



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

Etablierung und Charakterisierung von Kultivierungen im Mikrotiterplattenformat

Im Studiengang Biotechnologie der Fakultät Life Science des Departments
Biotechnologie

Vorgelegt von

Brenda Wichmann
[REDACTED]

Abgabetermin am 19. Januar 2022
An der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Kaiser

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser für die Betreuung, sowie die Korrektur meiner Bachelorarbeit.

Ich danke Frau Petra Derr für die liebevolle Betreuung während der praktischen Durchführung meiner Versuche für die Bachelorarbeit.

Für die Zweitkorrektur bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen.

Ein weiterer Dank geht an Florian Schiffel aus dem Labor für angewandte Mikrobiologie.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Freunde, die mich während dieser Zeit unterstützen und mit Ratschlägen weitergeholfen haben und an meine Schwester aus Lübeck die mich seelisch unterstützt hat und immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

A.	Abbildungsverzeichnis.....	VI
B.	Tabellenverzeichnis.....	IX
C.	Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	<i>Escherichia coli</i>	3
2.2	Fermentation	4
3	Material und Methoden.....	9
3.1	Eingesetzter Stamm für die Kultivierung.....	9
3.2	Medien für die Kultivierung.....	9
3.3	Abschätzung der Kultivierungsdauer und Bestimmung der Wachstumsrate	11
3.4	Vorkultivierung	12
3.5	Batch-Kultivierung.....	12
3.5.1	Kultivierung in 6- und 12-Well Zellkulturplatten.....	13
3.5.2	Vorbereitung und Kultivierung in 6- und 12-Well MTP	14
3.5.3	24-Deepwell System von <i>Duetz</i>	15
3.5.4	Vorbereitung und Kultivierung im <i>Deepwell</i> System von <i>Duetz</i>	18
3.6	Probenahme und Bestimmung der optischen Dichte	19
3.6.1	Probenahme aus den MTP	19
3.6.2	Bestimmung der optischen Dichte.....	22
3.7	Charakterisierung der MTP-Formate.....	27
4	Ergebnisse und Diskussion.....	28
4.1	Charakterisierung von Mikrotiterplatten.....	28
4.1.1	Schüttelfrequenzen.....	28
4.1.2	Verdunstungsraten der verschiedenen MTP	30
4.2	Ergebnisse und Diskussion der Wachstumsraten von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) in der Batch-Kultivierung	36
4.2.1	Batch-Fermentation: Vorversuche im 6- und 12-Well MTP-Format sowie im Schüttelkolben	37
4.2.2	Fermentationen mit dem Kultivierungsorganismus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) im MTP-Format	44
5	Fazit und Ausblick	62
6	Literaturverzeichnis.....	64
7	Anhang	67
8	Eidesstattliche Erklärung.....	99

A. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>E. coli</i> BL21 [Hielscher 2022].....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Satzreaktors mit dem Reaktionsvolumen V_L und den Konzentrationen für das Substrat c_{SL} , der Biomasse c_{XL} und das Produkt c_{PL} [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].....	5
Abbildung 3: Online-Überwachung vom pH-Wert sowie von Sauerstoff in 24-Well MTP mittels SDR SensorDish® [Presens 2021].	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Schüttelkolbens mit Schikanen [Steinbücke et al 2013].....	8
Abbildung 5: Verwendete 6- und 12- Well Zellkulturplatten zur Kultivierung im Batch-Verfahren.....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des <i>Deepwell</i> System von <i>Duetz</i> [Franzgrote 2014].....	15
Abbildung 7: Darstellung vom Querschnitt der Mikrotiterplatte des <i>Duetz</i> Systems [Enzyscreen 2021].....	17
Abbildung 8: Reihenfolge der Probenahme vom 6 Well MTP-Format [Cellsignet 2021].....	20
Abbildung 9: Reihenfolge der Probenahme vom 12-Well MTP-Format [Cellsignet 2021].	21
Abbildung 10: 24-Well MTP mit <i>Blank</i> bei D1. Probenahme von D (1-6) nach A (1-6) [Cellsignet 2021].	21
Abbildung 11: Korrelationsgerade zur Umrechnung der OD vom PR zum Photometer (100 μ l)	25
Abbildung 12: Korrelationsgerade zur Umrechnung der OD vom PR zum Küvettenphotometer (120 μ l).....	26
Abbildung 13: Verdunstungsrate der 12-Well MTP in DB mit einem Füllvolumen von 1 ml pro Well. Einer Schüttelfrequenz von 200 rpm und einer Temperatur von 37 °C.....	31
Abbildung 14: Verdunstung im 6-Well Format in Prozent über 6 Stunden.....	32
Abbildung 15: Verdunstung im 12-Well Format in Prozent über 6 Stunden.....	33
Abbildung 16: Verdunstung im 24- <i>Deepwell</i> Format in Prozent über 6 Stunden	33
Abbildung 17: V01 - Kultivierung der Mutterzelle ZB im Schüttelkolben (Versuchseinheit 1)	40
Abbildung 18: V02 und V06 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben sowie im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 2). Angeimpft aus VK der ZB1	41
Abbildung 19: V03 und V07 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben sowie im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm. Angeimpft aus VK der ZB2 (Versuchseinheit 3)	42

Abbildung 20: V04 und V10 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben und im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 4). Angeimpft aus VK der ZB2	43
Abbildung 21: V06 und V07 - Vorversuch im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 5). Angeimpft aus Vorkulturen der ZB1 und ZB2 mit unterschiedlicher OD	45
Abbildung 22: V08 und V09 - Vergleich der DB im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 30 °C sowie 200 rpm (Versuchseinheit 6)	47
Abbildung 23: V10 - Vorversuch einer Kultivierung im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 7). Angeimpft aus einer Vorkultur	49
Abbildung 24: V11 – DB im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm. Vergleich der Wachstumsrate in den Ecken (E)- und Innenwells (I) (Versuchseinheit 8)	51
Abbildung 25: V11 und V12 - Vergleich der Wachstumsraten der Zellen in den Ecken- und Innenwells mit Außen (A)- und Innenwells im 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 9)	52
Abbildung 26: V11, V13, V14 und V15 - Vergleich der Wachstumsraten im 12-Well MTP-Format bei unterschiedlichen Temperaturen und Schüttelfrequenzen (Versuchseinheit 10). Aufgetragen als Mittelwert der DBs der MTPs	53
Abbildung 27: V06, V10 und V07 - Vergleich der Wachstumsraten der Vorversuche im 6- und 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 11). Angeimpft aus Vorkulturen.	55
Abbildung 28: V08 und V11 - Vergleich der Wachstumsraten im 6- und 12- Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 12). Angeimpft aus einer Kryokultur	56
Abbildung 29: V09 und V15 - Vergleich der Wachstumsraten im 6- und 12-Well MTP-Format bei 30 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 13). Angeimpft aus Kryokultur	57
Abbildung 30: V05 - Kontrolle des Mediums (Versuchseinheit 17)	61
Abbildung 31: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 5 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	67
Abbildung 32: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	67
Abbildung 33: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	68
Abbildung 34: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	68
Abbildung 35: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 1 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	69
Abbildung 36: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C	69
Abbildung 37: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 5 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C	70

Abbildung 38: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C.....	70
Abbildung 39: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C.....	71
Abbildung 40: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 300 rpm, Temperatur 37 °C.....	71
Abbildung 41: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C.....	72
Abbildung 42: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 300 rpm, Temperatur 30 °C.....	72
Abbildung 43: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C.....	73
Abbildung 44: V16- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe A und B (Versuchseinheit 14).....	85
Abbildung 45: V16- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe C und D (Versuchseinheit 14).....	86
Abbildung 46: V17- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe A und B (Versuchseinheit 15).....	89
Abbildung 47: V17- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe C und D (Versuchseinheit 15).....	90
Abbildung 48: V18_1- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe A und B (Versuchseinheit 16).....	93
Abbildung 49: V18_1- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe C und D (Versuchseinheit 16).....	94
Abbildung 50: V18_2- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe A und B (Versuchseinheit 16).....	97
Abbildung 51: V18_2- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe C und D (Versuchseinheit 16).....	98

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht einiger Bioreaktoren und dessen Anwendungsgebiete [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].	6
Tabelle 2: Einsatzkonzentrationen der Medienkomponenten	10
Tabelle 3: Geräte zum Ansetzen des Mediums	10
Tabelle 4: Geräte zur Durchführung der Kultivierung in 6- und 12-Well MTPs	14
Tabelle 5: Geräte zur Durchführung der Fermentation in 24-Deepwell Mikrotiterplatte	16
Tabelle 6: Geräte zum Messen der optischen Dichte	23
Tabelle 7: Geräte und Materialien zur Bestimmung der optischen Dichte im PR	24
Tabelle 8: Benötigte Geräte und Materialien für die Ermittlung der Schüttelfrequenzen sowie zur Bestimmung der Verdunstungsraten	27
Tabelle 9: Ergebnisse der Untersuchung zu unterschiedlichen Füllvolumen und Schüttelfrequenz-Kombinationen in 6-, 12- und 24-Well MTP	29
Tabelle 10: Verdunstungsraten der verschiedenen MTP-Formate mit den aufgeführten Parametern (* Verdunstungsrate um eine Stunde extrapoliert; - Verdunstungsrate nicht bestimmt)	31
Tabelle 11: Verdunstungsrate der verschiedenen Mikrotiterplatten in Prozent nach 6 Stunden (- := Verdunstungsrate nicht bestimmt)	34
Tabelle 12: Übersicht der Batch-Kultivierungen im MTP-Format und Schüttelkolben mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	36
Tabelle 13: Parameter zu den einzelnen Vorversuchen.	38
Tabelle 14: Parameter für die Vorkulturen	38
Tabelle 15: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer	39
Tabelle 16: Parameter zu den einzelnen Versuchen mit dem 6-Well MTP-Format	44
Tabelle 17: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)	44
Tabelle 18: Parameter zu den einzelnen Versuchen im 12-Well MTP-Format	48
Tabelle 19: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)	48
Tabelle 20: Parameter zu den einzelnen Versuchen.	54
Tabelle 21: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)	54
Tabelle 22: Parameter zu den einzelnen Versuchen im 24-Deepwell System von Duetz (*angeimpft mit Kryokultur)	58
Tabelle 23: V01 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm	73
Tabelle 24: V02 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm	73
Tabelle 25: V03 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm	74

Tabelle 26: V04 - Messwerte – Schüttelkolben 1: 37 °C, 200 rpm.....	74
Tabelle 27: V04 - Messwerte – Schüttelkolben 2: 37 °C, 200 rpm.....	74
Tabelle 28: V05 - Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm - Kontrolle vom Medium Versuch V18.....	74
Tabelle 29: V06 - Messwerte - 6-Well MTP: 37 °C, 200 rpm	75
Tabelle 30: V07 - Messwerte - 6-Well MTP: 37 °C, 200 rpm	75
Tabelle 31: V08 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 1: 37 °C, 200 rpm.....	76
Tabelle 32: V08 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 2: 37 °C, 200 rpm.....	76
Tabelle 33: V09 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 1: 30 °C, 200 rpm.....	77
Tabelle 34: V09 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 2: 30 °C, 200 rpm.....	77
Tabelle 35: V10 - Messwerte - 12-Well MTP: 37 °C und 200 rpm	78
Tabelle 36: V11 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 37 °C und 200 rpm.....	78
Tabelle 37: V11 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 37 °C und 200 rpm.....	79
Tabelle 38: V12 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 37 °C und 200 rpm.....	79
Tabelle 39: V12 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 37 °C und 200 rpm.....	80
Tabelle 40: V13 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 30 °C und 200 rpm.....	80
Tabelle 41: V13 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 30 °C und 200 rpm.....	81
Tabelle 42: V14 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 37 °C und 300 rpm.....	81
Tabelle 43: V14 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 2: 37 °C und 300 rpm	82
Tabelle 44: V15 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 1: 30 °C und 300 rpm	82
Tabelle 45: V15 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 2: 30 °C und 300 rpm	83
Tabelle 46: V16 - Messwerte - 24-Well MTP: 37 °C und 200 rpm	83
Tabelle 47: V16 - CV-Werte.....	84
Tabelle 48: V17 - Messwerte - 24-Well MTP: 37 °C und 200 rpm	87
Tabelle 49: V17 - CV-Werte.....	88
Tabelle 50: V18 - Messwerte - 24-Well MTP -Platte 1: 37 °C und 200 rpm.....	91
Tabelle 51: V18 - CV-Werte Platte 1	92
Tabelle 52: V18 - Messwerte - 24-Well MTP – Platte 2: 37 °C und 200 rpm	95
Tabelle 53: V18 - CV-Werte Platte 2	96

C. Abkürzungsverzeichnis

b	Verdunstungsrate [ml/h]
c_{PL}	Produktkonzentration [g/l]
c_{SL}	Substratkonzentration [g/l]
c_{XL}	Biomassekonzentration [g/l]
C	Stoffmengenkonzentration [mol/l]
CV	Variationskoeffizient
d	Schichtdicke vom durchstrahlten Körper [cm]
DB	Doppelbestimmung
DSP	<i>Downstream Processing</i>
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient [L/ mol cm]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ePTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
F	Verdünnungsfaktor
F-Boden	flacher Boden (<i>F-bottom</i>)
$f_{x/OD}$	Umrechnungsfaktor von OD auf BTM-Konzentration [g/l]
HK	Hauptkultur
I_0	Ausgangsintensität
I	Intensität
KF	Korrelationsfaktor
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
μ_{max}	maximale zellspezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]
n	Anzahl
OD	Optische Dichte
ΔOD_{mess}	Mittelwert der gemessenen OD bei 600 nm
ΔOD_{real}	Mittelwert der realen OD bei 600 nm
ΔOD_{MW}	Mittelwert der OD
OD_{blank}	OD vom Leerwert (engl. blank)
OD_{susp}	OD der Suspension
PR	<i>Plate Reader</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)

Stdabw.	Standardabweichung
t	Kultivierungszeit [h]
τ	Kultivierungstemperatur [°C]
USP	<i>Upstream Processing</i>
V_0	Anfangsvolumen [ml]
$V_{\text{Füll}}$	Füllvolumen [ml]
V_{Ino}	Inokulationsvolumen [ml]
V_{L}	Reaktionsvolumen [l]
V_{real}	reales Volumen [ml]
V_{verd}	Verdunstetes Volumen [ml]
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VK	Vorkultur
X	Reihenfolge der Probenahme sowie Animpfung
$y_{X/S}$	Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient [g _{BTM} /g _{SL}]
ZB	Zellbank

1 Einleitung und Zielsetzung

Biotechnologische Herstellungsprozesse lassen sich in zwei Bereiche einteilen, den *Upstream*-Prozess (USP) und den *Downstream*-Prozess (DSP). Der USP beschäftigt sich mit der Zellanzucht und Produktherstellung in Kultivierungsprozessen sowie mit den dafür erforderlichen Vorbereitungen und lässt sich in verschiedene Bereiche einteilen, wie z. B. die Kultivierung von Zellen sowie die Herstellung und Sterilisation der benötigten Medien. Der DSP beschäftigt sich mit allen Operationen nach der Kultivierung, wie der Aufreinigung des Produktes bis zum Erreichen der erforderlichen Qualität [Rohe 2012] und ist nicht Bestandteil dieser Arbeit.

In den 1860er Jahren wurden die Erlenmeyerkolben für das Arbeiten im chemischen Labor entwickelt und eingesetzt. 20 Jahre später wurden die ersten Kultivierungen von Mikroorganismen im Schüttelkolben durchgeführt.

In vielen verschiedenen Forschungsprojekten, wie z. B. der Stammentwicklung, werden oft nur geringe Kulturvolumina benötigt. Daher verwenden Forscher heute vermehrt Formate wie Mikrotiterplatten (MTP). In den 1950er Jahren wurde die erste MTP (die 96-Well-MTP) von Herrn Gyula Takatsy für serologische Studien entwickelt [Duetz 2007]. Seit den 2000er Jahren haben sich die MTP und die dazugehörigen Technologien rasant entwickelt [Duetz 2007].

Mit MTP sind sogenannte Screenings möglich. Dies bietet den großen Vorteil gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben, dass viele Kultivierungen simultan durchgeführt werden können. Diese Methode ist kostengünstiger, da sie Platz und Medien spart. Es gibt bis zu 384-Well-MTP, in denen gleichzeitig Kultivierungen durchgeführt werden können [Mandenius 2016]. Um dies reproduzierbar bewerkstelligen zu können müssen Pipettierroboter eingesetzt werden [Rohe 2012].

Diese Bachelorarbeit wurde an der Hochschule für angewandte Wissenschaften im Labor für Bioverfahrenstechnik des Departments Biotechnologie durchgeführt. Ziel ist die Etablierung und Charakterisierung von Kultivierungen in verschiedenen Mikrotiterplatten-Formaten.

Es werden sterile Zellkulturplatten im 6- und 12-Well-Format, sowie im mehrfach verwendbarem 24-Deepwell System von Duetz auf Einsatzmöglichkeiten und charakteristische Eigenschaften analysiert. Dabei muss geklärt werden innerhalb welcher Parameter, wie Schüttelfrequenz und Volumen, Kultivierungen in den einzelnen MTP-

Formaten reproduzierbar unter unlimitierten Bedingungen durchgeführt werden können. Bei der Auswertung wird insbesondere die Verdunstungsrate berücksichtigt. Sie hängt vom verwendeten System und Faktoren wie der Temperatur, des (Füll-) Volumens und der Schüttelfrequenz ab.

Zudem werden Wachstumsraten von *E. coli* BL21 (DE3) in verschiedenen MTP-Formaten bestimmt, auf Limitierungen untersucht und mit Werten von Batch-Kultivierungen im Schüttelkolben verglichen.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für die durchgeführten Versuche erläutert. Es wird auf den für die Kultivierungen in dieser Arbeit eingesetzten Organismus *E. coli* BL21 (DE3) (Kapitel 2.1) und die Fermentation (Kapitel 2.2) eingegangen.

2.1 *Escherichia coli*

Theodor Escherich entdeckte 1885 die Kolibakterien während einer Untersuchung der Darmbakterien von Säuglingen und Neugeborenen. Er nannte diese Bakterien *Bacterium coli commune*. 1919 wurden die Kolibakterien zu Ehren Theodor Escherichs in *Escherichia coli* umbenannt. *E. coli* ist der genetisch und molekularbiologisch weltweit am besten untersuchte Organismus. Sein Genom wurde im Jahr 1997 komplett sequenziert. [Steверding 2010].

E. coli (Abbildung 1) ist ein gramnegatives 1 - 2.5 µm langes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer äußeren Membran sowie einer Zellwand und einer Plasmamembran [Clark & Pazdernik 2009].

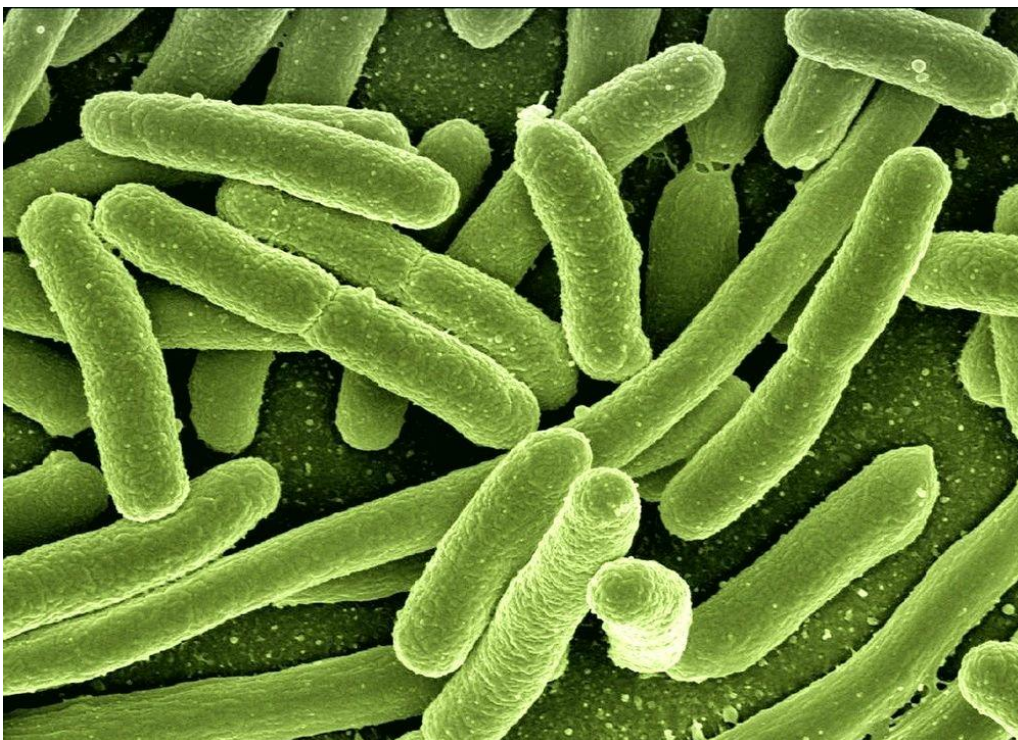


Abbildung 1: *E. coli* BL21 [Hielscher 2022].

Einzelne Stämme von *E. coli* sekretieren Toxine und sind somit pathogen. Zu den besonders pathogenen Stämmen gehört *E. coli* O157:H7. Dieser Stamm besitzt zwei Toxin Gene, die eine Diarrhö auslösen (flüssiger, blutiger Stuhl) und wird daher

Enterohämorrhagisches *E. coli* (EHEC) genannt [Antranikian 2006, Clark & Pazdernik 2009]. Die Toxine schädigen die Darmwand, so dass diese keine Flüssigkeit mehr aufnehmen kann. Für Kinder, ältere und immungeschwächte Menschen ist dieser Stamm deutlich gefährlicher als für gesunde adulte Menschen [Clark & Pazdernik 2009].

Die der niedrigsten Sicherheitsstufe zugeordneten *E. coli*-Laborstämme sind in der Regel ungefährlich und können für einfache Kultivierungen im Labor verwendet werden. Diese Organismen können sowohl auf Agar als auch auf flüssigen Kulturmedien wachsen. Unter idealen Kultivierungsbedingungen beträgt die Generationszeit etwa 20 Minuten [Antranikian 2006, Clark & Pazdernik 2009].

E. coli besitzen extrachromosomale Elemente, welche in Form von Plasmiden auftreten. Diese ringförmige DNA kann leicht aus den Bakterien extrahiert und durch Modifikation oder Hinzufügen von Genmaterial verändert werden. Außerdem kann der gramnegative Organismus in andere Bakterienzellen transformiert werden, in „denen die neuen Gene exprimiert werden“ sollen [Antranikian 2006, Clark & Pazdernik 2009]. Mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen lassen sich viele verschiedene Produkte bzw. biotechnologische Proteine, wie beispielsweise Enzyme oder Insulin herstellen. Insulin ist ein wichtiges Polypeptid-Hormon zur Bekämpfung von *Diabetis mellitus*, eine Art Zuckerkrankheit, welches sich seit 1982 durch gentechnische Verfahren mit rekombinanten Stämmen herstellen lässt [Antranikian 2006, Schmid 2016].

2.2 Fermentation

In der Fermentation können unterschiedliche Prozessführungsstrategien eingesetzt werden, wie z. B. die Batch-, Fed-Batch- und kontinuierliche Fermentation [Präve et al 1994]. In dieser Arbeit wird die Batch-Fermentation in verschiedenen MTP-Formaten sowie in Schüttelkolben durchgeführt.

Allgemein unterscheiden sich die drei genannten Prozessführungen durch die Art der Zufütterung. So werden beim Batch-Verfahren zu Beginn der Fermentation alle benötigten Substanzen hinzugegeben. Es wird während der Fermentation, mit Ausnahme von Korrekturmitteln und ggf. eines Induktors, nichts mehr zur Kulturbrühe hinzugegeben oder abgeführt [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]. Durch die begrenzte Zufuhr der Bestandteile ist die maximal zu erreichende Zellkonzentration limitiert. Bei der Fed-Batch Fermentation schließt sich an die Batch-Phase eine Fed-Batch Phase an, während der Nährstoffe zugefüttert werden. Somit lassen sich wesentlich höhere

Zellkonzentrationen und auch Produktausbeuten als in Batch-Prozessen erreichen. Bei der kontinuierlichen Fermentation werden Nährstoffen (Substrate) kontinuierlich zu- sowie Biomasse und Produkte kontinuierlich abgeführt, wobei das Fermentationsvolumen konstant gehalten wird [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018, Schmid 2016]

BIOREAKTOREN

Bioreaktoren, auch Fermenter genannt, sind geschlossene Reaktoren, deren Fassungsvermögen in der Regel von 1 L bis zu 500 m³ (Blasensäulenreaktor sogar bis zu 20'000 m³ an Volumen zur Abwasserbehandlung [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]) an Kultivierungsvolumen reicht. Der meistverwendete Bioreaktor ist der Rührreaktor [Schmid 2016]. Eine schematische Darstellung eines Satzreaktors unter Auf-führung der Substrat- c_{SL} , der Biomasse- c_{XL} und Produktkonzentration c_{PL} sowie dem Reaktionsvolumen V_L ist in Abbildung 2 aufgeführt [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].

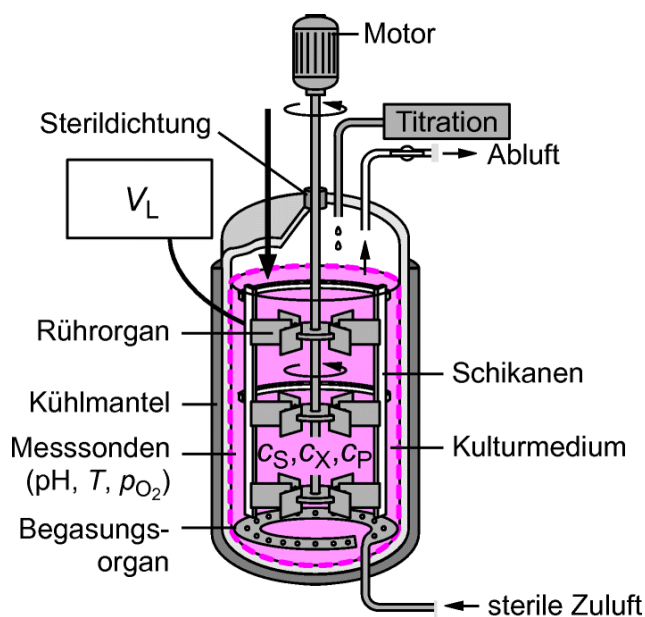


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Satzreaktors mit dem Reaktionsvolumen V_L und den Konzentrationen für das Substrat c_{SL} , der Biomasse c_{XL} und das Produkt c_{PL} [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].

Wie zuvor beschrieben müssen alle Nährstoffe für die Batch-Kultivierung vorgelegt werden. Dafür muss das Medium vor Beginn sterilisiert sowie der pH-Wert eingestellt werden. Auch während der Kultivierung muss der pH-Wert kontinuierlich mit Lauge und/oder Säure geregelt werden. Die benötigte Substratmenge, meist eine Zuckerquelle, muss vorgelegt werden. Bei einer aeroben Kultivierung muss für eine optimale Sauerstoffzufuhr gesorgt werden. Ebenso muss eine homogene Verteilung der

Kulturbrühe mit Hilfe von Rührwerken und Schikanen im Bioreaktor erreicht werden. Die benötigte Temperatur wird mit Hilfe eines Temperaturreglers eingestellt [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018, Schmid 2016]. Eine kleine Übersicht verschiedener Bioreaktoren ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht einiger Bioreaktoren und dessen Anwendungsgebiete [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].

Reaktor	Anwendung
Rohrreaktor	Bei Enzymen und Zellen, die als Biokatalysatoren verwendet werden. Kontinuierlicher Einsatz mit hohen Produktkonzentrationen möglich [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].
Blasensäule und <i>Airlift</i> Reaktor	Aerober Betrieb im großen Maßstab. Mit einem Volumina von > 300 m ³ . Einsatz z. B. bei „Abwasserbehandlung“ [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].
Einweg-Bioreaktoren	Züchtung von Blut- und Stammzellen sowie Gewebezellen. Herstellung von antiviralen Impfstoffen und therapeutischer Proteine bis zu 2000 L [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]

MIKROTITERPLATTEN

Wie bereits beschrieben können in MTP Screenings in sehr kleinem Maßstab für Prozessentwicklungen eingesetzt werden [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]. Dabei können parallele Kultivierungen von verschiedenen Stämmen durchgeführt werden, um unterschiedliche Produkte herzustellen [Duetz et al. 2000].

MTP sind in verschiedenster Ausführung erhältlich. Diese unterscheiden sich in Anzahl und Bauform der *Wells* sowie im eingesetzten Material (z. B. Polypropylen oder Polystyrol) und in Farbe und Transparenz (schwarzes, weißes, durchsichtig oder undurchsichtig) [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018].

Der ausreichende Sauerstoffeintrag in Mikrotiterplatten ist eine kritische Größe und muss für ein unlimitiertes Wachstum der Mikroorganismen sichergestellt werden. Der Sauerstoffübergang ist nur indirekt durch das Füllvolumen, die Schüttelfrequenz sowie die Auslenkung beeinflussbar [Duetz et al. 2000]. Bei zu geringem Sauerstoffeintrag bzw. einer Sauerstofflimitierung wachsen die fakultativ anaeroben *E. coli* deutlich

langsamer [Doig et al 2005, 24]. Fakultativ anaerobe Organismen stellen unter anaeroben Bedingungen den Stoffwechsel auf Gärung um und vergären Glucose zu Produkten, wie z. B: Ethanol, Wasserstoff, CO₂, Milchsäure, Essigsäure, und Ameisensäure [Antranikian 2006].

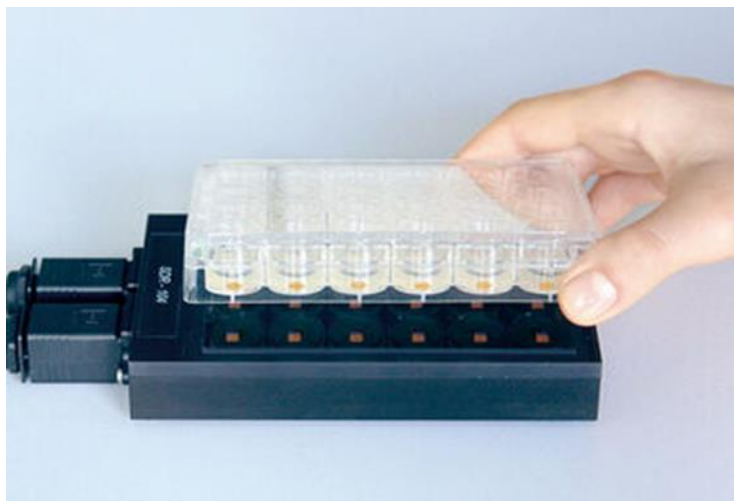
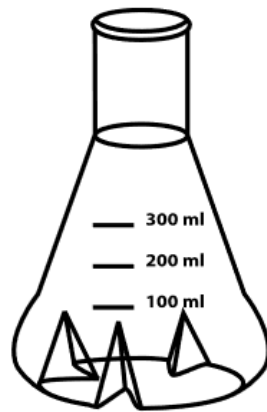


Abbildung 3: Online-Überwachung vom pH-Wert sowie von Sauerstoff in 24-Well MTP mittels SDR SensorDish® [Presens 2021].

Mit Hilfe von System wie dem SDR SensorDish® Reader (s. Abbildung 3) kann eine online-Überwachung von Sauerstoff und pH-Wert während der Kultivierung im 24-Well MTP-Format vorgenommen werden [Presens 2021].

SCHÜTTELKOLBEN

Schüttelkolben werden oft in der Biotechnologie in den ersten Entwicklungsstufen der Prozessentwicklung verwendet, da viele Versuche in kurzer Zeit durchgeführt werden können [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]. Bei Schüttelkolben handelt es sich um Erlenmeyerkolben, welche in verschiedenen Volumen erhältlich sind. Durch Kreisbewegung in einem Schüttelinkubator wird für einen ausreichenden Sauerstoffeintrag während der Kultivierung gesorgt [Schmid 2016, Steinbücke et al 2013]. Beim Erlenmeyerkolben ist ein Zehntel an Füllvolumen ideal zur Kultivierung der Organismen. Durch Schikanen (siehe Abbildung 4) im Innenraum des Schüttelkolbens wird der Sauerstoffeintrag zusätzlich erhöht, da die Kulturbrühe an den hineinragenden Einbuchtungen durch Rotation bricht [Steinbücke et al 2013].



Schikanen- kolben

Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Schüttelkolbens mit Schikanen [Steinbü-
cke et al 2013].

3 Material und Methoden

Im Folgenden wird auf die Materialien und Methoden in Bezug auf den eingesetzten Stamm (Kapitel 3.1), die Medien (Kapitel 3.2), die Kultivierungsvorgänge (Kapitel 3.4 und 3.5), die Probenahme und die Bestimmung der optischen Dichte (OD) (Kapitel 3.6) eingegangen.

3.1 Eingesetzter Stamm für die Kultivierung

Die meisten der im Labor und für die Herstellung rekombinanter Produkte eingesetzten *E. coli*-Bakterien gehören zu den B- und K-12-Stämmen [Noll et al. 2013, Studier & Moffatt 1986]. In dieser Arbeit wird das Derivat *E. coli* BL21 (DE3) vom Hersteller NEB® (C2527H), welches die modifizierte Lambda-Phage DE3 besitzt, als Kultivierungsorganismus eingesetzt. Dieser codiert für die T7-RNA-Polymerase und ermöglicht eine selektive und effiziente Expression für ein plasmidbasiertes Gen, welches sich unter der Kontrolle eines T7- Promoters befindet. *E. coli* BL21 und BL21 (DE3) wurden von Barbara A. Moffatt und William Studier entwickelt.

