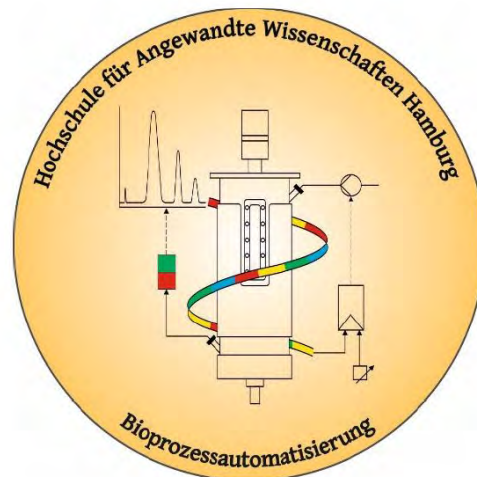


Masterarbeit

im Studiengang *Pharmaceutical Biotechnology*

Anwendung des *Design of Experiments*-Ansatzes zur Untersuchung und Weiterentwicklung des Produktionsverfahrens des rekombinanten antimikrobiellen Peptids NK2-ALK in *E. coli* BL21 in einer Multifermentieranlage



Jonas Niklas Oelbracht

Hamburg, 22.05.2024

1. Gutachter:

Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg)

2. Gutachter:

Prof. Dr. Christian Kaiser
(HAW Hamburg)

I. Abstrakt

Die Entdeckung von Antibiotika markierte einen Meilenstein in der Medizin, indem sie Krankheiten wie Lungenentzündungen, Infektionen und Tuberkulose effektiv behandelten. Der exzessive Einsatz in der Medizin und Landwirtschaft führte zu einer Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Die Relevanz dieser globalen Krise wird immer deutlicher und stellt die moderne Medizin vor große Herausforderungen. Um dieser Aufgabe zu begegnen, werden verschiedene Strategien, wie „Antibiotic Stewardship“ oder die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen wie antimikrobiellen Peptiden (AMPs) verfolgt, die breite Wirksamkeit gegen verschiedene Mikroorganismen zeigen. Die AMPs sind Teil des angeborenen Immunsystems und unterscheiden sich in Ihrer Wirkungsweise von traditionellen Antibiotika, weswegen die bestehenden Antibiotikaresistenzen nicht gegen sie wirken. Das modifizierte AMP NK2-ALK wird als Fusionsprotein mit einer Onconase im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) produziert. Die Kultivierung beginnt mit einer Batch-Phase, während der die Zellen fünf Stunden lang mit unbegrenzter Wachstumsrate unter Verwendung von Glucose als Substrat wachsen. Anschließend folgen zwei Fed-Batch Phasen mit einer Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,15 \text{ h}^{-1}$ für fünf bzw. 14 h. Nachfolgend werden die Zellen in die 1 L Screeningreaktoren der Multifermentieranlage transferiert. In diesen wird der Einfluss von Hefeextrakt, Pepton und IPTG auf die Produktionsrate, unter Anwendung eines Design of Experiments (DOE), untersucht. Hierfür durchlaufen die Zellen in den Screeningreaktoren eine einstündige Fed-Batch Phase und werden anschließend mittels IPTG induziert. Die Produktionsphase dauert drei Stunden. Am Ende der Produktionsphase werden Proben genommen. Das Peptide wird mit Hilfe des Novagen® Kits extrahiert. Die Peptide Konzentration wird durch die Verwendung von Tricin-SDS-Page bestimmt. Die Auswertung des DOE geschieht durch die Verwendung der Modde Software. Es konnte ein geeignetes Model erzeugt werden. Dieses beschreibt einen negativen Einfluss von hohen Konzentrationen von Hefeextrakt und IPTG. Außerdem hat Pepton einen positiven Effekt auf die Produktausbeute. Die Hefeextrakt und Pepton Konzentration haben eine positive Interaktion, welche sich positiv auf die Produktausbeute auswirkt.

Danksagung

Mit großer Dankbarkeit möchte ich meine Anerkennung und Wertschätzung für all jene aussprechen, die mich während meiner Masterarbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Bereitstellung des interessanten Themas und dem konstruktiven Feedback danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser, meinem Zweitgutachter, für seine wertvollen Einsichten und seine Unterstützung bei der Bewertung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an die Laboringenieure Dipl.-Ing. Hans-Peter Bertelsen und Dipl.-Ing. Ulrich Scheffler, die mir mit ihrer technischen Kompetenz und ihrem Engagement stets zur Seite standen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch Lisa Michel aussprechen, die mich mit ihrer hervorragenden Betreuung, ihrem konstruktiven Feedback und ihrer umfangreichen Unterstützung durch das gesamte Projekt begleitet hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei all meinen Kollegen im Labor bedanken, die durch ihre Zusammenarbeit und ihren Austausch dazu beigetragen haben, meine Arbeit voranzubringen.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden meinen tiefsten Dank aussprechen. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinem zukünftigen Schwager, die mich stets ermutigt und unterstützt haben, insbesondere bei der Überarbeitung des schriftlichen Teils meiner Masterarbeit.

Ohne die Unterstützung und Ermutigung dieser Personen und den Rückhalt meiner Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen gebührt mein aufrichtiger Dank.

II. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|------|
| I. | Abstrakt..... | I |
| II. | Inhaltsverzeichnis..... | III |
| III. | Abbildungsverzeichnis | VI |
| IV. | Tabellenverzeichnis | XI |
| V. | Formelverzeichnis..... | XIII |
| VI. | Nomenklatur | XIV |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Zielsetzung..... | 3 |
| 3 | Theorie..... | 4 |
| 3.1 | Expressionssystem <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) | 4 |
| 3.2 | Antimikrobielle Peptide..... | 7 |
| 3.2.1 | Geschichte | 7 |
| 3.2.2 | Charakteristika | 7 |
| 3.2.3 | Wirkungsmechanismus | 9 |
| 3.2.4 | Therapeutische Anwendung..... | 12 |
| 3.2.5 | NK-2..... | 14 |
| 3.2.6 | Fusionsprotein ONC-DCless-H6 (P) NK2-ALK | 16 |
| 3.3 | Design of Experiment..... | 18 |
| 3.3.1 | Anwendungsgebiete von DOE | 20 |
| 3.3.2 | Versuchsdesigns..... | 22 |
| 3.3.3 | Screeningparameter..... | 29 |
| 4 | Methoden | 31 |
| 4.1 | Zelllinie | 31 |
| 4.2 | Medien und Puffer..... | 32 |
| 4.3 | Vorkultur | 35 |
| 4.4 | Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5..... | 35 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.4.1 | Kultivierungsbedingungen | 37 |
| 4.4.2 | Messtechnik | 40 |
| 4.4.3 | MFCS/win | 41 |
| 4.4.4 | Trübungssonde | 42 |
| 4.5 | Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus..... | 43 |
| 4.5.1 | Kultivierungsbedingungen | 45 |
| 4.5.2 | Messtechnik | 47 |
| 4.5.3 | Kalibrierung der pH- und pO ₂ -Sonden..... | 47 |
| 4.6 | Analytische Methoden..... | 48 |
| 4.6.1 | Bestimmung Biotrockenmasse | 48 |
| 4.6.2 | Bestimmung optische Dichte | 49 |
| 4.7 | Screeningplan | 49 |
| 4.8 | Bestimmung der Produktkonzentration | 52 |
| 4.8.1 | Probenvorbereitung am Produktionstag | 52 |
| 4.8.2 | Produktaufreinigung am Analysetag..... | 53 |
| 4.9 | Analyse mittels Tris-Tricin Gelen..... | 53 |
| 5 | Auswertung | 55 |
| 5.1 | Kultivierungen | 55 |
| 5.1.1 | Kultivierung KW48..... | 57 |
| 5.1.2 | Kultivierung KW50..... | 66 |
| 5.1.3 | Kultivierung KW02..... | 78 |
| 5.1.4 | Kultivierung KW04..... | 89 |
| 5.2 | Tricin-SDS-PAGE | 102 |
| 5.3 | Modellierung | 109 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 120 |
| 7 | Ausblick..... | 121 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 122 |
| 9 | Anhang..... | 130 |
| 9.1 | Materialien | 130 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 9.2 | Puffer und Lösungen..... | 134 |
| 9.3 | Reaktoren | 136 |
| 9.3.1 | Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5..... | 136 |
| 9.3.2 | Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus..... | 137 |
| 9.4 | Kultivierungen | 139 |
| 9.4.1 | Übersicht..... | 139 |
| 9.4.2 | BTM/OD | 140 |
| 9.4.3 | KW50 Screeningreaktor Q3 | 145 |
| 9.4.4 | Mikroskopische Aufnahmen | 145 |
| 9.5 | Tricin-SDS-PAGE | 147 |
| 9.6 | MFCS Rezepte | 153 |
| 9.6.1 | Rezept BIOSTAT® ED5..... | 153 |
| 9.6.2 | Rezept Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus..... | 177 |

III. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Zeitliche Abfolge von Ereignissen bezüglich der Antibiotikaresistenz..... | 2 |
| Abbildung 2: Wirkungsmechanismus des Expressionssystems <i>E. coli</i> BL21 (DE3)..... | 6 |
| Abbildung 3: Quelle von AMPs aus der AMP Datenbank der Universität Nebraska..... | 8 |
| Abbildung 4: Darstellung der direkten und nicht direkten Wirkungsweisen von AMPs | 10 |
| Abbildung 5: Ziele der Wirkungsmechanismen von traditionellen Antibiotika und AMPs..... | 13 |
| Abbildung 6: Aminosäuresequenz der NK-lysin Derivate NK1 (40-63) und NK2 (39-65)..... | 14 |
| Abbildung 7: 3D Struktur des NK-lysin isoliert aus Schweinen..... | 15 |
| Abbildung 8: Aminosäuresequenz der Peptide NK2 (oben) und NK2-ALK(unten). | 16 |
| Abbildung 9: Aufbau des ONC-DCless_H6 (P) NK-2 ALK Fusionkonstruktes..... | 17 |
| Abbildung 10: Konturdiagramm des Ein-Faktor Ansatzes..... | 19 |
| Abbildung 11: DoE Untersuchungsgebiete und deren Zielsetzung | 20 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung eines vollfaktoriellen Designs..... | 24 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung eines teilfaktoriellen Designs..... | 25 |
| Abbildung 14: Schematische Darstellung des Faced Central-Composite Designs..... | 27 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung des Circumscribed Central-Composite Designs | 28 |
| Abbildung 16: Die unterschiedlichen Typen vom Central Composite Design | 28 |
| Abbildung 17: Vektorkarte des Plasmides pET30a ONC-Dcless-H6 (P) NK-2 ALK | 31 |
| Abbildung 18: Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5 | 36 |
| Abbildung 19: Theoretischer Verlauf der Kultivierung im ED5..... | 37 |
| Abbildung 20: Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild und Steuerungsaufgaben des ED5.. | 38 |
| Abbildung 21: a) Aufbau der Trübungssonde b) Aussehen der Trübungssonde | 42 |
| Abbildung 22: Seitenansicht der Multifermentieranlage | 43 |
| Abbildung 23: BIOSTAT® Qplus mit Sonden und Zubehör..... | 44 |
| Abbildung 24: Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild und Steuerungsaufgaben der Qplus | 45 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: Theoretischer Verlauf der Kultivierung in den Qplus Reaktoren | 46 |
| Abbildung 26: Grafische Darstellung des Versuchsplans des Screenings. | 50 |
| Abbildung 27: Bestimmung des Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD | 55 |
| Abbildung 28: Bestimmung eines Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD..... | 56 |
| Abbildung 29: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW48.. | 57 |
| Abbildung 30: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW48. . | 60 |
| Abbildung 31: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW48. . | 61 |
| Abbildung 32: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q2 | 62 |
| Abbildung 33: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q2 | 63 |
| Abbildung 34: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q3 | 64 |
| Abbildung 35: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q3. | 64 |
| Abbildung 36: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q5 | 65 |
| Abbildung 37: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q5 | 66 |
| Abbildung 38: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW50. . | 67 |
| Abbildung 39: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW50. . | 68 |
| Abbildung 40: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW50. . | 69 |
| Abbildung 41: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q1 | 70 |
| Abbildung 42: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q1 | 71 |
| Abbildung 43: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q2 | 72 |
| Abbildung 44: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q2 | 73 |
| Abbildung 45: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q3. | 74 |
| Abbildung 46: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q2 | 74 |
| Abbildung 47: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q5. | 75 |
| Abbildung 48: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q5 | 76 |
| Abbildung 49: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q6 | 77 |

Abbildung 50: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q678

Abbildung 51: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW02..79

Abbildung 52: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW02..80

Abbildung 53: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW02..81

Abbildung 54: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q182

Abbildung 55: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q183

Abbildung 56: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q284

Abbildung 57: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q284

Abbildung 58: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q385

Abbildung 59: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q386

Abbildung 60: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q487

Abbildung 61: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q487

Abbildung 62: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q588

Abbildung 63: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q589

Abbildung 64: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW04..90

Abbildung 65: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW04..91

Abbildung 66: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q192

Abbildung 67: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q193

Abbildung 68: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q294

Abbildung 69: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q294

Abbildung 70: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q395

Abbildung 71: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q396

Abbildung 72: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q497

Abbildung 73: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q498

Abbildung 74: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q599

| | |
|---|-----|
| Abbildung 75: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q5 | 99 |
| Abbildung 76: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q6 | 100 |
| Abbildung 77: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q6 | 101 |
| Abbildung 78: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 1 mM IPTG | 103 |
| Abbildung 79: Kalibrierungsgeraden des SDS-Gels mit BSA als Standard. | 104 |
| Abbildung 80: Kalibrierungsgeraden des SDS-Gels mit Lysozym als Standard. | 104 |
| Abbildung 81: Design Region des Screening DOE | 109 |
| Abbildung 82: Replikat Plot des Screening DOE | 110 |
| Abbildung 83: Histogramm der Responses des Screening DOE | 111 |
| Abbildung 84: Regressionskoeffizienten des Modells | 112 |
| Abbildung 85: Summary of fit Diagramm des Screening DOE | 113 |
| Abbildung 86: Wahrscheinlichkeitsnetz der Daten | 114 |
| Abbildung 87: Beobachtet gegen berechnet Diagramm..... | 115 |
| Abbildung 88: Response Contour Plot. | 116 |
| Abbildung 89: Response Contour Plot..... | 117 |
| Abbildung 90: Response Surface Plot. Für eine IPTG Konzentration von 0,1 mM..... | 117 |
| Abbildung 91: Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5 mit den verwendeten Sonden..... | 136 |
| Abbildung 92: BIOSTAT® Qplus mit den entsprechenden Sonden | 137 |
| Abbildung 93: Ausführliches RI-Fließbild einer Untereinheit des Multifermenteranlage..... | 138 |
| Abbildung 94: Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD über die Batch Phase | 143 |
| Abbildung 95: Universellen Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD | 144 |
| Abbildung 96: Universellen Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD | 144 |
| Abbildung 97: Kultivierungsverlauf der <i>E. coli</i> Zellen im Screeningreaktor Q3 | 145 |
| Abbildung 98: Mikroskopische Aufnahmen der Zellen | 146 |
| Abbildung 99: Gel der Zentralpunkte 50Q3, 02Q1 und 04Q4..... | 147 |

Abbildung 100: Gel zur Untersuchung von Verdünnungseinflüssen.....147

Abbildung 101: Gel aller Zentralpunkte aller Screeningversuche (Gel 3.1).148

Abbildung 102: Gel aller Zentralpunkte aller Screeningversuche (Gel 3.2).148

Abbildung 103: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 1 mM IPTG149

Abbildung 104: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 0,1 mM IPTG.....149

Abbildung 105: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 0,1 mM IPTG.....150

Abbildung 106: Gel der Screeningexperimente 04Q1, 04Q5 und 04Q2 (Gel 6).150

Abbildung 107: Gel der Screeningexperimente 04Q3, 04Q4 und 04Q6 (Gel 7).151

Abbildung 108: Gel der Screeningexperimente.....151

IV. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Vollfaktorieller Versuchsplan für drei Faktoren mit jeweils zwei Level | 23 |
| Tabelle 2: Auflösung von Versuchsplänen..... | 26 |
| Tabelle 3: Stammlösungen verwendet für Vorkultur-, Batch- und Feedmedium..... | 32 |
| Tabelle 4:Rezept des Vorkultur- (V) und Batchmediums (B), pH = 7 | 32 |
| Tabelle 5: Feedmedium..... | 33 |
| Tabelle 6: Kanamycin Stammlösung, verwendet in der Vorkultur, sterilfiltriert | 33 |
| Tabelle 7: Peptone Stammlösung..... | 33 |
| Tabelle 8: Hefeextrakt Stammlösung..... | 33 |
| Tabelle 9: Zusammensetzung des 90 mL Vorlagepuffers, pH = 7..... | 34 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung des 60 mL Vorlagepuffers, pH = 7..... | 34 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung des 30 mL Vorlagepuffers, pH = 7..... | 34 |
| Tabelle 12: Phosphatpuffer, pH = 7 | 34 |
| Tabelle 13: Tris-Puffer, pH = 7,4..... | 34 |
| Tabelle 14: Kultivierungsbedingungen der Kultivierung im ED5..... | 40 |
| Tabelle 15: Prozessvariablen des Bioreaktors ED5..... | 41 |
| Tabelle 16: Kultivierungsbedingungen der Kultivierung in den Qplus Reaktoren. | 47 |
| Tabelle 17: Prozessvariablen der Qplus Reaktoren..... | 47 |
| Tabelle 18: Übersicht der Screeningexperimente | 51 |
| Tabelle 19: Übersicht der durchgeführten Experimente | 52 |
| Tabelle 20: Reglereinstellungen über den Verlauf der Kultivierung in der KW48 | 58 |
| Tabelle 21: Reglereinstellungen über den Verlauf der Kultivierung in der KW50. | 67 |
| Tabelle 22: Kalibrierung mit Lysozym und BSA..... | 105 |
| Tabelle 23: Lysozym Kalibrierung der SDS Gele..... | 106 |
| Tabelle 24: Produktausbeute der einzelnen Screeningversuche. | 107 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 25: Bewertungskriterien eines Modells | 113 |
| Tabelle 26: Übersicht der verwendeten Chemikalien | 130 |
| Tabelle 27: Verwendetet Verbrauchsgegenstände | 131 |
| Tabelle 28: Equipment und Zubehör Reaktor BIOSTAT ED5 | 131 |
| Tabelle 29: Übersicht über das Equipment und Zubehör der Qplus Reaktoren..... | 132 |
| Tabelle 30: Verwendetes Laborequipment | 133 |
| Tabelle 31: Zusammensetzung des PBS-Urea (2 M) Puffers..... | 134 |
| Tabelle 32: Zusammensetzung der 1 M DTT Lösung. Aliquotiert und bei -20 °C gelagert .. | 134 |
| Tabelle 33: Zusammensetzung der Lysozym Standards. | 134 |
| Tabelle 34: Zusammensetzung des 10x Laufpuffer für Tris-Tricin Gele. | 134 |
| Tabelle 35: Zusammensetzung der Färbelösung zum anfärben der Tris-Tricin Gele. | 135 |
| Tabelle 36: Zusammensetzung der Entfärbelösung zum entfärben der Tris-Tricin Gele | 135 |
| Tabelle 37: Puffer S für die Herstellung des Probenpuffers für tris-tricin SDS-PAGE..... | 135 |
| Tabelle 38: Probenpuffer für die tris-tricin SDS-PAGE..... | 135 |
| Tabelle 39: Übersicht über alle durchgeführten Kultivierungen. | 140 |
| Tabelle 40: Messwerte der OD und der BTM der Kultivierung KW48 im ED5 | 141 |
| Tabelle 41: Messwerte der OD und der BTM der Kultivierung KW50 im ED5 | 141 |
| Tabelle 42: Messwerte der OD und der BTM der Kultivierung KW02 im ED5 | 142 |
| Tabelle 43: Messwerte der OD und der BTM der Kultivierung KW04 im ED5 | 143 |
| Tabelle 44: Auswertung der Kalibrierung des BSA-Standards | 152 |
| Tabelle 45: Verdünnungseinflüsse auf die Probe 50Q3 | 152 |

V. Formelverzeichnis

| | |
|---|----|
| Formel 1: Anzahl an Experimente beim vollfaktoriellen Design..... | 23 |
| Formel 2: Anzahl an Experimente beim teilfaktoriellen Design | 25 |
| Formel 3: Berechnung der maximalen Zellkonzentration | 38 |
| Formel 4: Berechnung des Zeitpunktes des Batchendes..... | 39 |
| Formel 5: Berechnung der relativen Pumprate der Zufütterpumpe zum Zeitpunkt t_i | 39 |
| Formel 6: Berechnung der Zellkonzentration aus dem Trübungssignal S_{turb} | 42 |
| Formel 7: Berechnung der Biotrockenmasse..... | 48 |
| Formel 8: Berechnung der Veränderung der OD der Probe..... | 49 |
| Formel 9: Berechnung der OD der Probe | 49 |
| Formel 10: Berechnung des Resuspensionsvolumens | 52 |

VI. Nomenklatur

Generelle Abkürzungen

AMP *antimikrobiellen Peptide*

BBPER *Bug Buster Protein Extraction Reagent*

BBPER (1:10) *1:10 Verdünnung des BugBuster Protein Extraction Reagents*

BSA *Rinderserumalbumin, Bovine Serumalbumin*

BTM *Biotrockenmasse*

DCU *digitale Steuereinheit*

DOE *Design of Experiment*

DTT *Dithiothreitol*

E. coli *Escherichia coli*

EMA *Europäische Arzneimittel Agentur*

FDA *Food and Drug Administration*

IB *Inclusion Bodies*

ICH *Internationaler Rat für die Harmonisierung der technischen Anforderungen an Humanarzneimittel*

IPTG *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

Mrg *Mikroreaktionsgefäß*

OD *optische Dichte*

PAT *Prozessanalytiktechnologie*

Stabw *Standardabweichung*

WHO *Weltgesundheitsorganisation*

Generelle Variablen

| | | |
|---------------|--|----------------------|
| ϑ_K | Temperatur im System K | °C |
| μ | Zellspezifische Wachstumsrate | h^{-1} |
| c_{IK} | Massenkonzentration von Stoff I im System K | $g L^{-1}$ |
| F_{nI} | Begasungsrate von Stoff I unter Standardbedingungen | $L h^{-1}$ |
| $k_{X/OD}$ | Korrelationsfaktor zwischen Zellkonzentration und OD | $(g L^{-1}) AU^{-1}$ |
| m_{IK} | Masse von Stoff I in System K | g |
| N_{St} | Rührerdrehgeschwindigkeit | min^{-1} |
| p_K | Absoluter Druck in System K | bar |
| p_{O_2} | Relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck | % |
| $q_{I/X}$ | Zellspezifische Aufnahme-rate des Stoffes I | h^{-1} |
| S_{turb} | Signal der Trübungssonde | AU |
| V_K | Volumen des Systems K | L |
| v_{vm} | Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro min | - |
| x_{IK} | Molenbruch des Gases I im System K | - |
| $y_{X/I}$ | Ausbeutekoeffizient der Zellmasse pro Stoff I | $g g^{-1}$ |

Generelle Indizes

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| 0 | Initiale Bedingungen (Zeitpunkt = 0) |
| AF | Anti-Foam (Anti Schaum) |
| AIR | Luft |
| BTM | Biotrockenmasse |
| est | Schätzung |
| L | Flüssigphase |
| max | Maximum |
| meas | gemessen |
| min | Minimum |
| n | Standard Gasbedingungen |
| O ₂ | Sauerstoff |
| R | Reservoir (Glucose) |
| S | Substrat (Glucose) |
| T1 | Titration 1 (Säure) |
| T2 | Titration 2 (Base) |
| turb | Trübung |
| w | Sollwert |

1 Einleitung

Vor der Entdeckung von Antibiotika waren Lungenentzündungen, Grippe, Tuberkulose und Magen-Darm-Infekte eine der häufigsten Todesursachen. Infektionen waren eine immer vorhandene Bedrohung, welche viele Opfer forderte. Dies änderte sich 1928, als Alexander Fleming das Penicillin entdeckte. Mit dieser Entdeckung und der anschließenden kommerziellen Produktion wurde das „Goldene Zeitalter“ der Antibiotika eingeleitet (siehe Abbildung 1). In diesem ca. 30 Jahren währenden Zeitraum wurden verschiedene Antibiotika mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen entdeckt. Antibiotika fanden Anwendungen in den verschiedensten Gebieten und brachten die moderne Medizin voran. Alexander Fleming warnte bereits bei seiner Nobelpreisrede vor den möglichen Resistenzbildungen von Bakterien. Dennoch fanden Antibiotika weitflächig Anwendung in der Humanmedizin, aber auch in der Landwirtschaft. Zwischen den späten 1950iger und dem Beginn der 1960iger wurden in vielen Darmbakterien Antibiotikaresistenzen festgestellt. Aufgrund der Entdeckung und Entwicklung immer neuer Antibiotika mit neuen Wirkungsmechanismen stellte dies keine große Bedrohung dar. Mit der Zeit wurden weniger neue Wirkungsmechanismen entdeckt, stattdessen wurden bestehende Mechanismen modifiziert. Dadurch entstanden sogenannte „Me-too“ Arzneimittel. Obwohl immer weniger neue Antibiotika entwickelt wurden, änderte sich der Umgang mit diesen nicht. Der Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft wird kaum reguliert, sodass fast 80 % der eingesetzten Antibiotika in der Landwirtschaft verwendet werden. Darüber hinaus haben mehrere Studien aufgezeigt, dass in 30-50 % der Behandlungen, die Wahl des Wirkstoffes und die Behandlungsdauer unangemessen waren. Gleichzeitig werden Antibiotika auch präventiv verschrieben. Diese und noch weitere Faktoren fördern das Auftreten von Antibiotikaresistenzen, welche an sich ein nicht zu vermeidendes Ereignis darstellen. Zum heutigen Zeitpunkt wird die Antibiotikaresistenz-Krise als globale Krise gleichbedeutend mit der globalen Erwärmung betrachtet. 2019 sind 1,27 Millionen Menschen direkt aufgrund von antibiotikaresistenten Keimen gestorben und zu 4,95 Millionen Toten haben diese beigetragen. Neben den menschlichen Opfern, welche diese Krise bereits forderte und noch fordern wird, kommen auch wirtschaftliche Folgen. Bis 2050 entstehen dadurch 1 Billionen US-Dollar zusätzliche Kosten und bis 2030 entstehen Verluste beim Bruttoinlandprodukt von 1 bis 3,4 Billionen US-Dollar pro Jahr. (Browne et al. 2020; World Health Organization 2024; Alexander Fleming 1945; Aslam et al. 2018)

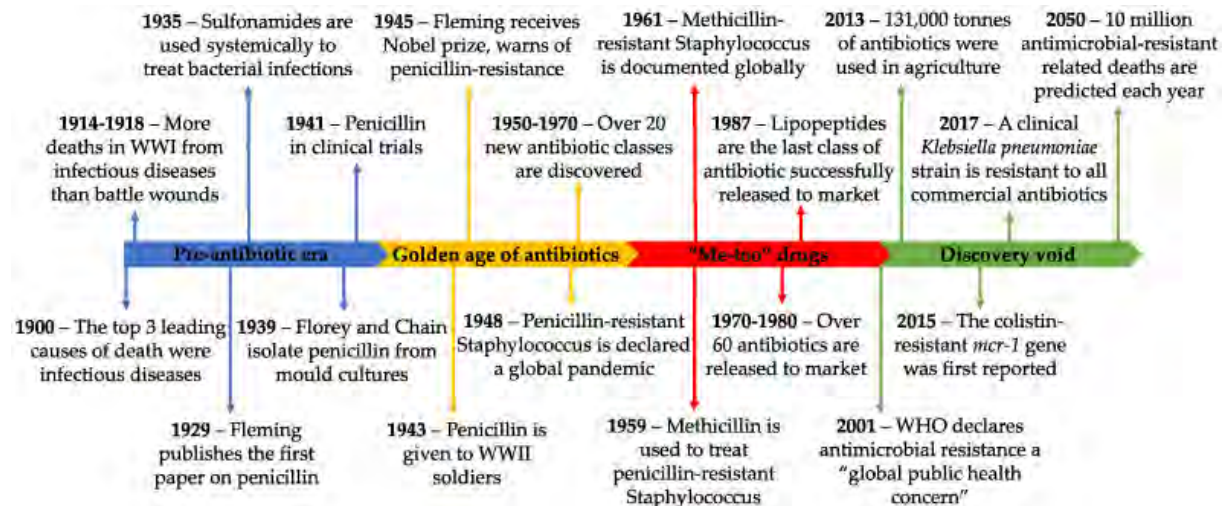


Abbildung 1: zeitliche Abfolge von Ereignissen bezüglich der Antibiotikaresistenz. WHO: Weltgesundheitsorganisation, WWI/II: Erster und Zweiter Weltkrieg (Browne et al. 2020)

Die Relevanz dieser Krise wird immer deutlicher und ist bei Organisationen wie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) schon längst bekannt. Die erste Versammlung der WHO bezüglich Antibiotikaresistenzen fand 1998 statt. Es gibt verschiedene Ansätze und Strategien, dennoch gibt es zwei Hauptansätze. Einerseits sollen bestehende Antibiotika geschützt werden, also das Auftreten von Resistenzen verringern und die Verteilung unterbunden werden. Gleichzeitig müssen neue antimikrobielle Komponenten entdeckt und entwickelt werden. Diese Hauptansätze lassen sich in kleinere Strategien unterteilen. Um vorhandene Antibiotika zu schützen, müssen die bestehenden Resistenzen erfasst und überwacht werden. Gleichzeitig muss großflächig über die richtige Verwendung von Antibiotika aufgeklärt werden, was bereits durch systematische Ansätze wie „Antibiotic Stewardship“ stattfindet. Außerdem müssen neue antimikrobielle Komponenten entdeckt werden, um gegen multiresistente Keime vorgehen zu können. Einer der möglichen neuen antimikrobiellen Mittel sind die antimikrobiellen Peptide (AMP). (Aslam et al. 2018; Browne et al. 2020; Sabtu et al. 2015)

Vertreter dieser Klasse wurden bereits 1939 von Dubos entdeckt. Sie kommen in nahezu allen Domänen des Lebens vor und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Die AMPs weisen ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien (gram positiv und negativ), Hefen, Pilze, Viren und Parasiten auf. Dabei richtet sich ihr Wirkungsmechanismus hauptsächlich auf die Membran der Zellen, zusätzlich wirken manche AMPs noch auf intrazelluläre Ziele. Der genaue Wirkungsmechanismus ist teilweise abhängig von dem Zielorganismus, den Umgebungsbedingungen und der Konzentration des AMPs. Vereinzelt finden AMPs bereits Anwendung in der modernen Medizin. Durch den zunehmenden Fokus der Forschung auf AMPs nimmt die Zahl an AMPs in klinischen Studien und auch die Anzahl an Publikationen über AMPs immer weiter zu. (Mahlapuu et al. 2020; Fry 2018; Bechinger und Gorr 2017)

2 Zielsetzung

Im Zuge des interdisziplinären Projektes PharmCycle sollte die Arzneimittelbelastung in Gewässern reduziert werden (Andrä et al. 2018). Eine der vier Stellschrauben ist die Produktion von nachhaltigen Antibiotika in Form des AMPs NK2-ALK. Im Rahmen dieses Projektes werden unterschiedliche Forschungsarbeiten durchgeführt. Initial wurde eine Produktion des Peptids als Fusionskonstrukt in *E. coli* in Betracht gezogen. Eine Produktion in diesem Expressionssystem ist möglich (Schulze 2020). Dennoch ist die Aufreinigung des Peptides aufwendig und die Expression konnte online nicht überwacht werden. Darüber hinaus ist eine Quantifizierung des Produktes schwierig. Deswegen wurde das *Pichia pastoris* als Expressionsorganismus ausgewählt. Dieser Organismus ist in der Lage das Expressionsprodukt zu sekretieren, was eine anschließende Aufreinigung vereinfacht. In dem Zuge wurde das Fusionskonstrukt geändert. Statt einer Onkonase wurde das NK2-ALK mit eGFP gekoppelt. Dadurch konnte die Expression online mittels der Fluoreszenz überwacht werden. Außerdem ließ sich das Produkt theoretisch über die Fluoreszenz quantifizieren. Es wurde ein dreistufiger Kultivierungsprozess mit anschließender Aufreinigung entwickelt (Thoma 2021). Allein die Kultivierung dauerte eine Woche. Außerdem produzierte *P. pastoris* nur sehr geringe Mengen des Peptides und eine einfache Quantifizierung des Peptides anhand der Fluoreszenz war nicht möglich (Ganczarski und Oelbracht 2023). Deswegen wurde dieser Ansatz verworfen und *E. coli* erneut als Expressionsorganismus ausgewählt. In dieser Arbeit soll der Einfluss der Hefeextrakt-, Pepton- und IPTG-Konzentration auf die Peptidproduktion untersucht werden. Dazu wird der Ansatz des Design of Experiment verwendet. Die Screening Experimente finden in einer Multifermenteranlage statt.

3 Theorie

3.1 Expressionssystem *Escherichia coli* BL 21 (DE3)

Die Produktion von rekombinanten Proteinen ist eines der größten Erfolge des letzten Jahrhunderts im Felde der Biotechnologie. Natürliche Wirkstoffe wurden schon lange in unterschiedlichsten Feldern angewendet, hierbei wurden diese in den natürlichen Quellen produziert und isoliert. Die Isolierung und Aufreinigung der Proteine ist ein aufwendiges und kostenintensives Verfahren, welches meistens eine geringe Ausbeute aufweist. Durch die Produktion von rekombinanten Proteinen, also die Produktion eines Proteins durch die Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen, konnte die Gewinnung nützlicher Proteine optimiert werden. Diese rekombinierten Proteine finden aktuell z.B. Anwendung in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und der Lebensmittelindustrie sowie der Landwirtschaft. Der Wert von rekombinanten Proteinen wird bis 2027 einen Betrag von 2,4 Milliarden Dollar übersteigen. (Pouresmaeil und Azizi-Dargahlou 2023; Rosano et al. 2019)

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen gibt es eine Vielzahl an Faktoren zu berücksichtigen, allen voran der Wirtsorganismus, in welchem das Protein produziert werden soll. Als Wirtsorganismus stehen unterschiedlichste Organismen zur Verfügung, sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Organismen. Als populäre prokaryotische Organismen gelten z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Bacillus subtilis*. Als eukaryotische Wirtssysteme gibt es Hefen, z.B. *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae*, Fadenpilze, Insektenzellen, Pflanzenzellen und Säugetierzellen, z.B. HEK-Zellen („Human Embryonic Kidney“-Zellen) und CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary“-Zellen). Die Auswahl des Expressionssystems ist abhängig von den Anforderungen, da alle Organismen ihre Vor- und Nachteile bzw. Limitierungen aufweisen. So muss die Ausstattung des Labors mit der Expertise des Personals, die Charakteristika des rekombinanten Proteins, die Eigenschaften des Wirts, aber auch Vorgaben der Regulatorien u.v.m. berücksichtigt werden. Darüber hinaus gibt es, je nach Produktionszweck, noch weitere Überlegungen, die berücksichtigt werden müssen. (Pouresmaeil und Azizi-Dargahlou 2023; Gomes et al. 2016)

E. coli stellt von den Expressionssystemen eines der wichtigsten Systeme dar, so werden 1/3 der therapeutischen rekombinanten Proteine in *E. coli* produziert. So weist *E. coli* mit einer Verdopplungszeit von bis zu 20 Minuten ein sehr schnelles Wachstum auf, wodurch schnell hohe Zelldichten erreicht werden können. Dieses Wachstum erreicht der Organismus bereits auf kostengünstigen Medien, was die Kultivierung preiswert macht. *E. coli* ist der besterforschte Mikroorganismus und weist eine Vielzahl an mutierten Stämmen und Klonierungsvektoren auf, was seine Anwendung sehr flexibel macht. Außerdem ist *E. coli* von der FDA für die

Anwendung beim Menschen zugelassen. Zu den Nachteilen zählt die limitierte Fähigkeit Disulfidbrücken auszubilden, wodurch die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen fehlerhaft ausgebildet werden können. Außerdem ist *E. coli* nicht in der Lage posttranslationale Modifikationen durchzuführen, was besonders bei eukaryotischen Proteinen notwendig ist. Die *E. coli* Stämme K12 und B sind die am häufigsten verwendeten Stämme. *E. coli* K12 findet vor allem als Klonierungsstamm Anwendung. Bei den *E. coli* B Stämmen wird hauptsächlich der Stamm BL21 (DE3) verwendet. Dieser Stamm ist der am häufigsten verwendete *E. coli* Stamm bei der Produktion von rekombinanten Proteinen, sowohl im industriellen als auch im akademischen Kontext. (Cardoso et al. 2020; Kim et al. 2017; Marisch et al. 2013)

Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) weist gegenüber den anderen *E. coli* Stämmen gewisse Vorteile auf. So produziert dieser Stamm weniger Acetat bei hohen Glucosekonzentrationen, was besonders in der Batchphase relevant ist, da sich hohe Acetatkonzentrationen negativ auf das Wachstum auswirken können. Darüber hinaus verfügt der Stamm über eine geringere Proteaseproduktion, was bei der Expression von rekombinanten Proteinen von Vorteil ist. (Kim et al. 2017)

Bei dem Expressionssystem *E. coli* BL21 (DE3) wurde dem Chromosom des *E. coli* die T7 RNA Polymerase der T7 Phage hinzugefügt. Diese RNA-Polymerase transkribiert achtmal so schnell wie die RNA-Polymerase von *E. coli*. Das Gen der T7 Polymerase wird durch einen Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induzierbaren Promotor (P_{lacUV5}) gesteuert. Dieser ist stärker als der natürliche *lac* Promotor. Darüber hinaus wird dieser nicht durch die Anwesenheit von Glucose inhibiert. Das Expressionssystem wird oftmals zusammen mit dem pET-Expressionsvektor verwendet. Bei diesem befindet sich die Sequenz des rekombinanten Proteins/Peptides hinter einem T7 Promotor (P_{T7}). Dieser Promotor wird von der T7 RNA-Polymerase erkannt und diese transkribiert dann die Sequenz des rekombinanten Proteins/Peptides. Die Aktivität des T7 Promotors ist stark, wodurch das rekombinante Protein 50 % des Gesamtproteingehalts der Zelle ausmachen kann. Oftmals überfordert die Produktion des Proteins die metabolischen Fähigkeiten der Zellen, wodurch das Wachstum der Zellen eingeschränkt wird. Teilweise kommt es auch zum Stillstand des Wachstums. (Du et al. 2021; Marisch et al. 2013; Ahmad et al. 2018; Jia und Jeon 2016)

Ohne die Induktion des Systems durch IPTG bindet der *lac*-Repressor an den *lac* operator (*lacO*), welcher sich sowohl hinter dem P_{lacUV5} Promotor als auch hinter dem P_{T7} Promotor befindet. Durch diese Bindungen sind die Promotoren blockiert, wodurch keine RNA-Polymerase an diese binden kann. Durch die Zugabe von IPTG wird das System induziert. Das IPTG bindet an die *lac*-Repressoren und sorgt für eine Konformationsänderung, wodurch diese

nicht mehr an das *lac* operon binden können. Die beiden Promotoren sind nun frei für Polymerasen. Die RNA-Polymerase von *E. coli* bindet an den P_{lacUV5} Promotor und transkribiert die T7 RNA-Polymerase. Die bindet an den P_{T7} Promotor und das rekombinante Gen wird transkribiert (siehe Abbildung 2). (Swint-Kruse und Matthews 2013; Ahmad et al. 2018)

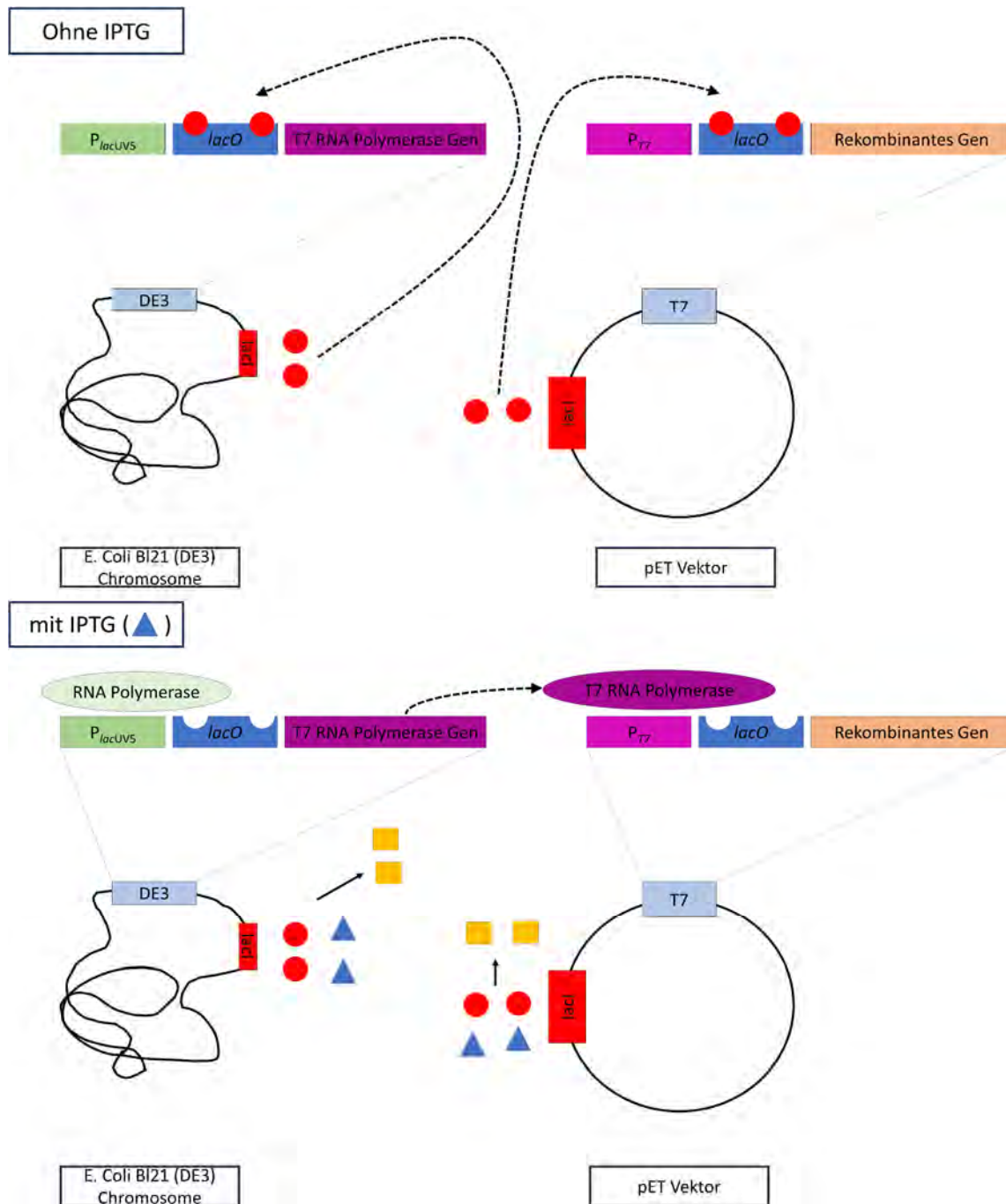


Abbildung 2: Wirkungsmechanismus des Expressionssystems *E. coli* BL21 (DE3) mit dem pET-Vektor. oben: Zustand des Systems ohne die Induktion durch IPTG. Der lac-Repressor (rot) bindet an das lac operon (*lacO*) und verhindert somit, dass die RNA-Polymerase an den entsprechenden Promotoren binden kann. unten: IPTG (blaues Dreieck) bindet an den lac-Repressor (rot) und sorgt für eine Konformationsänderung (gelb). Dadurch kann dieser nicht mehr an das lac operon binden. Dadurch sind die Promotoren nicht mehr blockiert.

