Fragen und Methoden im Bereich der Mikrobiologie unterstützte.

Mein Dank gilt auch Frau Professorin Doktorin Gesine Cornelissen, die die Betreuung der Arbeit als 2. Gutachterin übernommen hat.

Der HAW Hamburg möchte ich auch an dieser Stelle danken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, die Arbeit an der Hochschule zu schreiben.

Und ich möchte meinen Eltern danken, die während meines Studiums immer für mich da waren und mich finanziell und mental unterstützt haben.

Ich wünsche eine gute Lektüre meiner Abschlussarbeit.

Ann Noela Thies

Oststeinbek, den 23. Juli 2021

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Vorwort .....   | I  |
| Inhaltsverzeichnis.....   | II |
| Abkürzungen .....   | IV |
| Variablen .....   | IV |
| Indices .....   | VI |
| 1. Einleitung .....   | 1  |
| 2. Zielsetzung .....  | 2  |
| 3. Theoretische Grundlagen.....   | 3  |
| 3.1 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....                                     | 3  |
| 3.2 Rab11a .....  | 5  |
| 3.3 Mathematische Grundlagen .....  | 5  |
| 3.3.1 Massenbilanz .....  | 5  |
| 3.3.2 Monod-Gleichung .....   | 6  |
| 3.3.4 Ausbeutekoeffizienten.....  | 7  |
| 3.3.5 Erhaltungsstoffwechsel.....   | 8  |
| 3.3.6 Volumetrische Stoffübergangszahl $k_{La}$ .....                           | 9  |
| 3.3.7 Respirationsquotient .....  | 12 |
| 3.4 Prozessführungsstrategien .....   | 13 |
| 3.4.1 Batch-Prozess.....  | 13 |
| 3.4.2 Kontinuierliche Kultivierung .....  | 16 |
| 3.4.3 Induktion der Produktbildung in einer kontinuierlichen Kultivierung ..... | 22 |
| 3.4.4 Weitere Prozessführungsstrategien .....                                   | 22 |
| 4. Materialien und Methoden .....   | 24 |
| 4.1 Versuchsaufbau.....   | 24 |
| 4.2 SCADA-System MFCS/win .....   | 30 |
| 4.2.1 Einbindung der Pumpen und Waagen .....                                    | 32 |
| 4.3 Medienansatz.....   | 34 |
| 4.4 Analysemethoden .....   | 37 |
| 4.4.1 Bestimmung der optischen Dichte .....                                     | 37 |
| 4.4.2 Biotrockenmassebestimmung .....   | 38 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.4.3 Untersuchung der Plasmidretention .....                          | 40  |
| 4.4.4 Glucoseanalyse .....   | 40  |
| 4.4.5 Acetatanalyse.....   | 43  |
| 4.4.7 Produktanalyse .....   | 44  |
| 4.4.8. Untersuchung der Zellmorphologie.....                           | 46  |
| 5. Ergebnisse und Diskussion.....                                      | 48  |
| 5.1 Untersuchung des Zellwachstums .....                               | 51  |
| 5.1.1 Biotrockenmassebestimmung K1 .....                               | 51  |
| 5.1.2 Biotrockenmassebestimmung K2 .....                               | 55  |
| 5.1.3 Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Zellkonzentration..... | 58  |
| 5.2 Untersuchung der Verdünnungsraten .....                            | 63  |
| 5.3 Untersuchung der Glucosekonzentration.....                         | 67  |
| 5.3.2 Bestimmung des Substratausbeutekoeffizienten.....                | 74  |
| 5.4 Untersuchung der Acetatkonzentration .....                         | 79  |
| 5.5 Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate.....           | 82  |
| 5.6 Untersuchung der Abgasanalytik.....                                | 85  |
| 5.7 Diskussion der Ergebnisse zur Charakterisierung .....              | 93  |
| 5.8 Untersuchungen zur Produktbildung.....                             | 97  |
| 5.8.1 Untersuchungen zur Produktbildung von K1.....                    | 97  |
| 5.8.2 Untersuchungen zur Produktbildung von K2.....                    | 103 |
| 5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2 .....                           | 111 |
| 6. Zusammenfassung und Ausblick.....                                   | 114 |
| Quellenverzeichnis.....  | 116 |
| Anhang .....   | 118 |
| Plot K1 .....  | 118 |
| Plot K2 .....  | 119 |
| Prozessdaten K1.....   | 120 |
| Prozessdaten K2.....   | 122 |

## Abkürzungen

|                 |   |
|-----------------|---|
| BSA             | Bovines Serumalbumin  |
| BTM             | Biotrockenmasse   |
| BVT             | Bioverfahrenstechnik  |
| DCU             | Digital Control Unit  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| Feed            | Nachfüttermedium  |
| HPLC            | High Performance Liquid Chromatography  |
| KBE             | Koloniebildende Einheit   |
| LB-Medium       | Lysogeny broth Medium   |
| NH <sub>3</sub> | Ammoniak  |
| NL              | Normalliter (293,15 K, 1 bar)   |
| OD              | optische Dichte   |
| OTR             | volumetrische Sauerstofftransferrate ( <i>engl.</i> Oxygen Transfer Rate)   |
| OUR             | volumetrische Sauerstoffaufnahmerate ( <i>engl.</i> Oxygen Uptake Rate)   |
| MFCs/win        | Multi-Fermenter Control System for Windows  |
| pO <sub>2</sub> | Gelöstsauerstoffpartialdruck  |
| PVDF            | Polyvinylidenfluorid  |
| rpm             | Umdrehungen pro Minute ( <i>engl.</i> rounds per minute)  |
| RQ              | Respirationsquotient  |
| SDS-PAGE        | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>engl.</i> : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) |
| VE-Wasser       | vollentsalztes Wasser   |

## Variablen

|                              |  |     |
|------------------------------|--|-----|
| $\beta$                      | Massenkonzentration  | g/L |
| c <sub>CO<sub>2</sub>L</sub> | Gelöstkohlenstoffdioxidkonzentration in der Flüssigphase L | g/L |
| c <sub>O<sub>2</sub>L</sub>  | Gelöstsauerstoffkonzentration in Flüssigphase L            | g/L |
| c* <sub>O<sub>2</sub>L</sub> | Sauerstoffgleichgewichtskonzentration in Flüssigphase L    | g/L |
| c <sub>AL</sub>              | Acetatkonzentration in der Flüssigphase L                  | g/L |
| c <sub>SL</sub>              | Substratkonzentration in der Flüssigphase L                | g/L |

## Abkürzungen

---

|              |   |             |
|--------------|---|-------------|
| $c_{XL}$     | Biomassekonzentration in der Flüssigphase L               | g/L         |
| D            | Verdünnungsrate   | $h^{-1}$    |
| $F_G$        | Begasungsrate   | L/h         |
| $F_R$        | Zufütterrata  | L/h         |
| f            | Verdünnungsfaktor   | -           |
| $f_{X/OD}$   | Umrechnungsfaktor Biotrockenmasse über OD                 | -           |
| $k_{La}$     | volumetrische Stoffübergangszahl                          | $h^{-1}$    |
| $K_s$        | Sättigungskonstante der Monodkinetik                      | mol         |
| m            | Masse   | g           |
| $N_{st}$     | Rührerdrehzahl  | rpm         |
| $OD_{340}$   | Optische Dichte bei 340 nm                                | -           |
| $OD_{600}$   | optische Dichte bei 600 nm                                | -           |
| p            | Umgebungsdruck  | bar         |
| $p_{dry}$    | Luftdruck trockener Luft                                  | bar         |
| pH           | pH-Wert   | -           |
| $pO_2\%$     | relativer Sauerstoffpartialdruck                          | %           |
| $Q_{O_2L}$   | volumetrische Sauerstoffaufnahme                          | g/L h       |
| $q_{O/X}$    | spezifische Sauerstoffverbrauchsrate                      | $h^{-1}$    |
| $q_{X/S,m}$  | spezifische Substratverbrauchsrate Erhaltungsstoffwechsel | $h^{-1}$    |
| $r_X$        | Reaktionsgeschwindigkeit Zellmassezunahme                 | $h^{-1}$    |
| $R^2$        | Bestimmtheitsmaß  | -           |
| t            | Prozesszeit   | h           |
| $\bar{t}$    | mittlerer Verweilzeit                                     | h           |
| $V_L$        | Flüssiges Reaktionsvolumen                                | L           |
| $V_{Probe}$  | Probenvolumen   | L           |
| $x_{CO_2}$   | Stoffmengenanteil Kohlendioxid                            | -           |
| $x_{O_2}$    | Stoffmengenanteil Sauerstoff                              | -           |
| $Y_{X/S}$    | Substratausbeutekoeffizient                               | g/g         |
| $Y_{X/S,gr}$ | Substratausbeutekoeffizienten, wachstumsbezogen           | g/g         |
| $^{\circ}C$  | Grad Celsius  | $^{\circ}C$ |
| $\mu$        | zellspezifische Wachstumsgeschwindigkeit                  | $h^{-1}$    |
| $\mu_{max}$  | maximale zellspezifische Wachstumsgeschwindigkeit         | $h^{-1}$    |

## Indices

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| A   | Acetat                   |
| cal | Kalibrierwert            |
| Glc | Glucose                  |
| in  | Reaktoreingang           |
| KG  | Kalibriergerade          |
| L   | Flüssiges Reaktorvolumen |
| m   | Molvolumen               |
| out | Reaktorausgang           |
| R   | Reservoir                |
| S   | Substrat                 |
| X   | Zellmasse                |

# 1. Einleitung

Die Biotechnologie ist ein Arbeitsfeld, in dem mit Mikroorganismen und verschiedenen Zelllinien eine Vielzahl von Produkten hergestellt werden. Diese reichen von einfachen Enzymen, zum Beispiel für die Waschmittel- oder Lebensmittelindustrie, über Bioethanol als Treibstoff, bis zu rekombinanten Proteinen für die Pharmaindustrie, wie monoklonale Antikörper oder Insulin. Es werden auch Mikroorganismen für Abbauprozesse eingesetzt. Ein Beispiel hierfür sind Klärwerke, in denen unterschiedliche Bakterien verwendet werden, um Schadstoffe im Abwasser abzubauen. Das Produkt ist in diesem Fall aufgereinigtes Wasser.

Diese Substanzen werden teilweise von den verwendeten Zellen als natürliche Stoffwechselprodukte hergestellt, teilweise werden die Zellen durch gezieltes Einbringen bestimmter Gensequenzen befähigt, ein bestimmtes Produkt zu bilden.

Die Produktion durch Mikroorganismen und Zelllinien findet in sogenannten Bioreaktoren statt. Hier werden die Organismen, bei für die Produktbildung optimalen Bedingungen, kultiviert [1].

Es gibt verschiedene Arten einen Kultivierungsprozess zu führen. Eine mögliche Prozessführungsstrategie ist der Batch-Prozess. Hier werden zu Beginn des Prozesses alle benötigten Nährstoffe in den Bioreaktor gegeben und der Prozess maximal so lange geführt, bis einer der Nährstoffe verbraucht ist, oder ein anderer wachstumsbegrenzender Faktor eintritt, und die Zellen ihr Wachstum einstellen. Eine andere Variante ist der sogenannte Fed-Batch-Prozess. Nach einer Startphase, die dem Batch-Prozess entspricht, wird regelmäßig Substrat zugefüttert, um einen Nährstoffmangel zu vermeiden. Dieser Prozess lässt sich führen, bis das maximale Reaktorvolumen erreicht ist [2].

Eine weitere Prozessführungsstrategie ist die sogenannte kontinuierliche Kulturierung. Es wird permanent Medium in den Reaktor gepumpt und eine identische Menge verbrauchtes Medium mit Zellmasse aus dem Reaktor gepumpt. Dieser Prozess kann über einen langen Zeitraum geführt werden und findet immer häufiger Anwendung in der Industrie [3].

Im Zuge der Bachelorarbeit wird ein solcher Prozess aufgebaut und untersucht.

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war es eine kontinuierliche Kultivierung im Labor Bioverfahrenstechnik an der Fakultät Life Sciences der HAW Hamburg zu etablieren und zu charakterisieren.

Eine kontinuierliche Kultivierung zeichnet sich dadurch aus, dass es in Abhängigkeit verschiedener Prozessgrößen immer wieder zu einer Gleichgewichtseinstellung kommt. Dies kann genutzt werden, um den Einfluss einzelner Prozessgrößen auf eine Kultivierung mit einem bestimmten Stamm zu untersuchen [2].

Innerhalb eines Prozesses können so eine Vielzahl von Einflüssen, wie Temperatur, pH-Wert (pH), Medienzusammensetzung, getestet werden.

Die so gewonnen Erkenntnisse können auf andere Kultivierungsformen, wie zum Beispiel eine Hochzelldichtekultivierung (Fed-Batch-Verfahren), übertragen werden, um diese zu optimieren. Für die Kultivierung wird der im Labor häufig eingesetzte Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a Rab11a verwendet. Dieser Stamm ist robust und weist eine hohe Produktbildungsrate auf.

Der Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung wurde im Rahmen dieser Arbeit realisiert und in einem ersten Versuch auf Stabilität überprüft. So sollte zum Beispiel sichergestellt werden, dass die Zufütterung und Ernte mit vorgegebenen Verdünnungsraten des flüssigen Fermentationsvolumens umgesetzt werden kann. Zudem sollte untersucht werden, ob das System über den Verlauf einer Woche sicher funktioniert, keine Kontaminationen eingeschleppt werden und die Zellen die lange Kultivierung überstehen

Um die Grundlagen für die Untersuchung von Prozessgrößen zu legen, wurde überprüft, ob die Gleichgewichtseinstellung unter unterschiedlichen Prozessbedingungen gegeben ist. Zudem wurden Methoden eingeführt, mit denen eine sichere Analyse der Prozesszustände umzusetzen ist. Im zweiten Versuch wurde die Versuchsführung reproduziert und die Methodik der Analyse optimiert.

Eine weitere mögliche Nutzung dieser Prozessführungsstrategie ist die kontinuierliche Gewinnung eines Produktes. Im Zuge dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen vorgenommen, wie dies umzusetzen wäre.

## 3. Theoretische Grundlagen

Eine Fermentation ist ein Prozess, bei dem in wässriger Lösung Zellen kultiviert werden, um ein bestimmtes Produkt zu erhalten. Die Kultivierung findet in einem sterilen System statt, welches mit der Umwelt nur über Zuluft- und Abluftfilter verbunden ist, um den Eintrag von Kontaminanten und den Austrag der Zellen in die Umwelt zu verhindern. Über eine Kontrolleinheit (DCU) werden verschiedene Prozessparameter, wie Temperatur, pH, Begasung und Rührerdrehzahl ( $N_{st}$ ) geregelt, um für die zu kultivierenden Zellen optimale Bedingungen zu schaffen. Es wird vereinfacht angenommen, dass aufgrund idealer Durchmischung des Mediums überall die gleichen Bedingungen herrschen und die Zellen im Reaktor alle identisch sind und sich im gleichen Wachstumsstadium befinden.

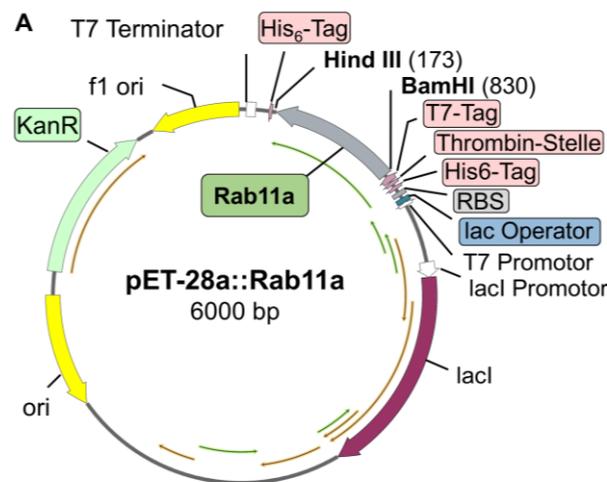
Im Folgenden wird der verwendete Organismus näher beschrieben, einige mathematische Modelle, die für die weitere Betrachtung relevant sind, aufgezeigt und die unterschiedlichen Phasen des Kultivierungsprozesses genau erläutert. Sofern nicht anders angegeben, stützt sich das angewendete mathematische Modell auf die 2. Auflage Bioprozesstechnik von Chmiel [2].

### 3.1 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Die Kultivierungen werden mit *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. *E. coli* ist ein gramnegatives Bakterium, welches sich unter anderem im menschlichen Darm findet. Es ist fakultativ anaerob, was bedeutet, dass es bei Sauerstoffmangel Gärung betreiben kann. Dieses stäbchenförmige, 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  breite und 2-6  $\mu\text{m}$  lange Bakterium besitzt auf seiner äußeren Zellmembran sogenannte Lipopolysaccharide, die die Zelle vor dem Eindringen hydrophober zelltoxischer Substanzen, wie zum Beispiel Antibiotika, schützt [4]. Der menschliche Körper weist eine starke Immunantwort gegen Lipopolysaccharide auf. Gelangen diese in die Blutbahn, kann es im schlimmsten Fall zu einer Sepsis kommen. Es gibt eine Vielzahl von *E. coli* Stämmen, die beim Menschen Krankheiten auslösen. Neben der Sepsis als mögliches Krankheitsbild, kommt es bei einer Infektion mit einigen Stämmen zu starkem Durchfall oder zu Blasenentzündungen [5]. Dies ist einer der Gründe, aufgrund derer im Labor mit Sicherheits-

stämmen gearbeitet wird. Diese weisen keine Pathogenität auf und verfügen über weitere Eigenschaften, welche die Klonierung und Expression rekombinanter Produkte verbessern. Ein Stamm, der häufig Anwendung findet, ist BL21, sowie die weiter modifizierte Variante BL21(DE3), welcher in den Kultivierungen verwendet wird. Diese Stämme wurden von F. William Studier und Barbara A. Moffatt entwickelt [6]. BL21 Stämme sind nicht in der Lage die Proteasen lon und ompT herzustellen, da die entsprechenden Sequenzen aus dem Genom entfernt wurden. Dies ist zum Beispiel bei der Herstellung rekombinanter Proteine relevant, da diese sonst wieder abgebaut werden würden [6].

Der Stamm enthält ein pET28a-Plasmid (Abb. 3.1), welches einen Promotor für die T7 RNA Polymerase enthält, und für die Basensequenz für das rekombinante Protein, sowie für eine Antibiotikaresistenz, in diesem Fall gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin, codiert [7]. Das Protein verfügt über zwei His<sub>6</sub>-Tags, die die spätere Aufreinigung erleichtern. An der Thrombinstelle kann der His-Tag anschließend von dem Produkt entfernt werden.



**Abbildung 3.1:** Das pET28a Plasmid, welches der verwendeten *E. coli*-Stamm trägt. Die Gensequenz für Rab11a befindet sich in 5'-3' Richtung zwischen BamHI (198) und HindIII (173). Das Protein verfügt über zwei His<sub>6</sub>-Tags, eine Thrombin und einen T7-Tag. Das Plasmid enthält außerdem eine Kanamycin-Resistenz, den lac Operator, lacI-Promotor, sowie -Repressor. Dazu die Basensequenz für den T7-Promotor und -Terminator [7].

Die verwendete T7 RNA Polymerase entstammt aus dem Bakteriophagen T7. Die Sequenz wird über die Prophage λDE3 in den Organismus eingebracht [8]. Die Expression der Polymerase wird über den lacI-Promotor reguliert, der in Anwesenheit von Lactose oder IPTG

aktiviert wird [9]. Im Gegensatz zu anderen durch Lactose aktivierten Promotoren wird dieser nicht durch die Anwesenheit von Glucose gehemmt, was bei einer Kultivierung mit Glucose als Substrat notwendig ist. Sobald die T7 RNA Polymerase Expression induziert wird, bindet diese an ihren spezifischen Promotor, und startet die Translation der Produkt-DNA. Aufgrund der hohen Translationsgeschwindigkeit der Polymerase kann so in kurzer Zeit eine hohe Ausbeute erzielt werden [8]. Ein Nachteil der Verwendung der  $\lambda$ DE3 Prophage für das Einbringen der T7 RNA Polymerase Sequenz ist, dass die Zelle unter bestimmten Stressbedingungen spontan lysieren kann [9].

#### 3.2 Rab11a

Der verwendete Organismus trägt auf dem pET28a Plasmid die Basensequenz für das Protein Rab11a. Rab11a gehört zu einer Gruppe von GTPasen, die für die Kontrolle von unterschiedlichen Transportmechanismen aus Zellen zuständig sind. In der Molekularbiologie der HAW sollte Rab11a als Differenzierungsfaktor verwendet werden, findet heute aber keine Anwendung mehr. Das verwendete Rab11-Gen ist aus einem Hund isoliert und weist eine Größe von 24.000 Dalton (Da) auf. Das Protein wird mit zwei His<sub>6</sub>-Tags, der Thrombinschnittstelle und dem T7-Tag exprimiert und erreicht so eine Molmasse von 27,9 kDa [7].

Für diesen Versuch ist das Produkt nicht weiter von Interesse, es soll lediglich untersucht werden, ob und in welcher Quantität eine Produktbildung induziert werden kann.

#### 3.3 Mathematische Grundlagen

Die theoretische Betrachtung der Prozessführung stützt sich auf einige mathematische Grundlagen und Modelle, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

##### 3.3.1 Massenbilanz

Eine grundlegende Betrachtungsweise für weitere Überlegungen ist die Massenbilanz. Diese Theorie hat ihren Ursprung in der Thermodynamik. Es wird ein Bilanzraum festgelegt und

alle ein- und austretenden Massenströme untersucht. Auf die Fermentationstechnik übertragen ist der Bilanzraum die Flüssigphase im Bioreaktor, in dem die Kultivierung stattfindet. Die betrachtete Masse ist zum Beispiel die Zellmasse im Kessel, die sich mit der Zeit ändert. Einfluss auf die Zellmasse hat ein Zellmassenstrom in den Reaktor hinein, sowie aus dem Reaktor hinaus, und der Zellzuwachs im Reaktor durch Zellwachstum. Die untenstehende Formel beschreibt diesen Zusammenhang.

$$\frac{dm_{XL}}{dt} = \frac{dc_{XL} \cdot V_L(t)}{dt} = r_X(t) \cdot V_L + F_{in} \cdot c_{XL,in} - F_{out} \cdot c_{XL,out} \quad (3.1)$$

mit

|              |   |       |
|--------------|---|-------|
| $m_{XL}$     | = Zellmasse im flüssigen Reaktorvolumen | [g]   |
| $c_{XL}$     | = Zellkonzentration                     | [g/L] |
| $V_L$        | = Reaktorvolumen                        | [L]   |
| $r_X$        | = Reaktionsgeschwindigkeit Zellwachstum | [h]   |
| $F_{in}$     | = Volumenstrom in den Reaktor           | [L/h] |
| $c_{XL,in}$  | = Zellkonzentration im Zufluss          | [g/L] |
| $F_{out}$    | = Volumenstrom aus dem Reaktor          | [L/h] |
| $c_{XL,out}$ | = Zellenkonzentration im Zufluss        | [g/L] |

Je nach Prozessführungsstrategie entfallen Teile der Gleichung.

#### 3.3.2 Monod-Gleichung

Die zellspezifische Wachstumsrate  $\mu$  wird über die Monod-Gleichung bestimmt, die im Jahre 1949 von Jacques Monod aufgestellt wurde. Sie basiert auf der Michaelis-Menten-Theorie, die die Enzymkinetik vereinfacht beschreibt.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad (3.2)$$

mit

|              |  |                    |
|--------------|--|--------------------|
| $\mu_{\max}$ | = maximale zellspezifische Wachstumsrate | [h <sup>-1</sup> ] |
| $c_{SL}$     | = Substratkonzentration                  | [g/L]              |
| $K_S$        | = Sättigungskonstante der Monod Kinetik  | [g/L]              |

$K_S$  beschreibt die Affinität des Organismus zu dem Substrat. In vielen Kultivierungen wird mit Substraten gearbeitet, zu denen die eingesetzten Mikroorganismen eine hohe Affinität haben,  $K_S$  ist also zumeist sehr klein. Daraus folgt, dass bereits bei einer niedrigen Substratkonzentration die zellspezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  entspricht.

Die Sättigungskonstante für Glucose bei *E. coli* ist abhängig von Prozessbedingungen, wie pH und Temperatur. Ein möglicher Wert, der sich in der Literatur findet, ist  $0,22 \cdot 10^{-4}$  mol [2].

#### 3.3.4 Ausbeutekoeffizienten

Ein Mikroorganismus benötigt eine Vielzahl von Nährstoffen, um optimal zu wachsen. Hierbei handelt es sich um 11 Makromoleküle, wie zum Beispiel Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor. Aber auch bestimmte Spurenelemente werden für den Stoffwechsel benötigt. Die benötigten Spurenelemente variieren je nach Mikroorganismus. Entsprechend den Bedürfnissen des zu kultivierenden Mikroorganismus wird ein Medium verwendet, das alle nötigen Bestandteile enthält. Viele Organismen kommen besser mit sogenannten Komplexmedien zurecht, da diese nicht nur Makro- und Spurenelemente in Reinstform enthalten, sondern auch Vitamine, Aminosäuren und Peptide. In einem Mineralmedium müssen die Zellen diese Komponenten selbst herstellen. Bei den Komplexbestandteilen handelt es sich häufig um Pepton und Hefeextrakt. Die genaue Zusammensetzung ist hier unbekannt. Für die genaue Reproduzierbarkeit eines Prozesses ist es daher ratsam, ein Mineralmedium mit bekannten Konzentrationen zu verwenden.

Ein Mikroorganismus hat eine Elementarzusammensetzung, anhand derer man den Verbrauch von Makromolekülen berechnen kann. *E. coli* hat die Elementarzusammensetzung

$\text{CH}_{1,77}\text{O}_{0,49}\text{N}_{0,24}$  [10]. Setzt man in einem Prozess eine bekannte Mengen Glucose als C-Quelle ein, kann man den Sauerstoff- oder den Stickstoffverbrauch in Gramm Sauerstoff/Stickstoff pro Gramm Zellmasse exakt berechnen.

Der beobachtbare Substratausbeutekoeffizient gibt an, wie viel Zellmasse aus einer im Prozess eingesetzten Substanz entsteht. Für den beobachtbaren Zellmasse-Substrat Ausbeutekoeffizienten lautet die Formel:

$$y_{X/S} = -\frac{\Delta c_{XL}}{\Delta c_{SL}} = \frac{c_{XL}(t) - c_{XL,0}}{c_{SL,0} - c_{SL}(t)} \quad (3.3)$$

mit

|             |   |       |
|-------------|---|-------|
| $c_{XL}(t)$ | = Zellkonzentration zum Zeitpunkt t     | [g/L] |
| $c_{XL,0}$  | = Ausgangszellkonzentration             | [g/L] |
| $c_{SL,0}$  | = Ausgangssubstratkonzentration         | [g/L] |
| $c_{SL}(t)$ | = Substratkonzentration zum Zeitpunkt t | [g/L] |

Ebenso kann der Ausbeutekoeffizient für zum Beispiel Sauerstoff,  $y_{X/O}$  oder Stickstoff,  $y_{X/N}$  berechnet werden. Auch ist ein Produktausbeutekoeffizient  $y_{P/X}$  einfach zu bestimmen. Allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Produktbildung der Zellen konstant ist. Dies kann nur für eine kontinuierliche Kultivierung innerhalb eines stationären Zustands angenommen werden. Grundsätzlich kann ein Ausbeutekoeffizient nur anhand sich konstant verändernder Werte berechnet werden. Diese Ausbeutekoeffizienten können mit theoretischen Werten verglichen werden, um zu beurteilen, ob der Prozess optimal abläuft.

#### 3.3.5 Erhaltungstoffwechsel

Die Zellen verbrauchen nicht das gesamte Substrat für das Zellwachstum, wie in der Monod-Kinetik angenommen. Ein Anteil wird für den Stoffwechsel und die Fortbewegung aufgewandt [2]. Der Maintenanceanteil (Maintenance *engl.*: Erhaltung) lässt sich nur in Kultivierungen unter Substratlimitierung mit einstellbarer Wachstumsrate bestimmen. Auch dann kann er nicht direkt berechnet werden, sondern wird anhand einer linearen Regression be-

stimmt. Die Formel für die lineare Regression wird auf Grundlage der allgemeinen Biomassebilanzgleichung mit Maintenance-Anteil hergeleitet [10].

$$\frac{dm_{SL}}{dt} = - \frac{\mu}{y_{X/S,gr}} c_{XL} V_L - q_{S/X,m} c_{XL} V_L + F_{in} c_{SL,R} - F_{out} c_{SL} \quad (3.4)$$

mit

|   |                    |
|---|--------------------|
| $m_{SL}$ = Substratmasse im flüssigen Reaktorvolumen          | [g]                |
| $y_{X/S,gr}$ = Growth Anteil des Ausbeutekoeffizienten        | [g/g]              |
| $q_{S/X,m}$ = spezifische Substratsverbrauchsrate Maintenance | [h <sup>-1</sup> ] |

#### 3.3.6 Volumetrische Stoffübergangszahl $k_L a$

Der  $k_L a$ -Wert ist der Transportleitwert eines Gases in eine Flüssigphase.  $k_L$  beschreibt, wie das Gas, bei den betrachteten Kultivierungen Sauerstoff, durch die laminare Grenzschicht zwischen Gas- und Flüssigphase diffundiert.  $a$  ist die spezifische Stoffaustauschfläche.

Über den  $k_L a$ -Wert kann der Sauerstoffeintrag in das Medium ermittelt werden, was für die Betrachtung einer Kultivierung von großem Interesse ist, da nur im Medium gelöster Sauerstoff von den Mikroorganismen aufgenommen werden kann. Die Sauerstofflöslichkeit im wässrigen Medium ist sehr gering, in reinem Wasser liegt sie bei 1,03 mmol/L bei 40 °C. Elektrolyte reduzieren die Sauerstofflöslichkeit zudem erheblich [2]. Aus diesem Grund spielt der  $k_L a$ -Wert und dessen Beeinflussung in Kultivierungen eine entscheidende Rolle.

Die volumetrische Stoffübergangszahl kann mit verschiedenen Verfahren experimentell bestimmt werden, sie kann zum Beispiel über die Sauerstoffeintragsrate (OTR) mit der Fließgleichgewichtsmethode berechnet werden [10].

Es gilt die Annahme:

$$Q_{O_2L} = Q_{O_2,in} - Q_{O_2,out} = OTR = OUR \quad (3.5)$$

mit

|               |   |         |
|---------------|---|---------|
| $Q_{O_2L}$    | = volumetrische Sauerstoffeintragsrate                    | [g/L h] |
| $Q_{O_2,in}$  | = volumetrische Sauerstoffeintragsrate in den Bioreaktor  | [g/L h] |
| $Q_{O_2,out}$ | = volumetrische Sauerstoffeintragsrate aus dem Bioreaktor | [g/L h] |
| OTR           | = volumetrische Sauerstofftransferate                     | [g/L h] |
| OUR           | = volumetrische Sauerstoffaufnahme                        | [g/L h] |

Die OTR kann aus dem Produkt des  $k_{La}$ -Wertes und der mittleren logarithmischen Sauerstoffkonzentrationsdifferenz zwischen Zu- und Abluft berechnet werden.

$$OTR = k_{La} \cdot \left( \frac{(c_{O_2L,in}^* - c_{O_2L,cal}) - (c_{O_2L,out}^* - c_{O_2L,cal})}{\ln \left( \frac{(c_{O_2L,in}^* - c_{O_2L,cal})}{(c_{O_2L,out}^* - c_{O_2L,cal})} \right)} \right) \quad (3.6)$$

mit

|                  |  |                    |
|------------------|--|--------------------|
| $c_{O_2L,in}^*$  | = Sauerstoffgleichgewichtskonzentration        |                    |
|                  | basierend auf dem Stoffmengenanteil der Zuluft | [g/L]              |
| $c_{O_2L,out}^*$ | = Sauerstoffgleichgewichtskonzentration        |                    |
|                  | basierend auf dem Stoffmengenanteil der Abluft | [g/L]              |
| $c_{O_2L,cal}$   | = Sauerstoffsättigungskonzentration im Medium  |                    |
|                  | unter Kalibrierbedingungen                     | [g/L]              |
| $p_{O_2}$        | = Sauerstoff-Partialdruck der trockenen Abluft | [bar]              |
| $p_{O_2,cal}$    | = Sauerstoff-Partialdruck der trockenen Zuluft | [bar]              |
| $x_{O_2,in}$     | = Stoffmengenanteil Sauerstoff Zuluft          | [-]                |
| $x_{O_2,out}$    | = Stoffmengenanteil Sauerstoff Abluft          | [-]                |
| $x_{CO_2,in}$    | = Stoffmengenanteil Kohlendioxid Zuluft        | [-]                |
| $x_{CO_2,out}$   | = Stoffmengenanteil Kohlendioxid Abluft        | [-]                |
| $H_{O_2}$        | = Henry-Koeffizient                            | [bar L/g]          |
| $k_{La}$         | = volumetrische Stoffübergangszahl             | [h <sup>-1</sup> ] |

Daraus folgt für  $k_L a$ :

$$k_L a = \frac{OTR}{\frac{(c_{OL,in}^* - c_{OL,cal}) - (c_{OL,out}^* - c_{OL,cal})}{\ln \left( \frac{c_{OL,in}^* - c_{OL,cal}}{c_{OL,out}^* - c_{OL,cal}} \right)}} \quad (3.7)$$

Die OTR kann entsprechend der vorher getroffenen Annahme durch  $Q_{O_2}$  ersetzt werden und die volumetrische Sauerstoffaufnahme rate aus der bekannten Begasungsrate und den Stoffmengenanteilen an Sauerstoff und Kohlendioxid in Zu- und Abluft berechnet werden.

$$Q_{O_2} = \frac{F_{n,STP} M_{O_2}}{V_m V_L} \frac{x_{O_2,in} (1 - x_{CO_2,out}) - x_{O_2,out} (1 - x_{CO_2,in})}{1 - x_{O_2,out} - x_{CO_2,out}} \quad (3.8)$$

mit

|           |  |         |
|-----------|--|---------|
| $F_{n,G}$ | = Begasungsrate unter Normbedingungen (0°C, 1 bar) | [L/h]   |
| $M_{O_2}$ | = Molmasse Sauerstoff                              | [g/mol] |
| $V_m$     | = Molvolumen ideales Gas                           | [L/mol] |

Alternativ kann die volumetrische Stoffübergangszahl auch anhand der Eigenschaften der Bauteile des Systems über die van't Riet Gleichung berechnet werden:

$$k_L a = 0,002 \left( \frac{P}{V_L} \right)^{0,7} \cdot u_G^{0,2} \quad (3.9)$$

mit

|       |   |                   |
|-------|---|-------------------|
| $P$   | = Rührerleistung                        | [W]               |
| $u_G$ | = $\frac{F_G}{A}$ = Begasung pro Fläche | [m/L]             |
| $F_G$ | = Begasungsrate                         | [L/h]             |
| $A$   | = Rührkesselfläche                      | [m <sup>2</sup> ] |

Die Sauerstoffaufnahme (OUR) beschreibt wie die Mikroorganismen den zur Verfügung gestellten Sauerstoff aufnehmen.

$$\text{OUR} = \frac{\mu}{y_{X/O}} c_{XL} = q_{O/X} \cdot c_{XL} \quad (3.10)$$

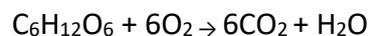
mit

$y_{X/O}$  = Sauerstoffausbeutekoeffizient [g/g]  
 $q_{O/X}$  = spezifische Sauerstoffverbrauchsrate [h<sup>-1</sup>]

Ist der Sauerstoffausbeutekoeffizient für den in der Kultivierung verwendeten Bakterienstamm bekannt, kann über ein bekanntes  $\mu$  oder  $D$  und  $c_{XL}$  OUR berechnet werden und so die oben getroffenen Annahme ( $Q_{O_2} = \text{OTR} = \text{OUR}$ ) überprüft werden. Alternativ kann die Zellkonzentration über OUR berechnet werden.

#### 3.3.7 Respirationsquotient

Der Respirationsquotient (RQ) gibt das Verhältnis zwischen verbrauchter Stoffmenge Sauerstoff und von den Zellen gebildetem Kohlendioxid an. Anhand dieses Wertes kann auf das von den Zellen verstoffwechelte Substrat rückgeschlossen werden. Verstoffwechseln die Zellen sauerstoffarme Verbindungen, liegt RQ unter 1. Wird eine teiloxidierte Substanz, wie zum Beispiel Pyruvat, eingesetzt, liegt RQ über 1. Für jedes Kohlenstoffatom im Substrat wird die doppelte Menge Sauerstoff benötigt, um CO<sub>2</sub> zu bilden [2] [10]. Für Glucose lautet die Reaktionsgleichung:



RQ kann über die bekannten Eingangsstoffmengenanteile der Zuluft, sowie die mittels Abgasanalytik gemessenen Stoffmengenanteile an CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> berechnet werden.

$$\text{RQ} = \frac{x_{\text{CO}_2,\text{out}} (1 - x_{\text{O}_2,\text{in}}) - x_{\text{CO}_2,\text{in}} (1 - x_{\text{O}_2,\text{out}})}{x_{\text{O}_2,\text{in}} (1 - x_{\text{CO}_2,\text{out}}) - x_{\text{O}_2,\text{out}} (1 - x_{\text{CO}_2,\text{in}})} \quad (3.11)$$

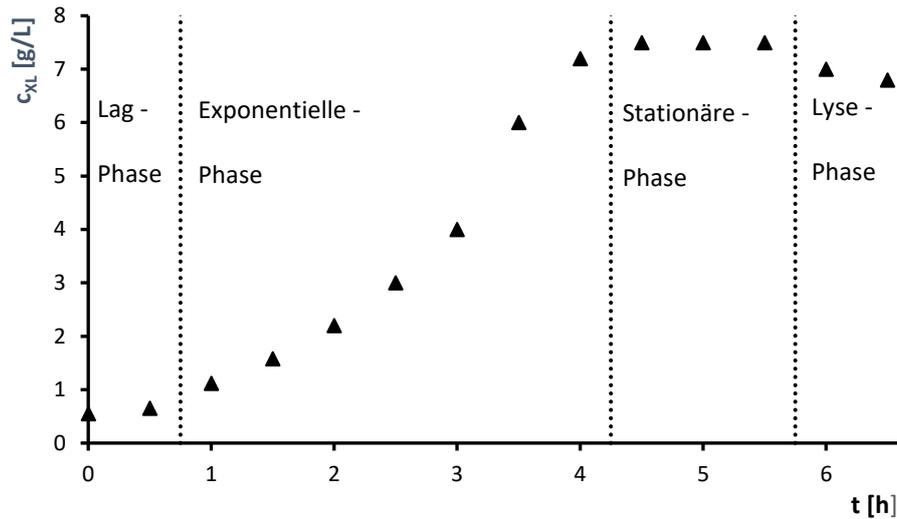
## 3.4 Prozessführungsstrategien

Im Folgenden wird der Batch-Prozess eingehend erläutert, da einer kontinuierlichen Kultivierung immer eine Batch-Phase vorhergeht. Im Anschluss wird die kontinuierliche Prozessführung näher beschrieben und für weitere Charakterisierung notwendige mathematische Betrachtungen hergeleitet. Abschließend wird ein kurzer Einblick in weitere Prozessführungsstrategien gegeben.