3.2 Medien für die Kultivierung

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein synthetisches Minimalmedium für die Batch-Kultivierung im MTP-Format sowie im Schüttelkolben eingesetzt. Dieses Medium weist einen exakt definierten Medienzusatz mit immer gleicher Zusammensetzung und Konzentration auf und enthält lediglich die essentiellen Bestandteile, die für das Wachstum der zu untersuchenden Mikroorganismen erforderlich sind [Munk 2018]. Das Minimalmedium wird gewählt, um gleiche Startvoraussetzungen sowie eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Es bietet genügend Nährstoffe, um eine gute Wachstumsrate für eine Kultivierung im gewählten Maßstab zu erreichen. Die Glucosekonzentration sowie das Füll- und Animpfvolumen, bzw. die Animpfzelldichte variiert für unterschiedliche Versuche. Die Zusammensetzung des Mediums mit den benötigten Substanzen und Konzentrationen der Kultivierung sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die für das Ansetzen der Kulturmedien und die Durchführung der Kultivierung verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Einsatzkonzentrationen der Medienkomponenten

Medienkomponenten	[g/l]	Hersteller
Glucose	4.5 - 15.0	Omikron (10-0236)
KH ₂ PO ₄	13.3	Roth (3904.1)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.00	Roth (P736.2)
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.20	Roth (P8283.1)
Spurenelemente	[mg/l]	
Titriplex III	8.40	Roth (8043.1)
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2.50	Riedel-de-Haën (12914)
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1.50	Riedel-de-Haën (31286)
H ₃ BO ₃	3.00	Riedel-de-Haën (11606)
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	15.0	Riedel-de-Haën (31422)
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2.50	Riedel-de-Haën (31439)
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	13.0	Roth (T884.1)
C ₆ H ₅ O ₇ Fe · X H ₂ O	100	Merck (1.03862.0500)

Tabelle 3: Geräte zum Ansetzen des Mediums

Geräte	Hersteller	Verwendung
Analysenwaage	Sartorius (BP 221 S)	Einwaage der Medienkomponenten
Waage	Sartorius (QUINTIX3102-1S)	Einwaage der Medienkomponenten
Autoklav	Systec (VX-150)	Sterilisation der Materialien und Medien
pH-Meter	Knick (pH-Meter 766 Calimatic)	pH-Wert Einstellung
Rührer	Heidolph (MR3001)	Homogenisation der Medien
Schüttelinkubator	New Brunswick (Innova 42)	Inkubation der Kulturen
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HERA Safe)	Steriles Arbeiten
Schikanekolben	Duran (1000 ml)	Gefäß für die Kultivierung

3.3 Abschätzung der Kultivierungsdauer und Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Planung der einzelnen Experimente muss die Kultivierungsdauer $t_{\text{HK,end}}$ abgeschätzt werden. Sie berechnet sich aus der Differenz der End-OD der Hauptkultur $\Delta\text{OD}_{\text{HK}}$ und der Anfangs-OD der Hauptkultur $\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}$ sowie der maximalen Wachstumsrate μ_{max} :

$$t_{\text{HK,end}} = \left(\frac{\ln \left(\frac{\Delta\text{OD}_{\text{HK}}}{\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}} \right)}{\mu_{\text{max}}} \right) \quad (3.1)$$

$\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}$ wird mithilfe von Formel (3.2) bestimmt. Dabei fließen die OD des Inokulums $\Delta\text{OD}_{\text{Ino}}$, das Inokulationsvolumen V_{Ino} und das Füllvolumen $V_{\text{Füll}}$ der Hauptkultur mit ein.

$$\Delta\text{OD}_{\text{HK},0} = \Delta\text{OD}_{\text{Ino}} * \left(\frac{V_{\text{Ino}}}{V_{\text{Füll}}} \right) \quad (3.2)$$

$\Delta\text{OD}_{\text{HK}}$ wird durch die $\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}$, die Substratkonzentration c_{SL} , den Substrat-Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ und den Umrechnungsfaktor $f_{x/OD}$ bestimmt. Dabei wird unlimitiertes Wachstum und vollständiger Substratverbrauch vorausgesetzt.

$$\Delta\text{OD}_{\text{HK}} = \Delta\text{OD}_{\text{HK},0} + \frac{c_{\text{SL}} * y_{X/S}}{f_{x/OD}} \quad (3.3)$$

Wobei $y_{X/S} = 0.5$ und $f_{x/OD} = 0.39 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ verwendet wird.

Die Kultivierungsdauer der Vorkultur lässt sich mit den gleichen Formeln berechnen. Es ändern sich nur die Variablen von $\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}$ zur Anfangs-OD der Vorkultur $\Delta\text{OD}_{\text{VK},0}$ und von $\Delta\text{OD}_{\text{HK}}$ zur End-OD der Vorkultur $\Delta\text{OD}_{\text{VK}}$. Zudem muss die spezifische Wachstumsrate μ_{max} angepasst werden.

Die Wachstumsrate der einzelnen Experimente wird bestimmt, indem die gemessenen $\Delta\text{OD}_{\text{MW}}$ logarithmisch ($\ln\Delta\text{OD}_{\text{MW}}$) aufgetragen und eine lineare Regression durch die Werte gelegt wird. Die Steigung der Geraden beschreibt die spezifische Wachstumsrate (die ermittelten Wachstumsraten sind in Kapitel 4.2 aufgeführt).

3.4 Vorkultivierung

Die Vorkultivierung wird ausschließlich für die Vorversuche eingesetzt. Alle weiteren Kultivierungen werden direkt aus der Kryokultur angeimpft, um einheitliche Startvoraussetzungen für jeden Versuch zu erhalten und Fehlerquellen zu minimieren. Die Zellen werden in Zellbankröhrchen als Kryokulturen mit einer optischen Dichte von ΔOD_2 in einem Glycerinmedium bei -80 °C tiefgefroren gelagert.

Am Nachmittag vor der Hauptkultivierung wird das Minimalmedium (Kapitel 3.2) der Vorkultur mit einem definierten Volumen der Kryokultur angeimpft, um die gewünschte End-OD bei gegebener Wachstumsrate und Inkubationszeit zu erreichen (Kapitel 3.3). Die Vorkultur wird anschließend über Nacht in einem 1000 ml Schüttelkolben mit 100 ml Füllvolumen bei einer Temperatur von 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm inkubiert.

3.5 Batch-Kultivierung

Als Referenz für das Wachstum der Zellen in den verschiedenen MTP Formaten wird die Batch-Kultivierung im Schüttelkolben durchgeführt. Zudem werden Vorkulturen im Schüttelkolben für Vorversuche angesetzt und die MTP damit angeimpft (vgl. Kapitel 3.5.2 und Kapitel 4.2). Die Hauptkultur im Schüttelkolben wird entweder mit einem definierten Volumen an Vorkultur oder aus einer Kryokultur angeimpft. Die gewählten Animpf- und Füllvolumina sowie die Kultivierungsdauer wird in Kapitel 4.2.1 dargestellt und wie in Kapitel 3.3 beschrieben ermittelt.

Die Bestimmung der optischen Dichte für die Kultivierung im Schüttelkolben sowie in der 6- und 12-Well MTP erfolgt mittels eines Photometers. Bei Kultivierungen im 24-Well MTP Format des Systems *Duetz* wird die optische Dichte mit Hilfe eines *Plate Readers* (PR) gemessen. Dafür werden von allen *Wells* mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette Proben gezogen und diese zügig in eine 96-Well MTP überführt. Die Wachstumsrate wird zur Überprüfung des gleichmäßigen Wachstums der Zellen ermittelt.

3.5.1 Kultivierung in 6- und 12-Well Zellkulturplatten

In dieser Arbeit wird die Fermentation in drei verschiedenen MTPs durchgeführt. Dabei handelt es sich um die 6-Well MTP (Abbildung 5. a), 12-Well MTP (Abbildung 5 b) und das 24-Deepwell System von *Duetz* (Kapitel 3.5.3).



a) 6-Well Zellkulturplatte [Fishersci 2021];



b) 12-Well Zellkulturplatte [Fishersci 2021]

Abbildung 5: Verwendete 6- und 12- Well Zellkulturplatten zur Kultivierung im Batch-Verfahren

Bei den 6- und 12-Well MTPs handelt es sich um transparente sterile *Multiwell* Platten mit flachem Boden (F-Boden) zur einmaligen Verwendung. Sie besitzen einen erhöhten Rand der *Wells*, wodurch die Verdunstung reduziert werden soll. Zudem befinden sich Kondensationsringe im Deckel zur Vermeidung bzw. Reduzierung von Kreuzkontaminationen [Carlroth 2021]. Außerdem ermöglicht die Abdeckung einen Austausch der Gase mit der Umgebung bei einer möglichst geringen Verdunstung [Fishersci 2021].

Das 6-Well MTP-Format besitzt ein Gesamtvolumen von 16 ml pro *Well*. Das vom Hersteller angegebene Kultivierungsvolumen beträgt 2-5 ml [Fishersci 2021]. Das Gesamtvolumen vom 12-Well MTP-Format beträgt 6.8 ml pro *Well* [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018]. Das Kultivierungsvolumen wird auf 2 ml begrenzt (ca. 30 % vom Gesamtvolumen), da keine Herstellerangabe vermerkt ist.

Tabelle 4: Geräte zur Durchführung der Kultivierung in 6- und 12-Well MTPs

Geräte	Hersteller	Verwendung
Zellkultur <i>Multiwell</i> Platten, 6-Well	Greiner Bio-One (CE54.1)	Kultivierung von bis zu 6 Fermentationen
Zellkultur <i>Multiwell</i> Platten, 12-Well	Case P1012 (EKX6.1)	Kultivierung von bis zu 12 Fermentationen
Schüttelinkubator	New Brunswick (Innova 42)	Inkubation der Kulturen
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HERA Safe)	Steriles Arbeiten
Dispensette	HandyStep touch Brand (705201)	Pipettieren des Mediums
Dispenser Tips	Brand (705718) (50 ml)	Aufnahme des Mediums
Einkanalpipette	VWR (100-1000 µl)	Animpfen und Probe ziehen

3.5.2 Vorbereitung und Kultivierung in 6- und 12-Well MTP

Bei der Vorbereitung der Fermentation und Kultivierung in 6- und 12-Well Zellkulturplatten werden die in Tabelle 4 aufgeführten Materialien verwendet.

Für die Fermentation in 6- und 12-Well-MTPs wird innerhalb einer Versuchsreihe das gleiche Minimalmedium (Kapitel 3.2) verwendet. Das Medium wird mit Hilfe einer Dispensette in die 6- bzw. 12-Well MTP überführt. Die Glukosekonzentration wird für jede Versuchsreihe angepasst. Es werden mehrere Versuche mit variierenden Füll- und Animpfvolumina (Kapitel 4.2) durchgeführt.

Bei der Kultivierung in der 6-Well MTP werden zwei verschiedene Füllvolumina mit einem Gesamtvolumen von 4 ml bzw. 5 ml verwendet.

Bei der 12-Well MTP wird bei jedem Versuch mit dem maximalen Füllvolumen von 2 ml gearbeitet. In Kapitel 3.6.1.1 sind die zwei verwendeten Pipettierschema der Versuche beschrieben. Auch die Animpfihenfolge, welche der Reihenfolge der Probenahme entspricht, wird dort näher erläutert.

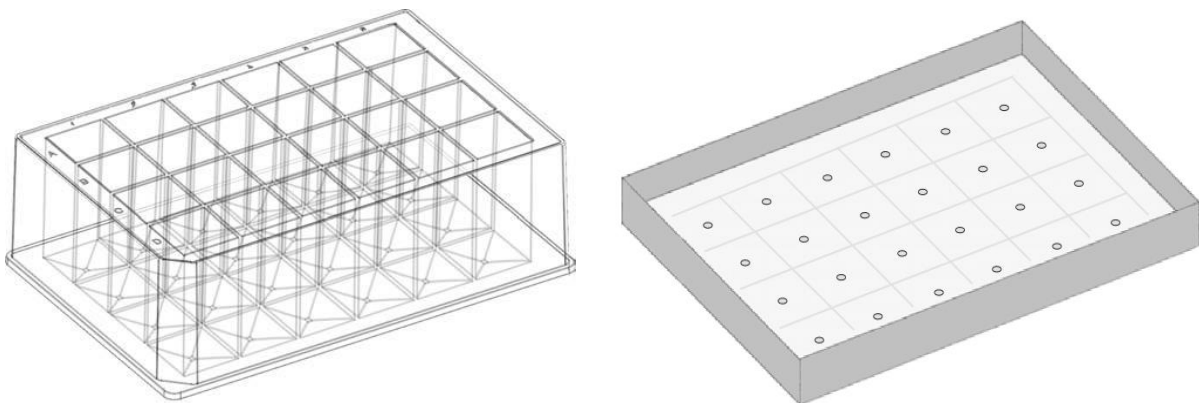
Die Batch-Fermentation in der 6-Well MTP wird mit einem Füllvolumen von 4 und 5 ml bei einer Temperatur von 30 und 37 °C sowie einer Schüttelfrequenz von 200 rpm durchgeführt. Bei der 12-Well MTP wird mit einem Füllvolumen von 2 ml und einer Temperatur von 30 und 37 °C sowie einer Schüttelfrequenz von 200 und 300 rpm inkubiert.

Die Platten werden unter sterilen Bedingungen angeimpft, mit dem Deckel verschlossen und anschließend im Schüttelinkubator in der Halterung fixiert. Um eine Wölbung des Deckels zu vermeiden ist zu beachten, dass die MTPs nicht zu fest eingespannt werden.

3.5.3 24-Deepwell System von Duetz

In dieser Arbeit wird das *Deepwell* System von *Duetz* verwendet, welches am biotechnologischen Institut in Zürich sowie von Wouter *Duetz* entwickelt und validiert wurde [Duetz et al. 2000, Duetz 2007].

Das *Deepwell* System von *Duetz* besteht aus einer 24-Well Mikrotiterplatte mit Pyramidboden mit einem Gesamtvolumen von 11 ml pro Well (Abbildung 6 a) und einem Deckel mit Silikoneinlage (Abbildung 6 b). Dieser Verbunddeckel besitzt Belüftungslöcher für den Sauerstoffeintrag und sorgt gleichzeitig für eine sterile Abdeckung. Zudem bewirkt diese Abdeckung, dass die Verdunstungsrate und damit der Flüssigkeitsverlust im System minimiert wird.



- a) Schematische Zeichnung einer 24-*Deepwell* Platte mit Pyramidboden
- b) Schematische Darstellung des Verbunddeckels mit Belüftungslöchern zum Sauerstoffeintrag

Abbildung 6: Schematische Darstellung des *Deepwell* System von *Duetz* [Franzgrote 2014].

Die MTP und der Verbunddeckel werden mit Hilfe einer Einspannvorrichtung im Schüttelinkubator während des Kultivierungsvorganges fixiert. Dabei ist zu beachten, dass die Platte nicht zu fest eingespannt wird. Andernfalls kann der Sauerstoffeintrag beeinträchtigt oder gar ganz unterbunden werden. Laut Hersteller können Kulturvolumen von 2 ml bis maximal 4 ml genutzt werden. Ein Kulturvolumen von 2.5 ml ist jedoch vom Hersteller empfohlen [Enzyscreen 2021].

Das benötigte Equipment für die Kultivierung im *Duetz*-System ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Geräte zur Durchführung der Fermentation in 24-*Deepwell* Mikrotiterplatte

Geräte	Hersteller	Verwendung
24- <i>Deepwell</i> Microplates (Mikrotiterplatte)	EnzyScreen (CR1424)	Kultivierung von 24 Fermentationen
24- <i>Deepwell</i> Sandwich Cover (Verbunddeckel)	EnzyScreen (CR1224b)	Abdecken der MTPs
Clamps	Kuhner (SMCR1703)	Fixieren der MTPs im Schüttelinkubator
Schüttelinkubator	New Brunswick (Innova 42)	Inkubation der Kulturen
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HERA Safe)	Steriles Arbeiten
Autoklav	Systec (VX-150)	Sterilisation der MTP mit Deckel
Trockenschrank	Heraeus (vacutherm)	Trocknung der MPT mit Deckel
Dispensette	Brand (HandyStep touch) (705201)	Pipettieren des Mediums und Animpfen
Dispenser Tips	Brand (50 ml) (705718) (5 ml) (705710)	Aufnahme des Mediums und Animpfen
Multikanalpipette	Eppendorf (20-200 µl u. 30-300 µl)	Probenahmen aus den MTPs
Einkanalpipette	VWR (100-1000 µl)	Animpfen
Zentrifugenröhrchen	Roth (50 ml) (AN97.1)	Mischen des Mediums mit Kryokultur

In Abbildung 7 ist der Querschnitt eines einzelnen *Wells* des *Duetz* Systems mit dem Aufbau des Edelstahldeckels und dessen verschiedenen Schichten dargestellt. Die blaue Schicht stellt einen Mikrofaserfilter dar. Die grüne Schicht besteht aus einem ePTFE-Filter, der sich zwischen zwei Polyester und Polyamidstoffen befindet. In Gelb dargestellt befindet sich darunter eine Silikonschicht mit 24 Löchern, ein Loch für jedes *Well*. Zusammen bilden sie das Belüftungssystem der Mikrotiterplatte [EnzyScreen 2021].

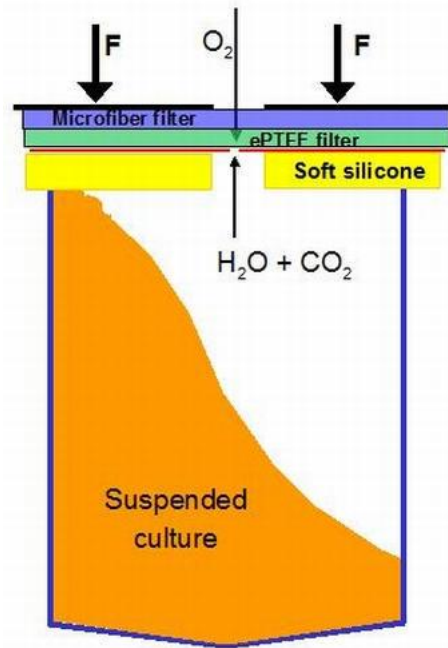


Abbildung 7: Darstellung vom Querschnitt der Mikrotiterplatte des *Duetz* Systems [Enzysscreen 2021]

Die Mikrotiterplatten von *Duetz* können mehrfach verwendet werden. Vor und nach einer Kultivierung werden die MTPs in einem Autoklaven sterilisiert. Für den Autoklaviervorgang werden die MTPs zunächst von Innen mit VE-Wasser befeuchtet damit sich Dampf während der Sterilisation bilden kann. Die Platten werden mit einem Deckel verschlossen und in einem Autoklavierbeutel bei 121 °C und einer Haltezeit von 20 Minuten autoklaviert. Nach der Sterilisation wird die Platte von dem Autoklavierbeutel befreit und im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet, bis keine Feuchtigkeitsrückstände mehr vorhanden sind.

Nach erfolgter Sterilisation sind die Platten für eine Kultivierung einsatzbereit und können unter der Sterilwerkbank mit Medium befüllt werden.

Nach der Kultivierung werden die Mikrotiterplatten mitsamt der Kulturbrühe erneut in einem Autoklavierbeutel bei 121 °C und einer Haltezeit von 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Dabei ist zu beachten, dass auf keinen Fall Kulturbrühe in die Membran des Deckels gelangt. Eine schräge Haltung beim Transport der MTP ist zu vermeiden. Nach dem Autoklavieren müssen die Platten entleert und mit einer Bürste gesäubert werden. Der Deckel darf nur mit einem Tuch abgewischt werden, um ein Fluten der Belüftungslöcher der Membran zu vermeiden. Nach der manuellen Reinigung ist es von Vorteil die Platte in einer Geschirrspülmaschine zu säubern.

3.5.4 Vorbereitung und Kultivierung im *Deepwell* System von *Duetz*

Nachdem die MTP für die Fermentation vorbereitet wurde, wird sie unter der Sicherheitswerkbank geöffnet und befüllt. Um die Methode zu optimieren, werden in dieser Arbeit drei verschiedene Verfahren zum Befüllen des *Deepwell* Systems mit dem Medium sowie zum Animpfen mit der Kryokultur durchgeführt (Kapitel 4.2.2.3). Das Gesamtvolumen von 4 ml ist in jedem Versuch im *Deepwell* System identisch, nur das Animpfvolumen variiert. Die verwendeten Animpfvolumina der Versuche sind in Kapitel 4.2.2.3 in Tabelle 22 aufgeführt.

Die Batch-Fermentation im *Deepwell* System wird stets mit 4 ml Füllvolumen pro *Well*, einer Temperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm durchgeführt. In allen Versuchen mit dieser MTP werden 23 *Wells* mit der Kryokultur angeimpft. Ein *Well* wird zur Kontrolle der Sterilität des Mediums und der MTP nur mit Medium befüllt, damit eine Kontamination ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 10). Ansonsten herrschen pro Versuch in allen *Wells* die gleichen Voraussetzungen.

Im ersten Versuch des *Deepwell* Systems wird das Minimalmedium mit Hilfe einer Dispensette in die MTP überführt. Anschließend wird die MTP mit dem Fermentationsmedium auf die erforderliche Kultivierungstemperatur im Schüttelinkubator vorgewärmt. Nachdem die Fermentationstemperatur erreicht ist, muss sie zügig unter der Sicherheitswerkbank mit Hilfe einer einkanaligen Pipette und entsprechendem Volumen der Kryokultur angeimpft werden.

Im zweiten Versuch wird das Medium zunächst auf Kultivierungstemperatur aufgewärmt, mit der Kryokultur homogen in zwei *Tubes* vermengt und anschließend mit Hilfe der Dispensette in die MTP überführt.

Beim letzten Versuch wird das Medium mit der Dispensette in die MTP überführt und im Schüttelinkubator auf Fermentationstemperatur gebracht. Anschließend wird die MTP mit einem definierten Volumen der Kryokultur mittels Dispensette angeimpft.

3.6 Probenahme und Bestimmung der optischen Dichte

In diesem Kapitel werden die Probenahme sowie die Bestimmung der optischen Dichte erläutert. Ziel ist es für die Batch-Kultivierung, sowohl im Schüttelkolben als auch in den verschiedenen MTP-Formaten, die OD zu bestimmen

3.6.1 Probenahme aus den MTP

Die Probenahme und Messung erfolgt in den 6-, 12- und 24-Well-MTP unterschiedlich. Bei jeder Probenahme verliert die Kulturbrühe an Volumen. Da bei der Kultivierung im Mikrotiterplattenformat mit geringen Volumen gearbeitet wird, muss jede Probenahme bzw. jeder Messpunkt genau überlegt sein. Zudem wird bei jeder Probenahme die Kultivierung unterbrochen, was sich auf die Temperatur und den Sauerstoffeintrag und damit ggf. auf die Wachstumsrate auswirkt. Für jede Probenahme muss die MTP aus dem Schüttelinkubator entnommen werden und für eine gewisse Zeit bei Raumtemperatur und ohne Sauerstoffeintrag in die Sicherheitswerkbank überführt werden. Um die daraus resultierenden Störeffekte so gering wie möglich zu halten, müssen die Entnahmen so schnell wie möglich erfolgen.

Die Probenahme der 6- und 12-Well-Mikrotiterplatten erfolgt jeweils aus einem Well zurzeit in definierter Reihenfolge und mit bestimmten Zeitabständen. Die OD der Proben werden jeweils mit dem Küvettenphotometer gemessen. Die Probenahme bei dem 24-Deepwell-System von Duetz erfolgt mittels Mehrkanalpipette. Die Proben werden zügig in die 96-Well-Mikrotiterplatte überführt, in welcher die OD-Messung in einem Plate-Reader erfolgt. Im Folgenden wird die Probenahme aus den verschiedenen Mikrotiterplattenformaten dargestellt.

3.6.1.1 Probenahme der 6- und 12-Well-Mikrotiterplatten

Die systematische Bezeichnung der einzelnen Wells der MTP sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Probenahme für die Messung der OD (Doppelbestimmung (DB) im Küvettenphotometer) erfolgt jeweils von X1 (Probenahmezeitpunkt 1) aufsteigend bis X6 (Probenahmezeitpunkt 6). In jedem Versuch werden insgesamt zwei bis drei Proben pro Well gezogen, um genügend Messpunkte für eine Aussage über die Well zu Well-Vergleichbarkeit des Zellwachstums zu erhalten und gleichzeitig das geringe Kultivierungsvolumen zu berücksichtigen. Zudem wird durch das Animpfen mit der Kryokultur die Anfangs-OD so eingestellt, dass spätestens bei der zweiten Probenahme im jeweiligen Well das erforderliche Probevolumen reduziert werden kann.

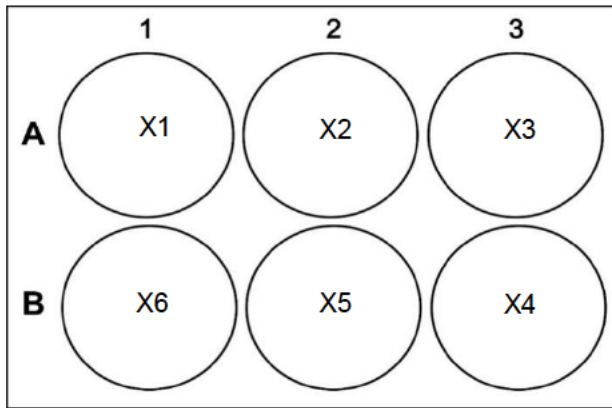
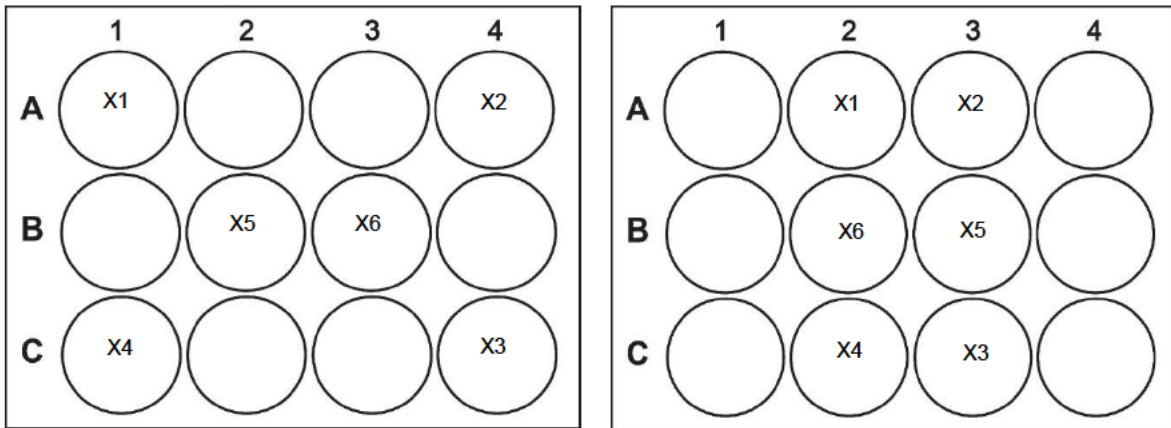


Abbildung 8: Reihenfolge der Probenahme vom 6 Well MTP-Format [Cellsignet 2021].

Da bei der 12-Well MTP nur mit maximal 2 ml Kulturvolumen gearbeitet werden kann, muss die Probenahme im Vergleich zu den 6-Well MTP angepasst werden. In der ersten Runde werden je Well 1.0 ml Probe für die DB der Optischen Dichte gezogen. Für jede der beiden Messungen mit der Mikro Küvette im Photometer werden etwa 500 µl benötigt. Um das Probenahmenvolumen zu reduzieren, werden die einzelnen Wells mit einem höheren Kryokulturvolumen angeimpft. Dadurch wird ermöglicht, dass zeitnah verdünnt werden kann und nur noch ein Probenahmenvolumen von insgesamt 200 µl (F5 Verdünnung) und weniger für die DB benötigt wird (Kapitel 3.6.2.1).

Bei der Fermentation in den 12-Well Mikrotiterplatten werden nur sechs Wells zurzeit angeimpft, da ein gleichzeitiges zügiges Messen aller Wells ist mit dieser Methode nicht möglich ist. Die Proben werden einzeln gezogen und als DB im Küvettenphotometer gemessen. Um alle wichtigen Punkte der 12-Well MTP zu erfassen, werden zwei Probenahmeschemata eingesetzt. Diese sind in Abbildung 9 dargestellt. Pro Versuch wird ein Schema verwendet. Schema b wird nur in Versuch V12 (Abbildung 9 b) angewendet, um herauszufinden, ob ein vergleichbares Wachstum der Zellen in den Außen- und Innenwells stattfindet (Kapitel 4.2.2.1). Dadurch werden so gut wie alle Punkte erfasst. Das Probenahmeschema in Abbildung 9 a wird in allen weiteren Versuchen angewandt, da Versuch V12 gezeigt hat das die Position der Wells keinen relevanten Einfluss auf das Wachstum hat. Well B1 und B4 sind Außenwells die nicht mit Probe getestet werden, da angenommen wird, dass das Wachstum der Zellen auch hier nahezu gleichmäßig verläuft.



a) Probenahme der Ecken und Innenwells

b) Probenahme der Außen- und Innenwells

Abbildung 9: Reihenfolge der Probenahme vom 12-Well MTP-Format [Cellsignet 2021].

3.6.1.2 Probenahme der 24-Deepwell Mikrotiterplatte von Duetz

Die Probenahme des *Deepwell* Systems erfolgt mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette. Bei der Probenahme tauchen gleichzeitig zwei Pipettenspitzen in die *Wells* ein und entnehmen jeweils ein Volumen von 100 μl . So ist es möglich während eines Pipettiervorganges mit der 12-Kanal-Pipette sechs *Wells* in DB gleichzeitig in eine 96-Well Mikroplatte zu überführen. Abbildung 10 zeigt das Schema der 24-Well MTP. Die Probenahme erfolgt pro Entnahme in vier Pipettierschritten von D (1-6) nach A (1-6). Ein zügiger Probentransfer der 23 Kultivierungen sowie des *Blanks* ist somit möglich.

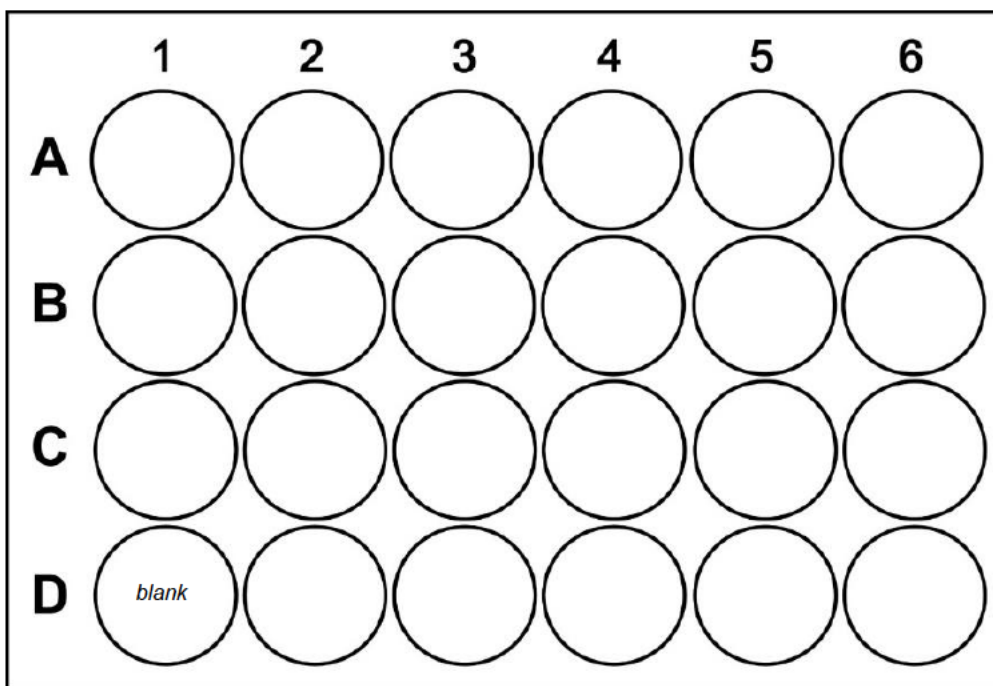


Abbildung 10: 24-Well MTP mit *Blank* bei D1. Probenahme von D (1-6) nach A (1-6) [Cellsignet 2021].

3.6.2 Bestimmung der optischen Dichte

Um das Wachstum der Zellen zu bestimmen, wird die OD ermittelt. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Messung gewählt. Um eine parallele Messung der Proben des 24-*Deepwell* Systems von *Duetz* durchzuführen wird ein *Plate-Reader* (PR) für die DB eingesetzt. Mit dem PR können 96 Proben gleichzeitig gemessen werden. Alle anderen Proben (Kryokultur, Schüttelkolben, 6- und 12-*Well* MTP Proben) werden im Küvettenphotometer als DB gemessen.

Bei Fermentationsproben wird die OD standardmäßig bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Es wird hierbei die Extinktion bzw. Trübung gemessen. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt, dass die Extinktion

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot C \cdot d \quad (3.4)$$

über den Logarithmus der Intensität des eingestrahnten Lichts bzw. der Ausgangsintensität I_0 zur gemessenen Intensität I gebildet wird. Zudem ist die Extinktion proportional zur Stoffmengenkonzentration C , der Schichtdicke d der Küvette bzw. vom durchstrahlten Körper sowie dem Extinktionskoeffizienten ε [Jansohn & Rothämel 2012, Franzgrote 2014].

Die optische Dichte ΔOD

$$\Delta OD = F(OD_{\text{susp}} - OD_{\text{blank}}) \quad (3.5)$$

wird berechnet, indem die Differenz der gemessenen optischen Dichte von der Suspension (OD_{susp}) und dem Medium (OD_{blank}) mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert wird. Ab einer OD von 0.6 muss die Kulturbrühe verdünnt werden, um im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetz arbeiten zu können [Dammann 2015].