3.2 Antimikrobielle Peptide

3.2.1 Geschichte

1928 entdeckte Alexander Fleming Penicillin, dies war nicht seine erste mikrobiell wirkende Substanz. Bereits 1922 entdeckte er Lysozym, welches antimikrobiell wirkte. Dennoch war die Aktivität gegen pathogene Keime gering. Von manchen Autoren wurde es als erstes antimikrobielles Peptid bezeichnet. Dennoch wirkt Lysozym enzymatisch und gehört somit nicht zu der Gruppe der AMPs. Der Nomenklatur der IUPAC folgend trägt das Enzym Lysozym den Namen Muramidase und die EC Nummer EC 3.2.1.17. (National Library of Medicine 2024; Moravej et al. 2018; Alexander Fleming 1945)

Das erste Peptid der Gruppe AMP entdeckte Dubos im Jahre 1939. Er isolierte das AMP Gramicidin aus dem Bodenbakterium *Bacillus brevis*. Gramicidin war das erste kommerzialisierte AMP. Im gleichen Jahr gelang es Sorensen das AMP Lactoferrin aus Kuhmilch zu isolieren. 1941 wurde das AMP Tyrocidin entdeckt. Dieses ist wirksam gegen gram positive und gram negative Bakterien, dennoch wirkte es zytotoxisch gegen menschliche Zellen, was eine therapeutische Nutzung einschränkte. In den folgenden Jahren wurden noch weitere AMPs entdeckt. Nichtsdestotrotz stieg das wissenschaftliche Interesse erst Anfang des 21. Jahrhunderts. So stieg die Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen in PubMed von weniger als 200 pro Jahr im Jahre 2000 auf über 1200 pro Jahr im Jahre 2018. (Mahlapuu et al. 2020; Nayab et al. 2022)

3.2.2 Charakteristika

Die Anzahl an entdeckten AMPs variiert je nach Datenbank. So umfasst die Datenbank des Medical Center der Universität Nebraska 3940 Peptide (Universität Nebraska 2024), wovon 3146 natürliche und 794 synthetische AMPs sind. Die AMPs sind Teil des angeborenen Immunsystems und wurden bisher in allen sechs Reichen des Lebens entdeckt. Dabei wurden die meisten AMPs im Reich der Animalia gefunden (siehe Abbildung 3). (Mahlapuu et al. 2020; Boparai und Sharma 2020)

Je nach Datenbank kann diese Anzahl variieren, so umfasst die DRAMP (Data repository of antimicrobial peptides) insgesamt 6105 AMPs, Gesamtheit an natürlichen und synthetischen AMPs. (Shi et al. 2022)

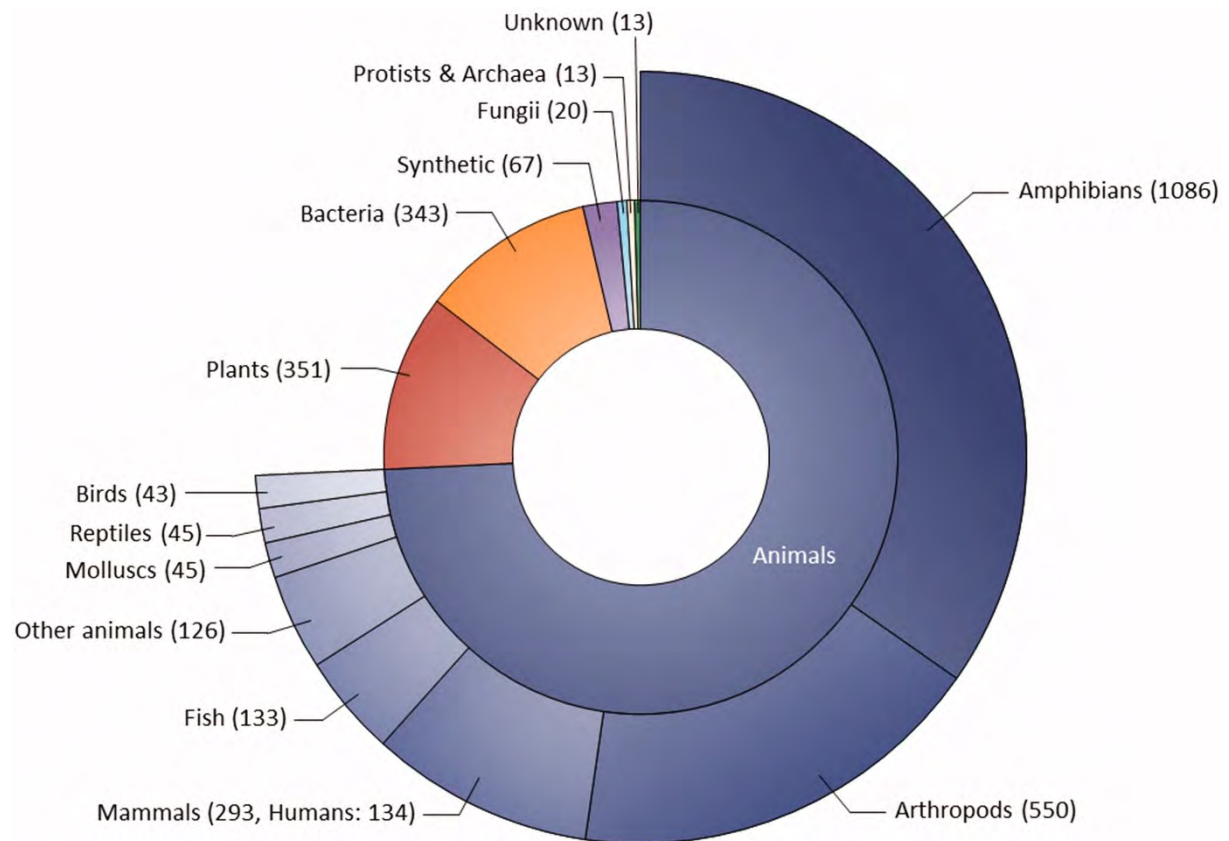


Abbildung 3: Quelle von AMPs aus der AMP Datenbank der Universität Nebraska (Universität Nebraska 2024) zum Zeitpunkt 2019 umfasste die Datenbank noch 3128 AMPs (Mahlapuu et al. 2020)

Trotz der Vielfalt an Quellen von AMP teilen sie alle gewisse Eigenschaften. AMPs sind kleine Peptide mit weniger als 100 Aminosäuren. Sie verfügen über keine enzymatische Aktivität, weswegen Lysosom kein AMP sein kann. Ein Großteil der AMPs weisen eine positive Nettoladung auf und sind somit kationisch, dennoch wurden auch schon anionische AMPs entdeckt. Sie bilden eine Minderheit. Die AMPs weisen alle einen amphiphilen Charakter auf, sie verfügen also über einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil, wobei der hydrophobe Teil mehr als 50 % des Peptides ausmacht. Die Peptide werden gemäß ihrer Sekundärstrukturen klassifiziert. (Lei et al. 2019; Nayab et al. 2022)

Die Peptide werden drei Gruppen zugeordnet. Die α -helikalen, die β -Faltblätter und die ausgedehnten (extended) Peptide. Die α -helikale Gruppe ist die größte und die am besten erforschte Gruppe, wobei Magainin das beste erforschte AMP dieser Gruppe ist. Die positiven Vertreter dieser Gruppe sind reich an den positiv geladenen Aminosäuren Histidin, Lysin, Prolin, Tryptophan und Arginin. Die negativ geladenen Vertreter weisen hohe Anteile an Glutaminsäure und Asparaginsäure auf. Die α -helikalen Peptide weisen in wässriger Lösung keine strukturelle Konformation auf, erst durch die Interaktion mit der Membran bildet sich die α -Helix als Sekundärstruktur aus. Viele Vertreter sorgen für Poren in der Bakterienmembran und wir-

ken bakteriostatisch. Die Vertreter der Gruppe der β -Faltblatt Peptide bestehen aus mindestens zwei β -strängen, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. Im Gegensatz zu den α -helikalen Peptiden behalten sie ihre Struktur auch in wässrigen Lösungen. Durch die Interaktion mit der Membran wird die Sekundärstruktur stabilisiert. Die meisten AMPs gehören zu einer dieser beiden Gruppen. Die ausgedehnten Peptide weisen eine lineare Struktur auf, ohne sich in eine typische Sekundärstruktur zu falten. In wässrigen Lösungen sind diese Peptide sehr flexible und ihr Wirkungsmechanismus zielt eher auf intrazelluläre Ziele, z.B. Chaperons, ab. Trotz dieser unterschiedlichen Strukturen weisen die Vertreter der unterschiedlichen Gruppen teilweise gleiche Wirkungsmechanismen auf. Die Struktur ist zwar ein Einflussfaktor für die Wirkungsweise der Peptide, aber nur einer von vielen. So können Änderungen innerhalb der Struktur von Peptiden den Wirkungsmechanismus maßgeblich verändern. Diese Änderung vorherzusagen ist dennoch sehr schwierig. (Nayab et al. 2022)

3.2.3 Wirkungsmechanismus

Die Wirkungsweise von AMPs hängt von verschiedenen Variablen ab. So nimmt die Struktur der Membran des Ziels Einfluss, aber auch die Peptidstruktur selbst. Generell wirken AMPs meistens auf mehr als nur eine Weise. Dabei lassen sich die Wirkungsweisen in direkt antimikrobiell und nicht direkt antimikrobiell unterscheiden (siehe Abbildung 4). Die direkt antimikrobiellen Wirkungsweisen lassen sich noch in membranzerstörend und nicht membranzerstörend unterteilen. (Nayab et al. 2022; Fry 2018)

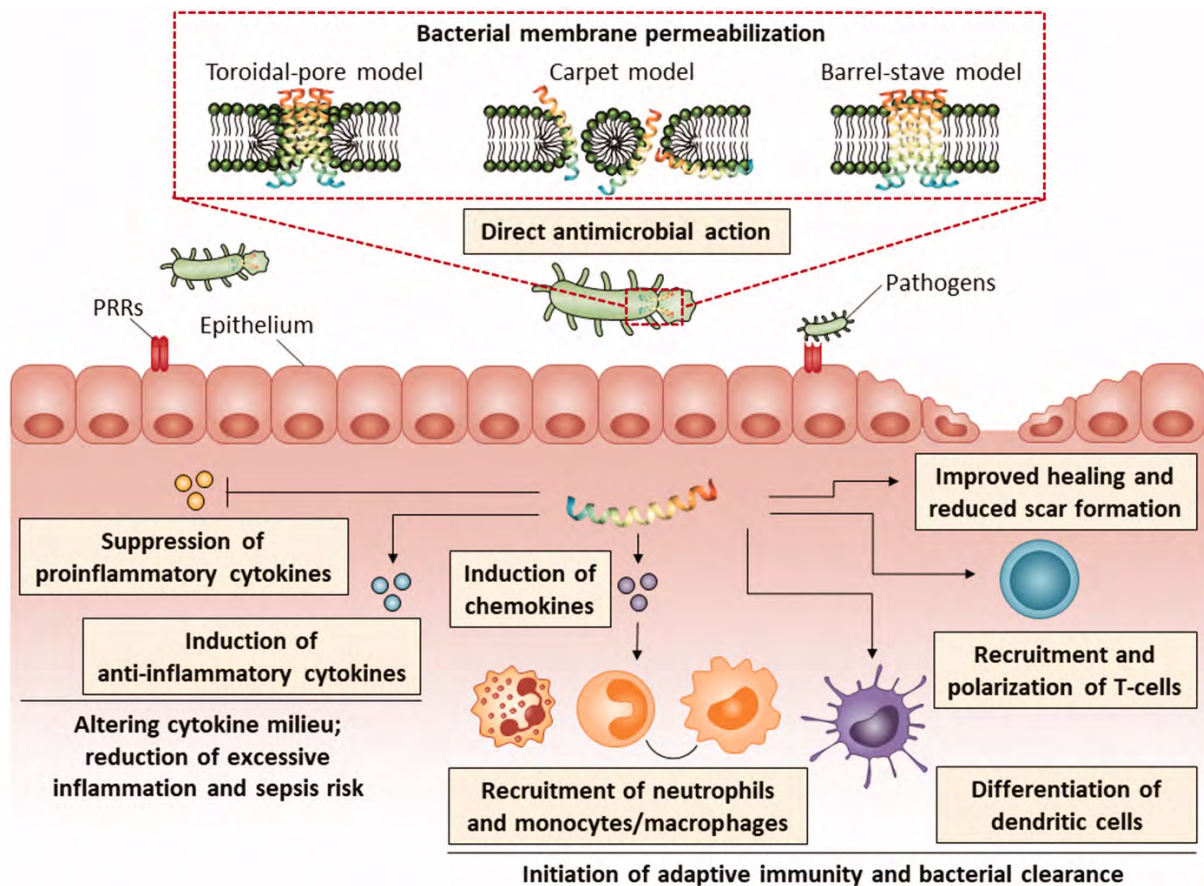


Abbildung 4: Schematische Darstellung der direkten und nicht direkten (immunmodulatorischen) Wirkungsweisen von AMPs. Im oberen Bereich sind die membranzerstörenden Wirkungsmechanismen der direkten antimikrobiellen Wirkungsweise dargestellt. Unten sind die nicht direkten antimikrobiellen Wirkungsweisen, die immunmodulatorischen Wirkungsweisen, dargestellt. PRR: pathogen recognition receptor. (Mahlapu et al. 2020)

3.2.3.1 Immunmodulatorische Funktionen von AMPs

AMPs sind Teil des angeborenen Immunsystems vieler Lebewesen. Dabei können die Gene der AMPs kontinuierlich oder induktiv transkribiert werden. Danach wirken sie entweder direkt auf den Erreger oder unterstützen das Immunsystem dabei den Erreger zu bekämpfen. Somit wirken sie indirekt antimikrobiell. Die immunmodulatorischen Funktionen der AMPs sind komplex. Sie verstärken die Chemotaxis von Immunzellen und aktivieren die Differenzierung von Immunzellen, um darüber T-Zellen zu aktivieren. In höheren eukaryotischen Lebensformen initiieren sie das adaptive Immunsystem. AMPs können sowohl die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen verringern als auch für die Freisetzung von entzündungshemmenden Zytokinen sorgen. In beiden Fällen interagieren die AMPs mit Toll-like Rezeptoren. Außerdem können sie die Wundheilung verbessern und Narbenbildung verringern (siehe Abbildung 4). (Mahlapu et al. 2020; Lei et al. 2019)

3.2.3.2 Antimikrobielle Wirkungsweise von AMPs

Bei den direkten antimikrobiellen Wirkungsweisen von AMPs lässt sich zwischen membranzerstörenden Wirkungsmechanismen und nicht membranzerstörenden Mechanismen unterscheiden. Bei den nicht membranzerstörenden Mechanismen dringen die AMPs durch die Membran, ohne diese zu beschädigen. Innerhalb der Zelle interagieren die AMPs mit unterschiedlichen Zielen und hemmen somit intrazelluläre Prozesse. Zu den intrazellulären Zielen gehören die Zellwandsynthese, die Proteinsynthese, Enzyme, DNA und RNA. Zusätzlich können die AMPs auch auf die Membran selbst wirken, da die meisten AMPs mehr als einen Wirkungsmechanismus besitzen, was sie den traditionellen Antibiotika voraushaben. Bei den membranzerstörenden Wirkungsmechanismen gibt es unterschiedliche Wirkungsmodelle, welche verwendet werden, um die Wirkungsmechanismen von spezifischen AMPs zu erklären. Zu diesen Modellen gehört das Torroidal Pore Modell, auch als Wurmloch Modell bekannt. Außerdem das Barrel-Staffel Modell/Helical-Bundle Modell und schlussendlich das Carpet Modell (deutsch: Teppichmodell). Welche die drei hauptsächlichen Wirkungsmodelle darstellen, diese sind in Abbildung 4 dargestellt. Zusätzlich werden noch das Molekular Elektroporationsmodell, das Sinking Raft Modell und das Aggregate Modell genannt. (Browne et al. 2020; Boparai und Sharma 2020; Bechinger und Gorr 2017)

Das Torroidal Pore Modell beschreibt die Wirkungsweise des AMPs Magainin-2 am besten. Bei diesem Modell richten sich die AMPs parallel zur Zellmembran aus. In dieser funktionellen inaktiven Form werden die AMPs in die Membran eingebaut. Ab einer spezifischen Peptid-Lipid Schwelle, welche AMP und Membran spezifisch ist, wandeln sich die AMPs in die aktive Form um. Dabei biegt sich der hydrophile Teil der Membran um den hydrophoben Teil der Membran (Innenraum der Lipiddoppelmembran), um diesen vor den polaren AMPs zu schützen. Dabei kommt es zu irreversiblen Rissen und zu Bildung der Poren. (Boparai und Sharma 2020)

Beim Barrel-Staffel Modell binden die amphipathischen α -helikalen AMPs an die Membran. Die AMPs bilden dabei Bündel, welche in die Membran integriert werden. Dieser Prozess ruft eine Konformationsänderung der AMPs hervor. Der hydrophobe Teil des AMPs wird zum Zentrum der Membran ausgerichtet, welcher ebenfalls hydrophob ist. Der hydrophile Teil richtet sich nach innen aus und bildet den Innenraum der Pore. In diesem Modell bilden die AMPs die Pore. Die Poren in diesem Modell sind kleiner und weniger variabel als beim Torroidal Pore Modell. Die Wirkungsweise von Alamethicin wird mit diesem Modell beschrieben. (Bechinger und Gorr 2017)

Beim Carpet Modell sammeln sich die kationischen AMPs an der Oberfläche der Zellmembran. Aufgrund der elektrostatischen Anziehungskraft zwischen den negativ geladenen Lipiden der Membran und den positiv geladenen AMPs bedecken die AMPs die äußere Schicht der Membran, ohne diese zu durchdringen. Ab einem gewissen Schwellenwert an Peptiden sind die Kräfte zwischen den Peptiden so stark, dass diese rotieren und dabei die Membran lokal auseinanderreißt. Es bilden sich Läsionen. In diese gelangen AMPs und schnüren dadurch Teile der Membran als Mizellen ab. Das humane AMP LL-37 wirkt auf diese Weise. (Nayab et al. 2022)

Beim molekularen Elektroporation Modell lagern sich die AMPs ebenfalls an die Zellmembran an. Dabei erzeugen sie eine elektrische Potentialdifferenz. Sobald diese den Wert von 0,2 Volt erreicht, öffnen sich Poren. (Nayab et al. 2022)

Beim Sinking Raft Modell sorgt das Anheften der AMPs zu einem Ungleichgewicht der Masse, wodurch die Krümmung der Membran verstärkt wird und die AMPs sinken durch die Membran. (Nayab et al. 2022)

Schlussendlich gibt es noch das Aggregate Modell, was im Großen und Ganz der Wirkungsweise vom Carpet Modell gleicht. Alle diese Modelle beschreiben die Wirkungsweise von AMPs gegen bakterielle Zellmembranen. Sie beruhen größtenteils auf der Anziehungskraft zwischen den kationischen AMPs und den negativ geladenen Lipiden der bakteriellen Zellmembran. Die äußere Schicht der eukaryotischen Zellmembran besteht hingegen aus zwitterionischen Lipiden und ist somit neutral geladen, wodurch diese nicht so anfällig gegenüber AMPs ist. Krebszellen weisen hingegen eine Asymmetrie zwischen der inneren und äußeren Schicht auf, wodurch vermehrt negativen Ladungen in der äußeren Schicht auftauchen. Dadurch sind Krebszellen anfälliger gegenüber AMPs (Nayab et al. 2022; Browne et al. 2020; Boparai und Sharma 2020; Bechinger und Gorr 2017)

3.2.4 Therapeutische Anwendung

Aufgrund der Krise bezüglich der Antibiotika Resistenzen rücken alternative antimikrobiell wirkende Substanzen in den Fokus der Wissenschaft, darunter auch AMPs, welche mit Vor- und Nachteilen einhergehen. Die AMPs zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum aus. So wirken sie nicht nur gegen Bakterien, sondern auch gegen Pilze und weitere Mikroorganismen. Die traditionellen Antibiotika wirken gegen sehr spezifische Ziele innerhalb der Zellen und sind dabei sehr selektiv (siehe Abbildung 5). Dadurch sind sie sehr anfällig gegenüber Resistenzen. Kleinste Änderungen in der Struktur des Ziels kann das Antibiotika unwirksam

machen. Der hauptsächliche antimikrobielle Effekt der AMPs zielt auf die Zellmembran von Bakterien ab. Dieser Mechanismus beruht auf dem Aufbau der Zellmembran. Um diesen unwirksam zu machen, müsste die Zelle durch eine zufällige Mutation den generellen Aufbau der Zellmembran ändern, was sehr unwahrscheinlich ist. Außerdem wirkt der antimikrobielle Effekt sehr schnell, so töten AMPs die Bakterienzellen teilweise schon nach wenigen Minuten, was die Resistenzbildung zusätzlich erschwert. Zusätzlich können AMPs immunmodulatorisch wirken. Hierbei wirken die AMPs nicht direkt auf die Mikroorganismen, wodurch eine Resistenzbildung gegen die AMPs sehr unwahrscheinlich ist. Außerdem wirken AMPs meisten mit mehr als nur einem Wirkungsmechanismus, was sie besonders effektiv macht und Resistenzbildungen zusätzlich erschwert. Zellen mit Resistenzstrategien gegen nur einen Wirkungsmechanismus des AMPs sind nicht vor der Tötung durch einen anderen Wirkungsmechanismus geschützt. Daher haben diese Zellen keinen evolutionären Vorteil, wodurch sich diese einzelne Resistenzstrategie nicht vermehrt verbreitet. Eine Zelle muss somit nahezu gleichzeitig mehrere Resistenzstrategien gegen alle Wirkungsmechanismen des AMPs aufweisen, um vor der Wirkung des AMPs geschützt zu sein. Deswegen gelten AMPs als vielversprechend, da sie ein geringes Potenzial für Resistenzentwicklung aufweisen. (Bechinger und Gorr 2017; Browne et al. 2020; Fry 2018)

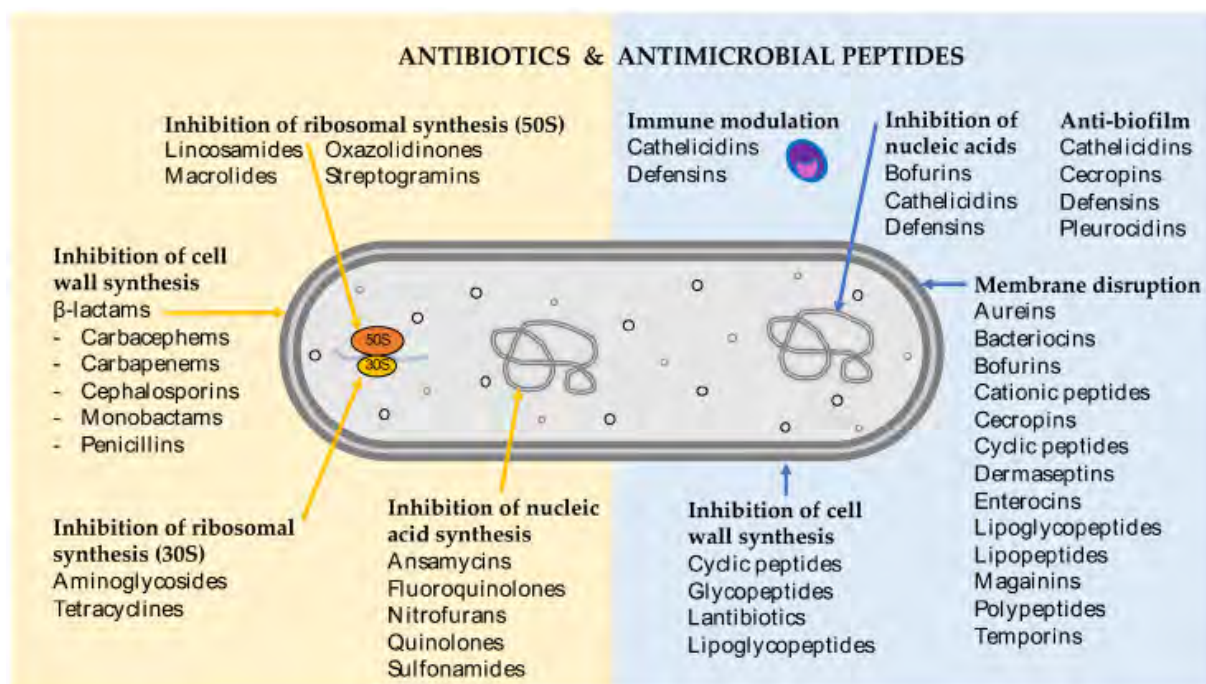


Abbildung 5: Ziele der Wirkungsmechanismen von traditionellen Antibiotika und AMPs. (Browne et al. 2020)

Die AMPs finden auch bereits in der Medizin Anwendung und es gibt zusätzlich noch einige AMPs in klinischen Studien. Dennoch wird der Großteil als topische Medikamente eingesetzt, also für die lokale äußere Anwendung. Eine systemische Anwendung der AMPs gestaltet sich

oft schwierig, da AMPs oftmals zytotoxisch (meist hämolytisch) auf eukaryotische Zellen wirken. Außerdem verfügen sie über eine geringe orale Verfügbarkeit, wodurch diese Anwendungsform entfällt. Die AMPs verfügen über eine sehr geringe Halbwertszeit, da sie schnell durch Leber und Nieren aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Außerdem sind sie sehr anfällig gegenüber Proteasen. Durch chemische Modifikationen der AMPs lassen sich manche dieser Nachteile verringern. So können D-Aminosäuren ins AMP eingebaut werden, um die Anfälligkeit gegenüber Proteasen zu verringern. Dadurch ist aber eine Produktion in Mikroorganismen nicht mehr möglich, da diese nur AMPs mit L-Aminosäuren produzieren können. Chemische Veränderungen der AMPs beeinflussen ggf. den Wirkmechanismus der AMPs, was vorher nur bedingt absehbar ist. (Mahlapuu et al. 2020; Lei et al. 2019)

3.2.5 NK-2

Die Amöbaporen sind Peptide bestehend aus 77 Aminosäuren, wovon drei Isoformen im Protozoen *Entamoeba histolitica* vorkommen. Diese weisen eine zytotoxische und antibakterielle Aktivität auf. Diese Aktivität geht auf die dritte Helix der Sekundärstruktur dieser Peptide zurück. NK-Lysin gleicht von der Struktur und Funktionalität den Amöbaporen. Diese verfügt aber über nahezu keine hämolytische Wirkung. NK-Lysin ist ein Peptid, welches aus dem Darmgewebe von Schweinen isoliert worden ist. Es umfasst 78 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von fast 9 kDA auf. Es ist ein Effektormolekül für zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Es übernimmt eine wichtige Rolle im Immunsystemen von unterschiedlichen Tieren und hat auch eine immunmodulatorische Wirkung. Die Kernstruktur des NK-Lysin, welches äquivalent zu der dritten Helix der Amöbaporen ist, wurde auf ihre Eignung als therapeutisches AMP untersucht. Dabei ist es sowohl wegen seiner antimikrobiellen als auch seiner antitumoralen Wirkung von Interesse. Dazu wurden zwei Peptide untersucht. NK1 bestand aus den Aminosäuren 40 bis 63 und NK2 bestand aus den Aminosäuren 39 bis 65. Lokal wurden einzelne Aminosäuren ausgetauscht wodurch NK1 eine Nettoladung von +6 und NK2 eine von +10 besitzt (siehe Abbildung 6). (Andrä und Leippe 1999; Karmakar et al. 2017; Andersson et al. 1995; Tong et al. 2022)

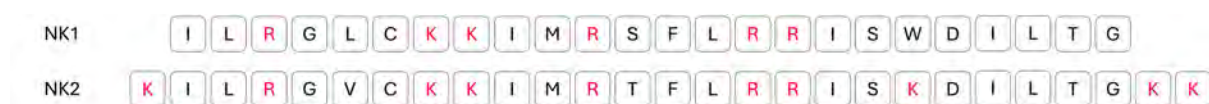


Abbildung 6: Aminosäuresequenz der NK-lysin Derivate NK1 (40-63) und NK2 (39-65), wobei die Aminosäuren, welche für die positive Nettoladung verantwortlich sind, rot markiert sind.

NK2 weist eine höhere antibakterielle Aktivität als NK1 auf, gleichzeitig ist die hämolytische Aktivität niedriger. Dadurch eignet sich NK2 besser als therapeutisches AMP. Das Derivat NK2

verfügt über eine starke candidazide Wirkung. Außerdem ist es wirksam gegen gram positive und gram negative Bakterien, ohne dabei toxisch für menschliche Hautzellen zu sein. NK2 gehört zu den kationischen AMPs mit α -helikaler Struktur (siehe Abbildung 7), welche es ausbildet, sobald es mit der Bakterienmembran in Verbindung kommt. (Andrä und Leippe 1999)

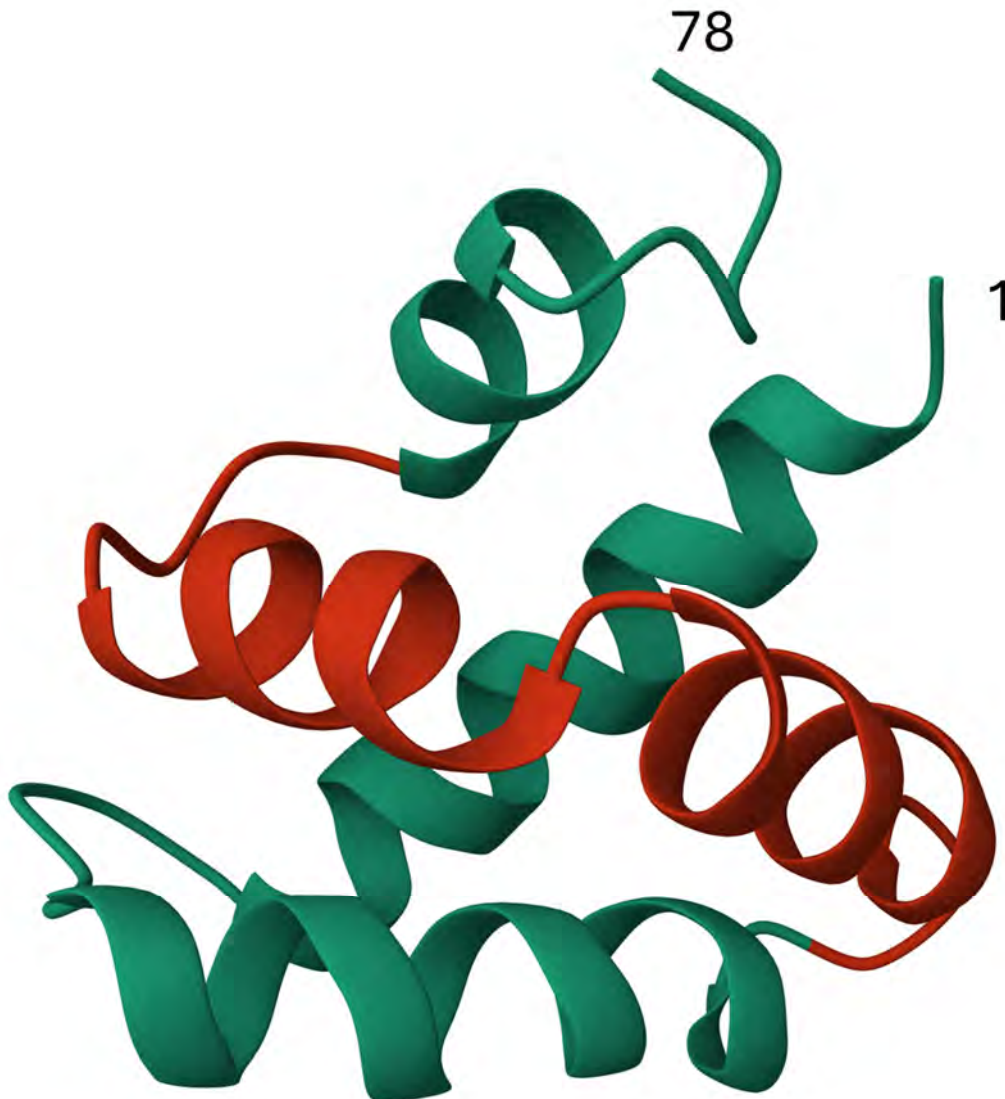


Abbildung 7: 3D Struktur des NK-lysins isoliert aus Schweinen. Rot markiert ist das Derivat NK2. (Bild aus der RCSB PDB (RCSB.org) von PDB ID 1NKL (Liepinsh et al. 1997))

3.2.6 Fusionsprotein ONC-DCless-H6 (P) NK2-ALK

Im Kampf gegen die multiresistenten Keime hat die WHO eine Liste von „priority pathogens“ veröffentlicht. Dies umfasst zwölf multiresistente Bakterienfamilien, welche eine hohe Bedrohung für die menschliche Gesundheit darstellen. Zusätzlich werden die Pathogene drei Prioritäten (kritisch, hoch und medium) zugeordnet. Alle drei Pathogene der ersten Gruppe, vier von den sechs Pathogenen der zweiten Gruppe und zwei der dritten Gruppe sind gram negativ. Somit sind neun von diesen zwölf Bakterien gram negativ, was die Notwendigkeit von effektiven antimikrobiellen Mittel gegen diese Art von Bakterien unterstreicht. (Browne et al. 2020)

Um die therapeutische Wirksamkeit des AMPs NK2 unteranderen gegenüber dieser Art von Bakterien zu verbessern, wurden weitreichende funktionelle und strukturelle Untersuchungen an den Peptiden durchgeführt. Daraus resultierte das Peptid NK2-ALK (siehe Abbildung 8). Bei diesen Peptiden wurde ein Cystein (C) an Position 7, das Methionin (M) an Position 11 und die Asparaginsäure an Position 21 durch ein Alanin (A), ein Leucin (L) und ein Lysin (K) ausgetauscht. (Andrä et al. 2007)



Abbildung 8: Aminosäuresequenz der Peptide NK2 (oben) und NK2-ALK (unten). Die ausgetauschten Aminosäuren sind rot markiert.

Das Peptid NK2-ALK weist genau wie das Peptide NK2 eine hohe Aktivität gegenüber *E. coli* auf. Eine Expression in *E. coli* ist daher schwierig, da das Expressionspeptid dem Expressionswirt schadet. Weisen Peptide eine toxische Wirkung gegenüber dem Wirt auf oder sind diese Peptide anfällig gegenüber Proteasen, lassen sich Peptide mit einem Trägerprotein fusionieren. Das Trägerprotein schützt das Peptid vor Proteasen und neutralisiert die toxische Wirkung des Peptids. Außerdem kann das Peptid durch diese Fusion ggf. leichter gereinigt werden. Dafür muss das Peptid nach der Reinigung vom Trägerprotein getrennt werden, was üblicherweise einen Engpass darstellen kann. Meistens macht das Peptid nur einen kleinen Teil des Fusionskonstrukts aus, wodurch die Ausbeute des Peptides sinkt. Die denaturierte Form der Onconase eignet sich als Fusionsprotein. Die Onconase ist eine RNAse von *Rana pipiens*. Sie kann in hohen Konzentrationen in Einschlusskörperchen in z.B. *E. coli*, sogenannten Inclusion Bodies (IB), exprimiert werden. Im Wachstumsmedium sind keine löslichen Onconase-Peptid Fusionsproteine nachweisbar, somit ist das toxische Risiko minimiert. Die Onconase ist mit 104 Aminosäuren klein, wodurch die Ausbeute des Peptides nach der Spaltung steigt. Außerdem ist die Löslichkeit der Onconase pH abhängig. Nur bei pH-Werten unterhalb von vier ist die denaturierte Form der Onconase löslich und lässt sich somit nach der Spaltung

vom Peptid gezielt ausfällen. Für das Fusionskonstrukt wurde die Onconase Mutante M23L verwendet. Zusätzlich wurden Aminosäuren an den Positionen 2, 16, 18, 20, 30, 32, 48, 67, 68, 75, 87 und 90 ausgetauscht. Zwischen der Linker Sequenz GTGDP und der Onconase wurde ein Hexahistidin-Tag eingebaut, wodurch ungewollte Peptidspaltprodukte minimiert werden und dadurch die Reinheit des Peptides erhöht wird. Die Linker Sequenz GTGDP lässt sich zwischen der Asparaginsäure (D) und dem Prolin (P) mittels Ameisensäure spalten (siehe Abbildung 9). An dem C-Terminus des NK2-ALK Peptides wurde noch ein Hexahistidin-Tag eingefügt. Dies erleichtert die Aufreinigung des Fusionsproteins durch die Verwendung der Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie. (Pane et al. 2016)

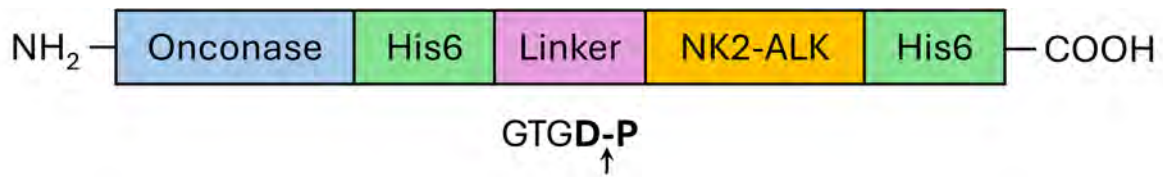


Abbildung 9: Aufbau des ONC-DCless_H6 (P) NK-2 ALK Fusionskonstrukts. Die Onconase wurde mittels der Linker Sequenz GTGDP an das Peptid gebunden. Dadurch lässt sich das Peptid mittels Säurespaltung von der Onconase trennen.