### 3.4.1 Batch-Prozess

Für eine Batch-Kultivierung (aus dem Englischen: Bündel, Ladung) werden zu Beginn der Fermentation alle für den Prozess benötigten Bestandteile mit dem Medium in das Kultivierungsgefäß gegeben. Das Volumen für die Kultivierung setzt sich aus dem Medium und den Volumina der Inokula zusammen und kann im Rahmen des Arbeitsvolumens des Kessels frei gewählt werden.

Die Batch-Kultivierung wird mit der Zugabe des Inokulums zur Kulturbrühe, dem Animpfen, gestartet. Wie Abbildung 3.2 zeigt, beginnt nach einer lag-Phase, in der sich die Zellen an die neue Umgebung anpassen, die exponentielle Wachstumsphase mit maximaler Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Tritt ein Limitierungsfaktor ein, endet das exponentielle Wachstum, die stationäre Phase beginnt. Die Zellen wachsen nun nicht mehr, sterben aber auch nicht sofort ab. Nach einiger Zeit beginnt die Lysephase, die Zellen zersetzen sich. Der gesamte Prozess dauert zumeist nur mehrere Stunden an.



**Abbildung 3.2:** Theoretischer Verlauf einer Batch-Kultivierung: Lag-Phase: die Zellen passen sich an das neue Medium an, exponentiellen Wachstumsphase: die Zellen wachsen mit maximaler Geschwindigkeit, stationäre Phase: die Zellen wachsen nicht mehr, ein Limitierungsfaktor ist eingetreten, Lysephase: die Zellen zersetzen sich.

Eine Batch-Kultivierung kann in jeder Phase beendet werden, abhängig von dem Zielprodukt des Prozesses. Dies können die Zellen sein oder ein von diesen gebildetes Protein. Die Zellen sind beispielsweise dann das Produkt, wenn ein Fed-Batch (3.4.4 *Weitere Prozessführungsstrategien*) oder eine kontinuierliche Kultivierung (3.4.2 *Kontinuierliche Kultivierung*) im Anschluss geplant ist. Hierfür wird der Prozess bei einer gewünschten Zellkonzentration in der exponentiellen Phase beendet oder direkt zu Beginn der stationären Phase. Soll ein von den Zellen exprimiertes Produkt geerntet werden, muss untersucht werden, in welcher Phase die höchste Ausbeute zu erzielen ist.

Für die Modellierung des Zellwachstums bedient man sich den Überlegungen aus der Massenbilanzierung (3.1). In einem Batch-Prozess wird das Volumen als konstant angenommen und kann aus der Formel gekürzt werden. Die Terme der Massenbilanz für Volumenströme in den und aus dem Reaktor entfallen ebenfalls.

$$\frac{dc_{XL}}{dt} = r_X = \mu \cdot c_{XL} \quad (3.12)$$

mit

$\mu$  = zellspezifische Wachstumsrate [h<sup>-1</sup>]

Die Differentialgleichung lässt sich für das unlimitierte exponentielle Zellwachstum unter Verwendung einer konstanten, maximalen zellspezifischen Wachstumsrate lösen.

$$c_{XL} = c_{XL,0} e^{\mu_{max} t} \quad (3.13)$$

mit

$c_{XL,0}$  = Startzellkonzentration [g/L]

$\mu_{max}$  = maximale zellspezifische Wachstumsrate [h<sup>-1</sup>]

t = Prozesszeit [h]

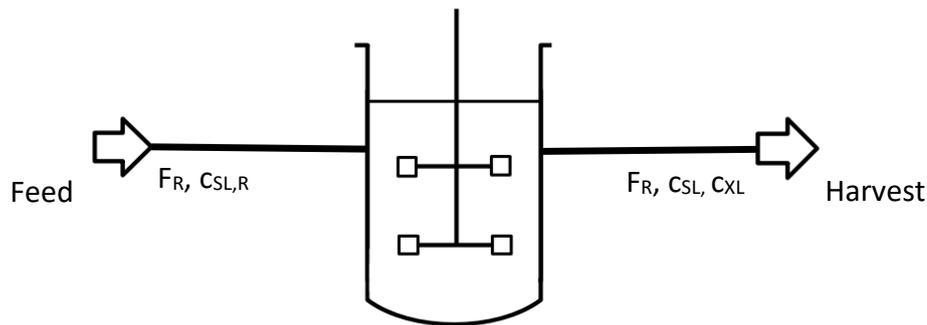
Diese Art der Prozessführung wird angewandt, um in kurzer Zeit eine hohe Ausbeute an Produkt zu erlangen. Vorteile dieser Prozessführung sind neben der Ausbeute, dass es in der Kürze der Prozesszeit und daraus resultierenden geringen Anzahl an Generationszyklen kaum zu Mutationen der Zellen kommen kann. Wenn das Produkt ein Protein ist, welches in hohen Konzentrationen zelltoxische Eigenschaften aufweist, kann diese Prozessführung ebenfalls von Vorteil sein, da die kritischen Konzentrationen erst zum Ende der Kultivierung erreicht werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Fermentationsstrategie ist der hohe Zeitaufwand in der Vor- und Nachbereitung des Prozesses im Verhältnis zur Kultivierungszeit. Des Weiteren kann  $\mu$  nicht beeinflusst werden, was für die Regulation der Produktbildung der Zellen aber von Interesse sein kann. Die maximale Zellkonzentration ist begrenzt und von den Zellen herzustellende Produkte mit langen Expressionsphasen können nicht gebildet werden.

Aus diesem Grund wird die Batch-Kultivierung in immer mehr Bereichen langsam durch die kontinuierliche Prozessführung abgelöst [11].

#### 3.4.2 Kontinuierliche Kultivierung

Die kontinuierliche Kultivierung findet über einen beliebig langen Zeitraum statt, da durch eine permanente Zufütter- oder Feedrate sowie eine identische Ernte- oder Harvestrate das Volumen im Reaktor konstant gehalten wird und die Zellen immer mit neuen Nährstoffen versorgt werden. Der Reaktor wird in diesem Fall auch als Chemostat bezeichnet. Chemostat ist ein Kunstwort, das sich aus chemo (*griech.*: Chemie) und stat (*griech.*: regelnd) zusammensetzt. Es wird also eine chemische Zusammensetzung auf einem konstanten Level geregelt. In der Biotechnologie wird hiermit ein konstanter Zustand im Reaktor beschrieben, das sogenannten Fließgleichgewicht.

Gewöhnlich wird diese Kultivierung mit einer Batch-Phase gestartet, um eine ausreichend hohe Zelldichte für die folgende Kultivierung zu erreichen. Die Batch-Phase kann, wie bei einem Batch-Prozess, bis zu einer Limitierung geführt werden oder bis zu einer gewünschten Zellkonzentration, die z. B. anhand der optischen Dichte (OD) bestimmt wird. Ist die Batch-Phase beendet, beginnt direkt die Zufütterung. Über eine Pumpe wird neues, zellfreies Medium in den Reaktor gepumpt. Das Medium muss alle für das Zellwachstum benötigten Bestandteile enthalten, kann sich aber von der Zusammensetzung des Mediums der Batch-Phase unterscheiden. Zum Beispiel kann eine höhere Glucosekonzentration im Zufüttermedium vorgelegt werden. Gleichzeitig wird die Erntepumpe gestartet, die über ein Tauchrohr Kultursuspension ab einer gewissen Füllhöhe abpumpt. Alternativ wäre eine Regelung der Erntepumpe über das flüssige Reaktorvolumen möglich, diese kann über eine Waage kontrolliert werden und mit einer Regelung der Pumprate konstant gehalten werden. Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung einer kontinuierlichen Kultivierung.



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung einer kontinuierlichen Kultivierung. Links ist die zellfreie Feedlösung mit der Konzentration  $c_{SL,R}$  dargestellt, die in den Kessel in der Mitte mit  $F_R$  gepumpt wird. Rechts befindet sich der Harvestbehälter in den die Kulturbrühe aus dem Kessel mit der Substratkonzentration  $c_{SL}$  und der Zellkonzentration  $c_{XL}$  mit der identischen Pumprate  $F_R$  gepumpt wird (in Anlehnung an [10]).

Über die Pumpraten kann die mittlere Verweilzeit  $\bar{t}$  der Kulturbrühe im Reaktor reguliert werden.

$$\bar{t} = \frac{V_L}{F_R} \quad (3.14)$$

mit

$V_L$  = Flüssiges Reaktionsvolumen [L]

$F_R$  = Pumprate [L/h]

Die mittlere Verweilzeit ist abhängig von der eingestellten Verdünnungsrate  $D$ .

$$D = \frac{1}{\bar{t}} = \frac{F_R}{V_L} \quad (3.15)$$

Je höher  $D$  gewählt wird, desto schneller wird das Volumen im Reaktor ausgetauscht, desto kürzer ist entsprechend die mittlere Verweilzeit.

Es kommt bei einer kontinuierlichen Kultivierung zu einer Einstellung von einem Fließgleichgewicht. Dieses stellt sich durch die selbstregulierenden Eigenschaften des Chemostaten

immer wieder neu ein. Wird  $D$  herabgesetzt, sinkt  $c_{sL}$  und damit entsprechend der Monod-Gleichung auch  $\mu$ , weil das frische Substrat langsamer nachgepumpt wird. Entsprechend sinkt auch die Zellkonzentration. Wird  $D$  gesteigert, werden die Zellen schneller mit frischem Substrat versorgt, die Zellkonzentration steigt. Dies zeigt auch Abbildung 3.4. Hier sind die Verläufe der Zell- und Substratkonzentration (erster und zweiter Graph von oben) gezeigt, wenn die Verdünnungsrate  $D$  verändert wird. Die zellspezifische Wachstumsrate nimmt entsprechend der Veränderung von  $D$  zu und ab.

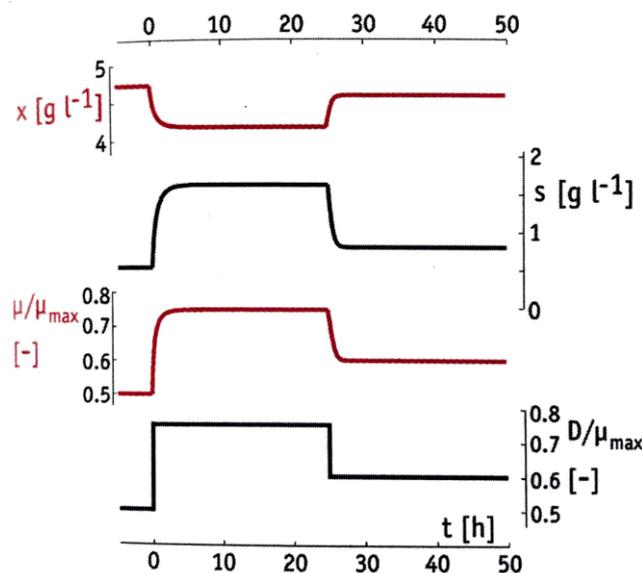


Abbildung 3.4: Verlauf der Zellkonzentration (1. Graph von oben) und der Substratkonzentration (2. Graph von oben), wenn die Verdünnungsrate  $D$  verändert wird (1. Graph von unten). Der 2. Graph von unten zeigt die auf  $\mu_{\max}$  normierte zellspezifische Wachstumsgeschwindigkeit. Alle Graphen sind gegen die Prozesszeit aufgetragen [2].

Es scheint also einen Zusammenhang zwischen der Verdünnungsrate und der zellspezifischen Wachstumsgeschwindigkeit zu geben. Dies lässt sich über die Biomassebilanz für den Chemostaten herleiten [10]. Es gilt:  $F_{in} = F_{out} = F_R$ .

$$\frac{dc_{XL}}{dt} V_L = \mu c_{XL} V_L + F_R c_{XL,R} - F_R c_{XL} \quad (3.16)$$

mit

$c_{XL,R}$  = Zellkonzentration im Zulauf [g/L]

Das Volumen eines Chemostaten wird als konstant angenommen, sodass durch  $V_L$  geteilt werden kann. Mit zellfreiem Zulauf ( $c_{XL,R} = 0$ ) und  $\frac{F_R}{V_L} = D$  ergibt sich:

$$\frac{dc_{XL}}{dt} = \mu c_{XL} - D c_{XL} \quad (3.17)$$

Im Fließgleichgewicht gilt zudem  $\frac{dc_{XL}}{dt} = 0$  und damit

$$\mu = D \quad (3.18)$$

Je höher  $D$  gewählt wird, desto höher ist die spezifische Wachstumsrate. Jeder Prozess hat einen sogenannten Auswaschpunkt,  $D_{crit}$ , an dem die Zellen bei der eingestellten Verdünnungsrate nicht mehr schnell genug nachwachsen können und aus dem Kessel gespült werden. Dieser Punkt kann experimentell bestimmt werden und die maximale Verdünnungsrate sollte entsprechend niedriger gewählt werden.

Über die Substratbilanz

$$\frac{dc_{SL}}{dt} V_L = -\frac{1}{y_{X/S}} \mu c_{XL} V_L + F_R c_{SL,R} - F_R c_{SL} \quad (3.19)$$

mit

$c_{SL,R}$  = Substratkonzentration im Zulauf [g/L]

kann mit den für die Biomassebilanz getroffenen Annahmen ( $V_L = \text{const.}$ ,  $\frac{dc_{SL}}{dt} = 0$ ,  $\frac{F_R}{V_L} = D$ ) und  $\mu = D$  eine Formel für  $c_x$  im Gleichgewicht hergeleitet werden. Für die Zell- und Substratkonzentration im Fließgleichgewicht werden die Formelzeichen  $\tilde{c}_{XL}$  und  $\tilde{c}_{SL}$  eingeführt.

$$\tilde{c}_{XL} = y_{X/S} (c_{SL,R} - \tilde{c}_{SL}) \quad (3.20)$$

Die Gleichgewichtssubstratkonzentration kann über die Monod-Gleichung (3.2) mit  $\mu = D$  ermittelt werden.

$$\tilde{c}_{SL} = \frac{D K_S}{\mu_{\max} - D} \quad (3.21)$$

Abbildung 3.5 zeigt den theoretischen Verlauf von  $\tilde{c}_{XL}$  und  $\tilde{c}_{SL}$  für eine kontinuierliche Kultivierung mit einer Substratkonzentration im Zulauf von 40 g/L. Ab einer Verdünnungsrate von 0,40 h<sup>-1</sup> nimmt die Zellkonzentration rapide ab und die Substratkonzentration steigt entsprechend, der Auswaschpunkt ist bei 0,42 bis 0,43 h<sup>-1</sup> erreicht. Es werden zwei unterschiedliche Modelle dargestellt, die Betrachtung der Zell- und Substratkonzentration unter Berücksichtigung eines Erhaltungsstoffwechsels (*engl.*: maintenance metabolism) der Zellen (3.3.5. *Erhaltungsstoffwechsel*) und die Modellierung unter der Annahme, dass die Zellen das gesamte Substrat für Zellwachstum verbrauchen.

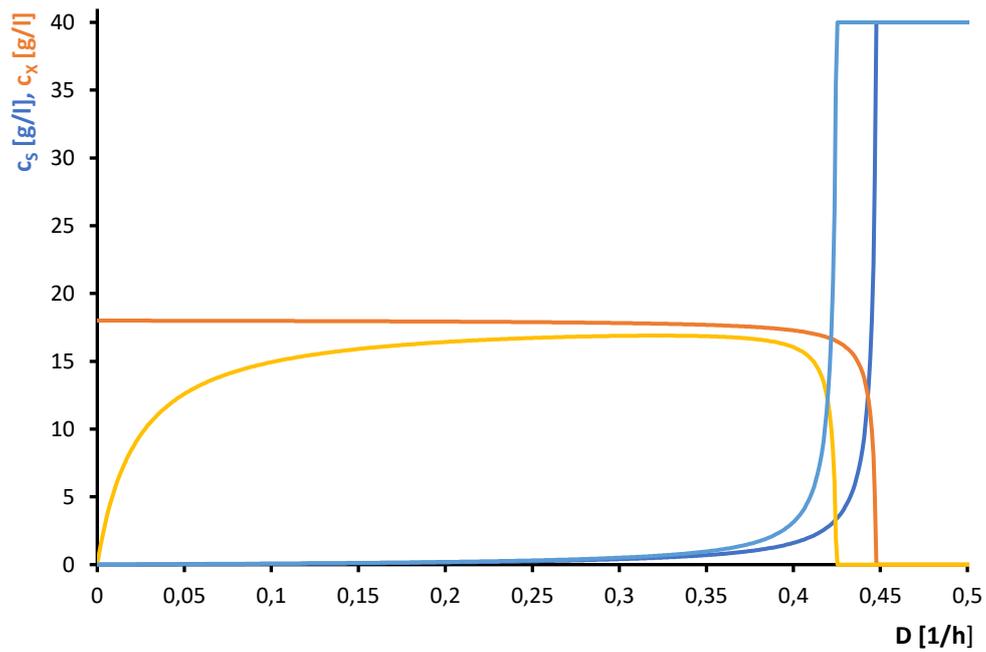


Abbildung 3.5: Theoretischer Verlauf von  $\tilde{c}_{xL}$  und  $\tilde{c}_{sL}$  bei unterschiedlichen Verdünnungsraten.  $\tilde{c}_{xL}$  und  $\tilde{c}_{sL}$  sind einmal unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsel aufgetragen (gelb und hellblau) und einmal unter der Annahme, dass alles Substrat dem Aufbau von Zellmasse dient (orange und dunkelblau) [12]. Mit  $y_{X/S, gr} = 0,45$  g/g,  $q_{S/X, m} = 0,05$  h<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3 Induktion der Produktbildung in einer kontinuierlichen Kultivierung

Die Produktexpression wird durch die Zugabe von sterilfiltriertem Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. IPTG bindet wie Lactose an den lac-Promotor, was die Translation der Gene des lac-Operons startet. Im Gegensatz zu Lactose kann IPTG von den Zellen nicht verstoffwechselt werden, sodass die Konzentration im Medium konstant bleibt. IPTG wird mit einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Die Zugabe kann entweder direkt in das flüssige Reaktionsvolumen oder in das Feedmedium erfolgen. Die Zugabe in das Kulturgefäß induziert die Zellen sofort, die Produktbildung nimmt entsprechend der eingestellten Verdünnungsrate ab. Wird das IPTG über das Feedmedium in den Kessel gegeben, steigt die Produktkonzentration langsam an. Bei einem  $D$  von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  dauert es 1,5 Stunden, bis sich die Konzentration von 1 mM im Bioreaktor eingestellt hat. Bei der Zugabe von IPTG über das Feedmedium, werden die Zellen für viel Stunden dauerinduziert. Es ist möglich, dass die Zellen ihr Wachstum während der Produktexpression stark reduzieren und so auch bei niedrigen Verdünnungsraten unter Dauerinduktion ausgewaschen werden.

#### 3.4.4 Weitere Prozessführungsstrategien

Der Fed-Batch-Prozess ist eine Ergänzung des Batch-Prozesses, bei dem nach einer Batch-Phase eine Zufütterung mit lebensnotwendigen Medienbestandteilen beginnt. Die Zufütterung erfolgt kontinuierlich oder in Schüben, es wird aber kein Volumen aus dem Reaktor entfernt. Ist das maximale Arbeitsvolumen des Reaktors erreicht, muss der Prozess beendet werden. Gegenüber einem Batch-Prozess hat diese Form der Kultivierung den Vorteil, dass sich die Raum-Zeit-Ausbeute verbessert, da durch die Zufütterung und das damit einhergehende längere Wachstum eine höhere Ausbeute erzielt werden kann. Es gibt in der Literatur viele Beispiele für diese Prozessführung. Der Artikel *Repetitive Fed-Batch: A Promising Process Mode for Biomanufacturing With E. coli* [13] gibt einen allgemeinen Einblick in die Prozessführung einer Fed-Batch-Kultivierung.

Eine weitere Strategie ist die kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung. Bei diesem Verfahren wird zellfreies Medium in den Bioreaktor gepumpt, Kulturbrühe abgepumpt und filtriert. Die Zellen werden wieder in den Reaktor geführt, das verbrauchte Medium, welches

auch Produkt enthalten kann, wird abgeführt. In dem Buch Bioprozesstechnik von Horst Chmiel wird dieses Modell in Kapitel 4.7 *Verfahren mit Zellrückhaltung* [2] beschrieben.

### 4. Materialien und Methoden

Hier wird der Versuchsaufbau zuerst allgemein erläutert und anschließend die einzelnen Komponenten näher beschrieben. Es folgt eine kurze Erläuterung der Verwendung MFCS/win und die Realisierung der Einbindung der externen Pumpen. Der Medienansatz wird dargestellt und abschließend folgt eine Zusammenstellung der verwendeten Analysemethoden.

#### 4.1 Versuchsaufbau

Abbildung 4.1 zeigt den Aufbau während der kontinuierlichen Kultivierung. Links befindet sich die 5L Flasche mit dem Zufütter- bzw. Feedmedium, daneben steht die Zufütterpumpe, die das Medium in den Bioreaktor befördert. Neben dem Reaktor stehen Schottflaschen mit verschiedene Korrekturmitteln. In der Ecke steht die Mikro-DCU, die die Prozessgrößen überwacht und regelt. Auf der Mikro-DCU sich die Abgasanalytik. Rechts neben der Mikro-DCU ist die Ernte- bzw. Harvestpumpe aufgebaut, welche die abgepumpte Kulturbrühe in die 5 L Harvest-Flasche pumpt. Beide Flaschen sind auf 6100 g Waagen positioniert. Die Pumpen sind in Wannen platziert, um bei Undichtigkeiten zum Beispiel auf Grund von Abnutzung der Pumpschläuche eine Havarie zu verhindern beziehungsweise zu minimieren. Die Pumpen stehen erhöht, damit diese nicht von austretender Flüssigkeit beschädigt werden.

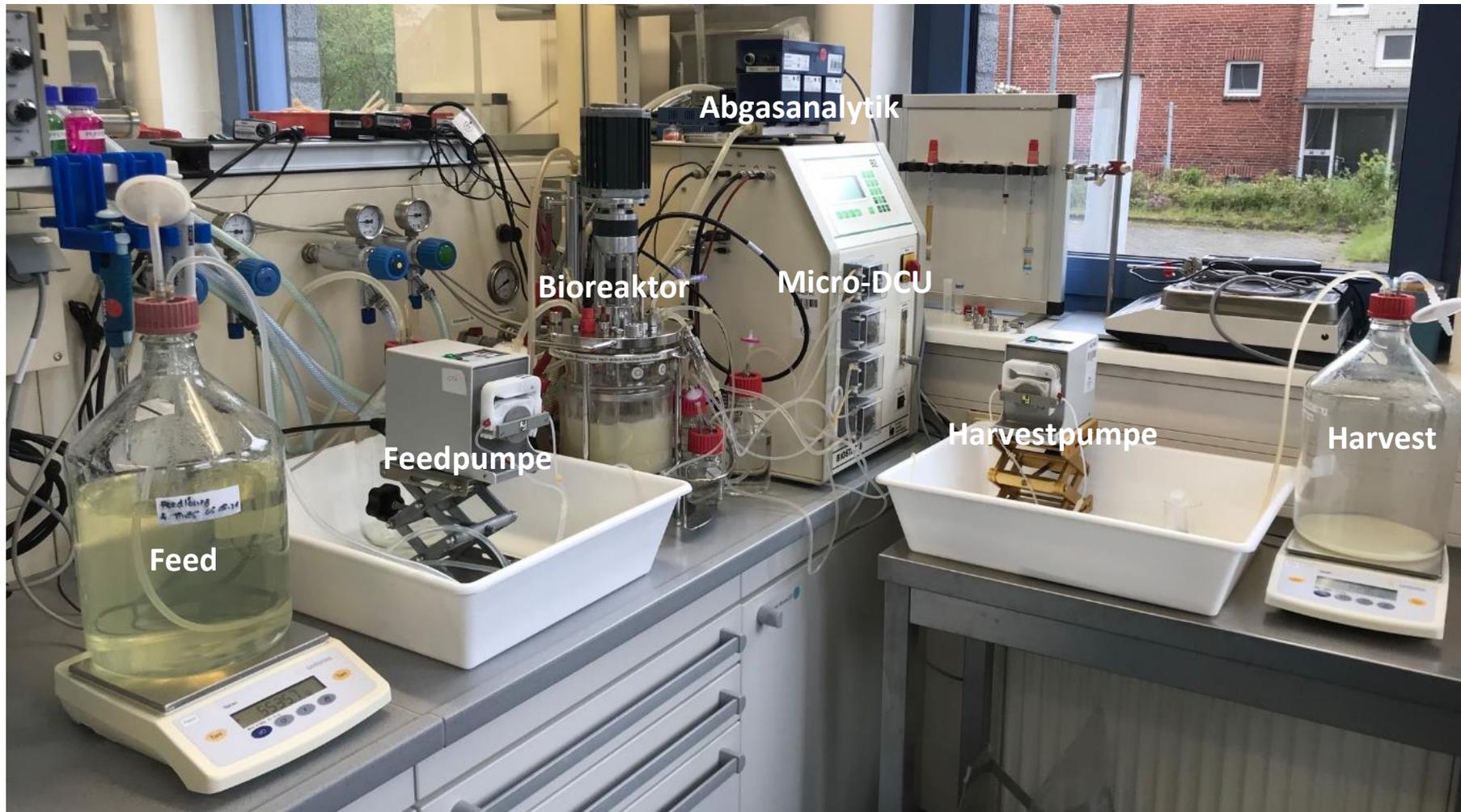
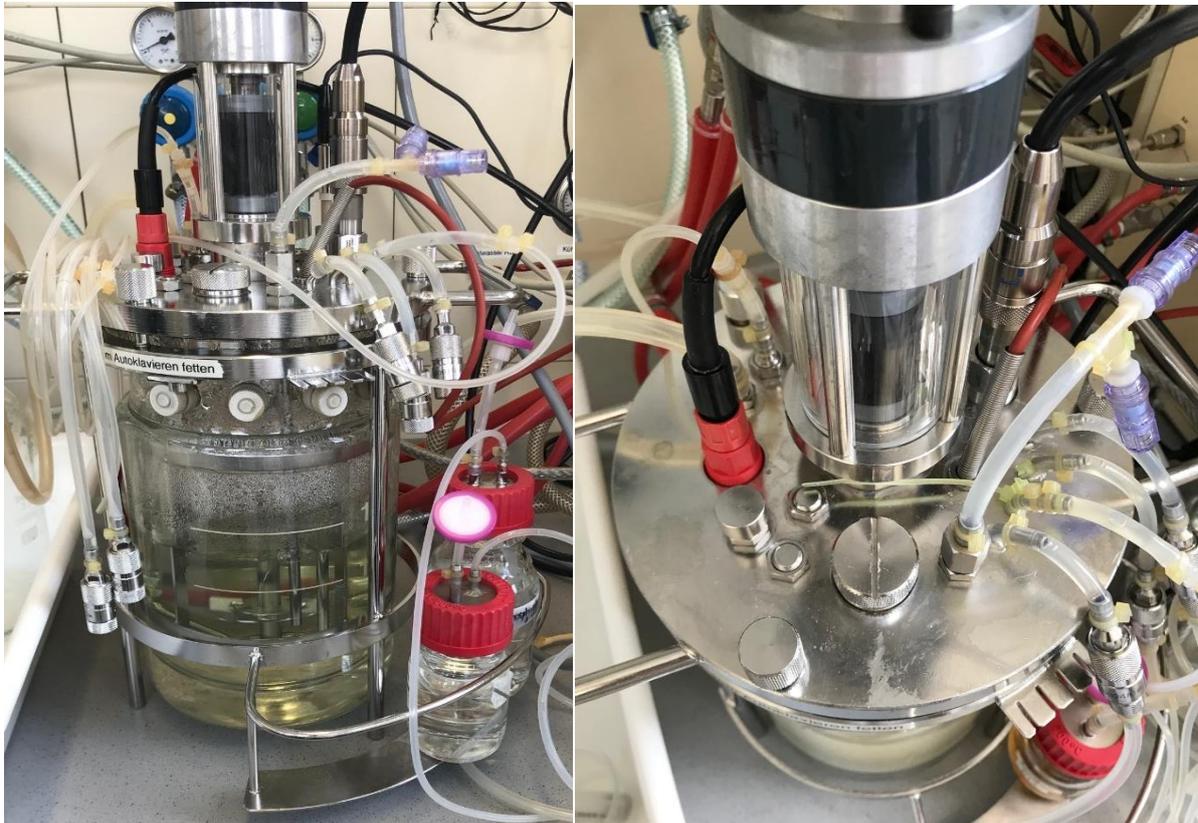


Abbildung 4.1: Aufbau während der kontinuierlichen Kultivierung (von links nach rechts): 5 L Flasche für die Zufütterung mit komplettiertem Feedmedium auf einer Waage, Zufütterpumpe in einer Wanne zum Auffangen unerwünscht austretender Flüssigkeiten, Kultivierungsgefäß mit der Kulturbrühe, die Digital Control Unit zur Regelung der Prozessparameter, Erntepumpe in einer Wanne zum Auffangen unerwünscht austretender Flüssigkeiten, 5 L Harvestflasche auf einer 6100 g Waage.

Die Fermentation wird in einem Rührkessel mit einem Arbeitsvolumen von 1,5-2 L und einem Maximalvolumen von 3 L durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt das fertig montierte Kultivierungsgefäß.



**Abbildung 4.2:** Das linke Bild zeigt den Rührkessel mit fertig montiertem Deckel. In der Halterung am Ständer des Gefäßes sind Korrekturmittelflaschen sicher platziert. Die Anschlüsse für das Wasser für die Temperierung des Doppelmantels befinden sich auf der Rückseite. Das rechte Bild zeigt den Deckel mit (von links nach rechts): pH-Sonde (roter Stecker, schwarzes Kabel), Zuluftschlauch mit Filter (nicht im Bild), Erntetauchrohr, Rührermotor, Tauchrohr mit Membranventilen zur Probenahme, Temperatursonde (rotes Kabel), pO<sub>2</sub>-Sonde (silberner Stecker, schwarzes Kabel), und vier Schlaucholiven, für die Zugabe von Säure, Lauge und Antischaummittel und des Mediums zur Zufütterung. Der Abluftkühler befindet sich hinter dem Motor.

Der Rührer verfügt über zwei Sechs-Blatt-Scheibenblattführer, die mit einem Abstand von 20 cm angebracht werden. Er wird von einem auf dem Deckel montierten Motor angetrieben. Die Prozesswerte werden mit einer pH-, einer Temperatur- und einer Sauerstoffpartialdruck-(pO<sub>2</sub>)-Sonde überwacht. Antischaummittel wird automatisiert in den Kessel zugegeben. Der pH-Wert wird über eine mittels Schnellkupplung angeschlossene Basenvorlage mit 2 M Natronlauge und eine Säurevorlage mit 10 %iger Phosphorsäure reguliert. Das Kultivie-

rungsgefäß verfügt über zwei Membran-Ventile an einem Tauchrohr. Ein Ventil dient dem Durchblasen von steriler Luft, um das Tauchrohr vor der Probenahme von altem Medium und Zellen zu säubern. Das andere der Entnahme frischer Probe aus dem Kessel mit einer Luer Lock Spritze.

Der Reaktor wird mit steriler Luft durch einen Membranfilter mit 2 NL/min begast. Die Druckluft geht nicht direkt in die DCU, sondern in eine externe Gasmischstation, an der die Begasungsrate eingestellt, sowie die Zusammensetzung des Gases gewählt werden oder für die Nullpunkt-Kalibrierung der  $pO_2$ -Sonde auf Stickstoffbegasung umgeschaltet werden kann. Die Abluft gelangt über einen Abluftkühler durch einen Membranfilter in die Abgasanalytik und wird anschließend aus dem Labor geführt. Der Abluftkühler dient der Reduktion des Flüssigkeitsaustrags durch die feuchte Abluft. Durch das Herabsetzen des Taupunktes kondensiert ein Teil der Luftfeuchte und tropft zurück in den Kessel. Das Kultivierungsgefäß besitzt zur Temperierung des Mediums einen Doppelmantel, der mit Wasser gefüllt ist. Um den Kesselinhalt aufzuheizen, wird Wasser durch die DCU gepumpt und an einer internen Heizung erwärmt. Niedrigere Temperaturen werden durch Zumischen von unbeheiztem Wasser erreicht.

Über eine STT-Schnellkupplung wird das Zufüttermedium an den Kessel angeschlossen. Das Erntereservoir ist über ein Tauchrohr, welches auf der Höhe des Füllstands bei 1,5 L Reaktorvolumen beginnt, fest mit dem Reaktor verbunden. Zufütter- und Ernteflasche sind jeweils auf Waagen positioniert, um die Linearität der Waagensignale zu überwachen und über diese den Volumenstrom zu überprüfen. Der Pumpschlauch der Zufütterpumpe ist ebenfalls durch eine Schnellkupplung mit dem Reaktor verbunden und kann so steril ausgetauscht werden, wenn zum Beispiel ein Schlauch mit anderem Innendurchmesser verwendet werden soll.

Für die Kultivierung wird die Micro-DCU Biostat B Typ 8840334 von Sartorius Stedim Biotech (ehemals B. Braun), verwendet (Abb. 4.3). In dieser sind die Regler für die Prozessvariablen Temperatur, pH-Wert (über Säure- und Basen-Zugabe), Füllstand-Regelung über Leitfähigkeitssonde, Schaumregelung über Leitfähigkeitssonde (über Antischaum-Zugabe), relative Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium ( $pO_2$  über die Rührerdrehzahl) und Rührerdrehzahl integriert. Die Säure-, Basen und Antischaummittelzugabe erfolgt über Pumpen, die

#### 4. Materialien und Methoden

---

vorne an der Micro-DCU montiert sind. Es steht noch eine weitere Pumpe zur Verfügung, die zum Beispiel zur Zufütterung oder Einstellung einer Ernterate genutzt werden kann.

Die Kalibrierung aller Sonden und Pumpen werden direkt am Gerät durchgeführt. Während einer Fermentation zeigt die DCU die Prozessvariablen Temperatur in °C, pH, Rührerdrehzahl in rpm und pO<sub>2</sub> in % an.



**Abbildung 4.3:** Digital Control Unit Typ 8840334 von Sartorius Stedim Biotech. Die digitale Anzeige zeigt Prozessparameter an (Temperatur in °C, Rührerdrehzahl in rpm, pH und pO<sub>2</sub> in %). Die Kalibrierung von Sonden und Pumpen erfolgt über das Display direkt an der DCU. Links sind die vier Pumpen, die auf manuell (Dauerbetrieb), auto (An-Aus-Regelung) oder ausgestellt werden können, angebracht. Rechts ist ein Rotameter zur Kontrolle der Begasungsrate montiert. Unter dem Rotameter befindet sich ein Schalter zum Befüllen des Doppelmantels des Kultivierungsgefäßes. Die Anschlüsse für Kühlwasser und Zuluft befinden sich auf der linken Seite des Gerätes.

Das über die Pumpen an der DCU in den Reaktor zugegebene Volumen wird über MFCS überwacht. Besonders der Basenverbrauch ist während der Kultivierung von Interesse, da anhand diesem das Zellwachstum verfolgt werden kann. Bei konstanter Verdünnungsrate steigt der Basenverbrauch linear an. Die Zellen nehmen Ammoniak (NH<sub>3</sub>) aus dem Medium auf, was ein Absinken des pH zur Folge hat. Entsprechend steigt der Basenverbrauch. Dieser kann nur über die an der DCU vorgenommene Kalibrierung überwacht werden. Der Nachteil gegenüber einer zusätzlichen Überwachung durch ein Waagensignal besteht darin, dass

#### 4. Materialien und Methoden

---

auch ein Volumenstrom dokumentiert wird, wenn aufgrund eines Fehlers (verstopfter oder defekter Pumpschlauch, keine Base angeschlossen) keine Base in den Bioreaktor gepumpt werden kann. In Tabelle 4. 1 sind die für die Kultivierung verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 4. 1: Verwendete Geräte und Materialien für die Kultivierung und Probenahme**

| <b>Geräte</b>              | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung/Typ</b>           | <b>Serien-, Artikelnr.</b> |
|----------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Digital Control Unit       | Sartorius         | 884032/6                         | 00463                      |
| Kulturgefäß                | Sartorius         | Kulturgefäß B2                   | 39204278                   |
| pH-Sonde                   | Mettler Toledo    | 405-DPAS-SC-K8S/200              | 59903231                   |
| pO <sub>2</sub> -Sonde     | Mettler Toledo    | 52200966                         | 9488168                    |
| Temperatursonde            | B. Braun          | PT-100-200/4                     | /                          |
| Feedpumpe                  | Ismatec           | ISM831C                          | 257025-3                   |
| Harvestpumpe               | Ismatec           | ISM831C                          | 336563-2                   |
| Feedwaage, 6100g           | Sartorius         | TE6101                           | 26390926                   |
| Harvestwaage, 6100g        | Sartorius         | TE6101                           | 2304402                    |
| Brutschrank                | Innova            | 4200                             | 201040420                  |
| Schüttelschrank            | Innova            | 42R Inc/Ref Shaker               | SI42IP704738               |
| Sicherheitswerkbank        | Heraeus           | Typ HS 12                        | 98107338                   |
| Pipette                    | RAININ            | Pipet-Linte XLS 10-100 µL        | /                          |
| Pipette                    | RAININ            | Pipet-Linte XLS 100-1000 µL      | /                          |
| Pipette                    | VWR               | 100-1000 µL                      | /                          |
| <b>Materialien</b>         | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>               | <b>Artikelnr.</b>          |
| Zuluftfilter               | Sartorius         | Midisart 2000, 0,20 µm PTFE      | 17805                      |
| Abluftfilter               | Sartorius         | Sartofluor 0,2 µm                | 5185307T7--00              |
| Membranventil (Probenahme) | B. Braun          | Safeflow Membranventil nadelfrei | 160183                     |
| Probenahme-Spritze         | B. Braun          | Omnifix, Luer Lock Solo 10 mL    | 10295                      |

| Geräte   | Hersteller | Bezeichnung/Typ  | Serien-, Artikelnr. |
|--|------------|--|---------------------|
| Filter für Spritze<br>(für sterile Zugabe in<br>das Kulturgefäß) | Whatman    | FP 30/0.2 CA-S 0,2<br>µm                                     | 10462200            |
| Mikroreaktions-<br>gefäße  | Argos      | 5 mL   | T2076A              |
| Pipettenspitzen  | Roth       | MµltiLowBinding 10-<br>200 µL                                | NL53.1              |
| Pipettenspitzen  | Roth       | MµltiLowBinding<br>100-1000 µL                               | NL54.1              |
| Pumpeschlauch,<br>dünn   | Ismatec    | 0,89 mm, Silicon   | SC0603              |
| Pumpeschlauch, dick  | Ismatec    | 2,06 mm, PharMed<br>BPT                                      | SC0735              |
| Schlauch, dünn   | Roth       | ∅ innen 1,5 mm<br>∅ außen 3,5 mm                             | 9557.1              |
| Schlauch, dick   | Roth       | Rotilabo-<br>Silikonschlauch<br>∅ innen 4 mm<br>∅ außen 6 mm | 9566.1              |

#### 4.2 SCADA-System MFCS/win

Die Abkürzung SCADA steht für *Supervisory Control and Data Acquisition*. SCADA-Systeme werden zur Überwachung, Steuerung und Aufzeichnung technischer Prozesse eingesetzt. Das für die Kultivierung verwendete Prozessleitsystem MFCS/win von Sartorius Stedim Biotech besteht aus sechs Modulen, die sich in die vier Bereiche Systemkonfiguration, Prozessverwaltung, Kultivierung und Dokumentation aufteilen [14]. Neben der Überwachung und Aufzeichnung von Prozessdaten, ist auch das Anlegen von Automatisierungen für die Kultivierungen möglich. So können Rahmenbedingungen, wie eine maximale Sauerstoffsättigung des Mediums, für die Kultivierung festgelegt werden. Der laufende Prozess wird im *Operator Service* überwacht. Abbildung 4.4 zeigt eine mögliche Ansicht. Hier kann der Prozess über sogenannte Trenddisplays überwacht werden, die den Verlauf der zu betrachtenden Größe innerhalb der letzten Stunde anzeigen. Es gibt zudem die Option Groupdisplays zu öffnen.