Die OD wird in dieser Arbeit als DB gemessen und daraus der arithmetische Mittelwert ΔOD_{MW} gebildet.

$$\Delta OD_{\text{MW}} = \frac{\Delta OD_{\text{P1}} + \Delta OD_{\text{P2}}}{2} \quad (3.6)$$

3.6.2.1 OD Messung im Küvettenphotometer

Mit Hilfe des Küvettenphotometers wird die optische Dichte der Kulturbrühe zu ausgewählten Zeitpunkten gemessen. Die Messung erfolgt in Mikro-Küvetten mit einem Probenvolumen von 500 µl. Bis zu einer OD von 0.6 wird unverdünnt gemessen. Liegt die OD zwischen 0.6 und 3 wird im Verhältnis 1:5 verdünnt und ab einer OD von 3 bis 15 wird die Kulturbrühe im Verhältnis 1:25 verdünnt. Um die genaue Zellkonzentration zu ermitteln und Matrixeffekte bezüglich der OD auszuschließen, wird die gemessene OD des reinen Mediums abgezogen. Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Geräte zum Messen der optischen Dichte

Geräte	Hersteller	Verwendung
Küvettenphotometer	Pharmacia (Pharmacia LKB Ultrospec III)	OD-Messung der Kulturen
Mikro-UV-Küvetten	Brand (7592 10)	Gefäß zur Messung der optischen Dichte
Pipetten	VWR (10-100 µl u. 100-1000 µl)	Sterile Probennahme und zum Animpfen
Pipettenspitzen	Sorensen BioScience Inc MultiGuard <i>Barrier Tips</i> . (1-200 µl u. 50-1250 µl)	Sterile Probennahme und zum Animpfen
Pipetten	Rainin (10-100 µl u. 100-1000 µl)	Probenahme und Verdünnung der Proben
Pipettenspitzen	Brand (2-200 µl) (Z740094) Roth (100-1200 µl) (B006.1)	Probennahme zum Messen der OD

3.6.2.2 OD Messung im *Plate Reader*

Für eine vergleichbare Bestimmung der OD im 24-*Deepwell* System müssen viele Proben gleichzeitig als DB gemessen werden. Dies wird durch einen PR ermöglicht. Die Proben werden mit Multikanalpipetten in ein 96-*Well* Plate überführt. Das Gesamtvolumen beträgt entweder 100 µl oder 120 µl, je nach Volumenbereich der verwendeten Multikanalpipette. In dieser Arbeit werden drei verschiedene Multikanalpipetten zum Überführen der Proben verwendet (s. auch Kapitel 4.2.2.3). Bei der Messung der OD wird maximal 1:5 verdünnt. Bei der Multikanalpipette mit einem Pipettiervolumen von 30-300 µl wird im Verhältnis von 1:4 verdünnt. Im PR werden die Proben vor der OD Messung 20 Sekunden geschüttelt, um Blasen und Inhomogenität der Kulturbrühe zu

vermeiden, da diese das Ergebnis verfälschen könnten. Die benötigten Materialien und Geräte zur Messung der OD mittels PR sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Geräte und Materialien zur Bestimmung der optischen Dichte im PR

Geräte	Hersteller	Verwendung
Abdeckung der 96-Well Mikrotiterplatte	Rotilabo Boettger (9297.1)	Abdeckung der 96-Well Platte
96-Well Mikrotiterplatte (F-Bottom)	Rotilabo Boettger (9293.1)	Vorlage zur OD-Messung
Multikanalpipette	Eppendorf (10-100 µl) u. 30-300 µl)	Transfer und Verdünnung der Proben
PR Infinite M200PRO NanoQuant	Tecan	OD-Messung der Kulturbrühe in einer MTP

3.6.2.3 Korrelationsfaktor

Der Korrelationsfaktor (KF) wird bestimmt, um eine Vergleichbarkeit der gemessenen OD zwischen dem PR und dem Photometer herzustellen. Das ist notwendig, weil sich die Absorptionswerte in jedem Photometer unterscheiden. Dazu werden aus einer Kultivierung im Nährmedium Proben gezogen und möglichst zur gleichen Zeit vom Photometer und PR gemessen. Hieraus wird eine Korrelationsgerade bestimmt. Die gemessenen Absorptionswerte verhalten sich innerhalb einer OD zwischen 0.0 und 0.6 linear. Es ergibt sich bei einem Probenvolumen von 100 µl im 96-Well mit dem verwendeten Minimalmedium ein Korrelationsfaktor von 4.77 (Abbildung 11). Dieser Faktor wird verwendet, um die ΔOD_{PR} vom PR in die $\Delta OD_{Photometer}$ des Photometers umzurechnen.

$$\Delta OD_{Photometer} = KF \cdot \Delta OD_{PR} \quad (3.7)$$

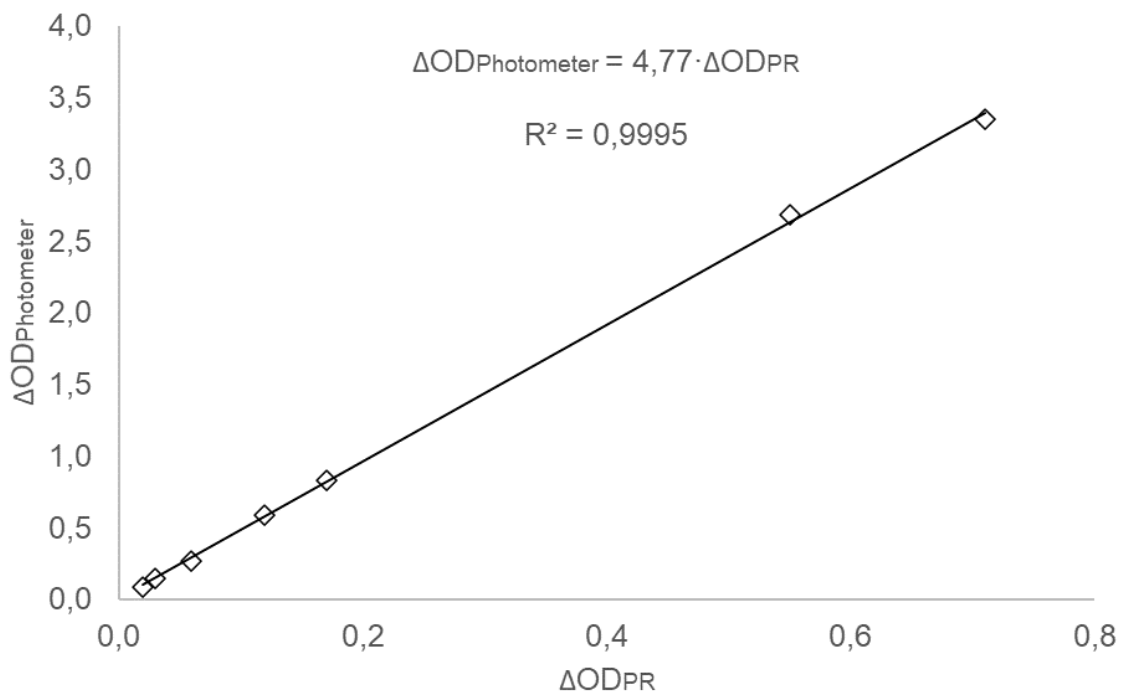


Abbildung 11: Korrelationsgerade zur Umrechnung der OD vom PR zum Photometer (100 μ l)

Bei zwei Versuchen mit dem 24-*Deepwell* System wird eine andere Multikanalpipette (30-300 μ l) verwendet. Das Probenvolumen wird bei der Messung im PR auf 120 μ l in der 96-*Well* Mikrotiterplatte angepasst, da die Pipette als kleinstes einstellbares Volumen 30 μ l hat und wie oben beschrieben 1:4 verdünnt wird. Dadurch verändert sich der Korrelationsfaktor auf 3.80 (siehe Abbildung 12).

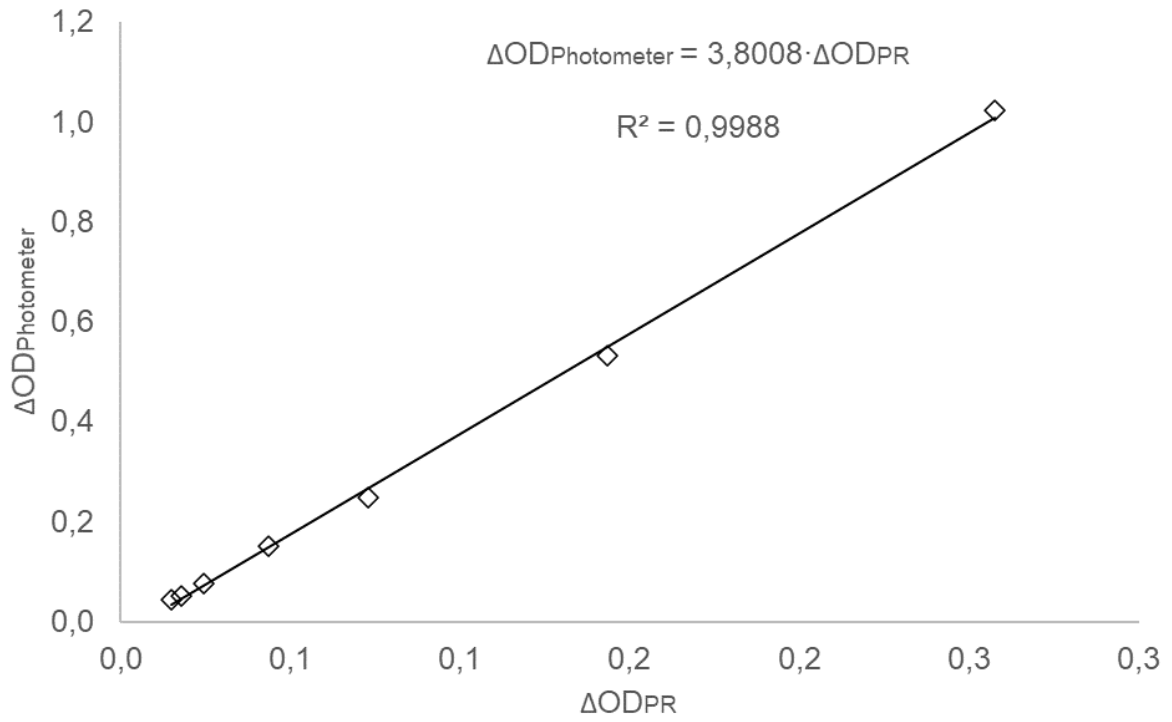


Abbildung 12: Korrelationsgerade zur Umrechnung der OD vom PR zum Küvettenphotometer (120 μ l)

3.7 Charakterisierung der MTP-Formate

Die benötigten Geräte und Materialien zur Ermittlung der einzusetzenden Schüttelfrequenzen sowie zur Bestimmung der Verdunstungsrate sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Benötigte Geräte und Materialien für die Ermittlung der Schüttelfrequenzen sowie zur Bestimmung der Verdunstungsraten

Geräte	Hersteller	Verwendung
Zellkultur <i>Multiwell</i> Platten, 6- <i>Well</i>	Greiner Bio-One (CE54.1)	Bestimmung der Verdunstungsrate
Zellkultur <i>Multiwell</i> Platten, 12- <i>Well</i>	Case P1012 (EKX6.1)	Bestimmung der Verdunstungsrate
24- <i>Deepwell Microplates</i> (Mikrotiterplatte)	EnzyScreen (CR1424)	Bestimmung der Verdunstungsrate
24- <i>Deepwell Sandwich Cover</i> (Verbunddeckel)	EnzyScreen (CR1224b)	Abdecken der MTPs
Clamps	Kuhner (SMCR1703)	Fixieren der MTPs im Schüttelinkubator
Schüttelinkubator	New Brunswick (Innova 42)	Bestimmung der Verdunstungsrate
Analysenwaage	Sartorius (BCE224I-1CEU)	Auswaage der MTPs
Waage	Sartorius (QUINTIX3102-1S)	Auswaage der MTPs
Dispensette	Brand (HandyStep touch) (705201)	Pipettieren des Wassers
Dispenser Tips	Brand (50 ml) (705718)	Aufnahme des Wassers

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung (Kapitel 4.1) der MTP sowie die Wachstumsraten in den unterschiedlichen Formaten (Kapitel 4.2) ausgewertet und diskutiert.

4.1 Charakterisierung von Mikrotiterplatten

Zunächst wird auf die möglichen bzw. einzusetzenden Schüttelfrequenzen der verwendeten MTP-Formate eingegangen. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird die Verdunstungsrate der einzelnen MTP-Formate untersucht.

4.1.1 Schüttelfrequenzen

Zu Beginn dieser Arbeit werden die am Schüttelinkubator einzustellenden Schüttelfrequenzen sowie die Füllvolumina der 6-, 12- und 24-*Well* MTP-Formate variiert (Tabelle 9), um diese für die folgenden Experimente festzulegen. Während der Versuche wird beobachtet, ob eine Tröpfchenbildung am Deckel zu verzeichnen ist oder Flüssigkeit aus den *Wells* der MTP austritt. Für eine geeignete Kombination aus Schüttelfrequenz und Füllvolumen muss dieses verhindert werden.

Die MTP werden mit Hilfe einer Dispensette gleichmäßig mit Wasser auf das zu untersuchende Füllvolumen befüllt und für maximal 2 Minuten geschüttelt. Wenn ein Auslaufen der Flüssigkeit zu beobachten ist oder sich Tröpfchen am Deckel bilden wird der Vorgang sofort abgebrochen.

Die MTP werden mit maximalen Füllvolumen (nach Angaben des Herstellers) und höchster Schüttelfrequenz von 400 rpm bis zur niedrigsten einzusetzenden Schüttelfrequenz von 200 rpm geschüttelt.

Kommt es bei einer Schüttelfrequenz zu Flüssigkeitsaustritt oder Tröpfchenbildung wird ein kleineres Füllvolumen gewählt, um in der Folge eine höhere Schüttelfrequenz einstellen zu können. Dadurch kann der Sauerstoffeintrag durch stärkere Turbulenzen erhöht werden.

Die Ergebnisse und die daraus folgenden Einsatzmöglichkeiten der MTP bei unterschiedlichen Kombinationen aus Schüttelfrequenz und Füllvolumen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Untersuchung zu unterschiedlichen Füllvolumen und Schüttelfrequenz-Kombinationen in 6-, 12- und 24-Well MTP

MTP	rpm	V _{Füll} [ml]	Ausgelaufen	Tropfen am Deckel
6-Well	200	5.0	Nein	Nein
	300	5.0	Ja	--
	400	5.0	Ja	--
	200	4.0	Nein	Nein
	300	4.0	Ja	--
	400	4.0	Ja	--
	200	3.0	Nein	Nein
	300	3.0	--	Ja
	400	3.0	Ja	--
12-Well	200	2.0	Nein	Nein
	300	2.0	Nein	Nein
	400	2.0	Ja	
	200	1.5	Nein	Nein
	300	1.5	Nein	Nein
	400	1.5	Ja	
	200	1.0	Nein	Nein
	300	1.0	Nein	Nein
	400	1.0	Nein	Nein
24-Well	200	4.0	Nein	Nein
	300	4.0	Nein	Nein
	400	4.0	Nein	Nein
	200	3.0	Nein	Nein
	300	3.0	Nein	Nein
	400	3.0	Nein	Nein

Das 6-Well MPT-Format hat im Verhältnis zum Durchmesser der einzelnen Wells eine geringe Tiefe. Dadurch tritt die Flüssigkeit schneller über den Rand als in einem System mit sehr tiefen Wells, wie beim *Deepwell* System von *Duetz*. Auch das 12-Well MTP-Format besitzt ein größeres Verhältnis von Tiefe zu Durchmesser der Wells. Dadurch werden höhere Schüttelfrequenzen ermöglicht. Die 6-Well MTP ist bei maximal 200 rpm und 5 ml Füllvolumen einsetzbar, bei höherer Schüttelfrequenz läuft dieses Format selbst bei niedrigem Füllvolumen von 3 ml aus.

Die 12-Well MTP sind bei einem Füllvolumen von 2 ml bis 300 rpm und bei einem Volumen von 1 ml bis 400 rpm im Schüttelinkubator einsetzbar.

Das 24-*Deepwell* System von *Duetz* ist selbst beim höchsten Füllvolumen von 4 ml mit jeder getesteten Schüttelfrequenz einsetzbar.

4.1.2 Verdunstungsraten der verschiedenen MTP

Da im MTP-Format mit einem sehr kleinem Füllvolumen gearbeitet wird nimmt das Volumen bei Probenahmen sowie durch Verdunstung im Vergleich zum Schüttelkolben stark ab. Durch die Verdunstung der wässrigen Phase nimmt die Zellkonzentration zu und folglich wird die gemessene OD fälschlicherweise erhöht. Daher müssen Verdunstungsraten ermittelt und berücksichtigt werden, die sich abhängig von der Bauform des MTP-Formats, vom Füllvolumen, der Temperatur sowie der Schüttelfrequenz unterscheiden [Doig et al 2005]. In Kapitel 3.5.1 und 3.5.3 sind die MTP-Formate und dessen Bauform detailliert beschrieben. Die benötigten Geräte und Materialien für die Bestimmung der Verdunstungsrate sind in Tabelle 8 in Kapitel 3.7 aufgeführt. Im Folgenden wird die Bestimmung der Verdunstungsraten näher erläutert.

Vor Beginn der Messung werden die leeren sowie anschließend die mit Wasser befüllten MTP gewogen. Danach werden die MTP bei Temperaturen von 30 °C und 37 °C sowie der jeweiligen Schüttelfrequenz im Schüttelinkubator fixiert und in unregelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 6 bis maximal 7.5 Stunden (Tabelle 10) gewogen. Wichtig hierbei ist genügend Messpunkte aufzunehmen, um eine ausreichende Genauigkeit zu erreichen. Alle Versuche werden als DB durchgeführt. Zum Teil werden Verdunstungsraten um eine Stunde extrapoliert, da länger als 6 Stunden kultiviert wird. Die ermittelten Raten sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die extrapolierten Werte sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Um das Füllvolumen zu bestimmen, wird jeweils das Leergewicht vom Messwert abgezogen und durch die Dichte von Wasser (1kg/m^3) geteilt. Die dadurch ermittelten Füllvolumen zur Bestimmung einer Verdunstungsrate sind in beispielhaft Abbildung 13 aufgetragen. Es zeigt sich eine lineare Abnahme des Flüssigkeitsvolumens über einen Zeitraum von 7 Stunden. Die Volumenabnahme lässt sich durch eine lineare Funktion $V = -b \cdot t + V_0$ darstellen. Die Verdunstungsrate entspricht der Steigung b und wird durch eine lineare Regression ermittelt. Alle weiteren Abbildungen der linearen Regression zur Ermittlung der Verdunstungsraten sind im Anhang (Abbildung 31 bis Abbildung 43 im Kapitel 7) zu finden.

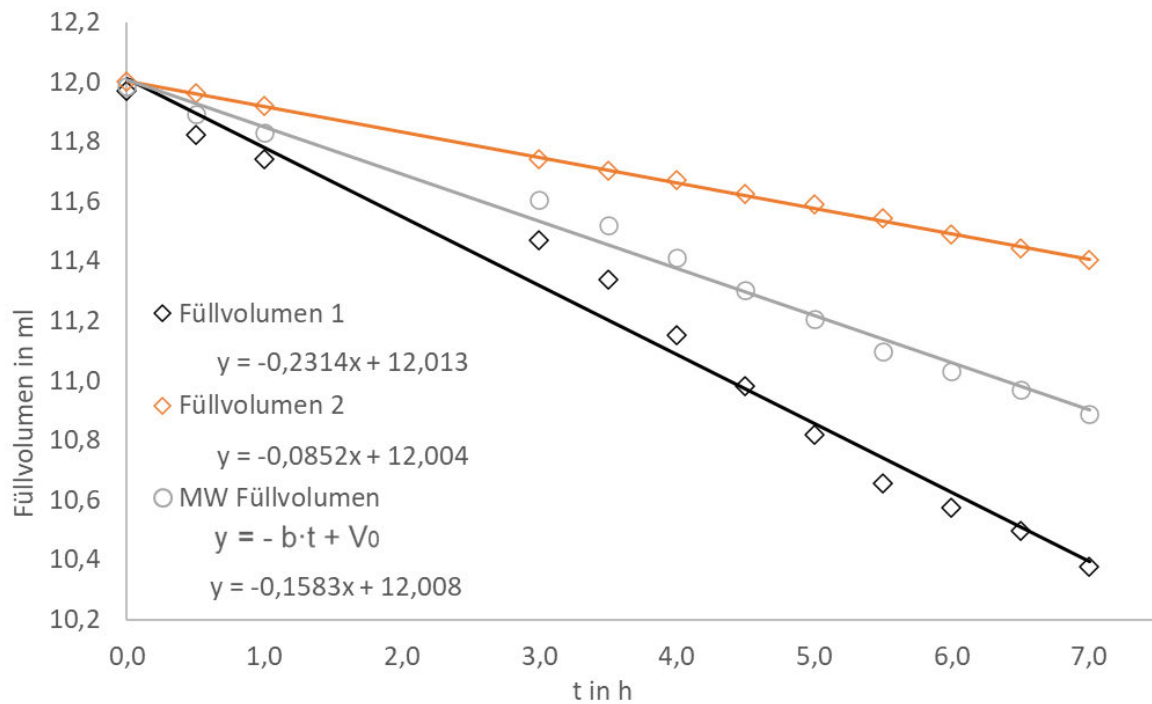


Abbildung 13: Verdunstungsrate der 12-Well MTP in DB mit einem Füllvolumen von 1 ml pro Well. Einer Schüttelfrequenz von 200 rpm und einer Temperatur von 37 °C

Tabelle 10: Verdunstungsraten der verschiedenen MTP-Formate mit den aufgeführten Parametern (* Verdunstungsrate um eine Stunde extrapoliert; - Verdunstungsrate nicht bestimmt).

MTP Format	V _{Füll} [ml]	30 °C		37 °C	
		200 rpm			
		b [ml/h]	t in h	b [ml/h]	t in h
6	5	-0.0590	6.0	-0.1150	7.0*
12	2	-0.0979	7.0*	-0.1239	7.0*
24	4	-0.0268	6.0	-0.0394	7.0*
6	2	-	-	-0.1014	7.0
12	1	-	-	-0.1583	7.0
24	2	-	-	-0.0407	7.0
6	4	-0.1292	7.0	-0.1290	7.5
		300 rpm			
12	2	-0.1904	7.0	-0.1769	7.0

Die Verdunstungsrate wird für jede Kultivierung im MTP-Format bestimmt und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Abbildung 14 bis Abbildung 16 zeigen die Verdunstungsraten der verschiedenen MTP-Formate in Abhängigkeit der Kultivierungstemperatur, des Füllvolumens und der Schüttelfrequenz in einem Zeitraum von 6 Stunden, in Prozent.

$$\text{Verdunstung in \%} = \frac{V_{verd} \cdot 100 \%}{V_0} \quad (4.1)$$

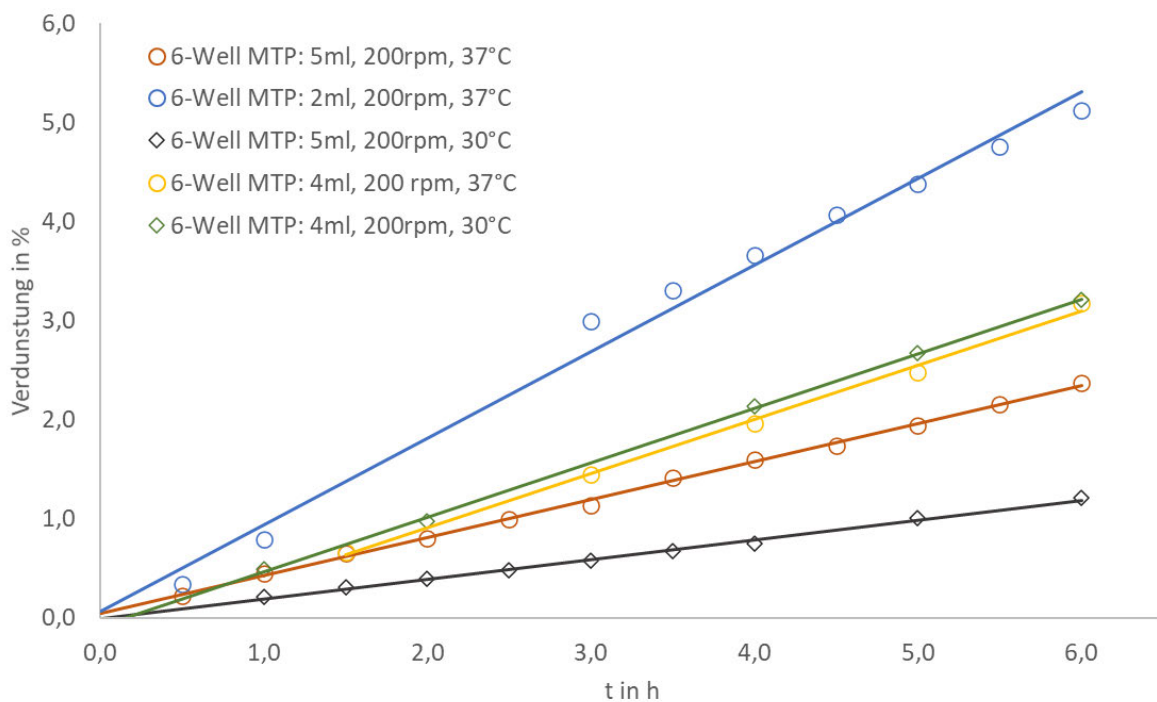


Abbildung 14: Verdunstung im 6-Well Format in Prozent über 6 Stunden

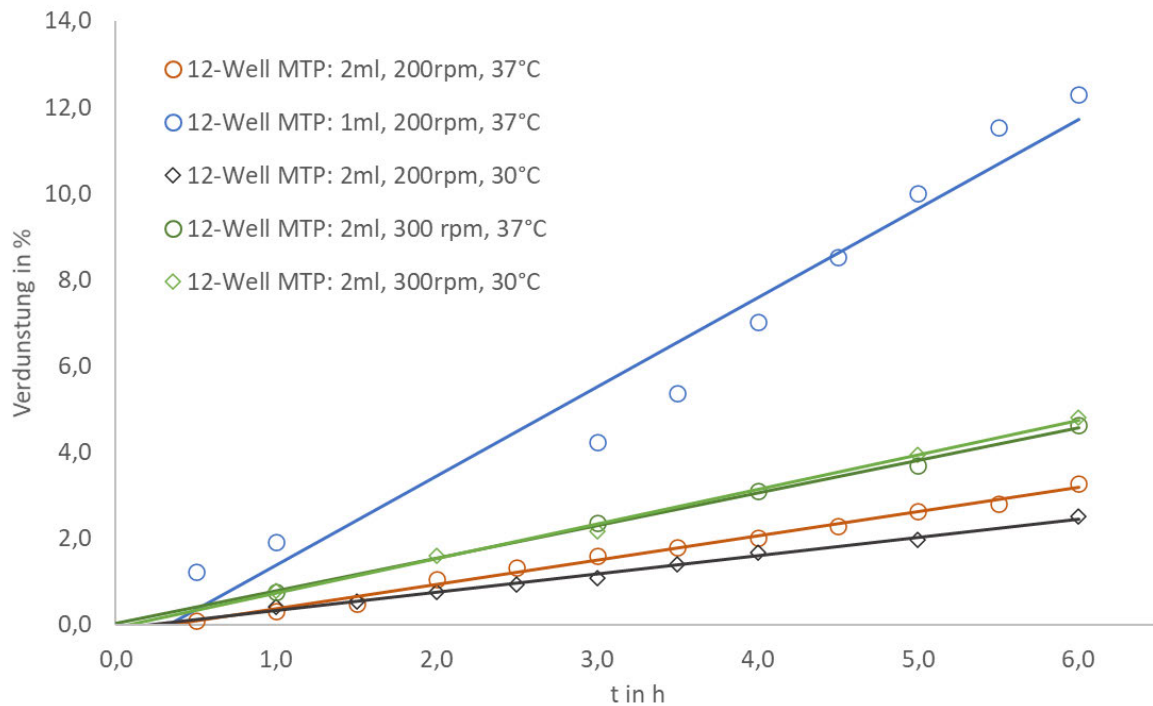


Abbildung 15: Verdunstung im 12-Well Format in Prozent über 6 Stunden

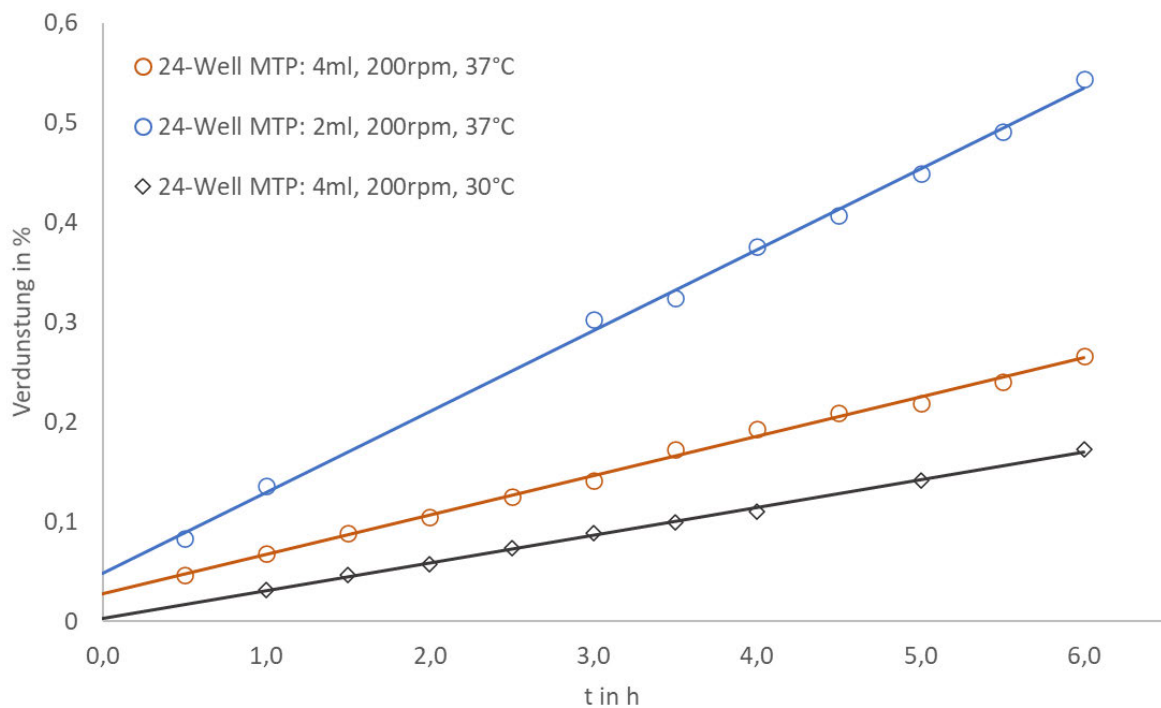


Abbildung 16: Verdunstung im 24-Deepwell Format in Prozent über 6 Stunden

Das *Deepwell* System von *Duetz* weist die geringste prozentuale Verdunstung über den gemessenen Zeitraum auf (Abbildung 16 und Tabelle 11). Die Verdunstung liegt unter einem Prozent und wirkt sich somit kaum auf die gemessene OD während einer Kultivierung aus.

Tabelle 11: Verdunstungsrate der verschiedenen Mikrotiterplatten in Prozent nach 6 Stunden (- := Verdunstungsrate nicht bestimmt)

MTP Format	V _{Füll} [ml]	30 °C		37 °C	
		200 rpm			
		Platte 1	Platte 2	Platte 1	Platte 2
		[%]	[%]	[%]	[%]
6	5	1.17	1.25	2.61	2.13
12	2	3.71	1.33	3.69	2.84
		-	-	5.18	2.24
24	4	0.17	0.18	0.25	0.28
6	2	-	-	4.59	5.67
12	1	-	-	12.30	4.34
24	2	-	-	0.52	0.56
6	4	4.39	2.03	4.01	2.34
		300 rpm			
12	2	6.21	3.41	5.17	4.09

Wie in Tabelle 11 sowie Abbildung 14 und Abbildung 15 zu erkennen ist, weichen die Einzelmessungen der Verdunstungsraten zum Teil stark voneinander ab. Vor allem bei den 6- und 12-Well MTP-Formaten. Dies liegt vermutlich zum großen Teil an der Fertigungspräzision der Mikrotiterplatten und der Fixierung im Schüttelinkubator. Es handelt sich bei diesen Formaten um einfache *single use* Zellkulturplatten, bei denen der Deckel aus reinem Kunststoff besteht und relativ locker aufliegt. Beim Fixieren im Schüttelinkubator kann es zur Wölbung des Deckels kommen, wodurch mehr Flüssigkeit verdunsten kann. Dies ist nicht ganz vermeidbar, da die Platten fest fixiert werden müssen. Das geringe Füllvolumen sowie das ungünstige Oberflächen- zu Volumenverhältnis führen zu relativ hohen Verdunstungsraten, vor allem im 12-Well MTP-Format.

Auf Basis der Versuche werden die OD Messwerte der folgenden Experimente dieser Arbeit mit Hilfe der ermittelten Verdunstungsrate korrigiert. Mit folgender Formel wird die reale OD mit Hilfe der Verdunstungsrate und der gemessenen optischen Dichte bestimmt.

$$\Delta OD_{\text{real}} = \Delta OD_{\text{mess}} \cdot \left(\frac{V_{\text{real}}}{V_0} \right) \quad (4.2)$$

Das reale Volumen V_{real} , welches sich über die Zeit eines Kultivierungsprozesses verringert, wird folgendermaßen bestimmt:

$$V_{\text{real}} = V_0 - \frac{b}{n} \cdot t \quad (4.3)$$

Vom Anfangsvolumen V_0 der Kulturbrühe des jeweiligen MTP-Formates wird der Quotient subtrahiert, der sich aus der Steigung (Volumen pro Zeiteinheit) b , Anzahl n der *Wells* sowie der Kultivierungszeit t zusammensetzt.

Daraus ergibt sich für die reale ΔOD_{real}

$$\Delta OD_{\text{real}} = \Delta OD_{\text{mess}} \cdot \left(\frac{V_0 - \frac{b}{n} \cdot t}{V_0} \right) \quad (4.4)$$

4.2 Ergebnisse und Diskussion der Wachstumsraten von *E. coli* BL21 (DE3) in der Batch-Kultivierung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Kultivierung in den unterschiedlichen MTP-Formaten sowie im Schüttelkolben anhand der beobachteten Wachstumsraten ausgewertet und diskutiert. Zur Übersicht sind in Tabelle 12 die durchgeführten Versuche mit deren jeweiligen Zielen aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht der Batch-Kultivierungen im MTP-Format und Schüttelkolben mit *E. coli* BL21 (DE3)

Versuch	Kultivierungsformat	Ziel des Versuchs
V01	Schüttelkoben	Vorversuch: Zellen von Agarplatte, Wachstumsrate der Mutterzelle (ZB) bei 37 °C und 200 rpm
V02	Schüttelkolben	Vorversuch: Referenz der Wachstumsrate (ZB1): Vergleich mit 6-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V03	Schüttelkolben	Vorversuch: Referenz der Wachstumsrate (ZB2): Vergleich mit 6-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V04	Schüttelkolben (DB)	Vorversuch: Referenz der Wachstumsrate: Vergleich mit 12-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V05	Schüttelkoben	Kontrolle des Mediums von Versuch V18 bei 37 °C und 200 rpm
V06	6-Well MTP	Vorversuch: Wachstumsrate: Vergleich aller Wells (ZB1) sowie mit Schüttelkolben und 12-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V07	6-Well MTP	Vorversuch: Wachstumsrate: Vergleich aller Wells (ZB2) sowie mit Schüttelkolben und 12-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V08	6-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller Wells sowie mit 12-Well MTP bei 30 °C und 200 rpm
V09	6-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller Wells sowie mit 12-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V10	12-Well MTP	Vorversuch: Wachstumsrate: Vergleich von Ecken- und Innenwells sowie mit Schüttelkolben und 6-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V11	12-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich von Ecken- und Innenwells bei 37 °C und 200 rpm sowie mit Außen- und Innenwells
V12	12-Well MTP (DB)	Wachstumsrate Vergleich von Außen- und Innen-Wells bei 37 °C und 200 rpm sowie mit Ecken- und Innenwells
V13	12-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller Wells sowie mit 6-Well MTP bei 30 °C und 200 rpm

Versuch	Kultivierungsformat	Ziel des Versuchs
V14	12-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller <i>Wells</i> bei 37 °C und 300 rpm sowie mit 12-Well MTP bei 37 °C und 200 rpm
V15	12-Well MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller <i>Wells</i> bei 30 °C und 300 rpm sowie mit 12-Well MTP bei 30 °C und 200 rpm
V16	24-Deepwell MTP	Wachstumsrate: Vergleich aller <i>Wells</i>
V17	24-Deepwell MTP	Wachstumsrate: Vergleich aller <i>Wells</i>
V18	24-Deepwell MTP (DB)	Wachstumsrate: Vergleich aller <i>Wells</i>

Die in Tabelle 12 zusammengefassten Versuche werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels ausgewertet. Dabei werden die Ergebnisse der verschiedenen MTP-Formate und Schüttelkolben anhand der Wachstumsraten bzw. einsetzender Sauerstofflimitierungen in Abhängigkeit der eingestellten Schüttelfrequenzen und Temperaturen miteinander verglichen. In den Abbildungen der folgenden Unterkapitel sind jeweils die ermittelten Wachstumsraten, Kultivierungstemperaturen sowie die gewählten Schüttelfrequenzen angegeben. Bei den in den Tabellen aufgeführten Anfangszellkonzentrationen $\Delta OD_{HK,0}$ handelt es sich um berechnete Werte, die sich aus dem Inokulationsvolumen und der optischen Dichte des Inokulums ergeben.