3.3 Design of Experiment

Das Konzept des Design of Experiment (DOE) ist im Deutschen auch als statistische Versuchsplanung bekannt. Dieses Konzept geht auf den Statistiker Sir Ronald Fisher zurück, welcher dieses Konzept in den 1920-iger Jahre entwickelte und in der Agrikultur anwendete. Während der 1950-iger Jahre fand das Konzept Einzug in die chemische Prozessentwicklung. Bei diesem Konzept finden statistische Analysen bereits während der Planungsphase der Forschung Anwendung, anstatt nur in der finalen Phase der Experimente. Verschieden Ingenieure, wie Walter A. Shewhart, William E. Deming und Joseph M. Juran, griffen die Arbeit von Sir Ronald Fisher auf und erweiterten diese. Joseph M. Juran begründete den Term des Quality by Design, ein Konzept, welches Teil des pharmazeutischen Sektors wurde. Dieser ist prozessbasiert und qualitätsorientiert, daher ist es verwunderlich, dass die Integration dieser Konzepte durch die Regulierungsbehörden (EMA, FDA) erst Anfang der 2000 Jahre begonnen hat. Der Ansatz des Quality by Design ist Teil der Qualitätsrichtlinien des internationalen Rates für die Harmonisierung der technischen Anforderungen an Humanarzneimittel (ICH). In der achten Qualitätsrichtlinie steht wörtlich „[...] quality cannot be tested into products; i.e, quality should be build in by Design“ (ICH 2005). DOE, als einer der wichtigsten mathematischen Modellierungsmethoden findet dadurch auch immer öfters Anwendung. Dies spiegelt sich auch in den Veröffentlichungen von pharmazeutischen Publikationen wider. Im Jahre 1978 gab es nur zwei Veröffentlichungen mit den Schlüsselwörtern Design of Experiment und *pharmaceutical*. Im Jahre 2000 waren dies schon 29 und im Jahre 2016 schon mehr als 800. Dennoch dauert die Integration von DOE in den pharmazeutischen Sektor im Vergleich zu anderen Sektoren lange, obwohl DOE viele Vorteile gegenüber der vorherigen Arbeitsweise aufweist. (N Politis et al. 2017; Ranga et al. 2014; Gujral et al. 2018)

Vor der Verwendung des DOE als Konzept wurde der Ein-Faktor Ansatz (engl. One Faktor at a Time) verwendet. Bei diesem Ansatz wird lediglich ein Faktor je Experiment verändert und die restlichen Faktoren werden konstant gehalten. So wird das Optimum dieses einen Faktors ermittelt. Danach wird, ausgehend von diesem Optimum ein anderer Faktor variiert und erneut das Optimum ermittelt. Dieser Ansatz ist sehr ressourcenintensiv und liefert wenig Informationen pro Experiment. Außerdem entspricht das gefundene Optimum aller Parameter nicht verlässlich dem tatsächlichen Optimum, da das Ergebnis des Ansatzes stark vom Ausgangspunkt abhängt. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt. (Cao et al. 2018; N Politis et al. 2017)

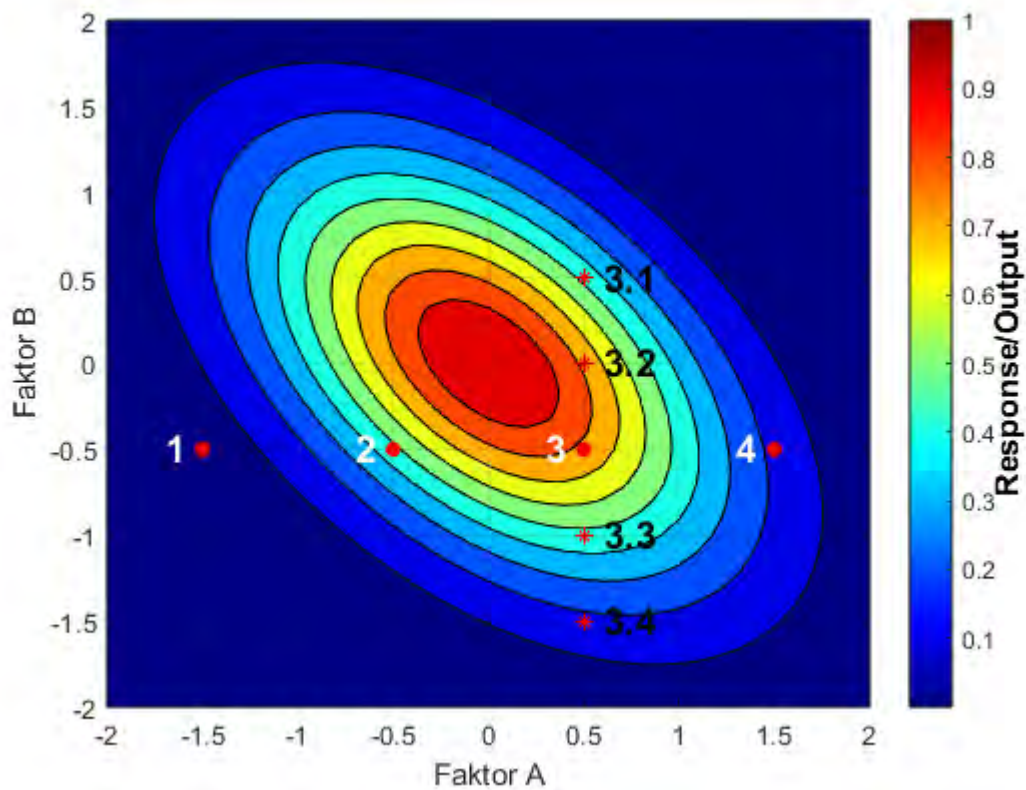


Abbildung 10: Konturdiagramm des Ein-Faktor Ansatzes. Auf der x-Achse sind die Einstellung des Faktors A dargestellt. Auf der y-Achse sind die Einstellungen des Faktors B dargestellt. Die Farbe stellt den Wert des Outputes/ der Response dar. Die Bedeutung der entsprechenden Farben ist auf der rechten Seite des Konturdiagrammes dargestellt.

In diesem Beispiel wird der Output des Prozesses durch zwei Faktoren beeinflusst. In der ersten Versuchsreihe wird der optimale Wert des Faktors A gesucht. Dazu wird der Faktor B konstant bei -0,5 gehalten und vom Faktor A werden vier verschiedene Variationen getestet. Die Parametereinstellungen von Faktor A gleich 0,5 und Faktor B gleich -0,5 liefern den besten Output des Prozesses für diese Versuchsreihe. In der zweiten Versuchsreihe wird Faktor A konstant bei 0,5 gehalten und Faktor B wird nun variiert. Hier liefern die Einstellungen Faktor A gleich 0,5 und Faktor B gleich -0,5 oder 0 die besten Ergebnisse. Somit wären dies die optimalen Einstellungen. Das Konturdiagramm zeigt ein Optimum um die Einstellungen Faktor A gleich 0 und Faktor B gleich 0. Somit weichen die Ergebnisse des Ein-Faktor Ansatzes von dem tatsächlichen Optimum ab. Wird erst die zweite Versuchsreihe bei gleichen Einstellungen durchgeführt, ist das Ergebnis ebenfalls ein anderes. Dieses Beispiel verdeutlicht die Abhängigkeit des Ein-Faktor Ansatzes von dem Ausgangspunkt. Durch die Verwendung von DOE lässt sich ein ebensolches Konturdiagramm erstellen. Dadurch ist es möglich mit minimalen Ressourceneinsatz maximale Informationen zu erhalten. Mit der Verwendung von DOE ist es möglich die Interaktion von Faktoren untereinander und deren Einfluss auf das Ergebnis des

Prozesses zu identifizieren. Dadurch lassen sich die größten Einflussfaktoren finden. (N Politis et al. 2017)

3.3.1 Anwendungsgebiete von DOE

DOE findet in unterschiedlichsten Untersuchungsgebieten Anwendung. Eine Auswahl von häufigen Anwendungsgebieten ist in Abbildung 11 aufgeführt, wobei die Anwendungsgebiete Screening, Modellierung, Optimierung und Robustes Design häufig kombiniert werden.

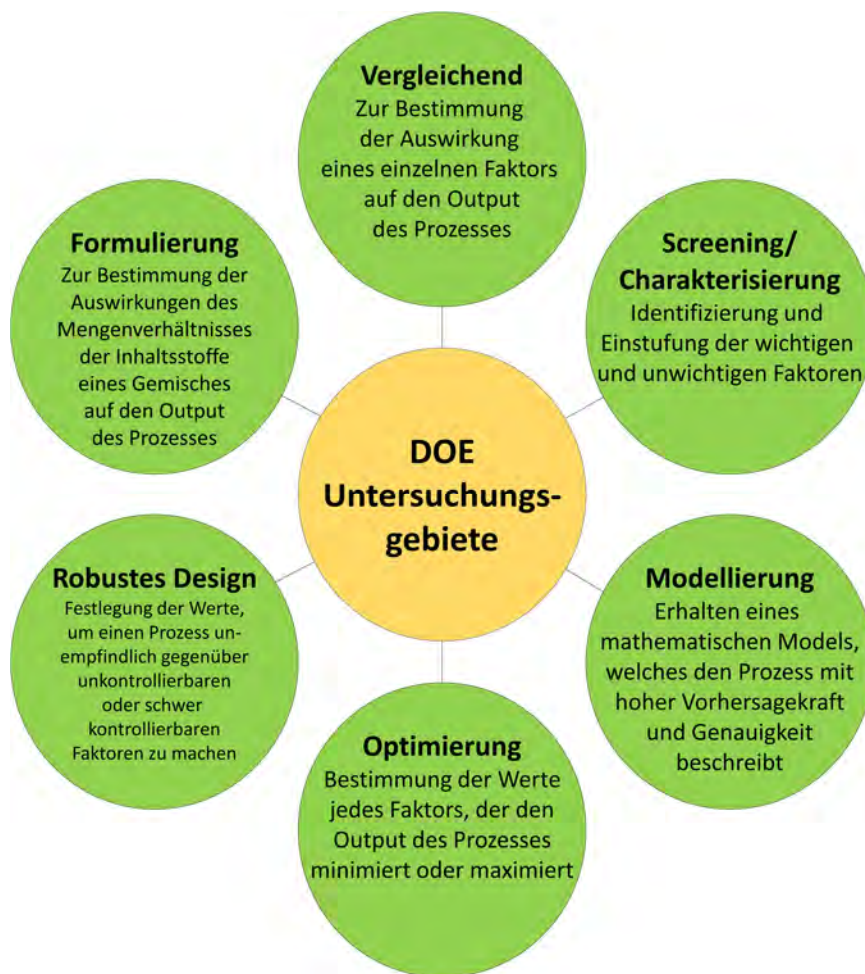


Abbildung 11: DoE Untersuchungsgebiete und deren Zielsetzung (Aus dem Englischen nach Román-Ramírez und Marco 2022)

Eine DOE-Strategie beginnt oftmals mit dem Screening. Ein Prozess wird durch die unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst, welche somit potenziell Einfluss auf das Ergebnis des Prozesses nehmen. Hierbei wird zwischen kontrollierbaren und unkontrollierbaren Einflussfaktoren unterschieden. Generell gilt die Annahme des Pareto Prinzipes, welches auch als 80:20 Prinzip bekannt ist. Demnach sind 20 % der Faktoren für 80 % des Ergebnisses verantwortlich. Das Screening dient dazu herauszufinden, welche Faktoren einen großen Einfluss darstellen

und inwiefern diese den Prozess beeinflussen. Diese Faktoren werden im Zuge des Optimierungsschrittes näher untersucht. (N Politis et al. 2017; Siebertz et al. 2017)

Beim Screening wurden die Faktoren innerhalb bestimmter Level untersucht, also z.B. innerhalb spezifischer Konzentrationsbereichen. Deren Einfluss auf das Ergebnis des Prozesses innerhalb dieser Grenzen ist daher bekannt. Entweder liegen die optimalen Einstellungen des Parameters bereits innerhalb der untersuchten Grenzen, dann wird der Bereich zwischen den Grenzen näher untersucht, oder die optimalen Einstellungen liegen nicht in dem untersuchten Bereich. Durch die Informationen aus dem Screening ist ersichtlich in welche Richtung der Untersuchungsbereich dann verschoben werden muss, um die optimalen Einstellungen zu finden. Somit muss erst einmal der Bereich gefunden werden, in welchem sich die optimalen Einstellungen befinden, bevor dieser Bereich näher untersucht werden kann. Sowohl das Screening als auch das Optimieren werden von Modellierungssoftwares unterstützt, sodass ein Modell erstellt werden kann, welches den Prozess beschreibt. Dadurch wird das Optimieren des Prozesses bezogen auf das Ergebnis, aber auch auf die Robustheit, vereinfacht. Dieses Modell sollte verifiziert werden, indem theoretische Berechnungen des Modells mit praktischen Ergebnissen des Prozesses verglichen werden. Neben den kontrollierbaren Faktoren gibt es unkontrollierbare und schwer kontrollierbare Faktoren. Diese können ebenfalls das Ergebnis des Prozesses beeinflussen. Dies resultiert in einer Variabilität innerhalb verschiedener Durchläufe des Prozesses. Diese Variabilität sollte möglichst gering ausfallen. Daher wird oftmals nach einer Optimierung des Prozessergebnisses, die Robustheit des Prozesses untersucht und verbessert. (Román-Ramírez und Marco 2022; Ranga et al. 2014; N Politis et al. 2017)

Unabhängig vom Anwendungsgebiet des DOEs oder des Schrittes innerhalb einer DOE-Strategie folgt ein DOE einem immergleichen methodischen Ablauf.

1. Festlegung der Zielsetzung des DOE

Beim DOE ist es wichtig, klare Ziele zu definieren. Diese könnten sein: herausfinden, welche Faktoren wichtig sind (Screening), den Prozess zu verbessern (Optimierung) oder die Stabilität eines Prozesses bei teilweise feststehenden Faktoren zu erhöhen (Robustheit erhöhen). (Weissman und Anderson 2015)

2. Festlegung von zu untersuchenden Faktoren und deren Untersuchungsbereich

Ein Prozess wird von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst, deren Berücksichtigung mit Ressourcenkosten verbunden ist. Daher muss festgelegt werden welche Faktoren und in welchen Bereichen diese untersucht werden. Außerdem muss bestimmt werden, wie viele unterschiedliche Level pro Faktor untersucht werden sollen.

Häufig wird ein zweistufiges Design gewählt, wobei es eine hohe und eine niedrige Einstellung jedes Faktors gibt. (Weissman und Anderson 2015)

3. Festlegung der Response (Output)

Als Response oder Output wird der messbare Ausgang bzw. das messbare Resultat des Prozesses bezeichnet. Dies kann sehr unterschiedlich sein. Einerseits kann es eine Produktausbeute sein, andererseits kann es die Reinheit des Produktes sein. Es können auch mehrere Outputs für einen Prozess bestimmt werden. (Weissman und Anderson 2015)

4. Auswahl des Versuch Designs

Es gibt unterschiedliche Versuch Designs. Die Auswahl ist abhängig von der Anzahl der Faktoren, dem Ziel des DOE, den Ressourcen und weiteren Faktoren. Vier Standarddesigns werden im Kapitel 3.3.2 näher beschrieben. (Weissman und Anderson 2015; Gujral et al. 2018)

5. Durchführung der Experimente

Gemäß des ausgewählten Versuchsdesigns ergeben sich Experimente mit verschiedenen Einstellungen für die zu untersuchenden Faktoren. Diese werden durchgeführt, um Ergebnisse für die folgende Auswertung zu erhalten. (Ranga et al. 2014)

6. Dateneingabe/ Softwareanalyse:

Die Ergebnisse der Experimente wird in eine entsprechende Software (z.B. Modde®) geladen und gemäß einem ausgewählten mathematischen Modell ausgewertet. (Weissman und Anderson 2015)

7. Zusammenfassung/ Nächste Schritte

Die Ergebnisse der Software werden zusammengefasst und verifiziert. Hierzu werden mithilfe des Modells Ergebnisse für spezifische Einstellungen von Faktoren berechnet. Die berechneten Ergebnisse werden mit praktischen Ergebnissen des Prozesses, bei diesen spezifischen Einstellungen, verglichen. Gemäß dem Ziel des DOE und den erhaltenen Ergebnissen wird das weitere Vorgehen geplant. (Weissman und Anderson 2015)

3.3.2 Versuchsdesigns

Es gibt die unterschiedlichsten Typen von Designs. Die Auswahl hängt stark von der Anzahl und der Art der Input Faktoren ab und von dem Ziel des DOE. Die Faktoren lassen sich in kontinuierliche, kategorische und gemischte Variablen unterteilen. Kontinuierliche Variablen haben einen numerischen Wert und lassen sich quantitativ messen. Zu diesem Variablentyp gehören z.B. Temperatur und Konzentrationen. Das Level von kategorischen Variablen lässt

sich benennen, aber nicht quantitativ messen, z.B. die Verwendung von unterschiedlichen Organismen. Binäre Variablen gehören zu dieser Kategorie. Bei gemischten Variablen können einzelne Variablen nicht unabhängig voneinander verändert werden, da spezifische Mischverhältnisse berücksichtigt werden müssen. Je nach Anzahl und Art dieser Variablen bieten sich gewisse Typen von Designs an wohingegen andere Designs nicht anwendbar sind. Im Folgenden wird der vollfaktorieller Versuchsplan (engl. Full Factorial Design), der teilfaktorieller Versuchsplan (engl. Fractional Factorial Design), der Plackett-Burman Versuchsplan und das Central-Composite Design vorgestellt. (Gujral et al. 2018)

3.3.2.1 Vollfaktorieller Versuchsplan

Das vollfaktorielle Design ist ein weit verbreitetes Design für Screeningziele. In diesem Design lassen sich mehrere Level pro Faktor untersuchen, dennoch werden oftmals lediglich zwei Level pro Faktor untersucht. Dieses Design ist leicht anzuwenden und liefert effizient Informationen über die Faktoren. Es gibt nicht nur Aufschluss inwiefern die einzelnen Faktoren das Ergebnis des Prozesses beeinflussen, sondern auch über Interaktionen zwischen den Faktoren. Bei der gängigen zwei Level Ausführung werden für jeden Faktor ein oberes (+1) und ein unteres Niveau (-1) festgelegt. In der Versuchsausführung werden dann alle Kombinationen dieser Niveaus aller Faktoren getestet. Die Anzahl der Experimente (N) dieses Designs ist abhängig von der Anzahl der Faktoren (k) und der Anzahl der Niveaus pro Faktor (L). Dargestellt in Formel 1. (Gujral et al. 2018)

Formel 1: Anzahl an Experimente beim vollfaktoriellen Design

$$N = L^k \quad (1)$$

Tabelle 1 zeigt ein vollfaktorielles Versuchsdesign mit drei Faktoren (A, B, C), welche jeweils ein hohes und ein niedriges Level haben.

Tabelle 1: Vollfaktorieller Versuchsplan für drei Faktoren mit jeweils zwei Level (Angelehnt an Gujral et al. 2018)

| Experiment | Faktor | | |
|------------|--------|---|---|
| | A | B | C |
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

Bei einem solchen Design ergibt sich als 3D Struktur ein Würfel, wobei jedes Experiment einen Eckpunkt des Würfels darstellt (siehe Abbildung 12). Der innere Bereich des Würfels stellt den Untersuchungsbereich dar. Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu erfassen, werden dem Versuchsplan noch Zentralpunktexperimente hinzugefügt. Bei diesen sind die Einstellungen der Faktoren genau mittig zwischen den oberen und unteren Level. Der Zentralpunkt liegt somit bei (0,0,0). (Tye 2004)

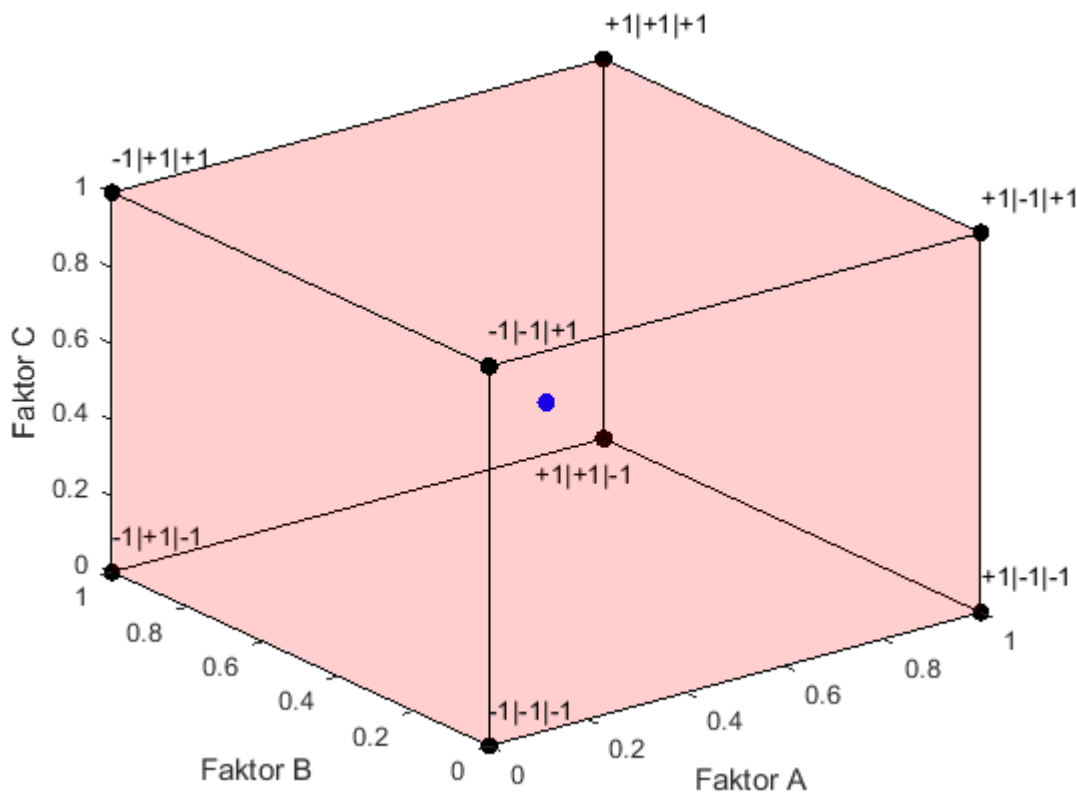


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines vollfaktoriellen Designs mit drei Faktoren und jeweils zwei Levels. Schwarz: Eckpunkte des DOE. Blau: Zentralpunkt des DOE

Bei diesem Versuchsaufbau ergeben sich mindestens acht Experimente. Bei zunehmender Anzahl an Faktoren steigt diese Anzahl und somit die benötigten Ressourcen stark an. Dieses Design findet daher hauptsächlich Anwendung, solange maximal neun Faktoren gleichzeitig untersucht werden. Sollen mehr Faktoren gleichzeitig untersucht werden, ohne dabei auf Information bezüglich der Interaktion von Faktoren untereinander zu verzichten, ist der teilfaktorielle Versuchsplan empfehlenswert. (Gujral et al. 2018)

3.3.2.2 Teilfaktorieller Versuchsplan

Das teilfaktorielle Design ähnelt sehr dem vollfaktoriellen Design. Vergleichbar wie beim vollfaktoriellen Versuchsplan werden für alle Faktoren ein hohes und ein niedriges Level festgelegt. Dadurch ergibt sich ein ähnlicher Versuchsplan wie beim vollfaktoriellen Design. Im Gegensatz zum vollfaktoriellen Design werden nicht alle Experimente durchgeführt (siehe Abbildung 13), wodurch sich die Anzahl der Experimente deutlich verringern lässt (siehe Formel 2).

Formel 2: Anzahl an Experimente beim teilfaktoriellen Design

$$N = L^{k-p} \quad (2)$$

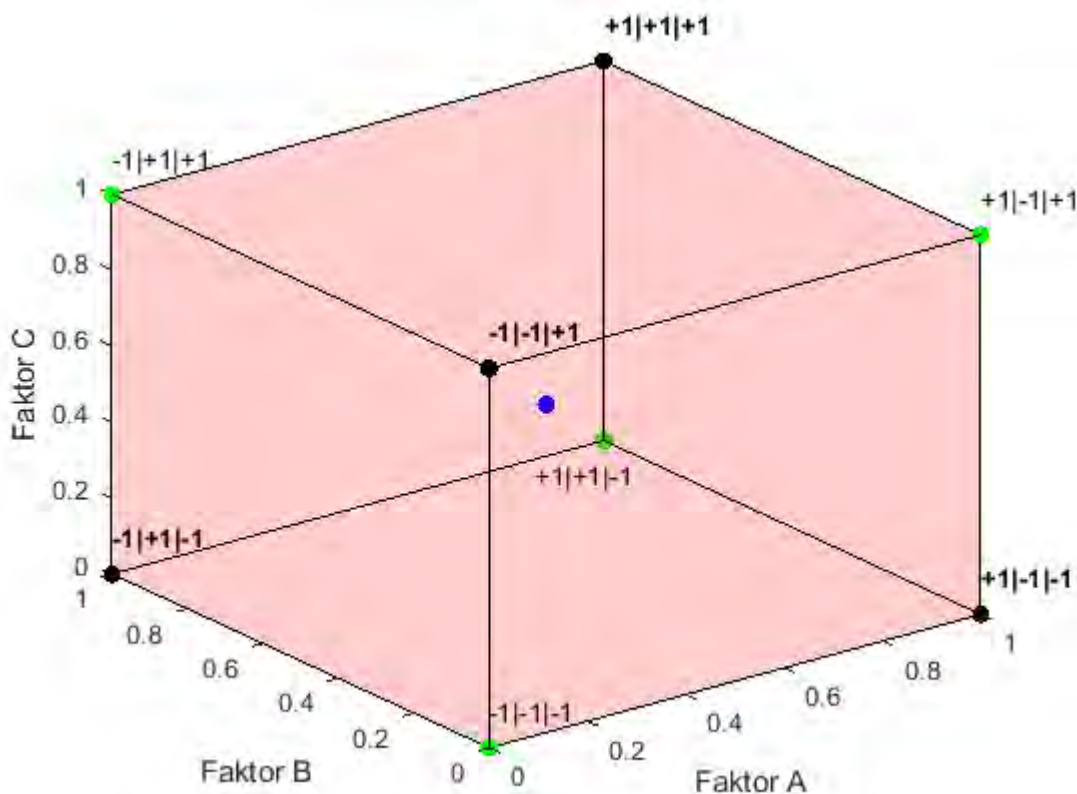


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines teilfaktoriellen Designs mit drei Faktoren und jeweils zwei Levels. Schwarz: Durchzuführende Experimente. Blau: Zentralpunkt des DOE. Grün: nicht durchzuführende Experimente

Dadurch lassen sich mehr Faktoren mit weniger Experimenten untersuchen, dennoch tritt der Confounding Effekt auf. Bei diesem lassen sich die Effekte eines Faktors nicht unabhängig von einem anderen Faktor untersuchen. Dies geschieht durch die Reduzierung der Experimente, deswegen muss dieses mit Bedacht getan werden. Wie gut das spezifische teilfaktorielle Design Confounding verhindert, spiegelt sich in der Auflösung wider. Diese wird von den Auswertungsprogrammen wiedergegeben und ist in Tabelle 2 angegeben (Siebertz et al. 2017)

Tabelle 2: Auflösung von Versuchsplänen (Siebertz et al. 2017).

| Auflösung | Eigenschaften |
|-----------|---|
| III | Haupteffekte sind mit Zweifachwechselwirkungen vermengt. Das Feld ist dicht besetzt und nur zum Screening geeignet. |
| IV | Haupteffekte sind mit Dreifachwechselwirkungen vermengt und Zweifachwechselwirkungen untereinander. Das Feld ist geeignet, um Haupteffekte sicher zu bestimmen, Zweifachwechselwirkungen lassen sich jedoch nicht eindeutig zuordnen. |
| V | Haupteffekte sind mit Vierfachwechselwirkungen vermengt und Dreifachwechselwirkungen mit Zweifachwechselwirkungen. Ein derartiges Feld kann ohne Schwierigkeiten das lineare Beschreibungsmodell versorgen. |
| V+ | Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen sind praktisch unvermengt. Im Vergleich zur Auflösungsstufe V ist jedoch kein großer Genauigkeitsgewinn zu erwarten. |

3.3.2.3 Plackett-Burman Versuchsplan

Mit dem Plackett-Burman Versuchsplan lassen sich weit mehr Faktoren gleichzeitig untersuchen mit weit weniger Aufwand als beim teilfaktoriellen Design. So lassen sich elf Faktoren mit nur zwölf Versuchen untersuchen. Generell werden nur ein bis vier Experimente mehr benötigt als die Anzahl an zu untersuchenden Faktoren, was diesen Ansatz sehr wirtschaftlich macht. Dennoch lassen sich dadurch nur die Hauptfaktoren identifizieren. Aussagen über Effekte untereinander sind nahezu unmöglich aufgrund des stark ausgeprägten Confounding Effektes in diesem Design. (Gujral et al. 2018)

3.3.2.4 Central-Composite Design

Die bisherigen Designs waren hauptsächlich dazu geeignet ein Screening von vielen unterschiedlichen Faktoren durchzuführen. Das Central-Composite Design hat unterschiedliche Varianten, welche hauptsächlich Anwendung im Optimierungsprozess finden, da es in der Lage ist komplexere Modelle abzubilden. Diesem Design liegt ein Vollfaktor bzw. Teilfaktor Design zugrunde. Zusätzlich zu den daraus resultierenden Eckpunkten werden bei diesem Design axiale Punkte (Star Points) hinzugefügt, um das Verhalten des Prozesses zwischen den Eckpunkten besser abschätzen zu können. Dadurch ergeben sich pro Faktor mindestens drei Level. Beim Faced Central-Composite Design wird ein weiteres Experiment zwischen zwei Eckpunkten hinzugefügt (siehe Abbildung 14). Beim Circumscribed Central-Composite Design befinden sich diese Punkte außerhalb des bisherigen

Untersuchungsbereiches (siehe Abbildung 15). Beim Inscribed Central-Composite Design befinden sich die axialen Punkte zwischen den Ecken. Die bisherigen Eckpunkte befinden sich nun innerhalb des bisherigen Untersuchungsbereichs (siehe Abbildung 16). (Gujral et al. 2018)

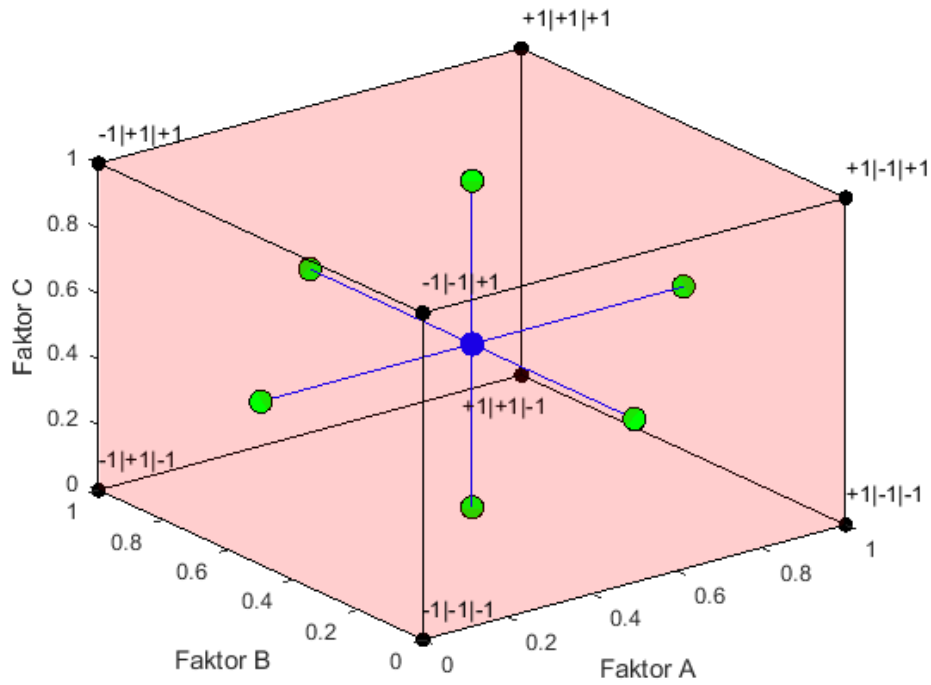


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Faced Central-Composite Designs. Schwarz: Eckpunkte des zugrundeliegenden Vollfaktor Designs. Blau: Zentralpunkt des Designs. Grün: Star Points

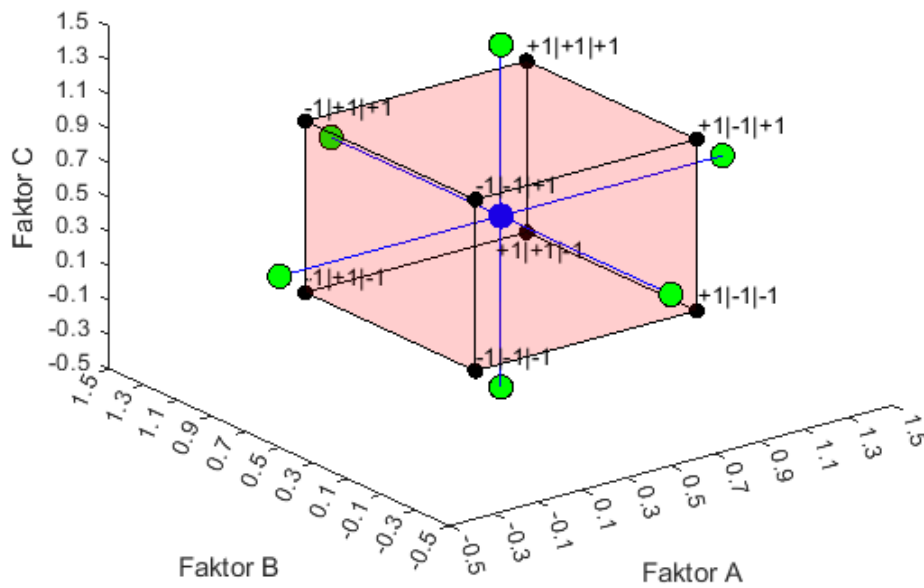


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Circumscribed Central-Composite Designs. Schwarz: Eckpunkte des zugrundeliegenden Vollfaktor Designs. Blau: Zentralpunkt des Designs. Grün: Star Points

| | |
|---|--|
| <p>Faced Central Composite Design</p> | |
| <p>Circumscribed Central Composite Design</p> | |
| <p>Inscribed Central Composite Design</p> | |

Abbildung 16: Die unterschiedlichen Typen vom Central Composite Design (Angelehnt an Gujral et al. 2018)

3.3.3 Screeningparameter

Die Produktion von rekombinanten Proteinen und Peptiden ist ein komplexer Prozess, welcher von den unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst werden kann. So kann die Mediumzusammensetzung, der pH-Wert, die Temperatur (besonders die post Induktion Temperatur), die Rührerdrehgeschwindigkeit, die Begasungsrate, die Induzerkonzentration, der Zeitpunkt und die Dauer der Induktion Einfluss auf die Produktproduktion haben. Neben den genannten Parametern gibt es noch weit mehr mögliche Faktoren. Gerade bei der Zusammensetzung des Mediums gibt es viele mögliche Ansätze, wobei insbesondere die Konzentration von Salzen und Hefeextrakt oftmals einen positiven Effekt aufgezeigt haben. Bei Proteinen ist die Faltung ein wichtiger Faktor, welche wiederum an das Zellwachstum gekoppelt sein kann. Gerade bei der Verwendung von *E. coli* als Expressionsstamm ist die Bildung von IBs ein Faktor, welcher ebenfalls berücksichtigt werden sollte. Die Einflüsse dieser Faktoren im Vorfeld abzusehen ist schwer, weshalb sich ein Screening dieser Parameter anbietet. (Tripathi 2016; Papaneophytou und Kontopidis 2014; Cardoso et al. 2020)

Für die Induktion der Zellen wurde IPTG verwendet, welches einen großen Einfluss auf die Produktivität haben kann, da es selbst toxisch für die Zellen ist. Konzentrationen kleiner als 1 mM haben keinen Einfluss auf die Wachstumsrate oder die maximale Zellkonzentration (Papaneophytou und Kontopidis 2014). Neben dieser biologischen Komponente ist die IPTG-Konzentration auch aus wirtschaftlicher Sicht relevant. So ist dieses im Verhältnis zu vielen anderen Medium Komponenten teuer (Cardoso et al. 2020). Eine Reduzierung der verwendeten Menge von IPTG ist daher Großmaßstab ein nicht zu vernachlässigender Kostenfaktor (Papaneophytou und Kontopidis 2014). Da eine Konzentration von IPTG bis 1 mM die Zellen scheinbar nicht negativ beeinflusst und dies die „Standard“ Konzentration im molekularbiologischen Kontext ist, wurde diese Konzentration als obere Grenze gewählt (Larentis et al. 2014a). In Vorversuchen in der Arbeitsgruppe konnte kein Leakage des Plasmides festgestellt werden, weswegen eine Konzentration von 0 mM IPTG nicht sinnvoll wäre. Orientierend an Larentis et al. 2014a wurde 0,1 mM IPTG als untere Grenze gewählt. Silaban et al. 2018 hatten ihre obere Grenze um diese Konzentration gewählt, diese wollten die Bildung von IBs vermeiden, welche im Zuge dieser Masterarbeit aber durchaus gewollt sind. Beide Publikationen dienten nur als grobe Orientierung um einen anfänglichen Startpunkt des Screenings festzulegen, da die Gegebenheiten innerhalb der Publikation abweichend von den Gegebenheiten innerhalb dieser Masterarbeit sind.

Neben der IPTG-Konzentration stellten die Hefeextrakt und die Pepton Konzentration weitere Screeningfaktoren dar. Während der Produktion wird den Zellen weiterhin Medium zugepumpt, somit könnte der Hefeextrakt und das Pepton über dieses Medium zugegeben werden. Dadurch könnte eine konstante Versorgung über die gesamte Produktionszeit gewährleistet werden, dennoch ist dies sowohl in der Entwicklung als auch in der Umsetzung ressourcenintensiver und somit eher Teil der Optimierung, sofern Hefeextrakt und Pepton einen nennenswerten Einfluss auf die Produktionsrate des Peptides haben sollten. Da die Zellen vor der Produktion transferiert werden, ist es möglich sowohl Hefeextrakt als auch Pepton vorzulegen. Noguère et al. 2012 untersuchten den Einfluss von Kulturmedien, Expressionstemperaturen, *E. coli* Stämmen und Fusionstags auf die Löslichkeit und Expression von rekombinanten Proteinen. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden das Terrific Broth Medium als Vorlage für die Screeningparameter Hefeextrakt und Pepton Konzentration gewählt (Lessard 2013).