#### 4. Materialien und Methoden

Hier werden Setpoints der ausgewählten Größen angezeigt und deren aktueller Wert. Ist die DCU auf „remote“ geschaltet, können über die Groupdisplays die Setpoints der Prozessgrößen variiert werden, es sei denn, dies wird über eine Automatisierung verhindert.

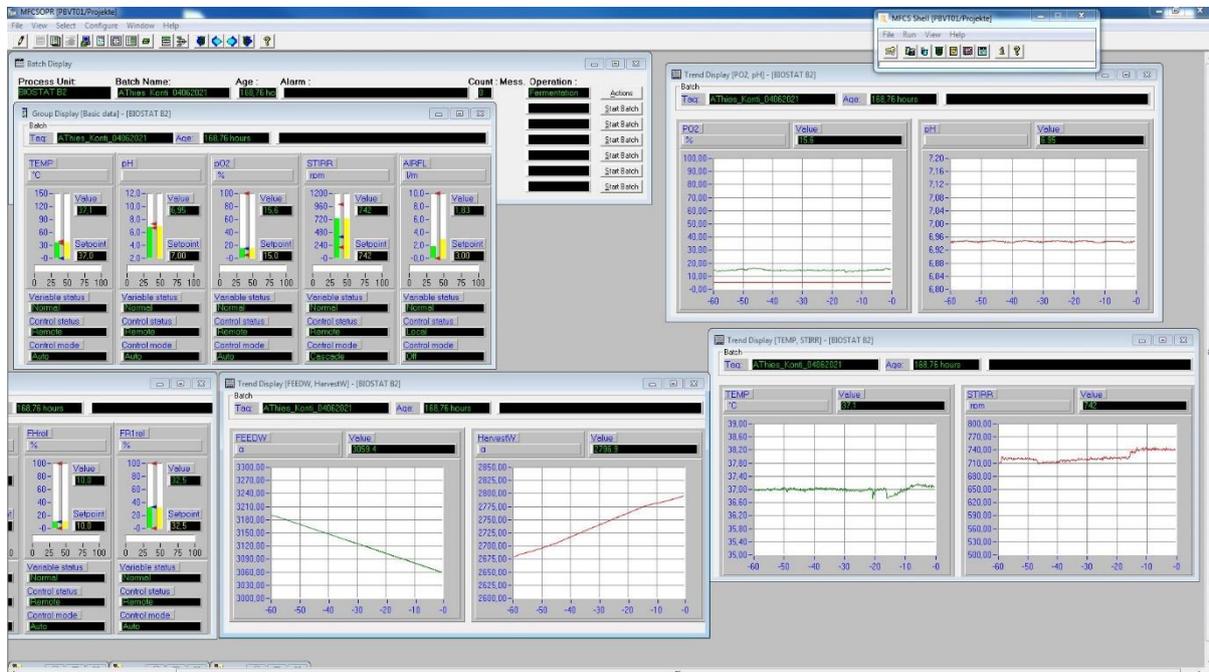


Abbildung 4.4: Screenshot von einer Anwendung innerhalb MFCS. Rechts und in der Mitte sind sechs sogenannte Trenddisplays zu sehen. Hier werden pO<sub>2</sub>%, pH (oben), Temperatur, Rührerdrehzahl (unten) und die Signale der Feed- und Harvestwaage (Mitte) angezeigt. Links sind zwei Groupdisplays geöffnet. Links unten wird die Pumprate der Feed- und Harvestpumpe angezeigt und kann nach Wunsch eingestellt werden, Mitte links sieht man die aktuellen Werte für die Temperatur, pH, pO<sub>2</sub>, Rührerdrehzahl und die Begasungsrate. Diese kann nicht über MFCS variiert werden. Links oben sind die verwendete DCU, der Prozessname, die Laufzeit und eventuelle Fehlermeldungen vermerkt.

Für die Kultivierung wird eine Automatisierung in MFCS hinterlegt. Diese legt Startparameter fest, die das System annimmt, bevor die Kultivierung gestartet wird. Die Rührerdrehzahl wird auf 200 rpm gesetzt, die Temperatur auf 37 °C und der pH-Wert auf 7,0 geregelt. Die Begasung kann nicht über das System geregelt werden, dies geschieht extern. Eine Aufzeichnung der Daten erfolgt. Die Pumpraten werden manuell in MFCS eingegeben und nur von dem System aufgezeichnet. Die Fermentation ist in eine Batch-Phase und eine kontinuierliche Phase unterteilt, der Übergang zwischen den Phasen wird manuell ausgelöst, nachdem das Substrat verbraucht ist. Die Automatisierung regelt während der Kultivierung den pO<sub>2</sub>-Wert über die Rührerdrehzahl auf 15%. Die Antischaumzugabe wird aufgrund eines

Defektes der DCU nicht über eine Regelung gesteuert, sondern über eine Schleife in der Automatisierung in einem Intervall von 250 Minuten mit 2 mL in den Kessel gepumpt. Der Prozess wird manuell über die Software beendet, die Rührerdrehzahl wird auf 200 rpm zurückgesetzt und anschließend alle Regelkreise abgeschaltet.

### 4.2.1 Einbindung der Pumpen und Waagen

Die Feed- und Harvestpumpe, die dazugehörigen Waagen und die Abgasanalytik müssen an MFCS angebunden und dem Reaktor zugeordnet werden. Die Bioreaktoren des Labors sind über einen RS-422-Bus mit dem Prozessleitrechners des Labors verbunden. An diesem erfolgt über eine Interface-Box eine Umwandlung in Recommended Standard 232 (RS-232).

Um lange Kabelwege zu vermeiden, werden die Geräte mit einem RS-232-Ethernet-Konverter verbunden, der eine Datenübertragung an den Prozessleitrechner über LLAN ermöglicht. Über die Software ezVSP werden an diesem digitale, serielle Schnittstellen erzeugt, die Daten empfangen und Befehle ausgeben können.

Mit entsprechenden, gerätespezifischen Treibern ist es möglich, die Geräte in MFCS einzubinden, dass diese über die Oberfläche zu bedienen sind und eine Aufzeichnung der Daten erfolgt [15]. Für die Verwendung der Pumpen muss zusätzlich die Software Reglo Pumps gestartet werden, über diese werden die Pumpen einer seriellen Schnittstelle zugeordnet. Die Datenaufzeichnung der Abgasanalytik ist nicht in MFCS hinterlegt und erfolgt extern auf dem Prozessleitrechner.

#### 4. Materialien und Methoden

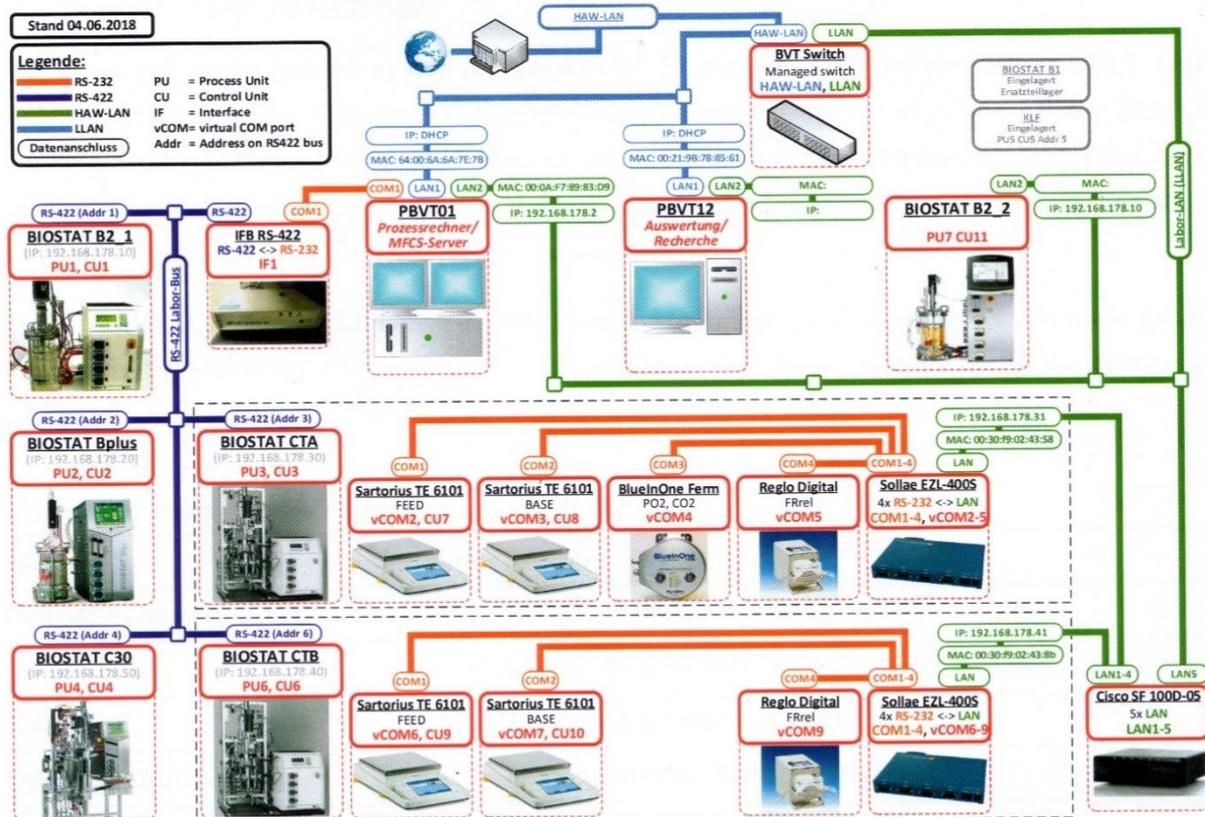


Abbildung 4.5: Vernetzung der Geräte im BVT Labor der HAW Hamburg [15].

Wie Abbildung 4.5 zu entnehmen ist waren die Pumpen, Waagen und Abgasanalytik zuvor mit anderen Reaktoren verbunden. Es muss im System hinterlegt werden, dass die Geräte nun mit dem Fermenter B2 verbunden sind. Bei den Waagensignalen ist keine Einrichtung erforderlich. Für die Zuweisung der Pumpen muss in der Software Reglo Pumps die Fermenter-ID des Reaktors B2 eingegeben werden und der MFCS Controller so eingestellt werden, dass eine externe Regelung der Pumpen möglich ist. Ebenso muss in der Treibersoftware der Abgasanalytik der Fermenter zugewiesen werden. In MFCS werden die Waagensignale ausgegeben und aufgezeichnet und die Pumpraten können neben der Anzeige und Aufzeichnung festgelegt werden.

### 4.3 Medienansatz

Für die Kultivierung wird ein Mineralmedium entsprechend Tabelle 2 verwendet. Es wird eine Stammlösung mit den Spurenelementen mit 400-fachener Konzentration hergestellt. Eine Glucose- und eine Magnesiumsulfatstammlösung mit 200 g/L werden separat angesetzt. Diese Komponenten müssen getrennt autoklaviert werden, da es sonst zu Kristallbildung kommt. Die Kristalle können Schläuche verstopfen und stehen den Bakterien nicht mehr als Nährstoffquelle zur Verfügung. Die Salze werden eingewogen, der pH-Wert mit 4 M Natronlauge auf 7,00 +/- 0,02 eingestellt, mit VE-Wasser auf das gewünschte Endvolumen, abzüglich der noch hinzukommenden Lösungen, aufgefüllt und die Spurenelementlösung dazugegeben. Alle Lösungen werden für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden die benötigten Volumina Glucose und Magnesiumsulfat in der Sicherheitswerkbank mit Messzylindern abgemessen und zu der Salzlösung gegeben. Für die Batch-Phasen wird die Salzlösung mit dem Kulturgefäß autoklaviert, Glucose und Magnesiumsulfat anschließend über eine STT-Schnellkupplung zugegeben. Für den Batch wird eine Glucosekonzentration von 10 g /L vorgelegt, das Feedmedium enthält 20 g/L Glucose. Zu Beginn wird ein Volumen von 1,5 L angesetzt, von dem 200 mL für die Vorkulturen verwendet werden. Das Feedmedium hat jeweils ein Volumen von 4 L.

In der 2. Kultivierung werden dem Zufüttermedium 0,03 g/L des Antibiotikums Kanamycin zugesetzt. Hierfür wird eine Stammlösung mit 30 mg/mL angesetzt und im Kühlschrank gelagert. Da Kanamycin hitzelabil ist, kann es erst zu dem Feedmedium hinzugegeben werden, wenn dieses auf mindestens 55 °C abgekühlt ist. Über einen Filter wird Kanamycin steril unter der Werkbank in die Feedflasche dazugegeben. Tabelle 4.2 listet die verwendeten Chemikalien für den Medienansatz auf. Für die Batch-Phase werden zwei Inokula mit je 100 mL Medium und 100 µL Kryokultur, die bei -80°C gelagert wird, angesetzt. Diese Inkubieren für 18 ½ Stunden im Schüttelschrank bei 120 rpm und 30 °C. Anschließend werden die beiden Inokula in der Sicherheitswerkbank in eine sterile Schottflasche mit einem seitlichen Auslass am Flaschenboden gefüllt und über eine STT-Schnellkupplung in den Reaktor überführt.

**Tabelle 4.2: Verwendete Chemikalien für den Medienansatz für die Batch-Phase und das Feed-Medium, sowie die jeweiligen Konzentrationen im Medium.**

| <b>Chemikalien</b>         | <b>Konzentration<br/>g/L</b>  | <b>Hersteller</b>                     | <b>Artikelnr.</b> |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Kaliumdihydrogenphosphat   | 13,3                          | Roth                                  | 3904.3            |
| Ammoniumdihydrogenphosphat | 3,6                           | Roth                                  | P736.1            |
| Citronensäure              | 1,7                           | Roth                                  | 3958.1            |
| Glucose-Monohydrat         | 10/20                         | Omikron Dr. Birgit<br>Heinrichtfreise | 10-0236           |
| Magnesiumsulfat            | 1,2                           | Roth                                  | 8283.1            |
|                            | <b>mg/L</b>                   |                                       |                   |
| Eisen(III)chlorid          | 100                           | Roth                                  | P742.1            |
| Mangan(II)chlorid          | 15                            | Riedel-de Haen                        | 31422             |
| Kupfer(II)chlorid          | 1,5                           | Riedel-de Haen                        | 31286             |
| Kobalt(II)chlorid          | 2,5                           | Riedel-de Haen                        | 12914             |
| Zinkacetat                 | 13                            | pro analysi                           | /                 |
| Natriummolybdat            | 2,5                           | Riedel-de Haen                        | 31439             |
| Borsäure                   | 3                             | Riedel-de Haen                        | 11606             |
| EDTA                       | 8,4                           | Roth                                  | 8043.1            |
| <b>Chemikalien</b>         | <b>Konzentration<br/>mg/L</b> | <b>Hersteller</b>                     | <b>Artikelnr.</b> |
| VE-Wasser                  | /                             | HAW-Hamburg                           | /                 |
| Kanamycin                  | 30                            | Roth                                  | T832.2            |

**Tabelle 4.3: Verwendete Geräte und Materialien für den Medienansatz**

| <b>Geräte</b>   | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung/Typ</b>    | <b>Serien-, Artikelnr.</b> |
|-----------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| Waage           | Sartorius         | QUINTIX3102-1S            | 0032207896                 |
| Analysewaage    | Sartorius         | BP221S                    | 12405215                   |
| Magnetrührer    | Heidolph          | MR 3001                   | 100586146                  |
| pH-Meter        | Knick             | pH-Meter 761<br>Calimatic | 902632                     |
| Autoklav        | Systec            | VX-150                    | 4890                       |
| Pasteurpipetten | Roth              | 225 mm, 2,3 mL            | EA56.1                     |
| Schottflaschen  | verschiedene      | 250-5000 mL               | /                          |
| Bechergläser    | verschiedene      | 10-2000 mL                | /                          |
| Metalllöffel    | verschiedene      | /                         | /                          |
| Messzylinder    | verschiedene      | 5-1000 mL                 | /                          |

### 4.4 Analysemethoden

Um den Prozess zu charakterisieren, werden eine Vielzahl von Analysemethoden angewandt. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

#### 4.4.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgt in Anlehnung an die Standardarbeitsanweisung (SOP) Nr. 320101-04, *Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm*, des Labors Bioverfahrenstechnik (BVT) der HAW Hamburg, mit den in Tabelle 4.5 aufgelisteten Geräten, Chemikalien und Materialien.

Es wird eine Probe aus dem Reaktor entnommen (4.1 Versuchsaufbau). Von dieser Probe wird 1 mL in eine Küvette überführt und die Trübung bei 600 nm gemessen. Entsprechend der gemessenen OD wird nach Tabelle 4.4 eine Verdünnung mit isotonischer Kochsalzlösung hergestellt, um einen Messwert im linearen Bereich des Lambert Beer'schen Gesetzes sicherzustellen

**Tabelle 4.4: Anzufertigende Verdünnung entsprechend gemessener OD**

| OD        | Verdünnung |
|-----------|------------|
| 0 bis 0,6 | keine      |
| 0,6 bis 3 | 1:5        |
| 3 bis 15  | 1:25       |

Die Verdünnung wird unter Verwendung eines Vortexers gut gemischt und anschließend in Doppelbestimmung 1 mL vermessen. Parallel wird eine Probe in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen, entsprechend der Probe verdünnt und anschließend die OD des Überstands gemessen und von den OD-Werten der Probe abgezogen. Die OD wird mit der folgenden Formel berechnet.

$$OD = f (OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Überstand}}) \quad (4.1)$$

mit

f = Verdünnungsfaktor [-]

OD<sub>Probe</sub> = OD der unverdünnten oder verdünnten Probe [-]

OD<sub>Überstand</sub> = OD des Mediums ohne Zellen [-]

**Tabelle 4.5: Für die OD-Bestimmung verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien**

| <b>Chemikalien</b>          | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Artikelnr.</b> |
|-----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| Natriumchlorid              | Roth              | /                            | 3957.1            |
| <b>Geräte</b>               | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Seriennr.</b>  |
| Vortexer                    | Phoenix           | RS-VA 10                     | VB3B010349        |
| Photometer                  | Pharmacia         | Ultrospec III                | 53523             |
| <b>Materialien</b>          | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Artikelnr.</b> |
| Halbmikroküvetten<br>1,6 mL | Roth              | Rotilabo-Einmal-<br>Küvetten | XK20              |

#### 4.4.2 Biotrockenmassebestimmung

Für die Biotrockenmassebestimmung entsprechend der SOP Nr. 320001-03 *Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration in Mikroreaktionsgefäßen* des Labors BVT der HAW-Hamburg werden in Vorbereitung Mikroreaktionsgefäße vorab offen bei 105 Grad über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Zum Abkühlen werden die Gefäße in einen Exsikator gestellt, mit einer Pinzette entnommen und in einer Analysewaage gewogen. Die Bestimmung erfolgt in Doppelbestimmung. Je ein Milliliter der Probe in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß pipettiert und in der Tischzentrifuge bei 16162 g für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen oder für weitere Analysen in ein anderes Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Gefäße mit Zellmasse werden wie die leeren Reaktionsgefäße getrocknet und ausgewogen. Die Biotro-

ckenmasse (BTM), beziehungsweise die Zellkonzentration auf Grundlage der BTM, wird über die Formel (4.2) berechnet. Die Massen ergeben sich aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung.

$$c_{XL} = \frac{\bar{m}_{R,X} - \bar{m}_{R,0}}{V_{Probe}} \quad (4.2)$$

mit

$\bar{m}_{R,X}$  = Mittelwert der Masse Mikroreaktionsgefäß mit getrockneter Probe [g]

$\bar{m}_{R,0}$  = Mittelwert der Masse Mikroreaktionsgefäß leer [g]

$V_{Probe}$  = Probenvolumen [L]

Für die zweite Kultivierung wurde die Methode abgewandelt. Die BTM-Bestimmung wird mit

3 mL Probe durchgeführt. Die Tischzentrifuge fasst nur Mikroreaktionsgefäße mit einem Volumen von 2 mL. Es wird für die Zentrifugation die Laborzentrifuge 3 K10 verwendet. Die Proben werden für 15 Minuten bei 5500 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Proben über drei Tage im Trockenschrank getrocknet. Um die neue Methode auf Vergleichbarkeit zu untersuchen, wurden auch einige Proben wie in der ersten Kultivierung behandelt.

**Tabelle 4.6: Für die BTM-Bestimmung verwendete Geräte und Materialien**

| <b>Geräte</b>        | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b> | <b>Seriennr.</b>  |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Vortexer             | Phoenix           | RS-VA 10           | VB3B010349        |
| Tischzentrifuge      | sartorius stedim  | Centrisart A-14    | 128414            |
| Laborzentrifuge      | Sigma             | 3 K 10             | /                 |
| Trockenschrank       | Heraeus           | Vacutherm Typ M    | 92117392          |
| <b>Materialien</b>   | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b> | <b>Artikelnr.</b> |
| Mikroreaktionsgefäße | Roth              | Rotilabo, 1,5 mL   | 4204.1            |

| Materialien     | Hersteller | Bezeichnung              | Artikelnr. |
|-----------------|------------|--------------------------|------------|
| Pipette         | BIONIT     | Proline Plus 5 mL        | /          |
| Pipettenspitzen | Roth       | Standard MAKRO<br>1,5 mL | CX70.1     |

#### 4.4.3 Untersuchung der Plasmidretention

Die erste Kultivierung wurde ohne Kanamycin durchgeführt, um zu untersuchen, wie lange die Bakterien ihr Plasmid ohne Selektionsdruck halten. Um dies während des laufenden Prozesses zu untersuchen, werden Proben ausplattiert. Es werden Agar-Platten mit LB-Medium hergestellt und in der Hälfte der Platten 30 mg/L Kanamycin zugesetzt. Dieses wird direkt nach dem Gießen in den 55 °C warmen, flüssigen Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten werden in der Sicherheitswerkbank zum Abkühlen stehen gelassen und anschließend im Kühlschrank gelagert.

Für das Ausplattieren wird eine Probe aus dem Reaktor genommen und in der Sicherheitswerkbank mit isotonischer Kochsalzlösung in einer Verdünnungsreihe bis zu  $10^{-7}$  verdünnt. Die Probe wird 1:10 verdünnt, diese Verdünnung ebenfalls. Dies wird noch fünf Mal wiederholt, bis die gewünschte Verdünnung erreicht ist. Von der letzten Verdünnung werden 100 µL auf je zwei Platten mit Kanamycin und zwei ohne gegeben, und mit einem sterilen Plastikspatel gleichmäßig verteilt. Die Platten werden kopfüber bei 36 °C über Nacht bebrütet und am Folgetag die Kolonien (KBE) in Doppelbestimmung ausgezählt.

#### 4.4.4 Glucoseanalyse

##### 4.4.4.1 Enzymatische Glucoseanalyse

Für die Glucoseanalyse wird ein Teil des Überstandes der Biotrockenmassebestimmung verwendet. Wichtig ist, dass die Proben so schnell wie möglich nach der Probenahme zentrifugiert werden, da sich in der Probe noch Zellen befinden, die die Glucose weiter verstoff-

wechseln. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

Die enzymatische Glucoseanalyse wird mit dem Kit Glucose Gluc-DH FS durchgeführt. Der Test enthält eine Glucose Dehydrogenase, die die Glucose in der Probe oxidiert [9].



NADH kann bei 340 nm mit dem Photometer gemessen werden. Die Konzentration ist proportional zur Glucosekonzentration der Probe.

Für die Messung werden 5 mL der Reagenz 2 mit 20 mL Reagenz 1 des Kits gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Es werden zu 500 µL Reagenzmischung 5 µL Probe gegeben, beides gut vermischt und für genau 10 Minuten inkubiert, direkt im Anschluss wird die Absorption bei 340 nm gemessen. Es werden Standards mit 0,05, 1, 3 und 5 g/L angesetzt, um die Kalibriergerade zu erstellen. Die Nachweißgrenze des Kits liegt laut Hersteller bei 0,04 g/L Glucose. Die Konzentration in der Probe berechnet sich wie folgt:

$$\beta_{\text{Glc}} = (\mathbf{E} - \mathbf{b}_{\text{KG}}) \cdot \frac{1}{\mathbf{m}_{\text{KG}}} \quad \mathbf{(4.3)}$$

mit

$\beta_{\text{Glc}}$  = Glucosekonzentration [g/L]

E = Extinktion [-]

bKG = Schnittpunkt der Kalibriergeraden mit der Y-Achse [-]

mKG = Steigung der Kalibriergeraden [-]

**Tabelle 4.7: Für die enzymatische Glucoseanalyse verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien**

| <b>Chemikalien</b> | <b>Hersteller</b>    | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Artikelnr.</b> |
|--------------------|----------------------|------------------------------|-------------------|
| Glucose Test-Kit   | DiaSys               | Glucose Gluc-DH FS           | 60138056          |
| <b>Geräte</b>      | <b>Hersteller</b>    | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Seriennr.</b>  |
| Photometer         | Pharmacia<br>Biotech | Ultrospec 3000<br>80-2106-20 | 60658             |
| <b>Materialien</b> | <b>Hersteller</b>    | <b>Bezeichnung</b>           | <b>Artikelnr.</b> |
| Einmal-Küvetten    | Brand                | UV-Küvette Mikro             | 7592 10           |

#### 4.4.4.2 Glucoseanalyse mit der HPLC

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wird einer Ionenausschluss säule in einem chromatographischen System, das aus einer Niederdruckgradientpumpe, einem Autosampler, einer Entgasereinheit, einem Säulenofen, sowie zur Probenanalytik einem Diodearray (DAD) und einem Brechungsindexdetektor (*engl.*: Refractive Index, RI) aufgebaut ist, durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgt über die Software Primaide System Manager. Die Probenanalyse mit der HPLC erfolgt in Anlehnung an die Methode der *HPICE zur Quantifizierung von Glucose und Acetat* aus der Dissertation von B. Beckmann [7].

Die Proben werden für die HPLC in einer 1:10 Verdünnung mit 50 mM Schwefelsäure angesäuert. Anschließend werden die Proben für 2 Minuten bei 16162 g zentrifugiert und mit einem hydrophilen 0,2 µm Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membranfilter filtriert. Für die HPLC ist ein Volumen von 20 µL erforderlich. Für die Filtration sollte größeres Volumen angesetzt werden, da ein Teil der Flüssigkeit im Filter verbleibt.

Die Trennung erfolgt mit einer Ionenausschluss säule isokratisch mit 2,5 mM Schwefelsäure. Die Fließmittelgeschwindigkeit beträgt 0,6 mL/min, die Säulenofentemperatur 60°C. Glucose wird über den RI-Detektor detektiert. Für die Kalibrierung werden Standards im Bereich von 5 bis 100 g/L angesetzt und 1:10 mit 50 mM Schwefelsäure verdünnt, sodass man nach der Ansäuerung Standards im Bereich von 0,5 bis 10 g/L erhält.

Tabelle 4.8: Für die Glucoseanalyse mit der HPLC verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien

| <b>Chemikalien</b>                              | <b>Hersteller</b>            | <b>Bezeichnung</b>                          | <b>Artikelnr.</b> |
|---|------------------------------|---|-------------------|
| Schwefelsäure                                   | Roth                         | /   | 9316.1            |
| <b>Geräte</b>                                   | <b>Hersteller</b>            | <b>Bezeichnung</b>                          | <b>Seriennr.</b>  |
| Autosampler                                     | Hitachi<br>High-Technologies | Primaide<br>PM1210                          |                   |
| Niederdruckgradientpumpe<br>mit Entgasereinheit | Hitachi<br>High-Technologies | Primaide<br>PM1110                          | /                 |
| Säulenofen                                      | Hitachi<br>High-Technologies | Primaide<br>PM1310                          | /                 |
| Diodenarray<br>Detector                         | Hitachi<br>High-Technologies | Primaide<br>PM1430                          | /                 |
| RI-Detector                                     | VWR, Hitachi                 | Chromaster 5450                             | /                 |
| Auswertungs-<br>Software                        | Hitachi<br>High-Technologies | Primaide System<br>Manager                  | /                 |
| <b>Materialien</b>                              | <b>Hersteller</b>            | <b>Bezeichnung</b>                          | <b>Artikelnr.</b> |
| Trennsäule                                      | Phenomenex                   | Rezex ROA-Organic<br>Acid<br>(150 × 7,8) mm | /                 |

#### 4.4.5 Acetatanalyse

Die Acetatanalyse erfolgt analog mit der HPLC. Für die Detektion wird der DAD-Detektor verwendet. Die Messung wird auch im RI-Detektor durchgeführt, diese Werte werden aber nicht für die Auswertung verwendet. Als Standards werden aus dem TraceCERT Acetat Standard mit einer Konzentration von 1 g/L Konzentrationen von 0,05 bis 1 g/L angesetzt.

### 4.4.7 Produktanalyse

Für die Produktanalyse wird das benötigte Probevolumen verdünnter oder unverdünnter Probe anhand der SOP Nr. 320200-02 *PAGE Probenvolumen für Minigele* des Labors BVT der HAW Hamburg ausgerechnet. Für die im Prozess gemessenen OD gilt

$$V_{\text{Probe,1:25}} = \frac{4500}{\text{OD}} \mu\text{L} \quad (4.4)$$

Das Volumen wird von einer verdünnten Probe abgenommen, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das verbleibende Zellpellet eingefroren. Für die Quantifizierung des Produkts wird eine Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl.*: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) in Anlehnung an die SOP Nr. 320214-03 *Durchführung der Gelelektrophorese mit TGX Fertiggelen von Bio-Rad für Fermentationsproben* durchgeführt. Das Zellpellet wird mit 50  $\mu\text{L}$  Lysepuffer versetzt, um die Zellen aufzuschließen. Die Probe wird gut gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 50  $\mu\text{L}$  Probenpuffer dazugegeben, erneut gemischt. Die Probe wird für 5 min bei 95 °C geöffnet in den Thermoblock gestellt, um die Proteine zu denaturieren, anschließend für 15 Sekunden bei 16162 g zentrifugiert und wieder gemischt. Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Als Standard wird Bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 250, 500 und 750 ng/10  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer gespannt und der Laufpuffer eingefüllt. Anschließend 20  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Probe und 10  $\mu\text{L}$  der Standards und ein Marker in die Geltaschen pipettiert. Mit dem Zellpellet des mit (4.4) berechneten Probenvolumens, welches in 100  $\mu\text{L}$  Lyse- und Probepuffer gelöst wird, ergeben sich bei 20  $\mu\text{L}$  Probenauftragung klar abgetrennte Banden. Die Produktbanden weisen Konzentrationen im Bereich von 200-700  $\mu\text{L}$  auf. Es werden 200 V Spannung angelegt. Die Laufzeit des Gels hängt von dessen Polyacrylamidkonzentration ab, ein Gel mit 12% braucht 30 bis 55 Minuten, bis die Laufbande den unteren Rand des Gels erreicht hat. Das Gel wird über Nacht in Comassiblau gefärbt und mit Ethanol 35% entfärbt. Danach mit dem Gel Doc EZ Imager eingescannt und mit dem Programm Image Lab bearbeitet. Mit diesem Programm können einzelne Banden optisch

quantifiziert werden. Je klarer die Banden und gerader die Laufbanden, desto besser gelingt die Auswertung.

**Tabelle 4.9: Für die Produktquantifizierung verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien**

| <b>Chemikalien</b>           | <b>Hersteller</b>    | <b>Bezeichnung</b>   | <b>Artikelnr.</b>          |
|------------------------------|----------------------|--|----------------------------|
| IPTG                         | A.G. Scientific Inc. | /  | I-1312                     |
| Probenpuffer                 | BioRad               | 4x Laemmli Sample Buffer   | 161-0747                   |
| Lysepuffer                   | /                    | 50mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 0,05% (w/v) DOC, 0,05% $\beta$ -Mercaptoethanol | /                          |
| Roti-Blue quick              | Roth                 | Ready-to-use 1x  | 4829,2                     |
| Marker                       | BioRad               | Precision Plus Protein Unstained Standards   | 161-0363                   |
| <b>Geräte</b>                | <b>Hersteller</b>    | <b>Bezeichnung</b>   | <b>Artikel-, Seriennr.</b> |
| Elektrophorese Kammer        | Themofisher          | Xcell SureLock Mini-Cell   | EI0001                     |
| Elektrophorese Kammer        | BioRad               | Criterion  | 4206272 ReVA               |
| Electrophoresis Power Supply | Pharmacia Biotech    | EPS-301  | 56117382                   |
| 10x TGS Buffer               | BioRad               | 10x Tris/Glycine/SDS Buffer  | 161-0772                   |
| Tischzentrifuge              | Sartorius            | Centrisart A-14  | A14 128415                 |
| Tischschwenker               | Assistent            | /  | /                          |
| Scanner                      | BioRad               | Gel Doc EZ Imager  | 1708270                    |

| <b>Geräte</b>        | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>            | <b>Artikel-, Seriennr.</b> |
|----------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Themoblock           | Roth              | Test Tube Thermostat, TCR 100 | /                          |
| <b>Materialien</b>   | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b>            | <b>Artikelnr.</b>          |
| Auswertungs-Software | BioRad            | Image Lab                     | 1709690                    |
| Schweißgerät         | Severin           | /                             | /                          |
| Gel 12%              | Serva             | ServaGel TG PRiME 12%         | 43266.01                   |
| Gel 12% Stain free   | BioRad            | Criterion TXG Stain-Free      | 5678123                    |

#### 4.4.8. Untersuchung der Zellmorphologie

Die Untersuchung der Bakterien auf ihre Morphologie erfolgt mit einem Lichtmikroskop. An dem Mikroskop muss vor der Verwendung die Köhlersche Beleuchtung eingestellt werden. Dadurch wird die Beleuchtung des Präparates optimiert. Da *E. coli* keine Färbung aufweisen, wird die Phasenkontrastmikroskopie verwendet. Hier wird die Phasenverschiebung des Lichtes beim Durchdringen der Zellen von dem Mikroskop als Intensitätsunterschied registriert [10]. Die Probe kann mit 10x, 40x und 63x Vergrößerungen untersucht werden. Das Bild wird von einer Kamera an einen Laptop übertragen und kann mit dem Programm Labscope der Firma Zeiss bearbeitet und aufgenommen werden. Tabelle 4.10 führt die verwendeten Geräte für die Untersuchung auf.

**Tabelle 4.10: Für die Untersuchung der Zellmorphologie verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien**

| <b>Geräte</b>      | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b> | <b>Serienr.</b>   |
|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Mikroskop          | Zeiss             | Axio Lab. A1       | 3136015321        |
| Mikroskop Kamera   | Zeiss             | Axiocam ERc 5s     | MHG10549          |
| Software           | Zeiss             | Labscope           | ZLS               |
| <b>Materialien</b> | <b>Hersteller</b> | <b>Bezeichnung</b> | <b>Artikelnr.</b> |
| Objekträger        | Marienfeld        | 76x26x1 mm         | 1000000           |

### 5. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden im Rahmen der Bachelorarbeit zwei kontinuierliche Kultivierungen durchgeführt (K1 und K2). Neben der Etablierung der Prozessführungsstrategie, war es das Ziel die Prozesse zu charakterisieren. Dies sollte auf Grundlage verschiedener Analysen geschehen. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der einzelnen Analysen dargestellt und abschließend bestimmte Phasen des Prozesses auf Grundlage dieser Daten charakterisiert und diskutiert. Die Untersuchung der Produktbildung folgt in einem separaten Kapitel.

Nach dem Aufbau und der Überprüfung des Systems, lief die erste Kultivierung 7 Tage ohne Zwischenfälle und wurde planmäßig beendet. In diesem Prozess wurden das Verhalten der Zellen in einer kontinuierlichen Langzeitkultivierung untersucht. Es wurden Änderungen an der Verdünnungsrate vorgenommen und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert. Alle anderen Prozesseigenschaften, wie Temperatur, pH und Medienzusammensetzung inklusive Substratkonzentration wurden konstant gehalten. Durch die Einstellung verschiedener Verdünnungsraten sollte die Einstellung des Fließgleichgewichtes untersucht und die einzelnen Zustände mit verschiedene Analysemethoden charakterisiert werden. So sollte anhand der Identifikation von kinetischen, Mikroorganismen charakterisierenden Parameter eine Grundlage für mögliche Optimierungen gelegt werden, die anschließend auf andere Prozessführungen übertragen werden können. Die Induktion der Zellen sollte einen ersten Einblick in die Möglichkeiten der Nutzung einer kontinuierlichen Kultivierung zur Produktion mit genetisch modifizierten Zellen geben.

Die zweite Kultivierung dauerte 11 Tage an und wurde unter Selektionsdruck, mit Antibiotikazugabe zum Medium, geführt. Am 6. Tag kam es zu einem unerwarteten Verhalten im Prozess, was eine Volumenreduktion im Bioreaktor zur Folge hatte, die nicht mehr behoben werden konnte. Der Prozess wurde dennoch weitergeführt. Bei dieser Fermentation sollten Methoden von K1 optimiert und einige Phänomene näher untersucht werden. Auch in diesem Versuch wurden verschiedene Verdünnungsraten eingestellt und die Zellen zu zwei Zeitpunkten induziert. Weitere Änderungen wurden nicht vorgenommen. Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 zeigen die Phasen der Kultivierungen. In der Kultivierung K2 war das Volumen ab Phase 6 (Tab. 5.2) nicht mehr konstant und lag unterhalb der ursprünglichen 1,5 L. Die Ver-

dünnungsraten waren somit nicht mehr genau zu bestimmen, da diese volumenabhängig sind (3.15). In der Tabelle sind die Verdünnungsraten kursiv dargestellt. Es werden die Verdünnungsraten angegeben, die bei den entsprechenden Pumpraten bei 1,5 L flüssigem Reaktorvolumen vorgelegen hätten.

**Tabelle 5.1: Phasen der ersten Kultivierung (K1), deren Prozesszeit und die eingestellte Verdünnungsrate. Phasen, in denen die Produktbildung induziert wurde, sind mit einem X gekennzeichnet.**

| Phase | Prozesszeit [h] | D [1/h] | Induktion         |
|-------|-----------------|---------|-------------------|
| 1     | 0,00-4,53       | -       |                   |
| 2     | 4,53-22,20      | 0,10    |                   |
| 3     | 22,20-25,57     | 0,20    |                   |
| 4     | 25,57-48,15     | 0,050   |                   |
| 5     | 48,15-53,51     | 0,30    |                   |
| 6     | 53,51-71,51     | 0,075   |                   |
| 7     | 71,51-74,11     | 0,30    |                   |
| 8     | 74,11-98,11     | 0,025   |                   |
| 9     | 98,11-121,21    | 0,075   |                   |
| 10    | 121,21-125,11   | 0,30    |                   |
| 11    | 125,11-143,51   | 0,025   |                   |
| 12    | 143,51-144,41   | 0,20    |                   |
| 13    | 144,41-148,41   | 0,30    |                   |
| 14    | 148,41-168,53   | 0,10    | <b>X (148,15)</b> |
| 15    | 168,53-170,40   | 0,30    | <b>X</b>          |

**Tabelle 5.2: Phasen der zweiten Kultivierung (K2), deren Prozesszeit und die eingestellte Verdünnungsrate. Phasen, in denen die Produktbildung induziert wurde, sind mit einem X gekennzeichnet. Verdünnungsraten nach der Volumenänderung sind kursiv dargestellt, da diese aufgrund des unbekanntes Volumens nicht mehr korrekt zu bestimmen sind.**

| Phase | Prozesszeit [h] | D [1/h]      | Induktion         |
|-------|-----------------|--------------|-------------------|
| 1     | 0,00-3,29       | -            |                   |
| 2     | 3,29-72,12      | 0,025        |                   |
| 3     | 72,12-99,12     | 0,075        |                   |
| 4     | 99,12-121,42    | 0,10         |                   |
| 5     | 121,42-124,22   | 0,10         | <b>X (122,12)</b> |
| 6     | 124,22-168,10   | <i>0,10</i>  |                   |
| 7     | 168,10-194,12   | <i>0,10</i>  | <b>X (167,57)</b> |
| 8     | 194,12-268,47   | <i>0,025</i> |                   |

### 5.1 Untersuchung des Zellwachstums

Die Biotrockenmassenkonzentration stellt die Grundlage für alle weiteren Berechnung dar. Aus diesem Grund ist es wichtig, diese als erstes zu bestimmen.