4.2.1 Batch-Fermentation: Vorversuche im 6- und 12-Well MTP-Format sowie im Schüttelkolben

Im Folgenden werden die Vorversuche dieser Arbeit analysiert. Die Kultivierung im Schüttelkolben dient als Referenz für die Versuche im MTP-Format. Eine Versuchseinheit beinhaltet den Vergleich der Wachstumsrate in einem MTP Format mit derer im Schüttelkolben. Die Versuche innerhalb einer Versuchseinheit werden immer mit der gleichen Anfangszellichte $\Delta OD_{HK,0}$ gestartet. In Tabelle 13 sind die verwendeten Parameter für alle Vorversuche aufgeführt. Alle Kultivierungen in diesem Abschnitt werden bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer eingestellten Schüttelfrequenz von 200 rpm durchgeführt. Angeimpft wird aus unterschiedlichen VKs (Tabelle 14) mit verschiedenen End-Ods. Dadurch ergeben sich zwischen den Versuchseinheiten unterschiedliche Anfangs-Ods der HK. Diese sind aber pro Versuchseinheit (Schüttelkolben und MTP-Format) identisch. Die erreichten $\Delta OD_{HK, end}$ sowie die Kultivierungsdauer der jeweiligen Versuche sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 13: Parameter zu den einzelnen Vorversuchen.

Versuch	Format	$\Delta OD_{HK,0}$	V_{Ino} [ml]	$V_{Füll}$ [ml]	c_{SL} [g/l]	τ [°C]	rpm
Versuchseinheit 1 (Abbildung 17)							
V01	Schüttelkolben	0,096	1.0	100.0	5.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 2 (Abbildung 18)							
V02	Schüttelkolben	0.143	5.00	50.0	4.5	37.0	200.0
V06	6-Well MTP		0.50	5.0	4.5	37.0	200.0
Versuchseinheit 3 (Abbildung 19)							
V03	Schüttelkolben	0.048	1.00	100.0	4.5	37.0	200.0
V07	6-Well MTP		0.05	5.0	4.5	37.0	200.0
Versuchseinheit 4 (Abbildung 20)							
V04	Schüttelkolben	0.492	4.00	100.0	15.0	37.0	200.0
V10	12-Well MTP		0.08	2.0	15.0	37.0	200.0

Tabelle 14: Parameter für die Vorkulturen

Versuch	$\Delta OD_{VK, end}$	$t_{VK, end}$
V01	9,60	18,50
V02 / V06	1,43	18,50
V03 / V07	4,83	17,50
V04 / V10	9,84	17,50

Tabelle 15: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer

Versuch	$\Delta OD_{HK, end}$		$t_{HK, end}$		Bemerkung
V01	3.29		6.00		vorzeitig abgebrochen
V02	4.37		5.17		Keine Limitierung
V03	2.68		6.17		Keine Limitierung
V04 (DB)	9.47 (7.90*)	9.04 (7.65*)	6.42 (4.58*)	6.50 (4.67*)	Ab $t_{HK} = 4.58/4.67$ *einsetzende Limitierung
V06	3.55		5.08		Keine deutliche Limitierung
V07	1.83		6.17		Keine Limitierung
V10	7.76		6.17		einsetzende Limitierung ab 3.5 Stunden.

Die erste Schüttelkolben-Kultivierung dieser Arbeit ist in Abbildung 17 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Mutterzelle der im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzten Zellbank (ZB) des Kultivierungsorganismus. Während die ZB für die Versuche dieser Arbeit angelegt wird, werden parallele Vorversuche im Schüttelkolben (V01 bis V04) sowie im MTP-Format (V06, V07 und V10) durchgeführt, um die Wachstumsraten zu vergleichen und sich mit dem Handling der verschiedenen Formate vertraut zu machen.

Zunächst wird von einer Agarplatte eine Kolonie der Mutterzelle mit einer Pipettenspitze aufgenommen und diese in einen 100 ml Schüttelkolben mit 10 ml Minimalmedium überführt. Diese wird zur Vorkultivierung über Nacht bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wird daraus die HK angeimpft und die Kultivierung mit den in Tabelle 13 angegebenen Parametern durchgeführt. Einmal pro Stunde wird eine Probe gezogen und im Küvettenphotometer gemessen (Abbildung 17). Die Wachstumsrate der Mutterzelle ist mit $0,70 \text{ h}^{-1}$ hoch, das bedeutet die Zellen sind sehr aktiv und nicht limitiert.

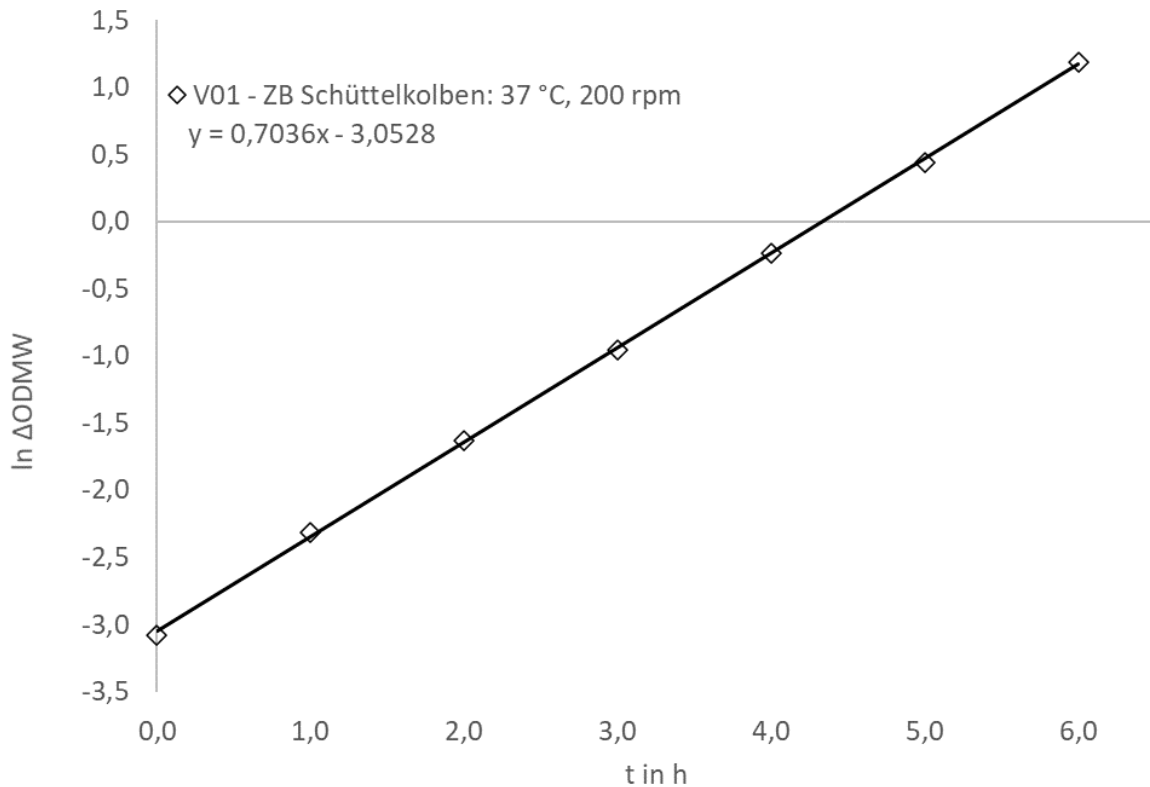


Abbildung 17: V01 - Kultivierung der Mutterzelle ZB im Schüttelkolben (Versuchseinheit 1)

Abbildung 18 (Versuchseinheit 2) und Abbildung 19 (Versuchseinheit 3) zeigen zwei Kultivierungen im Schüttelkolben sowie im 6-Well MTP-Format mit unterschiedlicher Start-OD der HK und VK aus unterschiedlichen ZBs (ZB1 und ZB2). Die Kultivierungen im Schüttelkolben werden als Referenz der 6-Well MTP jeweils am selben Tag durchgeführt und gemessen. Die Probenahmen im Schüttelkolben erfolgen etwa einmal pro Stunde über einen Zeitraum von fünf bzw. sechs Stunden.

Die Probenahmen aus den MTP erfolgen etwa alle 20 bis 40 Minuten. Der erste aufgeführte (orangene) Messpunkt beginnt hier in Well X2 (s. Abbildung 19), des Weiteren verlaufen die Messpunkte nach der vorgegebenen Reihenfolge des Probenahmeschemas. Der erste Messpunkt wird hier nicht aufgeführt, da dieser unterhalb der Sensitivität der OD-Messung liegt.

Es scheint als würde ab einer Inkubationszeit von etwa 4.5 Stunden und einer OD von 2.60 die Wachstumsrate von Versuch V06 leicht abnehmen (Abbildung 18). Anhand der Messpunkte ist nicht eindeutig zu erkennen, ob es sich hierbei um eine Sauerstofflimitierung oder um Schwankungen der OD handelt. In weiteren Versuchen dieses Formates werden höhere ODs ohne Limitierung erreicht. Die erreichten $\Delta OD_{HK, end}$

liegen bei Versuchseinheit 2 im Schüttelkolben bei 4.2 und im 6-Well MTP-Format bei 3.6 und weichen damit nicht stark voneinander ab. Bei Versuchseinheit 3 beträgt die OD im Schüttelkolben 2.7 und im MTP-Format deutlich niedriger bei 1.8. Es wurde nicht bis zur einsetzenden Limitierung kultiviert.

Die zum Teil etwas niedrigeren Wachstumsraten (und ODs) in den MTPs (Abbildung 19) kommen vermutlich durch die höhere Probenahmefrequenz zustande. Dadurch stehen die MTPs kürzer im Schüttelinkubator als die Schüttelkolben und die Kultivierung wird häufiger unterbrochen und sind somit auch kürzer.

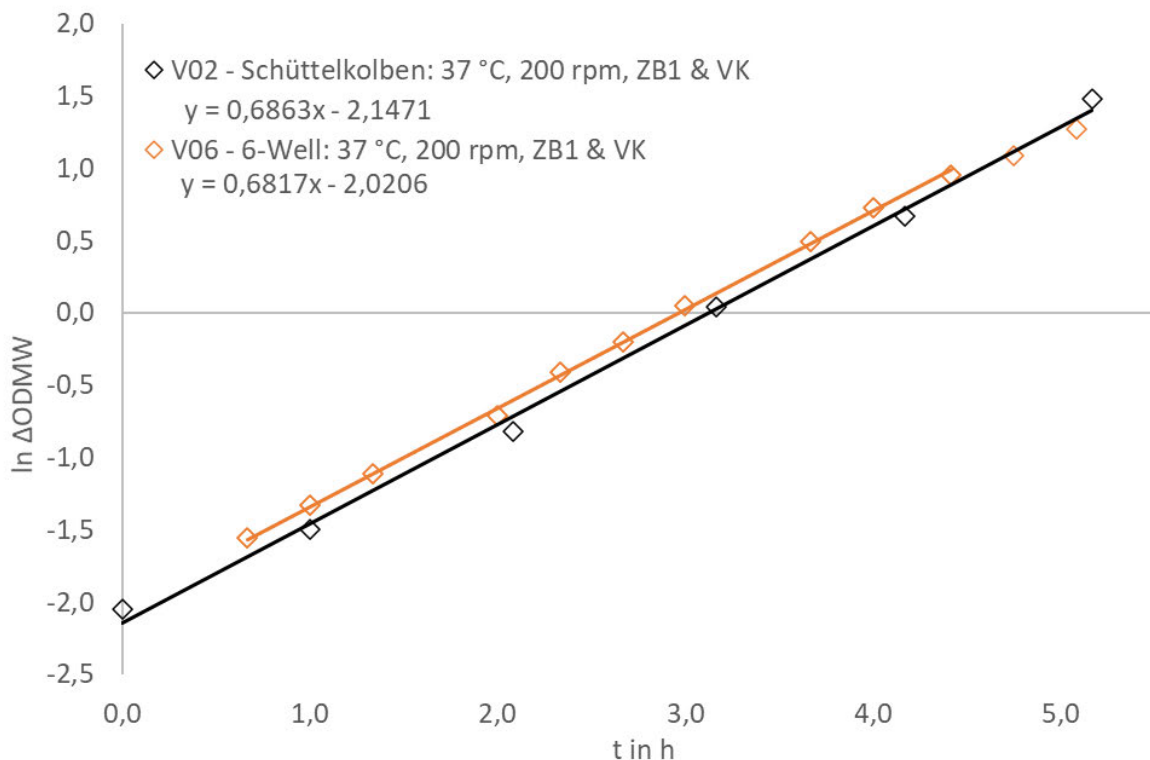


Abbildung 18: V02 und V06 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben sowie im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 2). Angeimpft aus VK der ZB1

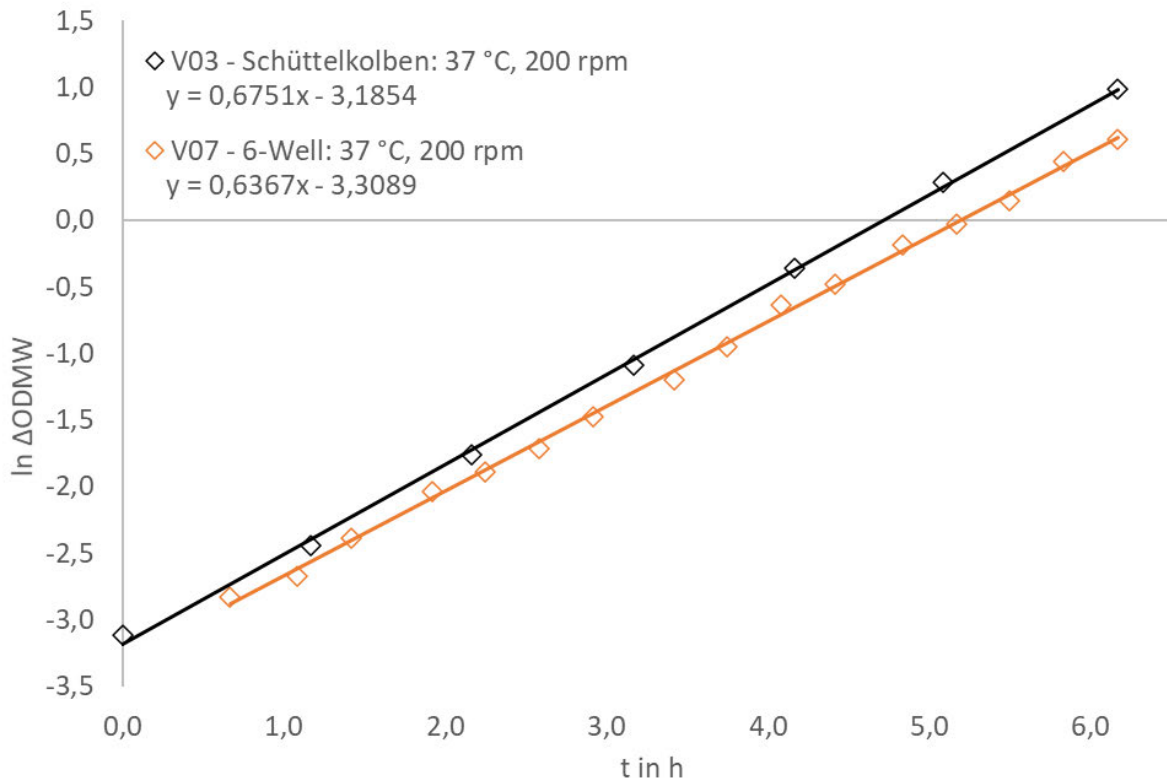


Abbildung 19: V03 und V07 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben sowie im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm. Angeimpft aus VK der ZB2 (Versuchseinheit 3)

Abbildung 20 zeigt die Wachstumsverläufe von zwei parallelen Schüttelkolbenkulturen sowie einer Kultivierung im 12-Well MTP-Format. Die Versuche werden parallel am selben Tag durchgeführt (Versuchseinheit 4) und werden aus derselben VK der ZB2 angeimpft. Die Kultivierung im Schüttelkolben wird als Referenz zur Kultivierung im 12-Well MTP-Format durchgeführt. Bis zur Kultivierungszeit von 3,5 Stunden ist ein unlimitiertes Wachstum im 12-Well MTP-Format zu verzeichnen. Die Wachstumsrate beträgt bis zum Eintreten der Limitierung $0,65 \text{ h}^{-1}$ und ist vergleichbar mit der im Schüttelkolben.

Ab ca. 3,5 Stunden bei einer OD von 3,2 ist ein Abknicken der Wachstumsrate im MTP-Format zu verzeichnen, was auf Sauerstofflimitierungen hinweist. Die Schüttelkolbenkultivierungen weisen im Vergleich zur 12-Well MTP eine höhere OD (4,4 und 4,5) bei ca. 3,5 Stunden auf.

Die OD-Werte des MTP Formats zeigen relativ starke Schwankungen. Dies könnte durch Pipettierfehler zustande gekommen sein. Zudem könnte beim Animpfen der einzelnen Wells aus der Vorkultur sowie durch die höhere Verdunstungsrate dieses Formats Abweichungen entstanden sein.

Die Wachstumsraten der Zellen in den beiden Schüttelkolbenkultivierungen sind vergleichbar. Lediglich für die letzten Messzeitpunkte ist ein einbrechen des Wachstums zu erahnen, was vermutlich auf eine einsetzende Sauerstofflimitierung hinweist.

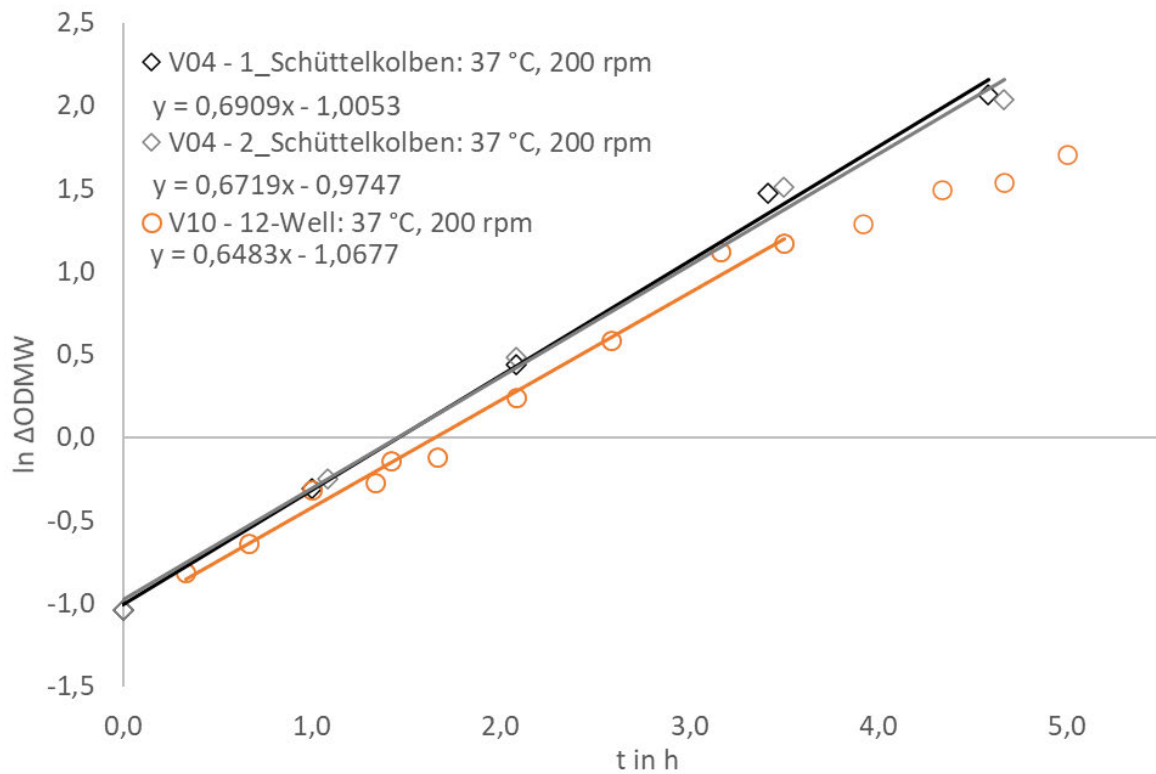


Abbildung 20: V04 und V10 - Vergleich der Wachstumsrate der Vorversuche im Schüttelkolben und im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 4). Angeimpft aus VK der ZB2

4.2.2 Fermentationen mit dem Kultivierungsorganismus *E. coli* BL21 (DE3) im MTP-Format

Im Folgendem werden die Versuche in den verschiedenen MTP-Formaten ausgewertet und analysiert. Die Kultivierungen im 6- und 12-Well MTP-Format sind in Abschnitt 4.2.2.1 und 4.2.2.2 dargestellt. In Abschnitt 4.2.2.3 wird auf die Ergebnisse des 24-Deepwell Systems von Duetz eingegangen.

4.2.2.1 Batch-Fermentation im 6- und 12-Well MTP-Format

In diesem Kapitel werden die Wachstumsraten im 6- und 12-Well MTP-Format bestimmt und miteinander verglichen. In Tabelle 16 sind die verwendeten Parameter für alle Versuche aufgeführt. Die erreichten ODs sowie die Kultivierungsdauer der jeweiligen Versuche sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 16: Parameter zu den einzelnen Versuchen mit dem 6-Well MTP-Format.

Versuch	Format	$\Delta OD_{HK,0}$	V_{ino} [ml]	$V_{füll}$ [ml]	c_{SL} [g/l]	τ [°C]	rpm
Versuchseinheit 5 (Abbildung 21)							
V06	6-Well MTP	0.143	0.5	5.0	4.5	37.0	200.0
V07	6-Well MTP	0,0483	0.05	5.0	4.5	37.0	200.0
Versuchseinheit 6 (Abbildung 22)							
V08	6-Well MTP	0.10	0.2	4.0	8.0	37.0	200.0
V09	6-Well MTP	0.10	0.2	4.0	8.0	30.0	200.0

Tabelle 17: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)

Versuch	$\Delta OD_{HK, end}$	$\Delta OD_{MW, end}$	$t_{HK, end}$	Bemerkung	
V06	3.55	3.55	5.08	Keine deutliche Limitierung	
V07	1.83	1.83	6.17	Keine Limitierung	
V08 (DB)*	4.07	4.82	4.45	7.00	Keine Limitierung
V09 (DB)*	0.73	0.72	0.73	6.92	Keine Limitierung

Das Wachstumsverhalten der Vorversuche im 6-Well MTP-Format sind in Abbildung 21 gegenübergestellt. Die 6-Well MTPs werden mit aus unterschiedlichen Vorkulturen (ZB1 und ZB2) angeimpft, so dass sich unterschiedliche Anfangszellkonzentrationen ergeben. Beide Kulturen zeigen ein annähernd exponentielles Wachstum in allen

Wells. Die Wachstumsraten sind insgesamt etwas niedriger als in der Kultivierung im Schüttelkolben ($0.68 - 0.69 \text{ h}^{-1}$), liegen mit $0.64 - 0.66 \text{ h}^{-1}$ aber in einem vergleichbaren Bereich. Der Grund dafür könnte die höhere Probenahmefrequenz der MTP im Vergleich zu den Schüttelkolben sein.

Grundsätzlich ist das Wachstumsverhalten in den beiden MTP-Versuchen sehr vergleichbar und unabhängig von der Animpfzellichte. Für Versuch V06 lässt sich für die letzten zwei bis drei Messwerte eine einsetzende Sauerstofflimitierung erkennen.

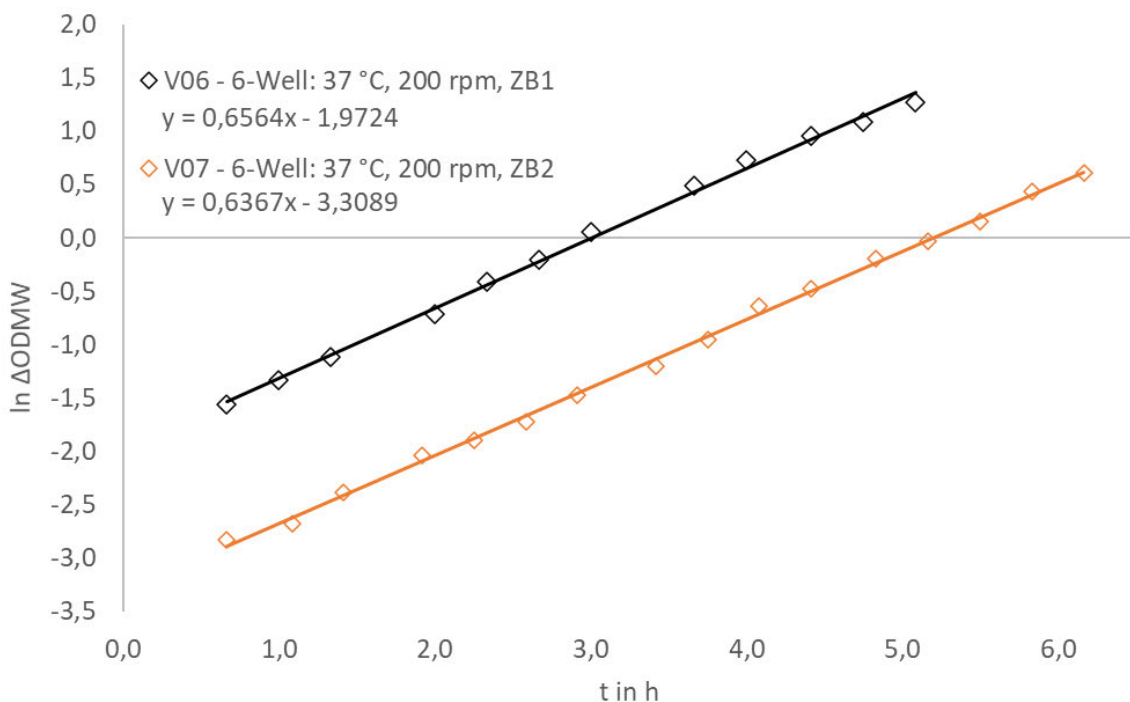


Abbildung 21: V06 und V07 - Vorversuch im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 5). Angeimpft aus Vorkulturen der ZB1 und ZB2 mit unterschiedlicher OD

Abbildung 22 zeigt das Wachstumsverhalten von Versuch V08 und Versuch V09. Versuch V08 beinhaltet zwei Kultivierungen im 6-Well MTP-Format bei 37°C, Versuch 09 zwei Kultivierungen im gleichen Format bei 30°C. Dabei soll die Reproduzierbarkeit des Zellwachstums im MTP-Format (*Well* zu *Well* und *Platte* zu *Platte*) näher untersucht werden. Die Inokulation erfolgt direkt aus der Kryokultur, um Fehlerquellen zu minimieren und konstante Animpfzellkonzentrationen zu erhalten.

Die Probenahmen von V08 erfolgen in den ersten vier Stunden etwa alle 40 Minuten da noch nicht verdünnt werden konnte. Ab einer OD von 0.6 wird die Probenahme auf ca. 20 Minuten verkürzt, um genügend Messpunkte zu erhalten. Die Probenahmen

erfolgen bei Versuch V09 zunächst alle 40 Minuten. Aufgrund des langsameren Zellwachstums kann die Probenahme erst nach ca. 6 Stunden auf alle 20 Minuten verkürzt werden. Bei den DBs ist ein annähernd gleicher Verlauf der einzelnen Messpunkte zu erkennen. Dies spricht für ein reproduzierbares Ergebnis. In Versuch V08 werden optische Dichten von 4.1 und 4.8 ohne Anzeichen von Limitierungen erreicht. Diese sind etwas höher als in den vorherigen Versuchen (V06 und V07). Es ist davon auszugehen, dass noch höhere optische Dichte im 6-Well MTP-Format erreicht werden können, da die Kultivierung noch nicht in die limitierende Phase übergegangen und das Substrat nicht aufgebraucht ist. Zudem könnte die Substratkonzentration erhöht werden, um eine höhere Zelldichte zu erreichen.

Bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C ist die Wachstumsrate deutlich höher als bei 30 °C. Die Versuche V08 und V09 zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit. Die bei 37°C ermittelte Wachstumsrate liegt mit 0.61 bis 0.62 h⁻¹ unter der in den vorangegangenen Versuchen (Versuchseinheit 5). Allerdings wurde in V08 auch mehr Proben genommen als in V06 ($\mu=0,66 \text{ h}^{-1}$). Die gemessene Wachstumsrate in V09 ist mit 0.36 h⁻¹ deutlich geringer als erwartet. Normalerweise liegt sie etwa bei 0.48 1/h (Erfahrungswerte des Labors) bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C im Schüttelkolben.

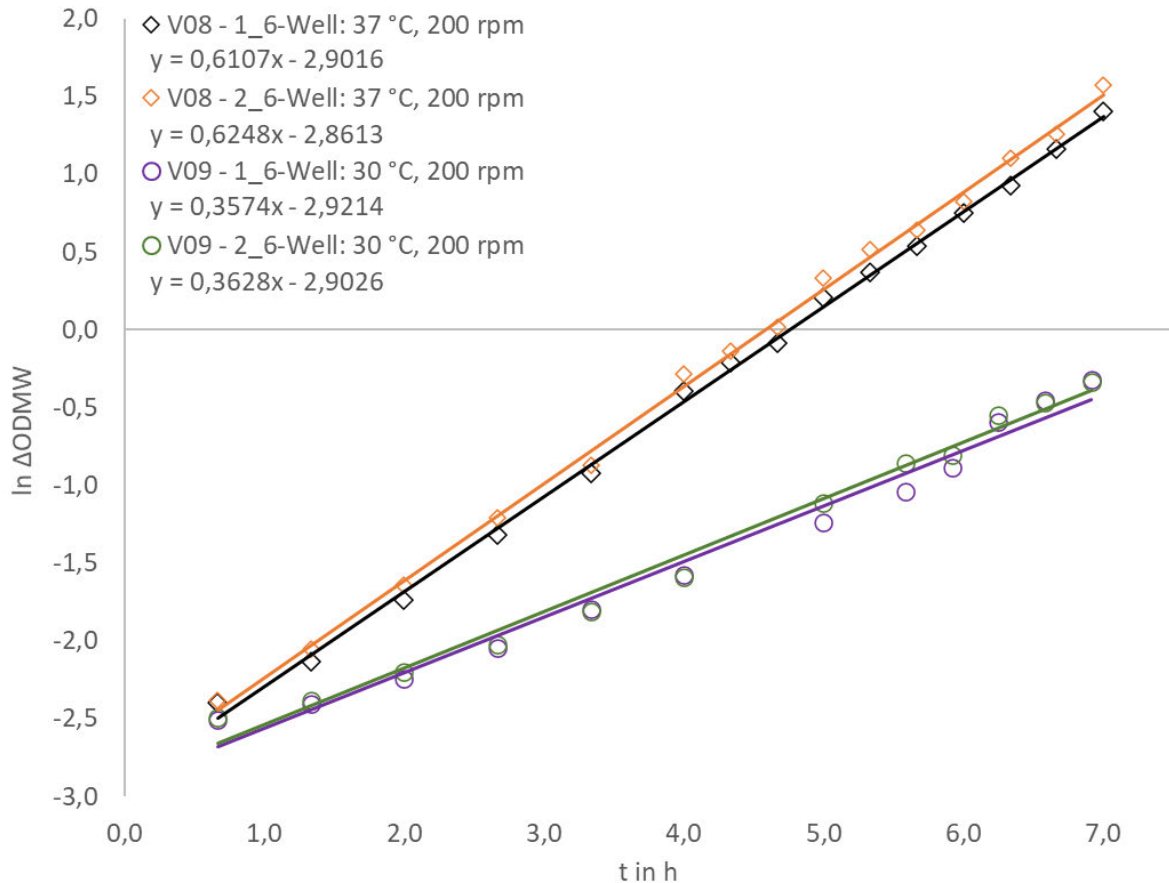


Abbildung 22: V08 und V09 - Vergleich der DB im 6-Well MTP-Format bei 37 °C und 30 °C sowie 200 rpm (Versuchseinheit 6)

Im 12-Well MTP-Format werden Wachstumsraten von Kultivierungen, die bei unterschiedlicher Kultivierungstemperatur und Schüttelfrequenz durchgeführt wurden, miteinander verglichen. Zudem werden die Wachstumsraten in den Wells der Außenseite, im Inneren der Platte sowie an den Ecken analysiert. Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen im 12-Well MTP-Format sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die Versuche werden mit Hilfe der jeweiligen Abbildungen visualisiert und anhand der Messwerte analysiert. Die erreichten ODs sowie die Kultivierungsdauer der jeweiligen Versuche sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 18: Parameter zu den einzelnen Versuchen im 12-Well MTP-Format

Versuch	Format	$\Delta OD_{HK,0}$	V_{ino} [ml]	$V_{füll}$ [ml]	c_{SL} [g/l]	τ [°C]	rpm
Versuchseinheit 7 (Abbildung 23)							
V10	12-Well MTP	0,492	0.08	2.0	15.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 8 (Abbildung 24)							
V11	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	10.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 9 (Abbildung 25)							
V11	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	10.0	37.0	200.0
V12	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	8.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 10 (Abbildung 26)							
V11	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	10.0	37.0	200.0
V13	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	8.0	30.0	200.0
V14	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	8.0	37.0	300.0
V15	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	8.0	30.0	300.0

Tabelle 19: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)

Versuch	$\Delta OD_{HK, end}$		$\Delta OD_{MW, end}$	$t_{HK, end}$	Bemerkung
V10	7.76		7.76	6.17	Ab 3.5 h einsetzende Sauerstofflimitierung.
V11 (DB)*	5.11	4.80	4.96	6.50	einsetzende Sauerstofflimitierung
V12 (DB)*	4.26	4.18	4.22	6.42	einsetzende Sauerstofflimitierung
V13 (DB)*	2.62	2.68	2.65	6.50	Keine Limitierung
V14 (DB)*	7.99	8.92	8.46	6.95	Keine Limitierung
V15 (DB)*	3.16	3.40	3.28	7.08	Keine Limitierung

Der Vorversuch im 12-Well MTP-Format ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von etwa sieben Stunden. Die weiteren Parameter des Vorversuches sind in Tabelle 18 aufgeführt. In diesem Versuch wird eine hohe Glucoseanfangskonzentration gewählt, um die HK mit einer höheren optischen Dichte animpfen zu können. Es müssen schnell optische Dichten >0.6

erreicht werden, um das Probenahmenvolumen reduzieren zu können. Zusätzlich konnte in Abschnitt 4.1.2 gezeigt werden, dass in diesem MTP-Format die Verdunstungsrate höher wird je weniger Füllvolumen in den *Wells* vorliegt. Die Probenahmen erfolgen in dieser Kultivierung ca. alle 20 Minuten. Dies ist durch die hohe $\Delta OD_{HK,0}$ ab der ersten Probe möglich.