4 Methoden

4.1 Zelllinie

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* BL21 DH10B™ T1R Stamm verwendet. Dieser verfügt über das Plasmid pET30a ONC-DCless-H6 (P) NK-2 ALK, deren Vektorkarte in Abbildung 17 dargestellt ist. Der Ursprung der Plasmid Replikation befindet sich zentral im oberen Bereich zwischen dem „T7 terminator“ und dem „f1 ori“. Rechts davon befindet sich das KanR Gen, welches für eine Kanamycin Resistenz sorgt. Im weiteren Verlauf befindet sich das „LacI“ Gen, welches den *LacI* Repressor kodiert. Der *LacI* Repressor verhindert die Expression des Fusionsproteins ONC-DCless-H6 (P) NK2-ALK, da dieser an den *lac* operator bindet. Dadurch wird eine Expression ohne Induktion (Leakage) verhindert. IPTG sorgt für eine Konformationsänderung der Repressorproteine, sodass diese nicht mehr an den *lac* operator binden können. Der Promotor P_{lac5UV} wird durch das IPTG induziert, wodurch die T7 RNA-Polymerase exprimiert wird. Diese bindet wiederum an den T7 Promotor auf dem Plasmid, wodurch das Fusionsprotein exprimiert werden kann. (Lewis 2005)



Abbildung 17: Vektorkarte des Plasmids pET30a ONC-Dcless-H6 (P) NK-2 ALK

4.2 Medien und Puffer

Tabelle 3: Stammlösungen verwendet für Vorkultur-, Batch- und Feedmedium

| Stammlösung | Chemikalie | Konzentration (g/L) |
|-------------------------------|---|---------------------|
| Glucose Stammlösung | Glucose Monohydrat | 695 |
| MgSO ₄ Stammlösung | MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 240 |
| Spurenlösung | Ammoniumiron(III)citrate | 6,42 |
| | CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,25 |
| | MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 2,2 |
| | CuCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,15 |
| | H ₃ BO ₃ | 0,3 |
| | Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0,25 |
| | Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O | 0,8 |
| | EDTA | 0,84 |

In Tabelle 4 ist das Rezept für das verwendete Vorkultur- und Batchmedium dargestellt. Bei beiden Medien wurden vor dem Autoklavieren ein pH-Wert von 7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden die Stammlösungen hinzugegeben. Dadurch ergibt sich eine Glucosekonzentration von 5 g L⁻¹ für das Vorkulturmedium und 20 g L⁻¹ für das Batchmedium.

Tabelle 4: Rezept des Vorkultur- (V) und Batchmediums (B), pH = 7

| Chemikalie | Konzentration |
|--|---|
| KH ₂ PO ₄ | 13,3 g L ⁻¹ |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 4 g L ⁻¹ |
| Zitronensäure | 1,7 g L ⁻¹ |
| Spurenlösung | 10 mL L ⁻¹ |
| Glucose Stammlösung | 7,915 ^V / 31,658 ^B mL L ⁻¹ |
| MgSO ₄ Stammlösung | 2,4 mL L ⁻¹ |

In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung des Feedmediums, welches bei der Fed-Batch Phase verwendet wurde, dargestellt. Die Spurenlösung und die MgSO₄ Stammlösung wurde nach dem Autoklavieren hinzugegeben. Das Feedmedium hat eine Glucosekonzentration von 700 g L⁻¹.

Tabelle 5: Feedmedium

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------------|-----------------------|
| Glucose Monohydrat | 770 g L ⁻¹ |
| Spurenlösung | 10 mL L ⁻¹ |
| MgSO ₄ Stammlösung | 40 mL L ⁻¹ |

Tabelle 6 zeigt die Konzentration der Kanamycin Stammlösung, welche bei der Vorkultur verwendet worden ist.

Tabelle 6: Kanamycin Stammlösung, verwendet in der Vorkultur, sterilfiltriert

| Chemikalie | Konzentration |
|-----------------|------------------------|
| Kanamycinsulfat | 30 mg mL ⁻¹ |

Gemäß der Screeningparameter wurden unterschiedliche Mengen an Pepton und Hefeextrakt mittels Stammlösungen hinzugegeben. Die Konzentration der Pepton Stammlösung ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die Konzentration der Hefeextrakt Stammlösung ist in Tabelle 8 dargestellt. Aufgrund der hohen Charge zu Charge Varianz von Pepton und Hefeextrakt sind zusätzlich die verwendeten Chargen aufgeführt, welche über den Verlauf der Experimente nicht verändert worden sind. (Tachibana et al. 2019)

Tabelle 7: Peptone Stammlösung

| Chemikalie | Konzentration | Hersteller | Charge |
|------------|-----------------------|------------|-----------|
| Peptone | 300 g L ⁻¹ | Roth | 293339976 |

Tabelle 8: Hefeextrakt Stammlösung

| Chemikalie | Konzentration | Hersteller | Charge |
|-------------|-----------------------|------------|-----------|
| Hefeextrakt | 200 g L ⁻¹ | Roth | 293340547 |

Um bei den Screeningversuchen in den 1 L Reaktoren identische Verdünnungseffekte zu erhalten, obwohl unterschiedliche Volumina an Peptone und Hefeextrakt Stammlösungen verwendet worden sind, wurden drei unterschiedliche Vorlagepuffer angesetzt. Deren Zusammensetzungen sind in Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Diese wurden so verwendet, dass in den 90 mL, welche beim Transfer der Zellen bereits im 1 L Reaktor vorlagen,

die gleichen Konzentrationen an Puffersalzen vorherrschen. Der Phosphatpuffer (siehe Tabelle 12) wurde zum Verdünnen der Zellen verwendet, wo dies nötig war. Der Tris-Puffer (siehe Tabelle 13) wurde bei der Probenvorbereitung verwendet (siehe Kapitel 4.8.1).

Tabelle 9: Zusammensetzung des 90 mL Vorlagepuffers, pH = 7

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------------|-------------------------|
| KH_2PO_4 | $13,3 \text{ g L}^{-1}$ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 4 g L^{-1} |
| Zitronensäure | $1,7 \text{ g L}^{-1}$ |

Tabelle 10: Zusammensetzung des 60 mL Vorlagepuffers, pH = 7

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------------|--------------------------|
| KH_2PO_4 | $19,95 \text{ g L}^{-1}$ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 6 g L^{-1} |
| Zitronensäure | $2,55 \text{ g L}^{-1}$ |

Tabelle 11: Zusammensetzung des 30 mL Vorlagepuffers, pH = 7

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------------|-------------------------|
| KH_2PO_4 | $39,9 \text{ g L}^{-1}$ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 12 g L^{-1} |
| Zitronensäure | $5,1 \text{ g L}^{-1}$ |

Tabelle 12: Phosphatpuffer, pH = 7

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------------|-------------------------|
| KH_2PO_4 | $13,3 \text{ g L}^{-1}$ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 4 g L^{-1} |

Tabelle 13: Tris-Puffer, pH = 7,4

| Chemikalie | Konzentration |
|------------|--------------------------|
| Tris | 20 mmol L^{-1} |

4.3 Vorkultur

Eine Kultivierung beginnt mit einer lag-Phase, in welcher kein Wachstum der Zellen zu detektieren ist. Der Grund für die lag-Phase sind einerseits tote Zellen, andererseits die Adaption der Zellen an die vorherrschenden Bedingungen. Um diese Lag-Phase im Fermenter möglichst gering zu halten und gleichzeitig die Kultivierung mit hauptsächlich aktiven Zellen zu starten, wird eine Vorkultur in Schüttelkolben angesetzt. (Pham et al. 1999)

Hierzu werden 420 mL des sterilen Vorkulturmediums in eine Schottflasche gefüllt, anschließend wird 714 μL der Kanamycin-Stammlösung hinzugegeben, um das Wachstum von Zellen ohne das Plasmid zu verhindern. Danach werden 950 μL der Kryokultur hinzugegeben. Der Inhalt der Flasche wird homogenisiert und im Anschluss werden jeweils 100 mL auf vier Schüttelkolben aufgeteilt. Diese werden für 19 h bei 28 °C und 180 min^{-1} inkubiert. Danach wird die optische Dichte (OD) aller Schüttelkolben gemessen. Außerdem werden die Schüttelkolben vermengt. Hiervon werden 300 mL aseptisch mit einer Transferflasche in den Bioreaktor transferiert. Von dem Inokulum wird ebenfalls die OD_{600} gemessen.

4.4 Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5

Für die Anzucht der Zellen wurde das Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5 von der Sartorius AG verwendet (siehe Abbildung 18). Dieser verfügt über ein Gesamtvolumen von 7.1 L und einem Arbeitsvolumen von ca. 5 L. Der Edelstahldeckel verfügt über Öffnungen für eine Levelsonde, eine pH-Sonde und eine Temperatursonde. Darüber hinaus verfügt der Deckel über ein Schauglas zur Beleuchtung des Innenraumes und ein Septum. Die Abgasstrecke ist mit einer Drucksonde, einer Hochschaumsonde und einem Sicherheitsventil ausgestattet. Zusätzlich befindet sich oberhalb des Abluffilters ein Manometer. Der Reaktor verfügt über eine doppelte Gleitringdichtung und zwei 6-blättrige Scheibenrührer. Die Begasung erfolgt durch einen Begasungsring im unteren Bereich des Bioreaktors. Unterhalb des Deckels befinden sich vier Anschlüsse mit Stäubli-Kupplung wodurch Säure, Base und Antischaum zu titriert werden. Dies erfolgt durch Peristaltikpumpen, welche durch die digitale Steuereinheit (DCU) gesteuert werden. Zusätzlich wird über den verbleibenden Anschluss das Feedmedium durch eine externe Pumpe zu gepumpt. Dieser Anschluss verfügt über ein Tauchrohr. In der Mitte des Reaktors befindet sich ein längliches Schaufenster. Im unteren Bereich ist der Reaktor mit fünf Anschlüssen ausgestattet. In einem ist ein Probenahmeventil verbaut. Die restlichen vier stehen für weitere Sonden zur Verfügung. In diesen Anschlüssen sind eine $p\text{O}_2$ Sonde, eine Fluoreszenzsonde und eine Trübungssonde eingebaut. Der letzte Anschluss ist durch einen Blindstopfen verschlossen. Am Boden des Reaktors befindet sich eine Erntevorrichtung. Der

Verbrauch an Säure, Base und Feedmedium wird durch Waagen gemessen. Das Reaktorvolumen wird ebenfalls durch eine Waage gemessen. Die Probenahme für die atline Analytik (siehe Kapitel 4.6) erfolgt über das Probenahmeventil, welches anschließend durch die Verbindung mit dem Dampferzeuger sterilisiert wird. Eine Übersicht der verwendeten Sonden befindet sich im Anhang (siehe 9.3.1/ Abbildung 91).

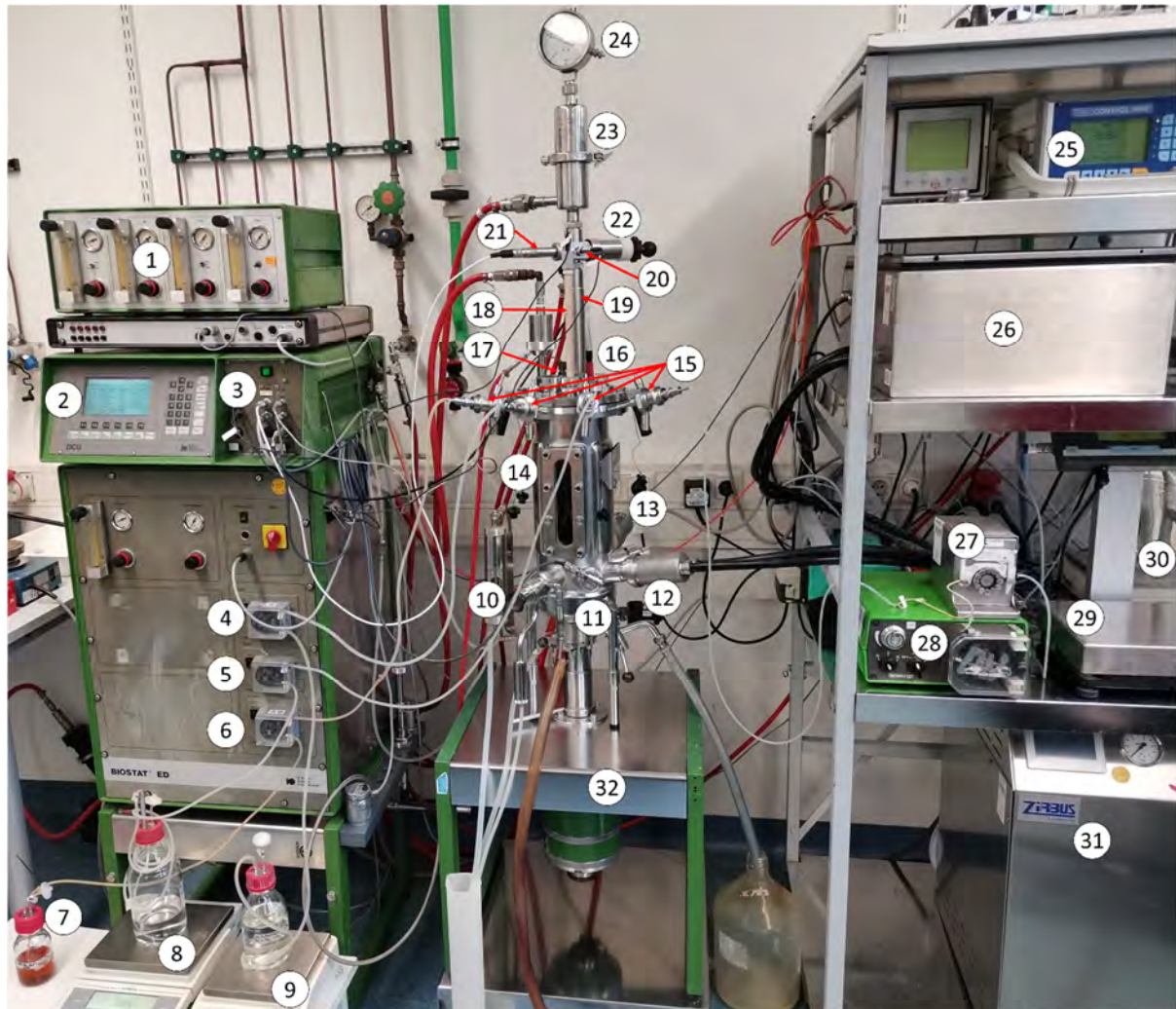


Abbildung 18: Bioreaktorsystem BIostat® ED5 mit dazugehöriger digitaler Steuereinheit (DCU), Pumpen und Zubehör. 1. Durchflussmesser, 2. DCU Display und Bedientasten, 3. Anschlüsse Sensoren, 4. Peristaltikpumpe für Säure, 5. Peristaltikpumpe für Base, 6. Peristaltikpumpe für Antischaummittel, 7. Behälter mit Anti Schaummittel, 8. Waage Base, 9. Waage Säure, 10. Probenahmeventil, 11. Gelöst Sauerstoffsonde (pO_2 Sonde), 12. Fluoreszenzsonde, 13. Trübungssonde, 14. Bioreaktor ED5, 15. Anschlüsse mit Stäubli-Kupplung (von links: Antischaum, Säure, Base, Feed), 16. pH Sonde, 17. Temperatursonde (pt100), 18. Levelsonde, 19. Abluftkühler, 20. Hochschaumsonde, 21. Drucksonde, 22. Sicherheitsventil, 23. Abluftfilter, 24. Manometer, 25. Trübungsmessanzeige, 26. Bioview® Fluoreszenzsonde und Fluoreszenzspektrometer, 27. Zufütterpumpe, 28. Erntepumpe, 29. Erntewaage, 30. Waage für das Zufütterreservoir, 31. Dampferzeuger, 32. Reaktorwaage

Die Überwachung und Datenerfassung des Bioprozesses erfolgte mit der Multi-Fermenter-Kontrollsystem (MFCS/win 3.0) Software der Firma Sartorius Stedim Systems. Diese Software wird in Kapitel 4.4.3 genauer beschrieben.

4.4.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen werden im ED5 angezüchtet. Hierfür werden eine Batch Phase und zwei Fed-Batch Phasen durchgeführt, um eine hohe Zelldichte zu erreichen. Der theoretische Verlauf ist in Abbildung 19 dargestellt.

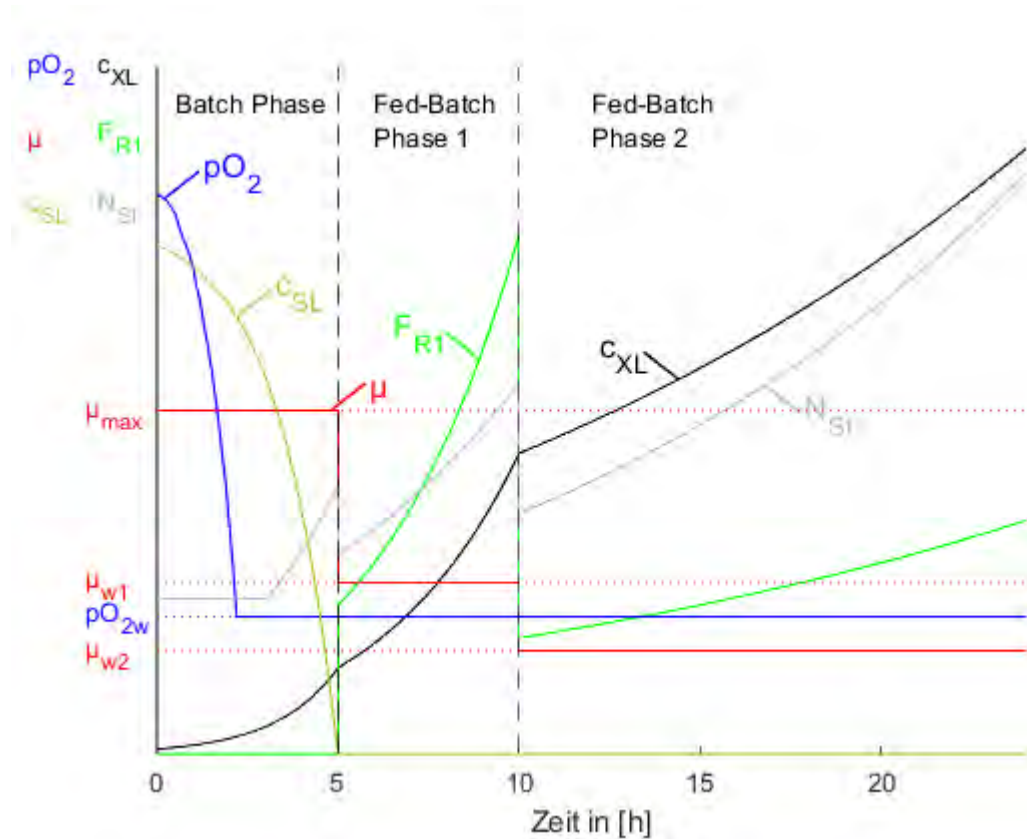


Abbildung 19: Theoretischer Verlauf der Kultivierung im ED5. Dargestellt sind der gelöste Sauerstoff (pO_2 /Blau), die Wachstumsrate (μ /Rot), die Substratkonzentration (c_{SL} /Olivgrün), die Zellkonzentration (c_{XL} /Schwarz), die Feedrate (F_{R1} /Grün) und die Rührerdrehgeschwindigkeit (N_{S1} /Grau).

Der Prozess im ED5 beginnt mit einer Batch Phase und einem Volumen von 3 L. Zum Beginn des Prozesses wird der pO_2 Wert nicht geregelt. Nach erstmaligem Erreichen von 20 % gelöstem Sauerstoff startet die pO_2 Regelung. Dies geschieht über das Erhöhen der Rührerdrehzahl (siehe Abbildung 20).

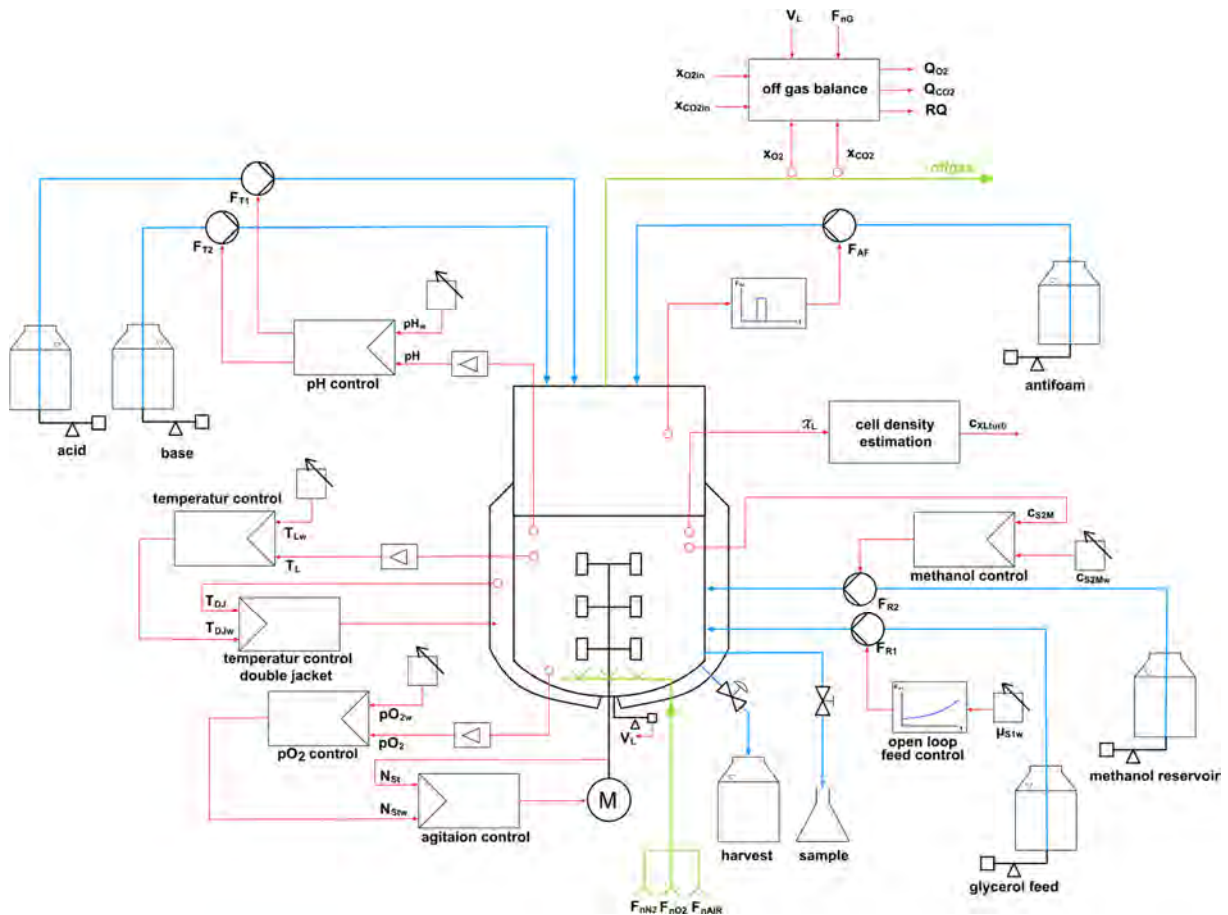


Abbildung 20: Vereinfachtes Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild und Steuerungsaufgaben des ED5

Die Batch wird mit 10 % v/v angeimpft. In dieser Phase wachsen die Zellen mit der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}). Dabei verstoffwechseln die Zellen das Substrat Glucose, wodurch die Substratkonzentration (c_{SL}) sinkt. Die Fed-Batch Phase wird nach 5 h, durch das Zupumpen von Glucose aus dem Reservoir, gestartet. Zu diesem Zeitpunkt ist das Substrat im Batchmedium noch nicht vollständig aufgebraucht. Durch eine festgelegte Länge der Batch Phasen ist der Prozess besser planbar, da die benötigte Zeit bis zum vollständigen Verbrauch des Substrates variieren kann. Die festgelegte Batchdauer darf nicht länger sein als die Zeit, welche die Zellen benötigen, um das Substrat aus dem Batchmedium vollends zu verstoffwechseln. Andernfalls leiden diese sonst unter dem Substratmangel. Um die maximale Länge der Batch Phase zu berechnen, wird die maximale Zellkonzentration (c_{XLmax}) benötigt.

Formel 3: Berechnung der maximalen Zellkonzentration

$$c_{XLmax} = c_{XL0} + Y_{X/S} \cdot c_{SL0} \quad (3)$$

Mit

| | | |
|-------------|--|------------|
| c_{XLmax} | Maximale Zellkonzentration in der Batch Phase | $g L^{-1}$ |
| c_{XL0} | Zellkonzentration zum Beginn der Batch Phase ($t = 0$) | $g L^{-1}$ |

| | | |
|-----------|--|-------------------|
| $y_{X/S}$ | Substratausbeutekoeffizient | g g^{-1} |
| c_{SLO} | Substratkonzentration zum Beginn der Batch Phase | g L^{-1} |

Daraus lässt sich der Zeitpunkt, zu dem das Substrat im Batchmedium vollends aufgebraucht ist, berechnen und damit die Dauer der tatsächlichen Batch Phase ($t_{Batchende}$) bestimmen.

Formel 4: Berechnung des Zeitpunktes des Batchendes

$$t_{Batchende} = \frac{\ln \frac{c_{XLmax}}{c_{XLO}}}{\mu_{max}} \quad (4)$$

Mit

| | | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|
| μ_{max} | Maximale Wachstumsrate der Zellen | h^{-1} |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|

Der Zeitpunkt des Starts des Zufütterns muss früher als $t_{Batchende}$ sein. Nach der Batch Phase beginnt die Fed-Batch Phase, in der die Zellen mit einer eingestellten Wachstumsrate wachsen. Dies geschieht über das exponentielle Zufütterprofil, welches durch ein MFCS-Tool berechnet wird. Diesem liegt folgende Formel zugrunde.

Formel 5: Berechnung der relativen Pumprate der Zufütterpumpe zum Zeitpunkt t_i

$$F_{R1relw}(t) = \frac{\mu_w(t_i) \cdot V_L(t_i) \cdot c_{XL}(t_i)}{y_{X/S}(t_i) \cdot c_{SR1}} \cdot \frac{100 \%}{F_{R1max}} \cdot e^{\mu_w(t_i) \cdot (t - t_i)} \quad (5)$$

Mit

| | | |
|--------------|---|-------------------|
| F_{R1relw} | Relative Zufütterraterate der Glucose aus dem Reservoir | % |
| μ_w | Sollwert der eingestellten Wachstumsrate | h^{-1} |
| t_i | Startzeitpunkt der Fed-Batch Phase | h |
| V_L | Volumen der Flüssigphase im Bioreaktor | L |
| c_{XL} | Zellkonzentration | g L^{-1} |
| c_{SR1} | Glucosekonzentration im Reservoir | g L^{-1} |
| F_{R1max} | Maximale Pumprate der Zufütterpumpe | L h^{-1} |

Nach 5 h beginnt die zweite Fed-Batch Phase, wobei die eingestellte Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ auf $0,15 \text{ h}^{-1}$ reduziert wurde. Diese dauert weitere 14 h an. Die Begasungsrate wird konstant bei 6 L min^{-1} gehalten, der Sauerstoffanteil des Gasmix wird automatisch erhöht, sofern dies notwendig ist, um den Sollwert von 20 % gelöst Sauerstoff zu erreichen. Anschließend werden die Zellen für den Transfer vorbereitet. Hierfür wird der Reaktor auf min. $17 \text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt, sodass die Zellen nahezu keinen Stoffwechsel mehr aufweisen. Gleichzeitig wird der Gasmix angepasst, wodurch der Sauerstoffanteil schrittweise reduziert wird. Dadurch

werden die Zellen vor dem Transfer nur noch mit 6 L min^{-1} Luft begast. Jeweils 660 g Zellsuspension werden dann vom ED5 in jeweils einen Qplus der Multifermentieranlage transferiert. Die Regelung des pH-Wertes wird ausgeschaltet, da die pH Sonde durch die Reduzierung des Volumens im Verlauf des Transfers die Flüssigphase nicht mehr erreicht. Die genauen Kultivierungsbedingungen der einzelnen Phasen der Kultivierung im ED5 sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Kultivierungsbedingungen der Kultivierung im ED5

| Parameter | Batch | Fed-Batch 1 | Fed-Batch 2 | Transfer | Einheit |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------|---------------------|
| ϑ_{LW} | 37 | 37 | 37 | 10 | $^{\circ}\text{C}$ |
| N_{Stw} | 400 | - | - | - | min^{-1} |
| pH_w | 7 | 7 | 7 | Off | - |
| F_{nGw} | 6 | 6 | 6 | 6 | L min^{-1} |
| F_{nAir} | 6 | 6/1 | 6/1 | 2/6 | L min^{-1} |
| F_{nO_2} | 0 | 0/5 | 0/5 | 4/0 | L min^{-1} |
| ρ_{O_2w} | 20 | 20 | 20 | 20 | % |
| μ | μ_{max} | 0,25 | 0,15 | 0,01 | h^{-1} |

4.4.2 Messtechnik

Der Bioreaktor verfügt sowohl über Inline als auch Online Messtechnik, welche in den Kultivierungen verwendet worden sind. Es gab Sonden für die Temperatur (ϑ), den pH-Wert, für den Schaum (Levelsonde), eine für den Hochschaum, für den relativen gelöst Sauerstoffgehalt (ρ_{O_2}), die Trübung und eine Fluoreszenzsonde. Außerdem befand sich in der Abluftstrecke eine Drucksonde, welche den Druck im Reaktor gemessen hat (siehe Tabelle 15). Dieser wurde unter Umgebungsdruckbedingungen betrieben. Dennoch stellte sich ein Überdruck von ca. 40 mbar ein. Das Begasungssystem war in der Lage, den Reaktor mit einer maximalen Begasungsrate von 10 L min^{-1} Luft und 5 L min^{-1} Sauerstoff zu begasen.

Tabelle 15: Prozessvariablen des Bioreaktors ED5, deren Messvariante und deren Messsystem

| Prozess Variable | Benennung | Messvariante | Messsystem |
|---------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| pH Wert | pH | Inline | Redoxelektrode |
| Temperatur | ϑ_L | Inline | Pt-100 |
| Druck | pG | Online | Piezoelektronische Membran |
| Rührerdrehgeschwindigkeit | N_{St} | Online | - |
| Volumen | V_L | Online | Waage |
| Level/ Hochschaum | - | Online | Konduktive Messung |
| gelöst Sauerstoff | pO_2 | Inline | Clark-Elektrode |
| Trübung | S_{turb} | Inline | Fotometrisch |

4.4.2.1 Kalibrierung der pH- und pO_2 -Sonden

Vor der Kultivierung wird der Reaktor zusammen mit dem Medium in-situ sterilisiert. Davor wird die pH Sonde kalibriert. Nach der Sterilisation wird das System bis zum Animpfen am nächsten Tag überwacht. Am folgenden Tag wird das Batch Medium durch die aseptische Zugabe der Stocklösungen komplementiert. Im Anschluss wird die pO_2 Sonde kalibriert. Die 100 % stellt eine Begasung mit Luft dar und die 0 % wird durch eine Begasung mit Stickstoff erreicht. Danach stellt das System durch das Hinzutritieren von 25%iger Ammoniaklösung und $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ Phosphorsäure einen pH-Wert von 7 ein. Im Anschluss wird eine Probe genommen und der pH-Wert wird extern gemessen. Bei einer Abweichung größer als das Totband von 0,05, wird die pH Sonde nachkalibriert. Dieser Vorgang wird bei der ersten Probe nach dem Animpfen wiederholt.

4.4.3 MFCS/win

Für die Steuerung, Regelung und Datenerfassung wurde die Software MFCS/win 3.0 der Firma Sartorius Stedim System verwendet. Diese verfügt über eine Prozesssteuerung gemäß der ANSI/ISA88, eine Richtlinie der internationalen Gemeinschaft für Automatisierung (isa.org 2024; Sartorius 2024). Mithilfe dieser Software lassen sich Rezepte für Fermentationen schreiben in denen Setpoints und Alarmer festgelegt werden können. Dadurch lässt sich die Batch zu Batch Variabilität verringern. Diese Software wurde sowohl für die Fermentation im ED5 als auch für die Fermentation in der Multifermentieranlage verwendet. Die verwendeten Rezepte für die Fermentation im ED5 und der Multifermentieranlage befinden sich im Anhang (siehe 9.6.1 und 9.6.2).

4.4.4 Trübungssonde

Die Zellkonzentration lässt sich über die OD messen. Diese Methode ist weit verbreitet, da sich diese Atline und Inline anwenden lässt. Die Messung beruht auf der Lichtstreuung der Zellen, daher kann nicht zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. (Beal et al. 2020)

Für die Inline Messung der Zelldichte im ED5 wurde die Trübungssonde ASD25-BT-N5 von der Firma Optek-Danulat GmbH (siehe Abbildung 21) verwendet. Das Messprinzip dieser Sonde beruht auf einer Einkanal-Lichtabsorption. Die Messung findet in einem Wellenbereich von 840-910 nm statt. Der Detektor ist eine Silizium-Photodiode. Die Sonde sendet ein Signal S_{turb} im Bereich 0-4 CU an MFSC. (Optek 2024)

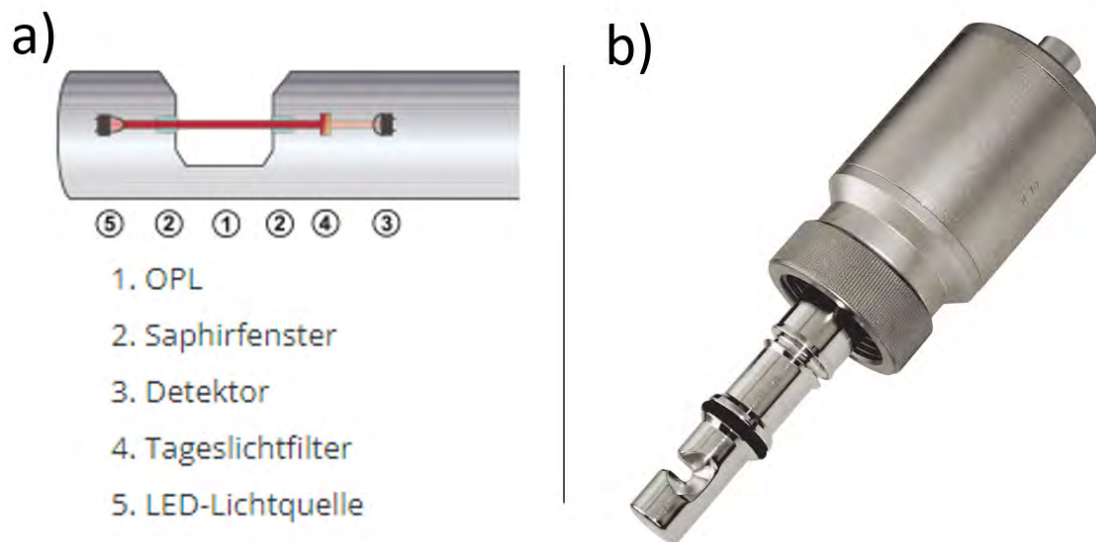


Abbildung 21: a) Aufbau der Trübungssonde b) Aussehen der Trübungssonde (Optek 2024)

Aus diesem Signal lässt sich eine Zelldichte abschätzen. Der Zusammenhang zwischen Zelldichte und dem Signal S_{turb} ist in Formel 6 dargestellt. (Cornelissen 2004)

Formel 6: Berechnung der Zellkonzentration aus dem Trübungssignal S_{turb}

$$c_{XLturb}(t) = K_{turb} \cdot e^{\alpha_{turb} \cdot S_{turb}} \cdot \left(\frac{N_{St}(t)}{N_{Stmax}} \right)^{\beta_{turb}} \quad (6)$$

Die Faktoren K_{turb} , α_{turb} und β_{turb} lassen sich unter Verwendung des Nelder-Mead Algorithmus aus den Rohdaten und der gemessenen Biotrockenmasse (BTM) ermitteln.

4.5 Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus

Die Multifermentieranlage wird von einer DCU IV gesteuert. Diese steuert zwei Versorgungseinheiten, welche jeweils drei 1L Bioreaktoren versorgen (Fricke 2011). In Abbildung 22 ist eine Seitenansicht der Multifermentieranlage zu sehen. Dargestellt sind dort die Screeningreaktoren Q1, Q2 und Q3. Die Reaktoren Q4, Q5 und Q6 befinden sich auf der anderen Seite der Anlage.

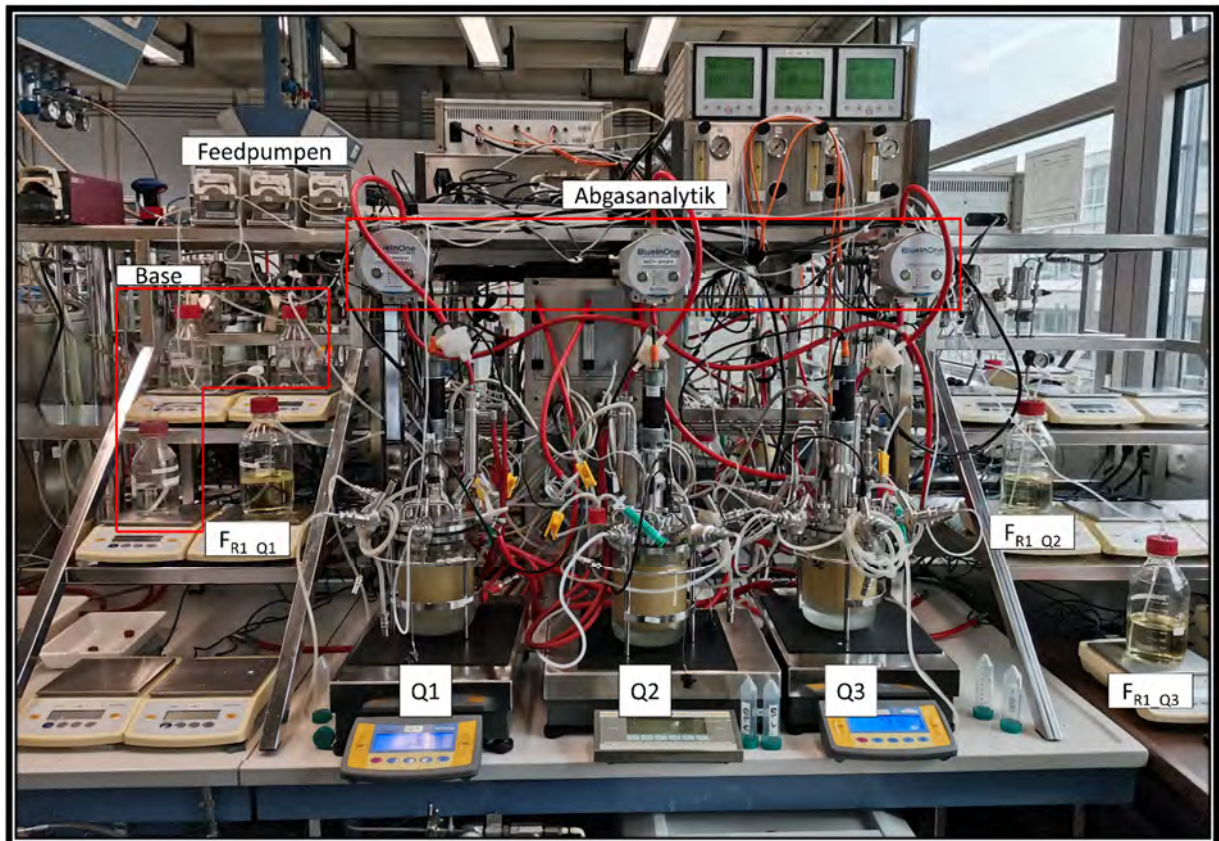


Abbildung 22: Seitenansicht der Multifermentieranlage. Dargestellt sind die Screeningreaktoren Q1, Q2 und Q3

Alle Reaktoren verfügen über die identische Prozessanalytiktechnologien (PAT). Die Daten lassen sich reaktorspezifisch speichern und die Reaktoren werden individuell durch die DCU bzw. MFCS gesteuert und geregelt. Dadurch ist es möglich unterschiedliche Bedingungen in den einzelnen Reaktoren einzustellen. (Fricke 2011)

Im Gegensatz zum ED5 befindet sich der Motor des Rührers am Deckel statt im Boden des Reaktors. Die Screeningreaktoren verfügen über eine Temperatursonde, eine pH Sonde, eine pO_2 Sonde, eine Levelsonde und eine Trübungssonde, welche sich alle am Deckel des Reaktors befinden. Genau wie der ED5 verfügen die Qplus Reaktoren über vier Stäubli-Kupplungen um Säure, Base und Antischaum hinzu titrieren zu können. Über den letzten Anschluss wird

Glucose zugefüttert. Die Proben für die Produktanalyse werden über ein Tauchrohr genommen. Die Induzierung mit IPTG geschieht über ein Septum im Deckel des Reaktors. Reaktor, Baseflasche und Glucosereservoir befinden sich auf Waagen. In Abbildung 23 ist der Reaktor Q5 dargestellt. Die anderen Reaktoren weisen einen gleichen Aufbau auf. Eine Übersicht über die spezifischen Sonden und die Probenentnahmevorrichtung befindet sich im Anhang (siehe Abbildung 92).