Der erwartete Verlauf der Biotrockenmassekonzentration ist durch das theoretische Modell (Abb. 3.5) und die Annahmen der Fließgleichgewichtseinstellung (Abb. 3.4) vorgegeben. Es kommt nach einer Änderung der Verdünnungsrate zu einer Einstellung eines neuen Gleichgewichtszustands. Zudem gilt, dass die Zellkonzentration für unterschiedliche Verdünnungsraten, also spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten, nahezu konstant ist. Dies gilt nicht für sehr niedrige  $\mu$ , und Verdünnungsraten in der Nähe des Auswaschpunktes. Parallel zur BTM-Bestimmung wird die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) der Proben gemessen. Es wird ein Zusammenhang zwischen  $OD_{600}$  und Zellkonzentration vorausgesetzt [18]. Ein Anstieg der Zellkonzentration sollte sich nach dieser Annahme also auch in höheren Messwerten der  $OD_{600}$  widerspiegeln.

#### 5.1.1 Biotrockenmassebestimmung K1

Abbildung 5.1 und 5.2 zeigen den Verlauf der mit der BTM-Bestimmung erhaltene Zellkonzentration  $c_{XL}$  und  $OD_{600}$  über die Prozesszeit. Die unterschiedlichen Phasen sind kenntlich gemacht. Die Rührerdrehzahl ist ebenfalls dargestellt. Diese wird als Leitfaden für den erwarteten Verlauf der Zellkonzentration verwendet. Der Sollwert für  $pO_2\%$  im Medium ist während der Kultivierung auf 15% festgelegt. Dieser Wert wird über die Rührerdrehzahl geregelt. Steigt der Sauerstoffbedarf der Zellen, weil ihnen mehr Substrat zum Zellwachstum zur Verfügung steht, muss die Rührerdrehzahl entsprechend ansteigen, um mehr Sauerstoff ins Medium einzutragen. Sinkt der Sauerstoffbedarf der Zellen, sinkt auch die Rührerdrehzahl.

Die erwartete Korrelation zwischen  $c_{XL}$ ,  $OD_{600}$  und  $N_{St}$  ist für die Phasen der kontinuierlichen Kultivierung nicht gegeben, wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen.

In der Batch-Phase (Phase 1) steigen mit  $N_{St}$  auch  $c_{XL}$  und  $OD_{600}$ . Dies entspricht dem erwarteten Verlauf der Batch-Phase, in der die Zellen exponentiell wachsen. Der Sauerstoffbedarf steigt in der Folge und damit auch  $N_{St}$ .

Wie man Abbildung 5.1 entnehmen kann, zeigt die Rührerdrehzahl auch während der kontinuierlichen Phasen den erwarteten Verlauf. Wird  $D$  erhöht, steigt auch  $N_{St}$ . An der  $OD_{600}$  sind Veränderungen der Verdünnungsrate nicht abzulesen. Dies fällt besonders bei dem Übergang von Phase 3 zu Phase 4 auf.  $D$  wird von 0,30 auf  $0,075 \text{ h}^{-1}$  herabgesetzt,  $N_{St}$  sinkt von über 800 auf unter 600 rpm,  $OD_{600}$  bleibt annähernd konstant.  $c_{XL}$  verläuft auch unabhängig von der Rührerdrehzahl und damit der Verdünnungsrate. In Phase 3 bleibt die Zellkonzentration trotz steigendem  $N_{St}$  konstant, innerhalb Phase 4 steigt  $c_{XL}$ , obwohl  $D$  und damit auch  $N_{St}$  konstant ist.

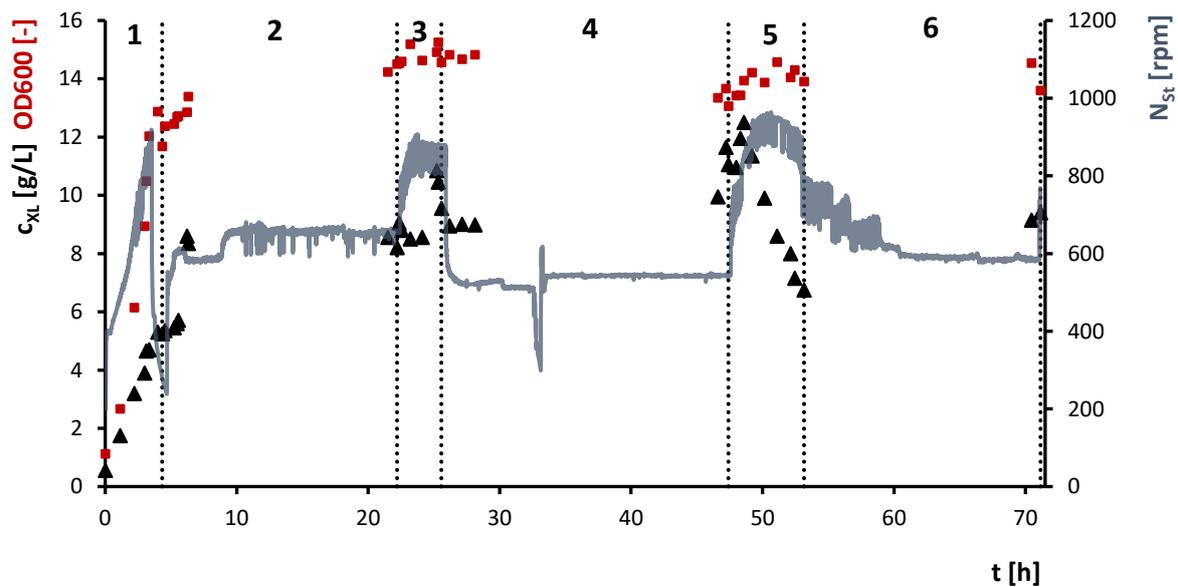


Abbildung 5.1:  $c_{XL}$  in g/L,  $OD_{600}$  und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die Prozesszeit der Kultivierung K1 bis 72 Stunden aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

In Phase 8 und 9 in Abbildung 5.2 ist ein deutlicher Anstieg von  $c_{XL}$  zu verzeichnen, der sich nicht in der Rührerdrehzahl widerspiegelt. Ab Phase 12 ist  $c_{XL}$  deutlich reduziert. Die  $OD_{600}$  verläuft auch hier weitestgehend unabhängig von den Schwankungen der Zellkonzentration und  $N_{St}$ .

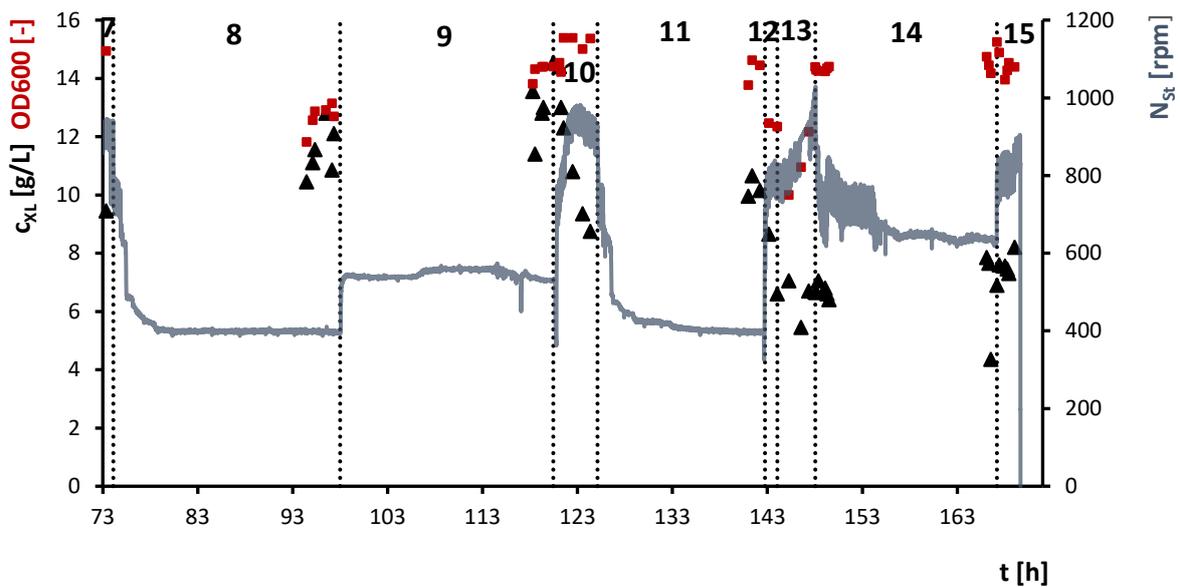


Abbildung 5.2:  $c_{XL}$  in g/L,  $OD_{600}$  und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die Prozesszeit ab 73 Stunden bis Prozessende der Kultivierung K1 aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

In Tabelle 5.3 sind die Mittelwerte der einzelnen Phasen für  $c_{XL}$  und die  $OD_{600}$  aufgetragen. Die Phasen mit identischen Verdünnungsraten sind zur besseren Übersichtlichkeit farblich markiert. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass sich die Mittelwerte von  $c_{XL}$  zweier Phasen mit gleicher Verdünnungsrate erheblich unterscheiden. Die Zunahme von  $c_{XL}$  im Laufe des Prozesses ist auch hier zu erkennen (Phase 8-10), ebenso wie die Abnahme ab Phase 14. Für die Phasen 12 und 13 wurden keine Werte bestimmt. Hier lag eine Störung des Prozesses durch die kurzfristige Verwendung zweier Pumpschläuche mit dem Versuch der Erhöhung der Pumprate vor, sodass die Werte für diese Betrachtung nicht herangezogen werden. Die  $OD_{600}$  weist, entsprechend Abbildung 5.1, bis auf einige Ausnahmen, keine großen Schwankungen auf.

Tabelle 5.3: Mittelwerte der BTM in g/L und  $\overline{OD}_{600}$  der Kultivierung K1 für die einzelne Prozessphasen mit den jeweiligen Verdünnungsraten in  $h^{-1}$ .

| Phase | D<br>[ $h^{-1}$ ] | $\bar{c}_{XL}$<br>[g/L] | $\overline{OD}_{600}$ |
|-------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1     | -                 | -                       | -                     |
| 2     | 0,10              | 8,55                    | 14,23                 |
| 3     | 0,20              | 10,65                   | 15,22                 |
| 4     | 0,050             | 9,95                    | 13,50                 |
| 5     | 0,30              | 8,53                    | 14,11                 |
| 6     | 0,075             | 9,15                    | 14,54                 |
| 7     | 0,30              | 9,03                    | 14,44                 |
| 8     | 0,025             | 11,6                    | 12,63                 |
| 9     | 0,075             | 13,28                   | 14,11                 |
| 10    | 0,30              | 11,88                   | 14,77                 |
| 11    | 0,025             | 10,25                   | 14,11                 |
| 12    | 0,20              | -                       | -                     |
| 13    | 0,30              | -                       | -                     |
| 14    | 0,10              | 6,61                    | 14,21                 |
| 15    | 0,30              | 7,62                    | 14,17                 |

Es gibt verschiedene mögliche Ursachen für die oben aufgeführte Problematik. Ein möglicher Grund könnte sein, dass es in den Phasen mit niedrigen Verdünnungsraten viele Stunden dauert, bis das Volumen im Fermenter einmal ausgetauscht wird. Bei einem D von  $0,025 h^{-1}$  zum Beispiel 48 h, bei einem D von  $0,075 h^{-1}$  immer noch 13,33 h. Es wurde die Verdünnungsraten häufig verändert, bevor ein kompletter Volumenaustausch stattgefunden hat. Dies trifft insbesondere auf die Phase 11 mit einem D von  $0,025 h^{-1}$  zu. Diese dauerte nur 22 Stunden an. Um sicherzustellen, dass sich der Gleichgewichtszustand einstellt,

wurden im 2. Versuch die Verdünnungsraten erst zwei Stunden nach einem kompletten Volumenaustausch geändert.

Eine andere Fehlerhypothese beruht auf der Annahme, dass die Methodik der Analytik mögliche Fehlerquellen aufweist. Das Probenvolumen für die BTM-Bestimmung ist mit einem Milliliter sehr gering, da aufgrund der Zelldichte im Reaktor somit nur sehr geringe Massen im Bereich von 0,006 bis maximal 0,012 g nach der Trocknung für die Auswertung zur Verfügung stehen. Minimale Schwankungen führen so zu großen Fehlern. Um diesen Einfluss zu reduzieren, wird bei der zweiten Kultivierung ein Probenvolumen von 3 mL verwendet. Einen weiteren möglichen Einfluss auf  $c_{XL}$  stellt die Trocknung dar. Um sicherzustellen, dass die Proben nach der Trockenzeit von einem Tag komplett getrocknet sind, wird die Trockenzeit auf zwei Tage verlängert und die Proben nach ein und zwei Tagen Trocknung ausgewogen. Vergleicht man die Differenzen zwischen den Massen nach ein und zwei Tagen Trocknung, führt dies zu einer Abweichung von 0,0049 %, die zu vernachlässigen ist, da die Waage selbst eine gewisse Ungenauigkeit aufweist. Es kann also angenommen werden, dass ein Tag ausreicht, um eine vollständige Trocknung zu gewährleisten. Für die 3 mL Probenvolumen wird dieser Vorgang wiederholt und eine Trockenzeit von 3 Tagen bestimmt.

Einen weiteren möglichen Einfluss auf Schwankungen in der Zellkonzentration stellt die Zufütterrate dar. Hierfür werden die Waagensignale der einzelnen Phasen auf Linearität überprüft. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) liegt in den verschiedenen Phasen zwischen 1,000 und 0,9998. Die Zufütterpumpe arbeitet gleichmäßig und stellt keine Fehlerquelle bei der BTM-Bestimmung dar.

Um die  $OD_{600}$ -Bestimmung zu optimieren, wird die Doppelbestimmung der  $OD_{600}$ -Messung in der 2. Kultivierung wiederholt, bis die Werte der Messungen sich maximal um 0,01 unterscheiden. In der ersten Kultivierung lagen Schwankungen der  $OD_{600}$  der Doppelbestimmung bei bis zu 0,02.

## 5.1.2 Biotrockenmassebestimmung K2

Den Verlauf von  $c_{XL}$  und  $OD_{600}$  während der Kultivierung K2 zeigt Abbildung 5.3. Hier sind  $c_{XL}$ ,  $OD_{600}$  und Rührerdrehzahl gegen die Prozesszeit bis 125 Stunden aufgetragen. Die Zellkonzentration schwankt, trotz der durchgeführten Optimierungsansätze, stark. Die Umstellungen der Verdünnungsraten sind in der Auftragung von  $c_{XL}$  nicht zu erkennen. Der Verlauf der  $OD_{600}$  hingegen folgt der Rührerdrehzahl. Wenn diese aufgrund erhöhter Zufütterung steigt, steigt auch die  $OD_{600}$  an. In der Phase 1 ist, wie auch bei der Kultivierung K1, ein Anstieg von  $c_{XL}$  und  $OD_{600}$  sichtbar, der dem erwarteten Zellzuwachs entspricht (Batch-Phase: exponentielles Wachstum).

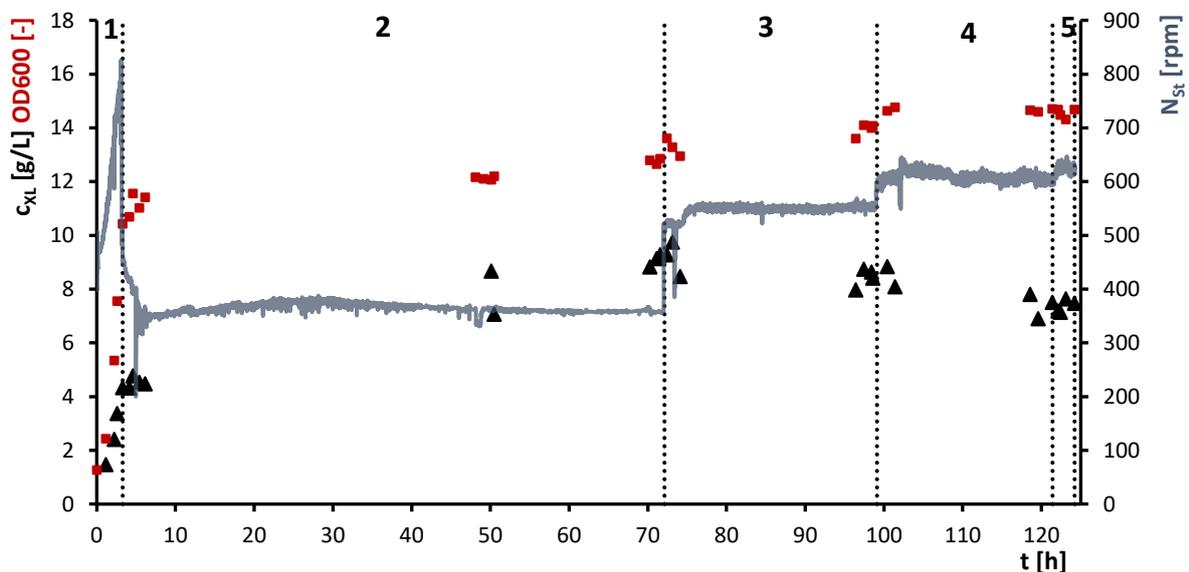


Abbildung 5.3:  $c_{XL}$  in g/L,  $OD_{600}$  und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die Prozesszeit der Kultivierung K2 bis 125 Stunden aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

In Abbildung 5.4 sind die Daten nach der Prozessstörung aufgetragen. Diese wird in Kap. 5.9 *Prozessstörung der Kultivierung K2* näher erläutert. Es ist anhand der stark schwankenden Rührerdrehzahl zu erkennen, dass es zu keiner nennenswerten Gleichgewichtseinstellung kommt. Aus diesem Grund wird die zweite Prozesshälfte von K2 nicht für die Auswertung von  $c_{XL}$  herangezogen.

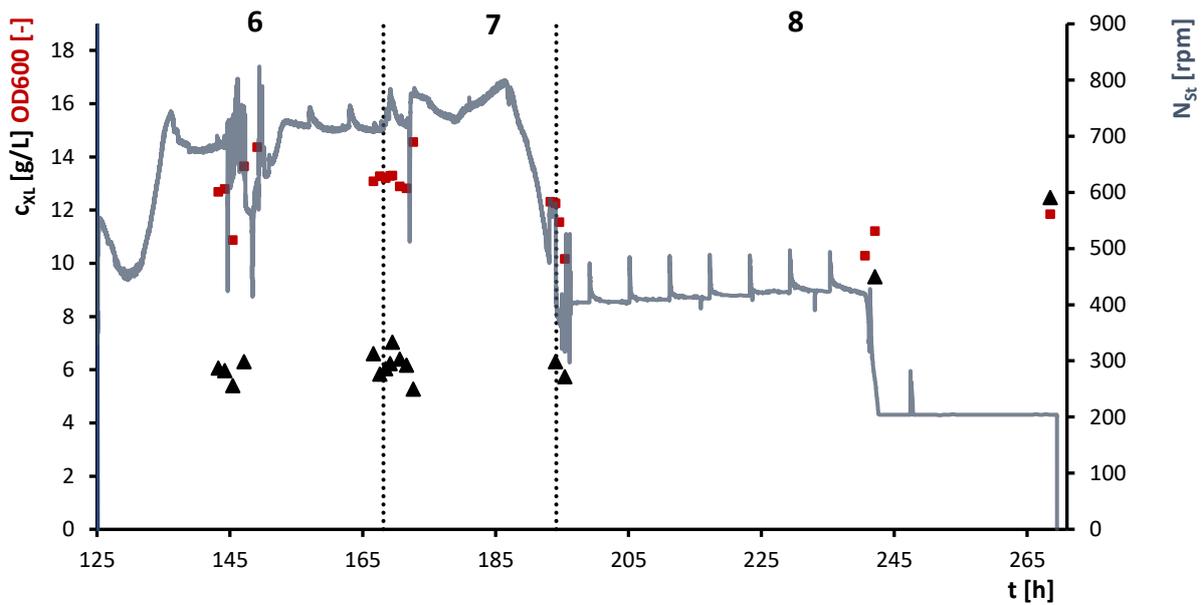


Abbildung 5.4:  $c_{XL}$  in g/L,  $OD_{600}$  und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die Prozesszeit der Kultivierung K2 von 125 Stunden bis Prozessende aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

In Tabelle 5.4 sind die Phasen von K2 vor der Prozessstörung aufgeführt. Die Mittelwerte von  $c_{XL}$  verhalten sich gegenüber der Theorie genau gegenteilig. Mit steigender Verdünnungsrate ist eine leicht ansteigende Zellkonzentration zu erwarten (5.1 Untersuchung des Zellwachstums).

Tabelle 5.4: Mittelwerte von  $c_{XL}$  in g/L und  $OD_{600}$  der Kultivierung K2 für die einzelne Prozessphasen mit den jeweiligen Verdünnungsraten in  $h^{-1}$ .

| Phase | D<br>[ $h^{-1}$ ] | $\bar{c}_{XL}$<br>[g/L] | $\overline{OD}_{600}$ |
|-------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1     | -                 | -                       | -                     |
| 2     | 0,025             | 9,07                    | 12,76                 |
| 3     | 0,075             | 8,43                    | 13,94                 |
| 4     | 0,10              | 7,40                    | 14,67                 |
| 5     | 0,10              | 7,35                    | 14,53                 |

Es ist möglich, dass die Abnahme von  $c_{XL}$  mit höheren Verdünnungsraten auf die Alterung der Zellen zurückzuführen ist. So könnte es sein, dass mit Fortschreiten des Prozesses der Zusammenhang  $\mu = D$  nicht mehr gilt. Vergleicht man die beiden Prozesse miteinander, so ist dieser Effekt bei der Kultivierung K1 nicht zu beobachten. Zu entsprechender Prozesszeit liegen vergleichsweise hohe Zellkonzentrationen vor (Tab. 5.3, Phase 10). Da die gemessenen Zellkonzentrationen innerhalb der jeweiligen Phasen stark schwanken, wie Abbildung 5.3 zu entnehmen ist, ist hier eher von einem systematischen Fehler als von einer Änderung der Wachstumseigenschaften der Zellen auszugehen.

### 5.1.3 Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Zellkonzentration

Eine mögliche Lösung, um zu besseren Ergebnissen zu kommen, ist es, sich eines Umrechnungsfaktors zu bedienen. Der Faktor  $f_{X/OD}$  wird aus der Auftragung von  $c_{XL}$  in g/L gegen die  $OD_{600}$  generiert. Die Steigung der Regressionsgerade entspricht  $f_{X/OD}$ . Hierfür werden die Batchphasen der beiden Kultivierungen verwendet, da nur hier ein linearer Anstieg von Zellkonzentration und  $OD_{600}$  vorliegt. Abbildung 5.5 zeigt diese Auftragung.

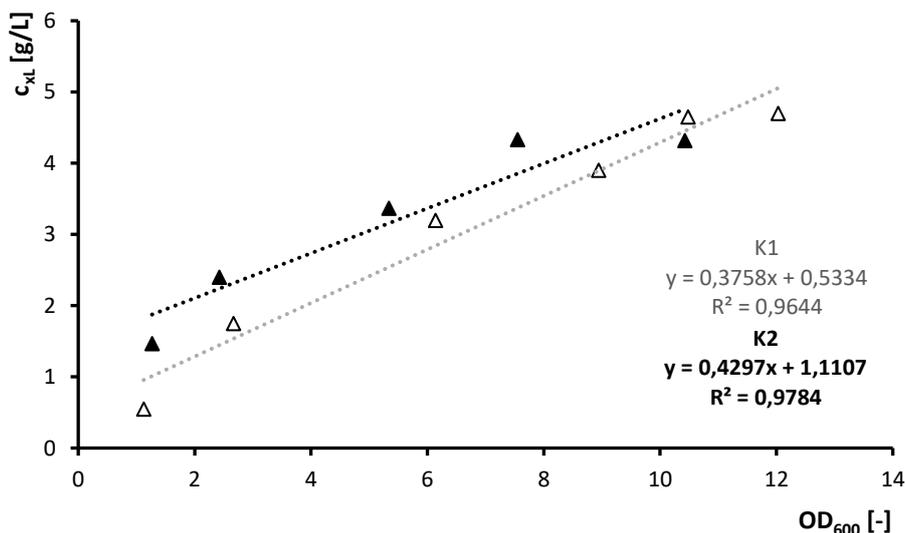


Abbildung 5.5: Auftragung von  $c_x$  [g/L] gegen  $OD_{600}$  mit Regressionsgeraden. Weiße Dreiecke mit schwarzem Rand: K1, schwarze Dreiecke: K2.

Der Mittelwert aus den Steigungen der Geraden 0,40 wird für die Umrechnung von  $c_{XL}$  verwendet. Abbildung 5.6 und 5.7 stellen den Verlauf der korrigierten Zellkonzentration  $c_{XL,f}$  über die relevanten Phasen der beiden Prozesse dar. Als Referenz ist erneut die Rührerdrehzahl gegen die Prozesszeit aufgetragen. Durch den Umrechnungsfaktor folgt der Verlauf der  $c_{XL,f}$  nun den Werten der  $OD_{600}$ -Messung. Es sind keine großen Schwankungen innerhalb der einzelnen Phasen zu erkennen, und auch im Vergleich zwischen den Phasen ist die  $c_{XL,f}$  über den Verlauf beider Prozesse annähernd konstant. Die Zellkonzentration liegt nach Anwendung des Umrechnungsfaktors deutlich niedriger.

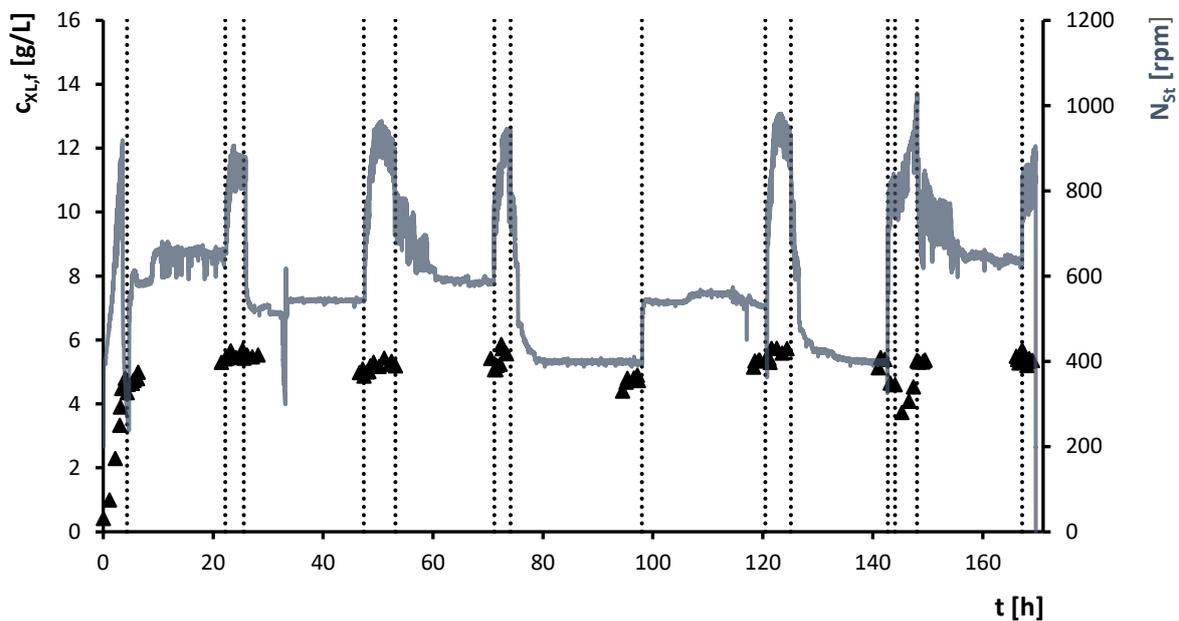


Abbildung 5.6: Korrigierte Zellkonzentration [g/L] und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die gesamte Prozesszeit der Kultivierung K1 aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

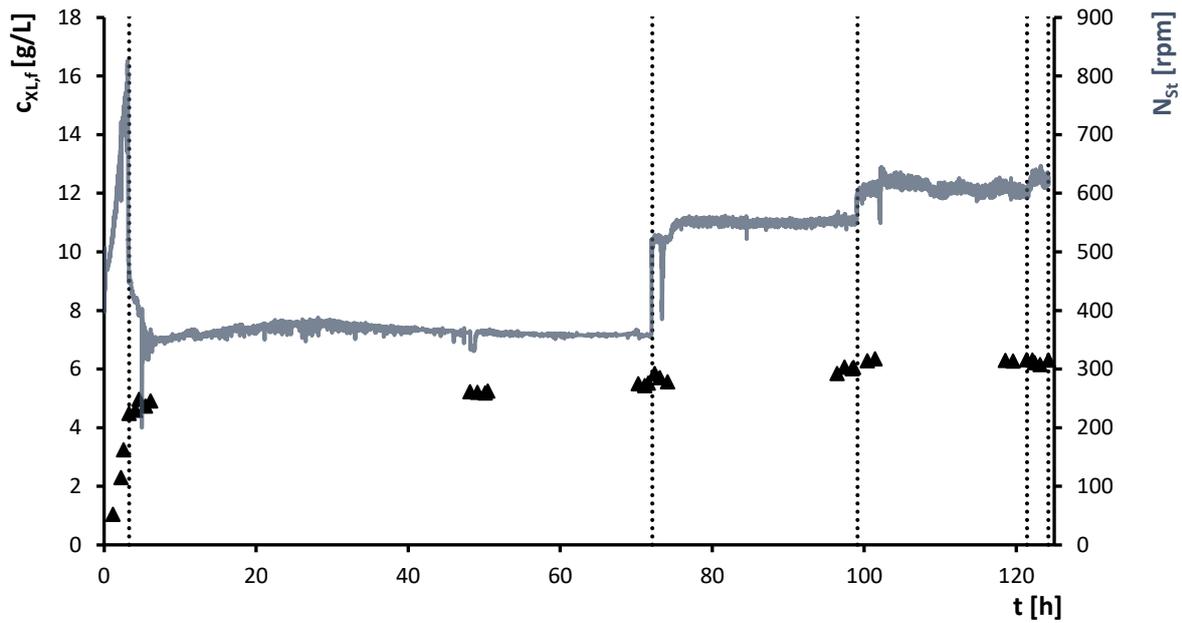


Abbildung 5.7: Korrigierte Zellkonzentration [g/L] und die Rührerdrehzahl in rpm gegen die Prozesszeit der Kultivierung K2 bis zur Störung ab 125 Stunden aufgetragen. Die einzelnen Phasen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

In Tabelle 5.5 sind neben den Mittelwerten der korrigierten Zellkonzentration  $\bar{c}_{XL,f}$ , die Mittelwerte von  $\bar{c}_{XL}$ , die aus der BTM-Bestimmung gemäß Kapitel 4.4.2 *Biotrockenmassebestimmung* gewonnen wurden, für die jeweiligen Phasen beider Prozesse aufgetragen. Trotz des identischen Korrekturfaktors  $f_{X/OD}$  liegen die korrigierten Zellkonzentrationen in der Kultivierung K2 deutlich über den in Phasen mit gleicher Verdünnungsrate in K1. Die Werte von  $\bar{c}_{XL,f}$  liegen für K1 Mittel bei 5,3 g/L, für K2 bei 6,0 g/L.

Tabelle 5.5: Mittelwerte der Zellkonzentration in g/L und der korrigierten der Kultivierungen K1 und K2 für die einzelne Prozessphasen mit den jeweiligen Verdünnungsraten in  $h^{-1}$ .

| Phase K1 | D<br>[ $h^{-1}$ ] | $\bar{c}_{XL}$<br>[g/L] | $\bar{c}_{XL,f}$<br>[g/L] |
|----------|-------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1        | -                 | -                       | -                         |
| 2        | 0,10              | 8,55                    | 5,30                      |
| 3        | 0,20              | 10,65                   | 5,62                      |

| <b>Phase K1</b> | <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b><math>\bar{c}_{XL}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>\bar{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> |
|-----------------|-------------------------------------|--|--|
| 4               | 0,050                               | 9,95   | 5,03   |
| 5               | 0,30                                | 8,53   | 5,29   |
| 6               | 0,075                               | 9,15   | 5,42   |
| 7               | 0,30                                | 9,03   | 5,33   |
| 8               | 0,025                               | 11,6   | 4,78   |
| 9               | 0,075                               | 13,28  | 5,30   |
| 10              | 0,30                                | 11,88  | 5,56   |
| 11              | 0,025                               | 10,25  | 5,32   |
| 12              | 0,20                                | -  | -  |
| 13              | 0,30                                | -  | -  |
| 14              | 0,10                                | 6,61   | 5,31   |
| 15              | 0,30                                | 7,62   | 5,33   |
| <b>Phase K2</b> | <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b><math>\bar{c}_{XL}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>\bar{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> |
| 1               | -                                   | -  | -  |
| 2               | 0,025                               | 9,07   | 5,49   |
| 3               | 0,075                               | 8,43   | 5,99   |
| 4               | 0,10                                | 7,40   | 6,30   |
| 5               | 0,10                                | 7,35   | 6,25   |

Die korrigierten Werte sind ebenfalls als fehlerbehaftet anzunehmen. So ist es problematisch, einen Umrechnungsfaktor, der aus einer Batch-Phase mit 10 g/L Substratkonzentration generiert wurde, auf eine kontinuierliche Kultivierung mit 20 g/L Substratkonzentration

zu übertragen. Des Weiteren wurde in einer Studie von Benjamin Volkmer und Matthias Heinemann festgestellt, dass unter bestimmten Kultivierungsbedingungen bei unterschiedlichen Wachstumsraten der Zellen die  $OD_{600}$  konstant bleibt, obwohl sich die Zellkonzentration ändert [19]. Dennoch werden für die weitere Auswertung die korrigierten Zellkonzentration  $c_{XL,f}$  verwendet. Die so erhaltenen Werte weisen weniger starke Schwankungen zwischen und innerhalb der einzelnen Phasen auf. Da die Einstellung eines Fließgleichgewichtes für alle weiteren Betrachtungen der kontinuierlichen Kultur grundlegend ist, werden die Werte verwendet, die dieser Voraussetzung näherkommen. Die Zellkonzentration  $c_{XL,f}$  liegt in allen Phasen deutlich unter der von  $c_{XL}$ . Ohne andere Referenzen kann nicht beurteilt werden, welcher Variante der Zellkonzentration der Realität näherkommt. In einer kontinuierlichen Kultivierung mit *E. coli* W3110 mit 10 g/L Glucose im definierten Zufüttermedium stellte sich bei einem  $D$  von  $0,20 \text{ h}^{-1}$  eine Zellkonzentration von 3,5 g/L ein [20]. Eine Zellkonzentration von bis zu 13 g/L wie sie für K1 in Phase 9 (Tab. 5.3) bestimmt wurde, scheint hinsichtlich dieser Tatsache nicht realistisch. Die Zellkonzentrationen in der zweiten Kultivierung fallen nach Anwendung des Umrechnungsfaktors höher aus als in vergleichbaren Phasen von K1.

Da fortan bei der Betrachtung der Zell- und Substratkonzentration der kontinuierlichen Kultivierungen von einem Gleichgewichtszustand ausgegangen wird, werden die Formelzeichen  $\tilde{c}_{XL}$  und  $\tilde{c}_{SL}$  verwendet.

Für folgende kontinuierliche Kultivierungen wäre es ratsam, eine andere Methode für die Bestimmung der Zellkonzentration zu verwenden. Eine leicht umzusetzende Methode wäre das regelmäßige Ausplattieren von Proben auf Agar-Platten. Anhand der KBE auf den Platten kann die Zellkonzentration im Bioreaktor ausgerechnet werden. Im Rahmen dieser Kultivierung wurden einige Proben ausplattiert. Die geringe Anzahl an Proben ist allerdings nicht ausreichend, um auf den Verlauf der Zellkonzentration zurückzuschließen. Auch ist eine Bestimmung anhand der  $OD_{600}$  mit einem experimentell belegten Umrechnungsfaktor denkbar [20].

## 5.2 Untersuchung der Verdünnungsraten

Während der zwei Kultivierungen wurden verschiedene Verdünnungsraten eingestellt und untersucht. Es sollte die Einstellung des Fließgleichgewichtes überprüft werden und ob die Zellkonzentration bei den verschiedenen spezifischen Wachstumsraten dem theoretischen Verlauf folgt. Zudem sollte geklärt werden, ob die Zellen auch nach langer Prozessführung bei identischer Verdünnungsrate wieder den gleichen Gleichgewichtszustand erreichen. In der ersten Kultivierung konnten sechs verschiedene Verdünnungsraten untersucht werden. In der zweiten Kultivierung sollten die einzelnen Phasen genauer untersucht werden und mindestens bis zu einem Volumenaustausch des Bioreaktors unverändert bleiben. Da es am sechsten Tag zu einer Störung im Prozess kam, war es nicht möglich weitere Verdünnungsraten zu untersuchen. Entsprechend konnten in der zweiten Kultivierung nur drei Verdünnungsraten realisiert werden.

Als erstes soll überprüft werden, ob die Verdünnungsraten mit den eingestellten Pumpraten erzielt wurden. Hierfür werden die tatsächlichen Pumpraten anhand der Waagensignale ermittelt. Aus der Änderung der Waagensignale mit der Zeit wird ein Volumenstrom berechnet und mit den so erhaltenen Pumpraten die realen Verdünnungsraten bestimmt (Tab. 5.6).

**Tabelle 5.6: Pumpraten aus den Kalibrierdaten für die Einstellung einer bestimmten Verdünnungsrate berechnet und der dafür eingestellte Setpoint in %. Die tatsächlichen Pumpraten anhand der Waagensignale und daraus bestimmter Volumenströme berechnet und die daraus resultierenden tatsächlichen Verdünnungsraten.**

| <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b>Pumprate</b><br><b>[L/h]</b><br>aus Kalibrierung | <b>Setpoint</b><br><b>[%]</b> | <b>Pumprate</b><br><b>[L/h]</b><br>aus Messdaten | <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b><br>aus Messdaten |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|--|--|
| 0,025                               | 0,037   | 8,1                           | 0,034  | 0,023  |
| 0,050                               | 0,075   | 16,3                          | 0,086  | 0,057  |
| 0,075                               | 0,112   | 24,4                          | 0,105  | 0,070  |
| 0,10                                | 0,150   | 32,5                          | 0,173  | 0,115  |

| <b>D</b><br>[h <sup>-1</sup> ] | <b>Pumprate</b><br>[L/h]<br>aus Kalibrierung | <b>Setpoint</b><br>[%] | <b>Pumprate</b><br>[L/h]<br>aus Messdaten | <b>D</b><br>[h <sup>-1</sup> ]<br>aus Messdaten |
|--------------------------------|--|------------------------|---|---|
| 0,20                           | 0,299  | 65,0                   | 0,263                                     | 0,175   |
| 0,30                           | 0,449  | 97,5                   | 0,399                                     | 0,266   |

Es kommt zu Abweichungen zwischen den angenommenen Pumpraten, beziehungsweise den daraus resultierenden Verdünnungsraten und den tatsächlichen. Je höher die eingestellte Pumprate, desto größer die Abweichung.