In diesem Versuch verläuft das Wachstum in den einzelnen *Wells* unterschiedlich. Evtl. wurde die Vorkultur während des Animpfens nicht genügend geschwenkt und es haben sich Zellen abgesetzt, wodurch es zu unterschiedlichen Animpfkonzentrationen gekommen sein könnte. Eventuell ist der Flüssigkeitsverlust durch Verdunsten auch nicht gleichmäßig auf alle 12-*Wells* verteilt. Allerdings wurde die starke Varianz der optischen Dichte in den einzelnen *Wells* in den nachfolgenden Versuchen nicht beobachtet, so dass eine inhomogene Inokulation am wahrscheinlichsten erscheint.

Durch die starke Streuung der Messwerte wird die Interpretation des Versuches V10 erschwert. Es scheint als würde ab einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden die Wachstumsgeschwindigkeit abnehmen. Ab der sechsten Stunde der Kultivierung scheint die Kultur in die stationäre Phase überzugehen. In den folgenden Versuchen wurden geringere Streuungen beobachtet, so dass konkretere Interpretationen möglich sind.

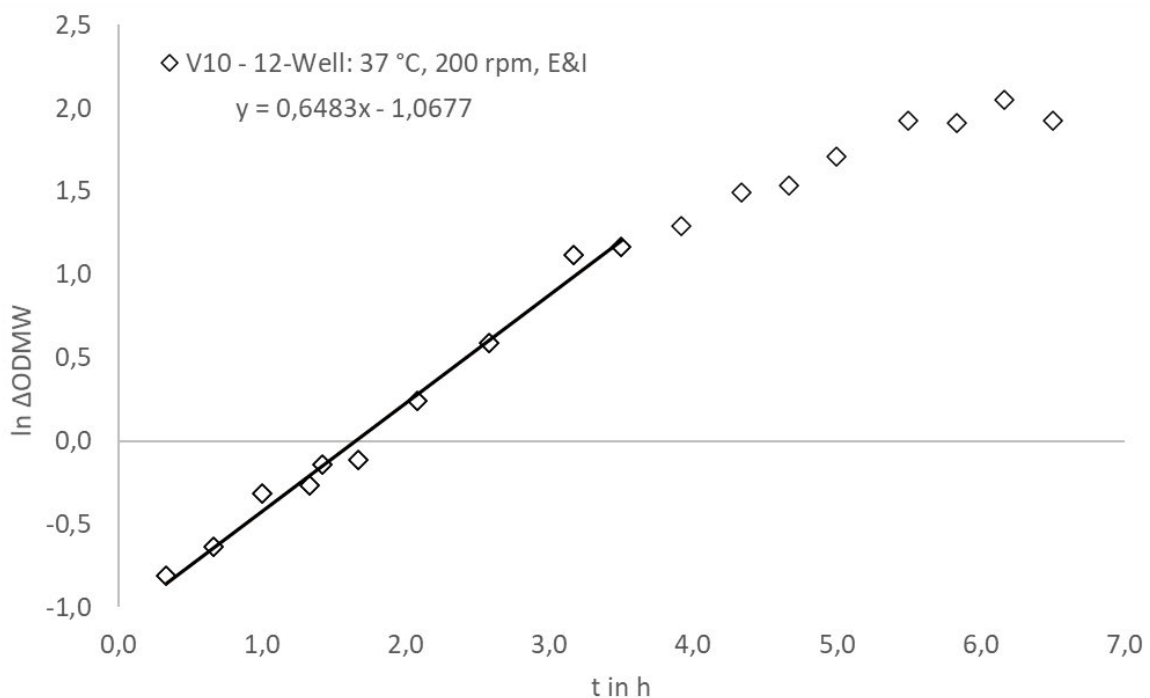


Abbildung 23: V10 - Vorversuch einer Kultivierung im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 7). Angeimpft aus einer Vorkultur

In Abbildung 24 ist der Vergleich von zwei Kultivierungen im 12-Well MTP-Format, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, aufgetragen. Dieser Versuch wird durchgeführt, um zu sehen ob die Wachstumsraten in beiden MTPs sowie in den einzelnen *Wells* an den Ecken sowie im inneren der MTP gleichmäßig verlaufen. Die Kultivierung erfolgt bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. Die Inokulation erfolgt direkt aus der Kryokultur. In diesem Versuch ist die $\Delta OD_{HK,0}$ deutlich niedriger als in Versuch V10. Dadurch erfolgt die Probenahme hier in den ersten drei Stunden etwa alle 30-40 Minuten, danach etwa alle 20 Minuten. Auch hier ist bei den DBs ein annähernd gleicher Verlauf der einzelnen Messpunkte zu erkennen. Dies spricht für ein reproduzierbares Ergebnis. In den ersten 4.5 Stunden bis zu einer OD von etwa 1.7 ist ein gleichmäßiger Wachstumsverlauf der einzelnen Messpunkte der Ecken- und Innenwells zu erkennen. Im Verlauf der Kultivierungen sind ab ca. 4.5 Stunden leichte Schwankungen der OD zu erkennen, was vermutlich durch unterschiedliche Verdunstung pro *Well* auftritt, da das Kulturvolumen durch eine kontinuierliche Probenahme sinkt und somit die Verdunstungsrate steigt. Dies kann in einzelnen *Wells* mehr oder weniger stark vorkommen. Es wäre auch zu vermuten, dass leichte Temperaturunterschiede in der MTP oder im Inkubator vorkommen und somit Unterschiede in der Verdunstung des wässrigen Anteiles des Mediums aufweisen was zu einer Abweichung der Wachstumsraten der Zellen pro *Well* führen kann.

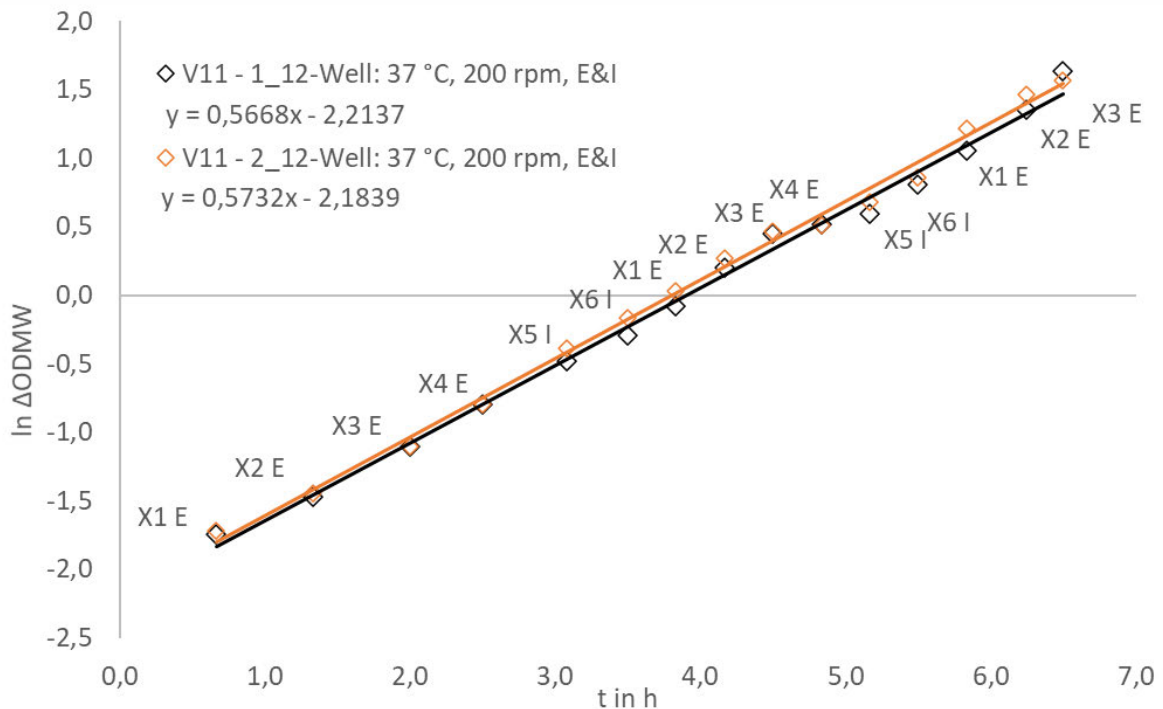


Abbildung 24: V11 – DB im 12-Well MTP-Format bei 37 °C und 200 rpm. Vergleich der Wachstumsrate in den Ecken (E)- und Innenwells (I) (Versuchseinheit 8)

In der Versuchseinheit 9 werden zwei Kultivierungsversuche V11 und V12 im 12-Well MTP-Format durchgeführt. Dabei werden zwei verschiedene Probenahmeschemas (s. Kapitel 3.6.1.1 in Abbildung 9) angewandt (s. Abbildung 25). Ziel dieser Versuche ist es die Wachstumsrate der Kultivierung (V11) der angeimpften Eck- und Innenwells, mit (V12) den Außen- und Innenwells zu vergleichen und zu analysieren, ob in jedem Well ein gleichmäßiges Wachstum stattfindet. Zur besseren Übersicht werden die Versuche V11 und V12 jeweils als MW aufgetragen. Dies ist möglich da die Versuche eine hohe Reproduzierbarkeit der Wachstumsverläufe in den DBs aufweisen. Beide Versuche werden bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm durchgeführt. Die Probenahme erfolgt in den ersten drei Stunden alle 40 Minuten, danach alle 20 Minuten.

Die einzelnen Messpunkte der Kultivierungen im 12-Well MTP-Format zeigen in den ersten fünf Stunden sowie in der letzten Stunde einen ähnlichen bzw. gleichmäßigen Wachstumsverlauf der Außen-, Innen- und Eckenwells. Bei Versuch V12 ist ein gleichmäßigerer Wachstumsverlauf der einzelnen Messpunkte bis zum Ende der Kultivierung festzustellen als in V11. Die Wachstumsraten ($0,57 - 0,58 \text{ h}^{-1}$) sind insgesamt niedriger als in der Kultivierung im Schüttelkolben ($0,68 - 0,69 \text{ h}^{-1}$), aber reproduzierbar. Grundsätzlich ist das Wachstumsverhalten in den beiden MTP-Versuchen

vergleichbar. Grund für die leichten Schwankungen in den letzten Stunden der Kultivierung von Versuch V11 könnten Pipettierfehler z. B. beim Verdünnen der Probe zur OD-Messung sowie ungleichmäßige Verdunstungsraten in den einzelnen *Wells* sein. Die letzten Messpunkte (vermutlich einsetzende Sauerstoff-, Substratlimitierung) sind in dieser Abbildung nicht aufgetragen.

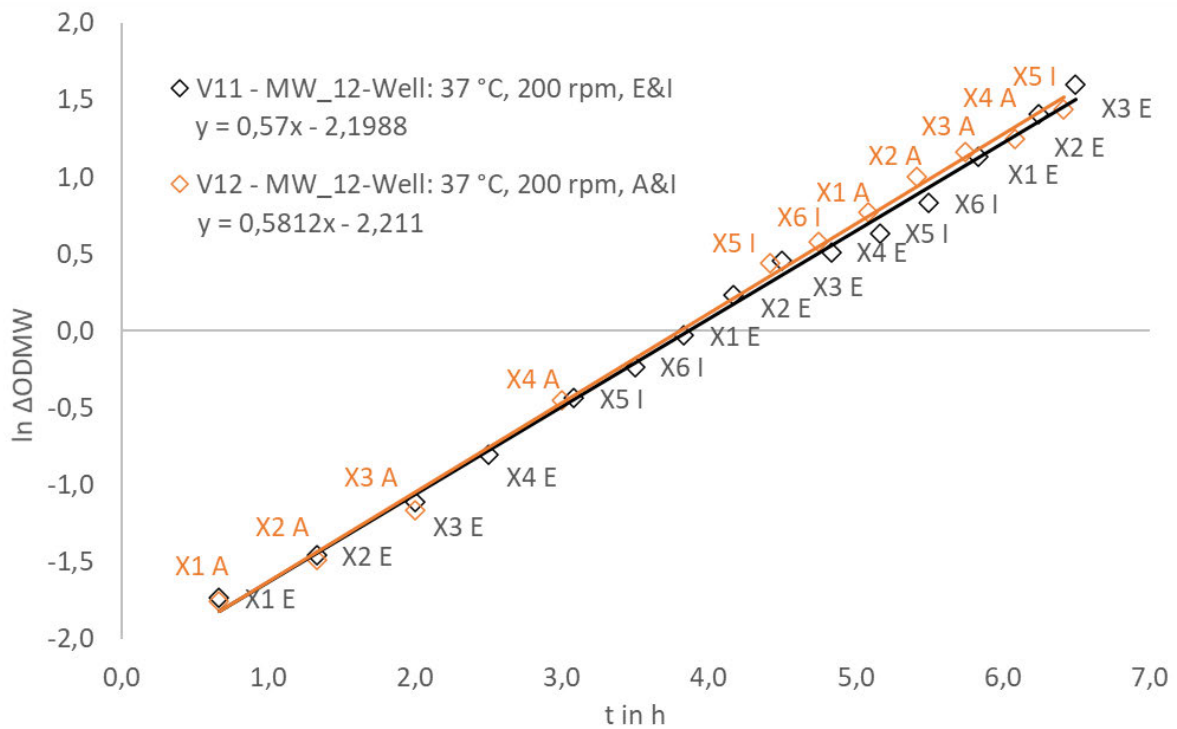


Abbildung 25: V11 und V12 - Vergleich der Wachstumsraten der Zellen in den Ecken- und Innenwells mit Außen (A)- und Innenwells im 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 9)

Abbildung 26 zeigt das Wachstumsverhalten von Versuch V11, V13, V14 und V15 (Versuchseinheit 10) im 12-Well MTP anhand verschieden eingestellter Schüttelfrequenzen sowie unterschiedlicher Temperatur. Zur besseren Übersicht sind jeweils die Mittelwerte der gemessenen DBs der Kultivierungen aufgetragen. Die Probenahme erfolgt in den ersten drei Stunden von Versuch V13 bis V15 nur einmal pro Stunde. Aufgrund des langsameren Zellwachstums werden zunächst pro Probenahme 1 ml Kulturbrühe benötigt. Danach werden in kürzeren Abständen (20/30 Minuten) kleinere Volumina zur Messung der OD gezogen.

Versuch V11 und V14 werden bei einer eingestellten Schüttelfrequenz von 200 rpm und 300 rpm und einer Kultivierungstemperatur von 37 °C durchgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass die Wachstumsrate in Versuch V14 ($0,61 \text{ h}^{-1}$) im vergleichbaren Bereich wie bei Versuch V11 ($0,57 \text{ h}^{-1}$) liegt. Selbst bei höher eingestellter

Schüttelfrequenz von 300 rpm ist die Wachstumsrate dennoch niedriger als bei einer Kultivierung im Schüttelkolben bei 200 rpm (0.68 h^{-1} – 0.69 h^{-1}) (s. Kapitel 4.2.1). Es werden aber deutlich höhere ODs bei Versuch V14 (8.5) im Vergleich zu V11 (5.0) beobachtet, ohne das eine Sauerstofflimitierung aufzuweisen ist (Tabelle 17).

Versuch V13 und V15 werden ebenso anhand unterschiedlich eingestellter Schüttelfrequenzen 200 rpm und 300 rpm, dieses Mal aber bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C durchgeführt. Die Wachstumsraten von V13 und V15 (0.45 h^{-1} und 0.45 h^{-1}) sind bei 200 rpm und 300 rpm ebenfalls vergleichbar.

Bei V14 wäre dennoch eine höhere Wachstumsrate zu vermuten als 0.62 h^{-1} . Allgemein sind alle aufgeführten Wachstumsraten in Abbildung 26 niedriger als erwartet, aber die Versuche sind reproduzierbar. Die niedrigeren Wachstumsraten sind vermutlich durch die häufige Probenahme zurückzuführen. Grundsätzlich ist das Wachstumsverhalten in den beiden MTP Versuchen ähnlich. Mit höher eingestellten Schüttelfrequenzen sowie höheren Substratkonzentrationen können vermutlich noch höhere Zelldichten in diesem MTP-Format erreicht werden.

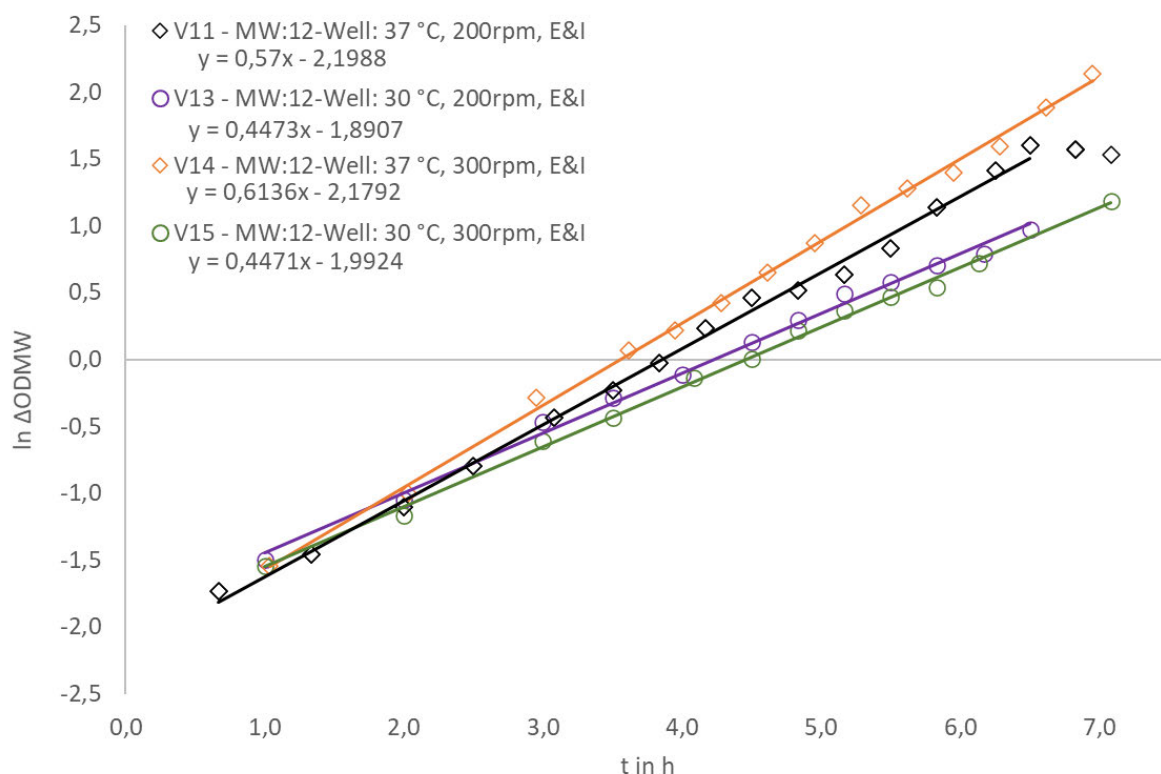


Abbildung 26: V11, V13, V14 und V15 - Vergleich der Wachstumsraten im 12-Well MTP-Format bei unterschiedlichen Temperaturen und Schüttelfrequenzen (Versuchseinheit 10). Aufgetragen als Mittelwert der DBs der MTPs

4.2.2.2 Batch-Fermentation: Vergleich 6- und 12-Well MTP

Im folgenden Kapitel werden die Wachstumsraten von Kultivierungen im 6-Well MTP-Format mit denen im 12-Well MTP-Format anhand unterschiedlicher Parameter verglichen. In Tabelle 20 sind die verwendeten Parameter der Versuche aufgeführt. Die erreichten ODs sowie die Kultivierungsdauer der jeweiligen Versuche sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 20: Parameter zu den einzelnen Versuchen.

Versuch	Format	$\Delta OD_{HK,0}$	V_{ino} [ml]	$V_{füll}$ [ml]	c_{SL} [g/l]	τ [°C]	rpm
Versuchseinheit 11 (Abbildung 27)							
V06	6-Well MTP	0.143	0.50	5.0	4.5	37.0	200.0
V07	6-Well MTP	0,0483	0.05	5.0	4.5	37.0	200.0
V10	12-Well MTP	0,492	0.08	2.0	15.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 12 (Abbildung 28)							
V08	6-Well MTP	0.10	0.2	4.0	8.0	37.0	200.0
V11	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	10.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 13 (Abbildung 29)							
V09	6-Well MTP	0.10	0.2	4.0	8.0	30.0	200.0
V15	12-Well MTP	0.20	0.2	2.0	8.0	30.0	200.0

Tabelle 21: Optische Dichte der HK sowie Kultivierungsdauer (*angeimpft mit Kryokultur)

Versuch	$\Delta OD_{HK, end}$		$\Delta OD_{MW, end}$	$t_{HK, end}$	Bemerkung
V06	3.55		3.55	5.08	Keine deutliche Limitierung
V07	1.83		1.83	6.17	Keine Limitierung
V08 (DB)*	4.07	4.82	4.45	7.00	Keine Limitierung
V09 (DB)*	0.73	0.72	0.73	6.92	Keine Limitierung
V10	7.76		7.76	6.17	Ab 3.5 h einsetzende Sauerstofflimitierung. Ab 6.17 h sinkt OD
V11 (DB)*	5.11	4.80	4.96	6.50	Keine Limitierung
V15 (DB)*	3.16	3.40	3.28	7.08	Keine Limitierung

In Abbildung 27 werden die Wachstumsverläufe der Vorversuche im 6- und 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 11) gegenübergestellt, um zu untersuchen ob in beiden Formaten die gleichen Wachstumsraten möglich sind. Die Versuche werden an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt und mit unterschiedlicher Start-OD und VK aus verschiedenen ZBs (ZB1 und ZB2) angeimpft (Tabelle 14). Die Kultivierungen werden bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm durchgeführt. Die Wachstumsraten sind in den MTP-Formaten ähnlich. Im 6-Well MTP-Format (Versuch V06 und V07) liegen die Wachstumsraten bei 0.66 h⁻¹ und 0.64 h⁻¹ und im 12-Well MTP-Format (Versuch V10) bei 0.65 h⁻¹. Bei Versuch V10 ist aber schon ab einer Inkubationszeit von 3.5 Stunden eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit zu verzeichnen. Wie in Kapitel 4.2.2.1 (Versuchseinheit 7) beschrieben ist vermutlich die Anfangszellkonzentration in den einzelnen Wells inhomogen, wodurch das Wachstum in den einzelnen Wells unterschiedlich verläuft. Dadurch sind konkrete Interpretationen zur Vergleichbarkeit der Wachstumsraten über einen längeren Inkubationszeitraum als 3.5 Stunden in dieser Versuchseinheit nicht möglich. Die folgenden Versuchseinheiten weisen geringere Streuungen auf.

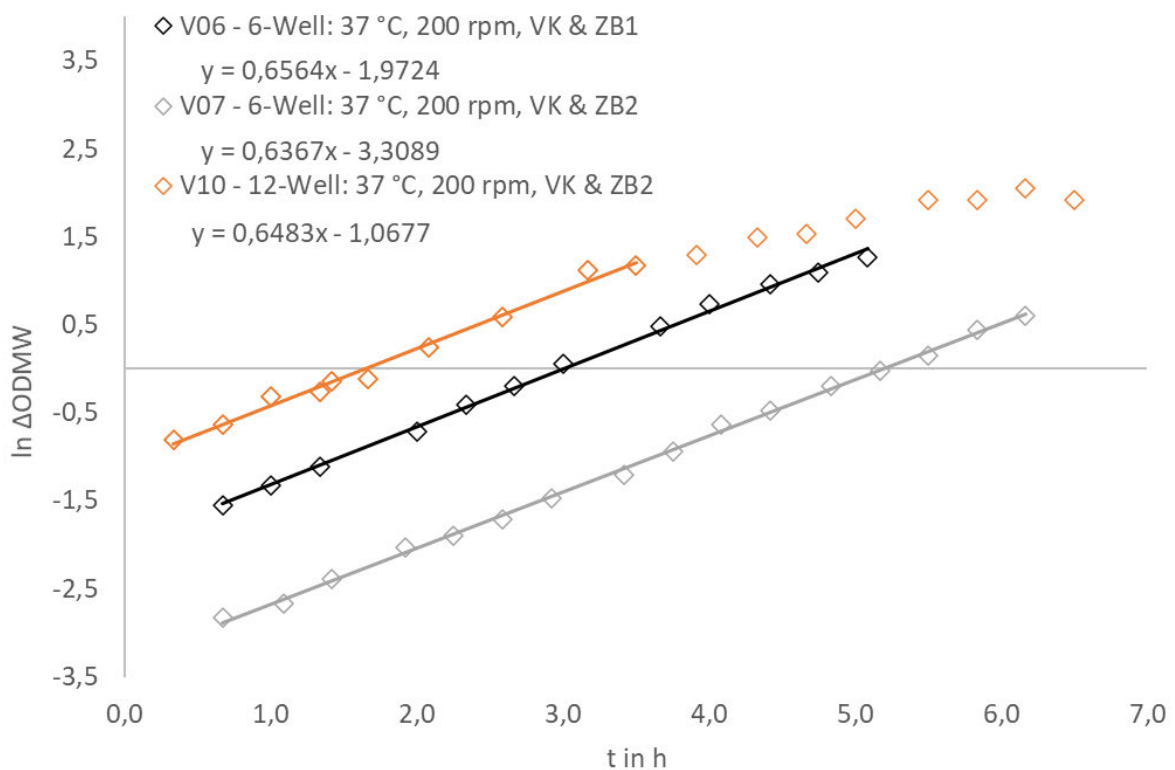


Abbildung 27: V06, V10 und V07 - Vergleich der Wachstumsraten der Vorversuche im 6- und 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 11). Angeimpft aus Vorkulturen.

Die Wachstumsverläufe der Versuche V08 im 6-Well MTP-Format und V11 im 12-Well MTP-Format werden in Abbildung 28 gegenübergestellt. Die Inokulation erfolgt direkt aus der Kryokultur. Für Versuch V08 und V11 (Versuchseinheit 12) werden jeweils die Mittelwerte der DB aufgetragen. Dies ist möglich da die Versuche eine hohe Reproduzierbarkeit der Wachstumsverläufe in den DBs aufweisen.

In dieser Versuchseinheit ist die Wachstumsrate der Zellen im 6-Well MTP-Format (0.62 h^{-1}) ebenfalls vergleichbar zu denen im 12-Well-Format (0.57 h^{-1}).

Die Wachstumsraten in den beiden MTP-Formaten sind niedriger als im Schüttelkolben, die Versuche zeigen aber eine hohe Reproduzierbarkeit des Wachstumsverhaltens (Abbildung 22 und Abbildung 24).

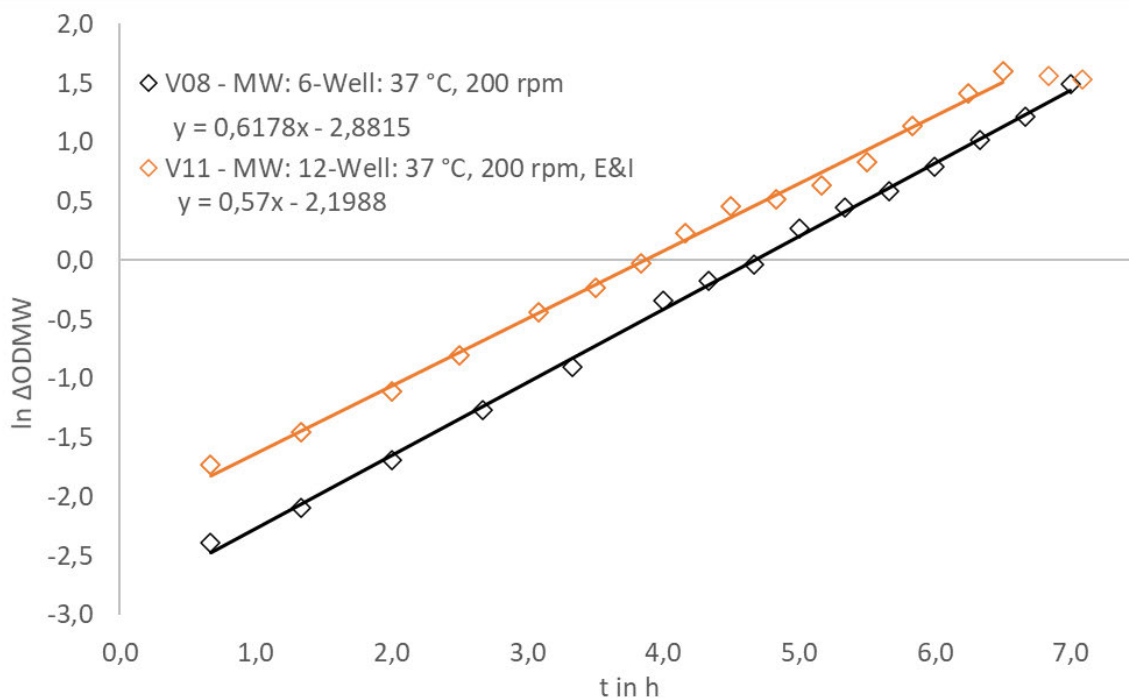


Abbildung 28: V08 und V11 - Vergleich der Wachstumsraten im 6- und 12- Well MTP-Format bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm (Versuchseinheit 12). Angeimpft aus einer Kryokultur

Abbildung 29 zeigt die Wachstumsverläufe von zwei Kultivierungen im 6- und 12-Well MTP-Format (Versuchseinheit 13) bei einer Kultivierungstemperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Zur Auswertung werden die Mittelwerte der DBs dargestellt, da auch in diesen Versuchen ein annähernd gleicher Verlauf des Zellwachstums in den einzelnen Wells vorliegt. Die identifizierte Wachstumsrate ist im 12-Well MTP-Format (0.45 h^{-1}) deutlich höher als im 6-Well MTP-Format (0.35 h^{-1}). In den vorherigen Versuchen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28) sind die Wachstumsraten des 6- und 12-Well MTP-Formates ähnlich ausgefallen. Es wäre auch hier zu vermuten, dass die Wachstumsraten in den

MTP-Formaten ähnlich ausfallen. Evtl. Fehler bei der Durchführung, oder beim Ansetzen des Mediums sind nicht auszuschließen.

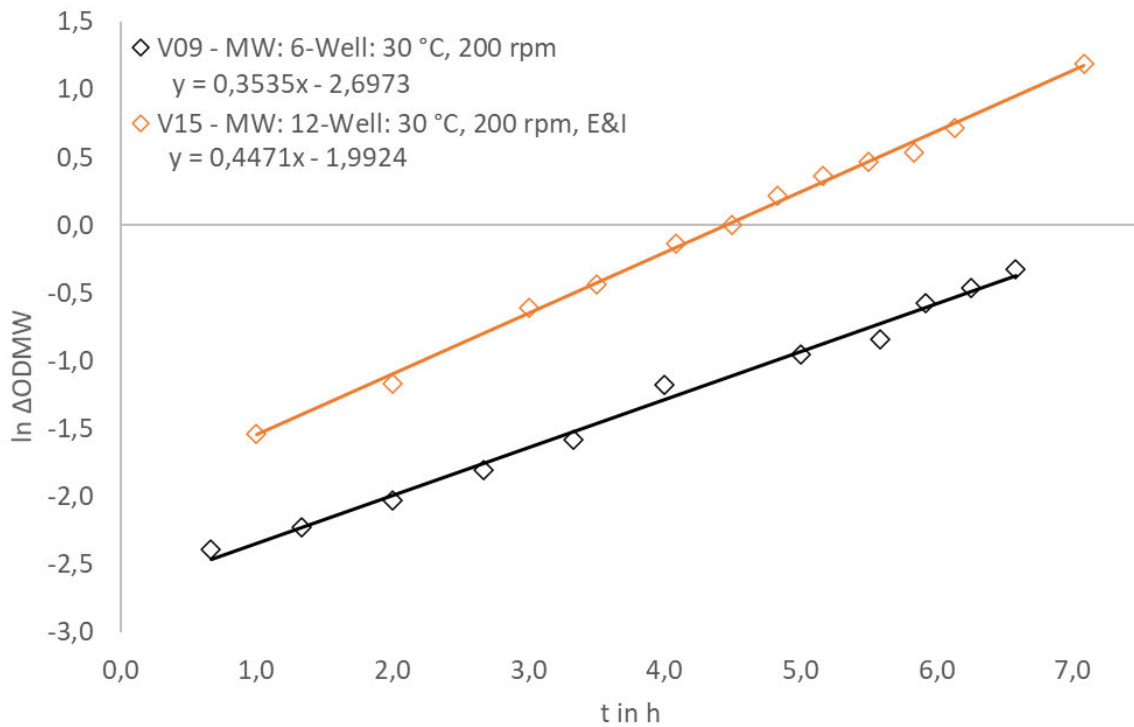


Abbildung 29: V09 und V15 - Vergleich der Wachstumsraten im 6- und 12-Well MTP-Format bei 30 °C und 200 rpm (Versuchseinheit 13). Angeimpft aus Kryokultur

4.2.2.3 Batch-Fermentation im *Deepwell* System von *Duetz*

In diesem Kapitel wird auf die Vorgehensweise der Kultivierung im 24-*Deepwell* System von *Duetz* eingegangen. Die Parameter der Versuche V16 bis V18 sowie V05 sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Parameter zu den einzelnen Versuchen im 24-*Deepwell* System von *Duetz* (*angeimpft mit Kryokultur)

Versuch	Format	$\Delta OD_{HK,0}$	V_{Ino} [ml]	$V_{Füll}$ [ml]	c_{SL} [g/l]	τ [°C]	rpm
Versuchseinheit 14 (Abbildung 45 und Abbildung 44)							
V16	24- <i>Deepwell</i> MTP	0.05*	0.10	4.0	8.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 15 (Abbildung 47 und Abbildung 46)							
V17	24- <i>Deepwell</i> MTP	0.05*	0.10	4.0	8.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 16 (Abbildung 49 und Abbildung 48 Abbildung 51 und Abbildung 50)							
V18	24- <i>Deepwell</i> MTP	0.15*	0.30	4.0	10.0	37.0	200.0
Versuchseinheit 17 (Abbildung 30)							
V05	Schüttelkolben	0.06*	4.00	100.0	10.0	37.0	200.0

Alle Versuche werden bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer eingestellten Schüttelfrequenz von 200 rpm sowie mit maximalem Füllvolumen von 4 ml durchgeführt. Die Kultivierungen verliefen in diesem System nicht wie erwartet. Es gibt pro Messung im PR mit der 96-*Well* MTP zum Teil hohe bis sehr hohe CV-Werte, vor allem in den ersten zwei Versuchen V16 und V17 (siehe Tabelle 47 und Tabelle 49 im Anhang Kapitel 7). Im Folgenden wird die Vorgehensweise in den einzelnen Versuchen mit dem 24-*Deepwell* System von *Duetz* erläutert, um dem Problem auf den Grund zu gehen.