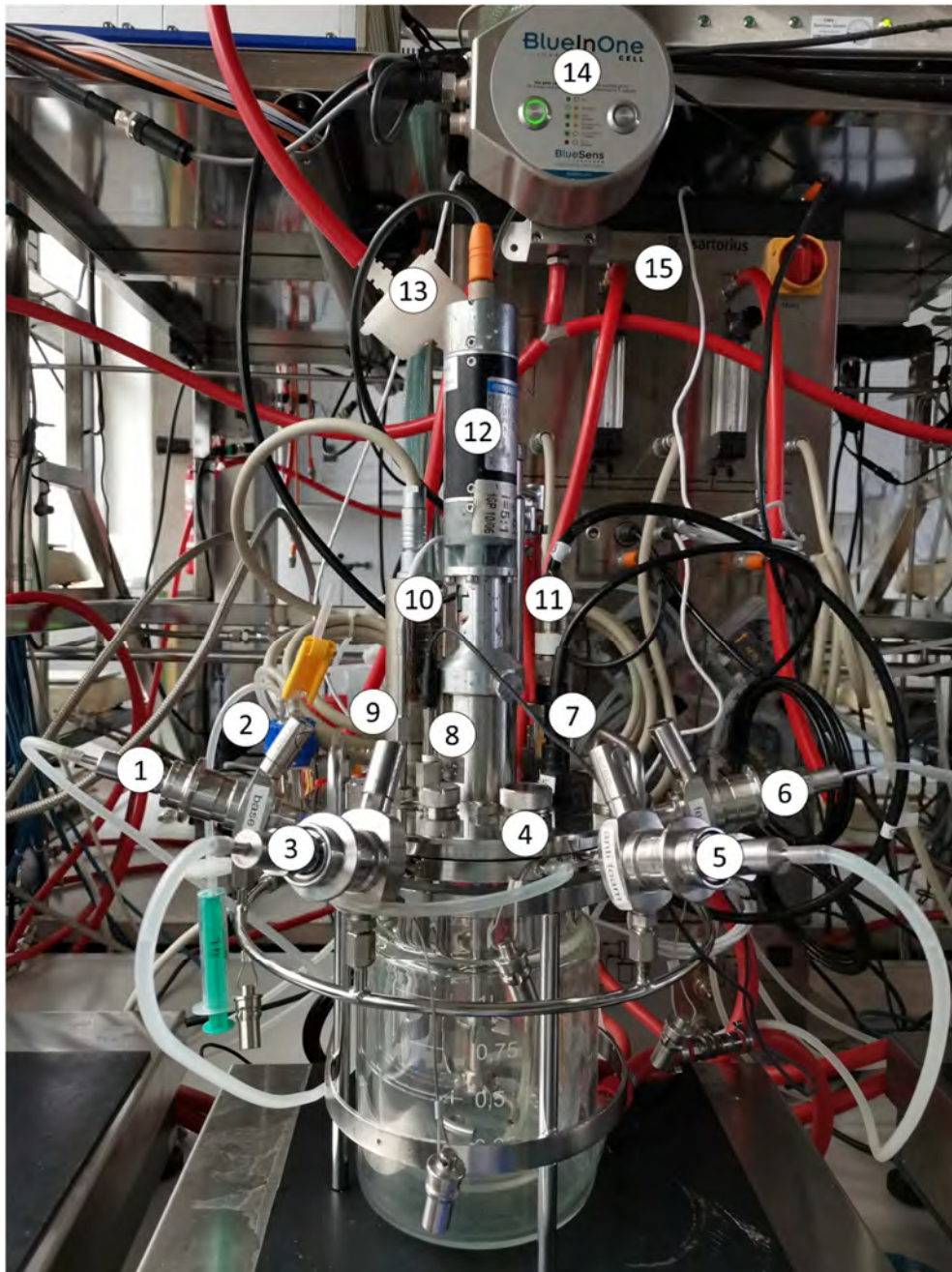


Abbildung 23: BIOSTAT® Qplus mit Sonden und Zubehör. 1. Anschluss Base, 2. Probenentnahmevorrichtung, 3. Anschluss Säure, 4. Septum, 5. Anschluss Antischaummittel, 6. Anschluss Feedmedium, 7. pH Sonde, 8. Levelsonde, 9. Temperatursonde (pt 100), 10. Trübungssonde, 11. Gelöst Sauerstoffsonde (pO₂ Sonde), 12. Motor Rührer, 13. Abluftfilter, 14. Abgassensor BlueInOne, 15. Versorgungseinheit B

4.5.1 Kultivierungsbedingungen

Nach der Anzucht der Zellen im ED5 werden diese jeweils in die einzelnen Qplus Reaktoren transferiert. In diesen befinden sich bereits insgesamt 90 mL Hefeextrakt Stammlösung, Pepton Stammlösung und/oder Vorlagemedium je nach Screeningexperiment. Dessen Planung wird in Kapitel 4.7 näher beschrieben. Zusammen mit den 660 g Zellsuspension ergibt sich ein Gewicht von 750 g. Abbildung 24 stellt ein vereinfachtes Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild der Qplus Reaktoren dar. Im Anhang ist ein ausführliches Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild der Reaktoren vorzufinden (siehe Abbildung 93).

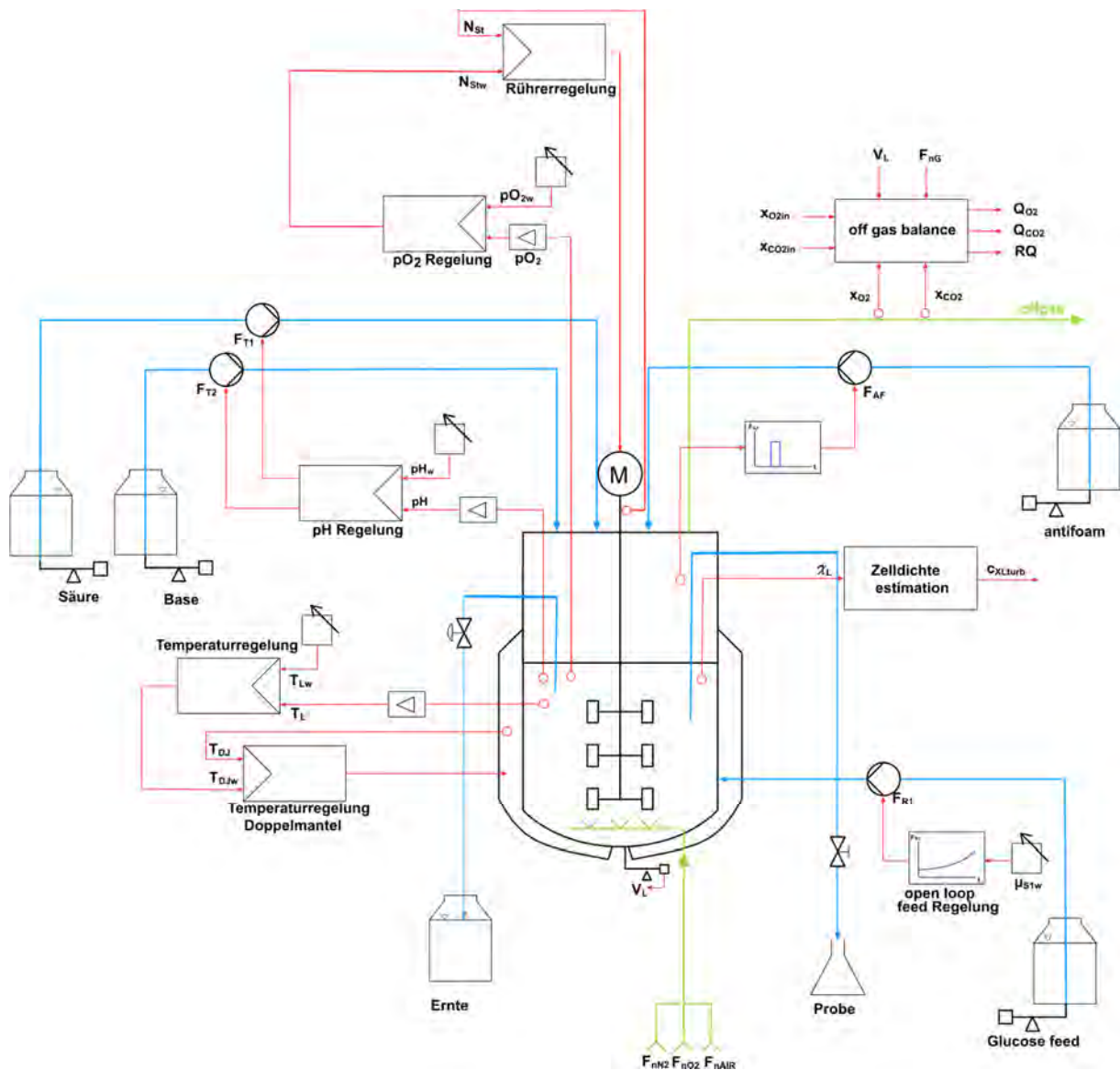


Abbildung 24: Vereinfachtes Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild und Steuerungsaufgaben der Qplus

Nach dem Transfer finden zwei weitere Phasen in den Qplus Reaktoren statt. Zuerst eine einstündige Fed-Batch Phase, gefolgt von einer dreistündigen Produktionsphase. Der theoretische Verlauf ist in Abbildung 25 dargestellt.

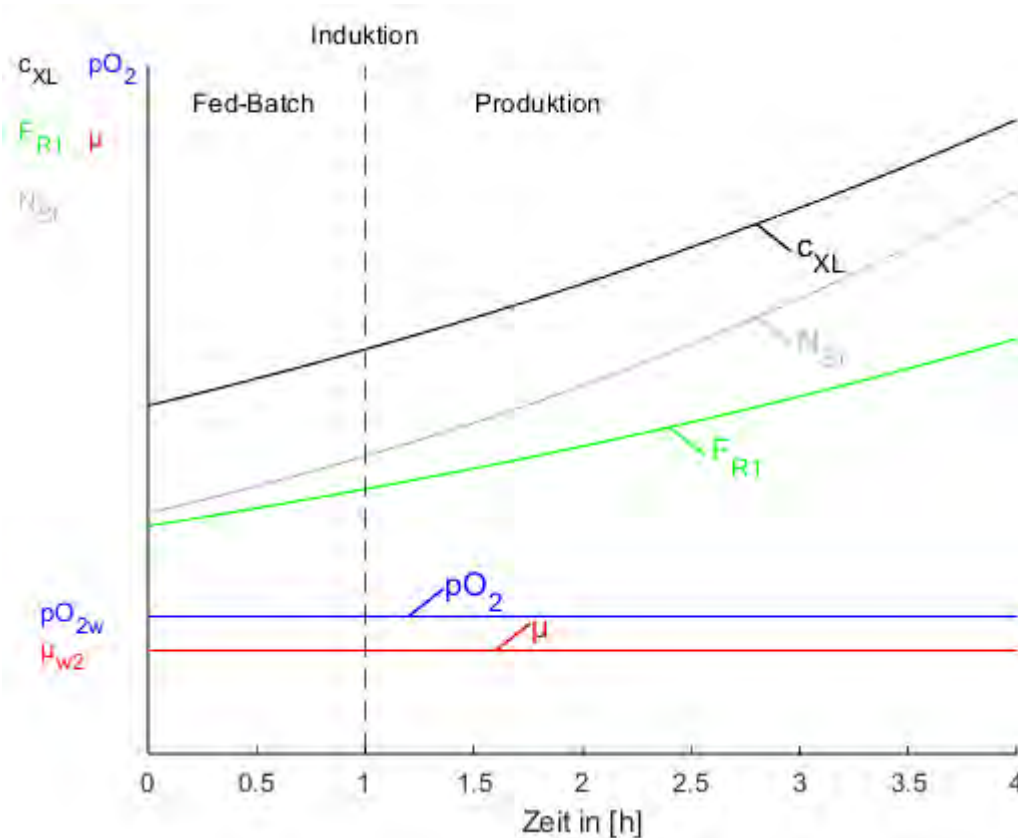


Abbildung 25: Theoretischer Verlauf der Kultivierung in den Qplus Reaktoren

In der Fed-Batch Phase werden die Zellen wieder auf 37 °C erwärmt, wodurch deren Stoffwechsel wieder aktiviert wird. Die Wachstumsrate ist für beide Phasen die gleiche und liegt bei $0,15 \text{ h}^{-1}$. Die Zufüterraterate wird ebenfalls gemäß der Formel 5 berechnet. Die Begasungsraterate beträgt 3 L min^{-1} mit $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Luft und $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Sauerstoff. Nach einer Stunde wird die Produktion durch die Zugabe von IPTG gestartet. Eine Übersicht der Kultivierungsbedingungen ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Kultivierungsbedingungen der Kultivierung in den Qplus Reaktoren.

| Parameter | Fed-Batch | Produktion | Einheit |
|------------------|-----------|------------|---------------------|
| ϑ_{LW} | 37 | 37 | °C |
| N_{Stw} | - | - | min ⁻¹ |
| pH _w | 7 | 7 | - |
| F_{nGw} | 3 | 3 | L min ⁻¹ |
| F_{nAir} | 1,5 | 1,5 | L min ⁻¹ |
| F_{nO_2} | 1,5 | 1,5 | L min ⁻¹ |
| p_{O_2w} | 20 | 20 | % |
| μ | 0,15 | 0,15 | h ⁻¹ |

4.5.2 Messtechnik

Wie auch der ED5 verfügen die Qplus Reaktoren über Inline und Online Messtechnik. Sie verfügen über Sonden für die Temperatur, den pH-Wert, für den Schaum, den relativen gelöst Sauerstoffgehalt und die Trübung. Die maximalen Begasungsraten der Reaktoren bezogen auf Luft und Sauerstoff variieren zwischen 1,5 und 3 L min⁻¹. Eine Übersicht über die Prozessvariablen und deren Messsysteme ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Prozessvariablen der Qplus Reaktoren, deren Messvariante und deren Messsystem

| Prozess Variable | Benennung | Messvariante | Messsystem |
|---------------------------|---------------|--------------|--------------------|
| pH Wert | pH | Inline | Redoxelektrode |
| Temperatur | ϑ_L | Inline | Pt-100 |
| Rührerdrehgeschwindigkeit | N_{St} | Online | - |
| Volumen | V_L | Online | Waage |
| Level | - | Online | Konduktive Messung |
| gelöst Sauerstoff | p_{O_2} | Inline | Clark-Elektrode |
| Trübung | S_{turb} | Inline | Fotometrisch |

4.5.3 Kalibrierung der pH- und pO₂-Sonden

Die Qplus Reaktoren werden in einem Autoklav sterilisiert. Um ein aseptisches Herauspumpen von Flüssigkeit zu vermeiden, werden diese leer sterilisiert. Somit würden sich die pH Sonde und die pO₂ Sonde nicht mehr in einer Flüssigkeit befinden. Um diese Sonden zu schützen, werden diese nicht mit den Reaktoren zusammen sterilisiert. Die pO₂ Sonden werden vorher

in den Reaktor eingebaut und in Wasser kalibriert. Anschließend werden die pO₂ Sonden aus den Reaktoren ausgebaut und die Öffnung mit einem Blindstopfen versiegelt. Die Flüssigkeit wird über den Ernteschlauch aus dem Reaktor entfernt. Die pH-Sonde wird ebenfalls ausgebaut und deren Öffnung mit einem Blindstopfen versehen. Danach wird der Reaktor sterilisiert. Unter der Sicherheitswerkbank werden die 90 mL Vorlage zusammengemischt. Diese Stammlösungen waren vorher autoklaviert. Danach wird die pO₂ Sonde unter der Sicherheitswerkbank eingebaut, welche vorher mit Ethanol desinfiziert worden ist. Diese Reaktoren werden an die PAT angeschlossen. Die pH Sonden werden extern kalibriert und kurz vor dem Transfer unter Verwendung von Ethanol eingebaut, sodass diese nicht austrocknen. Hierbei kann es zu Kontaminationen kommen. Diese sind aufgrund der hohen Zellzahl des Transfervolumens und der kurzen Kultivierungszeit zu vernachlässigen.

4.6 Analytische Methoden

Während der Kultivierung im ED5 werden stündliche Proben genommen. Dazu werden zweimal ca. 10 mL Proben genommen, wobei die ersten 10 mL verworfen werden. Die zweiten 10 mL werden für die Bestimmung der BTM und der OD verwendet. Bei den Qplus Reaktoren werden nach der Induktion und nach drei Stunden jeweils zwei Proben pro Reaktor gezogen, wobei auch hier die erste Probe verworfen wird. Diese Proben werden zur Bestimmung der BTM und OD verwendet. Das Hauptziel der Probennahme ist die Bestimmung der Produktkonzentration (siehe Kapitel 4.8).

4.6.1 Bestimmung Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der BTM werden jeweils zweimal ein Milliliter in eine Mikroreaktionsgefäß (Mrg) überführt. Dieses Mrg wird zuvor bei 105 °C über Nacht getrocknet und dann gewogen. Die Bestimmung der BTM wird als Doppelbestimmung durchgeführt. Nachdem die zwei Milliliter überführt worden sind, wird das Mrg bei 12470 xg für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird für spätere Analysen in ein weiteres Mrg überführt. Das Pellet wird bei 105 °C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet. Die BTM lässt sich berechnen indem von dem Gewicht Mrg (m_{tot}) das Leergewicht des Mrg (m_0) abgezogen und das Gewicht durch das Volumen der Probe (V_{sample} / hier 2 mL) geteilt wird (siehe Formel 7).

Formel 7: Berechnung der Biotrockenmasse

$$c_{XLBTM} = \frac{m_{tot} - m_0}{V_{sample}} \quad (7)$$

4.6.2 Bestimmung optische Dichte

Eine häufig verwendete Technik zu Bestimmung der Zellkonzentration in der Flüssigphase des Bioreaktors ist die Bestimmung der optischen Dichte. Dies kann sowohl Online (siehe Kapitel 4.4.4) als auch atline geschehen. Eine häufig verwendete Wellenlänge ist hierbei 600 nm. Das Messverfahren beruht dabei nicht auf direkte Absorption, sondern auf Lichtstreuung. Der lineare Zusammenhang zwischen Lichtstreuung und Zellzahl besteht nur in einem kleinen Bereich, weshalb ab einer OD von mehr als 0,6 die Probe verdünnt werden muss. (Beal et al. 2020)

Von der entnommenen Probe wird eine Doppelbestimmung (2x1 mL) durchgeführt. Die Probe wird so weit verdünnt, dass die OD unter dem Wert von 0,6 liegt. Von dem OD-Wert wird der OD-Wert des Mediums bzw. VE-Wasser (OD_{Blank}) abgezogen, sofern dies nicht automatisch vom Fotometer durchgeführt wird. Um die OD der Probe zu erhalten wird der Mittelwert der errechneten OD-Werte (ΔOD) mit dem Verdünnungsfaktor (F) multipliziert. Die Berechnungen sind in Formel 8 und Formel 9 angegeben.

Formel 8: Berechnung der Veränderung der OD der Probe

$$\Delta OD(t) = OD_{Mess}(t) - OD_{Blank} \quad \text{Formel 88)}$$

Formel 9: Berechnung der OD der Probe

$$OD(t) = \frac{\Delta OD_1(t) - \Delta OD_2(t)}{2} \cdot F \quad (9)$$

4.7 Screeningplan

Für das Screening wurden die Konzentration an Hefeextrakt, die Konzentration an Peptone und die Konzentration an IPTG, mit dem die Zellen induziert werden, als Input Variablen gewählt. Die Screeninggrenzen, bezogen auf Hefeextrakt und Pepton, sind angelehnt an die Zusammensetzung des Terrific Broth Medium. Auf Glycerol als Kohlenstoffquelle wird hierbei verzichtet. (Noguère et al. 2012; Lessard 2013)

Hefeextrakt und Pepton wird als hochkonzentrierte Stammlösung in den Qplus Reaktoren vorgelegt. Durch die Verdünnung durch die transferierten Zellen ergeben sich die Konzentrationen des Screenings. Gemäß diesem Ansatz müsste die Hefeextrakt Stammlösung eine Kon-

zentration von 600 g L^{-1} aufweisen. Eine derartige Stammlösung ließ sich nicht ansetzen, weshalb die Konzentration der Stammlösung auf 200 g L^{-1} angepasst worden ist. Wodurch sich ein Screeningbereich von $0\text{-}8 \text{ g L}^{-1}$ für den Hefeextrakt ergab. Für das Pepton ergab sich ein Screeningbereich von $0\text{-}12 \text{ g L}^{-1}$. Für IPTG wurde ein Screeningbereich von $0,1\text{-}1 \text{ mmol L}^{-1}$ gewählt. Das IPTG wurde in entsprechender Menge über das Septum hinzugegeben. Dadurch ergibt sich ein Zentralpunkt bei einer Hefeextrakt Konzentration von 4 g L^{-1} , Pepton Konzentration von 6 g L^{-1} und einer Konzentration von IPTG von $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$. Dargestellt ist der Versuchsaufbau in Abbildung 26.

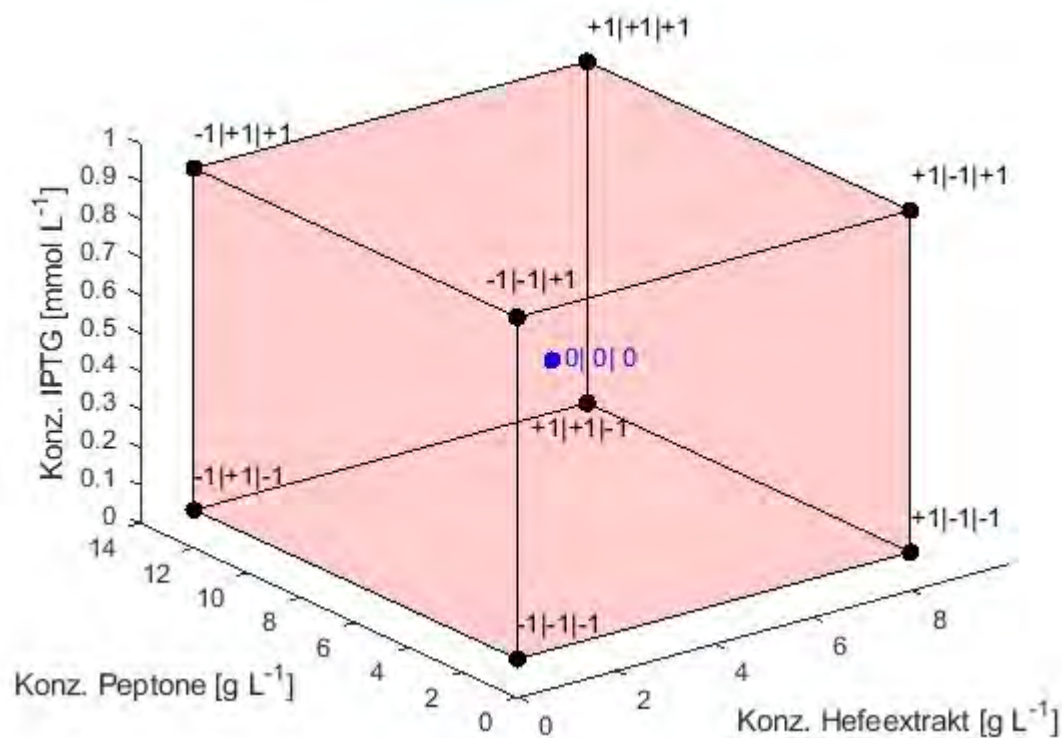


Abbildung 26: grafische Darstellung des Versuchsplans des Screenings. Die Eckpunkte des Screeningwürfels sind als schwarze Punkte und der Zentralpunkt ist als blauer Punkt dargestellt.

Gemäß den oben beschriebenen Parametern ergeben sich acht Experimente plus mindestens vier Zentralpunktexperimente. Diese sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht der Screeningexperimente

| Experiment | | Hefeextrakt | | Pepton | | IPTG | |
|------------|------|-------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|-------|--------------------------------|
| Nummer | Name | Stufe | Konz. [g L^{-1}] | Stufe | Konz. [g L^{-1}] | Stufe | Konz. [mmol L^{-1}] |
| 1 | N1 | -1 | 0 | -1 | 0 | -1 | 0,10 |
| 2 | N2 | 1 | 8 | -1 | 0 | -1 | 0,10 |
| 3 | N3 | -1 | 0 | 1 | 12 | -1 | 0,10 |
| 4 | N4 | 1 | 8 | 1 | 12 | -1 | 0,10 |
| 5 | N5 | -1 | 0 | -1 | 0 | 1 | 1,00 |
| 6 | N6 | 1 | 8 | -1 | 0 | 1 | 1,00 |
| 7 | N7 | -1 | 0 | 1 | 12 | 1 | 1,00 |
| 8 | N8 | 1 | 8 | 1 | 12 | 1 | 1,00 |
| 9 | N9 | 0 | 4 | 0 | 6 | 0 | 0,55 |
| 10 | N10 | 0 | 4 | 0 | 6 | 0 | 0,55 |
| 11 | N11 | 0 | 4 | 0 | 6 | 0 | 0,55 |
| 12 | N12 | 0 | 4 | 0 | 6 | 0 | 0,55 |

Die Multifermenteranlage besteht aus sechs Screeningreaktoren, wodurch sich theoretisch sechs unterschiedliche Bedingungen gleichzeitig screenen lassen. Somit lassen sich nicht alle Bedingungen mit einer Zellanzucht testen. Um Varianzen zwischen unterschiedlichen Zellanzuchten besser im Model berücksichtigen zu können, werden in jedem Screeningdurchlauf zwei Zentralpunkte getestet. Eine Zuordnung der Experimente zu den entsprechenden Kultivierungen ist in Tabelle 19 dargestellt. Die Zuordnung der Experimente zu den ersten beiden Kultivierungen und die Reaktorbelegung war zufällig. Die einzige Bedingung war, dass zwei Zentralpunkte pro Screeningdurchlauf getestet werden müssen. In den nachfolgenden Kultivierungen wurden spezifische Experimente wiederholt. Die Reaktorbelegung innerhalb dieser Kultivierung geschah dennoch zufällig. Alle weiteren Zentralpunkte, welche zusätzlich zu den vier geplanten stattgefunden haben, werden in der nachfolgenden Tabelle als Z gekennzeichnet. Im letzten Screeningdurchlauf wurden die zu transferierenden Zellen mit Phosphatpuffer verdünnt. Die Screeningbedingungen glichen den von den Zentralpunkten und daher wurden diese Experimente mit VZ abgekürzt. Eine Auflistung der durchgeführten Experimente in den entsprechenden Screeningdurchläufen ist in Tabelle 19 dargestellt. Eine Übersicht aller Kultivierung ist im Anhang in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 19: Übersicht der durchgeführten Experimente in den entsprechenden Screeningdurchläufen

| KW | Reaktor | Experiment | Hefeextrakt | Peptone | IPTG |
|----|---------|------------|-------------|---------|------|
| 48 | Q2 | N10 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Q3 | N12 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Q5 | N8 | 1 | 1 | 1 |
| 50 | Q1 | N5 | -1 | -1 | 1 |
| 50 | Q2 | N1 | -1 | -1 | -1 |
| 50 | Q3 | N11 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | Q5 | N3 | -1 | 1 | -1 |
| 50 | Q6 | N7 | -1 | 1 | 1 |
| 02 | Q1 | N9 | 0 | 0 | 0 |
| 02 | Q2 | N4 | 1 | 1 | -1 |
| 02 | Q3 | N5 | -1 | -1 | 1 |
| 02 | Q4 | N2 | 1 | -1 | -1 |
| 02 | Q5 | N6 | 1 | -1 | 1 |
| 04 | Q1 | VZ | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q2 | N2 | 1 | -1 | -1 |
| 04 | Q3 | N6 | 1 | -1 | 1 |
| 04 | Q4 | Z | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q5 | VZ | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q6 | Z | 0 | 0 | 0 |

4.8 Bestimmung der Produktkonzentration

4.8.1 Probenvorbereitung am Produktionstag

Direkt nach der Induktion mit IPTG und nach 3 Stunden Produktionszeit wurden jeweils Proben genommen. Diese Proben wurden identisch am Produktionstag vorbereitet. Dazu wurde 1 mL in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 15.000 xg bei 20 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Kolbenhubpipette entnommen und verworfen. Anschließend wurde eine OD von 50 mithilfe des 20 mM Tris Puffers eingestellt. Dazu wurde das Resuspensionsvolumen (V_{Resp}) gemäß der folgenden Formel 10 berechnet.

Formel 10: Berechnung des Resuspensionsvolumens

$$V_{Resp} = \frac{OD(t)}{50} \cdot 1000 \mu L \quad (10)$$

Nachdem das Pellet im Tris Puffer resuspendiert worden ist, wurde 1 mL der Suspension in ein Mrg überführt. Dieses wurde bei 16.000 xg bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Kolbenhubpipette entnommen und ebenfalls verworfen. Das Pellet wurde bei -20 °C gelagert bis zum Tag der Analyse.

4.8.2 Produktaufreinigung am Analysetag

Am Analysetag werden die eingefrorenen Proben aus dem -20 °C Kühlschrank entnommen und für 30 min inkubiert. In dieser Zeit tauen die Proben vollständig auf. Das Pellet wird in 500 µL BugBuster® Protein Extraction Reagent (BBPER) der Firma Novagen® gelöst (500 µL pro 1 mL Probensuspension). Die Lösung wird für 30 Sekunden gevortext. Anschließend wird jede Probe für 4 min mittel Ultraschall bei einer konstanten Beschallung mit 60 Watt Leistung homogenisiert. Das Mrg mit der Probe wird dabei gekühlt. Hiernach wird jeder Probe 5 µL Benzonase (2500 Units mL⁻¹) hinzugegeben und für 20 Sekunden gevortext. Die Probe wird für 20 min bei Raumtemperatur bei 300 rpm inkubiert. Als nächstes wird die Probe für 20 min bei 4 °C und 16 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Mrg überführt und erneut mit 5 µL Benzonase (2500 Units mL⁻¹) behandelt. Darauffolgend wird der Überstand für 20 Sekunden gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur bei einer Schüttelfrequenz von 300 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wird der Überstand bei -20 °C gelagert. Das Pellet hingegen wird in 500 µL BBPER resuspendiert und für 30 Sekunden gevortext. Zusätzlich werden 500 µL einer 1:10 Verdünnung des BBPER hinzugegeben (BBPER (1:10)) und dann folgen vier Waschschrte. Ein Waschschrte besteht aus einer Zentrifugation der Probe für 15 min bei 4 °C bei 10 000 xg. Der Überstand wird dabei verworfen und das Pellet wird in 800 µL BBPER (1:10) resuspendiert. Beim letzten Waschschrte wird das Pellet nicht in 800 µL BBPER (1:10), sondern in 800 µL des PBS-Urea (2 M) Puffers resuspendiert

4.9 Analyse mittels Tris-Tricin Gelen

Gemäß der erwarteten Peptidkonzentration in den aufgereinigten Proben, werden von diesen, mit PBS-Urea (2 M) Puffer, Verdünnungen angefertigt. Von den meisten der aufgereinigten Proben werden 1:10 Verdünnungen erstellt. Dazu werden 100 µL Probe mit 900 µL PBS-Urea (2 M) Puffer gemischt. Von dem 0,1 mg mL⁻¹ Lysozym Standard wird eine 1:2 Verdünnung ebenfalls mit PBS-Urea (2 M) Puffer angefertigt. Anschließend wird der Probenpuffer (siehe Tabelle 38) mit einer einmolaren Dithiothreitol (DTT) Lösung versetzt, sodass sich im Probenpuffer eine Konzentration von 0,1 mol L⁻¹ DTT einstellt. Darauffolgend werden die Proben, VE-Wasser und die Lysozym Standards (0,05 mg mL⁻¹ | 0,1 mg mL⁻¹ | 0,2 mg mL⁻¹) 1:1 mit dem versetzten Probenpuffer gemischt. Zusätzlich wurde Rinderserumalbumin (BSA) als weiterer Standard mit den gleichen Konzentrationen verwende. Hierzu wurde der BSA-Protein-Standard (2 mg mL⁻¹) der Firma Sigma-Aldrich entsprechend mit VE-Wasser verdünnt. Diese Gemische werden für 5 min bei 90 °C aufgeköcht. Für die Analyse werden Tris-Tricin Gele der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet. Es werden 30 µL des entsprechenden aufgeköchten

Gemisches in eine Tasche des Gels pipettiert. Bei jedem Gel werden jeweils zweimal 5 μ L Marker verwendet. Es wird eine Spannung von 100 Volt angelegt. Vorher wird der 10x Laufpuffer für Tris-Tricin Gele 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und in die Kammern gefüllt. Nach ca. 2 h werden die Gele in die Färbelösung transferiert und über Nacht in dieser gelagert. Dabei werden diese leicht geschwenkt. Am Morgen des folgenden Tages wird die Färbelösung entfernt und das Gel mit VE-Wasser gespült. Anschließend wird das Gel in der Entfärbelösung gelagert bis zum nächsten Tag. Die Gele werden gescannt und mittels der Image Lab Software von der Firma Bio-Rad Laboratories ausgewertet.

5 Auswertung

5.1 Kultivierungen

Durch die Bestimmung der BTM lässt sich auf die Zellkonzentration im Reaktor schließen. Dieses Verfahren liefert nur zeitverzögert Daten, da die Proben mindestens über Nacht getrocknet werden müssen. Die Messung der OD hingegen liefert mit nahezu keiner Verzögerung Aufschluss über die Trübung im Reaktor. Zwischen der BTM und der OD besteht ein linearer Zusammenhang, wodurch die Messung der OD als nahezu sofortiges atline Verfahren zur Bestimmung der Zellkonzentration dienen kann. Zur Bestimmung dieses Umrechnungskoeffizienten wurden über dem Verlaufe des Prozesses Proben genommen und deren OD und BTM bestimmt (siehe Anhang 9.4.2). Aus diesen Daten lassen sich für alle Kultivierungen Umrechnungsfaktoren bestimmen (Abbildung 27). Die Kultivierungen KW48 und KW50 weisen ähnliche Umrechnungsfaktoren mit 0,54 und 0,53 auf. Die Kultivierung KW02 weist mit einem Wert von 0,49, einen geringeren Umrechnungsfaktor auf. Besonders auffällig ist die Kultivierung KW04 mit einem Wert von 0,76. Dieser Wert liegt weit oberhalb der anderen Umrechnungsfaktoren. Bei dieser Kultivierung wurden nur zwei Proben in der Fed-Batch Phase gezogen, wodurch die Berechnung hauptsächlich auf den Proben der Batch Phase beruht. Innerhalb der Batch Phase weisen alle Kultivierungen höhere Umrechnungsfaktoren von über 0,6 auf. Einzige Ausnahme stellt hierbei die Kultivierung KW04 mit einem Wert von 0,57 dar (siehe Anhang Abbildung 94).

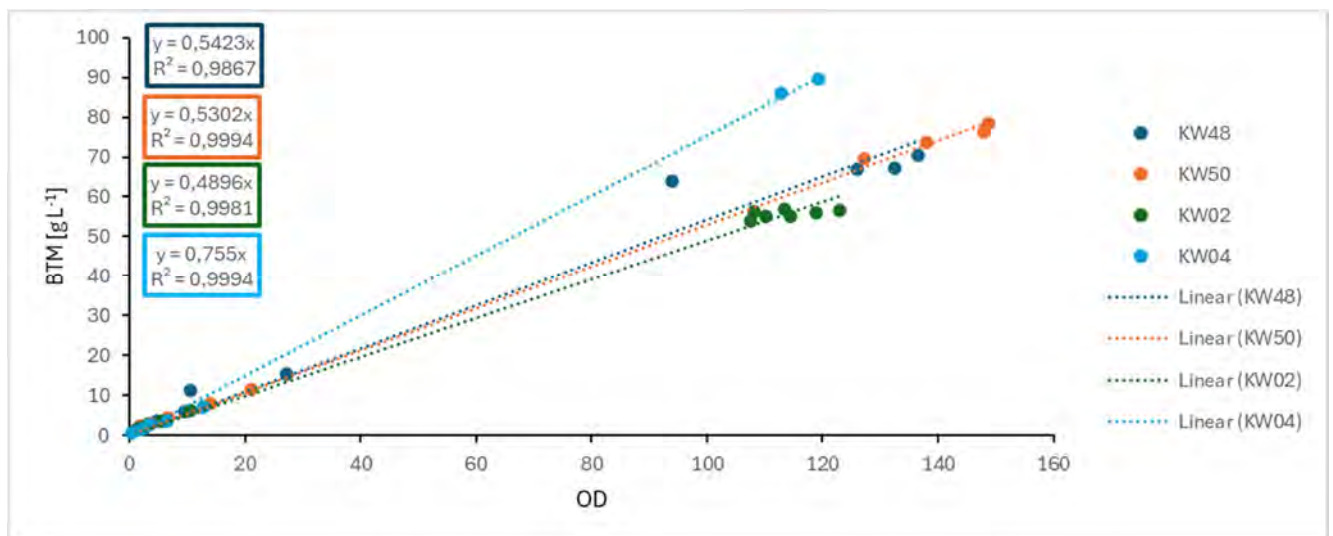


Abbildung 27: Bestimmung des Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD für alle Kultivierungen

Je mehr Kultivierungen durchgeführt werden, desto belastbarer ist der errechnete Umrechnungsfaktor. Zusätzlich lassen sich Ausreißer besser erkennen und somit die Daten besser bereinigen. Auf Grundlage der vier Kultivierungen wurde ein universeller Umrechnungsfaktor

zwischen BTM und OD bestimmt (siehe Abbildung 28). Unter Einbezug von allen Datenpunkten ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von 0,54 mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,98 (siehe Anhang Abbildung 95). Die Datenpunkte KW48 Probenzeitpunkt 6 h und 21,11 h, KW02 Probenzeitpunkt 22,4 und 24,09 h wurden als Ausreißer identifiziert und somit bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Dadurch ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 0,5109 mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9976 (siehe Abbildung 28).