Die Kalibrierung wird mit 20 g/L Glucoselösung durchgeführt, das Medium hat eine etwas anderer Zusammensetzung. Dies könnte ein Grund für die Abweichungen sein. Ebenso nutzen sich die Schläuche im Laufe der Kultivierung ab. Dies hat ebenfalls einen Effekt auf das Volumen, dass durch diese gefördert wird. Da Mittelwerte für die jeweiligen Verdünnungsraten gebildet wurden, wirkt sich dieser Effekt auf die einzelnen Phasen der Kultivierungen unterschiedlich aus. Eine weitere Fehlerquelle ist, dass die Dichte des Mediums für die Berechnung mit 1 g/cm<sup>3</sup> angenommen wurde, der tatsächliche Wert wird von dieser Annahme abweichen. Aufgrund dieser Effekte und da die Abweichungen besonders bei den niedrigen Pumpraten gering sind, ist die Abweichung zwischen der Verdünnungsraten auf Grundlage der Pumpenkalibrierung und der auf Grundlage der Messdaten akzeptabel und werden im Folgenden vernachlässigen.

Abbildung 5.8 zeigt den theoretischen Verlauf der Zellkonzentration mit Erhaltungsstoffwechsel und ohne bei einer Glucosekonzentration von 20 g/L im Zufüttermedium und dem theoretischen Glucoseausbeutekoeffizient von 0,45 g/g für *E. coli*. Dazu sind die Mittelwerte der Zellkonzentration zu den eingestellten Verdünnungsraten für beide Kultivierungen aufgetragen.

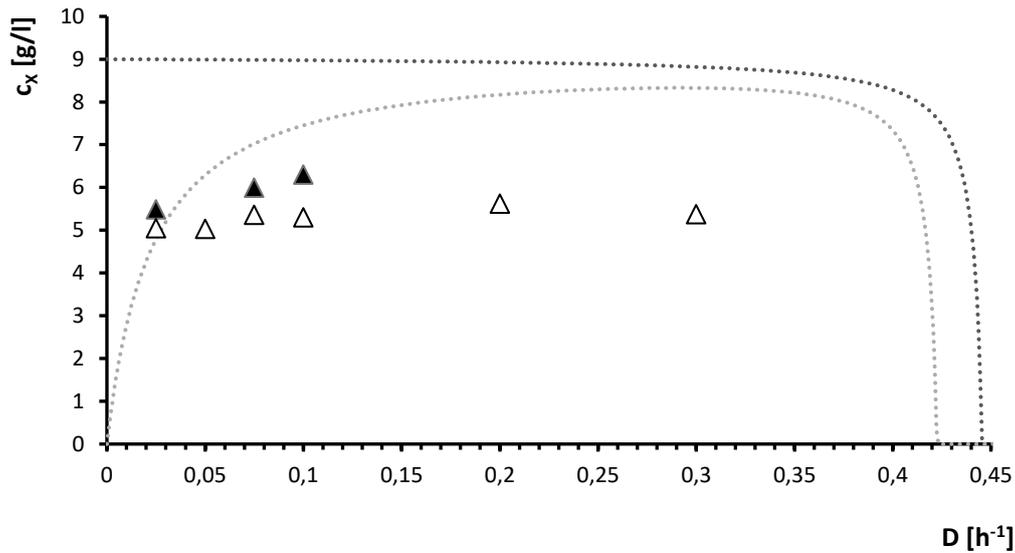


Abbildung 5.8: Durchschnittliche BTM in g/L für verschiedene Verdünnungsraten. K1: weiße Dreiecke mit schwarzem Rand, K2: schwarze Dreiecke. Gestrichelte Linien: theoretische BTM für verschiedene  $D$  (dunkel), theoretische BTM für verschiedene  $D$  mit Erhaltungsstoffwechsel (hell). Erhaltungsstoffwechsel mit  $y_{X/S,gr} = 0,45$  g/g,  $q_{S/X,m} = 0,05$   $h^{-1}$ .

Die Zellkonzentration ist fast um die Hälfte niedriger als die theoretischen Werte. Dies kann auf die korrigierten Werte von  $c_{XL,f}$  zurückzuführen sein. Alternativ wäre es möglich, dass der Ausbeutekoeffizient von *E. coli* für Glucose in einer kontinuierlichen Kultivierung unter dem theoretischen Wert liegt. Dies wird im Abschnitt 5.3.2 *Bestimmung des Substratausbeutekoeffizient* näher diskutiert.

Der Verlauf der durchschnittlichen  $\tilde{c}_{XL,f}$  für die verschiedenen Wachstumsraten entspricht dem theoretischen Verlauf unter der Annahme eines Erhaltungsstoffwechsels der Zellen. Dies ist zu erwarten, da dieser Ansatz näher an der Realität liegt. Die Zellen können nicht das gesamte Substrat für Zellwachstum verwenden. Die Werte von  $\tilde{c}_{XL,f}$  für die Verdünnungsraten 0,025 und 0,075  $h^{-1}$  fallen durch zu hohe Werte etwas aus der Kurve heraus (Abb. 5.8, Tabelle 5.7). Betrachtet man den Verlauf von  $\tilde{c}_{XL,f}$  für K2 ist ein deutlicher Anstieg zwischen den Verdünnungsraten 0,025 - 0,10  $h^{-1}$  zu erkennen.

**Tabelle 5.7: Korrigierte Gleichgewichtszellkonzentrationen der beiden Kultivierungen für die untersuchten Verdünnungsraten.**

|                                     | <b>K1</b>  | <b>K2</b>  |
|-------------------------------------|--|--|
| <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b><math>\tilde{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>\tilde{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> |
| 0,025                               | 5,05   | 5,49   |
| 0,050                               | 5,03   | /  |
| 0,075                               | 5,36   | 5,99   |
| 0,10                                | 5,31   | 6,30   |
| 0,20                                | 5,62   | /  |
| 0,30                                | 5,38   | /  |

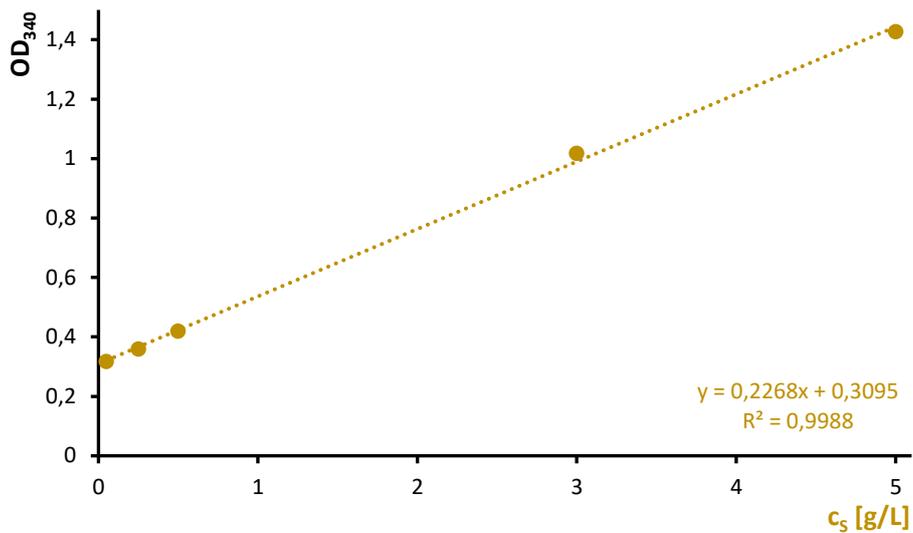
Die Frage, ob sich Gleichgewichtszustände auch nach langer Prozesszeit bei identischer Verdünnungsrate wieder einstellen, kann aufgrund der Datenlage nicht beurteilt werden. Dies wird Anhand der Daten aus der Abgasanalytik näher untersucht (*5.7 Diskussion der Ergebnisse zur Charakterisierung*).

### 5.3 Untersuchung der Glucosekonzentration

Mit der Überprüfung der Glucosekonzentration während der kontinuierlichen Kultivierung kann untersucht werden, ob die Zellen sich der Theorie entsprechend verhalten, ebenso kann anhand der Glucosekonzentration die Fließgleichgewichtseinstellung überprüft werden. Zudem sind die Ergebnisse für die Bestimmung einiger Prozessparameter, wie zum Beispiel der Maintenance-Verbrauch der Zellen und der maximalen spezifischen Wachstumsrate nötig. Es wird die Konzentration der Glucose in Proben der Batch-Phasen untersucht und ein bestimmter Verlauf der Glucosekonzentration erwartet. Auf dieser Grundlage kann die Methodik überprüft werden. Anschließend wird die Glucosekonzentration für bestimmte Proben der kontinuierlichen Kultivierungen gemessen. Die Analyse wird mit zwei Methoden durchgeführt (4.4.4 *Glucoseanalyse*), die in diesem Kapitel verglichen werden.

Die Glucosekonzentration  $\tilde{c}_{sL}$  in einer kontinuierlichen Kultivierung wird nahe null angenommen und liegt damit unterhalb oder nahe der Nachweisgrenze der eingesetzten Methoden. Die Zellen verstoffwechseln den größten Teil der Glucose, der ihnen zur Verfügung gestellt wird. In der Nähe des Auswaschpunktes steigt die Glucosekonzentration an, bis sie am Auswaschpunkt die Konzentration des Zufüttermediums erreicht (Abb. 3.5). Dies wird in den folgenden Kapiteln untersucht. Die Glucoseanalytik wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, einem Enzym-Kit und einer HPLC-Methode. So soll festgestellt werden, welche Methodik für welche Anwendung geeignet ist.

Die Glucosekonzentrationsbestimmung der Proben aus den Batch-Phasen wird mit dem Glucose-Kit Gluc-DH FS durchgeführt, zum Vergleich werden je zwei Proben auch mit der HPLC analysiert. Die Messungen mit dem Enzym-Kit wird hauptsächlich mit Proben aus dieser Prozessphase durchgeführt, da hier der theoretische Verlauf der Glucosekonzentration bekannt ist. Es werden aber auch zum weiteren Methodenvergleich Proben aus den kontinuierlichen Kultivierungen vermessen, bei denen mit der HPLC eine Glucosekonzentration festgestellt wurde. Für die Berechnungen der Glucosekonzentration in den Proben mittels des Glucose-Kits wird eine Kalibrierung durchgeführt (Abb. 5.9). Die mit Formel (4.3) berechneten Konzentrationen sind in Abbildung 5.10 für die Batch-Phasen gegen die Zellkonzentrationen aufgetragen.



**Abbildung 5.9:** Kalibriergerade des Glucose-Kits Glucose Gluc-DH FS\* mit Standards 0,05, 1 und 3 und 5 g/L Glucose. Absorption gemessen nach 10 Minuten Inkubation bei 340 nm.

Die für die beiden Batch-Phasen mit den Analysemethoden bestimmten Werte sind in Tabelle 5.8 aufgeführt. Zum ersten Vergleich der Methoden sind auch die Werte der vier Proben, die zusätzlich mit der HPLC vermessen wurden, aufgetragen. Zudem sind die in Kap. 5.1.3 *Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Zellkonzentration* bestimmten Zellkonzentrationen aufgeführt. In Abbildung 5.10 sind die Verläufe der Zell- sowie Substratkonzentration für die Batch-Phasen aufgetragen. Während die Zellkonzentration entsprechend Formel (3.13) exponentiell ansteigt, da die Zellen bei Substratüberschuss mit  $\mu_{\max}$  wachsen, nimmt die Substratkonzentration parallel erst langsam und zum Ende der Batch-Phase immer schneller ab.

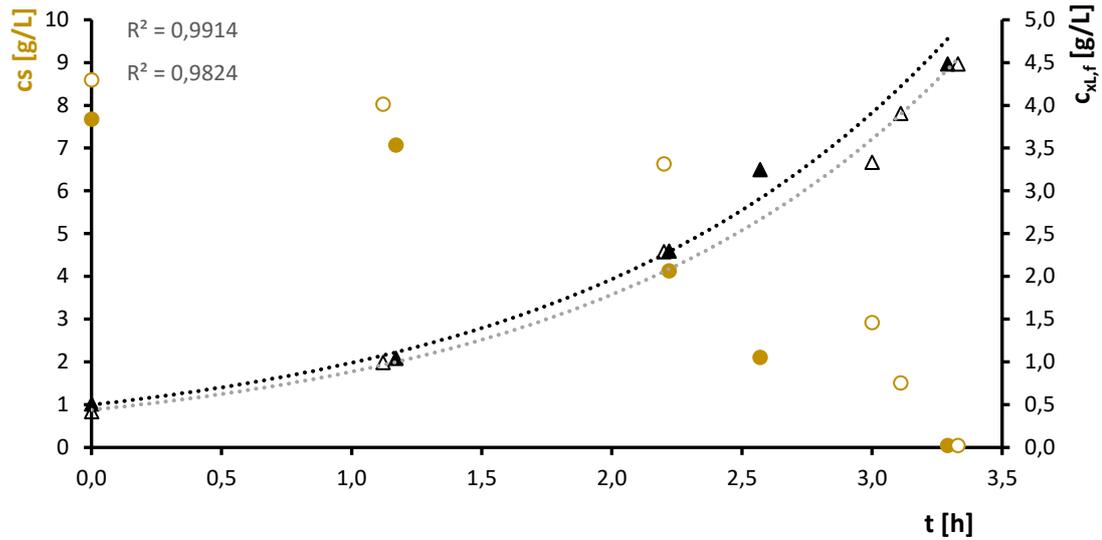


Abbildung 5.10: Verlauf der Zellkonzentration in den Batch-Phasen der Kultivierungen, K1: weiße Dreiecke, schwarz umrandet, K2: schwarze Dreiecke, und der Glucosekonzentration, K1: weiße Kreise, golden umrandet, K2: goldene Kreise

Tabelle 5.8: Zellkonzentrationen und mit dem Glucose-Kit Glucose Gluc-DH FS\* und der HPLC bestimmte Substratkonzentrationen aus den Batch-Phasen der Kultivierungen K1 und K2, in Abbildung 5.10 aufgetragen.

| K1                              |                              |                               |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| $c_{XL,f}$<br>[g/L]<br>bestimmt | $c_{SL}$<br>[g/L]<br>aus Kit | $c_{SL}$<br>[g/L]<br>aus HPLC |
| 0,42                            | 8,59                         | /                             |
| 0,99                            | 8,03                         | /                             |
| 2,29                            | 6,63                         | 5,50                          |
| 3,33                            | 2,92                         | /                             |
| 3,91                            | 1,51                         | 1,23                          |
| 4,48                            | 0,05                         | /                             |

| <b>K2</b>                                      |   |  |
|--|---|--|
| <b>C<sub>xL,f</sub><br/>[g/L]<br/>bestimmt</b> | <b>C<sub>sL</sub><br/>[g/L]<br/>aus Kit</b> | <b>C<sub>sL</sub><br/>[g/L]<br/>aus HPLC</b> |
| 0,51   | 7,67  | /  |
| 1,04   | 7,07  | /  |
| 2,30   | 4,13  | 4,67   |
| 3,25   | 2,11  | /  |
| 4,48   | 0,05  | 0,27   |

Die Ergebnisse, die mit der HPLC erzielt wurden, weichen von denen der enzymatischen Bestimmung ab (Tab. 5.8). Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die Messung mit der HPLC weniger fehleranfällig ist. Nach der Probenvorbereitung läuft alles automatisch ab. Bei dem Enzym-Kit muss neben der Probenvorbereitung bei der Messung auf die genaue Einhaltung der Zeit geachtet werden, weitere Effekte, wie Raum-, Proben- und Kitlösungstemperatur spielen ebenfalls eine Rolle und stellen mögliche Fehlerquellen dar. Die Messung mit dem Kit kann dennoch als plausibel eingestuft werden. Der erwartete Verlauf der Glucosekonzentration in der Batch-Phase konnte mit den Kit-Messungen bestätigt werden. Die Abweichungen zwischen HPLC- und Kit-Messungen variieren (0,22 g/L bis 1,13 g/L), aber die Werte liegen in ähnlichen Bereichen. Tabelle 5.9 und 5.10 zeigen die mit der HPLC gemessenen Werte der verwendeten Proben der Kultivierung K1 und K2. Es wurde jeweils die zweite Probe nach Umstellung der Verdünnungsrate und die letzte Probe vor einer erneuten Umstellung untersucht. Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der Methoden wurden einige Proben nach der Messung mit der HPLC ebenfalls mit dem Kit gemessen.

**Tabelle 5.9: Glucosekonzentration der Kultivierung K1 mit der HPLC und dem Glucose-Kit Glucose Gluc-DH FS\* (Kit) gemessen. Werte für Beginn und Ende sowie das eingestellte D der Prozessphasen aufgetragen.**

|       |                         | HPLC                            |                               |  | Kit                             |                               |
|-------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | Beginn<br>c <sub>SL</sub> [g/L] | Ende<br>c <sub>SL</sub> [g/L] |  | Beginn<br>c <sub>SL</sub> [g/L] | Ende<br>c <sub>SL</sub> [g/L] |
| 2     | 0,10                    | 0                               | 0                             |  | /                               | /                             |
| 3     | 0,20                    | 0                               | 0                             |  | /                               | /                             |
| 4     | 0,050                   | 0                               | 0                             |  | /                               | /                             |
| 5     | 0,30                    | 1,7                             | 4,47                          |  | 2,40                            | 4,54                          |
| 6     | 0,075                   | 3,58                            | 0                             |  | /                               | /                             |
| 7     | 0,30                    | 1,38                            | 1,96                          |  | 1,48                            | 1,92                          |
| 9     | 0,025                   | 0                               | 0                             |  | /                               | /                             |
| 10    | 0,30                    | 0                               | 1,26                          |  | /                               | /                             |
| 11    | 0,025                   | 0                               | 5,22                          |  | /                               | /                             |
| 14    | 0,10                    | 0                               | 0,62                          |  | 5,67                            | /                             |
| 15    | 0,30                    | 1                               | 1                             |  | /                               | 1,06                          |

Phase 12 und 13 von K1 wurde bei den Messungen aufgrund der bereits angeführten Störung (5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2) auch hier nicht berücksichtigt. Phase 8 wurde bei der Probenauswahl übersehen. Auffällig ist der Wert zu Beginn der Phase 14 der mit dem Kit gemessen wurde. Hier muss bei einer der Proben ein Pipettierfehler vorliegen. Aufgrund der vorangegangenen Störung ist hier eine erhöhte Glucosekonzentration zu erwarten, da die Zellen durch die Störung in Stress geraten. Der Messwert mit dem Kit scheint somit plausibler. Es ist zum Ende jeder Phase mit einer Verdünnungsrate von 0,30 h<sup>-1</sup> mit beiden Methoden eine Glucosekonzentration im Medium nachweisbar. Je länger die Phase andauert, desto höher steigt die messbare Glucosekonzentration. Der Wert zum Ende der

Phase 11 liegt mit 5,22 g/L Glucose sehr hoch. Es ist möglich, dass die Probe beim Einräumen in den Samplettable der HPLC mit der folgenden vertauscht wurde.

Tabelle 5.10 zeigt die gemessenen Glucosekonzentration von Proben der zweiten Kultivierung. Ab Phase 6 befindet sich K2 im Störungszustand, der einen Volumenverlust zu Folge hatte (5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2). In einem Versuch das Volumen wieder auf 1,5 L aufzufüllen, wurden 500 mL Feedmedium mit 20 g/L Glucose in den Bioreaktor gegeben. Aus diesem Grund ist die Glucosekonzentration zu Beginn von Phase 6 erhöht. Im weiteren Verlauf des Prozesses ist trotz der Störung keine Glucose nachweisbar.

**Tabelle 5.10: Glucosekonzentration der Kultivierung K2 mit der HPLC und dem Glucose-Kit Glucose Gluc-DH FS\* (Kit) gemessen. Werte für Beginn und Ende, sowie das eingestellte D der Prozessphasen aufgetragen. Ab Phase 6 wurden die Proben auch innerhalb der Phasen genommen, daher erfolgt hier keine Auftrennung in Beginn und Ende der Phase.**

|       |                      | HPLC                        |                           | Kit                         |                           |
|-------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Phase | D [h <sup>-1</sup> ] | Beginn c <sub>s</sub> [g/L] | Ende c <sub>s</sub> [g/L] | Beginn c <sub>s</sub> [g/L] | Ende c <sub>s</sub> [g/L] |
| 2     | 0,025                | 0                           | 0                         | 0,0                         | /                         |
| 3     | 0,075                | 0                           | 0                         | /                           | /                         |
| 4     | 0,10                 | 0                           | 0                         | /                           | /                         |
| 5     | 0,10                 | 0                           | 0                         | /                           | 0,11                      |
| 6     | 0,10                 | 4,37                        |                           | 4,64                        |                           |
| 6     | 0,10                 | 1,57                        |                           | 1,32                        |                           |
| 6     | 0,10                 | 0                           |                           | 0,40                        |                           |
| 6     | 0,10                 | 0                           |                           | /                           |                           |
| 7     | 0,10                 | 0                           |                           | 0,0                         |                           |
| 7     | 0,10                 | 0                           |                           | 0,0                         |                           |
| 7     | 0,10                 | 0                           |                           | /                           |                           |

|       |                         | HPLC                           |                              | Kit                            |
|-------|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | Beginn<br>c <sub>s</sub> [g/L] | Ende<br>c <sub>s</sub> [g/L] | Beginn<br>c <sub>s</sub> [g/L] |
| 7     | 0,10                    | 0                              |                              | /                              |
| 8     | 0,10                    | 0                              |                              | 0,0                            |
| 8     | 0,025                   | 0                              |                              | /                              |
| 8     | 0,025                   | 0                              |                              | 0,0                            |
| 8     | 0,025                   | 0                              |                              | 0,11                           |

Die Abweichungen zwischen den Methoden sind ähnlich wie bei der Untersuchung der Batch-Phase. Die Konzentrationen liegen entsprechend der Erwartung bei vielen Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Laut Hersteller liegt die Nachweisgrenze des Kits bei 0,04 g/L. Die Konzentration des niedrigsten Kalibrierstandards der HPLC liegt bei 0,5 g/L. In den Chromatogrammen der Proben mit einer Glucosekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze, ist kein Peak bei der Retentionszeit von Glucose von 5,2 Minuten sichtbar (Abb. 5.11). Dies gilt für alle Proben, bei denen die HPLC-Messung ein c<sub>sL</sub> von null ergibt. Das Kit liefert bei Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze ungenaue Ergebnisse, die HPLC-Methode kann hingegen auch mit Standards von 0,0 g/L Glucose durchgeführt werden und liefert so auch für geringe Konzentrationen genaue Werte [7].

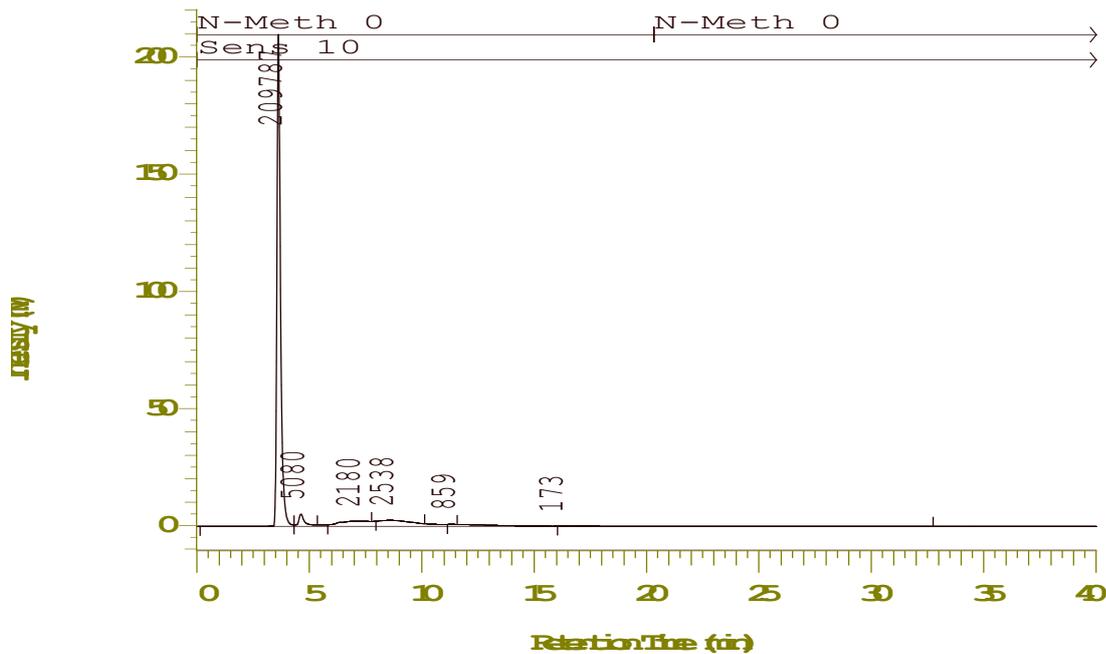


Abbildung 5.11: Chromatogramm der Glucosemessung der ersten Probe der Phase 8. Retentionszeit Glucose: 5,2 min.

Besonders, wenn nur eine geringe Anzahl von Proben vermessen werden soll, ist die Messung mit dem Glucose-Kit vorzuziehen. Die Vorbereitung der HPLC nimmt einige Zeit in Anspruch, die Probenvorbereitung ist aufwendiger und eine Messung dauert 40 statt 10 Minuten. Allerdings läuft die Messung automatisch ab, sodass die Zeit für andere Dinge genutzt werden kann. Für eine große Menge an Proben mit möglicherweise niedrigen Konzentrationen ist die Nutzung der HPLC zu empfehlen.

### 5.3.2 Bestimmung des Substratausbeutekoeffizienten

Es sollen die Substratausbeutekoeffizienten  $y_{X/S}$  der Batch-Phase und für die kontinuierlichen Kultivierungen bestimmt werden, um diese miteinander zu vergleichen. In einer Batch-Kultivierung können die Zellen bei Substratüberschuss und optimalen Prozessbedingungen ihren maximalen Ausbeutekoeffizienten erreichen. Dieser beobachtbare maximale Ausbeutekoeffizient der durchgeführten Kultivierungen, soll mit den Daten der Batch-Phasen bestimmt werden. Ebenso werden die Ausbeutekoeffizienten der eingestellten Verdünnungsraten für die kontinuierliche Kultivierung ermittelt, um den Maintenance-Anteil der Zellen

zu bestimmen. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben für den Ausbeutekoeffizienten von *E. coli* auf Glucose. Allgemein wird ein durchschnittlicher Ausbeutekoeffizient von 0,5 g/g angenommen [21]. Der Ausbeutekoeffizient soll in den Batch-Phasen und den kontinuierlichen Kultivierungen ähnliche Wert annehmen.

Für die Batch-Phase wird der Ausbeutekoeffizient mit Formel (3.3) berechnet. Für  $c_{SL,0}$  werden für K1 10 g/L, für K2 9,44 g/L verwendet. Bei der Komplettierung des Mediums für K2 lief ein Teil der Glucose an der Schlaucholive des Deckels vom Bioreaktor aus. Es wurde eine Probe des nicht beimpfen Mediums genommen und die Glucosekonzentration gemessen. Die erhaltenen Ausbeutekoeffizienten sind:  $y_{X/S,K1} = 0,41 \text{ g/g}$  ,  $y_{X/S,K2} = 0,42 \text{ g/g}$ . Diese liegen etwas unterhalb des Literaturwertes. Da es sich bei dem Literaturwert um einen Mittelwert handelt, ist mit einer Abweichung zu rechnen. Tabelle 5.11 zeigt die anhand der vorhandenen Daten beobachtbaren Ausbeutekoeffizienten für die eingestellten Verdünnungsraten von K1 und K2. Diese wurde mit einer Abwandlung der Formel (3.3) berechnet.

$$y_{X/S} = \frac{\tilde{c}_{XL}}{c_{S,R} - \tilde{c}_{SL}} \quad (5.1)$$

**Tabelle 5. 11: Ausbeutekoeffizienten für verschieden Verdünnungsraten mit den jeweiligen  $\tilde{c}_{XL,f}$  und  $\tilde{c}_{SL}$**

| <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b><math>\tilde{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>\tilde{c}_{SL}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>y_{X/S}</math></b><br><b>[g/g]</b> |
|-------------------------------------|--|--|---|
| 0,025                               | 5,05   | 0  | 0,25  |
| 0,050                               | 5,03   | 0  | 0,25  |
| 0,075                               | 5,36   | 0  | 0,27  |
| 0,10                                | 5,31   | 0  | 0,27  |
| 0,20                                | 5,62   | 0  | 0,28  |
| 0,30                                | 5,38   | 4,47   | 0,35  |

| <b>D</b><br><b>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b><math>\tilde{c}_{XL,f}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>\tilde{c}_{SL}</math></b><br><b>[g/L]</b> | <b><math>y_{X/S}</math></b><br><b>[g/g]</b> |
|-------------------------------------|--|--|---|
| 0,025                               | 5,49   | 0  | 0,27  |
| 0,075                               | 5,99   | 0  | 0,30  |
| 0,10                                | 6,30   | 0  | 0,31  |

Auf Grundlage der Bestimmung der Glucosekonzentration wird für  $\tilde{c}_{SL}$  für alle D null angenommen. Nur für  $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$  wird eine Glucosekonzentration von 4,47 g/L festgelegt. Dies entspricht dem Wert, der am Ende der längsten Phase mit dieser Verdünnungsrate gemessen wurde. Die Ausbeutekoeffizienten fallen für alle Phasen der kontinuierlichen Kultur im Vergleich mit dem Literaturwert niedrig aus. Eine mögliche Ursache ist die korrigierte Zellkonzentration, die durch die Korrektur in der kontinuierlichen Phase ebenfalls niedrig ausfällt. Ein weiterer Aspekt ist, dass insbesondere bei den niedrigen Verdünnungsraten der Maintenance-Anteil stark ins Gewicht fällt. Die Zellen können nur einen geringen Anteil der zur Verfügung gestellten Glucose für das Zellwachstum aufwenden. Der größere Anteil wird für den Stoffwechsel aufgewandt. Da dieser Anteil konstant ist, kann bei steigenden Verdünnungsraten eine steigende Menge Glucose für das Zellwachstum verwendet werden.

Für die Berechnung der Anteile des Maintenance-Substratverbrauchs kann auf Grundlage von (3.4) folgende Formel hergeleitet werden.

$$\frac{1}{y_{X/S}} = \frac{1}{y_{X/S,gr}} + q_{S/X,m} \frac{1}{\mu} \quad (5.2)$$

Es muss  $y_{X/S}$  für verschiedene  $\mu$  berechnet und  $y_{X/S}^{-1}$  gegen  $\mu^{-1}$  aufgetragen werden. Der Schnittpunkt der linearen Regression mit der y-Achse stellt den Anteil des Ausbeutekoeffizienten dar, der von den Zellen für das Wachstum verwendet wird,  $y_{X/S,gr}^{-1}$ . Die Steigung der Geraden den Maintenance-Anteil,  $q_{S/X,m}$ . Abbildung 5.12 zeigt die Auftragung von  $y_{X/S}^{-1}$  gegen

$\mu^{-1}$  für K1 und K2. Bei der Auftragung von K1 sind die Ausbeutekoeffizienten für die Verdünnungsraten 0,025 und 0,075 h<sup>-1</sup> nicht berücksichtigt.

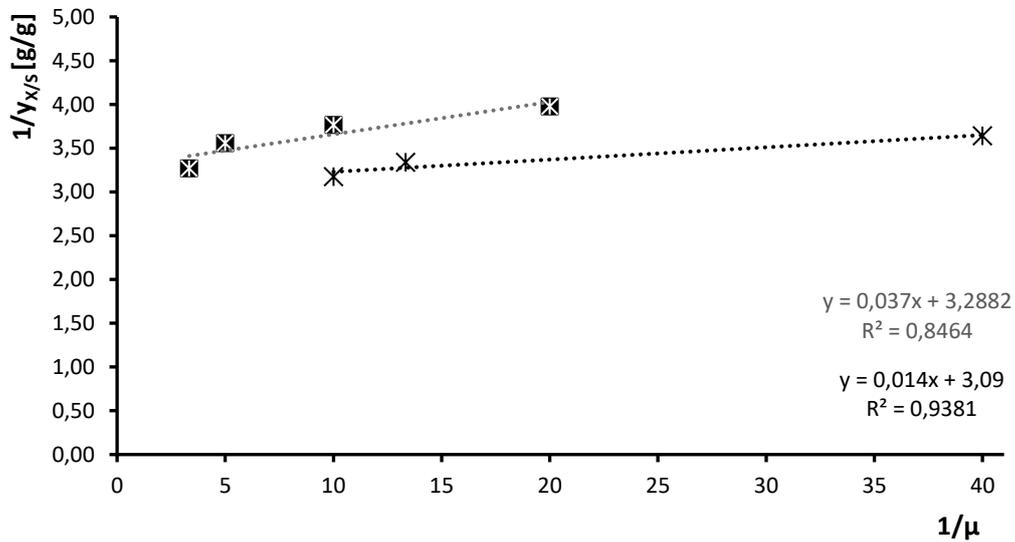


Abbildung 5.12: Auftragung von  $1/y_{X/S}$  gegen  $1/\mu$  für verschiedene  $\mu$  (=D) der beiden Kultivierungen. K1: weiße Kreuze auf schwarzem Grund, K2: schwarze Kreuze

Wie Abbildung 5.12 zu entnehmen ist, liegt  $y_{X/S,gr}$  für K1 bei 0,30 g/g und für K2 bei 0,32 g/g.  $q_{S/X,m}$  bei 0,037 h<sup>-1</sup> für K1 und bei 0,014 h<sup>-1</sup> für K2. Diese Werte sind gering, erwartet werden Wert wie  $y_{X/S,gr} = 0,42$  g/g und für  $q_{S/X,m} = 0,06$  h<sup>-1</sup> [7]. Die niedrigeren Werte lassen sich aber auf die geringen Zellkonzentrationen durch den Umrechnungsfaktor zurückführen.

Trägt man die zuvor bestimmten Gleichgewichtszellkonzentrationen gegen die eingestellten Verdünnungsraten auf, entspricht dies annähernd dem Verlauf der Kurve für den Maintenance-Verbrauch mit  $y_{X/S,gr} = 0,30$  g/g und  $q_{S/X,m} = 0,01$  h<sup>-1</sup> (Abb. 5.13).

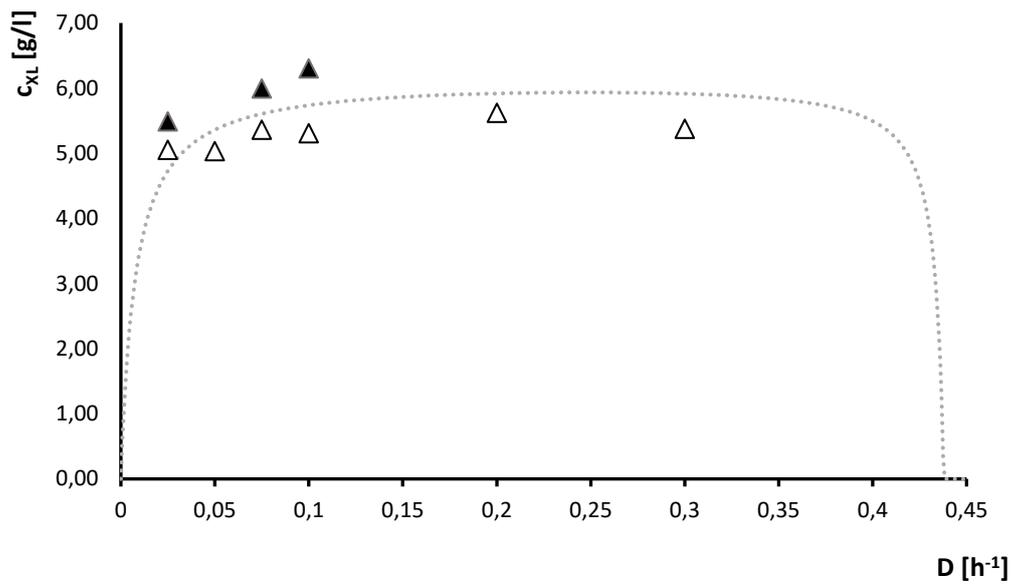


Abbildung 5.13: Auftragung der mittleren beider Prozesse Zellkonzentration für verschiedene Verdünnungsraten, K1: weiße Dreiecke, schwarzer Rand, K2: schwarze Dreiecke. Die Kurve stellt den theoretischen Verlauf der Zellkonzentration für verschiedene Verdünnungsraten bei einem  $\gamma_{x/s,gr}$  von 0,30 g/g und einem  $q_{s/x,m}$  von 0,01  $h^{-1}$  dar.

#### 5.4 Untersuchung der Acetatkonzentration

Die Untersuchung der Acetatanalyse ist ein weiterer Baustein für die Charakterisierung des Prozesses. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden im Folgenden dargestellt. Die Acetatanalyse wird ausschließlich mit der HPLC durchgeführt (4.4.5 Acetatanalyse). Die Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt bei 0,05 g/L.

*E. coli* produziert Acetat, wenn Glucose im Überschuss vorliegt, die Zellen gestresst sind, zum Beispiel durch Produktbildung, anaerobe Atmung betreiben oder es bei einem kritischen  $\mu$  zum sogenannten metabolic overflow kommt [22]. Es wird also während der aeroben, nicht induzierten kontinuierlichen Kultivierung keine Akkumulation von Acetat im flüssigen Reaktorvolumen erwartet. In den Phasen mit einem D von  $0,30 \text{ h}^{-1}$  kommt es jedoch zur Bildung von Acetat (Tab. 5.12, Tab. 5.13). Ebenso kommt es zum Ende von K1 nach der Induktion zu einer messbaren Anreicherung von Acetat im Medium. Dies kann auf die Anreicherung von Glucose in den Phasen 12 und 13 zurückzuführen sein. Bei K2 ist nach Induktion keine Acetatkonzentration messbar.