V16 (VERSUCHSEINHEIT 14)

Im ersten Versuch im 24-*Deepwell* System von *Duetz*, gibt es sehr hohe Streuungen der OD der einzelnen *Wells* sowie der einzelnen DBs. Während der Kultivierung bzw.

Probenahme war es rein optisch zu erkennen, dass die 12-Kanal-Pipette nicht immer das gleiche Probenvolumen in den 12 Kanälen zog. Die Pipette ist älter und wurde länger nicht benutzt. Zudem könnten auch beim Animpfen der einzelnen *Wells* Fehler beim Pipettieren entstanden sein. Jedes *Well* wird mit Hilfe einer Einkanalpipette mit einem Volumen von 100 μl Kryokultur angeimpft.

Die Wachstumsraten liegen im Bereich von 0.186 h^{-1} bis 0.615 h^{-1} und sind aufgrund der hohen Streuung nicht aussagekräftig. Es gab pro OD-Messung der Reihen A bis D der MTP zum Teil sehr hohe CV-Werte (bis zu 16 %) (s. Tabelle 47 im Anhang Kapitel 7).

V17 (VERSUCHSEINHEIT 15)

Im zweiten Versuch mit dem 24-*Deepwell* System von *Duetz*, wird die Kultivierung mit den gleichen Parametern wiederholt. Es wird eine weitere 12-Kanal-Pipette aus einem anderen Labor verwendet.

Um evtl. Fehler beim Animpfen auszuschließen und zügiger die *Wells* anzuimpfen, wird wie in Kapitel 3.5.4 vorgegangen. Die Kryokultur wird mitsamt Medium vermengt und mit Hilfe der Dispensette in die einzelnen *Wells* der MTP überführt. Dies wird zügig durchgeführt, um ein Absetzen der Kultur im Medium zu vermeiden.

Auch bei diesem Versuch gibt es Abweichungen der Wachstumsraten in den einzelnen *Wells*, welches sich vor allem bei der zweiten Messung äußert (s. Abbildung 46 und Abbildung 47 im Anhang Kapitel 7). Zudem sind die Wachstumsraten zum Teil sehr niedrig (0.343 h^{-1} bis 0.557 h^{-1}) im Vergleich zu den Wachstumsraten im Schüttelkolben welche sich bei 200 rpm und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ etwa im Bereich von 0.66 h^{-1} bis 0.7 h^{-1} befinden (s. Kapitel 4.2.1).

V18 (VERSUCHSEINHEIT 16)

Im letzten Versuch mit dem 24-*Deepwell* System von *Duetz*, werden zwei parallele Kultivierungen mit einer relativ neuen 12-Kanal-Pipette (30-300 μl) durchgeführt.

In diesem Versuch wurde mit einer Dispensette angeimpft, um Fehlerquellen zu minimieren (s. Kapitel 3.5.4). So kann die Kryokultur zügig in alle *Wells* überführt werden. Zudem wird mit einem größeren Volumen an Kryokultur (300 μl) angeimpft, um die $\Delta\text{OD}_{\text{HK},0}$ der HK zu erhöhen, da bei der Messung mit niedrigerer OD die Messungengenauigkeit höher wird (s. Tabelle 51 und Tabelle 53 im Anhang Kapitel 7).

In diesem Versuch verläuft die Messung vor allem in den *Wells* C (1-6) und D (2-6) in der ersten 24-*Deepwell* MTP (V18_1) von der DB am genauesten (s. Abbildung 49 im Anhang Kapitel 7). Dennoch sind in den einzelnen Reihen sehr hohe CV-Werte (bis zu 25 %), welche auf einzelne Ausreißer pro Kanal der Pipette zurückzuführen sind (s. Tabelle 51).

In der zweiten *Deepwell* MTP (V18_2 s. Abbildung 50 und Abbildung 51) sind die CV-Werte (s. Tabelle 53) in der ersten OD-Messung im PR sehr hoch. In Reihe B liegen sie bei 14.1 % und Reihe C bei 15.7 %

Im weiteren Verlauf der Kultivierung liegen die CV-Werte in einem akzeptablen Bereich von 1 % bis 5.9 %. Allerdings sind die Wachstumsraten sehr viel niedriger als erwartet, sie liegen zwischen 0.2334 h^{-1} und 0.3837 h^{-1} .

Der Kultivierungsvorgang wird bei jeder Probenahme für ca. 5 Minuten unterbrochen. Dies kann sich auf die Wachstumsrate auswirken da die Zellen während der Probenahme einer niedrigeren Temperatur ausgesetzt sind und die Sauerstoffzufuhr unterbrochen wird. Dies allein kann vermutlich nicht für so geringe Wachstumsraten verantwortlich sein.

Evtl. ist das gewählte Füllvolumen zu hoch und die eingestellte Schüttelfrequenz von 200 rpm zu niedrig für die Kultivierung. Allerdings soll eine Kultivierung in diesem System bis zu 4 ml möglich sein. Es waren weitere Versuche mit niedrigeren Füllvolumen geplant sowie mit dem vom Hersteller angegeben optimalen Füllvolumen von 2.5 ml, um die Wachstumsraten zu vergleichen, aber aus zeitlicher Begrenzung dieser Arbeit nicht möglich. Höhere Schüttelfrequenzen wären ebenfalls optimaler für einen erhöhten Sauerstoffeintrag, was aber auch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Um das Medium als Fehlerquelle auszuschließen, wird eine Kultivierung im Schüttelkolben durchgeführt. Das Wachstum der Zellen verläuft wie erwartet bei $0,69 \text{ h}^{-1}$ (s. Abbildung 30). Eine Verblockung des Filtermaterials wäre nicht auszuschließen. Evtl. wurde die MTP nicht lang genug nach der Sterilisation (s. Kapitel 3.5.3) getrocknet. Es könnte eine Kombination der genannten Gründe für die sehr niedrigen Wachstumsraten verantwortlich sein.

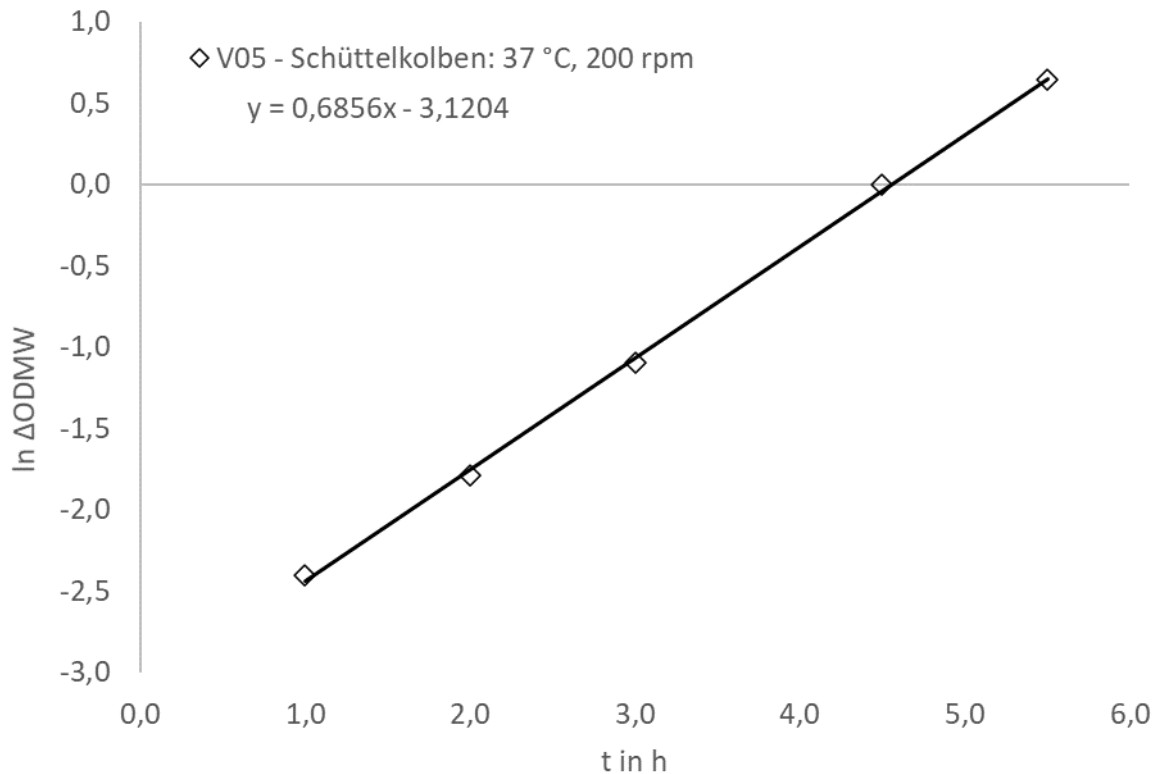


Abbildung 30: V05 - Kontrolle des Mediums (Versuchseinheit 17)

Da insbesondere in den inneren *Wells* der MTP eine höhere OD ermittelt wird wäre zu vermuten, dass bei der OD-Messung mit der 96-*Well* Platte im PR Streuungen zwischen den *Wells* eine erhöhte Absorption erzeugen. Ein weiteres Vorgehen wäre eine andere 96-*Well* Platte zu verwenden, wie z. B. eine schwarze Platte mit flachen durchsichtigen Boden (*F-bottom*). Damit könnte eine Streuung der Absorptionen der *Wells* untereinander vermieden werden.

Zudem haben die einzelnen *Wells* der 96-*Well* Platten während der Messung im PR unterschiedliche Eigenabsorptionen die als Fehler mit einbezogen werden können.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Bachelorarbeit werden die Wachstumsraten sowie das Wachstumsverhalten von *E. coli* BL21 (DE3) in verschiedenen MTP-Formaten analysiert und miteinander verglichen. Als Medium wird ein Minimalmedium gewählt, um vergleichbare Grundvoraussetzungen für die Versuche zu haben. Es wird bei der Inokulation der MTPs auf das direkte Animpfen aus der Kryokultur gewechselt, um konstante Animpfzellkonzentrationen für jeden Versuch zu erhalten und Fehlerquellen zu minimieren da bei einer Vorkultur nie dieselbe End-OD herrscht.

Die *single-use* MTP-Formate weisen zum Teil hohe Verdunstungsraten auf, die sich auf die Wachstumsraten auswirken, da durch die Verdunstung die Kultur eingeengt und die gemessene OD verfälscht wird. Deswegen muss für jedes Format die Verdunstungsrate bestimmt und abgezogen werden. Die Verdunstungsrate kann nur für das ganze System bestimmt werden. Für die einzelnen *Wells* ist sie damit nur ein Näherungswert. Dadurch können leichte Schwankungen bei der OD Messung in den einzelnen *Wells* vorkommen.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung im 6- und 12-*Well* MTP-Format reproduzierbar ist. Sie haben bei gleichen Kultivierungsbedingungen annähernd gleiche Wachstumsraten in den einzelnen MTP-Formaten. Allerdings zeigt sich während der Versuche, dass die Wachstumsraten in den Mikrotiterplatten zum Teil etwas niedriger ausfallen als im Schüttelkolben (s. Kapitel 4.2.1). Grund dafür könnte sein das in dieser Arbeit für die MTP-Formate eine höhere Probenahmefrequenz gewählt wurde als für den Schüttelkolben.

Es hat sich erwiesen, dass das Kultivieren von *E. coli* BL21 (DE3) in Zellkulturplatten möglich und somit etablierbar ist. Jede Platte hat ihre eigenen Vorzüge und ist für verschiedene Zwecke einsetzbar. Die Wachstumsraten sind durchaus ausreichend für weitergehende Versuche. Es könnten weitere Parameter wie unterschiedliche pH-Werte und Medienzusammensetzungen sowie Produktbildung in Betracht gezogen werden.

Die Kultivierung im 24-*Deepwell* System von *Duetz* ist in dieser Arbeit nicht wie gewünscht verlaufen. Die Mehrkanalpipetten zogen zum Teil unterschiedliche Volumina. Es werden in dieser Arbeit drei verschiedene Pipetten verwendet, wobei die Mehrkanal-Pipette mit 30-300 μ l die höchste Genauigkeit (CV-Werte) während des Testens

und der Versuche aufweist. Eine Etablierung des *Deepwell* Systems ist durch die aufgeführte Problematik und der begrenzten Zeit in dieser Arbeit nicht möglich.

Beim *Deepwell* System von *Duetz* muss zunächst eine Reproduzierbarkeit der einzelnen Wachstumsverläufe bzw. Wachstumsraten in allen *Wells* mit den verfügbaren Mitteln erreicht werden um weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Parametern (Kultivierungstemperatur, Schüttelfrequenz und Füllvolumen) durchführen zu können. Es könnten weitere OD-Messungen im PR mit schwarzen 96-*Well* Platten mit einem flachen durchsichtigen Boden durchgeführt werden, um eine Streuung der Absorptionen der *Wells* untereinander zu vermeiden und bessere Ergebnisse zu erzielen.

6 Literaturverzeichnis

- [Antranikian 2006] Antranikian, Garabed (Hg.) (2006): Angewandte Mikrobiologie. Mit 69 Tabellen. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://swbplus.bsz-bw.de/bsz115057161cov.htm>.
- [Carlroth 2021] Carlroth (2021): 12-Well Zellkulturplatte. <https://www.carlroth.com/de/de/flaschen-platten-schalen-fuer-die-zellkultur/zellkulturplatten-steril/p/ekx6.1>, abgerufen am 13.11.21
- [Cellsignet 2021] Cellsignet (2021): 6-, 12- und 24-Well MTP-Vorlage. <http://www.cellsignet.com/media/templ.html>, abgerufen am 26.11.21
- [Chmiel, Takors & Weuster-Botz 2018] Chmiel, Horst; Takors, Ralf; Weuster-Botz, Dirk (2018): Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [Clark & Pazdernik 2009] Clark, David P.; Pazdernik, Nanette Jean (2009): Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Online verfügbar unter <http://swbplus.bsz-bw.de/bsz309852552cov.htm>.
- [Dammann 2015] Dammann, Katja (2015): Entwicklung einer Versuchsvorschrift für die Batchkultivierung von *Escherichia coli* BL21 in Laborbioreaktoren mit einer durch Lactose induzierten β -Galactosidase-Produktion. Bachelorarbeit. Hamburg.
- [Duetz 2007] Duetz, Wouter A. (2007): Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. In: *Trends in microbiology* 15 (10), S. 469–475. DOI: 10.1016/j.tim.2007.09.004.
- [Duetz et al. 2000] DUETZ, W. A.; RUEDI, L.; HERMANN, R.; O'CONNOR, K.; BUCHS, J.; WITHOLT, B. (2000): Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Nr. 66, S. 6, 2641-2646.
- [Doig et al 2005] Doig, Steven D.; Pickering, Samuel C.R.; Lye, Gary J.; Baganz, Frank (2005): Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. In: *Chemical Engineering Science* 60 (10), S. 2741–2750. DOI: 10.1016/j.ces.2004.12.025.
- [Enzyscreen 2021] Enzyscreen (2021): 24-Deepwell System von Duetz. <https://www.enzyscreen.com> abgerufen am 06.12.21

- [Fishersci 2021] Fishersci (2021): 6-Well und 12-Well Zellkulturplatte. <https://www.fishersci.de/shop/products/cellstar-polystyrene-6-well-cell-culture-multiwell-plates/10536952>; <https://www.fishersci.de/shop/products/falcon-tissue-culture-plates-23/10110151> (Abbildung); <https://www.fishersci.de/shop/products/falcon-tissue-culture-plates-23/10489482> (Abbildung), abgerufen am 20.12.21
- [Franzgrote 2014] Franzgrote, Lukas (2014): Systematische Untersuchung des Einflusses von Aminosäurezusätzen auf das Wachstumsverhalten und die Produktbildung rekombinanter *Escherichia coli* im Mikrotiterplattenformat. Bachelorarbeit. Hamburg.
- [Hielscher 2022] Hielscher (2022): *E. coli* BL21: <https://www.hielscher.com/wp-content/uploads/E.-coli-bacteria-protein-expression-ultrasonic-cell-disruption-lysis-protein-extraction-HielscherUltrasonics.jpg> abgerufen am 15.02.2022
- [Jansohn & Rothämel 2012] Jansohn, Monika; Rothämel, Sophie (Hg.) (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Aufl. 2012. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1569275>.
- [Mandenius 2016] Mandenius, Carl-Fredrik (Hg.) (2016): Bioreactors. Design, operation and novel applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <https://online-library.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527683369>.
- [Munk 2018] Munk, Katharina (2018): Mikrobiologie. 381 Abbildungen und 43 Tabellen. 2., unveränderte Auflage. Hg. v. Katharina Munk. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (Taschenlehrbuch Biologie).
- [Noll et al. 2013] Noll, Stephan; Reyelt, Jan; Rysiok, Thomas; Kellner, Roland; Güssow, Detlef; Jäkel, Stefan et al. (2013): Gezielte Optimierung von *Escherichia coli* BL21(DE3). In: *Biospektrum* 19 (2), S. 211–213. DOI: 10.1007/s12268-013-0292-2.
- [Präve et al 1994] Präve, Paul (Hg.) (1994): Handbuch der Biotechnologie. Mit 401 Abbildungen, 150 Tabellen, 26 Fließschemata sowie 80 Strukturformeln und zahlreichen weiteren Zusammenstellungen und Formeln. 4., neu bearb. und erw. Aufl. München: Oldenbourg.

- [Rohe 2012] Rohe, Peter (2012): Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen. Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2012. Jülich: Forschungszentrum Jülich (Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Gesundheit, 58). Online verfügbar unter <http://hdl.handle.net/2128/4706>.
- [Schmid 2016] Schmid, Rolf D. (2016): Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Unter Mitarbeit von Ruth Hammelehle. Dritte Auflage. Weinheim, München: Wiley-VCH; Ciando. Online verfügbar unter https://ciando.com/book/index.cfm/bok_id/2105486.
- [Steverding 2010] Steverding, Dietmar (2010): Die Geschichte der Kolibakterien. Vom Darmbewohner zum Bioreaktor. In: *Biologie in unserer Zeit* 40 (3), S. 194–201. DOI: 10.1002/biuz.201010423.
- [Steinbücke et al 2013] Steinbüchel, Alexander; Oppermann-Sanio, Fred Bernd; Ewering, Christian; Pötter, Markus (2013): Mikrobiologisches Praktikum. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [Studier & Moffatt 1986] Studier, F. William; Moffatt, Barbara A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. In: *Journal of Molecular Biology* 189 (1), S. 113–130. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.

7 Anhang

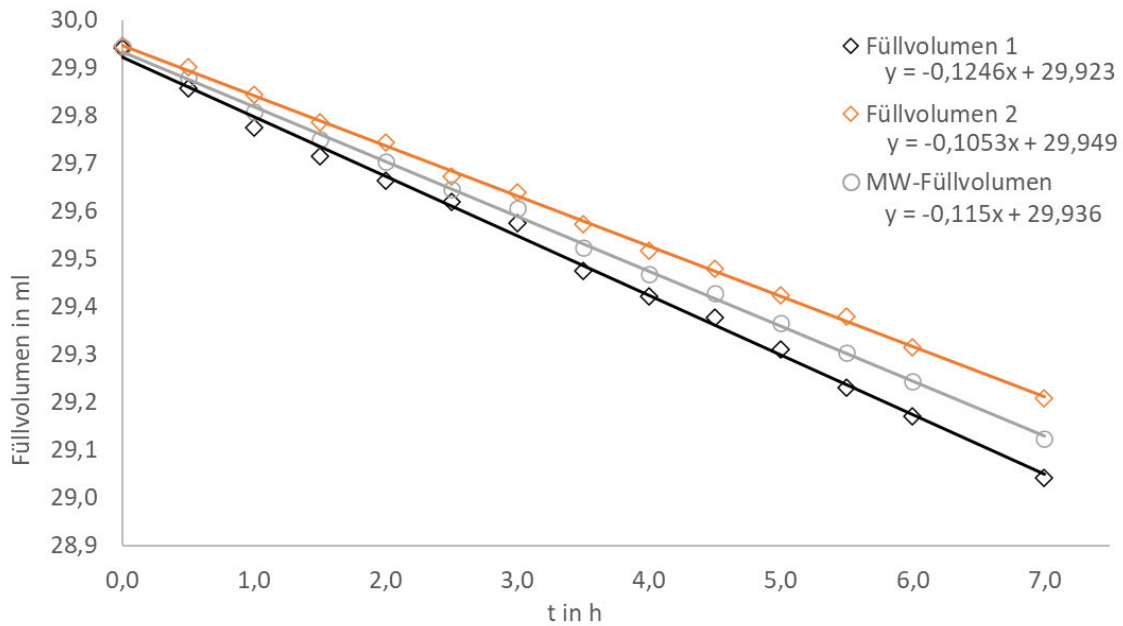


Abbildung 31: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 5 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

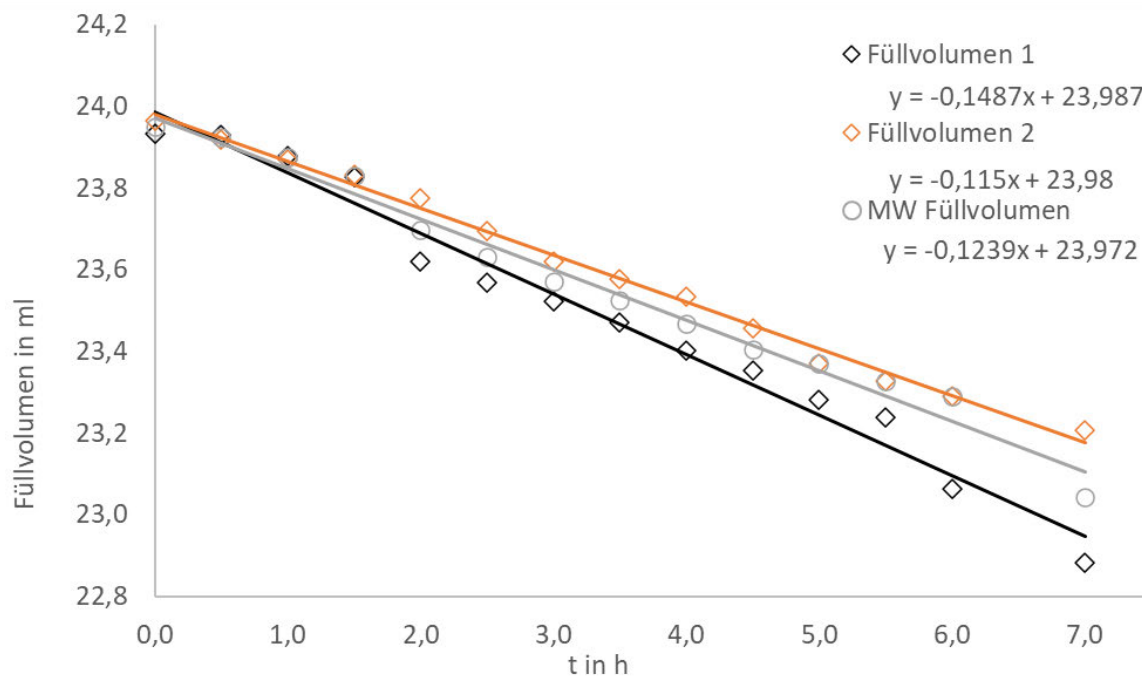


Abbildung 32: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

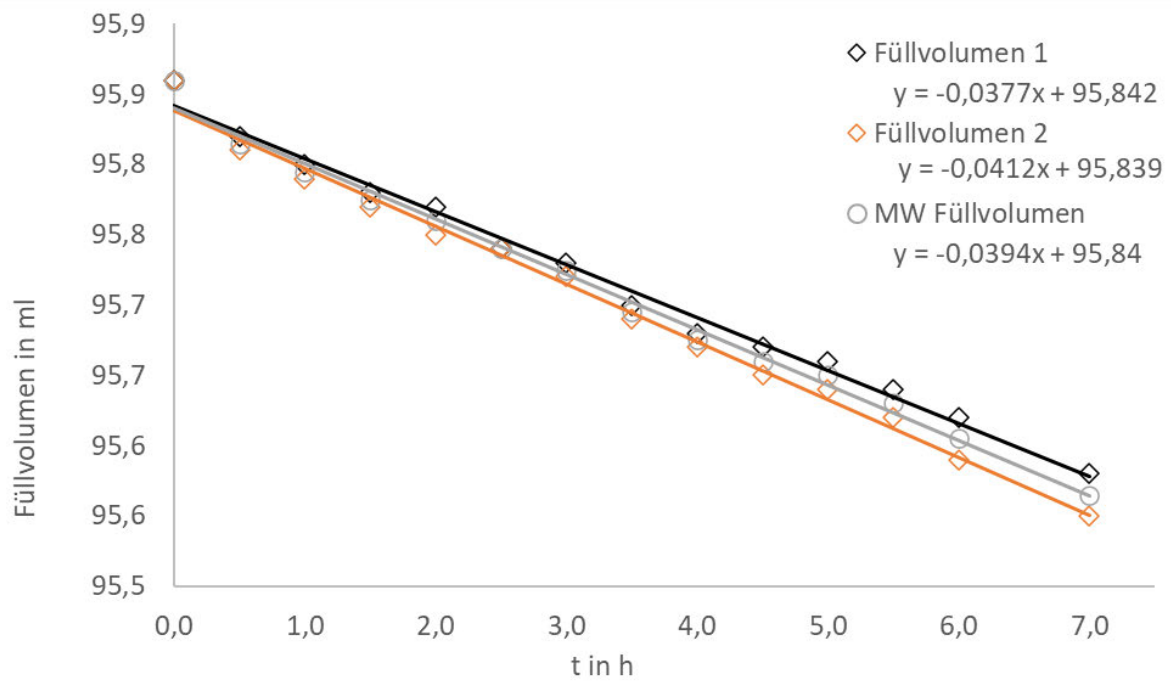


Abbildung 33: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

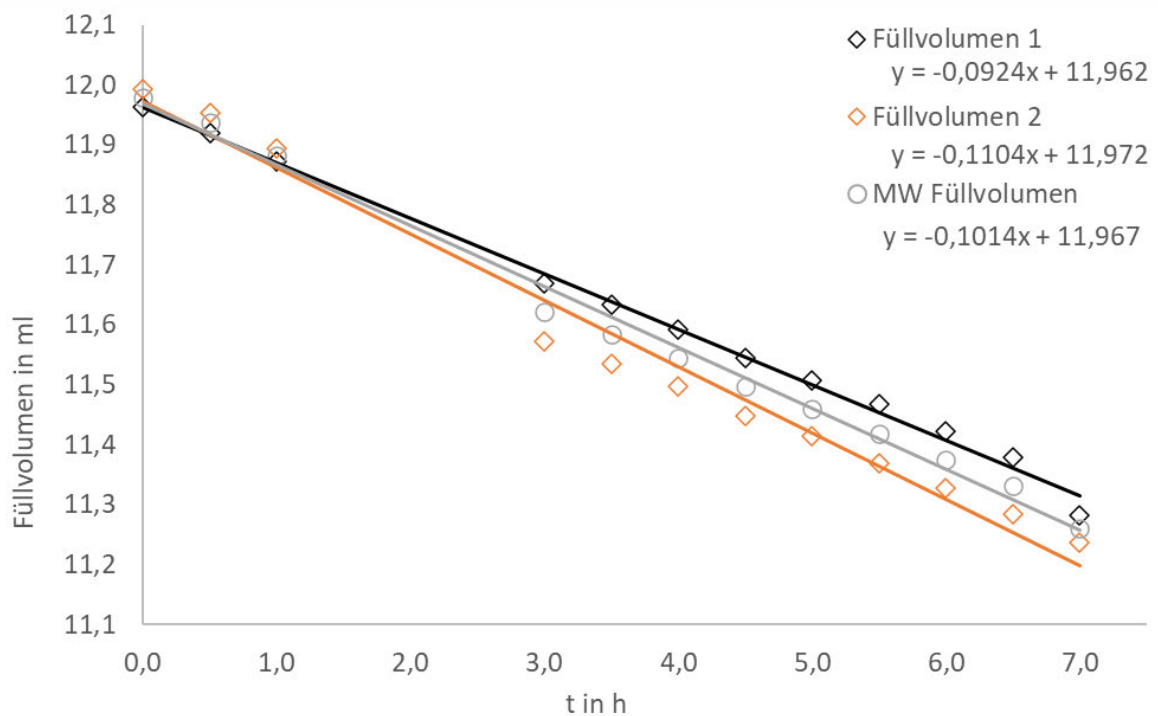


Abbildung 34: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

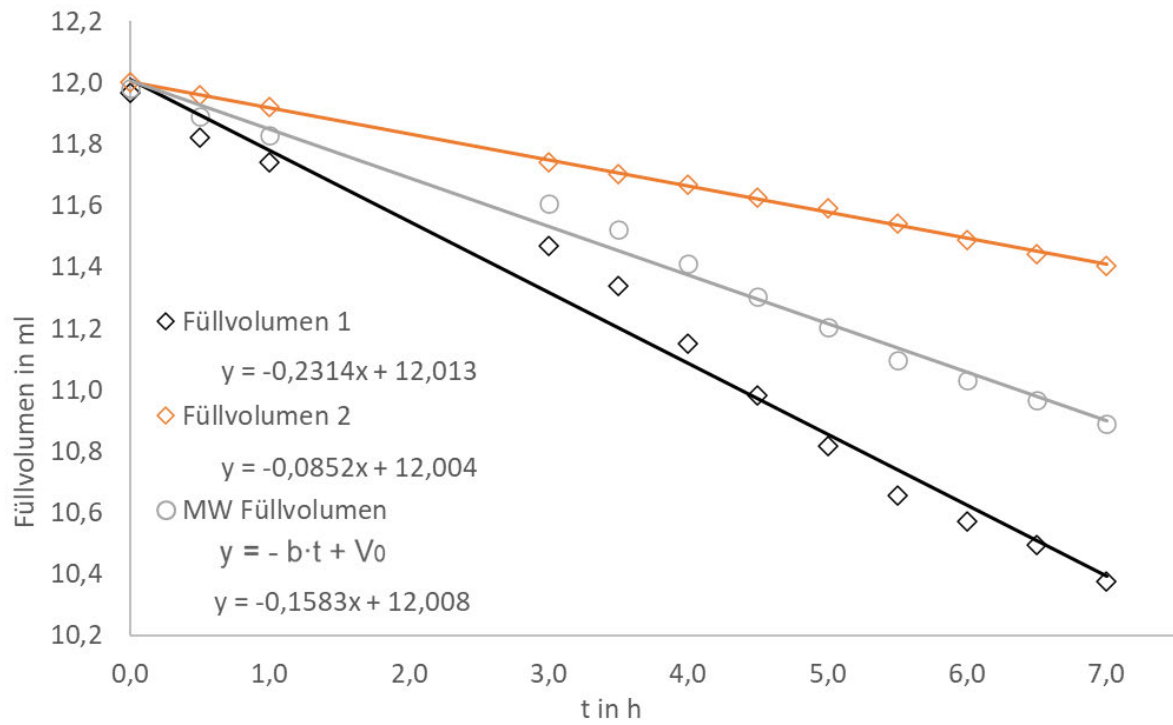


Abbildung 35: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 1 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

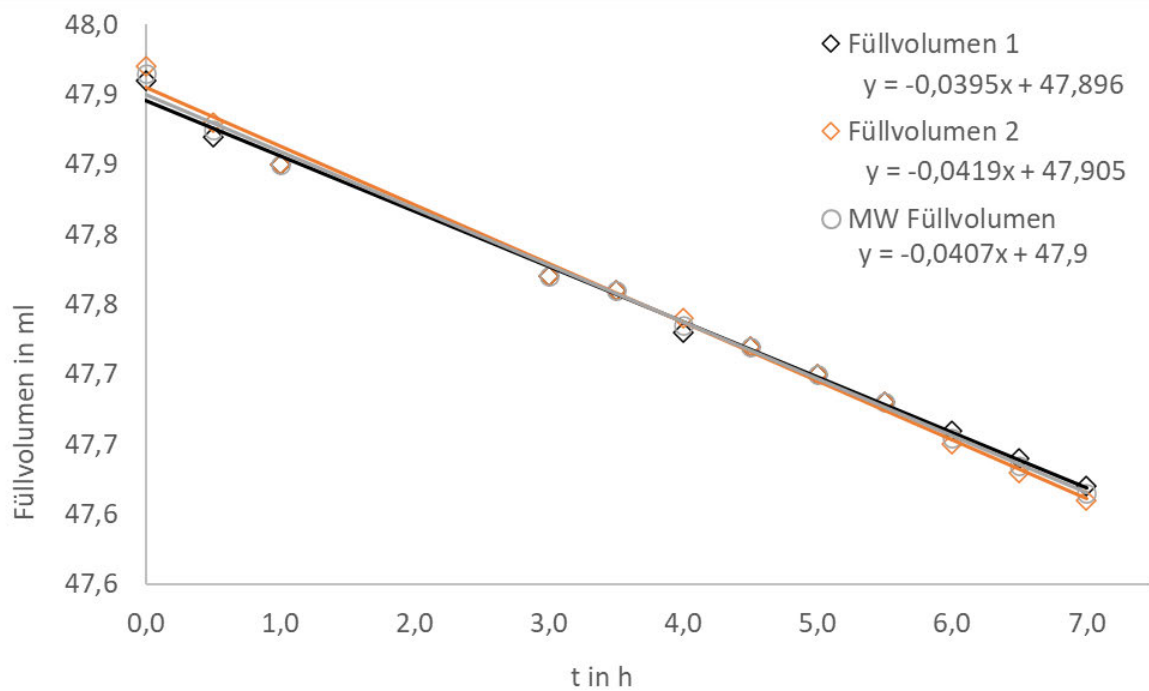


Abbildung 36: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

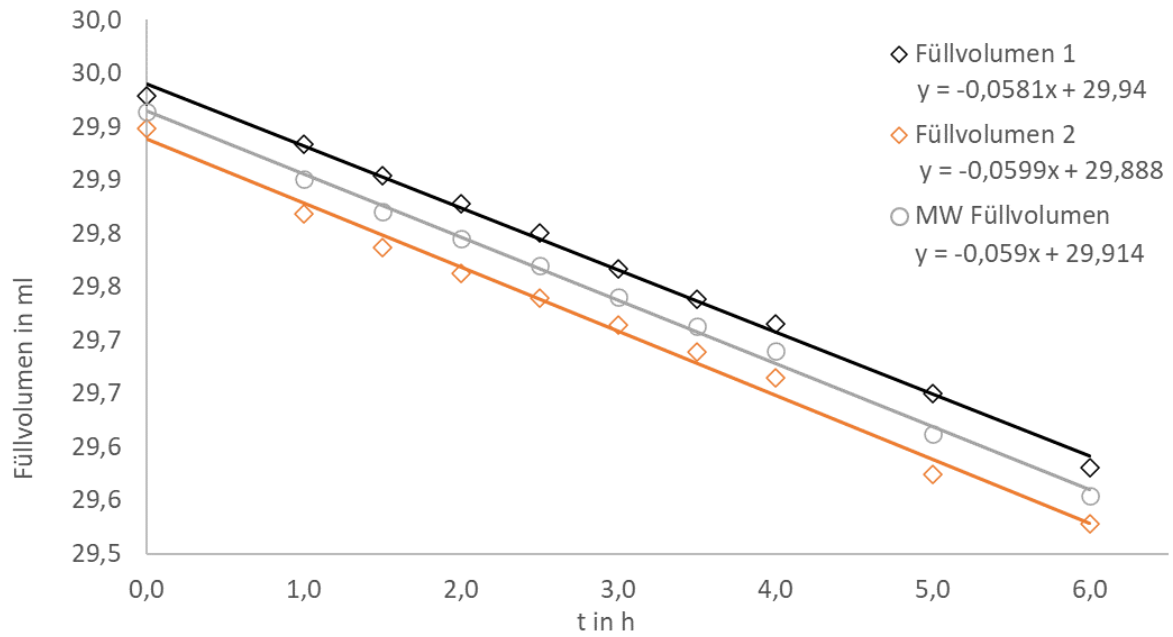


Abbildung 37: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 5 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C