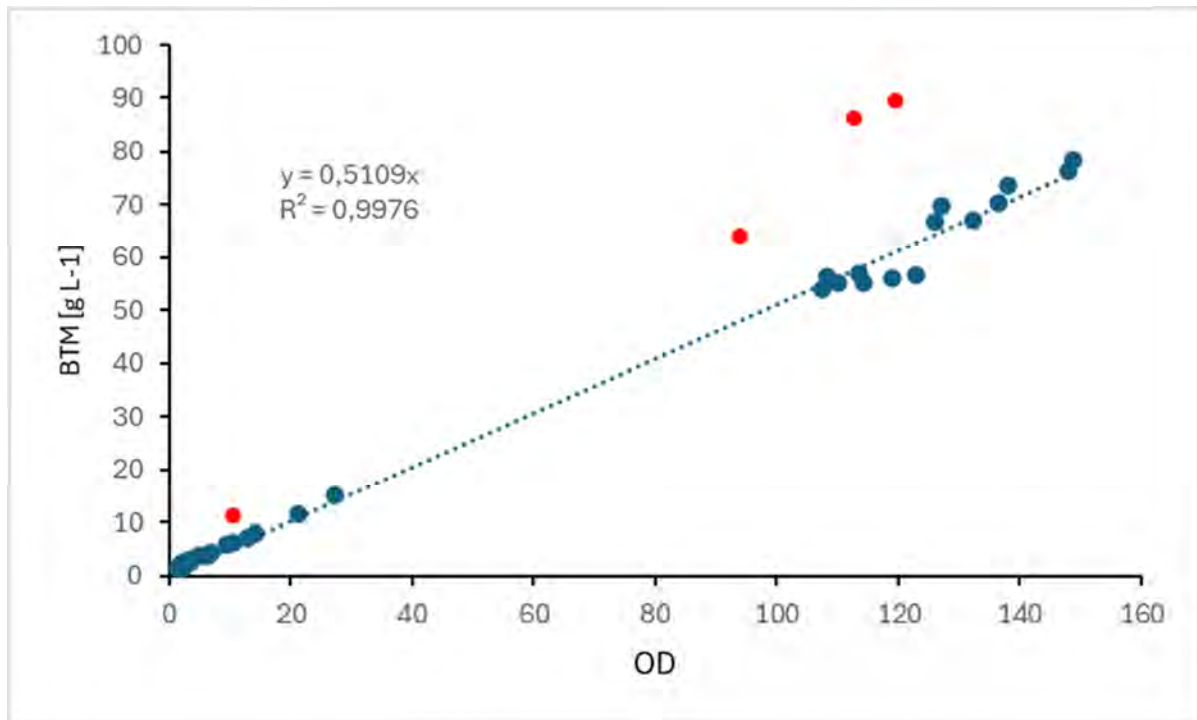


Abbildung 28: Bestimmung eines universellen Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD auf Grundlage der vier Kultivierungen. Rote Datenpunkte wurden als Ausreißer behandelt.

5.1.1 Kultivierung KW48

5.1.1.1 ED5

Die Anzucht der Zellen hat im ED5 stattgefunden, nach einer 5 h Batch Phase und zwei Fed-Batch Phasen wurden die Zellen nacheinander in die Screeningreaktoren transferiert. Zum Beginn der Batch Phase ist der pO_2 Wert unreguliert. Sobald dieser den Wert von 20 % erreicht, aktiviert sich die Regelung. Initial waren die Parameter bei 750 für den XP-Anteil und 200 für T_1 . Nach 3,18 h Prozesszeit wurde ein XP von 500 und ein T_1 von 200 eingestellt und diese wurden beim Wechsel in die Fed-Batch Phase automatisch auf 750 und 200 angepasst. Die genauen Anpassungen mit den dazugehörigen Prozesszeitpunkten sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Zusätzlich sind diese im Kultivierungsverlauf in Abbildung 29 eingezeichnet.

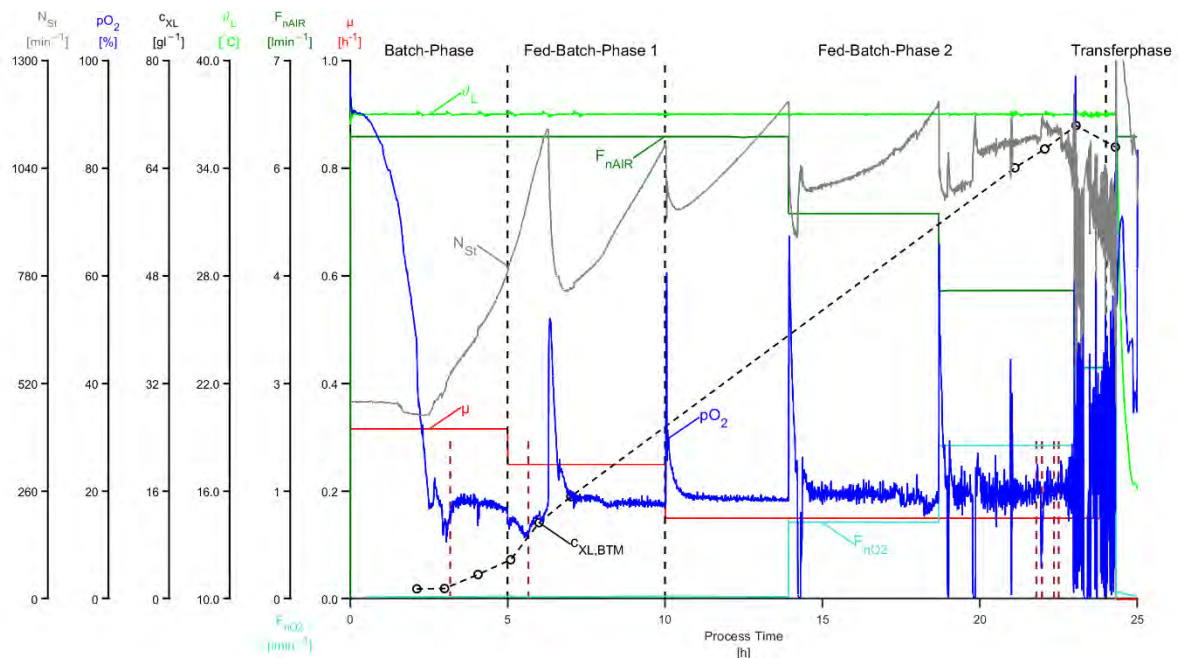


Abbildung 29: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW48. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), die Begasungsrate mit Luft (F_{nAir}) und Sauerstoff (F_{nO_2}), die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (θ_L), die Zellkonzentration bestimmt über die BTM (c_{XL}), der gelöst Sauerstoff (pO_2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

Tabelle 20: Änderungen in den Reglereinstellungen über den Verlauf der Kultivierung in der KW48

| Prozesszeit [h] | X_p | | T_I | |
|--------------------|--------|---------|--------|---------|
| | vorher | nachher | vorher | nachher |
| 3,18 | 750 | 500 | 200 | 200 |
| 5,66 | 750 | 500 | 200 | 200 |
| 21,79 | 500 | 500 | 200 | 400 |
| 21,97 | 500 | 400 | 400 | 150 |
| 22,35 | 400 | 300 | 150 | 100 |
| 22,5 | 300 | 250 | 100 | 100 |

Diese veränderten Einstellungen in der Batch Phase wurde für die nachfolgenden Fed-Batch Phase übernommen. Mit diesen Einstellungen weist der pO_2 Regler für die anfängliche Fed-Batch Phase eine gute Regelung auf. Mit zunehmender Zellkonzentration und zunehmenden Anteil an Sauerstoff, wird die Regelung zunehmend schlechter.

Nach einer 19-stündigen Vorkultur, werden die Zellen in den ED5 überführt. In diesem findet eine Batch Phase von 5 h statt. Nach diesen 5 h startet automatisch das Zupumpen von Feedmedium. Das tatsächliche Batchende wurde nach 6,3 h erreicht. Durch das Zupumpen des Feedmediums wurde dieses nach hinten verschoben. Innerhalb dieser Phase wachsen die Zellen mit μ_{max} , welches den Wert von $0,31 \text{ h}^{-1}$ beträgt. Nach 10 h Prozesszeit ist das Ende der ersten Fed-Batch Phase erreicht. Die Wachstumsrate wird von $0,25 \text{ h}^{-1}$ auf $0,15 \text{ h}^{-1}$ verringert, dadurch nimmt der Sauerstoffbedarf ebenfalls ab, weswegen es zum Anstieg des gelöst Sauerstoffs kommt. Sobald der Rührer eine Drehgeschwindigkeit von 1200 min^{-1} erreicht, wird der Gasmix angepasst, was sich ebenfalls im gelöst Sauerstoffwert widerspiegelt. Zum Ende der zweiten Fed-Batch Phase wird die pO_2 -Regelung immer schlechter. Nach einer Prozesszeit von 24 h ist das Ende der Kultivierung im ED5 erreicht. Die Temperatur wird auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ verringert, gleichzeitig wird der Gasmix angepasst.

Über den Verlauf der Batch Phase nimmt das Volumen im Bioreaktor etwas ab. Dies resultiert durch die konstante Probenahme in der Batch Phase (siehe Abbildung 30). Diesem wirkt der Eintrag der Base (25%iges Ammoniak) entgegen. Durch den Overflow Metabolismus in der Batch Phase produzieren die Zellen Acetat (Xu et al. 1999). Um den pH-Wert konstant auf 7 zu halten, wird Base in den Reaktor gepumpt. Dies geschieht durch die pH-Regelung. Im gesamten Prozess wird nahezu keine Säure in den Reaktor gepumpt. Der gesamte Volumenzuwachs beruht auf den Eintrag der Base und des Feedmediums. Die volumetrische Eintragsrate lässt sich einerseits über die Pumprate berechnen. Andererseits lässt sich diese über das Waagen Signal der Feedwaage bestimmen. Die Werte der volumetrische Eintragsrate berechnet aus dem Waagen Signal wurde mittels eines Gleitender-Mittelwert-Filters bearbeitet. Dabei

wurde eine Fensterbreite von zehn Werte gewählt, dies entspricht einem Intervall von ca. 74,5 Sekunden. Diese Einstellungen wurden für alle dieser volumetrische Eintragsraten für die vier Kultivierungen im ED5 beibehalten. In diesem Fall liegt muss das F_{Rmax} der Pumpe über dem experimentell bestimmten F_{Rmax} liegen, wodurch es zu dem Offset in der volumetrischen Eintragsrate kommt. Zum Ende der zweiten Fed-Batch Phase kommt es zu einem Abfall der volumetrischen Eintragsrate $Q_{Sin_Balance}$, was sich eigentlich in der Zunahme des Reaktorvolumens widerspiegeln. Die Zunahme des Reaktorvolumens nimmt in diesem Zeitraum nicht nennenswert ab. Daher wird der Abfall der volumetrischen Eintragsrate $Q_{Sin_Balance}$ auf eine Störung des Waagsignales zurückzuführen sein. Dieses Phänomen wiederholt sich bei der Kultivierung in der KW50, aber nicht in der Kultivierung in der KW04. Die Störung könnte somit auf die niedrigen Außentemperaturen zurückzuführen sein. Die Störung der Waage tritt um ca. 5 Uhr morgens auf. In den beiden Nächten herrschten Temperaturen von bis zu -6 °C bzw. 1 °C in Kirchwerder (14-tage-wettervorhersage.de: Wetter, Wettervorhersage, Wettertrend 2024a, 2024c). Bei der Kultivierung in der KW04 herrschten Außentemperaturen in der Nacht von bis zu 3 °C (14-tage-wettervorhersage.de: Wetter, Wettervorhersage, Wettertrend 2024b). Somit könnte die Waagenstörung auf die niedrige Temperatur zurückzuführen sein. Im Verlauf der Transferphase nimmt das Reaktorvolumen schrittweise ab, da dieses in die Transferflaschen überführt wird. Dennoch wurde die pH-Regelung nicht deaktiviert. Der pH-Wert steigt zum Ende der Transferphase sprunghaft an. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die pH Sonde nicht mehr in der Flüssigphase, da diese zu weit abgenommen hat. Deswegen wurde die pH-Regelung bei den nachfolgenden Kultivierungen vor dem tatsächlichen Transfer deaktiviert. Außerdem wurden die Zellen in den anderen Kultivierungen vollständig runtergekühlt, bevor diese transferiert werden.

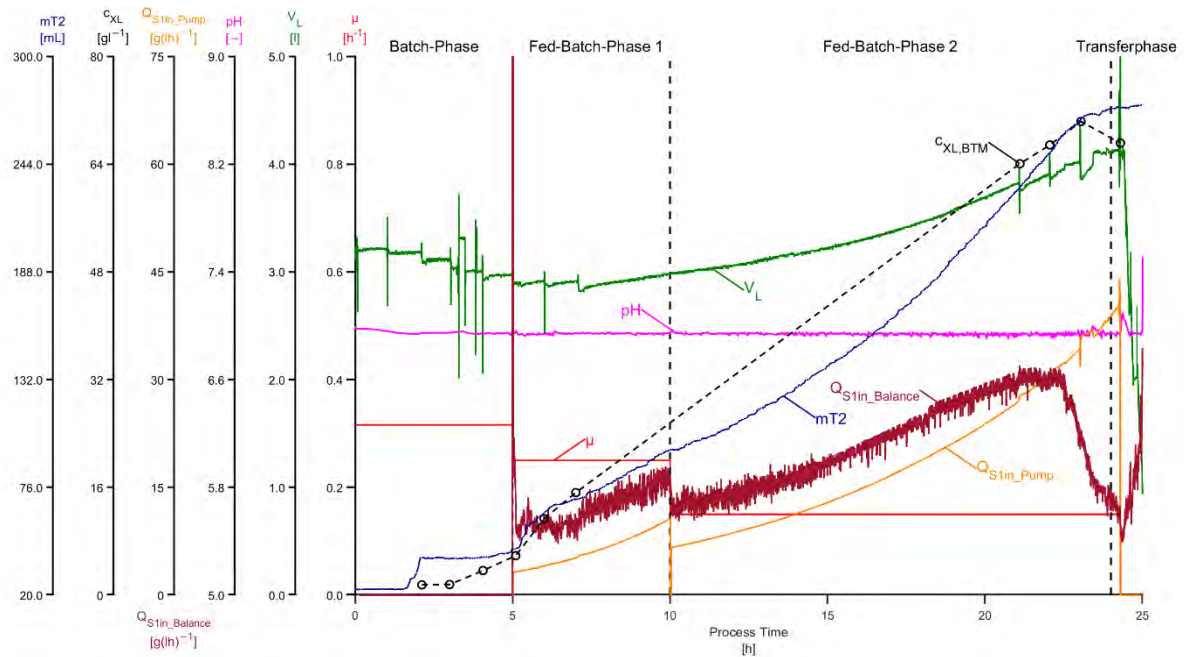


Abbildung 30: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW48. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), das Volumen der Flüssigkeitsphase im Reaktor (V_L), der pH-Wert, die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}) und der Eintrag an Base ($mT2$).

Solange das Substrat des Batchmediums nicht aufgebraucht ist, wachsen die Zellen exponentiell mit μ_{max} . Dieses exponentielle Wachstum ist sowohl in der Zellkonzentration als auch im Rohwert der Trübungssonde zu erkennen (siehe Abbildung 31). Sobald das Substrat vollständig aufgebraucht worden ist, nach ca. 6,3 h, wachsen die Zellen mit der Eingestellten Wachstumsrate. Die Fed-Batch Phase fanden über Nacht statt, weswegen in dem Zeitraum keine Proben genommen wurden. Das Wachstum der Zellen in diesem Zeitraum spiegelt sich einerseits im Eintrag der Base, andererseits in dem Rohwert der Trübungssonde wider.

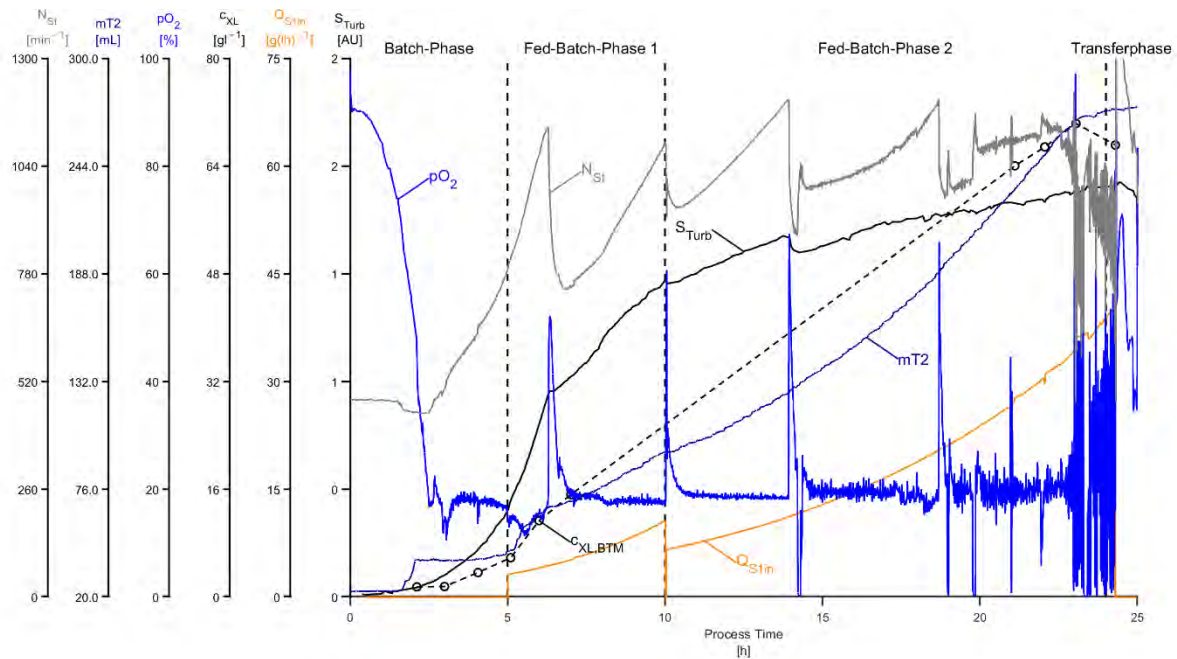


Abbildung 31: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW48. Dargestellt ist der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{Stin_Pump}), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}), der gelöste Sauerstoffwert (pO_2), der Eintrag an Base ($mT2$) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.1.2 Screeningsreaktor Q2

Die Zellen werden mittels Transferflaschen in die Screeningreaktoren überführt. Sobald die Zellen im Reaktor sind, wird die MFCS-Rezept des Screeningreaktors gestartet. Die Reaktoren wurden konstant mit $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Luft und $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Sauerstoff begast. Gleichzeitig wurden die Reaktoren mit maximaler Rührerdrehzahl durchmischt. Aufgrund des geringen $k_L a$ -Wertes der Screeningreaktoren, befand sich der pO_2 -Wert über die gesamte Kultivierung bei 0 %. Der gesamte in die Flüssigkeit eingebrachte Sauerstoff wurde augenblicklich von den Zellen aufgenommen. Somit wuchsen die Zellen unter Sauerstofflimitierung, statt unter Substratlimitierung. Wodurch die Wachstumsrate der Zellen unterhalb des eingestellten Wertes von $0,15 \text{ h}^{-1}$ lag. Durch das geringere Wachstum der Zellen kommt es zu einer Akkumulation von Glucose und zu einer Verdünnung der Zellen im Reaktor. Erkennbar im Signal der Trübungssonde und der OD (siehe Abbildung 33). Solange die Glucosekonzentration im Reaktor keine toxische Werte erreicht, sollte es die Produktion nicht beeinflussen. Nach dem Transfer der Zellen haben die Zellen eine Stunde um sich zu Akklimatisieren. Innerhalb dieser Zeit wird die Temperatur erneut auf 37 °C und der pH-Wert auf 7 eingestellt (siehe Abbildung 32) Nach einer Stunde werden die Zellen mit IPTG induziert. Die Zugabe erfolgt über das Septum. Direkt danach wird eine Probe genommen. Diese stellt den Zeitpunkt t_0 der Produktionsphase dar. Nach

drei Stunden wird eine weitere Probe genommen. Diese stellt den Zeitpunkt t_3 der Produktionsphase dar. Die Induktion und die beiden Probennahmen sind in den Schwankungen des Volumens zu erkennen. Von den Proben wurde die OD gemessen. Die volumetrische Eintragsrate berechnet aus dem Waagensignal ist erneut höher als die berechnet aus der Pumprate (siehe Abbildung 33). Dies war ein generelles Problem. Der F_{Rmax} Wert der Pumpe ist abhängig von dem Medium und dem Pumpschlauch und der Pumpe selbst. Der F_{Rmax} Wert wurde vor jeder Kultivierung erneut bestimmt und dennoch wich der bestimmte Wert von dem tatsächlichen Wert bei der Kultivierung ab. Dies ist wahrscheinlich auf die Schläuche zurückzuführen. Die Werte der volumetrische Eintragsrate berechnet aus dem Waagensignal wurde mittels eines Gleitender-Mittelwert-Filters bearbeitet. Dabei wurde eine Fensterbreite von fünf Werte gewählt, dies entspricht einem Intervall von ca. 84,4 Sekunden. Diese Einstellungen wurden für alle dieser volumetrische Eintragsraten für alle Screeningreaktoren beibehalten.

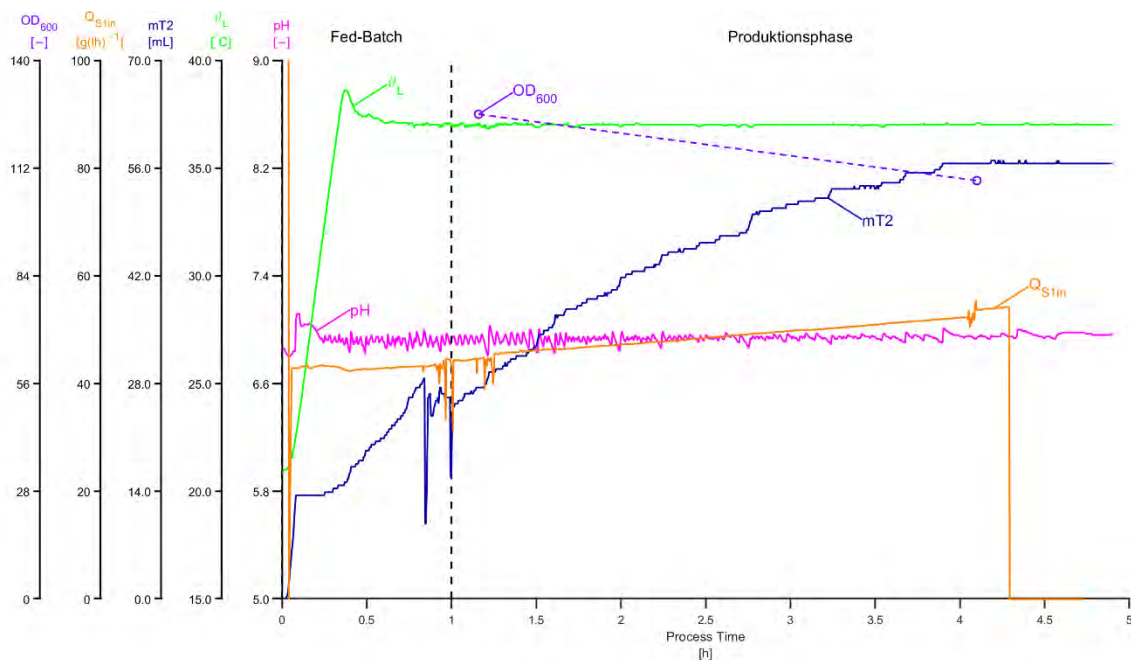


Abbildung 32: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

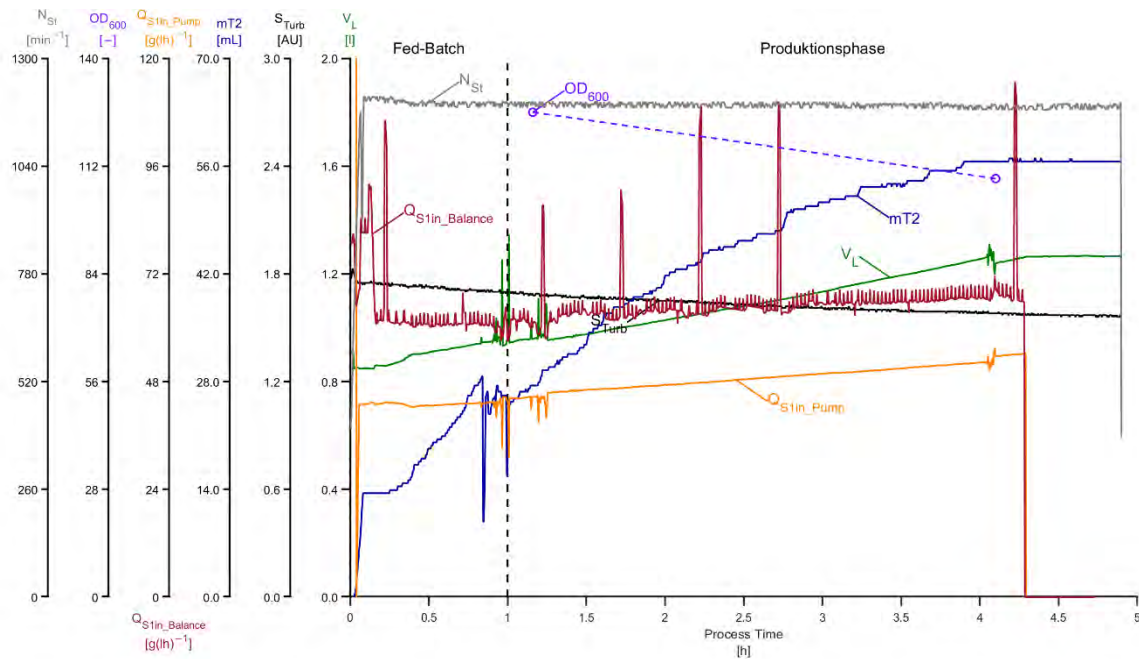


Abbildung 33: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.1.3 Screeningreaktor Q3

Die Bedingungen im Screeningreaktor Q3 glichen denen im Q2. In beiden wurden Zentralpunktexperimente durchgeführt. Die Kultivierungen sollten einander gleichen. Beide Kultivierungen erreichen zur gleichen Zeit die Temperatur von 37 °C (siehe Abbildung 34), wobei in der Kultivierung im Q3 augenscheinlich mehr Baseeingetragen worden ist. Ausgehend von dem Signal der Trübungssonde wurde diese mit einer höheren Zellkonzentration angeimpft. Dies widerspricht die OD der ersten Probe. Über den Verlauf beider Kultivierungen wurden ungefähr der gleiche Wert an Base eingetragen. In der Kultivierung im Q2 wurde lediglich mehr Base in der Fed-Batch Phase eingetragen. Die OD nimmt im Q2 stärker ab als im Q3. Dies ist auf eine größere Verdünnung durch den Substrateintrag zurückzuführen. Für die Produktanalyse werden die Proben auf eine einheitliche OD von 50 eingestellt, wodurch solche Phänomene keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben dürften.

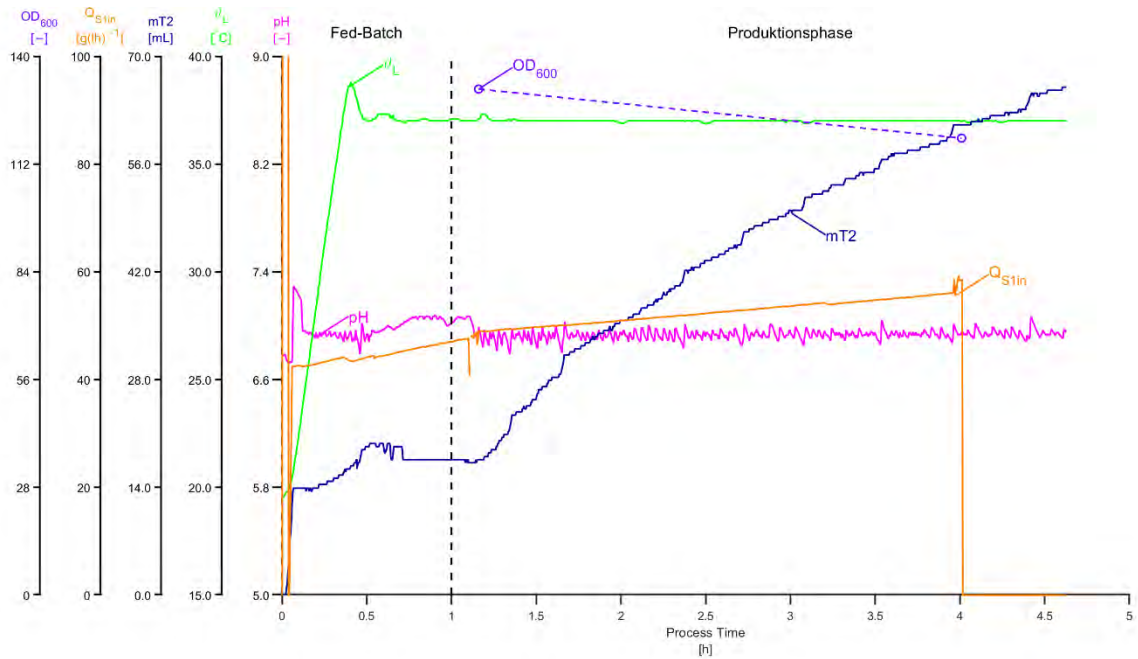


Abbildung 34: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

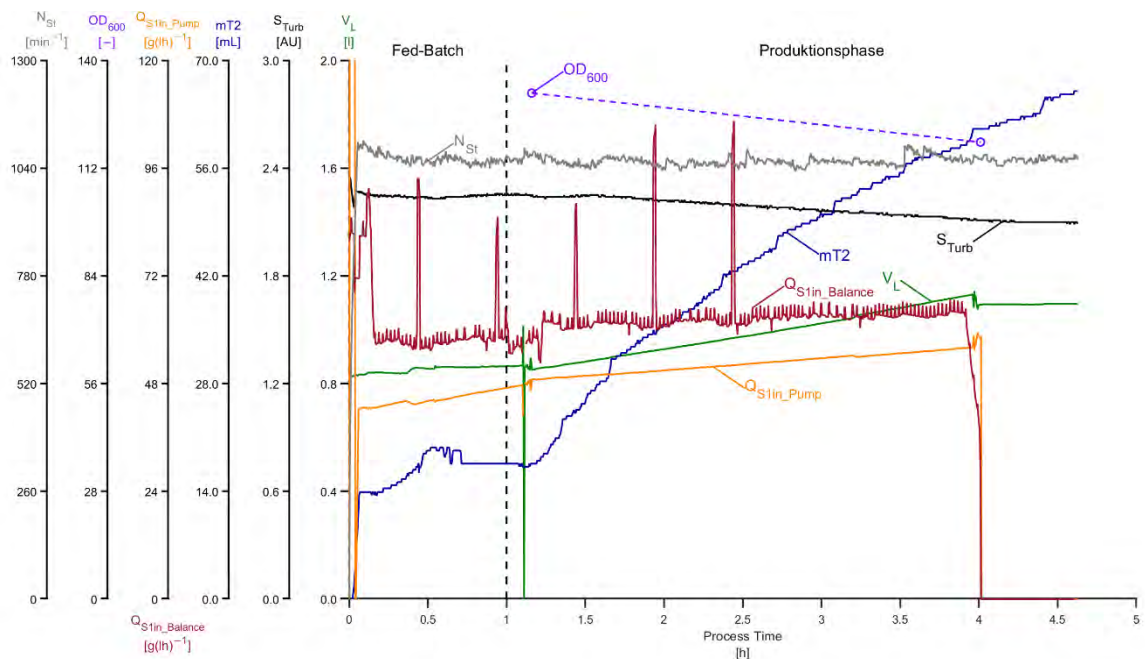


Abbildung 35: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.1.4 Screeningreaktor Q5

Bei diesem Screeningexperiment waren es für alle drei Parameter die oberen Grenzen. Die Parameter können sowohl Einfluss auf die Produktion des Peptides, aber auch auf das Wachstum der Zellen haben, wodurch die sich diese Kultivierung von den Kultivierungen im Q2 und Q3 unterscheiden kann. Initial musste mehr Base in den Reaktor gepumpt werden, um den pH-Wert zu regulieren, dafür wurde im Verlauf der Kultivierung weniger Base in den Reaktor gepumpt (siehe Abbildung 36). Dies könnte ein Indiz für eine geringere Wachstumsrate sein, welche durch die höhere Konzentration an IPTG ausgelöst worden sein könnte. Die unterschiedlichen ODs lassen sich durch die unterschiedlichen Volumina innerhalb der Reaktoren erklären (siehe Abbildung 33, Abbildung 35 und Abbildung 37). Für die Berechnung der Produktausbeute sollte dies keinen Einfluss haben und somit auch nicht aufs DOE, insofern die erhöhte Substratkonzentration im Reaktor keinen negativen Effekt ausübt.

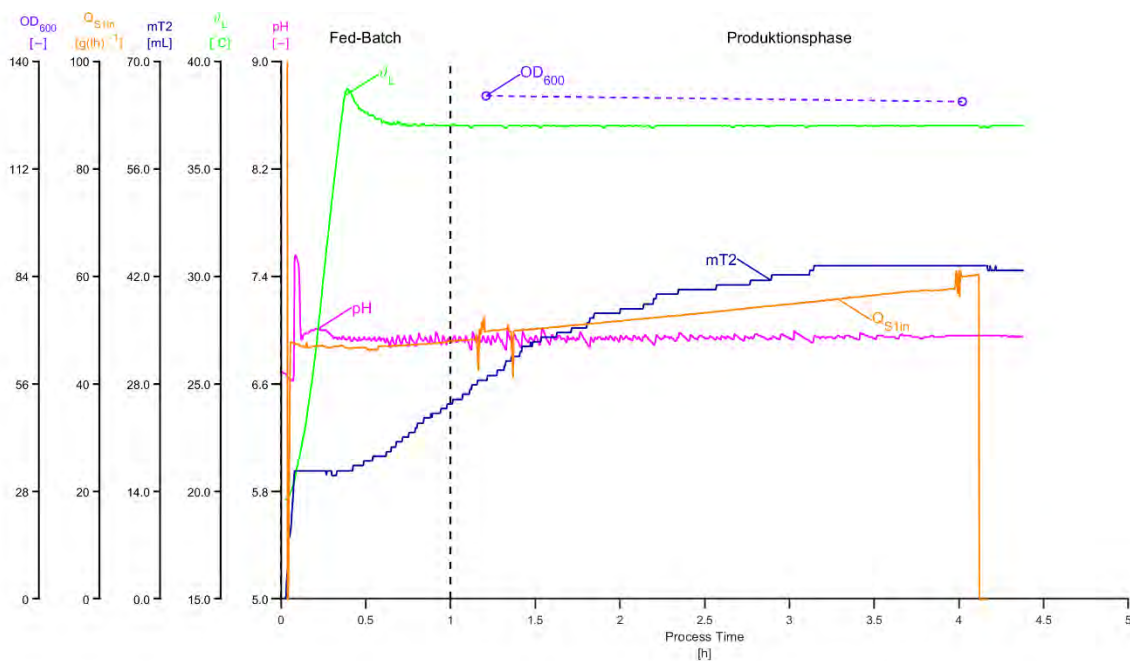


Abbildung 36: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (T_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

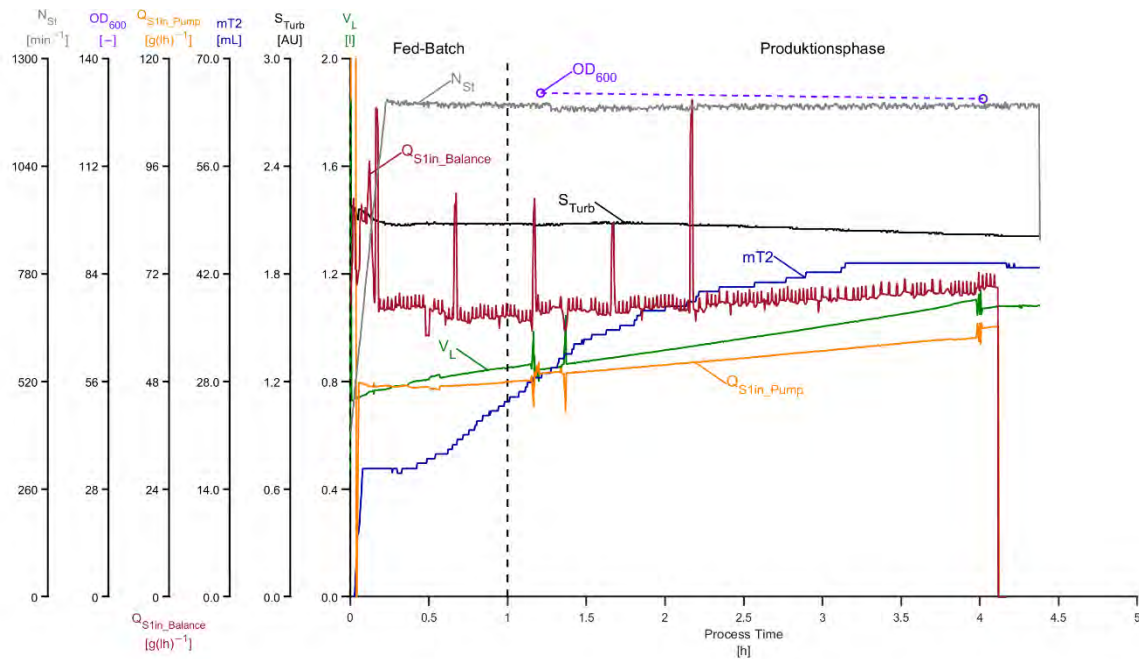


Abbildung 37: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW48. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2 Kultivierung KW50

5.1.2.1 ED5

Die Regelparameter X_P 500 und T_I 200 wurden für diese Fermentation sowohl für die Batch Phase, als auch die Fed-Batch Phase übernommen, da diese eine bessere Regelung aufwiesen, als die initialen Einstellungen aus der Fermentation KW48. Bei höheren Anteilen an Sauerstoff im Gasmix wiesen diese Regelung mit diesen Parametern Schwierigkeiten auf, weswegen sich die Regelparameter bei einem Gasmix von $4 \text{ L min}^{-1}:2 \text{ L min}^{-1}$ Luft:Sauerstoff bzw. $3 \text{ L min}^{-1}:3 \text{ L min}^{-1}$ Luft:Sauerstoff automatisch umgestellt haben. Zusätzlich wurde der Einfluss von unterschiedlichen Regelparametern auf die Regelung untersucht. Eine Übersicht der Regelparameter Einstellungen ist in Tabelle 21 dargestellt. Deren Einfluss auf die Regelung ist in Abbildung 38 dargestellt. Mit zunehmendem Anteil an Sauerstoff am Gasmix schwankt die Regelung zunehmend. Die Zellen wiesen in der Batch Phase mit einem μ_{max} von 0,75 ein weitaus höheres Wachstum auf, wodurch das Substrat im Batchmedium schneller aufgebraucht worden ist. Die Zellkonzentrationen sind in der Kultivierung KW50 etwas höher als in der KW48. Abgesehen von dem unterschiedlichen μ_{max} in der Batch Phase weisen die beiden Fermentationen einen sehr ähnlichen Verlauf auf.