**Tabelle 5.12: Acetatmessung zu Beginn und zum Ende der Phasen von K1. Die Verdünnungsraten der Phasen sind aufgeführt. Phasen, in denen induziert wurde, sind kenntlich gemacht. Phase 1 (Batch-Phase), 8, 12 und 13 (Störung) sind nicht aufgeführt.**

| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | Beginn<br>C <sub>AL</sub><br>[g/L] | Ende<br>C <sub>AL</sub><br>[g/L] | Induktion |
|-------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| 2     | 0,10                    | 0                                  | 0                                |           |
| 3     | 0,20                    | 0                                  | 0                                |           |
| 4     | 0,050                   | 0                                  | 0                                |           |
| 5     | 0,30                    | 1,7                                | 0,49                             |           |
| 6     | 0,075                   | 0,52                               | 0                                |           |
| 7     | 0,30                    | 0                                  | 0,25                             |           |
| 9     | 0,025                   | 0                                  | 0                                |           |

| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | Beginn<br>c <sub>AL</sub><br>[g/L] | Ende<br>c <sub>AL</sub><br>[g/L] | Induktion |
|-------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| 10    | 0,30                    | 0                                  | 0,36                             |           |
| 11    | 0,025                   | 0                                  | 0,32                             |           |
| 14    | 0,10                    | 0                                  | 0,13                             | <b>X</b>  |
| 15    | 0,30                    | 0,39                               | 0,37                             | <b>X</b>  |

Tabelle 5.13: Acetatmessung zu Beginn und zum Ende der Phasen von K2. Die Verdünnungsraten der Phasen sind aufgeführt. Phasen, in denen induziert wurde, sind kenntlich gemacht. Phase 1 (Batch-Phase) ist nicht aufgeführt. Ab Phase 6 wurden die Proben auch innerhalb der Phasen genommen, daher erfolgt hier keine Auftrennung in Beginn und Ende der Phase.

| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | Beginn<br>c <sub>AL</sub><br>[g/L] | Ende<br>c <sub>AL</sub><br>[g/L] | Induktion |
|-------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| 2     | 0,025                   | 0                                  | 0                                |           |
| 3     | 0,075                   | 0                                  | 0                                |           |
| 4     | 0,10                    | 0                                  | 0                                |           |
| 5     | 0,10                    | 0                                  | 0                                | <b>X</b>  |
| 6     | 0,10                    | 0,24                               |                                  |           |
| 6     | 0,10                    | 0,35                               |                                  |           |
| 6     | 0,10                    | 0                                  |                                  |           |
| 6     | 0,10                    | 0                                  |                                  |           |
| 7     | 0,10                    | 0                                  |                                  | <b>X</b>  |
| 7     | 0,10                    | 0                                  |                                  | <b>X</b>  |
| 7     | 0,10                    | 0,14                               |                                  | <b>X</b>  |
| 7     | 0,10                    | 0                                  |                                  | <b>X</b>  |

| <b>Phase</b> | <b>D<br/>[h<sup>-1</sup>]</b> | <b>Beginn<br/>C<sub>AL</sub><br/>[g/L]</b> | <b>Induktion</b> |
|--------------|-------------------------------|--|------------------|
| 8            | <i>0,10</i>                   | 0  |                  |
| 8            | <i>0,025</i>                  | 0  |                  |
| 8            | <i>0,025</i>                  | 0  |                  |
| 8            | <i>0,025</i>                  | 0  |                  |

### 5.5 Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate

In der exponentiellen Phase des Batches wachsen die Zellen mit  $\mu_{\max}$ . Dieser Wert wird in diesem Kapitel bestimmt. Anschließend wird untersucht, welchen Wert die maximale spezifische Wachstumsrate für die kontinuierlichen Kultivierungen annimmt. Dies dient der weiteren Charakterisierung der Prozessführung und der Produktbildung. Je höher  $\mu_{\max}$  desto höher liegt zum Beispiel auch die mögliche Produktausbeute.

Die maximale spezifische Wachstumsrate wird in der Literatur für *E. coli* mit Glucose als Substrat in einer Batch-Kultivierung mit definiertem Medium von  $0,45 \text{ h}^{-1}$  [23] bis  $0,62 \text{ h}^{-1}$  [24] angegeben. Für die Batch-Phase sollte  $\mu_{\max}$  im Rahmen der Literaturwerte liegen. Für die kontinuierliche Kultivierung wird ein identischer Wert erwartet.

Für die Bestimmung der maximalen Wachstumsraten wird der Logarithmus Naturalis (ln) der optischen Dichte gegen die Prozesszeit aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht  $\mu_{\max}$ . In der Batch-Phase der Kultivierung K1 liegt die spezifische Wachstumsrate bei  $0,65 \text{ h}^{-1}$  (Abb. 5.14) bei der Kultivierung K2 liegt  $\mu_{\max}$  mit  $0,62 \text{ h}^{-1}$  etwas niedriger. Beide Werte liegen zwischen den in der Literatur angegebenen Werten. Der Unterschied zwischen den beiden Batch-Phasen lässt sich auf Faktoren wie biologische Variabilität und Messungenauigkeiten durch Pipettierungenauigkeiten und die geringe Probenanzahl zurückführen. Das ist auch Bestimmtheitsmaß  $R^2$  zu erkennen, dieses liegt bei K1 bei 97,38%, bei K2 bei 98,62 (Abb. 5.14). Je näher  $R^2$  an 100 liegt, desto genauer ist die Regressionsgerade.

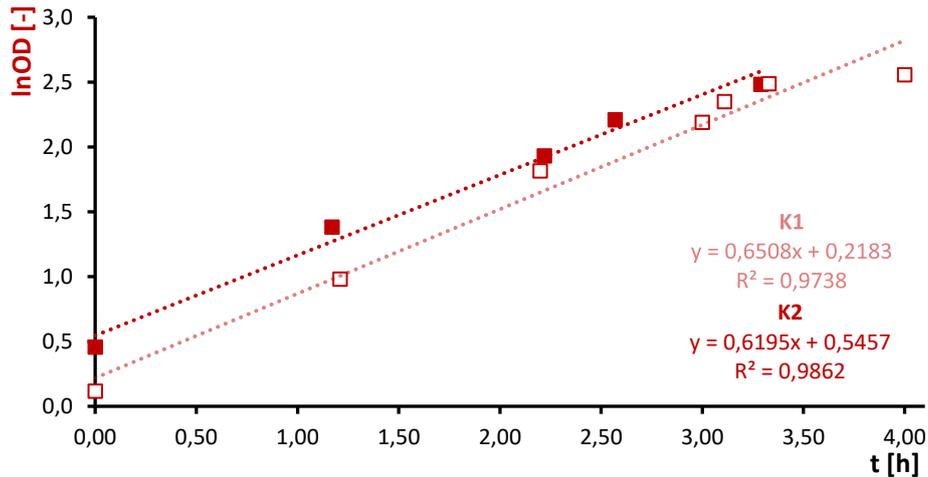


Abbildung 5.14: Auftragung von lnOD gegen die Prozesszeit für K1 und K2 in den Batch-Phasen. K1: weiße Quadrate mit rotem Rand, K2: rote Quadrate.

Die maximale spezifische Wachstumsrate für die kontinuierlichen Kulturen kann über die Monod-Gleichung (3.2) berechnet werden. Bei der Betrachtung des Chemostaten wird  $\tilde{c}_{SL}$  für  $c_{SL}$  und  $D$  für  $\mu$  eingesetzt.

$$D = \mu_{\max} \cdot \frac{\tilde{c}_{SL}}{K_S + \tilde{c}_{SL}} \quad (5.3)$$

Nach Umstellung ergibt sich für  $\mu_{\max}$  folgende Formel.

$$\mu_{\max} = \frac{D}{\frac{\tilde{c}_{SL}}{K_S + \tilde{c}_{SL}}} \quad (5.4)$$

Nimmt man für  $K_S$  den Literaturwert 0,004 g/L an [2] kann man für  $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$  mit  $\tilde{c}_{SL} = 4,47 \text{ g/L}$   $\mu_{\max}$  berechnen. Andere Wertpaare können nicht verwendet werden, da der Zähler mit diesen null werden würde. Es ergibt sich eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $0,32 \text{ h}^{-1}$ .

Alternativ ist eine Berechnung über die Formel, die mit (3.20) und (3.21) hergeleitet wurde, möglich.

$$\tilde{c}_{XL} = y_{X/S} \cdot \left( c_{SR} - \frac{D \cdot K_s}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (5.5)$$

Für diesen Ansatz ist es notwendig, den Ausbeutekoeffizienten für  $\tilde{c}_{SL} > 0$  sicher bestimmt zu haben. Mit Anwendungen wie Excel Solver oder Matlab können anhand der Formel anschließend  $\mu_{\max}$  und auch  $K_s$  bestimmt werden.

### 5.6 Untersuchung der Abgasanalytik

Die Untersuchung der Abgasanalytik ist der letzte Teil der Charakterisierung. Anhand dieser kann auf eine Vielzahl von Prozesseigenschaften geschlossen werden und die volumetrische Stoffübergangszahl ermittelt werden. Dies ist auf den nächsten Seiten dargestellt.

Die Abgasanalytik zeichnet alle 10 bis 30 Sekunden die Zusammensetzung der Abluft auf. Es wird die Sauerstoffstoffmenge, die Kohlendioxidstoffmenge in der Abluft in Prozent und der trockene Luftdruck in bar aufgezeichnet. Auf Grundlage dieser Werte soll der  $k_{La}$ -Wert für verschiedene Phasen der Prozesse bestimmt werden und über die Gleichung (3.10) die Zellkonzentration ermittelt und bewertet werden. Für  $y_{X/O}$  wird für die Berechnung 1 angenommen. Für  $k_{La}$  wird erwartet, dass die Werte mit zunehmender Verdünnungsrate steigen. Wird die Verdünnungsrate erhöht, werden die Zellen mit mehr Substrat versorgt und der Sauerstoffbedarf der Zellen steigt. Entsprechend wird der Sauerstoffeintrag ins Medium gesteigert und  $k_{La}$  steigt. Die Berechnung der  $k_{La}$ -Werte wird anhand der Formel (3.7) durchgeführt. Für die Bestimmung der mittleren logarithmischen Sauerstoffkonzentrationsdifferenz werden die Stoffmengenanteile  $CO_2$  und  $O_2$  benötigt. Abbildung 5.15 zeigt die Auftragung der Stoffmengenanteile der Abluft für die Prozesszeit von 70 bis 94 Stunden des ersten Prozesses. Die Verdünnungsrate wird von  $0,075$  auf  $0,30 \text{ h}^{-1}$  und anschließend auf  $0,025 \text{ h}^{-1}$  eingestellt. Diese Prozesszeit wurde beispielhaft gewählt, da hier die Umstellung auf zwei Verdünnungsraten erfolgt und auch die Gleichgewichtseinstellungen zu beobachten sind. Die gelbe Kurve zeigt den Verlauf von  $x_{CO_2}$ , die grüne den Verlauf von  $x_{O_2}$ . Nach Umstellung der Verdünnungsrate wird auch hier eine Gleichgewichtseinstellung erwartet. Eine konstante Menge Zellen atmet eine konstante Menge Sauerstoff ein und Kohlendioxid aus

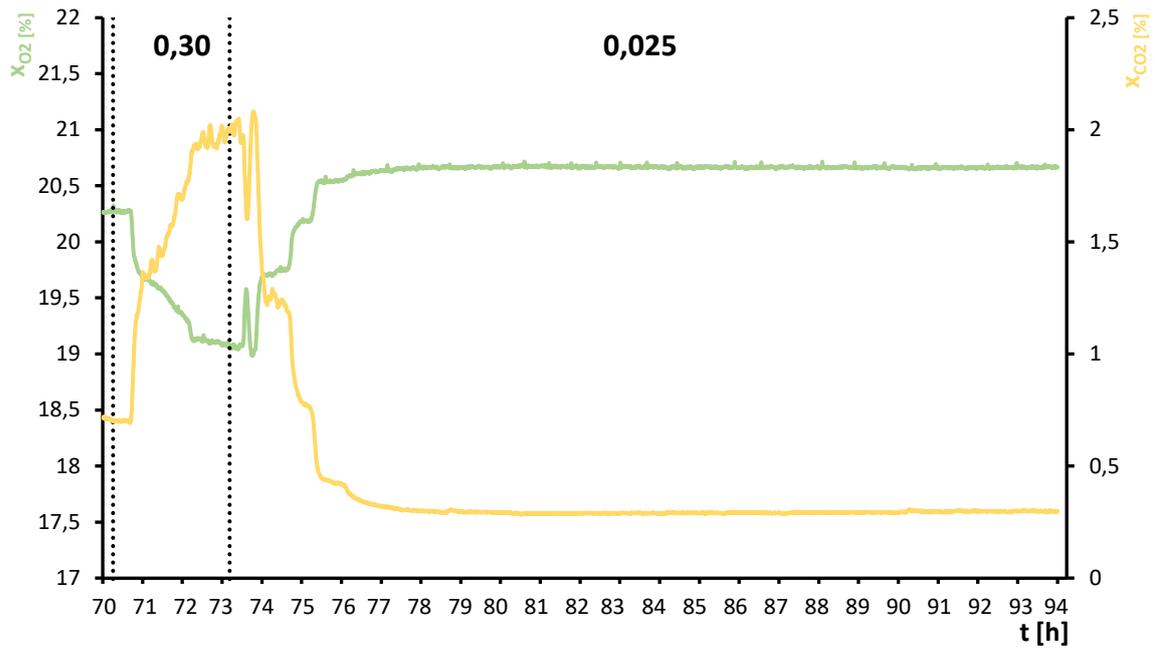


Abbildung 5.15: Stoffmengenanteil in Prozent von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> der Abluft von K1 für die Prozesszeit von 70 bis 94 Prozessstunden.  $x_{O_2}$  grün,  $x_{CO_2}$  gelb.

Dieser Verlauf ist in Abbildung 5.15 gut zu erkennen. Nach der Umstellung pendelt sich innerhalb einiger Stunden ein neues Gleichgewicht ein. Bei einer hohen Verdünnungsrate geht dies schneller (circa zwei Stunden) als bei einer niedrigen Verdünnungsrate (circa vier Stunden). Abbildung 5.16 zeigt den Verlauf der Stoffmengenanteile der Abluft von vier Stunden nach Prozessbeginn (Beginn der Zufütterung) von K2 bis zu 133 Stunden Prozesszeit. Auch hier ist die Einstellung der Gleichgewichtszustände gut zu erkennen. Ab 126 Stunden kommt es hier zu einer Störung (5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2). Dies ist auch bei der Auftragung der Stoffmengenanteile sichtbar. Bei nicht veränderter Verdünnungsrate schwanken plötzlich die Stoffmengenanteile der Abluft.

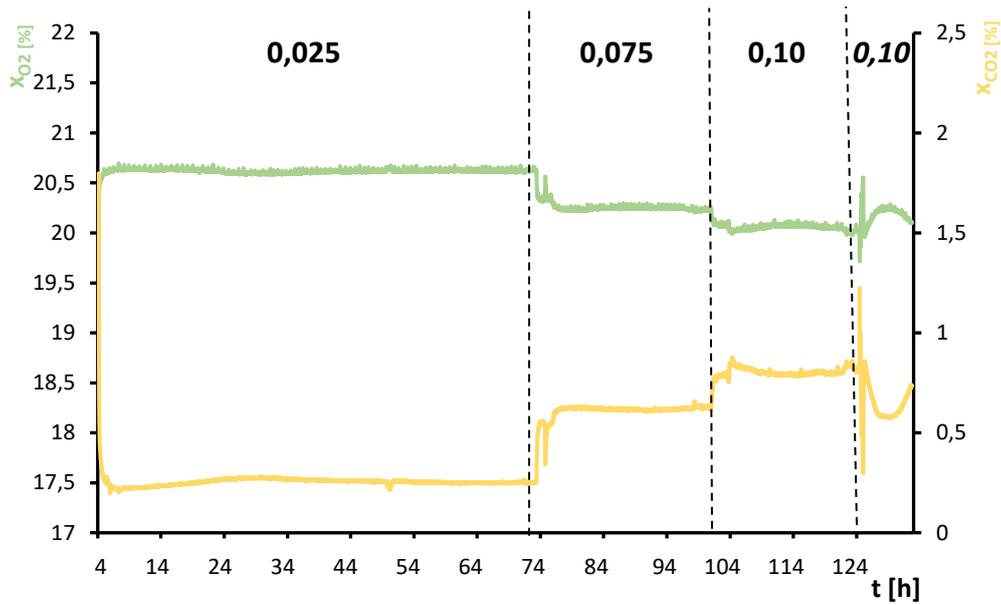
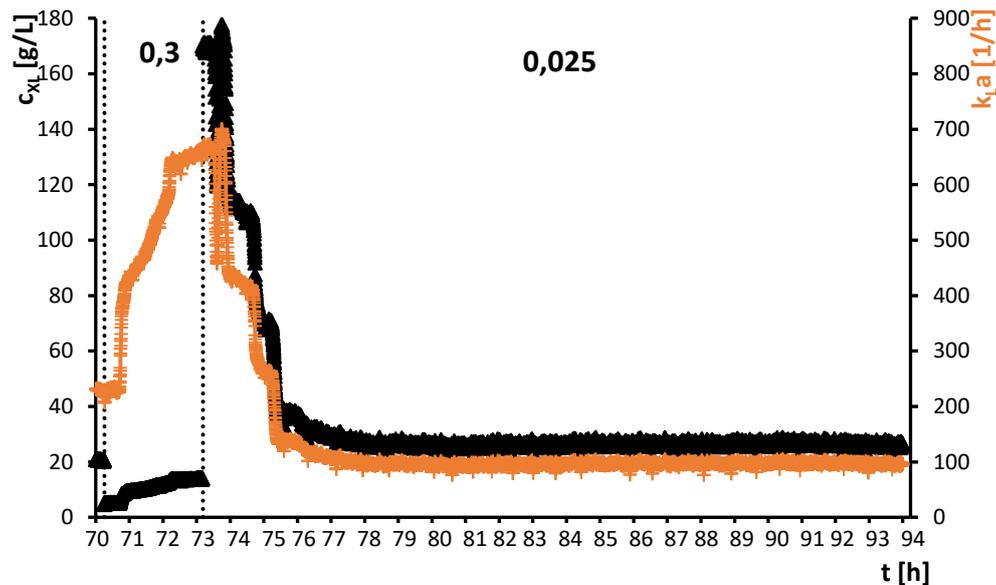


Abbildung 5.16: Stoffmengenanteil in % von  $O_2$  und  $CO_2$  der Abluft von K2 für die Prozesszeit von 4 bis 133 Stunden. Grün  $x_{O_2}$ , gelb  $x_{CO_2}$ .

Vergleicht man die beiden Abbildungen, so fällt auf, dass die Stoffmengenanteile der Abluft für die Verdünnungsrate  $0,025 \text{ h}^{-1}$  bei den beiden Prozessen nicht ganz identisch sind. Auch schwanken die Werte beim Prozess K2 sichtbar stärker.

Abbildung 5.17 und 5.18 zeigen die Entwicklung der  $k_{La}$ -Werte für K1 von 70 bis 94 und für K2 von 4 bis 133 Stunden, bis kurz nach der Störung aufgetragen. Wird die Verdünnungsrate heraufgesetzt, steigt  $k_{La}$  nach einer Einstellungsphase, wird sie herabgesetzt, sinkt  $k_{La}$ , entsprechend den Erwartungen.



**Abbildung 5.17:**  $k_{La}$ -Werte-Verlauf und Verlauf der über die Abgaswerte berechneten Zellkonzentration von K1 für die Prozesszeit von 70 bis 94 Prozessstunden.

In der Literatur finden sich abhängig von den Kultivierungsbedingungen verschiedene Angaben für  $k_{La}$ . In einem Experiment konnte eine maximale volumetrische Stoffübergangszahl von  $116 \text{ h}^{-1}$  ermittelt werden [25]. Hier wurde ein Bioreaktor mit 3 L Arbeitsvolumen mit 600 mL/min Luft bei einer Rührerdrehzahl von 900 rpm betrieben. In der Kultivierung sind Drehzahlen bei 900-1000 rpm erreicht worden, der Reaktor hatte ein Arbeitsvolumen von 1,5 L und es wurde mit 2 L/min begast. Je kleiner das Volumen, bei identischen Bedingungen, desto höher wird der  $k_{La}$ -Wert. Dieser Zusammenhang lässt sich aus der van't Riet Gleichung (3.9) herleiten. In einem anderen Experiment [26] konnten in einem Reaktor mit 3 L Arbeitsvolumen mit einer Rührerdrehzahl von 1860 rpm mit 3 L/min Begasung ein maximaler  $k_{La}$ -Wert von  $730 \text{ h}^{-1}$  erreicht werden. So scheint eine maximale volumetrische Stoffübergangszahl von durchschnittlich  $701 \text{ h}^{-1}$  (Tab. 5.15) unter den vorherrschenden Prozessbedingungen realistisch. Die Zellen wurden zu allen Prozesszeiten ausreichend mit Sauerstoff versorgt, die eingestellte Sauerstoffsättigung von 15% konnte auch bei hohen Verdünnungsraten gehalten werden. Die maximale Rührerdrehzahl des Systems liegt bei 1200 rpm, bei  $0,30 \text{ h}^{-1}$  lagen Rührerdrehzahlen zwischen 900 und 1000 rpm vor. Bei höheren Verdünnungsraten kann der Sauerstoffbedarf durch eine Erhöhung der

Rührerdrehzahl nicht mehr gedeckt werden. Es müsste also zusätzlich mit Sauerstoff begast werden.

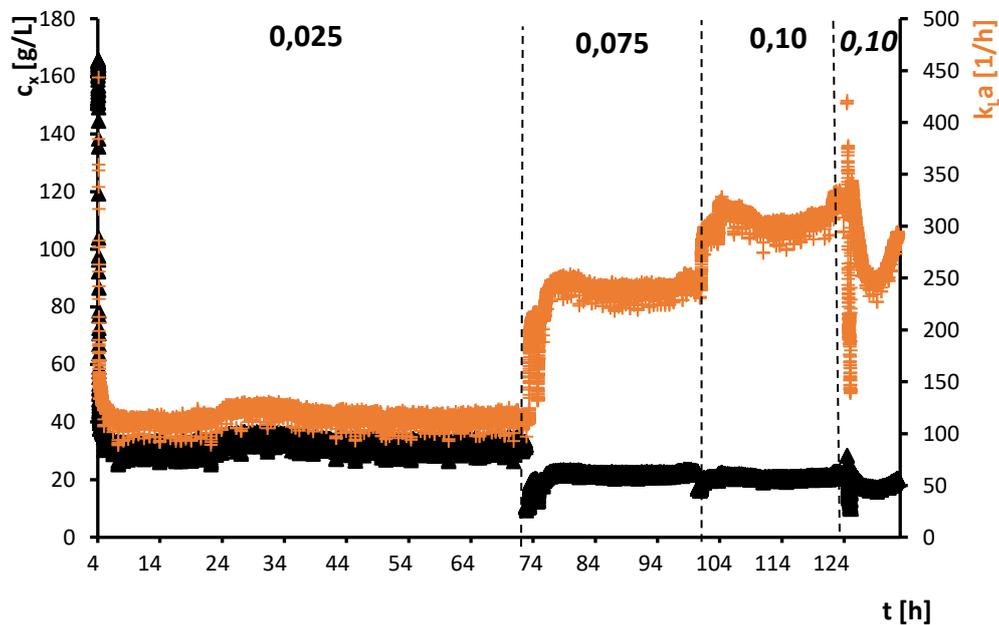


Abbildung 5.18:  $k_{La}$ -Werte-Verlauf und Verlauf der über Abgaswerte berechneten Zellkonzentration von K2 für die Prozesszeit von 0 bis 133 Stunden.

In den Abbildung 5.17 und 5.18 ist auch die Zellkonzentration, die anhand der Abgaswerte über OUR berechnet wurde, aufgetragen. Die Formel (3.10) wird nach  $c_{XL}$  umgestellt.

$$c_{XL} = \frac{OUR}{q_{O/X}} \quad (5.6)$$

Man sieht auch hier die Einstellung des Fließgleichgewichtes. Es fällt aber auf, dass für niedrige Verdünnungsraten höhere Zellkonzentrationen vorliegen als bei höheren Verdünnungsraten. Dies ist auch in Tabelle 5.14 aufgetragen. Die  $k_{La}$ -Werte steigen mit steigender Verdünnungsrate, die Zellkonzentrationen sinken.

Es ist mit den verwendeten Methoden nicht zu bestimmen, welcher Anteil der Zellen lebendig und welcher bereits gestorben ist. Auch bei der OD-Messung und der BTM-Bestimmung fließen sowohl lebendige als auch tote Zellen mit in die Ergebnisse ein. Bei der Berechnung

der Zellkonzentration über OUR geht  $\mu$  mit in die Berechnung ein. Nimmt man beispielsweise an, die Hälfte der Zellen im Bioreaktor sei bei einem D von  $0,025 \text{ h}^{-1}$  tot, so ergibt sich statt einem  $\mu$  von  $0,025 \text{ h}^{-1}$  ein Wert von  $0,050 \text{ h}^{-1}$ . Um den Verlauf der Zellkonzentration in Tabelle 5.14 zu erklären, müsste man annehmen, dass besonders bei niedrigen Verdünnungsraten ein signifikanter Teil der Zellen tot ist. Dies könnte gegebenenfalls an der geringen Substratzufuhr liegen. Der Ausbeutekoeffizient  $y_{x/o}$  ist mit 1 angenommen worden. Es ist möglich, dass dieser für verschiedene Verdünnungsraten unterschiedliche Werte annimmt. Um diesen zu bestimmen, bedarf es aber einer sicheren Methode für die Bestimmung der Zellkonzentration.

**Tabelle 5.14: Mittelwerte der Zellkonzentration und der  $k_{La}$ -Werte von K1 und K2 für bestimmte Verdünnungsraten.**

| D<br>[h <sup>-1</sup> ] | K1             |                                | K2             |                                |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|
|                         | $c_x$<br>[g/L] | $k_{La}$<br>[h <sup>-1</sup> ] | $c_x$<br>[g/L] | $k_{La}$<br>[h <sup>-1</sup> ] |
| 0,025                   | 26,64          | 97                             | 32,75          | 116                            |
| 0,075                   | 21,28          | 217                            | 22,32          | 241                            |
| 0,10                    | 20,19          | 303                            | 21,10          | 307                            |
| 0,30                    | 13,83          | 634                            | /              | /                              |

Abbildung 5.19 zeigt die Auftragung der Werte in Tabelle 5.14. Man sieht deutlich den gegensätzlichen Verlauf von  $k_{La}$  und der Zellkonzentration.

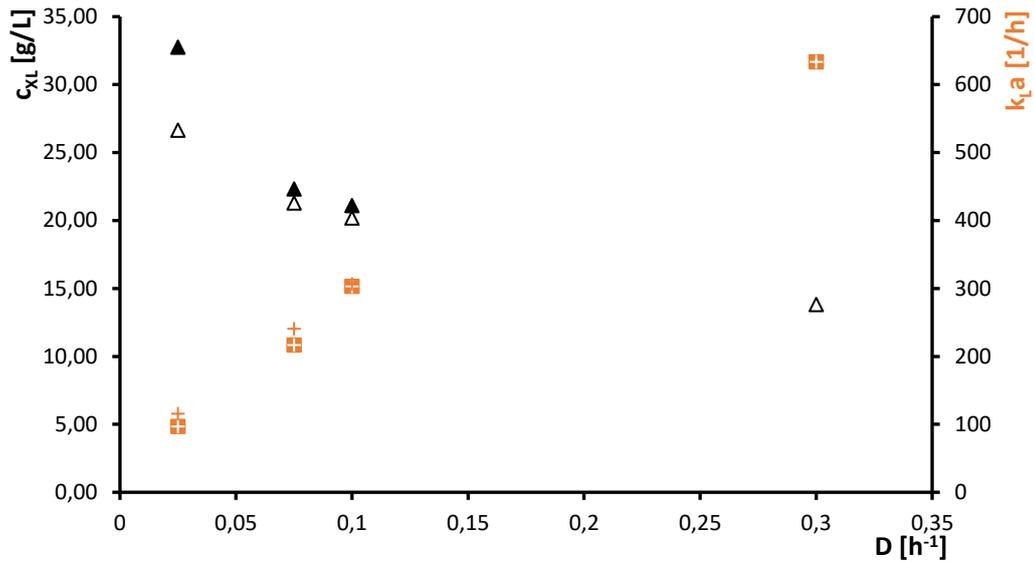


Abbildung 5.19: Mittelwerte der Zellkonzentration und der  $k_{La}$ -Werte von K1 und K2 für bestimmte Verdünnungsraten. Weiße Dreiecke, schwarzer Rand: Zellkonzentration K1, schwarze Dreiecke Zellkonzentration K2; weiße Kreuze auf orangem Grund:  $k_{La}$  K1, orangene Kreuze:  $k_{La}$  K2.

Die Untersuchung der Zellkonzentration über die Abgasmessung dient in erster Linie der Untersuchung der Gleichgewichtseinstellung. Diese ist mit den beispielhaft gewählten Prozessabschnitten von K1 und K2 gezeigt. Betrachtet man einen Abschnitt mit der Verdünnungsrate  $0,075 \text{ h}^{-1}$  aus K2 genauer (Abb. 5.20), wird jedoch deutlich, warum es mit der Bestimmung der Biotrockenmasse nicht möglich war, das Fließgleichgewicht nachzuweisen. Die Werte streuen teilweise stark um den Mittelwert von  $22,32 \text{ g/L}$  (Tab. 5.14) im Bereich von  $20,2$  bis  $23,5 \text{ g/L}$ . Erfolgt die Probenahme nur alle 20 bis 60 Minuten, wie es in beiden Prozessen der Fall war, ist davon auszugehen, dass die Werte in einem gewissen Rahmen schwanken.

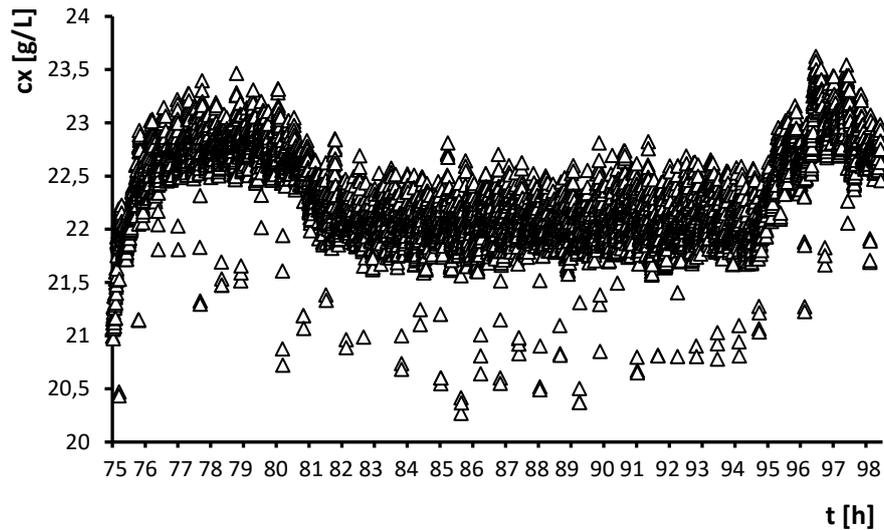


Abbildung 5.20: Auftragung der über OUR berechneten Zellkonzentration für die Zeit von 75 bis 98 Stunden von K2.

Der durchschnittliche Respirationsquotient lag während K1 bei 0,94. Damit liegt der Wert in der Nähe von 1, was für Glucose als Substrat erwartet wird. In der zweiten Kultivierung lag RQ im Durchschnitt allerdings bei 0,69. Dieser Wert deutet eigentlich bei einer Verstoffwechslung von Fett hin. Die Medienzusammensetzung war in beiden Prozessen aber identisch. Zu Beginn der Zufütterung liegt RQ noch bei 1, fällt dann aber innerhalb von 20 Minuten unter 0,9 und anschließend immer weiter ab. Nach der Einstellung der Verdünnungsrate auf  $0,10 \text{ h}^{-1}$  steigt RQ wieder auf über 0,8. Analysen mit der HPLC ergeben für K2 aber keine auffällig hohen Glucosekonzentrationen. Es wird also das zur Verfügung gestellte Substrat verstoffwechselt. Es wäre denkbar, dass die Zellen besonders bei niedrigen Verdünnungsraten eine weitere Nährstoffquelle nutzen. Da es sich um kein Komplexmedium handelt, steht den Zellen aber keine andere Nährstoffquelle zur Verfügung. Möglich wäre, dass die Zellen tote Zellbestandteile verstoffwechseln. Diese Annahme wirft aber die Frage auf, warum dies nur bei K2 passiert. Es könnte sein, dass die Störung ab 126 Stunden schon hier in einer Vorstufe auf die Zellen einwirkt und diese stresst.

### 5.7 Diskussion der Ergebnisse zur Charakterisierung

Im Zuge der Charakterisierung sollten einige Fragen geklärt werden. Das Verhalten, welches die kontinuierliche Kultivierung auszeichnet und den Begriff Chemostat für den Bioreaktor in dieser Prozessführung geprägt hat, ist die Einstellung eines Fließgleichgewichtes nach Veränderung von Prozessgrößen, wie der Verdünnungsrate. Dieses Verhalten konnte mit der Zellkonzentration, die über die BTM-Bestimmung ermittelt wurde, nicht gezeigt werden. Nach Anwendung des Korrekturfaktors  $f_{X/OD}$  zeigt  $c_{XL,f}$  dieses Verhalten (5.1.3 *Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Zellkonzentration*). Die Einstellung des Fließgleichgewichtes ist auch in Kapitel 5.6 *Untersuchung der Abgasanalytik* gezeigt. Die Stoffmengenanteile stellen sich nach einer Umstellung der Verdünnungsrate auf einen konstanten Wert ein, Gleiches konnte somit auch für die aus den Abgaswerten berechnete Zellkonzentration gezeigt werden. Die Glucosekonzentration liegt für die eingestellten Verdünnungsraten unter  $0,30 \text{ h}^{-1}$  unterhalb der Nachweisgrenze (5.3 *Untersuchung der Glucosekonzentration*). Dies wird nach Gleichgewichtseinstellung erwartet. Die nach der ersten Kultivierung getroffene Annahme, dass die Einstellung des Gleichgewichtes erst nach einem kompletten Volumenaustausch erfolgt, ist anhand der Untersuchungen der Abgaswerte zu verwerfen. Hier wird ersichtlich, dass es bei hohen Verdünnungsraten bis zu zwei, bei niedrigen bis zu sechs Stunden dauern kann, bis ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Eine weitere Frage war, ob die Zustände bei einer bestimmten Verdünnungsrate auch nach langer Prozessführung wieder erreicht werden können. Die Zellkonzentration vor Anwendung des Umrechnungsfaktors variiert innerhalb Phasen mit gleicher Verdünnungsrate stark.  $c_{XL,f}$  beziehungsweise die optische Dichte zeigt dieses Phänomen nicht (Tab. 5.5). Betrachtet man allerdings die durchschnittlichen Zellkonzentrationen, die über die Abgaswerte berechnet wurden, zeigt sich das Verhalten der nicht korrigierten Zellkonzentration (Tab. 5.15). Die Werte der Konzentrationen sind bei dieser Betrachtung nicht relevant. Auch die  $k_{La}$ -Werte variieren. Es kann also angenommen werden, dass die Zellen sich im Laufe des Prozesses verändern und Prozessbedingungen nicht wieder identisch hergestellt werden können.

**Tabelle 5.15: Mittelwerte der Zellkonzentration und der  $k_{La}$ -Werte von K1 für die Phasen ab 47,40 Stunden Prozesszeit für die unterschiedlichen Verdünnungsraten, Phase 12 und 13 sind nicht berücksichtigt.**

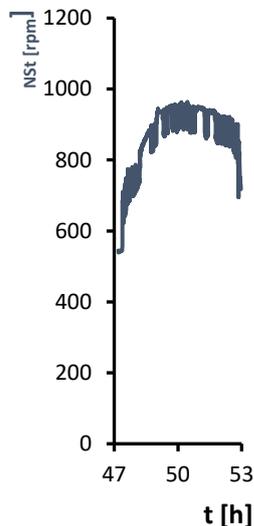
| Phase | D<br>[h <sup>-1</sup> ] | $c_x$<br>[g/L] | $k_{La}$<br>[h <sup>-1</sup> ] |
|-------|-------------------------|----------------|--------------------------------|
| 5     | 0,30                    | 13,6           | 641                            |
| 6     | 0,075                   | 21,28          | 236                            |
| 7     | 0,30                    | 13,78          | 647                            |
| 8     | 0,025                   | 26,39          | 96                             |
| 9     | 0,075                   | 17,69          | 197                            |
| 10    | 0,30                    | 14,65          | 701                            |
| 11    | 0,025                   | 26,89          | 98                             |
| 14    | 0,10                    | 20,19          | 303                            |
| 15    | 0,30                    | 13,28          | 613                            |

Bei der Untersuchung der Zellkonzentration fällt auf, dass  $c_{xL,f}$  für gleiche Verdünnungsraten in K2 höher liegen als in K1. Dieses bestätigt sich auch in abgeschwächter Form bei den Stoffmengenanteilen der Abgaswerte, bei einer Verdünnungsrate von 0,025 h<sup>-1</sup> liegen die Werte für K1 im Mittel bei  $x_{CO_2} = 0,30 \%$ ,  $x_{O_2} = 20,66 \%$ , bei K2 im Mittel bei  $x_{CO_2} = 0,34 \%$ ,  $x_{O_2} = 20,55\%$ . Ein möglicher Ansatz für die abweichenden Werte wäre, dass auch in kontinuierlichen Kultivierungen eine Variabilität der Zellen mit einbezogen werden muss, ähnlich wie in der Batch-Phase. Die Abweichungen zwischen den Zellkonzentrationen ist zudem noch durch Abweichungen in der Probenahme zu erklären (Anzahl Proben, systematische Fehler bei der Probenahme). Die Kultivierung unter Selektionsdruck hat keinen negativen Einfluss auf die Zellkonzentration.

Die stärkeren Schwankungen der Abgaswerte in K2 deuten, wie der niedrige RQ, möglicherweise schon auf den Fehler hin, der ab 126 Stunden die Störung auslöst. Wird eine sichere Bestimmung für die Zellkonzentration eingeführt, ist davon auszugehen, dass eine gleiche

Zellkonzentration bei verschiedenen Prozessen mit identischem  $D$  nachgewiesen werden kann.

Es soll zudem eine Aussage über den möglichen Auswaschpunkt der Zellen beziehungsweise über  $D_{crit}$  getroffen werden. Der Auswaschpunkt liegt laut Abbildung 5.8 bei  $0,42 \text{ h}^{-1}$  unter



**Abbildung 5.21:** Verlauf der Rührerdrehzahl in rpm bei einem  $D$  von  $0,3 \text{ h}^{-1}$  über die gesamte Dauer, in der diese Verdünnungsrate am Stück eingestellt war.

Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels. Die höchste Verdünnungsrate, die in den Kultivierungen eingestellt wurde, war  $0,30 \text{ h}^{-1}$ . Der Verlauf der Rührerdrehzahl bei dieser Verdünnungsrate ist in Abbildung 5.21 dargestellt. Hier ist die Prozesszeit von 47 bis 53 Stunden von K1 aufgetragen, zu dieser Zeit war das erste Mal ein  $D$  von  $0,30 \text{ h}^{-1}$  eingestellt. Es ist ein Anstieg der Drehzahl zu erkennen, der auf die schnellere Versorgung der Zellen mit Substrat zurückzuführen ist. Die Zellen können schneller wachsen und brauchen mehr Sauerstoff. Ungefähr nach drei Stunden sinkt die Drehzahl wieder, die Zellen benötigen weniger Sauerstoff. Da die Substratzufuhr nicht verändert wurde, was auch anhand der linearen Waagensignale überprüft wurde, ist anzunehmen, dass Zellen schneller aus dem Bioreaktor gepumpt werden, als diese nachwachsen können, die Zellkonzentration also sinkt. Dies ist bei der korrigierten Zellkonzentration nicht zu erkennen. Bei der

Glucose- und Acetatanalyse waren in den Phasen mit einem  $D$  von  $0,30 \text{ h}^{-1}$  Konzentrationen nachweisbar (5.3 Untersuchung der Glucosekonzentration, 5.4 Untersuchung der Acetatkonzentration). Eine nachweisbare Glucosekonzentration deutet darauf hin, dass die Zellen nicht mehr das gesamte ihnen zur Verfügung gestellte Substrat verstoffwechseln. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen stark gestresst sind, oder dass die Zellen das Substrat nicht mehr verstoffwechseln können, weil sie zu schnell aus dem Bioreaktor gespült werden. Die Acetatkonzentration kann ebenfalls auf gestresste Zellen oder den Glucoseüberschuss zurückzuführen sein. Der in Kapitel 5.5 Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate bestimmte Wert für  $\mu_{max}$  liegt bei  $0,32 \text{ h}^{-1}$ . Anhand der Daten kann angenommen werden, dass die Zellen bei einem  $D$  von  $0,30 \text{ h}^{-1}$  ausgewaschen werden, da sich das entsprechende Verhalten nur bei dieser Verdünnungsrate zeigt. Liegt im Bioreaktor eine

inhomogene Population vor, so kann es sein, dass ein Teil der Zellen gestorben, ein anderer Teil sich in der stationären Phase befindet und nur ein gewisser Anteil der Zellen mit  $\mu_{\max}$  wächst. Dies würde bedeuten, dass  $\mu$  tatsächlich höher als  $0,30 \text{ h}^{-1}$  liegt. Wenn sich nur die Hälfte der Zellen im Wachstum befindet, könnte  $\mu$  unter dieser Annahme bei  $0,60 \text{ h}^{-1}$  liegen und das  $\mu_{\max}$  der kontinuierlichen Kultivierung läge damit in der Nähe der für die Batch-Phasen ermittelten Werte (K1:  $0,65 \text{ h}^{-1}$  und K2:  $0,62 \text{ h}^{-1}$ ). Um herauszufinden, welcher Anteil der Zellen im Bioreaktor lebendig ist, kann eine über eine Keimzahlbestimmung erhaltene Zellkonzentration mit einer über eine Messung der optischen Dichte erhaltenen verglichen werden.

Es sollten auch höhere Verdünnungsraten mit dem Versuchsaufbau eingestellt werden, um zu überprüfen, ob sich bei diesen das gleiche Verhalten zeigt. Bei der ersten Kultivierung war dies aufgrund des Durchmessers des verwendeten Pumpschlauches nicht möglich, bei K2 standen dickerer Schläuche zur Verfügung, durch das Auftreten der Störung (*5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2*) war es aber nicht mehr sinnvoll, höhere Verdünnungsraten zu testen.

### 5.8 Untersuchungen zur Produktbildung

In den Kultivierungen soll auch untersucht werden, inwiefern es möglich ist, eine Produktbildung der genetisch veränderten Zellen zu induzieren. Es sollen erste Ansätze geliefert werden, wie eine kontinuierliche Produktion mit einem Chemostaten umzusetzen sein könnte.

Für die Induktion in der ersten Kultivierung wird IPTG in gleicher Konzentration direkt in den Bioreaktor und in das Feedmedium gegeben. So werden die zwei möglichen Induktionswege kombiniert (*3.4.3 Induktion der Produktbildung in einer kontinuierlichen Kultivierung*). In der zweiten Fermentation werden die Zellen nur durch Zugabe direkt in das Kulturgefäß induziert.

#### 5.8.1 Untersuchungen zur Produktbildung von K1

Die Zellen wurden im Prozess K1 nach 148,15 h Prozesszeit bei einem D von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  mit 1 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden ohne Kanamycin kultiviert. Über Selektivausstriche wurde die Plasmidretention untersucht. Im Abstand von ungefähr 20 Minuten wurden bis 2 Stunden nach der Induktion, sowie am Folgetag Proben genommen und mit einer SDS-PAGE ausgewertet

#### *Untersuchung der Plasmidretention*

Die Untersuchung der Plasmidretention zeigt, dass die KBE auf den Agarplatten ohne Kanamycin immer etwas höher liegt als die auf den Platten mit Kanamycin (Tab. 5.16). Die Kolonien sind auf den Platten ohne Kanamycin deutlich größer (Abbildung 5.22). Das ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen auf den Platten mit dem Antibiotikum erst auf dessen Anwesenheit reagieren und es deaktivieren müssen. Die nach 141,40 h Prozesszeit genommene Probe zeigte keinen signifikanten Plasmidverlust der Zellen. Die letzte Probe nach 166,55 h Prozesszeit wurde circa 25 Stunden nach der Induktion genommen. Wie Abbildung 5.23 zeigt, sind keine KBE auf der Platte mit Kanamycin gewachsen.

Tabelle 5.16: KBE auf den Platten mit und ohne Kanamycin in einer Verdünnung von  $10^{-7}$  von Proben, die zu verschiedenen Prozesszeiten und unterschiedlichen Verdünnungsraten genommen wurden.

| Datum  | Verdünnung | KBE mit Kanamycin | KBE ohne Kanamycin | D $h^{-1}$ |
|--------|------------|-------------------|--------------------|------------|
| 72,57  | $10^{-7}$  | 91                | 95                 | 0,075      |
| 95,10  | $10^{-7}$  | 81                | 84,5               | 0,025      |
| 119,25 | $10^{-7}$  | 87                | 97,5               | 0,075      |
| 141,40 | $10^{-7}$  | 67,5              | 82                 | 0,025      |
| 166,55 | $10^{-7}$  | 0                 | 89,5               | 0,10       |

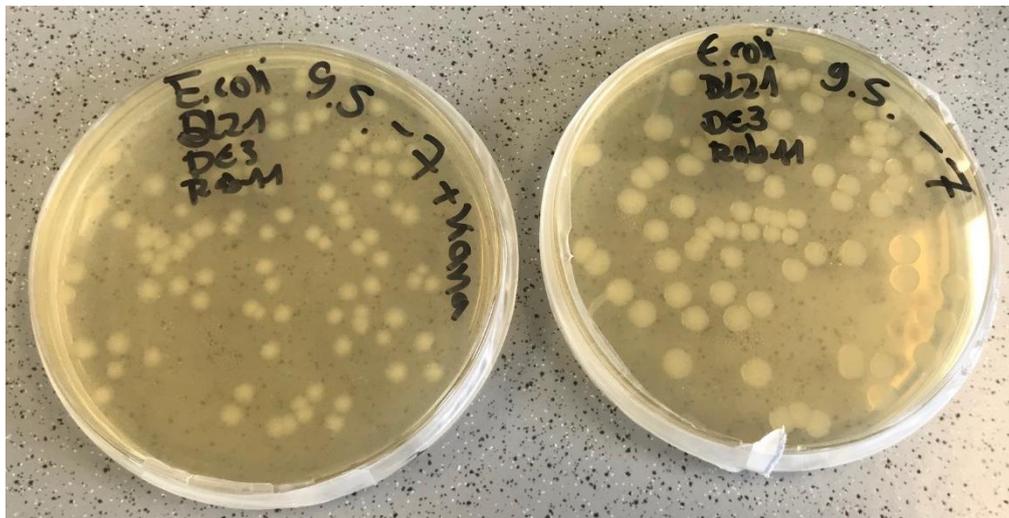


Abbildung 5.22: *E. coli* BL21 DE3 pET28a, Probe nach 95,10 h Prozesszeit genommen,  $10^{-7}$  verdünnt, 100  $\mu$ L ausplattiert. Rechts LB-Agar mit 0,1 g/L Kanamycin, links LB-Agar ohne Kanamycin. Ausplattierte Agar-Platten über Nacht bei 30 °C inkubiert.

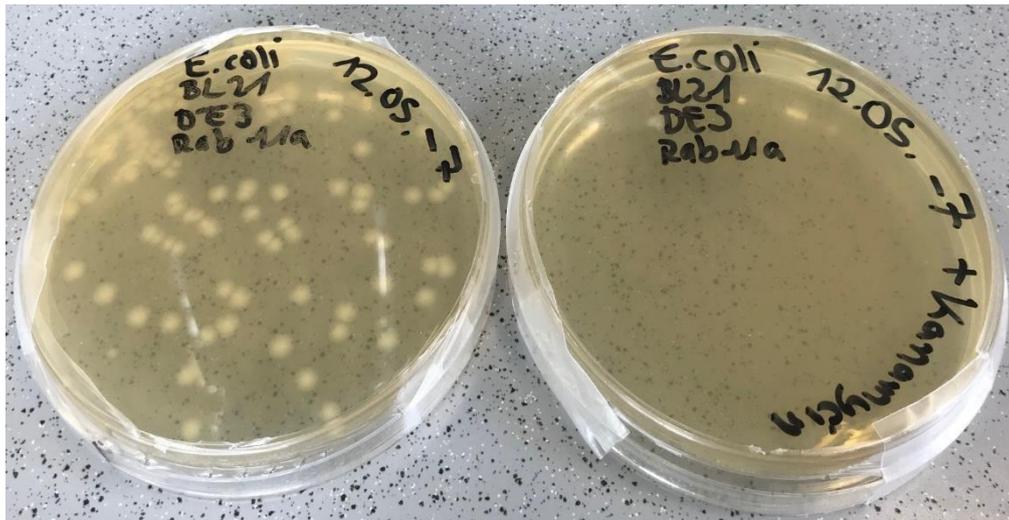


Abbildung 5.23: *E. coli* BL21 DE3 pET28a, Probe nach 166,55h Prozesszeit genommen,  $10^{-7}$  verdünnt, 100  $\mu$ L ausplattiert. Rechts LB-Agar ohne Kanamycin, links LB-Agar mit 0,1 g/L Kanamycin. Ausplattierte Agar-Platten über Nacht bei 30 °C inkubiert.

### *Untersuchung der Produktbildung*

Abbildung 5.24 zeigt die Auftragung von Proben nach der Induktion, sowie einer als Referenz vor der Induktion. Die Proben wurden aufgrund eines Bearbeitungsfehlers nicht zentrifugiert und der Lyse- sowie Probenpuffer nicht, wie vorgesehen, zu dem Zellpellet gegeben, sondern in die flüssigen Proben mit circa 300  $\mu$ L Volumen. Als Standard wurde BSA mit den Konzentrationen 25, 50 und 75 ng/ $\mu$ L verwendet und 10  $\mu$ L aufgetragen. Von den Proben wurden je 20  $\mu$ L aufgetragen. Durch die höhere Verdünnung der Proben sind die Banden schwächer und können aufgrund der Verdünnung nur schwer für die Quantifizierung herangezogen werden. Eine qualitative Aussage kann aber anhand des Gels getroffen werden. Rab11a mit den verwendeten Tags hat ein Molekulargewicht von 27,9 kDa, wird also auf Höhe der 25 kDa Bande des Markers erwartet. Es ist bei allen Proben eine Bande auf Höhe der 25 kDa Bande des Markers zu erkennen, allerdings ist diese sehr schwach und weist keinen Unterschied in der Intensität zwischen Proben vor der Induktion, direkt nach der Induktion und am Folgetag auf. Dies würde bedeuten, dass die Zellen kein Produkt gebildet haben. Oberhalb dieser schwachen Bande ist bei einigen Proben eine deutlichere Bande zu erkennen. Das Produkt ist etwas größer als 25 ka, sodass es möglich wäre, dass es sich bei dieser Bande um Rab11a handelt. Betrachtet man die sichtbare Bande oberhalb der 25 kDa

Bande des Markers als Produktbande, so ist auch eine schwache Bande bei der Probe P0, vor der Induktion zu erkennen. Hierbei kann es sich um ein zelleigenes Protein in gleicher Größe handeln, es ist aber auch möglich, dass das Plasmid *leaky* ist und auch in Abwesenheit von IPTG eine kleine Menge Produkt gebildet wird. Bei der Auftragung von P1 ist ein Teil des Volumens aus der Tasche ausgetreten, somit wird diese Probe nicht näher untersucht. Ab Probe P2 nimmt die Bande an Stärke zu, bis sie bei P6 ihre maximale Dicke erreicht. P8 und P15 sind am Folgetag genommen (Tab. 5.17).

Die Untersuchungen der Plasmidretention ergab, dass die Zellen nach der Induktion nicht mehr auf Platten mit Antibiotikum wachsen konnten, was darauf hindeuten kann, dass diese ihr Plasmid verloren haben. Bei P8 und P15 ist aber ebenfalls eine deutliche Bande zu erkennen. Handelt es sich hierbei um die Produktbande, so kann für den Ausstrich der Probe auf Kanamycin angenommen werden, dass die Zellen entweder nur noch wenig Plasmid besaßen und bei der Zellteilung viele Zellen ohne Plasmid gebildet wurden, die auf der Platte sofort starben. Alternativ kann angenommen werden, dass die Zellen so gestresst waren, dass sie nicht in der Lage waren, ihre Antibiotikaresistenz zu aktivieren. Die Produktkonzentration nimmt bei der letzten Probe sichtlich ab, die kann auf die höhere Verdünnungsrate im Vergleich zur Probe davor zurückzuführen sein (Tab. 5.17).

Für ein zweites Gel wurden einige der Proben, die nicht für das erste Gel verwendet wurden, inklusive Zentrifugation entsprechend 4.4.7 *Produktanalyse* vorbereitet. In Tabelle 5.17 sind diese grün hinterlegt. Es sollte untersucht werden, ob bei der Auftragung der unverdünnten Proben die Produktbande deutlicher sichtbar ist. Zudem wurde versucht die verdünnten Proben aufzukonzentrieren und diese erneut aufzutragen. Dies führte aber zu keinen auswertbaren Ergebnissen (Abb. 5.25).

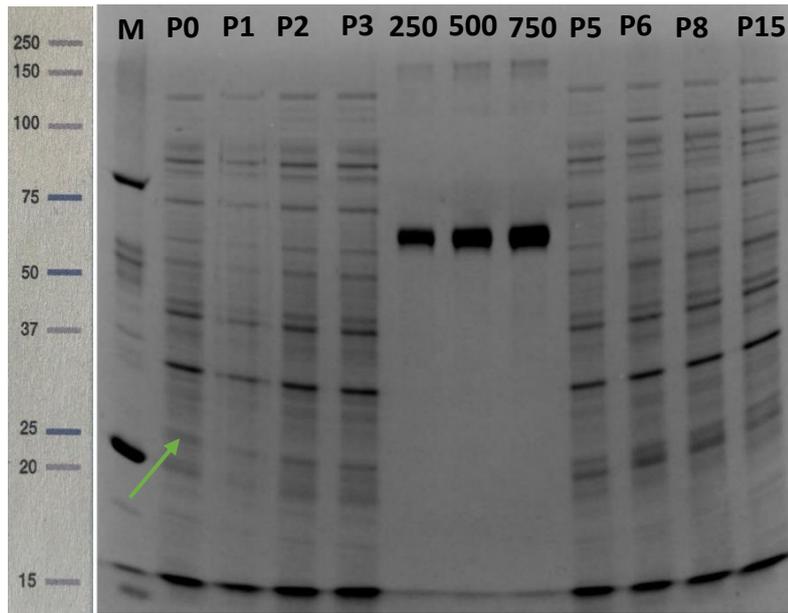


Abbildung 5.24: Produkt-Proben der Kultivierung K1 auf einem 12%-SDS-Gel. Links ist der Marker aufgetragen, in der Mitte die BAS-Standards mit 250, 500 und 750 ng. Grüner Pfeil: Produktbande.

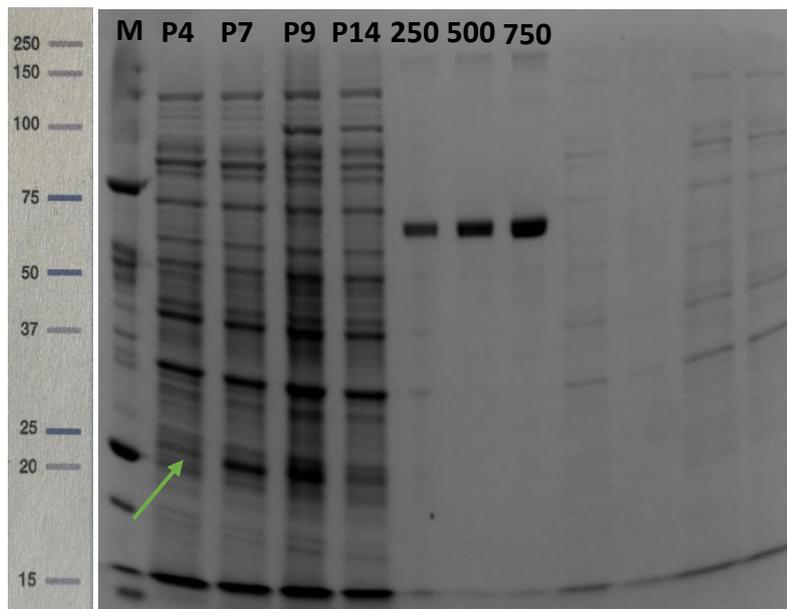


Abbildung 5.25: Produkt-Proben der Kultivierung K1 auf einem 12%-SDS-Gel. Links ist der Marker aufgetragen, in der Mitte die BAS-Standards mit 250,500 und 750 ng. Grüner Pfeil: Produktbande.

Tabelle 5.17: Probennummer der Proben der Produktuntersuchung von K1 mit der jeweiligen Prozesszeit und eingestellten Verdünnungsrate. Blau hinterlegte Probe wurden auf dem ersten Gel untersucht, grün hinterlegte auf dem zweiten. Zur gelb hinterlegten Prozesszeit wurde die Induktion gestartet.

| Probennummer | Prozesszeit [h] | D h <sup>-1</sup> | Probennummer | Prozesszeit [h] | D h <sup>-1</sup> |
|--------------|-----------------|-------------------|--------------|-----------------|-------------------|
| P1           | 148,05          | 0,1               | P9           | 166,55          | 0,1               |
| P2           | 148,15          | 0,1               | P10          | 167,18          | 0,3               |
| P3           | 148,38          | 0,1               | P11          | 167,43          | 0,3               |
| P4           | 149,09          | 0,1               | P12          | 168,03          | 0,3               |
| P5           | 149,29          | 0,1               | P13          | 168,25          | 0,3               |
| P6           | 149,49          | 0,1               | P14          | 168,45          | 0,3               |
| P7           | 166,1           | 0,1               | P15          | 169,05          | 0,3               |
| P8           | 166,32          | 0,1               |              |                 |                   |

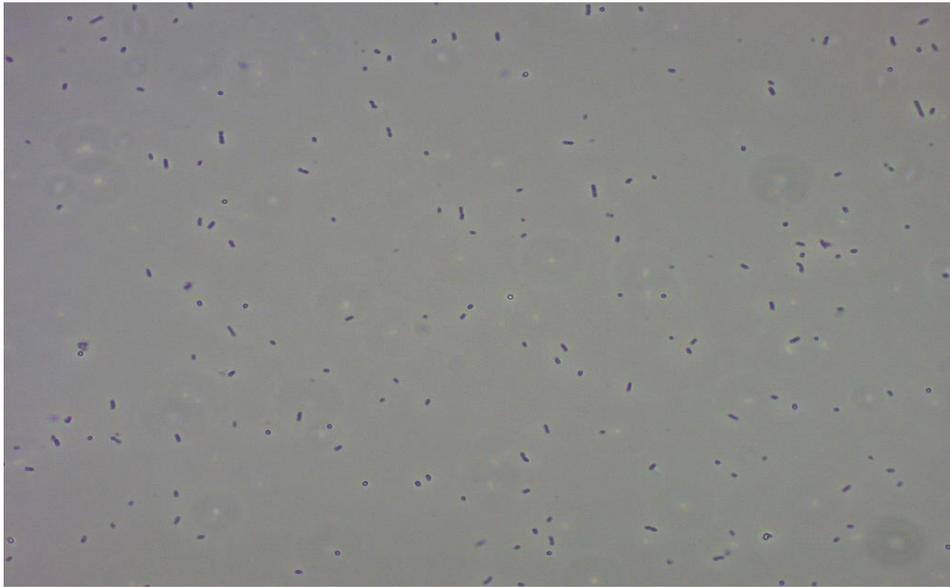
Bei der Auftragung der unverdünnten Proben ist besonders bei P7 und P9, die am Folgetage nach der Induktion genommen wurden, eine deutliche Produktbande zu erkennen. Bei P4 liegt eine schwache Bande vor, die Zellen beginnen langsam mit der Produktion des Zielproteins. Bei P14, ähnlich wie bei P15 auf dem ersten Gel, ist die Produktbande abgeschwächt. Auch hier ist bereits ein D von 0,30 h<sup>-1</sup> eingestellt.

### 5.8.2 Untersuchungen zur Produktbildung von K2

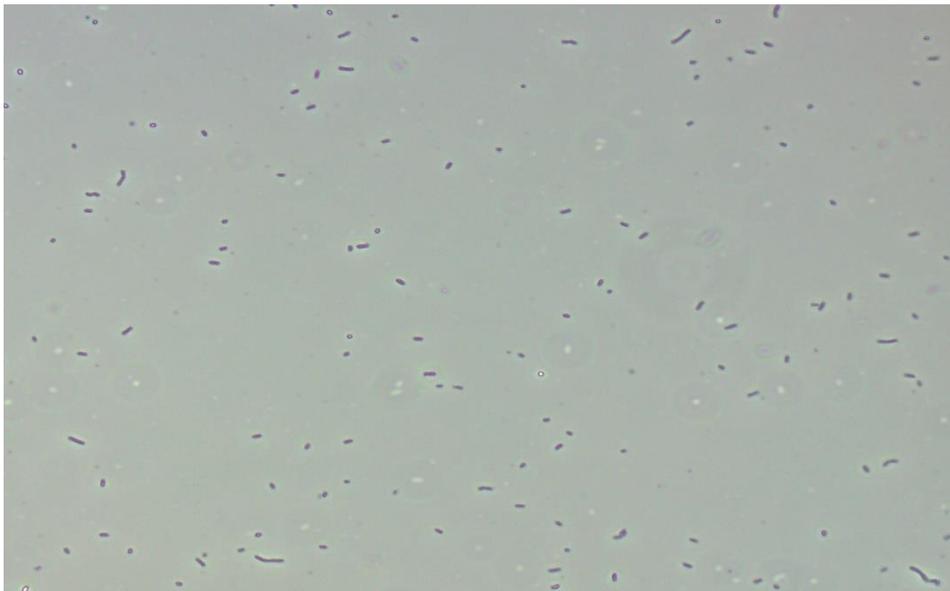
Es werden Zellen nach 122,12 und nach 167,57 Stunden bei einem D von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  mit 1 mM IPTG induziert, die Zugabe des IPTG erfolgt ausschließlich in den Bioreaktor. Die Kultivierung erfolgte mit 30mg/mL Kanamycin. Nach der Induktion werden alle 20 bis 30 Minuten über zwei bis fünf Stunden Proben für die Produktanalyse genommen. Die Zellen werden während K2 immer wieder mit einem Lichtmikroskop auf ihre Morphologie untersucht, um einen Anhaltspunkt zu haben, ob die Zellen sich noch normal teilen. Dies ist ein Indikator dafür, wie gestresst die Zellen sind.

#### *Untersuchung der Zellmorphologie*

Um zu untersuchen, ob die Bakterien noch teilungsfähig sind, wurden regelmäßig Proben unter dem Mikroskop untersucht. Abbildung 5.26 zeigt eine Aufnahme nach 100,42 h Prozesszeit. Die Zellen weisen noch ihre typische kompakte Stäbchenform auf. Bei einigen ist der Teilungsprozess zu erkennen. Der Prozess ist zu diesem Zeitpunkt zwar schon mehrere Tage gelaufen, es wurden aber wenige Änderungen der Verdünnungsrate vorgenommen und keine Produktbildung induziert. Es ist möglich, dass die lange Kultivierungsdauer den Zellen keine Probleme bereitet, wenn sie wenigen Stressfaktoren ausgesetzt sind.



**Abbildung 5.26:** *E. coli* BL21 DE3 pET28a, Probe 1:100 verdünnt, 10  $\mu$ L, Aufnahme unter einem Lichtmikroskop mit 40x Vergrößerung, Phasenkontrast. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Teilbereich der Probe.

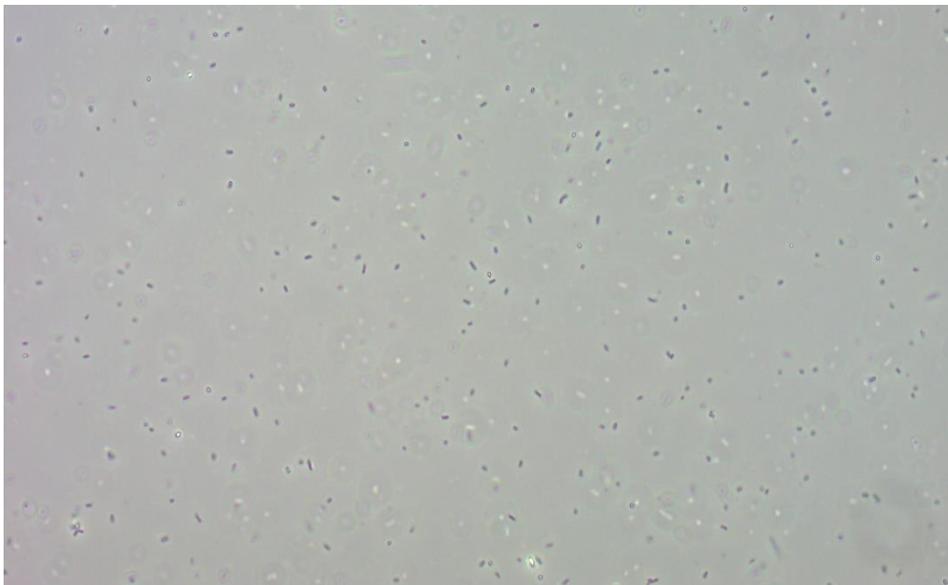


**Abbildung 5.27:** *E. coli* BL21 DE3 pET28a, Probe 1:100 verdünnt, 10  $\mu$ L, Aufnahme unter einem Lichtmikroskop mit 40x Vergrößerung, Phasenkontrast. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Teilbereich der Probe.

Die Probe, die in Abbildung 5.26 untersucht wurde, wurde nach 123 Stunden Prozesszeit genommen. Es fällt auf, dass einige Zelle deutlich verlängert sind. Dies könnte daran liegen, dass einige Zellen sich nach der Induktion nicht mehr teilen. Die Zellen werden immer län-

ger, aber trennen sich nicht voneinander ab. Dies kann ein Hinweis auf erhöhten Stress der Zellen sein.

Abbildung 5.28 zeigt zum Vergleich die Zellen am letzten Prozesstag, nachdem diese verhungert sind. Bei gleicher Auflösung wie die beiden vorherigen Bilder sind nur kleine Punkte zu erkennen. Es handelt sich dabei um Zelltrümmer. Es muss aber angemerkt werden, dass mit dem verwendeten Mikroskop nur eine sehr grobe Einschätzung der Zellmorphologie getätigt werden kann. Zur genaueren Beurteilung müsste ein Mikroskop mit einer höheren Auflösung verwendet werden.

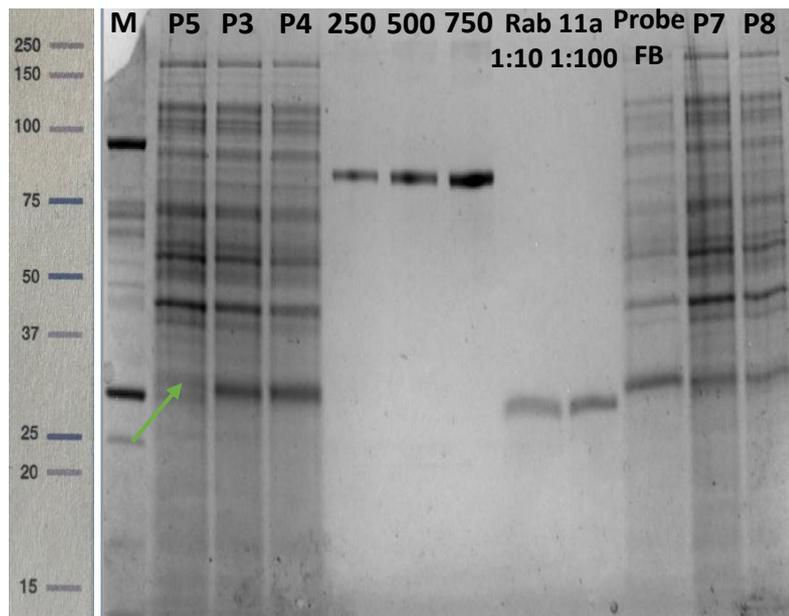


**Abbildung 5.28:** *E. coli* BL21 DE3 pET28a, Probe unverdünnt, 10  $\mu$ L, Aufnahme unter einem Lichtmikroskop mit 40x Vergrößerung, Phasenkontrast. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Teilbereich der Probe.

### *Untersuchung der Produktbildung*

Bei der Untersuchung der Proben der Kultivierung K2 wurde aufgereinigtes Rab11a ohne Tags in unbekannter Konzentration mit einer Verdünnung von 1:0 und 1:100 mit auf das Gel aufgetragen, ebenso wie eine Probe nach Induktion aus einem im März durchgeführten Fed-Batch für ein Master Projekt, für das der gleiche Bakterienstamm verwendet wurde. Dies sollte eine konkrete Einschätzung der Produktbande ermöglichen. Das aufgereinigte Rab11a

liegt auf der Höhe der 25 kDa Bande des Markers, die Produktbande aus der Probe aus dem Fed-Batch ein Stück oberhalb (Abb. 5.29). Die Annahme, dass die Produktbanden nicht direkt auf der Höhe der 25 kDa Bande liegen, aus der ersten Kultivierung ist damit bestätigt. Die Probe P5 ist vor der zweiten Induktion genommen, hier ist eine schwache Bande zu erkennen. Nach der Induktion nimmt die Produktkonzentration schnell zu. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Induktionen zu erkennen. Eine Quantifizierung anhand der Banden durchzuführen ist problematisch, da die Software, die zur Konzentrationsbestimmung der Proben verwendet wurde, für Proben, die auf beiden Gelen aufgetragen wurden, unterschiedliche Konzentrationen berechnet. Zum Beispiel P7: Gel 1: 603,4 ng, Gel 2 321,7 ng. Es wurden die gleichen Gele, dieselben Standards und die gleiche Färbelösung verwendet. Die Einwirkzeit des Färbelösung war auch vergleichbar.



**Abbildung 5.29:** Produkt-Proben der Kultivierung K2 auf einem 12%-Stain Free-SDS-Gel. Links ist der Marker aufgetragen, in der Mitte die BAS-Standards mit 250,500 und 750 ng, rechts neben den Markern aufgereinigtes Rab11a in unbekannter Konzentration 1:10 und 1:100 verdünnt, als weitere Referenz einer Probe aus einer Fed-Batch-Kultivierung mit dem gleichen Stamm nach Induktion.

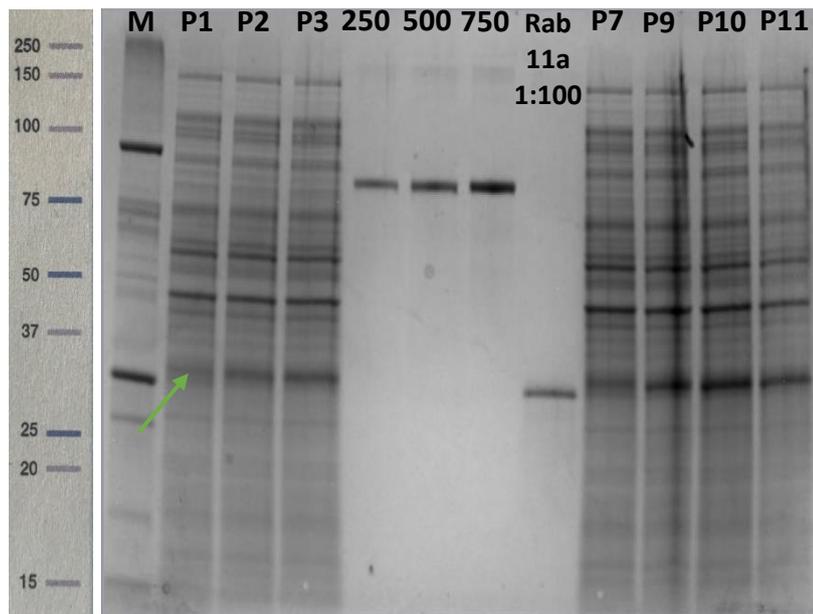


Abbildung 5.30: Produkt-Proben der Kultivierung K2 auf einem 12%-Stain Free-SDS-Gel. Links ist der Marker aufgetragen, in der Mitte die BAS-Standards mit 250,500 und 750 ng, rechts neben den Markern aufgereinigtes Rab11a in unbekannter Konzentration 1:10 und 1:100 verdünnt, als weitere Referenz einer Probe aus einer Fed-Batch-Kultivierung mit dem gleichen Stamm nach Induktion.

Tabelle 5.18: Probennummer der Proben der Produktuntersuchung von K2 mit der jeweiligen Prozesszeit und eingestellten Verdünnungsrate. Blau hinterlegte Probe wurden auf dem ersten Gel untersucht, grün hinterlegte auf dem zweiten, grün hinterlegte mit blauer Schrift bei beiden. Zur gelb hinterlegten Prozesszeit wurde die Induktion gestartet.

| Probennummer | Prozesszeit [h] | D [h <sup>-1</sup> ] | Probennummer | Prozesszeit [h] | D [h <sup>-1</sup> ] |
|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| P1           | 122,12          | 0,1                  | P5           | 167,57          | 0,1                  |
| P2           | 122,42          | 0,1                  | P6           | 168,42          | 0,1                  |
| P3           | 123,12          | 0,1                  | P7           | 169,12          | 0,1                  |
| P4           | 124,22          | 0,1                  | P8           | 169,42          | 0,1                  |
|              |                 |                      | P9           | 170,57          | 0,1                  |
|              |                 |                      | P10          | 171,57          | 0,1                  |

| <b>Probennummer</b> | <b>Prozesszeit<br/>[h]</b> | <b>D<br/>[h<sup>-1</sup>]</b> |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------|
| P11                 | 172,57                     | 0,1                           |

Bei den verwendeten Gelen für die Produktanalyse von K2 wurden Stain Free Gele verwendet. In dem Gel enthaltene Trihalogene reagieren mit Tryptophan in den Proben. Unter dem Einfluss von UV-Licht wird eine Reaktion ausgelöst, die eine sichtbare Fluoreszenz hervorruft [27]. Die Banden sind bei dieser Darstellungsform deutlich klarer abgetrennt und somit besser von dem Programm auszuwerten, allerdings kann der verwendete Standard BSA nicht als Referenz verwendet werden, da dieses Protein deutlich weniger Tryptophan enthält als Rab11a. Um die Stain Free Gele für eine Quantifizierung zu nutzen, muss hier ein Rab11a Standard verwendet werden, der zur Zeit der Bachelorarbeit nicht zur Verfügung stand. Abbildung 5.31 zeigt die Fluoreszenz-Aufnahme des 2. Gels von K2. Um eine noch deutlichere Trennung der Banden zu erlangen wäre eine Auftragung von 10 statt 20  $\mu\text{L}$  Probe denkbar.

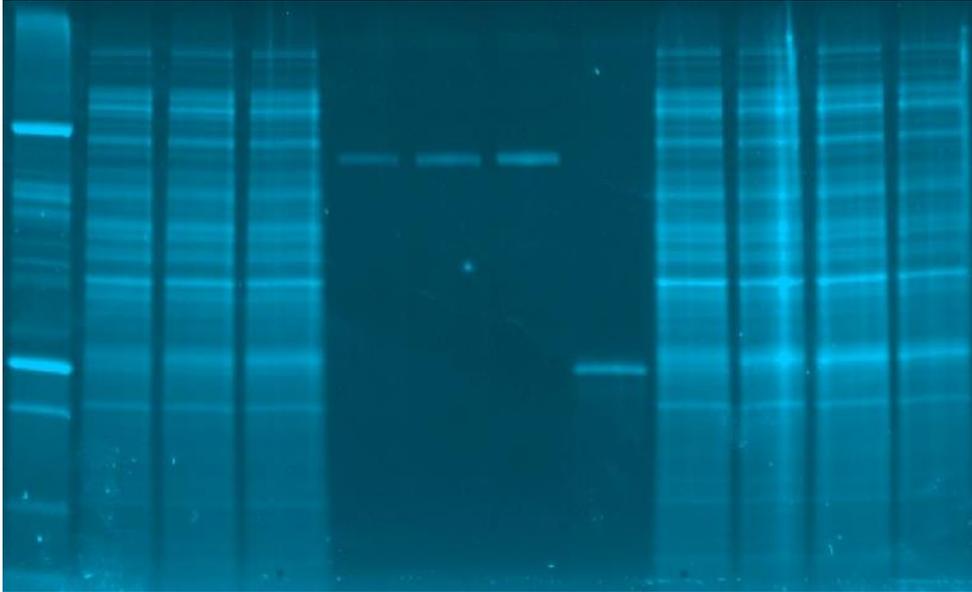


Abbildung 5.31: Gel aus Abbildung 5.29 unter Fluoreszenz (Stain Free).

### *Kultivierung mit und ohne Antibiotika*

Die Kultivierung K1 wurde ohne Antibiotikazugabe durchgeführt. Die Zellen bildeten nach der Induktion eine feststellbare Menge Produkt. Auch nach 20 Stunden ist noch eine Produktkonzentration mit der SDS-PAGE nachweisbar. Erst als die Verdünnungsrate hochgesetzt wurde, nahm die Produktkonzentration ab. Wie lange die Produktbildung bei unveränderter Verdünnungsrate möglich gewesen wäre, ist somit nicht zu beurteilen. Die Zellen wuchsen nach Dauerinduktion über Nacht nicht mehr auf LB-Platten mit Kanamycin. Die lange Induktion löst bei den Zellen eine Reaktion aus. Entweder verlieren die Zellen nach und nach ihr Plasmid oder sie sind durch die Dauerinduktion stark gestresst. Es ist daher anzunehmen, dass eine Induktion nicht über Tage am Stück durchgeführt werden kann.

Die zweite Kultivierung wurde mit Kanamycin durchgeführt. Drei Stunden nach der ersten Induktion kam es zu einer Störung im Prozess (*5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2*). Die Störung begann mit einer starken Reduktion der Zellkonzentration, was durch einen rapiden Abfall der Rührerdrehzahl sichtbar wurde. Proben wurden zu dieser Zeit nicht genommen, da die Störung in der Nacht stattfand. Der Rückgang der Zellkonzentration lässt sich damit erklären, dass kurz vorher neues Medium angeschlossen wurde. Das Medium, welches während der Induktion angeschlossen war, enthielt Antibiotika, aber dieses wurde bei erhöhter

Temperatur des Mediums diesem hinzugefügt. Es ist also denkbar, dass das hitzelabile Antibiotikum durch die Hitze deaktiviert wurden. Nach Anschluss des neuen Mediums starb der Teil der Zellen ab, die nicht in der Lage waren, die Antibiotikaresistenz auszubilden. Es kam aber nicht zum Auswaschen der Zellen. 43 Stunden nach Auftreten der Störung wurden die Zellen ein zweites Mal induziert. Eine Stunde nach der Induktion kam es sichtbar zur Zelllyse. Diese zeigte sich durch einen Schmierfilm, der nach dem Zentrifugieren auf der Probe schwamm und nach Verwerfen des Überstandes an der Mikroreaktionsgefäßwand kleben blieb. In der Harvestflasche waren die lysierten Zellen ebenfalls deutlich sichtbar (Abb. 5.32, mitte, links). Es wurde von den verbleibenden Zellen Produkt in vergleichbarer Menge zur ersten Induktion hergestellt. Am Folgetag wurde die Verdünnungsrate herabgesetzt und der Prozess lief unbeobachtet weitere 45 Stunden. Anschließend war auch ein Großteil der Zellen im Bioreaktor sichtbar lysiert (Abb. 5.32, rechts). Eine erhöhte Konzentration an Glucose ist nach keiner Induktion festzustellen. Nach der Induktion von K1 ist eine Acetatkonzentration nachweisbar, bei K2 ist dies nicht der Fall.