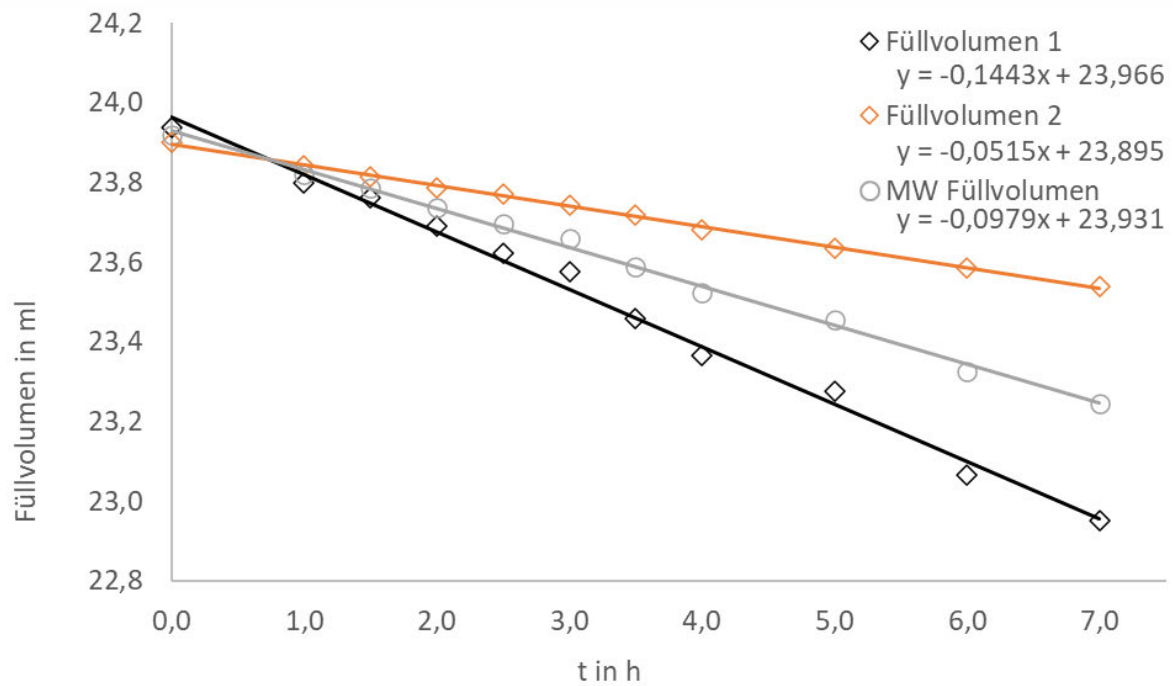


Abbildung 38: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C

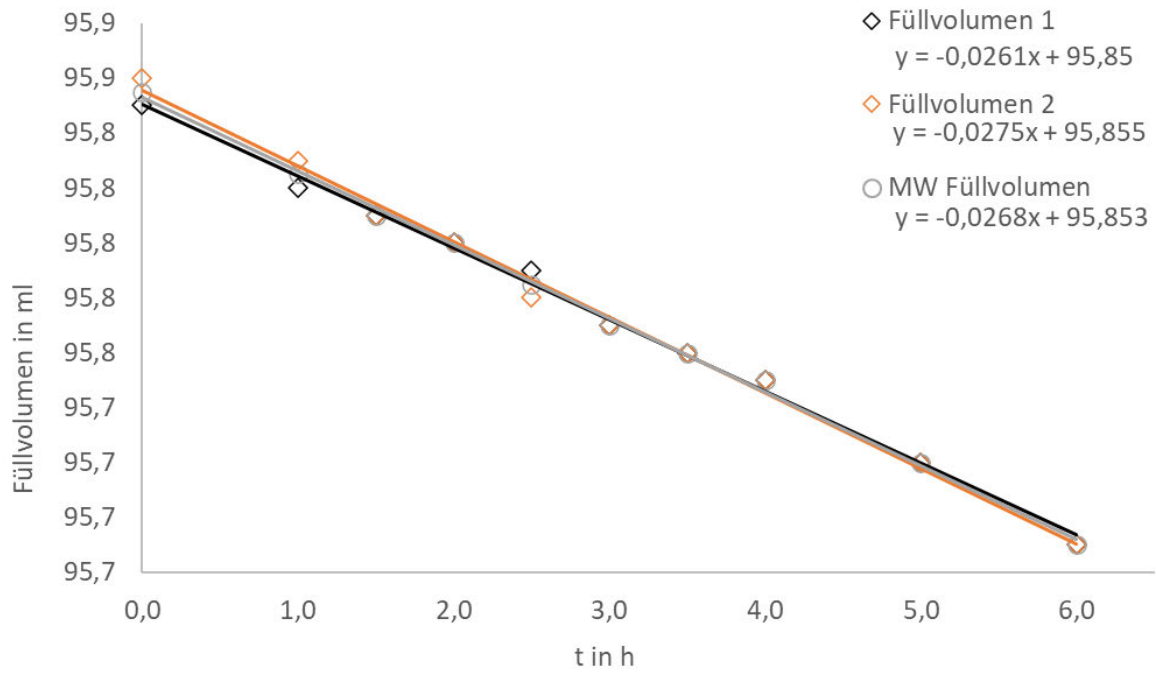


Abbildung 39: Verdunstungsrate im 24-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C

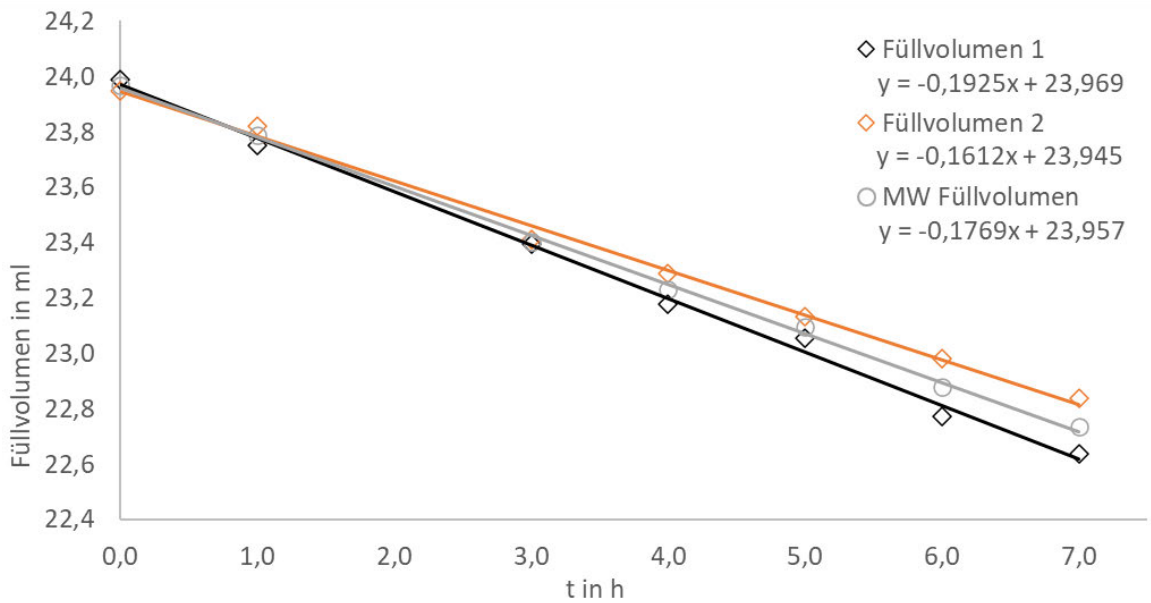


Abbildung 40: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 300 rpm, Temperatur 37 °C

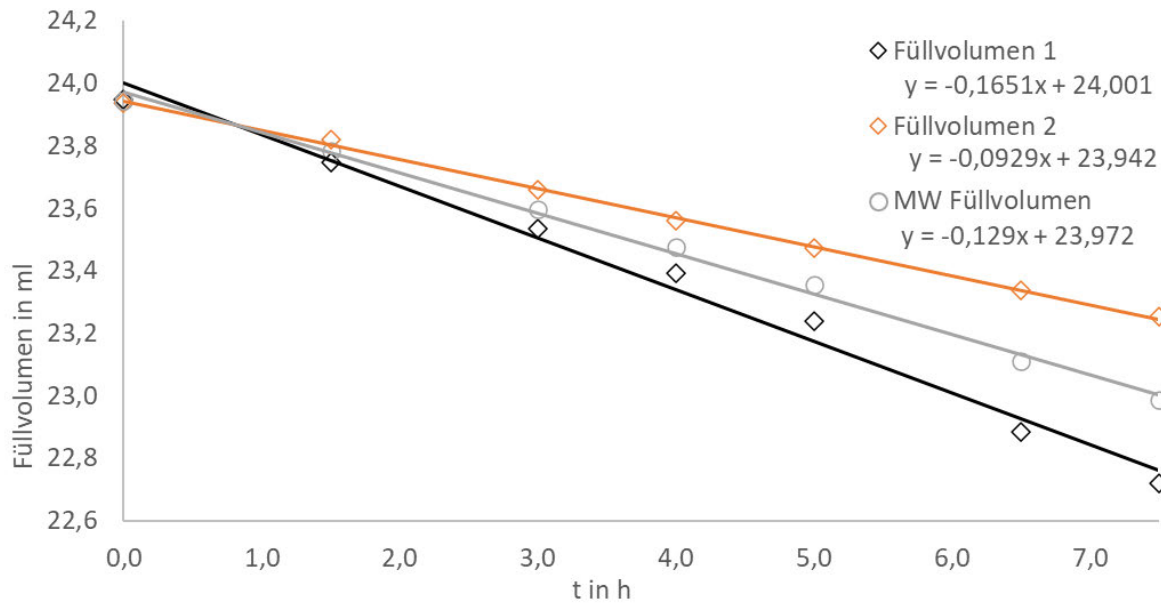


Abbildung 41: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 37 °C

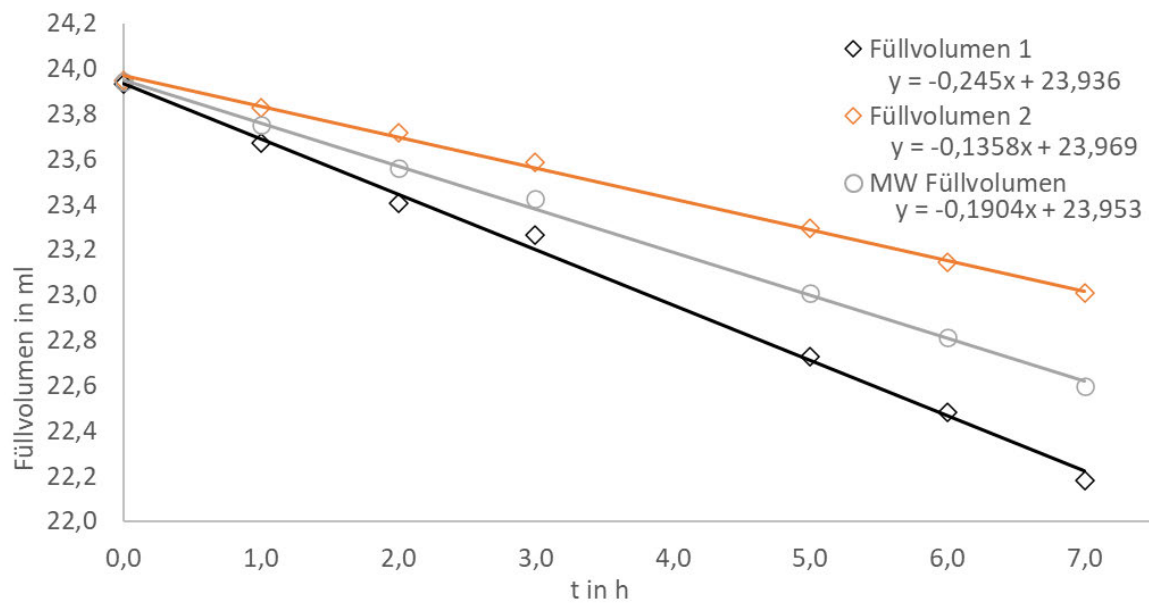


Abbildung 42: Verdunstungsrate im 12-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 2 ml, Schüttelfrequenz 300 rpm, Temperatur 30 °C

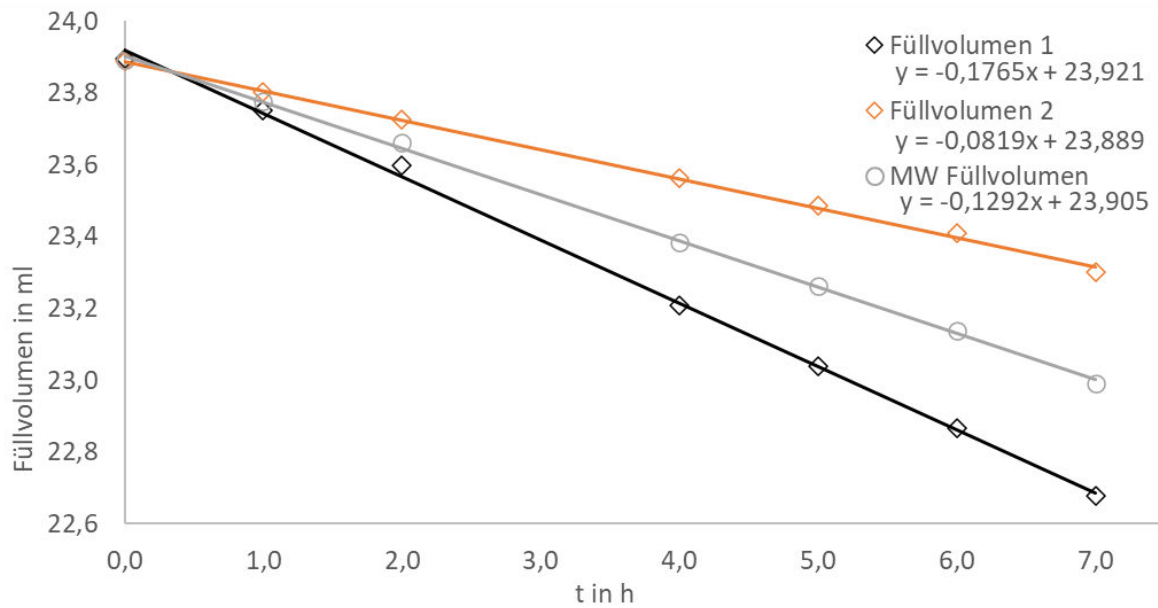


Abbildung 43: Verdunstungsrate im 6-Well MTP-Format: Füllvolumen pro Well 4 ml, Schüttelfrequenz 200 rpm, Temperatur 30 °C

Tabelle 23: V01 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.05	-3.0791
2	1.00	1	0.10	-2.3126
3	2.00	1	0.20	-1.6348
4	3.00	1	0.39	-0.9545
5	4.00	5	0.79	-0.2389
6	5.00	5	1.55	0.4366
7	6.00	25	3.29	1.1901

Tabelle 24: V02 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.13	-2.053
2	1.00	1	0.22	-1.500
3	2.08	1	0.44	-0.816
4	3.17	5	1.04	0.041
5	4.17	5	1.94	0.665
6	5.17	25	4.37	1.475

Tabelle 25: V03 – Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.04	-3.112
2	1.17	1	0.09	-2.448
3	2.17	1	0.17	-1.757
4	3.17	1	0.34	-1.089
5	4.17	5	0.70	-0.360
6	5.08	5	1.33	0.281
7	6.17	25	2.68	0.984

Tabelle 26: V04 - Messwerte – Schüttelkolben 1: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.35	-1.043
2	1.00	5	0.73	-0.311
3	2.08	5	1.56	0.441
4	3.42	25	4.38	1.476
5	4.58	25	7.90	2.067
6	5.42	123	9.84	2.286
7	6.42	123	9.47	2.248

Tabelle 27: V04 - Messwerte – Schüttelkolben 2: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.35	-1.038
2	1.08	5	0.78	-0.252
3	2.08	5	1.63	0.487
4	3.50	25	4.53	1.510
5	4.67	25	7.65	2.035
6	5.50	123	8.98	2.195
7	6.50	123	9.04	2.202

Tabelle 28: V05 - Messwerte – Schüttelkolben: 37 °C, 200 rpm - Kontrolle vom Medium Versuch V18

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.00	1	0.06	-2.781
2	1.00	1	0.09	-2.397
3	2.00	1	0.17	-1.787
4	3.00	1	0.34	-1.094
5	4.50	5	1.00	0.000
6	5.50	5	1.91	0.644

Tabelle 29: V06 - Messwerte - 6-Well MTP: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
		1		
1	0.67	1	0.21	-1.558
2	1.00	1	0.26	-1.332
3	1.33	1	0.33	-1.115
4	2.00	1	0.49	-0.714
5	2.33	5	0.66	-0.414
6	2.67	5	0.82	-0.201
7	3.00	5	1.05	0.053
8	3.67	5	1.63	0.489
9	4.00	5	2.07	0.728
10	4.42	25	2.60	0.957
11	4.75	25	2.98	1.091
12	5.08	25	3.55	1.267

Tabelle 30: V07 - Messwerte - 6-Well MTP: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.33	1	0.055	-2.901
2	0.67	1	0.059	-2.831
3	1.08	1	0.069	-2.674
4	1.42	1	0.092	-2.387
5	1.92	1	0.131	-2.034
6	2.25	1	0.151	-1.892
7	2.58	1	0.180	-1.716
8	2.92	1	0.230	-1.472
9	3.42	1	0.301	-1.201
10	3.75	1	0.388	-0.947
11	4.08	1	0.529	-0.637
12	4.42	5	0.621	-0.477
13	4.83	5	0.827	-0.189
14	5.17	5	0.974	-0.026
15	5.50	5	1.161	0.149
16	5.83	5	1.554	0.441
17	6.17	5	1.833	0.606

Tabelle 31: V08 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 1: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	In ΔOD_{MW}
1	0.67	1	0.091	-2.397
2	1.33	1	0.119	-2.130
3	2.00	1	0.177	-1.733
4	2.67	1	0.268	-1.317
5	3.33	1	0.397	-0.924
6	4.00	5	0.673	-0.397
7	4.33	5	0.812	-0.208
8	4.67	5	0.916	-0.088
9	5.00	5	1.234	0.211
10	5.33	5	1.443	0.367
11	5.67	5	1.709	0.536
12	6.00	5	2.124	0.753
13	6.33	25	2.536	0.930
14	6.67	25	3.206	1.165
15	7.00	25	4.074	1.405

Tabelle 32: V08 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 2: 37 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	In ΔOD_{MW}
1	0.67	1	0.092	-2.381
2	1.33	1	0.128	-2.053
3	2.00	1	0.193	-1.644
4	2.67	1	0.299	-1.208
5	3.33	1	0.419	-0.870
6	4.00	5	0.755	-0.281
7	4.33	5	0.869	-0.140
8	4.67	5	1.018	0.018
9	5.00	5	1.399	0.336
10	5.33	5	1.682	0.520
11	5.67	5	1.893	0.638
12	6.00	5	2.280	0.824
13	6.33	25	3.008	1.101
14	6.67	25	3.529	1.261
15	7.00	25	4.820	1.573

Tabelle 33: V09 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 1: 30 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.081	-2.508
2	1.33	1	0.090	-2.404
3	2.00	1	0.106	-2.246
4	2.67	1	0.130	-2.043
5	3.33	1	0.166	-1.799
6	4.00	1	0.206	-1.579
7	5.00	1	0.291	-1.234
8	5.58	1	0.354	-1.039
9	5.92	1	0.414	-0.882
10	6.25	5	0.552	-0.594
11	6.58	5	0.636	-0.452
12	6.92	5	0.728	-0.318

Tabelle 34: V09 - Messwerte - 6-Well MTP - Platte 2: 30 °C, 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.083	-2.490
2	1.33	1	0.092	-2.382
3	2.00	1	0.111	-2.200
4	2.67	1	0.133	-2.020
5	3.33	1	0.164	-1.811
6	4.00	1	0.204	-1.588
7	5.00	1	0.330	-1.110
8	5.58	1	0.424	-0.858
9	5.92	1	0.449	-0.802
10	6.25	5	0.579	-0.546
11	6.58	5	0.629	-0.464
12	6.92	5	0.718	-0.331

Tabelle 35: V10 - Messwerte - 12-Well/ MTP: 37 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.33	5	0.445	-0.810
2	0.67	5	0.530	-0.635
3	1.00	5	0.730	-0.315
4	1.33	5	0.765	-0.268
5	1.42	5	0.867	-0.143
6	1.67	5	0.892	-0.114
7	2.08	5	1.271	0.240
8	2.58	5	1.801	0.588
9	3.17	25	3.059	1.118
10	3.50	25	3.221	1.170
11	3.92	25	3.632	1.290
12	4.33	25	4.455	1.494
13	4.67	25	4.654	1.538
14	5.00	25	5.514	1.707
15	5.50	25	6.848	1.924
16	5.83	25	6.772	1.913
17	6.17	25	7.756	2.048
18	6.50	25	6.845	1.924

Tabelle 36: V11 - Messwerte - 12-Well/ MTP - Platte 1: 37 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.174	-1.746
2	1.33	1	0.230	-1.470
3	2.00	1	0.331	-1.106
4	2.50	5	0.450	-0.799
5	3.08	5	0.617	-0.483
6	3.50	5	0.744	-0.296
7	3.83	5	0.921	-0.082
8	4.17	5	1.218	0.197
9	4.50	5	1.562	0.446
10	4.83	5	1.674	0.515
11	5.17	5	1.809	0.593
12	5.50	5	2.235	0.804
13	5.83	25	2.868	1.054
14	6.25	25	3.878	1.355
15	6.50	25	5.112	1.632

Tabelle 37: V11 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 37 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.179	-1.718
2	1.33	1	0.235	-1.447
3	2.00	1	0.330	-1.108
4	2.50	5	0.450	-0.799
5	3.08	5	0.679	-0.387
6	3.50	5	0.846	-0.167
7	3.83	5	1.028	0.028
8	4.17	5	1.313	0.272
9	4.50	5	1.600	0.470
10	4.83	5	1.669	0.512
11	5.17	5	1.971	0.679
12	5.50	5	2.367	0.862
13	5.83	25	3.367	1.214
14	6.25	25	4.339	1.468
15	6.50	25	4.800	1.569

Tabelle 38: V12 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 37 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.167	-1.790
2	1.33	1	0.218	-1.521
3	2.00	1	0.310	-1.172
4	3.00	5	0.609	-0.495
5	4.42	5	1.605	0.473
6	4.75	5	1.822	0.600
7	5.08	5	1.996	0.691
8	5.42	25	2.495	0.914
9	5.75	25	3.105	1.133
10	6.08	25	3.404	1.225
11	6.42	25	4.264	1.450
12	6.75	25	4.837	1.576

Tabelle 39: V12 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 37 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	0.67	1	0.179	-1.721
2	1.33	1	0.235	-1.449
3	2.00	1	0.313	-1.162
4	3.00	5	0.672	-0.398
5	4.42	5	1.507	0.410
6	4.75	5	1.744	0.556
7	5.08	5	2.328	0.845
8	5.42	25	2.969	1.088
9	5.75	25	3.293	1.192
10	6.08	25	3.566	1.272
11	6.42	25	4.177	1.430
12	6.75	25	4.388	1.479

Tabelle 40: V13 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 30 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.219	-1.519
2	2.00	1	0.352	-1.045
3	3.00	5	0.632	-0.459
4	3.50	5	0.724	-0.323
5	4.00	5	0.876	-0.132
6	4.50	5	1.143	0.134
7	4.83	5	1.308	0.268
8	5.17	5	1.615	0.479
9	5.50	5	1.802	0.589
10	5.83	5	2.006	0.696
11	6.17	5	2.168	0.774
12	6.50	5	2.622	0.964

Tabelle 41: V13 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 2: 30 °C und 200 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.228	-1.479
2	2.00	1	0.351	-1.046
3	3.00	5	0.627	-0.467
4	3.50	5	0.779	-0.250
5	4.00	5	0.909	-0.096
6	4.50	5	1.143	0.134
7	4.83	5	1.383	0.324
8	5.17	5	1.655	0.504
9	5.50	5	1.777	0.575
10	5.83	5	2.056	0.721
11	6.17	5	2.245	0.809
12	6.50	5	2.679	0.985

Tabelle 42: V14 - Messwerte - 12-Well MTP - Platte 1: 37 °C und 300 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.211	-1.554
2	2.00	1	0.355	-1.037
3	2.92	5	0.749	-0.289
4	3.58	5	1.058	0.056
5	3.92	5	1.192	0.176
6	4.25	5	1.479	0.391
7	4.58	5	1.830	0.604
8	4.92	5	2.278	0.823
9	5.25	25	3.102	1.132
10	5.58	25	3.588	1.277
11	5.92	25	3.923	1.367
12	6.25	25	4.894	1.588
13	6.58	25	6.088	1.806
14	6.92	25	7.991	2.078

Tabelle 43: V14 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 2: 37 °C und 300 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.214	-1.540
2	2.00	1	0.380	-0.969
3	2.92	5	0.759	-0.276
4	3.58	5	1.090	0.086
5	3.92	5	1.302	0.264
6	4.25	5	1.571	0.452
7	4.58	5	2.009	0.698
8	4.92	5	2.507	0.919
9	5.25	25	3.227	1.172
10	5.58	25	3.613	1.284
11	5.92	25	4.172	1.428
12	6.25	25	4.981	1.606
13	6.58	25	7.059	1.954
14	6.92	25	8.924	2.189

Tabelle 44: V15 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 1: 30 °C und 300 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.210	-1.561
2	2.00	1	0.308	-1.179
3	3.00	5	0.536	-0.623
4	3.50	5	0.629	-0.464
5	4.08	5	0.853	-0.159
6	4.50	5	0.967	-0.033
7	4.83	5	1.191	0.175
8	5.17	5	1.410	0.344
9	5.50	5	1.549	0.438
10	5.83	5	1.696	0.528
11	6.17	5	2.014	0.700
12	7.08	25	3.160	1.151

Tabelle 45: V15 - Messwerte - 12-Well MTP – Platte 2: 30 °C und 300 rpm

Probe	t in h	F	ΔOD_{MW}	$\ln \Delta OD_{MW}$
1	1.00	1	0.219	-1.519
2	2.00	1	0.317	-1.150
3	3.00	5	0.556	-0.586
4	3.50	5	0.668	-0.403
5	4.08	5	0.895	-0.111
6	4.50	5	1.044	0.043
7	4.83	5	1.306	0.267
8	5.17	5	1.465	0.382
9	5.50	5	1.642	0.496
10	5.83	5	1.728	0.547
11	6.17	5	2.099	0.741
12	7.08	25	3.397	1.223

Tabelle 46: V16 - Messwerte - 24-Well MTP: 37 °C und 200 rpm

Well-Nr.	$\ln \Delta OD_{MW}$			
	1.58 h	3.58 h	5.08 h	6.58 h
A1	-2.019	-1.578	-0.736	-0.065
A2	-2.313	-1.915	-0.750	0.005
A3	-2.732	-1.683	-0.713	0.082
A4	-2.912	-1.786	-0.633	0.089
A5	-2.848	-1.761	-0.712	0.000
A6	-3.063	-1.677	-1.003	-0.037
B1	-1.464	-1.091	-0.411	0.031
B2	-1.153	-1.104	-0.322	-0.374
B3	-1.070	-0.801	-0.186	0.223
B4	-1.253	-0.825	-0.224	0.153
B5	-1.147	-0.739	-0.272	0.255
B6	-1.852	-1.098	-0.777	0.076
C1	-2.159	-1.566	-0.637	-0.056
C2	-1.758	-2.197	-0.670	-0.041
C3	-1.623	-1.317	-0.604	0.030
C4	-1.683	-1.226	-0.530	0.014
C5	-1.664	-1.082	-0.554	0.128
C6	-2.337	-1.489	-0.902	0.008
D2	-3.182	-1.576	-0.931	-0.163
D3	-3.068	-1.527	-0.706	-0.047
D4	-3.008	-1.564	-0.722	-0.056
D5	-3.121	-1.544	-0.732	-0.055
D6	-3.400	-1.544	-1.089	-0.383

Tabelle 47: V16 - CV-Werte

Reihen	t in h	OD _{MW. PR}	Stdabw	CV in %
A	1.58	0.103	0.010	9.395
	3.58	0.125	0.008	6.183
	5.08	0.186	0.015	8.269
	6.58	0.300	0.024	8.003
B	1.58	0.145	0.020	13.904
	3.58	0.170	0.020	11.930
	5.08	0.235	0.033	14.204
	6.58	0.315	0.051	16.082
C	1.58	0.121	0.011	9.398
	3.58	0.138	0.017	12.244
	5.08	0.198	0.017	8.807
	6.58	0.301	0.021	7.130
D	1.58	0.096	0.002	1.777
	3.58	0.132	0.002	1.392
	5.08	0.179	0.019	10.771
	6.58	0.271	0.024	8.782

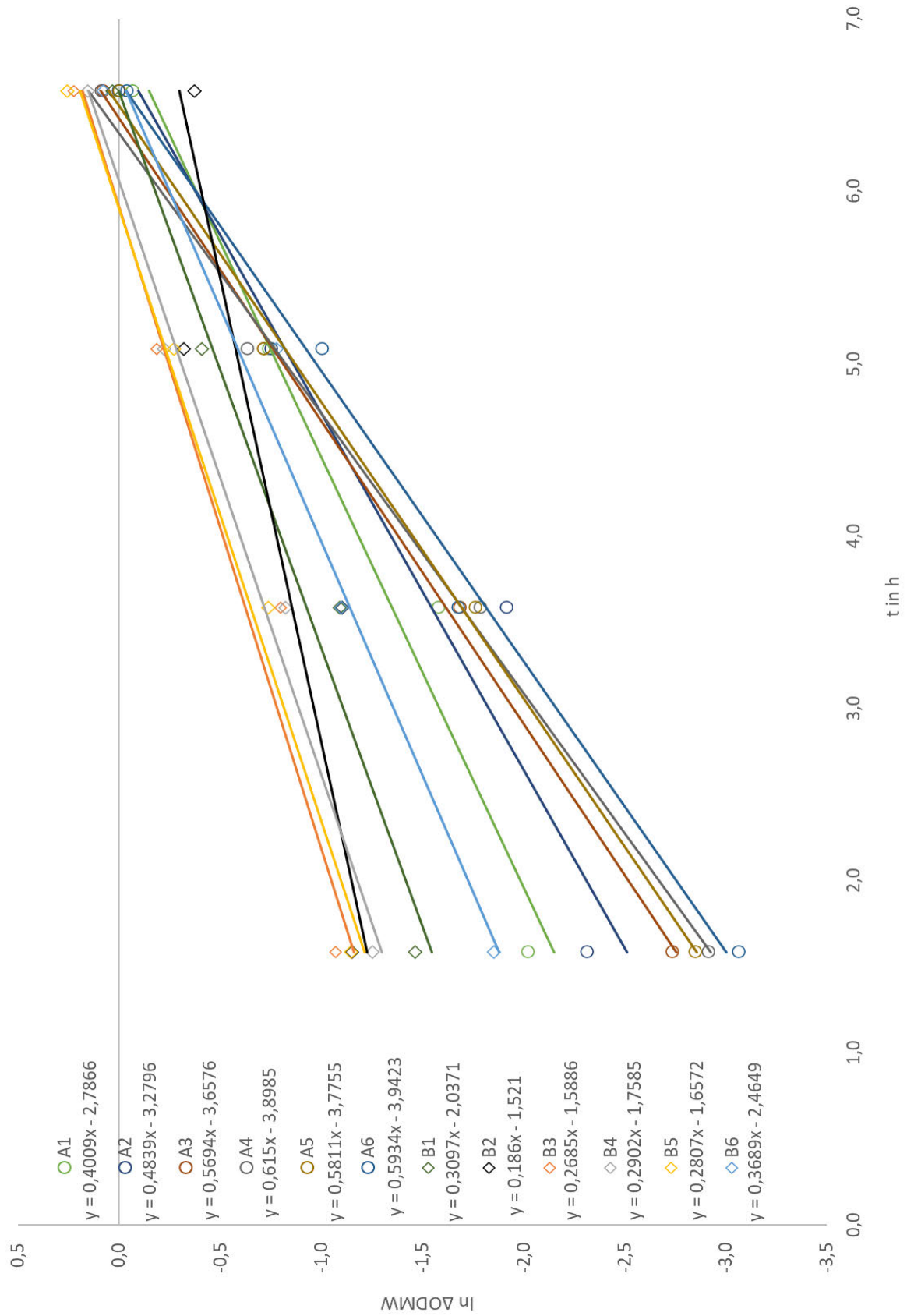


Abbildung 44: V16- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe A und B (Versuchseinheit 14)