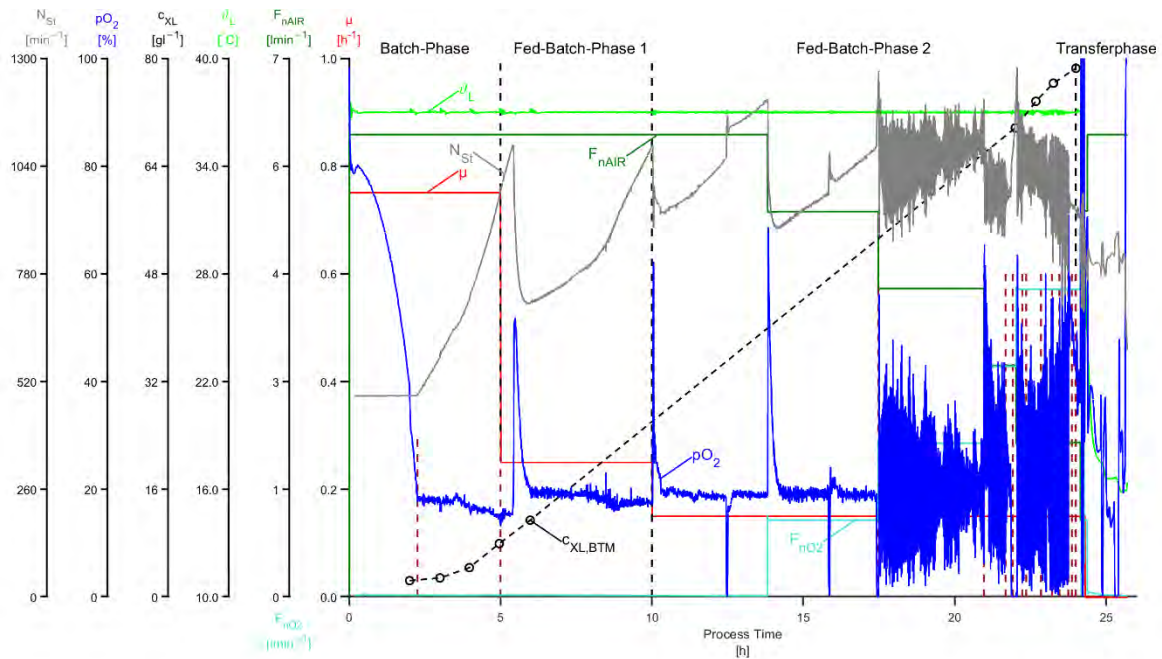


Abbildung 38: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW50. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), die Begasungsrate mit Luft (F_{nAIR}) und Sauerstoff (F_{nO_2}), die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), die Zellkonzentration bestimmt über die BTM (c_{XL}), der gelöste Sauerstoff (pO_2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

Tabelle 21: Änderungen in den Reglereinstellungen über den Verlauf der Kultivierung in der KW50.

| Prozesszeit [h] | χ_p | | T_1 | |
|--------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | vorher | nachher | vorher | nachher |
| Batch | | 500 | | 200 |
| Fed-Batch | 500 | 500 | 200 | 200 |
| 2 L min ⁻¹ O ₂ | 500 | 250 | 200 | 100 |
| 3 L min ⁻¹ O ₂ | 250 | 350 | 100 | 500 |
| 21,68 | 350 | 500 | 500 | 400 |
| 21,92 | 500 | 300 | 400 | 400 |
| 22,23 | 300 | 400 | 400 | 150 |
| 22,36 | 400 | 400 | 150 | 600 |
| 22,85 | 400 | 400 | 600 | 1000 |
| 23,21 | 400 | 300 | 1000 | 1000 |
| 23,46 | 300 | 300 | 1000 | 1200 |
| 23,75 | 300 | 800 | 1200 | 1200 |
| 23,87 | 800 | 800 | 1200 | 1000 |
| 23,99 | 800 | 800 | 1000 | 800 |

Das Volumen der Flüssigphase im Reaktor in der Kultivierung KW50 ist höher als in der Kultivierung KW48. Die volumetrische Eintragsrate ist in beiden Kultivierungen gleich. Sie unterscheiden sich lediglich in dem Ausmaß des vorher beschriebenen Phänomens zum Ende der

zweiten Fed-Batch Phase. Die Störung fällt in der Kultivierung KW48 stärker aus, was durchaus in Indiz für die Temperaturtheorie ist. Die unterschiedlichen Volumina im Reaktor sind durch den unterschiedlichen Baseeintrag zu erklären (siehe Abbildung 39). Der größere Baseeintrag in der Kultivierung KW50 lässt sich wiederum durch die leicht erhöhte Zellkonzentration erklären lässt.

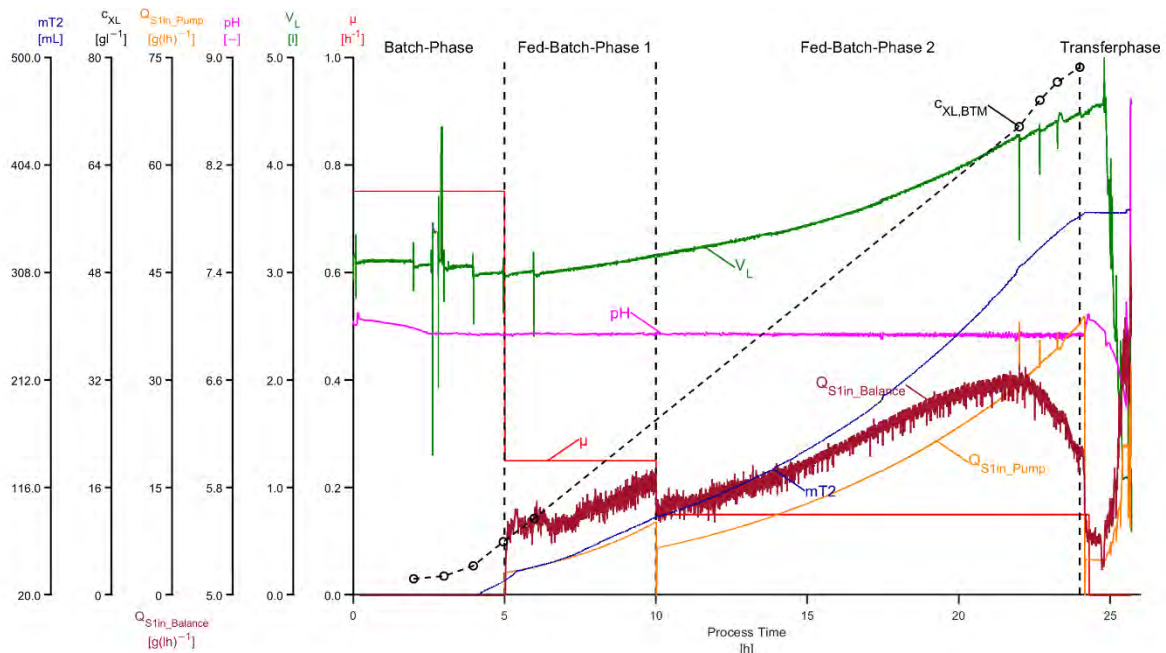


Abbildung 39: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW50. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), das Volumen der Flüssigkeitsphase im Reaktor (V_L), der pH-Wert, die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}) und der Eintrag an Base ($mT2$).

Die Vorkultur in KW48 wies eine OD von 3 auf, wobei die Vorkultur aus KW50 eine OD von 4,7 aufwies. Somit wurde der Reaktor mit einer höheren Zellkonzentration angeimpft, was den höheren Abfall des pO_2 -Wertes nach der Animpfung erklärt (siehe Abbildung 31 und Abbildung 40). Die Methodik der Vorkultur ist einheitlich und konstant, somit spricht die höhere OD der Vorkultur der KW50 für eine vitalere Vorkultur, was sich im weit höheren μ_{max} widerspiegelt.

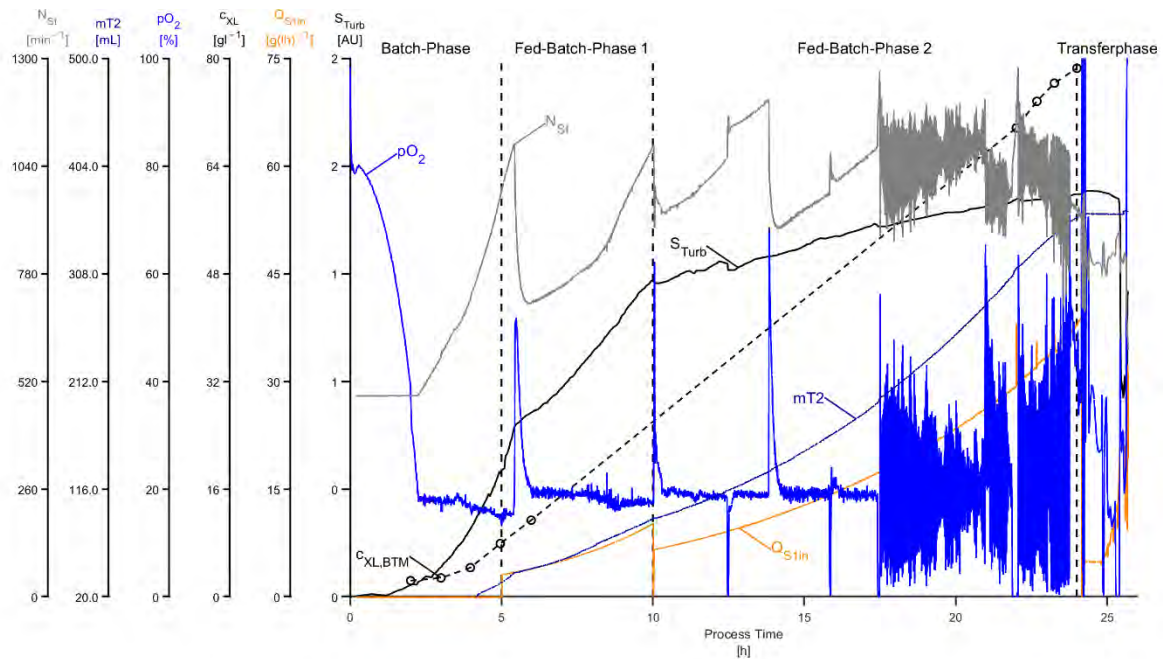


Abbildung 40: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW50. Dargestellt ist der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}), der gelöste Sauerstoffwert (pO_2), der Eintrag an Base (mT2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2.2 Screeningreaktor Q1

Die Transferphase im ED5 wurde verlängert, wodurch die Zellen eine geringere Temperatur aufweisen, nachdem diese in die Screeningreaktoren überführt worden sind. Direkt nach dem Transfer weisen die Zellen einen stark verlangsamten Stoffwechsel auf wodurch die pO_2 Sonde zu Beginn der Kultivierung einen positiven gelöste Sauerstoffgehalt misst. Sobald sich das Flüssigkeitsvolumen im Screeningreaktor aufheizt, aktiviert sich der Stoffwechsel der Zellen, was zum starken Absinken des pO_2 Wertes führt (siehe Abbildung 41). Die pH-Regelung schwankt relativ stark, was auf die starke 25%ige Ammoniaklösung zurückzuführen ist. Für eine bessere Regelung würde sich eine geringe Base eignen, dies führt zu einem höheren Volumeneintrag, was im Verlauf der Kultivierung zu Problemen mit der Reaktorvolumen führen würde. Erneut ist eine Verdünnung der Zellen zu betrachten, dies war bereits bei der Kultivierung KW48 zu beobachten. Dies spiegelt sich nicht deutlich im Signal der Trübungssonde wider (siehe Abbildung 42). Gerade bei hohen optischen Dichten ist ein solcher Zusammenhang schwer zu erkennen. Zum Zeitpunkt der ersten Probenahme betrug die Zellkonzentration $70,5 \text{ g L}^{-1}$.

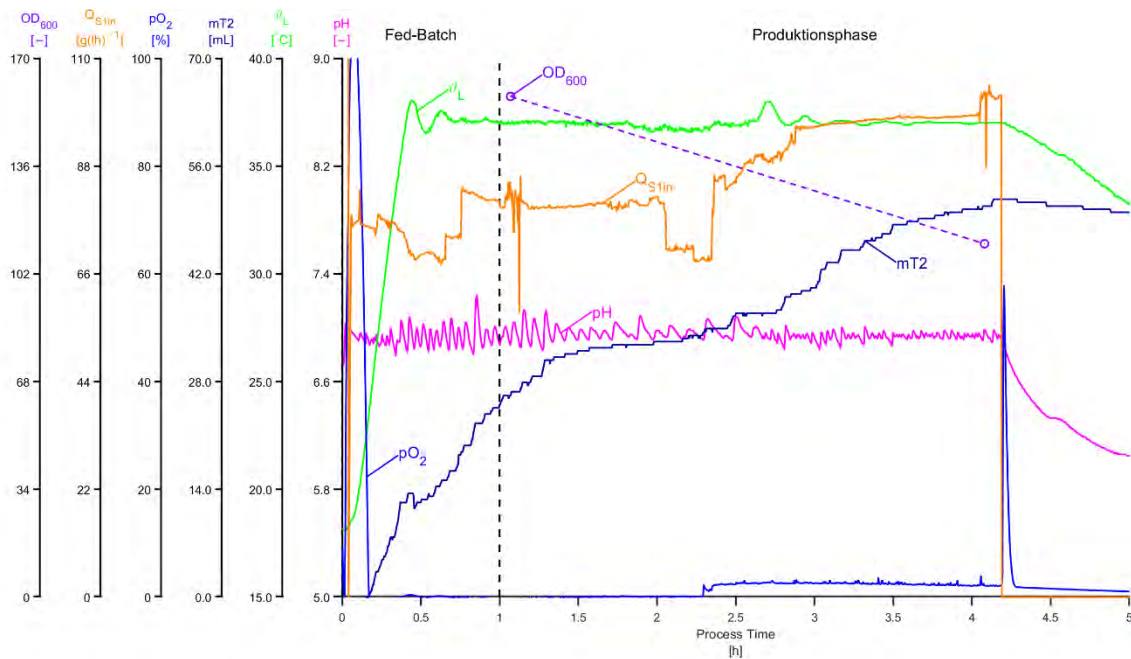


Abbildung 41: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), der gelöst Sauerstoff (pO_2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Das starke Rauschen in den volumetrischen Eintragsraten ist auf das starke Schwanken der Waagensignale der Reservoir- und der Reaktorwaage zurückzuführen. Generell weist die Reaktorwaage ein negatives Offset auf, da diese vor dem Transfer tariert worden ist. Dadurch sind die berechneten Eintragsraten höher als die tatsächlichen Eintragsraten. Die Schwankungen im Signal der Reaktorwaage innerhalb der Fed-Batch ist auf den Transfer der anderen Zellen in die anderen Screeningreaktoren zurückzuführen. Dabei ist es nicht vermeidbar mit den anderen Reaktoren in Kontakt zu kommen, auch wenn dies möglichst vermieden wurde. Der Ausschlag im Signal der Reaktorwaage bei 2 h ist hingegen verwunderlich. Zu diesem Zeitpunkt fanden keine Probenahmen an diesem oder anderen Reaktoren der Seite statt. Somit sind externe menschliche Einflussfaktoren auszuschließen. Diese Schwankung spiegelt sich in den volumetrischen Eintragsraten wider, da diese sich auf das Reaktorvolumen beziehen. Schwankungen innerhalb der volumetrischen Eintragsrate, berechnet aus dem Signal der Reservoirwaage, welche sich nicht in der anderen volumetrischen Eintragsrate wiederauffinden, sind auf Schwankungen im Waagensignal des Reservoirs zurückzuführen.

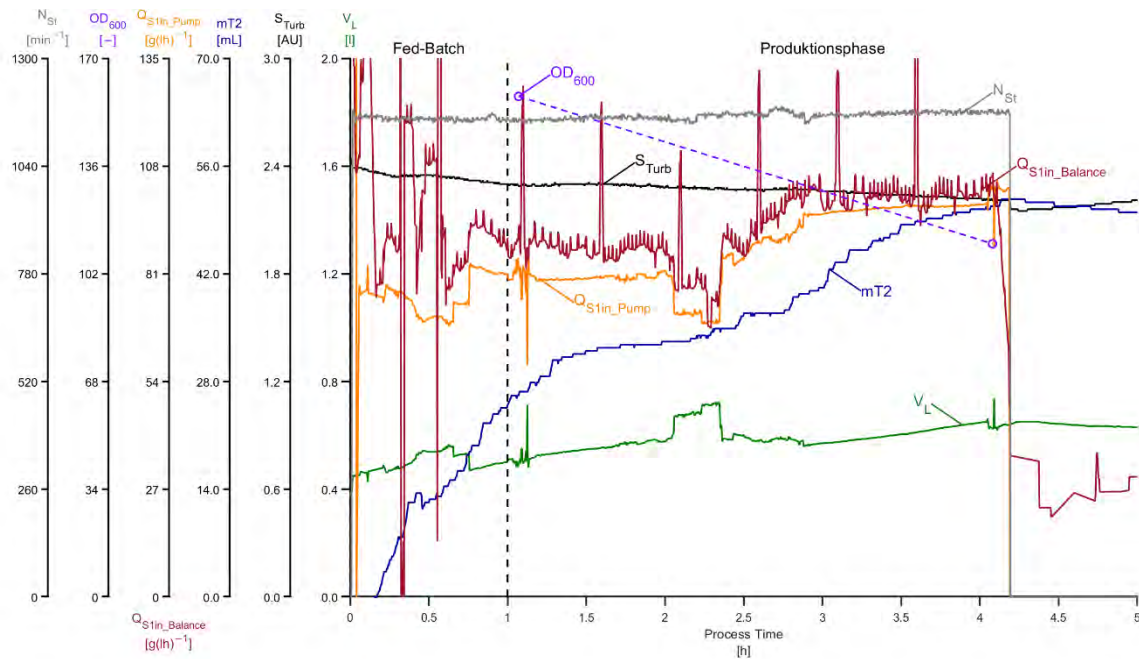


Abbildung 42: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2.3 Screeningreaktor Q2

Die Kultivierung im Q2 weist einen nahezu identischen Verlauf auf wie die Kultivierung im Q1. Der pO_2 Wert sinkt mit steigender Temperatur und die OD nimmt über den Verlauf der Kultivierung ab (siehe Abbildung 43). Die Zellkonzentration bei der ersten Probenahme liegt mit $72,3 \text{ g L}^{-1}$ etwas über dem Wert vom Q1. Dieser unterschied kann auf die leicht unterschiedlichen Volumina zurückzuführen sein. Aufgrund des Offsets im Waagensignal von Q1 lässt sich dies nicht verifizieren. Da sich die Screeningbedingungen nur in der IPTG-Konzentration unterscheiden sollten die Kultivierungen nahezu identisch sein.

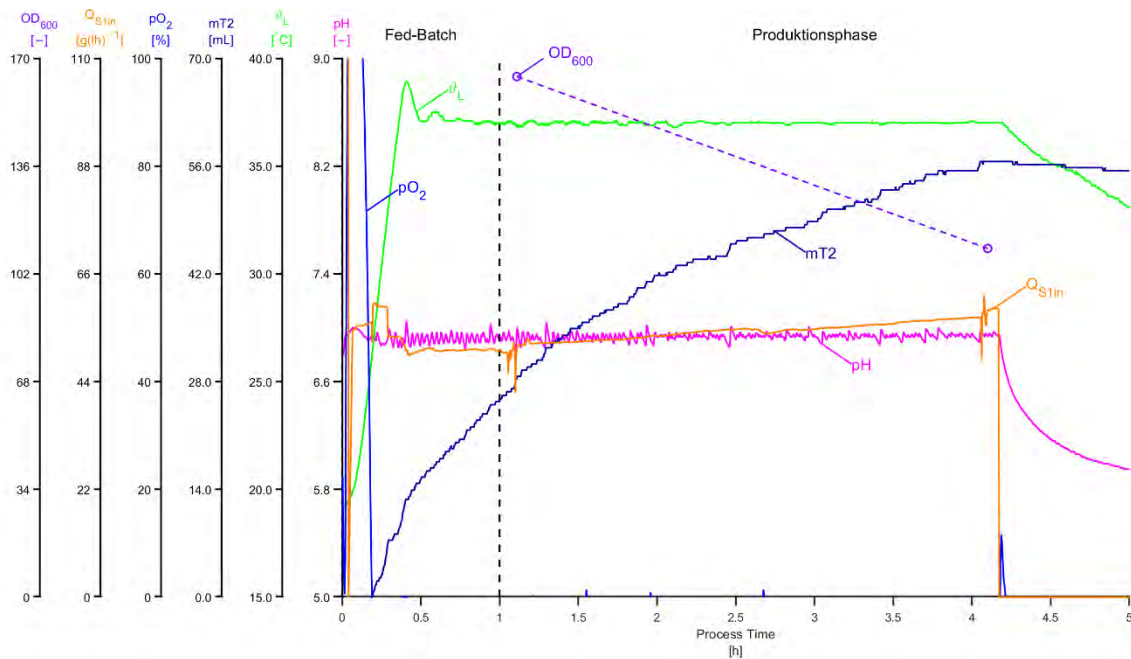


Abbildung 43: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), der gelöst Sauerstoff (pO_2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Sowohl das Waagensignal des Reservoirs als auch das des Reaktors weisen geringere Schwingungen auf als beim Q1, wodurch die berechnete volumetrische Eintragsrate geringen Schwingungen unterliegt. Wie bereits in der Kultivierung KW48, weist die volumetrische Eintragsrate von Glucose Unterschiede auf, je nach Berechnungsmethode. Der naheliegendsten Verdacht für eine solche Abweichung ist ein abweichender F_{Rmax} Wert der Pumpe, weshalb der F_{Rmax} Wert aller Pumpen der Screeningreaktoren neu bestimmt wurde.

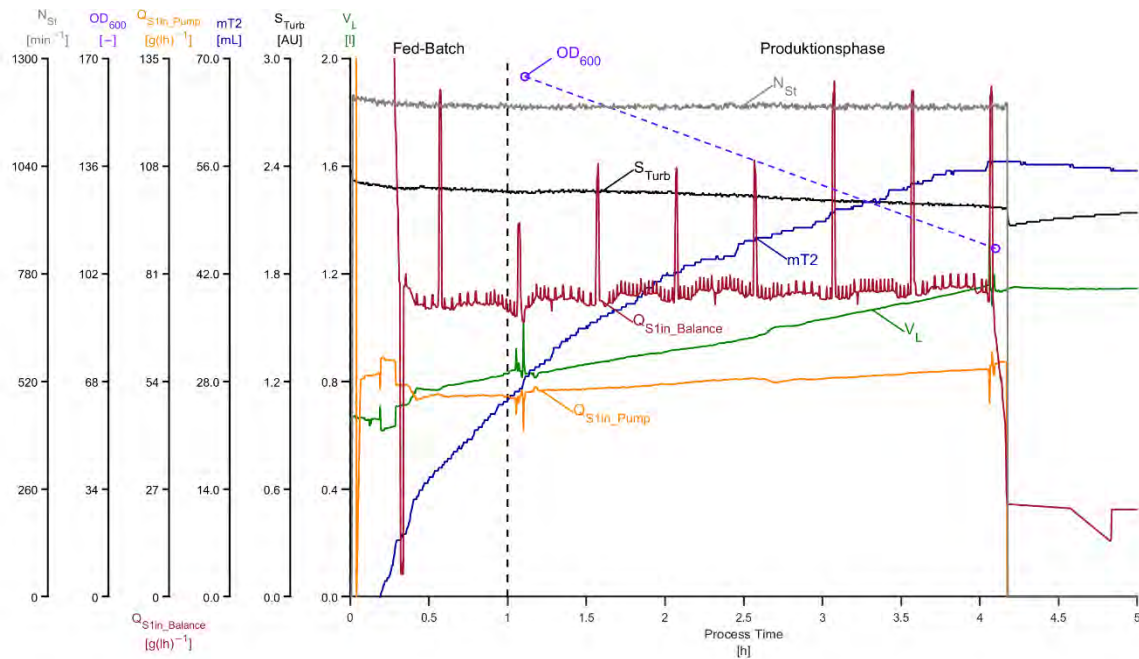


Abbildung 44: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2.4 Screeningreaktor Q3

Der pO_2 -Wert startet bei einem geringeren Wert, obwohl die Temperatur im Reaktor vergleichbar mit der im Q1 bzw. Q2 ist, somit können aktivere Zellen nicht der Auslöser sein (siehe Abbildung 45). Die Zellkonzentration zum Zeitpunkt der ersten Probenahme betrug 74 g L^{-1} und liegt somit etwas höher als beim Q1 und Q2. Bei diesem Experiment handelt es sich um ein Zentralversuch. Der Kultivierungsverlauf weist einen ähnlichen Verlauf zu den Kultivierungen KW48Q2 und KW48Q3 auf. Lediglich die OD und somit auch die Zellkonzentration liegt höher beim KW50Q3, dies ist auf die höhere Zellkonzentration im ED5 zurückzuführen. Aufgrund der Methodik zur Probenvorbereitung für die Proben für die Produktaufreinigung, sollte dies keine Probleme darstellen

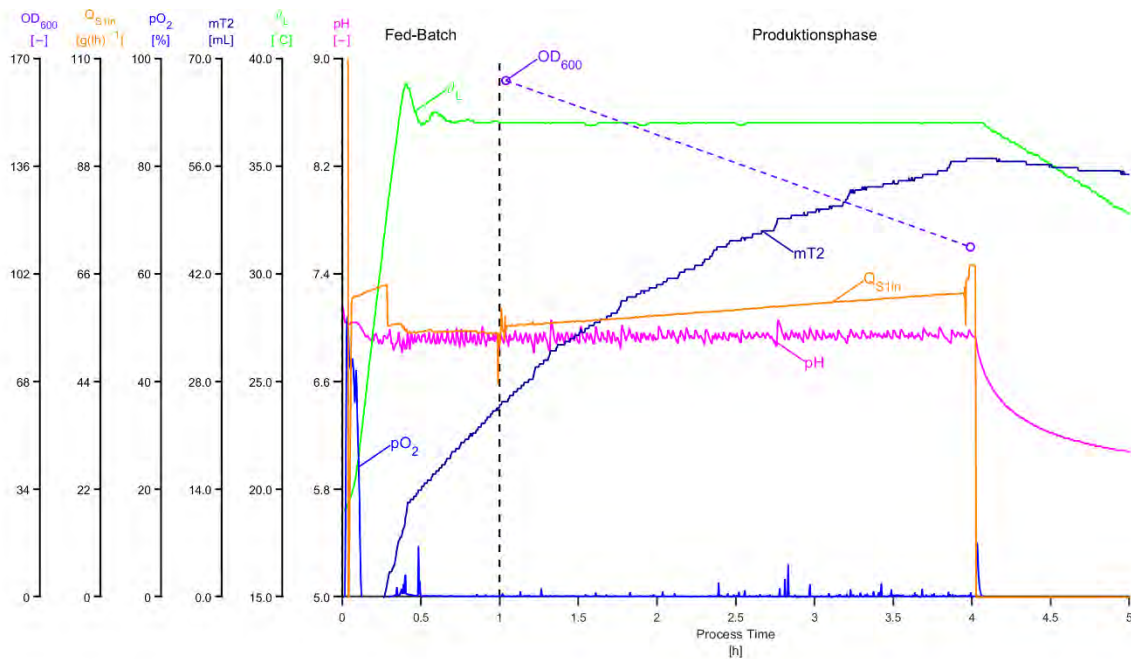


Abbildung 45: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (T_L), der Eintrag an Base (mT2), der gelöste Sauerstoff (pO_2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Aufgrund des schlechten Signals der Reservoirwaage konnte keine sinnvolle volumetrische Eintragsrate aus diesen Daten errechnet werden, weshalb diese in Abbildung 46 fehlt. Eine Darstellung mit den entsprechenden Daten ist im Anhang zu finden (siehe Abbildung 97).

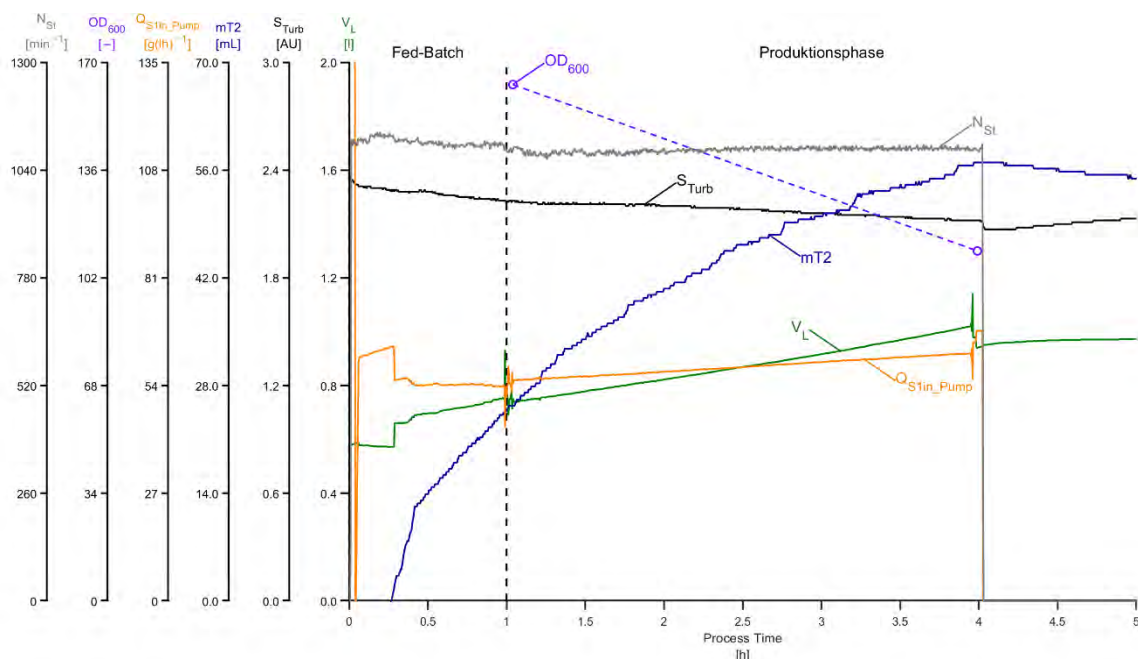


Abbildung 46: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2.5 Screeningreaktor Q5

Wie bereits im Q3, startet der pO_2 -Wert bei einem geringeren Wert und fällt somit etwas früher auf 0 %. Dieser Reaktor weist mit $74,6 \text{ g L}^{-1}$ die höchste Zellkonzentration auf zum Zeitpunkt der ersten Probenahme. Abseits davon ist der Verlauf vergleichbar mit denen der anderen Reaktoren (siehe Abbildung 47). Leichte Unterschiede können durch die unterschiedlichen Screeningbedingungen hervorgerufen werden, da diese neben der Produktproduktion auch das Wachstum der Zellen an sich beeinflussen können.

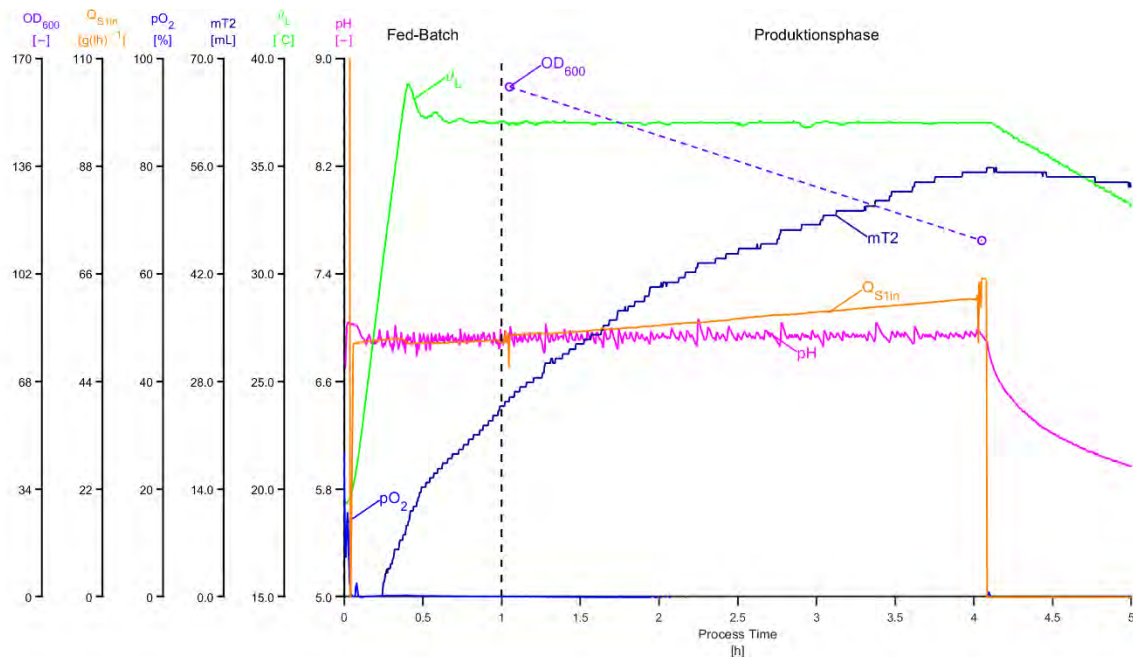


Abbildung 47: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base ($mT2$), der gelöst Sauerstoff (pO_2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Erneut gibt es Auffälligkeiten im Waagensignal des Reservoirs (siehe Abbildung 48). Die Zellen im Reaktor sollen mit der eingestellten Wachstumsrate wachsen. Dies wird gewährleistet wird die exponentielle Erhöhung der Pumprate. Dadurch steigt ebenfalls die volumetrische Eintragsrate. Durch die Berücksichtigung des Reaktorvolumens, ist der Anstieg kleiner als bei der Pumprate. Dieser Anstieg ist in der volumetrischen Eintragsrate sichtbar. Dies ist unabhängig von der Berechnungsart. In dieser Kultivierung ist die volumetrische Eintragsrate nahezu konstant, wenn die Berechnung auf dem Waagensignal der Reservoirwaage beruht. Dieses Verhalten weicht von der volumetrischen Eintragsrate, beruhend auf der Pumprate, ab. Dies wäre nur möglich, wenn sich die Dichte des Feedmediums oder sich die maximale Pumprate der Feedpumpe im Verlaufe der Kultivierung verändert hätte. Was als sehr unwahrscheinlich erachtet werden kann.

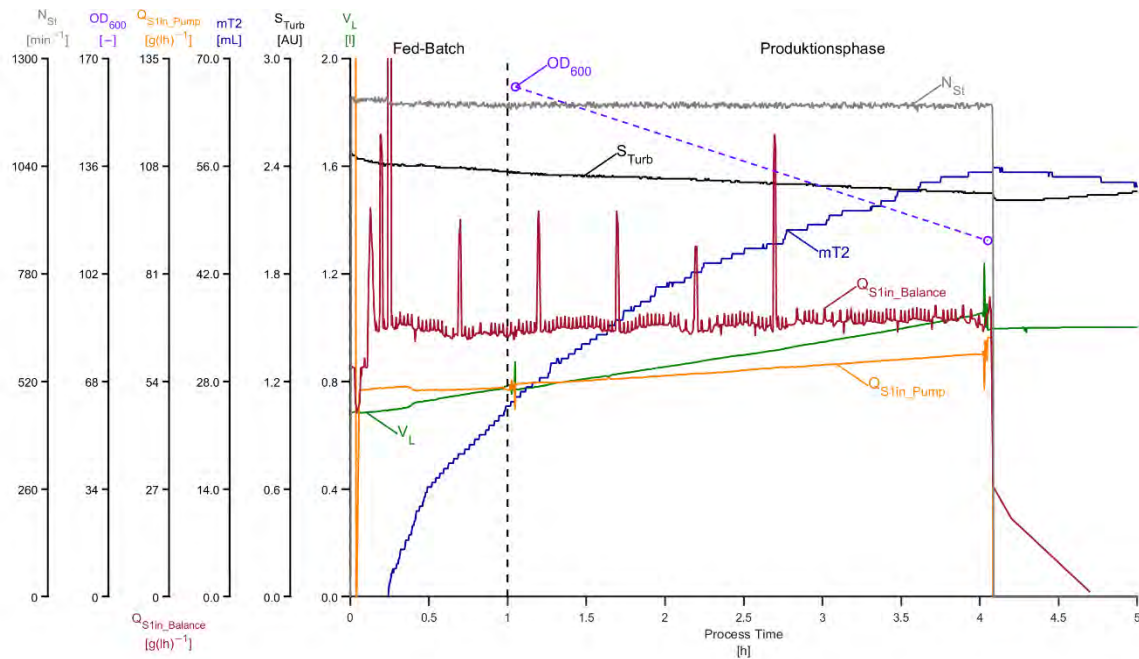


Abbildung 48: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.2.6 Screeningreaktor Q6

Der gelöste Sauerstoff war nahezu zu Beginn der Kultivierung bereits auf 0 % gefallen, weswegen dieser nicht in der Abbildung 49 dargestellt ist. Nach 1,7 h fällt der pH-Wert auf 6,15 ab (siehe Abbildung 49). Für diesen Abfall gibt es keinen ersichtlichen Grund. Die pH-Sonde befindet sich im Reaktor selbst und sollte daher vor externen Störungen geschützt sein. Die Säure wird bei diesen Reaktoren nicht überwacht. Somit könnte die Regelung Säure in den Reaktor gepumpt haben, was das Absinken des pH-Wertes erklären würde. Dafür gibt es für die Regelung eigentlich keinen Anlass. Um den pH-Wert auszugleichen, pumpt die Regelung Base in den Reaktor, weswegen $mT2$ sprunghaft ansteigt. Durch das starke Zupumpen von Base steigt der pH-Wert zu stark an, was den Anstieg in diesem erklären würde. Eine entsprechende Volumenzunahme ist im Reaktorvolumen nicht festzustellen, wobei diese kleinen Volumina ggf. in der Abweichung verschwinden. Darüber hinaus sinkt das $mT2$ Signal nach 16,5 min wieder ab, was kein Sinn ergibt, denn dies wäre mit einem Rauspumpen aus dem Reaktor in die Baseflasche gleichzusetzen. Die Steigung in diesem Zeitintervall passt nicht zu der bisherigen Steigung. Zu dem Zeitpunkt war keiner an der Anlage, was eine externe menschliche Störung ausschließt, außerdem könnte diese nur das Phänomen im $mT2$ Signal erklären, nicht aber das Verhalten des pH-Wertes. Somit ist das Phänomen in den Daten wahrscheinlich auf fehlerhaften Daten zurückzuführen oder eine nicht erkennbare Störung. Auch in

dieser Kultivierung unterliegt das Signal der Reservoirwaage einer hohen Schwankung (siehe Abbildung 50). Im Zeitraum von 0,54 h bis 1,29 h weist das Signal der Trübungssonde einen auffälligen Anstieg auf, welcher sich nicht durch z.B. die Rührerdrehzahl erklären lässt. Wahrscheinlich hat sich ein Partikel im Strahlengang der Trübungssonde, für dieses Zeitintervall, festgesetzt.