**Abbildung 5.32:** Links: Ernteflasche mit Zelllysat-Sprenkeln. Mitte: Mikroreaktionsgefäß mit BTM von 3 mL Probe nach 15 Minuten Zentrifugation bei 5500 g. Der schwache, weiße Film im oberen Bereich an der Gefäßwand besteht aus Zellbestandteilen lysierter Bakterien. Rechts: Bioreaktor mit sichtbarem Zelllysat im flüssigen Reaktorvolumen.

### 5.9 Prozessstörung der Kultivierung K2

In der Kultivierung K2 kam es nach circa 126 Stunden am frühen Abend zu einer Störung. Da niemand vor Ort war, kann über die Ursachen teilweise nur spekuliert werden. Der Verlauf der Störung ist anhand des Verlaufes der Rührerdrehzahl in Abbildung 5.33 dargestellt.

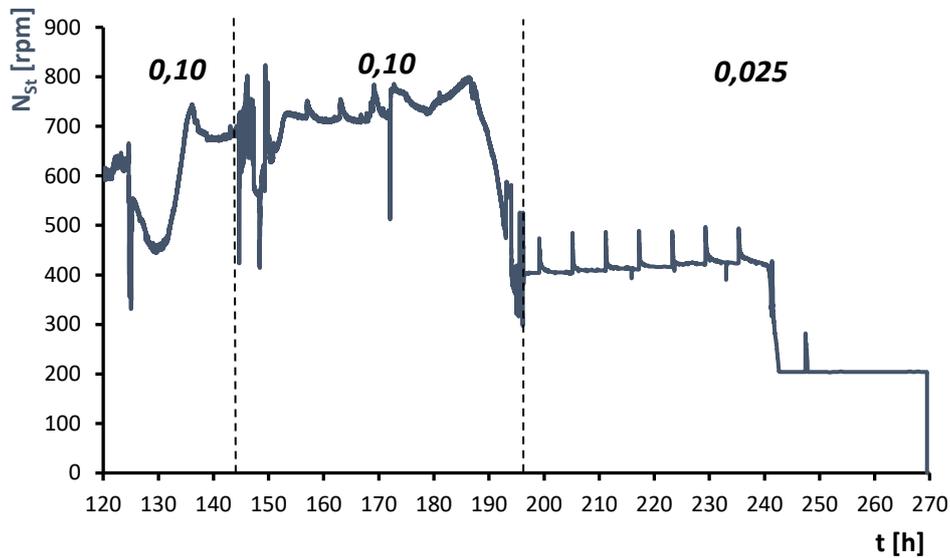


Abbildung 5.33: Verlauf der Rührerdrehzahl nach der Prozessstörung in K2.

Es kam zu einem rasanten Abfall der Zellkonzentration, was durch die Reduktion der Rührerdrehzahl widerspiegelt wird. Dies kann, wie im Unterkapitel von 5.8.2 Untersuchung der Produktbildung von K2 *Kultivierung mit und ohne Antibiotika* erläutert wird, durch die Zugabe frischen Antibiotikums ausgelöst worden sein. Parallel kam es zu einer Verstopfung des Tauchrohrs oder des Schlauches zur Harvestflasche. Dies ist anhand des Waagensignals der Harvestwaage festzustellen, welches für zwei Stunden annähernd konstant war (Abb. 5.34).

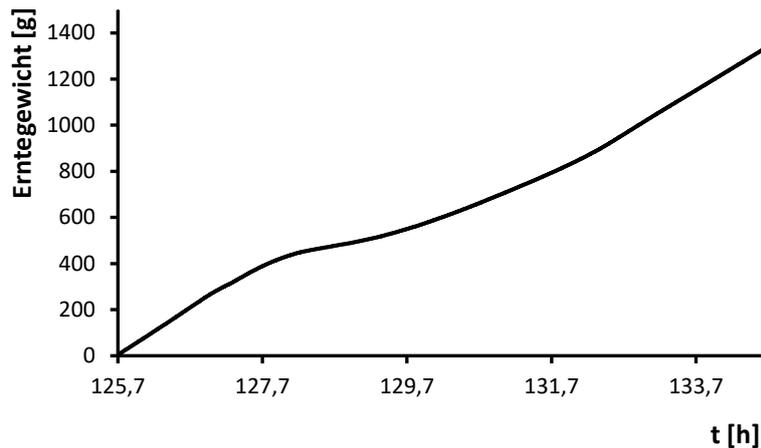


Abbildung 5.34: Waagensignal der Harvestwaage über die Prozesszeit von 125,7 bis 134,7 Stunden von K2.

In dieser Zeit wurde weiter Feedmedium in den Reaktor gepumpt, sodass das Volumen stark anstieg. Kulturbrühe trat an der Halterung des Schikanekorbs am Deckel und an Dichtungen an der Seite des Bioreaktors aus. Aufgrund der erhöhten Substratkonzentration konnten die Zellen sich erholen und wuchsen ab Stunde 130 mit hoher Geschwindigkeit, was an der steigenden Rührerdrehzahl zu erkennen ist. Ab dieser Zeit wird auch wieder flüssiges Reaktorvolumen abgepumpt, die Verstopfung hat sich gelöst. Es werden Rührerdrehzahlen von über 700 rpm erreicht, was in der Kultivierung K2 bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt ist. Hier zeigt sich nun ein Fehler am Aufbau, der nach der Reinigung nach K1 entstanden ist. Das Tauchrohr ist in dieser Kultivierung an den Rand des Kessels orientiert. Bei einer hohen Rührerdrehzahl kommt es zu einer stärkeren Aufwirbelung der Flüssigphase, besonders am Rand des Reaktors. Das Tauchrohr saugt so ständig Flüssigkeit ab. Dies passiert aufgrund der ungünstigen Positionierung bis der obere Scheibenrührer freigelegt ist. Dies führt gegebenenfalls zu einer weiteren Steigerung der Drehzahl, da nun schlechter Sauerstoff ins Medium eingetragen werden kann. Die höhere Drehzahl verstärkt den Effekt weiter. So wurde das Volumen im Bioreaktor über Nacht von 1,5 L auf circa 1 L reduziert. Am nächsten Vormittag wurde nach 145 Stunden 500 mL steriles Medium in den Kessel gegeben. Da sich die Rührerdrehzahl aufgrund der erhöhten Glucosekonzentration erneut steigert, konnte der Effekt reproduziert werden und das Volumen war nach wenigen Stunden wieder auf circa 1 L reduziert. Die Kultivierung wurde weitergeführt und nach 198 Stunden 300 mL substratfrei-

es Medium in das Kulturgefäß gegeben, um einen Anstieg der Rührerdrehzahl zu verhindern. Die Verdünnungsrate wurde auf  $0,025 \text{ h}^{-1}$  reduziert. Das Volumen war nach 240 Stunden leicht reduziert, eine stabile Rührdrehzahl stellte sich über die 42 Stunden nicht ein. Dies kann aber auch auf die stark gestressten Zellen zurückzuführen sein, die deutlich lysierten.

Die Positionierung des Tauchrohrs hatte vermutlich schon vor der Störung einen Effekt auf die Zellen, wie in Kapitel 5.6 *Untersuchung der Abgasanalytik* vermutet. So kann es auch in Phasen niedriger Verdünnungsraten und Rührerdrehzahlen zu einem Schwanken des Volumens gekommen sein, was eine Schwankung in der Zellkonzentration hervorruft und dazu führt, dass die Zellen nicht gleichmäßig mit Substrat versorgt werden.

Für folgende Kultivierungen sollte das Tauchrohr möglichst mittig in den Reaktor reichen, um nicht in Kontakt mit hochsitzender Flüssigkeit zu kommen. Zudem wäre es denkbar, den Scheibenrührer nicht direkt unter der Flüssigkeitsoberfläche zu positionieren, um dieses Verhalten in Zukunft zu vermeiden.

### 6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge der Bachelorarbeit wurden zwei kontinuierliche Kultivierungen über mehrere Tage durchgeführt. Die erste Kultivierung verlief planmäßig. Es kam nach sechs Tagen der zweiten Kultivierung zu einer Problematik in der Prozessführung, deren Ursache aber ausfindig gemacht wurde und in künftigen Prozessen vermieden werden kann. Verschiedene Verdünnungsraten konnten umgesetzt werden und die Datenaufzeichnung auch der externen Geräte verlief einwandfrei. Der Aufbau der kontinuierlichen Kultivierungen kann damit als etabliert verstanden werden.

Für die Charakterisierung wurde eine Vielzahl von Analyse durchgeführt auf deren Grundlagen der  $k_{La}$ -Wert berechnet und der verwendete Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET28a Rab11a näher untersucht wurde. Die Analytik wurde zum großen Teil mit Methoden, die an der HAW Hamburg für Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen etabliert waren, durchgeführt. Diese wurden auf die Eignung der Anwendung für eine kontinuierliche Kultivierung überprüft und teilweise optimiert. Im Rahmen der 10-wöchigen Arbeit konnten nicht alle Abläufe so angepasst werden, dass sie einwandfrei anzuwenden sind. Besonders die Bestimmung der Biotrockenmasse warf Fragen auf, die in künftigen Arbeiten näher untersucht werden müssen, um hier eine sichere Bestimmung zu ermöglichen. Die Glucoseanalytik wurde mit einem Enzym-Kit und der HPLC erfolgreich umgesetzt, ebenso die Acetatanalyse. Hier wäre eventuell noch ein Vergleich der HPLC-Methodik mit einem Kit denkbar. Für die Charakterisierung des Stammes in einer kontinuierlichen Kultivierung konnten Grundsteine gelegt werden, die einen ersten Eindruck über dessen Verhalten in einer Langzeitkultivierung liefern. Es gilt im Folgenden weitere Prozesszustände zu untersuchen und diese in die Charakterisierung miteinzubeziehen, um das Bild zu vervollständigen. Die Einbindung der Abgasanalytik war ebenfalls erfolgreich und anhand dieser Daten konnten Prozessgrößen, wie Stoffmengenanteile der Abluft untersucht werden und die volumetrische Stoffübergangszahl  $k_{La}$  und der Respirationsquotient bestimmt und mit der Theorie verglichen werden. Für die Charakterisierung wurden in dieser Arbeit viele Grundsteine gelegt. Mit diesen können in anschließenden Arbeiten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die eine Nutzung dieser Prozessführung zur Optimierung von Kultivierungsbedingungen möglich machen werden.

Die Untersuchung der Produktbildung diente einer ersten Einschätzung, ob eine Produktion in einer kontinuierlichen Kultivierung möglich ist und unter welchen Voraussetzungen. Mit der ersten Kultivierung konnte gezeigt werden, dass nach langer Kultivierungsdauer mit vielen verschiedenen Verdünnungsraten ohne Zugabe von Antibiotika eine Produktbildung induziert werden kann. Es könnte weiter untersucht werden, wie lange die Zellen unter Dauerinduktion Produkt bilden können und ob bei rechtzeitiger Unterbrechung der Induktion, die Zellen sich erholen und eine erneute Induktion möglich ist.

Es wurde zudem untersucht, welchen Effekt die Kultivierung mit Antibiotika auf die Produktbildung hat. Des Weiteren wurde keine Dauerinduktion durchgeführt. Die Idee war, eine Produktionsstrategie zu testen, bei der in regelmäßigen Abständen die Zellen durch Induktorzugabe in das Kulturgefäß zur Produktion angeregt werden. Nach der zweiten Induktion lysierte ein Teil der Zellen sichtbar, dennoch konnte eine Produktkonzentration nachgewiesen werden. Die Zellen waren zu dem Zeitpunkt schon stark gestresst, sodass man dieses Phänomen noch einmal mit frischeren Zellen durchführen sollte. Auch bei diesem Ansatz gilt es zu prüfen, wie oft eine Induktion wiederholt werden kann. Anschließend kann auf Grundlage der beiden Konzepte ein Modell für die optimale Produktbildung in einer kontinuierlichen Kultivierung erstellt werden. Aktuell findet in der pharmazeutischen Industrie eine langsame Ablösung des Batch-Verfahrens durch kontinuierliche Kultivierungen statt [11], sodass es in Zukunft von großem Interesse sein wird, Grundlagenforschung im Bereich der Produktion mit kontinuierlicher Prozessführung voranzutreiben.

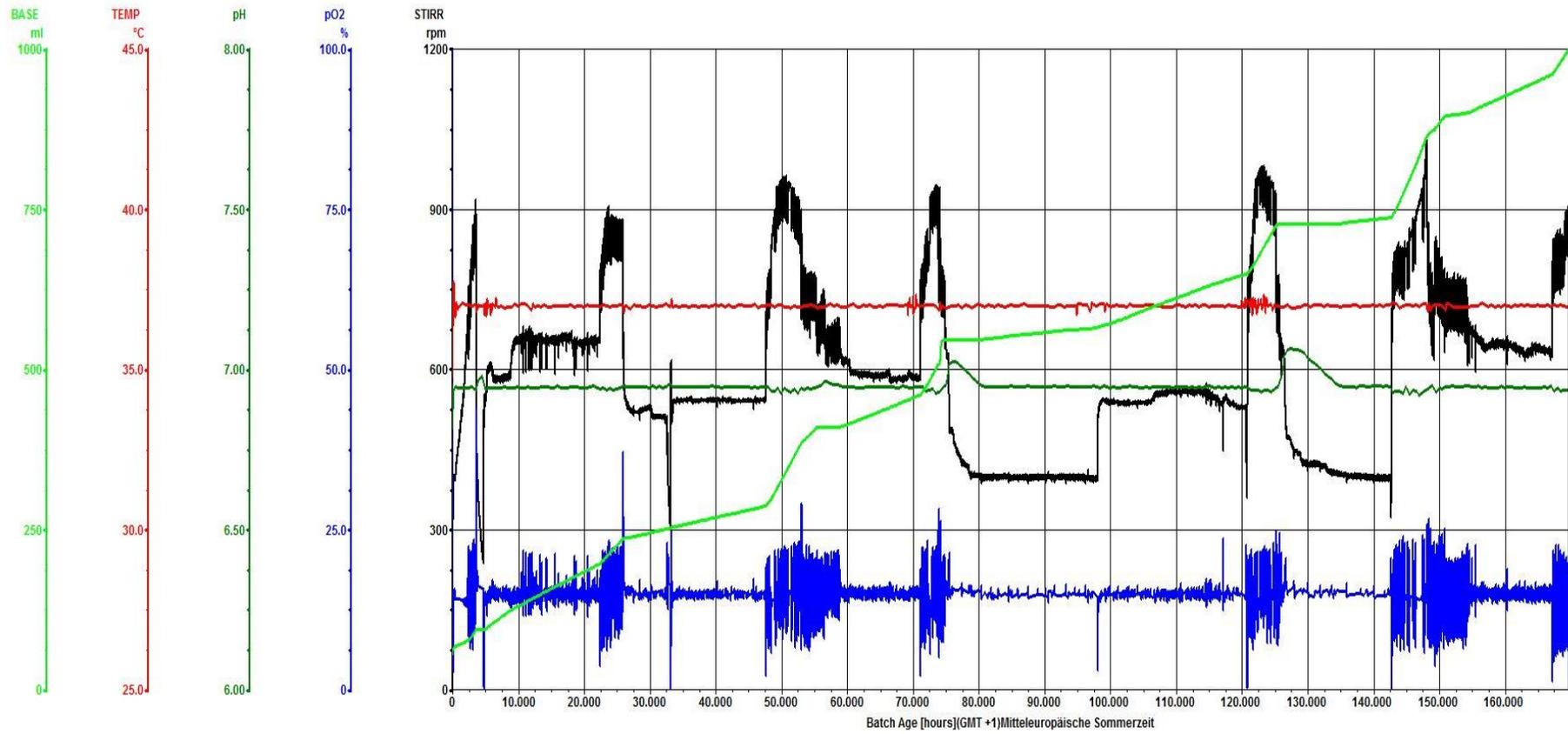
## Quellenverzeichnis

- [1] John Conner, et al: *The Biomanufacturing of Biotechnology Products, Biotechnology Entrepreneurship*. 1. Auflage, Academic Press, 2014
- [2] Horst Chmiel: *Bioprozesstechnik*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlage, 2006
- [3] D. Herbert, et al: *The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study*. Microbiology Society 1956
- [4] Blake Bertani, et al: *Function and biogenesis of lipopolysaccharides*. EcoSal Plus 2018
- [5] James B. Kaper, et al: *Pathogenic Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology 2004
- [6] Haeyoung Jeong, et al: *Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21*. Genome Announc 2015
- [7] Björn Beckmann: *Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate von Escherichia coli*. HAW Hamburg 2018
- [8] Patrick J. Shilling, et al: *Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli*. Communications Biology 2020
- [9] Federica Angius, et al: *A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase-based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins*. Scientific Reports 2018
- [10] Ernst Sanders: *Vorlesungsskript Fermentations- und Bioreaktortechnik*. HAW Hamburg 2019
- [11] Gautam Chauhan, et al: *With help from FDA, continuous manufacturing is gaining traction in pharmaceutical manufacturing*. Developments and Challenges: Adapting Continuous Manufacturing for Pharmaceuticals 2019
- [12] Christian Kaiser: *Vorlesungsunterlagen Fermentations- und Bioreaktortechnik*. HAW Hamburg 2020
- [13] Julian Kopp, et al: *Repetitive Fed-Batch: A Promising Process Mode for Biomanufacturing with E. coli*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 2020
- [14] Christian Kaiser: *Methoden zur Prozessüberwachung und Modellierung von Herstellungsprozessen rekombinanter Proteine mit Escherichia coli*. Leibniz Universität Hannover 2010
- [15] Marlon Scheffler: *Migration des Datenerfassungs- und Steuerungssystems für Bioreaktoren MFCS/win und exemplarische Kultivierung von E. coli BL21 nach dem i<sup>2</sup>HCDC-Verfahren*. HAW Hamburg 2019

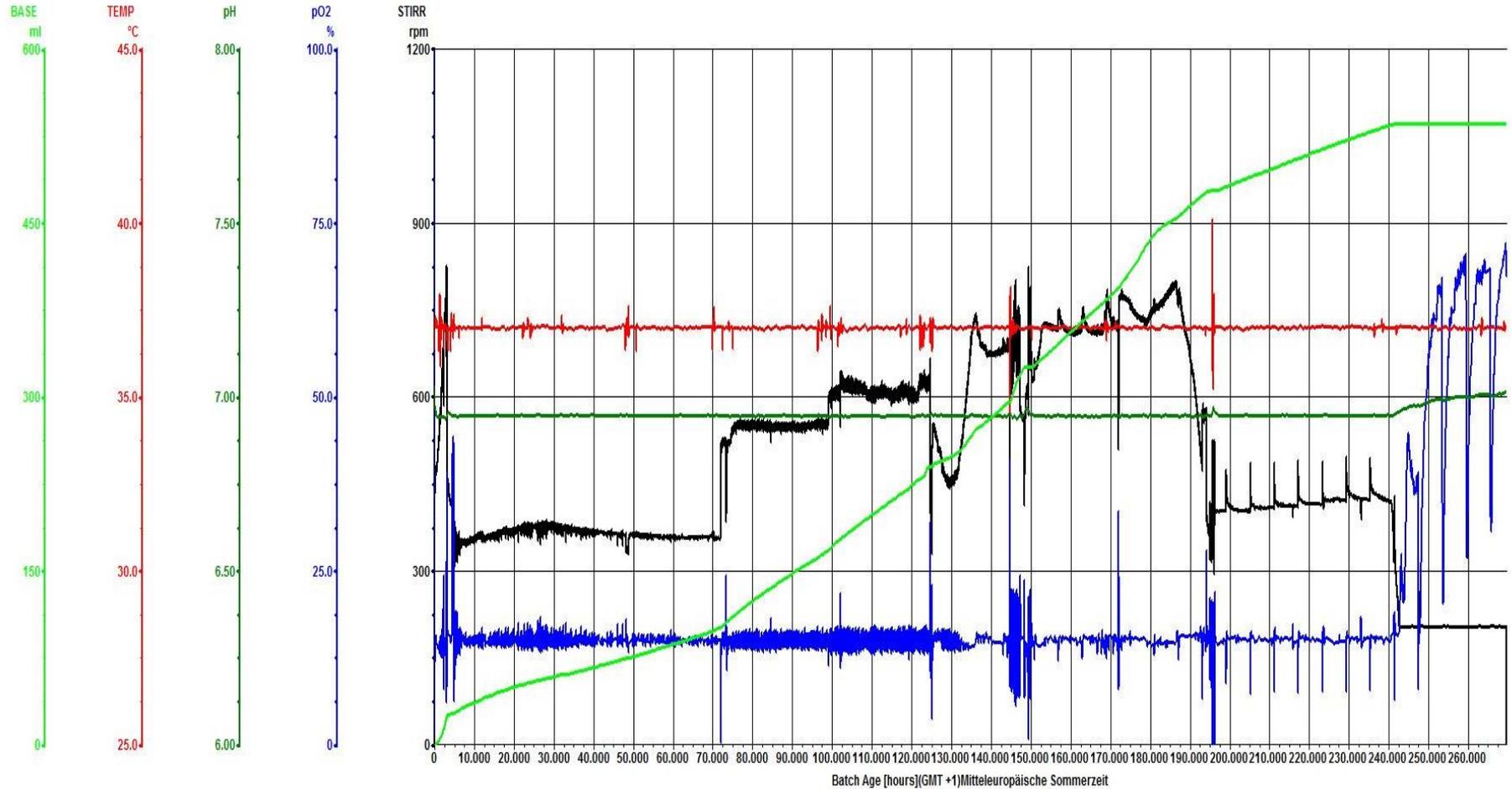
- [16] Beipackzettel Glucose-Kit Gluc DH-FS DiaSys
- [17] Introduction to Phase Contrast Microscopy: Microscopy U, <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy> - Abruf: 20. Juni 2021
- [18] Jacob Beal, et al: *Robust estimation of bacterial cell count from optical density*. Communications Biology 2020
- [19] Benjamin Volkmer, et al: *Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of Escherichia coli to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling*. PLoS one 2011
- [20] Christopher J. Hewitt, et al: *The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological response of Escherichia coli W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations*. Journal of Biotechnology 75 1999
- [21] Shiloach J, et al: *Growing E. coli to high cell density-a historical perspective on method development*. Biotechnol Advanced 2005
- [22] Brice Enjalbert, et al: *Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway*. Scientific Report 2017
- [23] D. Riesenber, et al: *High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate*. J Biotechnology 1991
- [24] Ernst Sanders: Praktikumsunterlagen Fermentations- und Bioreaktortechnik Praktikum. HAW Hamburg 2019
- [25] Kan Liu, et al: *Investigation and Modeling of Gas-Liquid Mass Transfer in a Sparged and Non-Sparged Continuous Stirred Tank Reactor with Potential in Syngas Fermentation*. Fermentation 2019
- [26] De Jong, et al: *Scalability in Laboratory Bioreactors Based on Constant Volumetric Mass Transfer Coefficient ( $kLa$ )*. Applikon Biotechnology
- [27] Criterion TGX Stain-Free Precast Gels. BioRad, <https://www.bio-rad.com/en-us/product/criterion-tgx-stain-free-precaster-gels?ID=N3GSCDHYP> – Abruf 28. Juni 2020

# Anhang

## Plot K1



Plot K2



## Prozessdaten K1

| Prozesszeit | D     | OD <sub>600</sub> | C <sub>XL</sub> | C <sub>XL,f</sub> | C <sub>SL Kit</sub> | C <sub>SL HPLC</sub> | C <sub>AL</sub> |
|-------------|-------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| 0:00        | -     | 1,12              | 0,55            | 0,42              | 8,59                | -                    | -               |
| 1:21        | -     | 2,67              | 1,75            | 0,99              | 8,03                | -                    | -               |
| 2:20        | -     | 6,14              | 3,20            | 2,29              | 6,63                | 5,50                 | 0,19            |
| 3:00        | -     | 8,94              | 3,90            | 3,33              | 2,92                | -                    | -               |
| 3:11        | -     | 10,48             | 4,65            | 3,91              | 1,51                | 1,23                 | 0,0             |
| 3:33        | -     | 12,03             | 4,70            | 4,48              | 0,0                 | -                    | -               |
| 4:00        | -     | 12,88             | 5,30            | 4,80              | 0,0                 | -                    | -               |
| 4:33        | 0,10  | 11,68             | 5,25            | 4,35              | 0,0                 | -                    | -               |
| 4:53        | 0,10  | 12,37             | 5,35            | 4,61              | 1,51                | 0,0                  | 0,0             |
| 5:25        | 0,10  | 12,44             | 5,45            | 4,64              | -                   | -                    | -               |
| 5:45        | 0,10  | 12,69             | 5,60            | 4,73              | -                   | -                    | -               |
| 5:55        | 0,10  | 12,72             | 5,70            | 4,74              | -                   | -                    | -               |
| 6:21        | 0,10  | 12,85             | 8,60            | 4,79              | -                   | -                    | -               |
| 6:32        | 0,10  | 13,39             | 8,35            | 4,99              | -                   | -                    | -               |
| 21:48       | 0,10  | 14,23             | 8,55            | 5,30              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 22:20       | 0,20  | 14,50             | 8,20            | 5,41              | -                   | -                    | -               |
| 22:35       | 0,20  | 14,53             | 9,05            | 5,42              | -                   | 0,23                 | 0,0             |
| 22:55       | 0,20  | 14,59             | 8,80            | 5,44              | -                   | -                    | -               |
| 23:19       | 0,20  | 15,19             | 8,50            | 5,66              | -                   | -                    | -               |
| 24:11       | 0,20  | 14,63             | 8,55            | 5,45              | -                   | -                    | -               |
| 25:21       | 0,20  | 14,92             | 10,85           | 5,56              | -                   | -                    | -               |
| 25:35       | 0,20  | 15,25             | 10,45           | 5,69              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 25:57       | 0,050 | 14,57             | 9,55            | 5,43              | -                   | -                    | -               |
| 26:19       | 0,050 | 14,83             | 8,95            | 5,53              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 27:13       | 0,050 | 14,67             | 9,00            | 5,47              | -                   | -                    | -               |
| 28:13       | 0,050 | 14,83             | 8,98            | 5,53              | -                   | -                    | -               |
| 46:59       | 0,050 | 13,35             | 9,95            | 4,98              | -                   | -                    | -               |
| 47:20       | 0,050 | 13,66             | 11,65           | 5,09              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 47:40       | 0,30  | 13,06             | 11,05           | 4,87              | -                   | -                    | -               |
| 48:00       | 0,30  | 13,42             | 10,95           | 5,00              | 2,40                | 1,70                 | 0,0             |
| 48:30       | 0,30  | 13,43             | 11,95           | 5,01              | -                   | -                    | -               |
| 48:57       | 0,30  | 13,93             | 12,50           | 5,19              | -                   | -                    | -               |
| 49:18       | 0,30  | 14,21             | 11,35           | 5,30              | -                   | -                    | -               |
| 50:15       | 0,30  | 13,87             | 9,90            | 5,17              | 4,28                | -                    | -               |
| 51:11       | 0,30  | 14,57             | 8,60            | 5,43              | -                   | -                    | -               |
| 52:13       | 0,30  | 14,05             | 8,00            | 5,24              | -                   | -                    | -               |
| 52:45       | 0,30  | 14,30             | 7,15            | 5,33              | 4,54                | 4,47                 | 0,49            |
| 53:16       | 0,075 | 13,91             | 6,75            | 5,18              | -                   | 3,58                 | 0,52            |
| 70:45       | 0,075 | 14,54             | 9,15            | 5,42              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 71:15       | 0,30  | 13,60             | 9,40            | 5,07              | -                   | -                    | -               |
| 71:39       | 0,30  | 13,60             | 8,80            | 5,07              | 1,48                | 1,38                 | 0,0             |

| Prozesszeit | D     | OD <sub>600</sub> | C <sub>XL</sub> | C <sub>XL,f</sub> | c <sub>SL</sub> Kit | c <sub>SL</sub> HPLC | C <sub>AL</sub> |
|-------------|-------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| 71:57       | 0,30  | 13,94             | 8,60            | 5,20              | -                   | -                    | -               |
| 72:17       | 0,30  | 14,05             | 8,30            | 5,24              | -                   | -                    | -               |
| 72:38       | 0,30  | 15,73             | 11,15           | 5,86              | 2,31                | -                    | -               |
| 72:57       | 0,30  | 15,38             | 8,75            | 5,73              | -                   | -                    | -               |
| 73:35       | 0,30  | 14,94             | 9,45            | 5,57              | 1,92                | 1,96                 | 0,25            |
| 94:45       | 0,025 | 11,81             | 10,45           | 4,40              | -                   | -                    | -               |
| 95:10       | 0,025 | 12,56             | 11,10           | 4,68              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 95:35       | 0,025 | 12,86             | 11,55           | 4,80              | -                   | -                    | -               |
| 96:49       | 0,025 | 12,91             | 12,80           | 4,81              | -                   | -                    | -               |
| 97:15       | 0,025 | 13,14             | 10,85           | 4,90              | -                   | -                    | -               |
| 97:35       | 0,025 | 12,69             | 12,10           | 4,73              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 118:30      | 0,075 | 13,81             | 13,55           | 5,15              | -                   | -                    | -               |
| 118:53      | 0,075 | 14,31             | 11,40           | 5,34              | -                   | -                    | -               |
| 119:25      | 0,075 | 14,39             | 12,80           | 5,36              | -                   | -                    | -               |
| 119:40      | 0,075 | 14,40             | 13,00           | 5,37              | -                   | -                    | -               |
| 120:45      | 0,30  | 14,40             | 14,55           | 5,37              | -                   | -                    | -               |
| 121:08      | 0,30  | 14,54             | 14,40           | 5,42              | -                   | 1,26                 | 0,36            |
| 121:25      | 0,30  | 14,21             | 13,00           | 5,30              | -                   | -                    | -               |
| 121:55      | 0,30  | 15,39             | 12,30           | 5,74              | -                   | -                    | -               |
| 122:49      | 0,30  | 15,39             | 10,80           | 5,74              | -                   | -                    | -               |
| 123:52      | 0,30  | 15,00             | 9,35            | 5,59              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 124:35      | 0,025 | 15,36             | 8,75            | 5,73              | -                   | -                    | -               |
| 141:00      | 0,025 | 13,76             | 9,95            | 5,13              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 141:40      | 0,025 | 14,63             | 10,65           | 5,45              | -                   | -                    | -               |
| 142:19      | 0,025 | 14,45             | 10,15           | 5,39              | -                   | 5,22                 | 0,32            |
| 143:15      | 0,20  | 12,46             | 8,65            | 4,65              | -                   | -                    | -               |
| 144:05      | 0,30  | 12,34             | 6,60            | 4,60              | -                   | -                    | -               |
| 145:25      | 0,30  | 10,00             | 7,05            | 3,73              | -                   | -                    | -               |
| 146:55      | 0,30  | 10,95             | 5,45            | 4,08              | -                   | -                    | -               |
| 147:35      | 0,30  | 12,16             | 6,70            | 4,53              | -                   | -                    | -               |
| 148:05      | 0,10  | 14,39             | 6,65            | 5,36              | -                   | -                    | -               |
| 148:15      | 0,10  | 14,29             | 6,65            | 5,33              | 5,66                | 0                    | 0,0             |
| 148:38      | 0,10  | 14,25             | 7,05            | 5,31              | -                   | -                    | -               |
| 149:09      | 0,10  | 14,24             | 6,80            | 5,31              | -                   | -                    | -               |
| 149:29      | 0,10  | 14,35             | 6,60            | 5,35              | -                   | -                    | -               |
| 149:49      | 0,10  | 14,40             | 6,40            | 5,37              | 1,73                | -                    | -               |
| 166:10      | 0,10  | 14,74             | 7,85            | 5,49              | -                   | -                    | -               |
| 166:32      | 0,10  | 14,45             | 7,65            | 5,39              | -                   | -                    | -               |
| 166:55      | 0,10  | 14,18             | 4,35            | 5,28              | -                   | 0,62                 | 0,13            |
| 167:18      | 0,30  | 15,25             | 6,90            | 5,69              | -                   | -                    | -               |
| 167:43      | 0,30  | 14,88             | 7,60            | 5,55              | -                   | 1                    | 0,39            |
| 168:03      | 0,30  | 13,95             | 7,55            | 5,20              | -                   | -                    | -               |
| 168:25      | 0,30  | 14,28             | 7,45            | 5,32              | -                   | -                    | -               |
| 168:45      | 0,30  | 14,54             | 7,30            | 5,42              | -                   | -                    | -               |

| <b>Prozesszeit</b> | <b>D</b> | <b>OD<sub>600</sub></b> | <b>c<sub>XL</sub></b> | <b>c<sub>XL,f</sub></b> | <b>c<sub>SL Kit</sub></b> | <b>c<sub>SL HPLC</sub></b> | <b>c<sub>AL</sub></b> |
|--------------------|----------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 169:05             | 0,30     | 14,39                   | 8,20                  | 5,36                    | 1,06                      | 1                          | 0,37                  |

## Prozessdaten K2

| Prozesszeit | D     | OD <sub>600</sub> | C <sub>XL</sub> | C <sub>XL,f</sub> | C <sub>SL Kit</sub> | C <sub>SL HPLC</sub> | C <sub>AL</sub> |
|-------------|-------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| 0:00        | -     | 1,27              | 0,65            | 0,51              | 7,67                | -                    | -               |
| 1:17        | -     | 2,43              | 1,47            | 1,04              | 7,07                | -                    | -               |
| 2:22        | -     | 5,34              | 2,40            | 2,30              | 4,13                | 4,67                 | 0,15            |
| 2:57        | -     | 7,55              | 3,37            | 3,25              | 2,11                | -                    | -               |
| 3:29        | 0,025 | 10,43             | 4,33            | 4,48              | 0,0                 | 0,27                 | 0,0             |
| 4:12        | 0,025 | 10,69             | 4,32            | 4,60              | 0,0                 | -                    | -               |
| 4:57        | 0,025 | 11,55             | 4,77            | 4,97              | 0,0                 | 0                    | 0,0             |
| 5:42        | 0,025 | 11,01             | 4,53            | 4,74              | -                   | -                    | -               |
| 6:12        | 0,025 | 11,41             | 4,47            | 4,91              | -                   | -                    | -               |
| 48:12       | 0,025 | 12,16             | -               | 5,23              | -                   | -                    | -               |
| 49:12       | 0,025 | 12,10             | -               | 5,20              | -                   | -                    | -               |
| 50:12       | 0,025 | 12,06             | 8,67            | 5,19              | -                   | -                    | -               |
| 50:47       | 0,025 | 12,20             | 7,07            | 5,25              | -                   | -                    | -               |
| 70:27       | 0,025 | 12,79             | 8,82            | 5,50              | -                   | -                    | -               |
| 71:12       | 0,025 | 12,65             | 9,13            | 5,44              | -                   | -                    | -               |
| 71:57       | 0,025 | 12,85             | 9,27            | 5,53              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 72:42       | 0,075 | 13,61             | 9,27            | 5,85              | -                   | -                    | -               |
| 73:12       | 0,075 | 13,28             | 9,75            | 5,71              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 74:12       | 0,075 | 12,94             | 8,47            | 5,56              | -                   | -                    | -               |
| 96:42       | 0,075 | 13,60             | 7,97            | 5,85              | -                   | -                    | -               |
| 97:42       | 0,075 | 14,10             | 8,73            | 6,06              | -                   | -                    | -               |
| 98:42       | 0,075 | 13,99             | 8,63            | 6,01              | -                   | -                    | -               |
| 98:57       | 0,075 | 14,08             | 8,40            | 6,05              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 100:42      | 0,10  | 14,63             | 8,83            | 6,29              | -                   | -                    | -               |
| 101:42      | 0,10  | 14,76             | 8,08            | 6,35              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 118:57      | 0,10  | 14,65             | 7,80            | 6,30              | -                   | -                    | -               |
| 119:57      | 0,10  | 14,60             | 6,90            | 6,28              | -                   | -                    | -               |
| 121:37      | 0,10  | 14,70             | 7,50            | 6,32              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 122:12      | 0,10  | 14,68             | 7,18            | 6,31              | 0,13                | -                    | -               |
| 122:42      | 0,10  | 14,48             | 7,13            | 6,22              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 123:12      | 0,10  | 14,31             | 7,63            | 6,15              | -                   | -                    | -               |
| 124:22      | 0,10  | 14,68             | 7,47            | 6,31              | 0,11                | 0                    | 0,0             |
| 143:22      | 0,10  | 12,69             | 6,07            | 5,46              | -                   | -                    | -               |
| 144:22      | 0,10  | 12,80             | 5,97            | 5,50              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 145:42      | 0,10  | 10,88             | 5,40            | 4,68              | 4,64                | 4,37                 | 0,24            |
| 147:12      | 0,10  | 13,65             | 6,30            | 5,87              | 1,32                | 1,57                 | 0,35            |
| 149:12      | 0,10  | 14,36             | -               | 6,18              | 0,11                | -                    | -               |
| 166:57      | 0,10  | 13,09             | 6,60            | 5,63              | 0,40                | 0                    | 0,0             |
| 167:57      | 0,10  | 13,28             | 5,83            | 5,71              | -                   | -                    | -               |
| 168:42      | 0,10  | 13,20             | 6,03            | 5,68              | -                   | 0                    | 0,0             |
| 169:12      | 0,10  | 13,29             | 6,23            | 5,71              | -                   | -                    | -               |

| <b>Prozesszeit</b> | <b>D</b> | <b>OD<sub>600</sub></b> | <b>c<sub>XL</sub></b> | <b>c<sub>XL,f</sub></b> | <b>c<sub>SL Kit</sub></b> | <b>c<sub>SL HPLC</sub></b> | <b>c<sub>AL</sub></b> |
|--------------------|----------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 169:42             | 0,10     | 13,30                   | 8,60                  | 5,72                    | -                         | -                          | -                     |
| 170:57             | 0,10     | 12,89                   | 8,30                  | 5,54                    | -                         | -                          | -                     |
| 171:57             | 0,10     | 12,81                   | 11,15                 | 5,51                    | -                         | -                          | -                     |
| 172:57             | 0,10     | 14,56                   | 8,75                  | 6,26                    | 0,0                       | 0                          | 0,14                  |
| 193:22             | 0,10     | 16,24                   | 9,45                  | 6,98                    | -                         | 0                          | 0,0                   |
| 194:02             | 0,10     | 12,25                   | 10,45                 | 5,27                    | -                         | -                          | -                     |
| 194:57             | 0,025    | 11,55                   | 11,10                 | 4,97                    | -                         | -                          | -                     |
| 195:42             | 0,025    | 10,16                   | 11,55                 | 4,37                    | -                         | 0                          | 0,0                   |
| 240:27             | 0,025    | 10,29                   | 12,80                 | 4,42                    | 0,0                       | 0                          | 0,0                   |
| 242:07             | 0,025    | 11,21                   | 10,85                 | 4,82                    | -                         | 0                          | 0,0                   |
| 268:47             | 0,025    | 11,85                   | 12,10                 | 5,10                    | 0,0                       | 0                          | 0,0                   |

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Oststeinbek, 23. Juni 2021

---

Ann Noela Thies