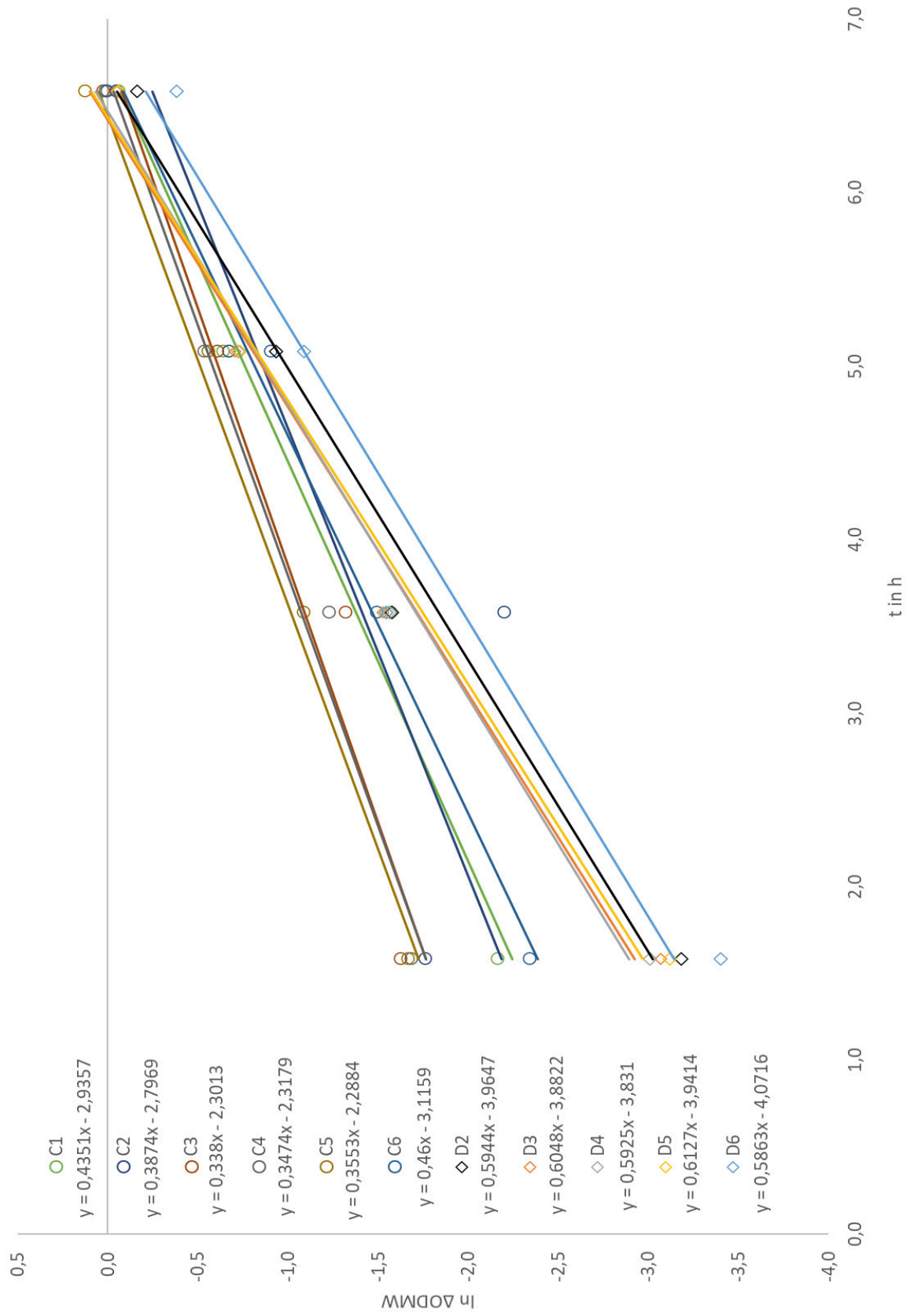


Abbildung 45: V16- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe C und D (Versuchseinheit 14)

Tabelle 48: V17 - Messwerte - 24-Well MTP: 37 °C und 200 rpm

Well-Nr.	ln ΔOD_{MW}					
	1.08 h	2.08 h	3.08 h	4.25 h	5.83 h	6.83 h
A1	-2.219	-2.352	-1.541	-0.725	0.180	0.268
A2	-1.588	-2.357	-1.390	-0.682	-0.075	0.365
A3	-1.488	-2.197	-1.187	-0.625	-0.076	0.449
A4	-1.626	-2.111	-1.004	-0.337	-0.080	0.398
A5	-1.747	-2.282	-1.009	-1.180	-0.082	0.345
A6	-2.595	-2.289	-1.155	-0.636	0.160	0.442
B1	-1.691	-2.107	-1.274	-0.675	-0.055	0.307
B2	-1.501	-1.729	-1.126	-0.613	-0.079	0.451
B3	-1.396	-1.707	-1.074	-0.594	0.022	0.461
B4	-1.533	-1.709	-0.956	-0.545	0.041	0.483
B5	-1.365	-1.705	-0.895	-0.325	-0.060	0.362
B6	-2.082	-2.035	-1.000	-0.683	-0.075	0.353
C1	-2.046	-1.907	-1.067	-0.647	-0.008	0.372
C2	-1.863	-1.832	-1.108	-0.662	-0.036	0.376
C3	-1.884	-1.786	-1.009	-0.615	-0.053	0.569
C4	-1.863	-1.792	-0.942	-0.611	-0.016	0.436
C5	-1.892	-1.824	-0.929	-0.641	-0.062	0.366
C6	-2.461	-2.178	-1.063	-0.694	-0.030	0.323
D2	-2.710	-2.388	-1.476	-0.683	-0.119	0.276
D3	-2.732	-2.299	-1.476	-0.707	-0.119	0.255
D4	-2.685	-2.383	-1.058	-0.664	-0.077	0.265
D5	-2.548	-2.230	-0.968	-0.669	-0.057	0.267
D6	-2.671	-2.308	-1.305	-0.660	-0.059	0.273

Tabelle 49: V17 - CV-Werte

Reihen	t in h	OD _{MW. PR}	Stdabw	CV in %
A	1.08	0.121	0.013	11.071
	2.08	0.106	0.002	2.250
	3.08	0.147	0.013	9.164
	4.25	0.191	0.030	15.670
	5.83	0.296	0.037	12.384
	6.83	0.390	0.024	6.188
B	1.08	0.129	0.011	8.786
	2.08	0.118	0.007	5.659
	3.08	0.157	0.009	5.986
	4.25	0.203	0.021	10.184
	5.83	0.287	0.010	3.659
	6.83	0.399	0.027	6.862
C	1.08	0.113	0.007	5.931
	2.08	0.116	0.007	5.709
	3.08	0.160	0.006	3.591
	4.25	0.194	0.004	1.893
	5.83	0.286	0.005	1.633
	6.83	0.400	0.029	7.279
D	1.08	0.098	0.001	1.240
	2.08	0.104	0.001	1.421
	3.08	0.145	0.015	10.035
	4.25	0.190	0.003	1.371
	5.83	0.274	0.009	3.195
	6.83	0.358	0.003	0.801

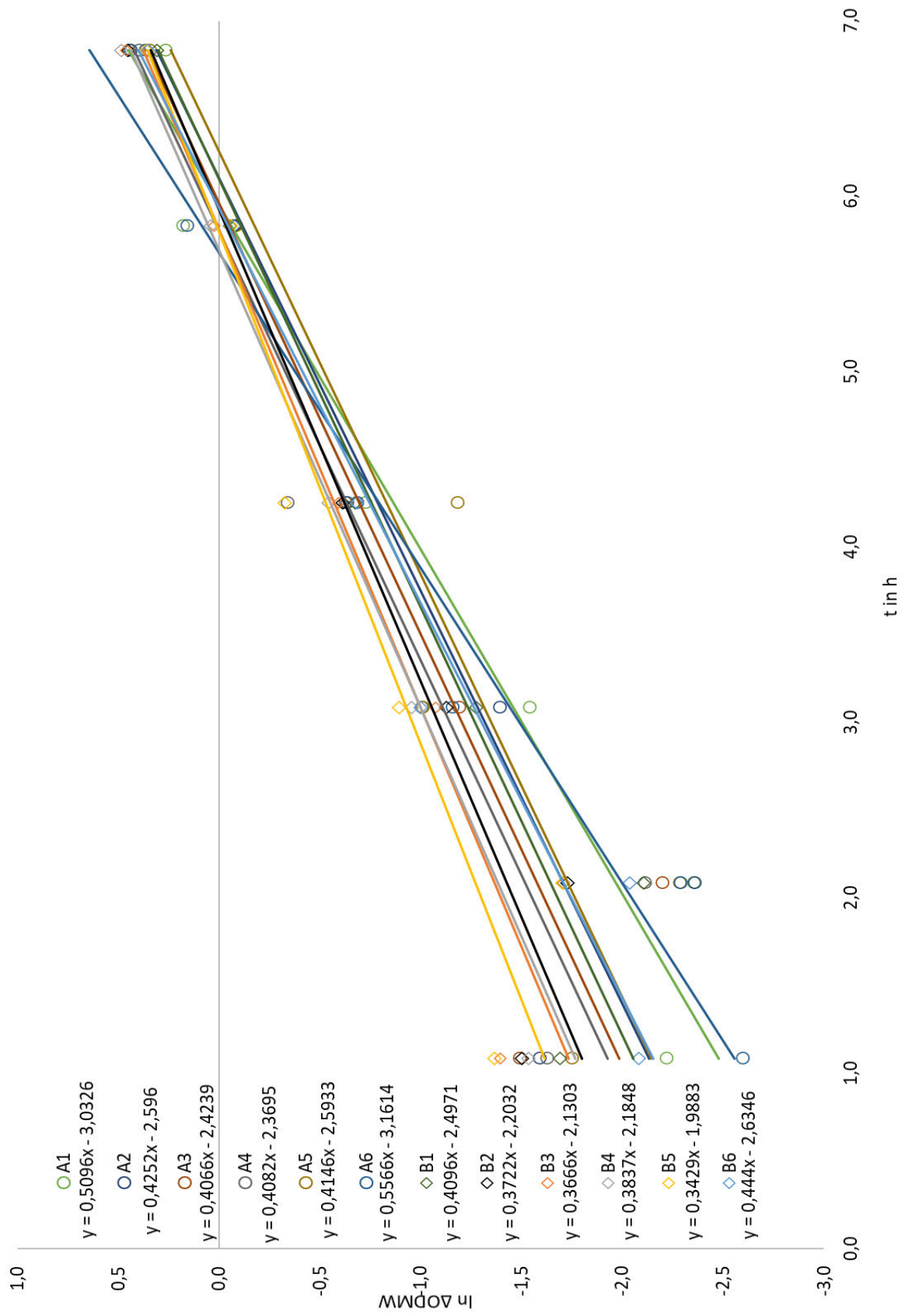


Abbildung 46: V17- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe A und B (Versuchseinheit 15)

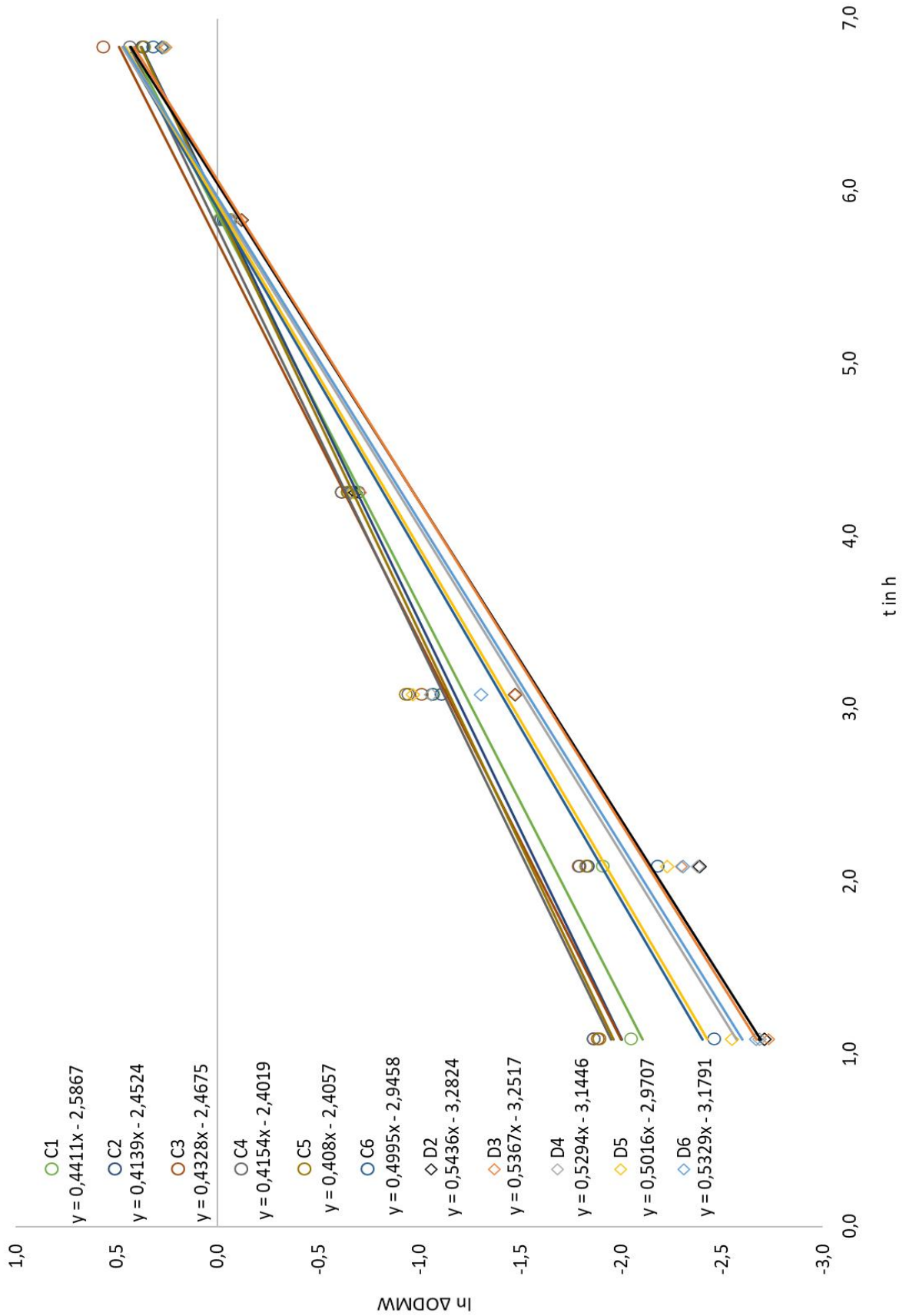


Abbildung 47: V17- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe C und D (Versuchseinheit 15)

Tabelle 50: V18 - Messwerte - 24-Well MTP -Platte 1: 37 °C und 200 rpm

Well-Nr.	ln ΔOD_{MW}			
	3.00 h	4.00 h	6.50 h	7.17 h
A1	-0.430	-0.058	0.669	1.032
A2	-0.465	-0.026	0.810	0.991
A3	-0.391	0.091	0.858	1.043
A4	-0.426	0.104	0.601	1.088
A5	-0.448	-0.008	0.882	1.047
A6	-0.473	-0.105	0.833	1.047
B1	-0.368	-0.029	0.672	1.055
B2	-0.332	-0.036	0.670	0.986
B3	-0.118	0.235	1.141	0.628
B4	-0.396	-0.088	0.721	0.783
B5	-0.275	-0.021	0.676	1.072
B6	-0.338	0.016	0.524	0.983
C1	-0.563	-0.074	0.763	1.052
C2	-0.482	0.047	0.786	1.038
C3	-0.410	0.030	0.805	1.009
C4	-0.407	0.021	0.688	1.043
C5	-0.378	-0.016	0.713	1.017
C6	-0.470	-0.063	0.903	1.035
D2	-0.616	-0.081	0.910	1.014
D3	-0.534	-0.052	0.907	1.060
D4	-0.562	-0.023	0.922	1.064
D5	-0.558	-0.104	0.895	1.069
D6	-0.529	-0.110	0.925	1.069

Tabelle 51: V18 - CV-Werte Platte 1

Reihen	t in h	OD _{MW. PR}	Stdabw	CV in %
A	3.00	0.247	0.007	2.657
	4.00	0.341	0.023	6.872
	6.50	0.221	0.020	8.855
	7.17	0.264	0.006	2.231
B	3.00	0.273	0.021	7.598
	4.00	0.346	0.032	9.221
	6.50	0.217	0.035	16.289
	7.17	0.244	0.060	24.598
C	3.00	0.245	0.012	4.727
	4.00	0.339	0.014	4.076
	6.50	0.221	0.020	8.829
	7.17	0.262	0.005	1.989
D	3.00	0.228	0.007	2.975
	4.00	0.322	0.009	2.945
	6.50	0.241	0.004	1.650
	7.17	0.267	0.005	1.772

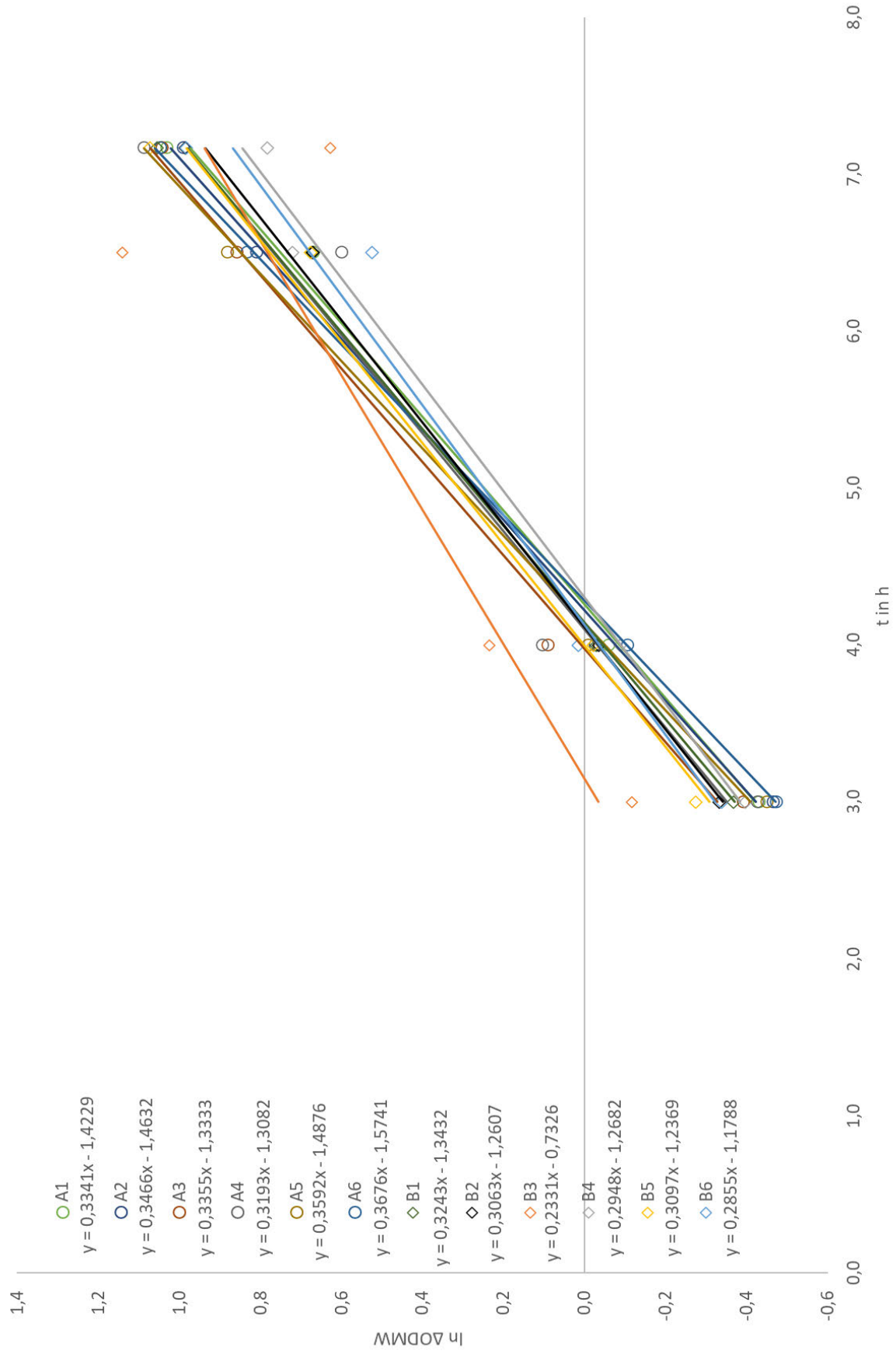


Abbildung 48: V18_1- Kultivierung im 24-Deepwell System von Duetz. Reihe A und B (Versuchseinheit 16)

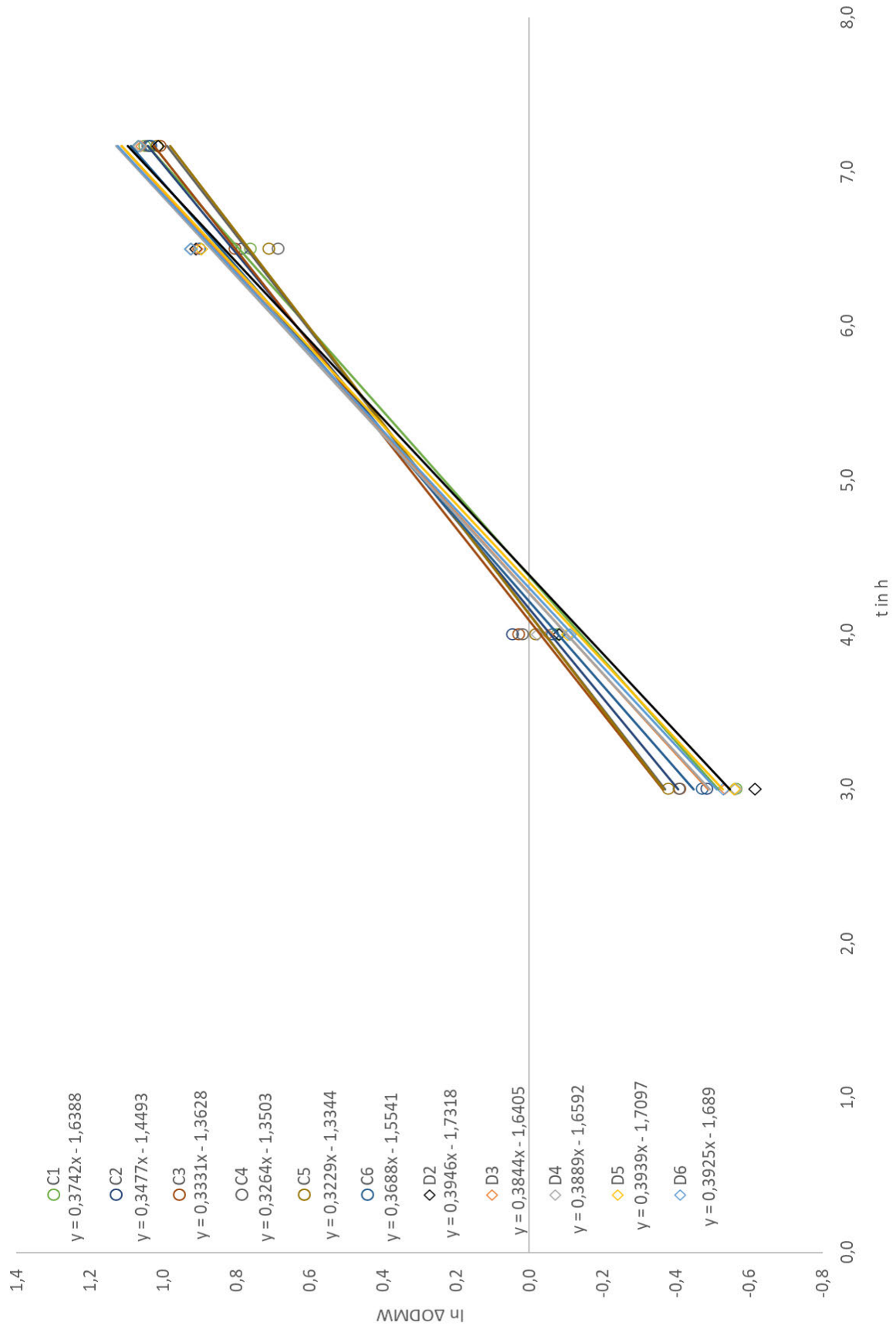


Abbildung 49: V18_1- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe C und D (Versuchseinheit 16)

Tabelle 52: V18 - Messwerte - 24-Well MTP – Platte 2: 37 °C und 200 rpm

Well-Nr.	ln ΔOD_{MW}			
	3.00 h	4.00 h	6.33 h	7.00 h
A1	-0.580	-0.083	0.807	0.922
A2	-0.460	-0.101	0.759	0.963
A3	-0.359	0.031	0.789	0.941
A4	-0.341	0.093	0.806	0.966
A5	-0.431	-0.034	0.805	0.955
A6	-0.463	-0.069	0.830	0.980
B1	-0.175	-0.053	0.814	1.014
B2	0.105	-0.015	0.791	0.899
B3	0.138	-0.009	0.797	0.972
B4	0.008	0.051	0.829	1.023
B5	-0.041	-0.002	0.797	0.973
B6	-0.435	-0.010	0.815	0.973
C1	-0.355	-0.089	0.705	0.999
C2	0.013	-0.044	0.726	1.014
C3	0.080	0.003	0.817	0.976
C4	0.037	0.050	0.808	0.994
C5	-0.078	0.025	0.791	1.014
C6	-0.354	-0.030	0.809	0.955
D2	-0.368	-0.114	0.770	0.985
D3	-0.351	-0.091	0.716	0.976
D4	-0.426	-0.127	0.788	0.941
D5	-0.464	-0.098	0.856	0.970
D6	-0.508	-0.157	0.860	0.951

Tabelle 53: V18 - CV-Werte Platte 2

Reihen	t in h	OD _{MW. PR}	Stdabw	CV in %
A	3.00	0.253	0.018	7.130
	4.00	0.339	0.020	5.907
	6.33	0.225	0.005	2.400
	7.00	0.249	0.005	2.119
B	3.00	0.333	0.053	15.788
	4.00	0.344	0.009	2.716
	6.33	0.226	0.002	1.000
	7.00	0.253	0.008	3.011
C	3.00	0.322	0.046	14.131
	4.00	0.342	0.015	4.301
	6.33	0.221	0.007	2.966
	7.00	0.256	0.006	2.203
D	3.00	0.255	0.013	4.971
	4.00	0.317	0.008	2.573
	6.33	0.225	0.009	4.149
	7.00	0.253	0.008	2.970

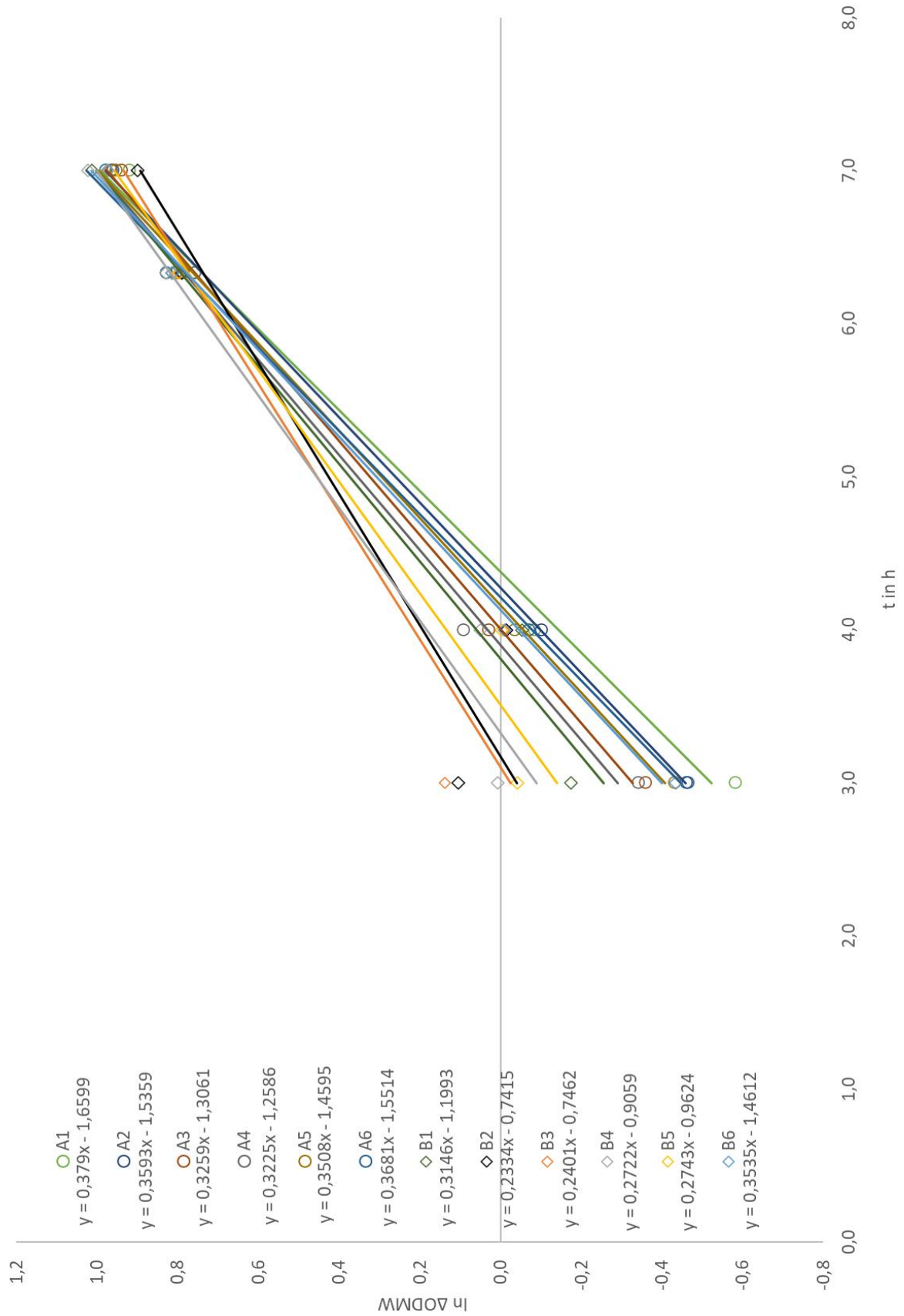


Abbildung 50: V18_2- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe A und B (Versuchseinheit 16)

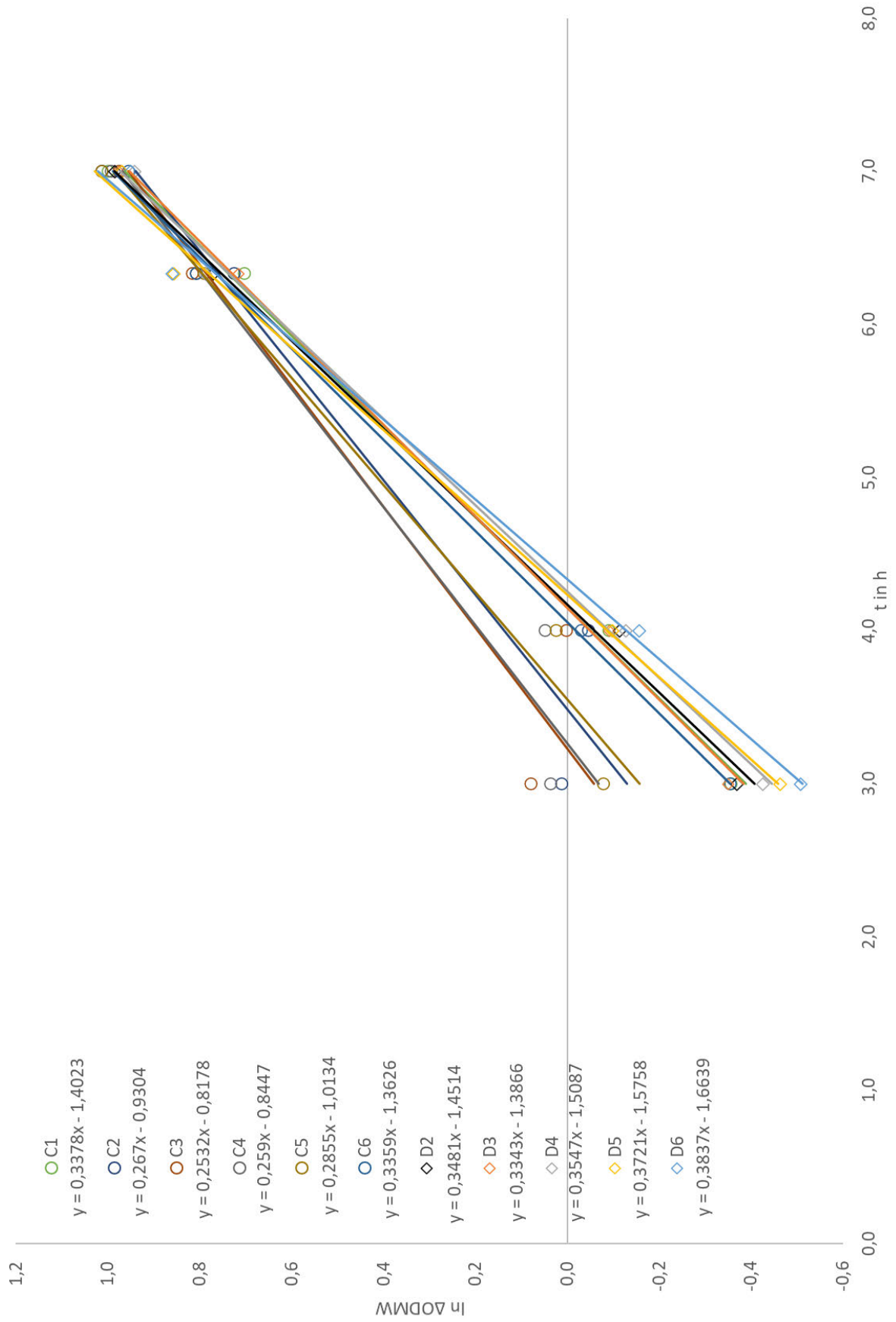


Abbildung 51: V18_2- Kultivierung im 24-Deepwell System von *Duetz*. Reihe C und D (Versuchseinheit 16)

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere Ich, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema Etablierung und Charakterisierung von Kultivierungen im Mikrotiterplattenformat von mir selbst ausgearbeitet und nur mit den angegebenen Quellen wörtlich, oder nach dem Sinn geschrieben und mit der Quellenangabe erkenntlich gemacht wurde.

Hamburg, 17. Januar 2022

Brenda Wichmann