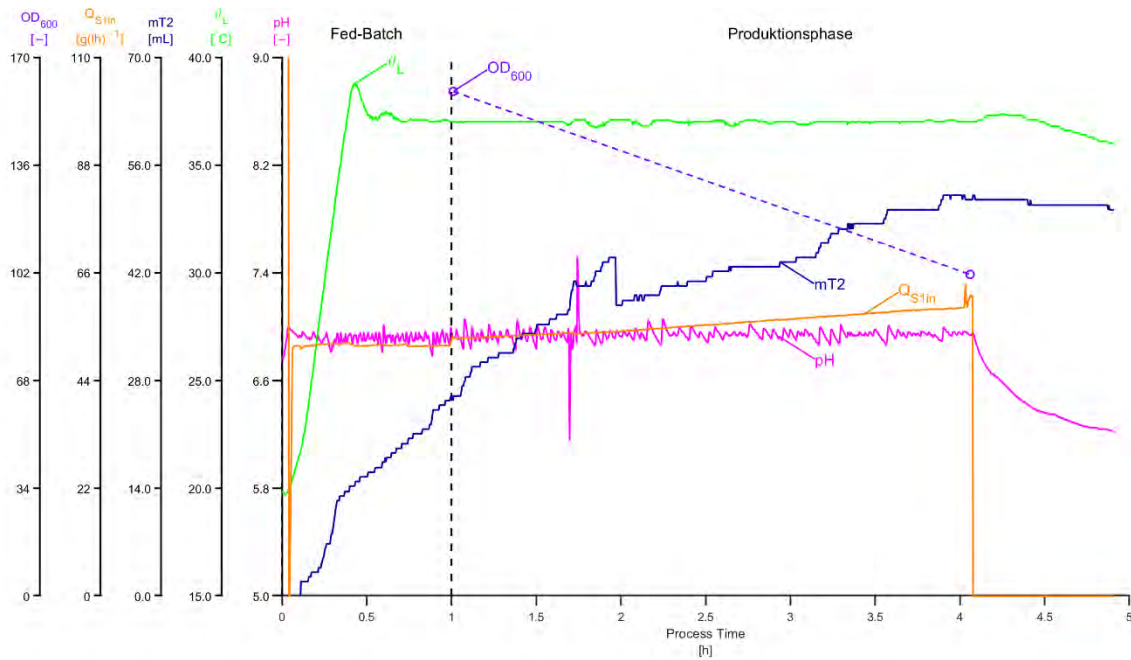


Abbildung 49: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q6 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

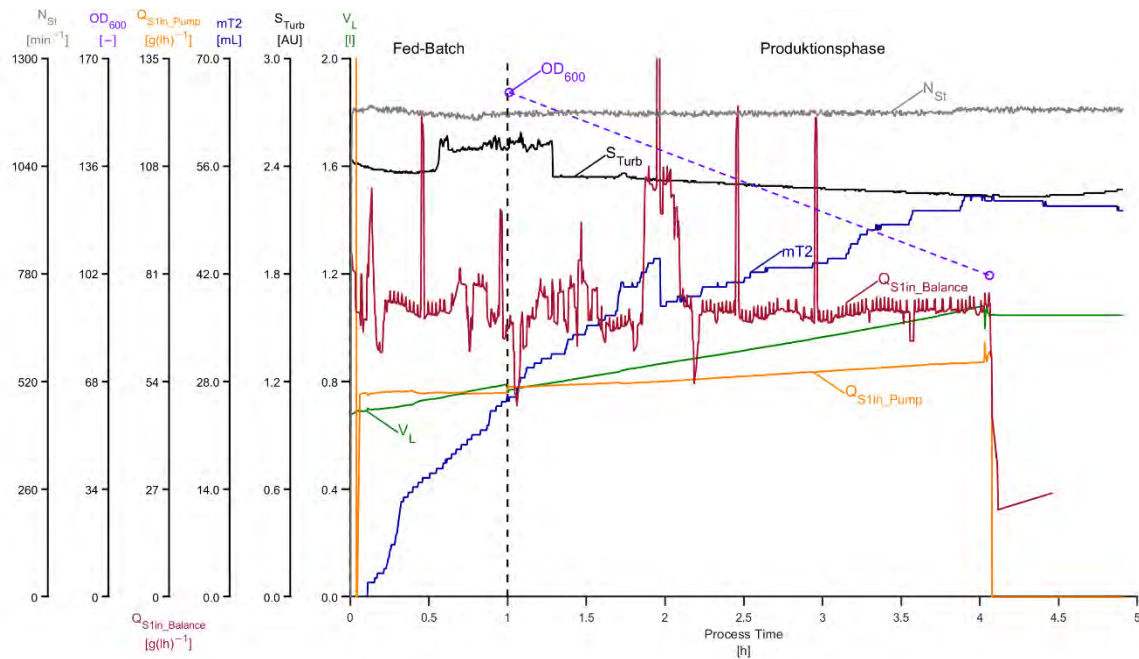


Abbildung 50: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q6 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.3 Kultivierung KW02

5.1.3.1 ED5

Ausgehend von den Ergebnissen der vorherigen Kultivierungen wurden die Reglereinstellungen für die Batch und Fed-Batch Phase auf $X_p=500$ und $T_i=200$ festgelegt. Sobald der Gasmix zu 2 L min^{-1} aus Sauerstoff besteht, wechseln die Reglerparameter auf $X_p=800$ und $T_i=800$. Dies ist nach 16,2 h eingetreten (siehe Abbildung 51). Mit diesen Einstellungen benötigt die Regelung sehr lange um sich einzuschwingen, was sich für diesen Prozess nur bedingt eignet. Zum Ende der Kultivierung wird der Gasmix in kurzen Intervallen angepasst, um den Sauerstoffbedarf der Zellen gerecht zu werden. Dafür ist die Regelung zu langsam, dennoch kommt es zu keiner Unterversorgung von Sauerstoff. Die maximale Wachstumsrate in der Batch Phase lag mit $0,57 \text{ h}^{-1}$ zwischen den beiden bisherigen Kultivierungen. Die vier Schüttelkolben der Vorkultur wiesen große Unterschiede zueinander auf. Jeweils zwei Schüttelkolben mit geringeren ODs von um die 3,4 und zwei mit höheren ODs um die 4,2. Dies kann ein Indiz für unterschiedliche Temperaturzonen innerhalb des Inkubators sein. Nach dem Vermengen ergab sich eine OD von 3,9 für das Inokulum. Damit lag die OD des Inokulums zwischen den ODs der anderen beiden Inokulums, was sich im Zellwachstum widerspiegelt.

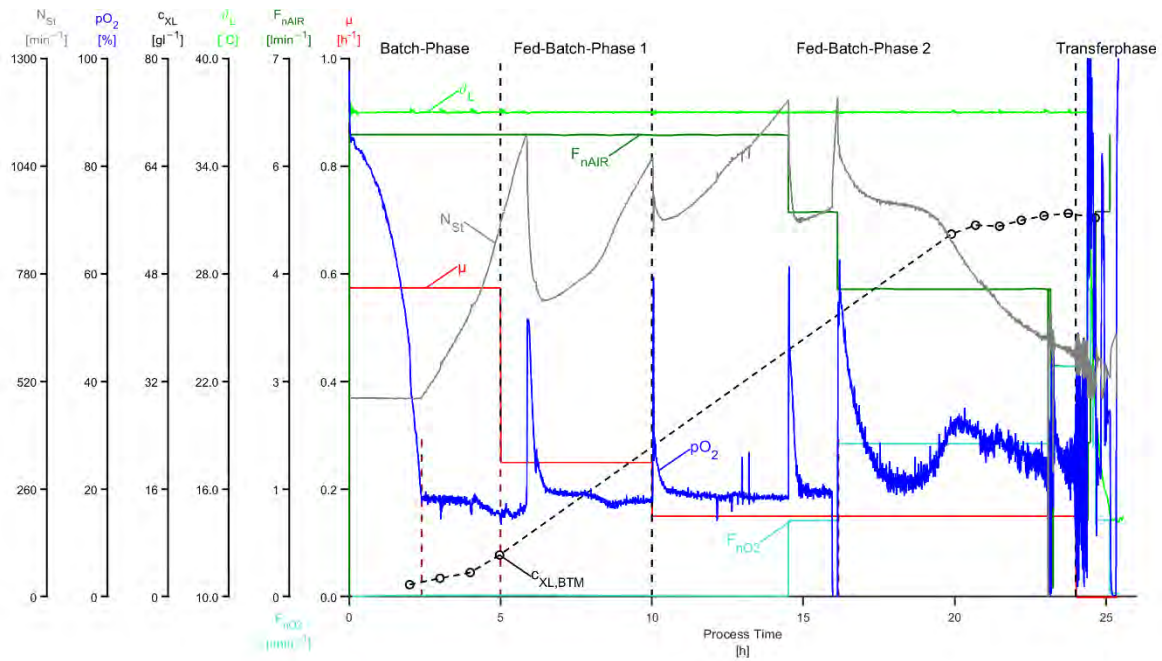


Abbildung 51: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW02. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), die Begasungsrate mit Luft (F_{nAIR}) und Sauerstoff (F_{nO_2}), die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), die Zellkonzentration bestimmt über die BTM (c_{XL}), der gelöst Sauerstoff (pO_2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

Vor der Kultivierung ist die Waage des Reservoirs ausgefallen, weshalb auf eine andere Waage ausgewichen werden musste. Diese ist im Verlaufe des Prozesses, über Nacht, ausgefallen, weswegen diese Daten fehlen bzw. fehlerhaft sind. Gemäß der Daten der Feedpumpe gab es beim Zufütterprofil keine Probleme, dennoch ist das Reaktorvolumen im Verlauf der zweiten Fed-Batch Phase geringer angestiegen als erwartet (siehe Abbildung 52). Somit kann das Zufütterprofil nicht allumfänglich durchgelaufen sein. Aufgrund der fehlenden bzw. fehlerhaften Daten der Reservoirwaage, lässt sich dies nicht näher festlegen. Das geringere Zupumpen von Feedmedium hat mehrere Konsequenzen. Einerseits wurden weitgeringere Zelldichten im Reaktor erreicht, andererseits reichte das Volumen im Reaktor nichts aus, um alle Screeningreaktoren mit ausreichend Zellen zu versorgen.

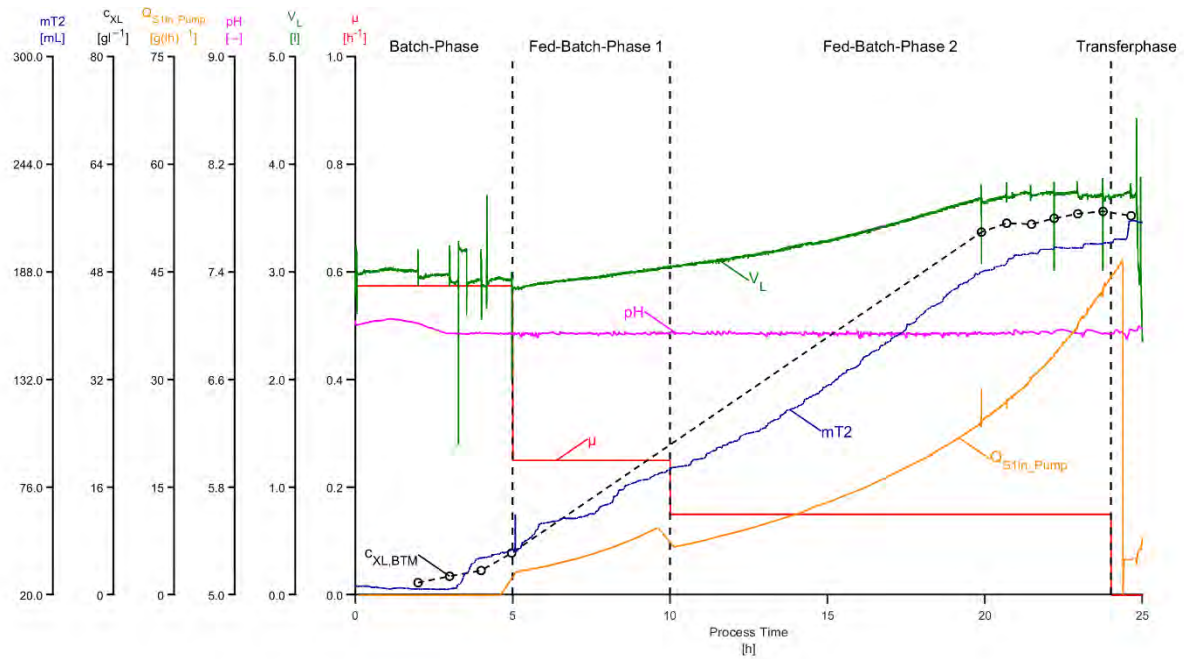


Abbildung 52: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW02. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), das Volumen der Flüssigkeitsphase im Reaktor (V_L), der pH-Wert, die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}) und der Eintrag an Base (mT2).

Das geringere Wachstum der Zellen spiegelt sich in der Zellkonzentration, dem Signal der Trübungssonde und dem Baseverbrauch wider, welche alle unterhalb der bisherigen Kultivierungen liegen (siehe Abbildung 53). Aufgrund von zwei high Foam Alarmen, hat sich die Transferphase leicht nach hinten verschoben.

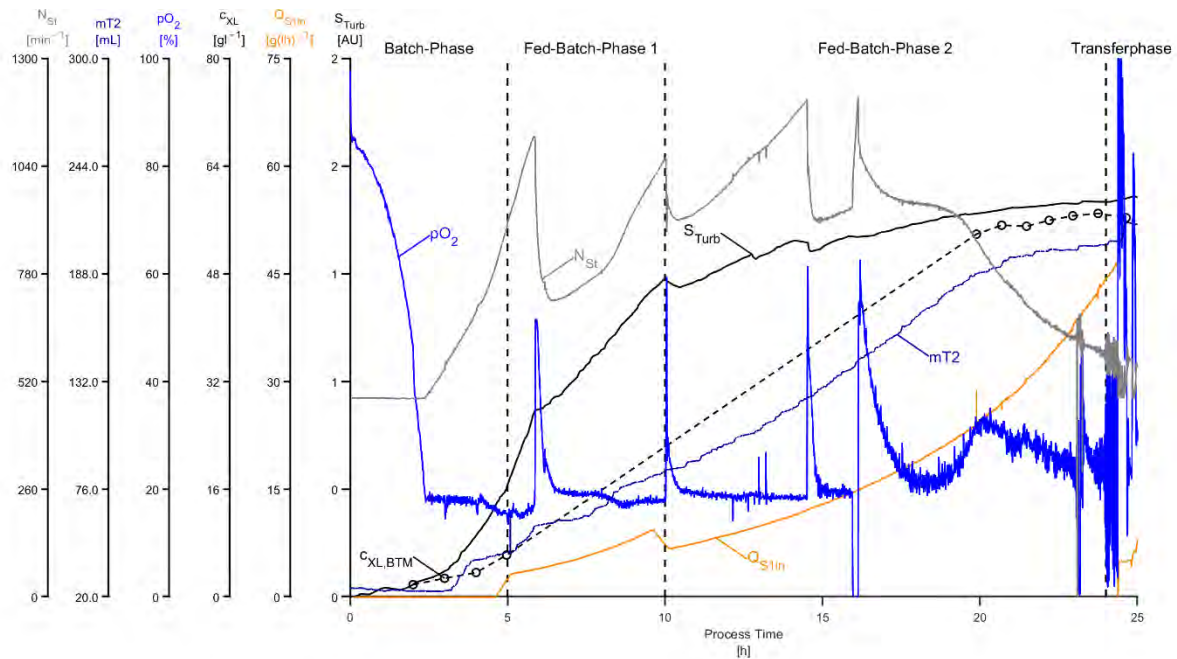


Abbildung 53: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierungen der KW02. Dargestellt ist der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}), der gelöste Sauerstoffwert (pO_2), der Eintrag an Base (mT2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.3.2 Screeningreaktor Q1

Der pO_2 -Wert beginnt beim Transfer bei einem Wert von über 1000 % und fällt dann innerhalb von Minuten auf 0 % (siehe Abbildung 54). Die pO_2 -Sonde wurde gegen Luft als 100 %-Wert kalibriert. Bei der Kultivierung wird der Reaktor mit einem Gemisch aus Luft und reinem Sauerstoff begast, weshalb der Wert über dem kalibrierten Wert liegt, da die Sonde den relativ gelösten Sauerstoff anzeigt. Die Flüssigphase wird im Reaktor schnell erwärmt, wodurch die Zellen aktiviert werden und deren Stoffwechselaktivität wieder zunimmt. Dadurch sinkt der gelöste Sauerstoffgehalt. Abgesehen von der geringeren OD bei der ersten Probenahme, weist diese Kultivierung einen ähnlichen Verlauf wie die anderen Zentralpunkte auf. Die geringere OD ist auf die geringere OD zum Ende der Kultivierung im ED5 zurückzuführen.

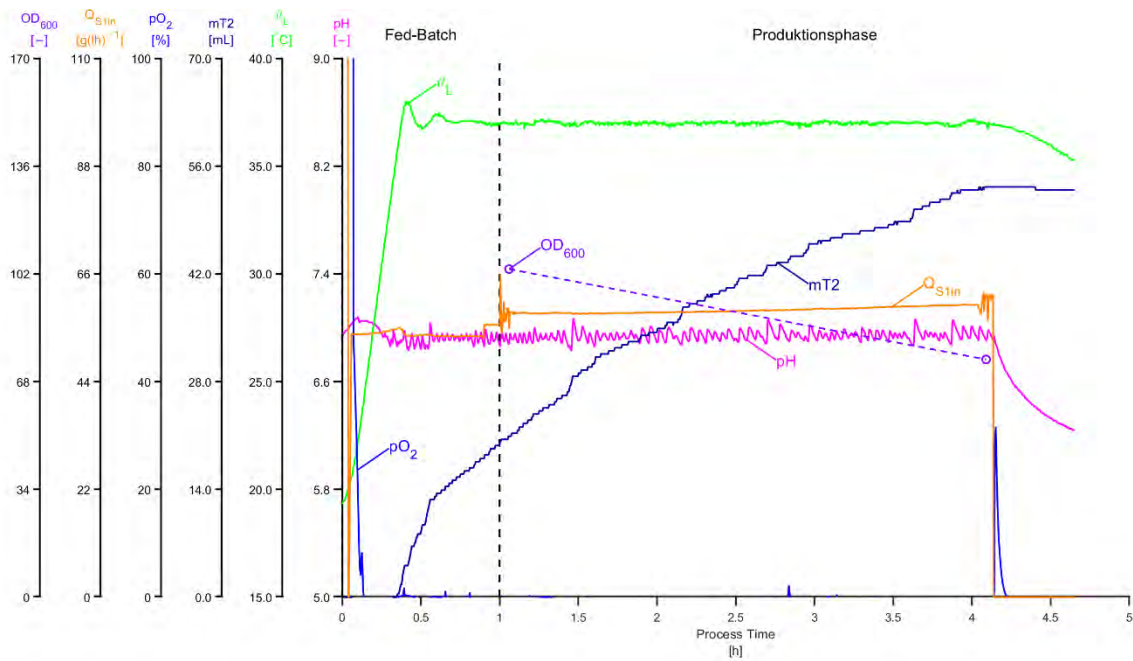


Abbildung 54: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Trotz des erneuten Bestimmen des F_{Rmax} Wertes der Feedingpumpe, gibt es noch Abweichungen zum F_{Rmax} Wertes bei der Kultivierung (siehe Abbildung 55). Zum Beginn der Kultivierung im Screeningreaktor erfasst die Waage ein Gewicht von 660 g. Die Waage wurde kurz vor dem Transfer der Zellen tariert. In jedem Reaktor wurde ein Volumen von 90 mL vorgelegt, welches sich je nach Experiment in der Zusammensetzung unterscheidet. Dieses ist im Gewicht nicht erfasst. Somit unterliegt die Waage einem negativen Offset von 90 g. Dadurch befindet sich zum Beginn der Kultivierung ein Volumen von 750 mL im Reaktor. Dies entspricht den Erwartungen.

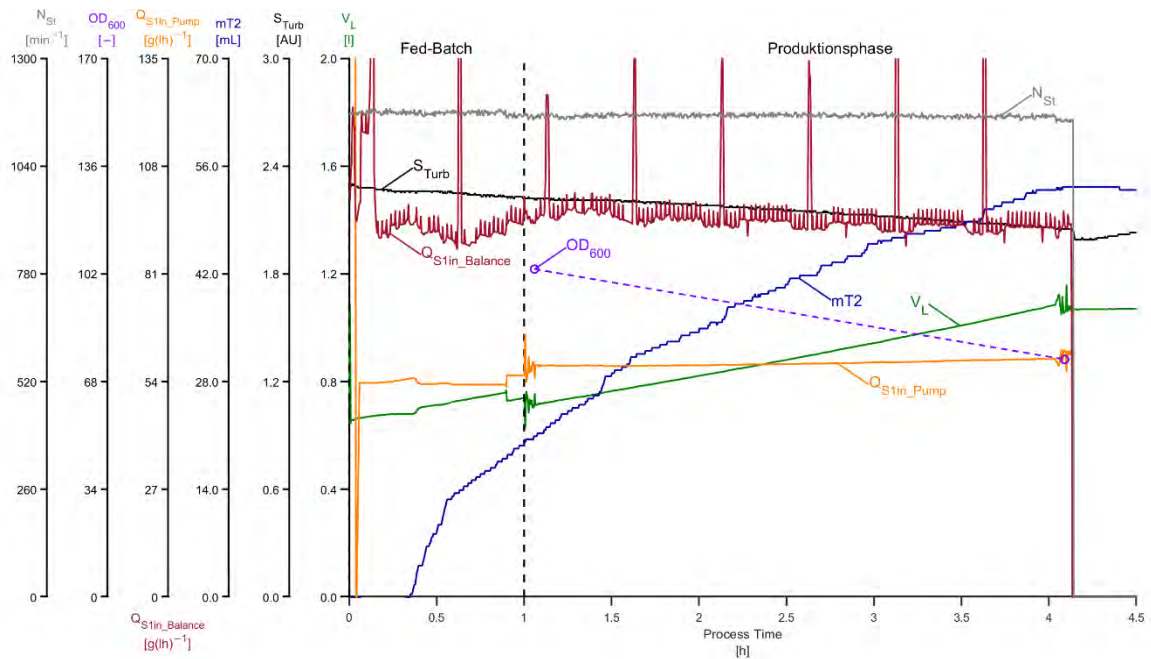


Abbildung 55: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.3.3 Screeningreaktor Q2

Trotz ähnlicher OD-Werte bei der ersten Probenahme, nimmt der OD-Wert in dieser Kultivierung weniger ab als in der Kultivierung im Screeningreaktor Q1 (siehe Abbildung 56). Dies kann auf verschiedenen Einflussfaktoren zurückzuführen sein, unter anderem die unterschiedlichen Screeningbedingungen. Wahrscheinlich ist es auf unterschiedliche Verdünnung durch das Feedmedium zurückzuführen, denn die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus dem Waagensignal liegt niedriger als beim Screeningreaktor Q1. Die Unregelmäßigkeiten im Signal der volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate ist auf Unregelmäßigkeiten im Waagensignal des Bioreaktors zurückzuführen (siehe Abbildung 57)

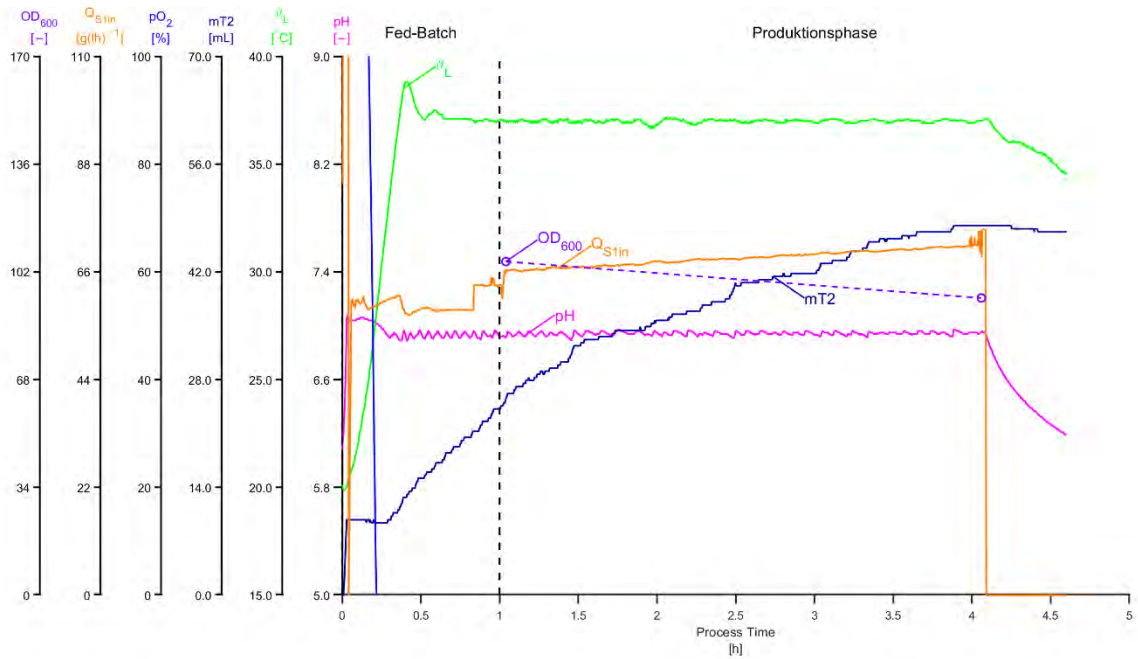


Abbildung 56: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

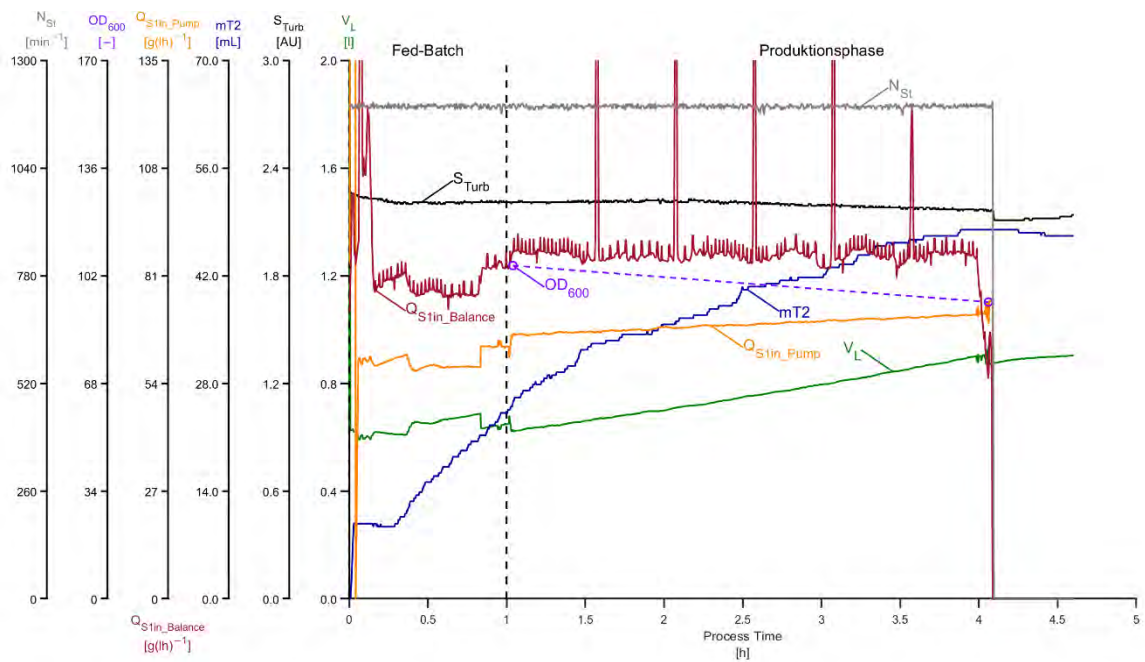


Abbildung 57: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.3.4 Screeningreaktor Q3

Direkt nach dem Transfer der Zellen wird die Kultivierung in MFCS gestartet. Zum Beginn pumpt die Feedpumpe für 2 min bei 100% Leistung, dadurch entstehen die Ausschläge in der volumetrischen Eintragsrate von Glucose (siehe Abbildung 58 und Abbildung 59)

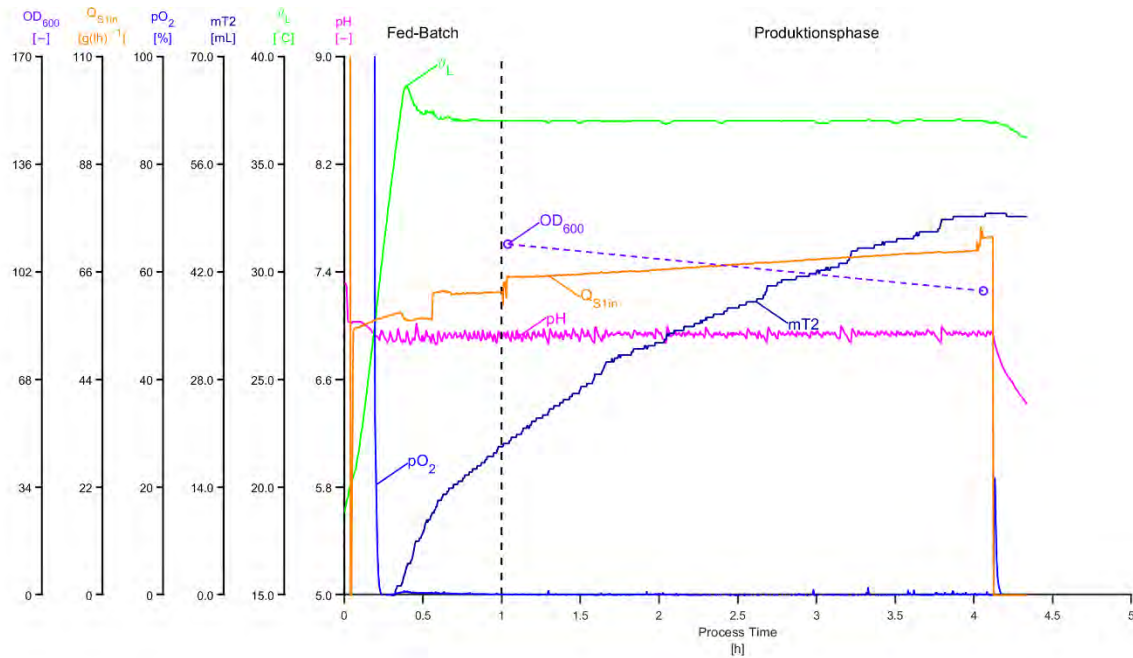


Abbildung 58: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (θ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

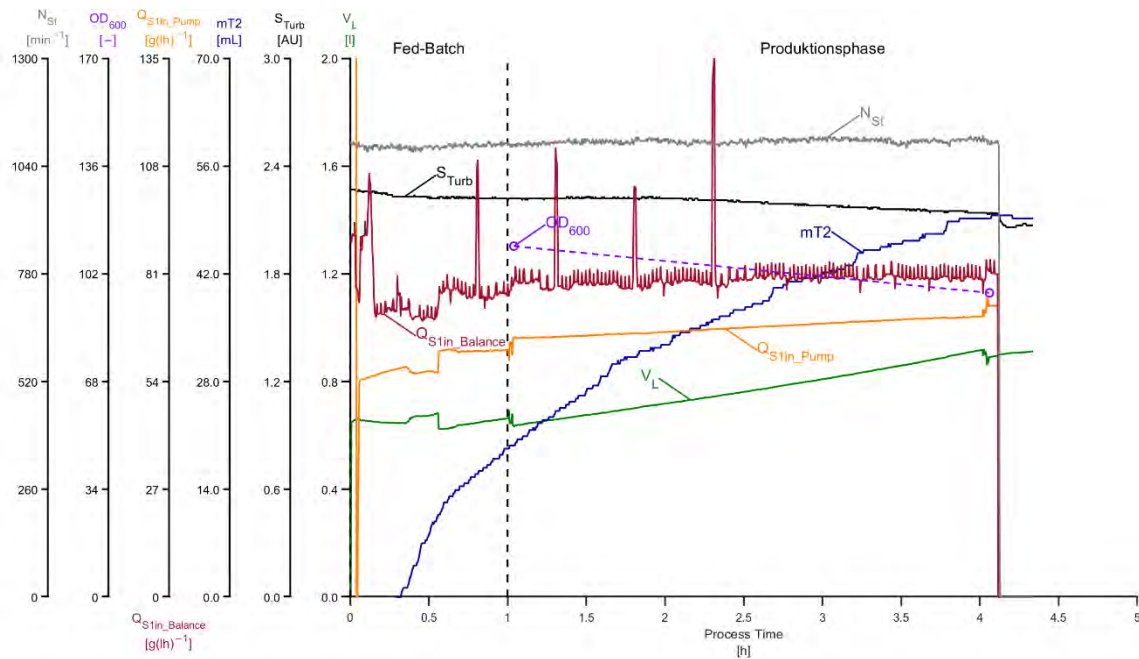


Abbildung 59: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{Sf}).

5.1.3.5 Screeningreaktor Q4

Nach 0,52 h fällt das Waagensignal des Reaktors ab, wodurch die volumetrischen Eintragsraten zu diesem Zeitpunkt einen Ausschlag aufweisen. Nach 3,3 h steigt das Volumen im Bioreaktor außergewöhnlich stark an. Dieser Anstieg hält für ca. 8 Minuten an. In dieser Zeit nimmt das Volumen um ca. 100 mL zu. Dieser Anstieg im Volumen spiegelt sich im Absinken der volumetrischen Eintragsrate wider (siehe Abbildung 60 und Abbildung 61). Aufgrund der starken Abweichung vom gemessenen F_{Rmax} Wert zum tatsächlichen Wert der Pumpe, wurde viel Volumen in den Reaktor gepumpt. In Kombination mit der hohen Rührerdrehzahl, wurde die Levelsonde erreicht. Dadurch wurde AF in den Reaktor gepumpt, was für den Anstieg im Volumen verantwortlich ist. Antifoam kann das Wachstum und die Ausbeute an rekombinanten Proteinen beeinflussen (Rosano und Ceccarelli 2014). Gleichzeitig kann es die Probennahme beeinflussen und kann Einfluss auf die OD haben. All diese Faktoren können zu fehlerhaften Ergebnissen führen und müssen in der Auswertung des DOEs berücksichtigt werden. Durch den späten Zeitpunkt sollte der Einfluss auf das Wachstum gering sein, dennoch kann der Einfluss des Antifoams auf die OD signifikant sein. Ein Großteil des AFs in der Probe konnte nach der ersten Zentrifugation, zusammen mit dem Überstand, entfernt werden und sollte somit maximal einen kleinen Einfluss auf die Aufreinigung haben.

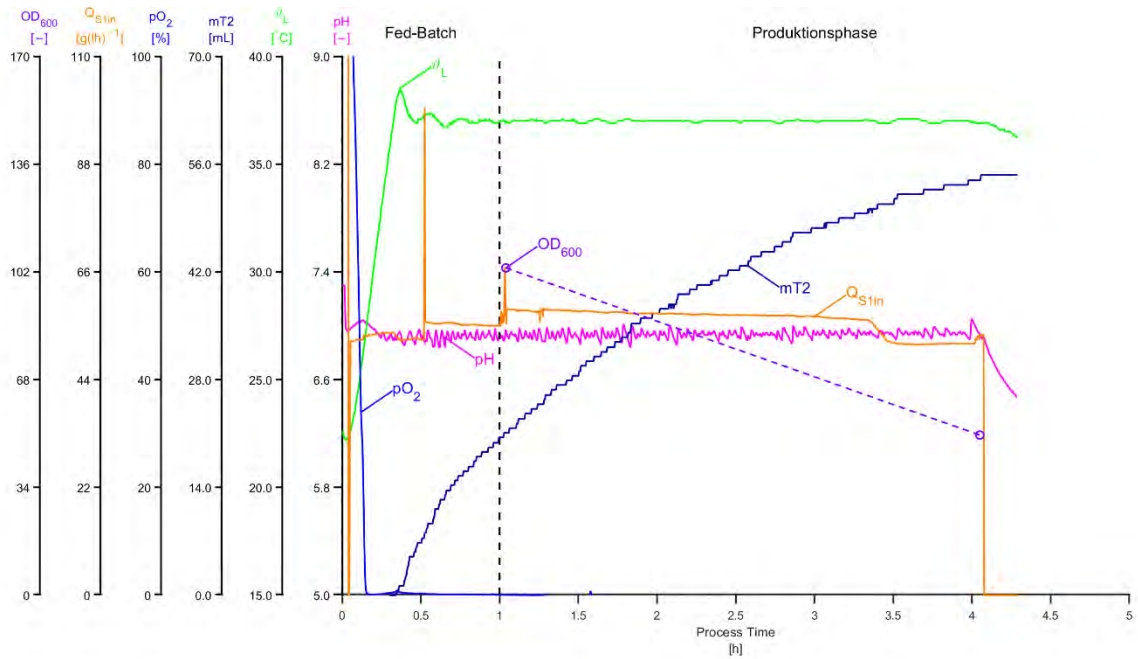


Abbildung 60: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q4 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

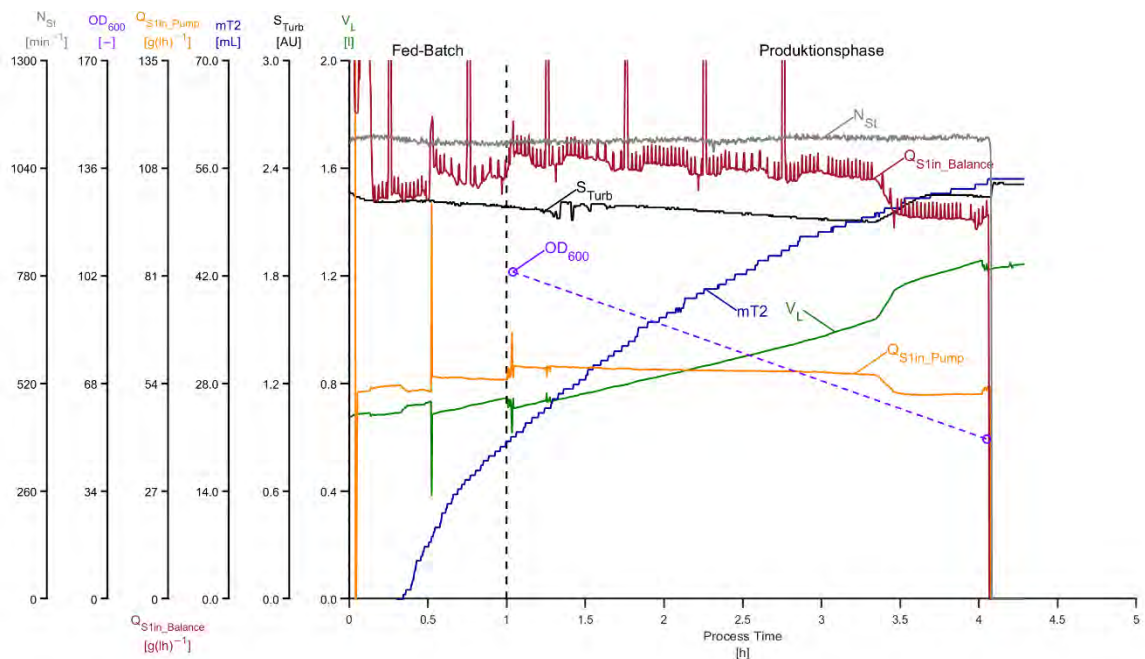


Abbildung 61: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q4 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{Si}).

5.1.3.6 Screeningreaktor Q5

Im Signal der Waage des Reaktors ist ebenfalls vor der Produktionsphase ein kurzes Absinken festzustellen, was aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Reaktoren zueinander nicht verwunderlich ist. Dies ist wahrscheinlich auf den gleichen externen Faktor zurückzuführen. Außerdem ist die gleiche Problematik bezüglich der Levelsonde, wie in Screeningreaktor Q4, aufgetreten. Auch in diesem Reaktor wurde zum Ende der Produktionsphase ca. 100 mL Antifoam zugepumpt. Den Einfluss des Antifoams auf die Trübungssonde zeichnet sich durch den Anstieg des Trübungssignals ab. Es erreicht einen Wert oberhalb des Startwertes. Dennoch ist dieser Effekt nicht in der offline OD-Messung zu beobachten, zu mindestens nicht in den gleichen Ausmaßen.

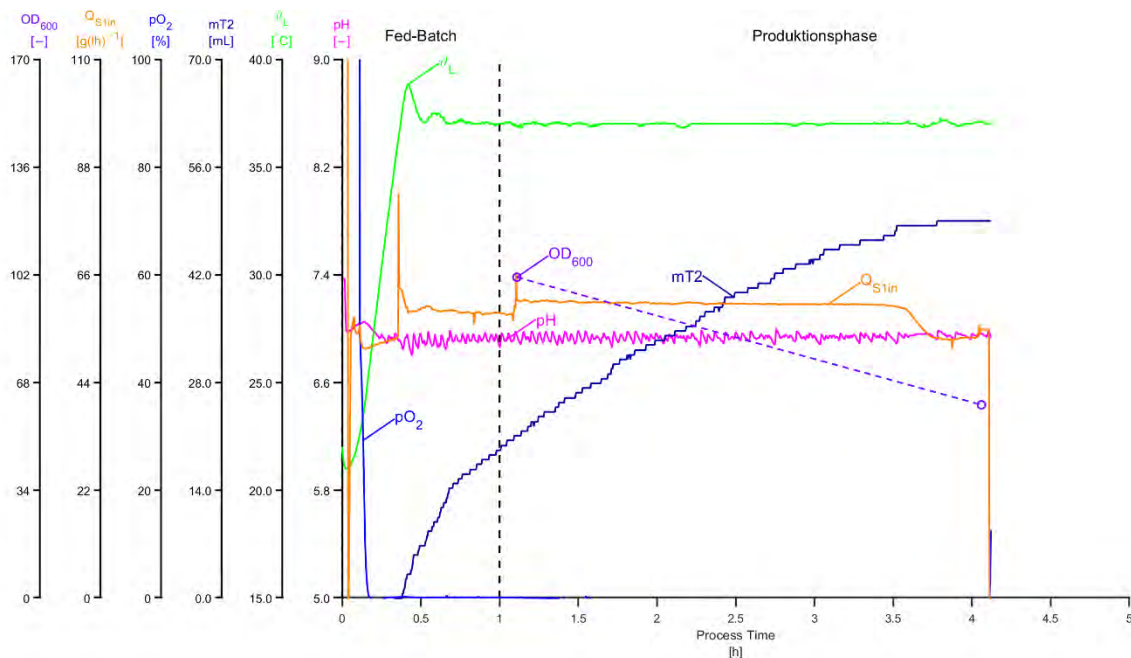


Abbildung 62: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (T_L), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

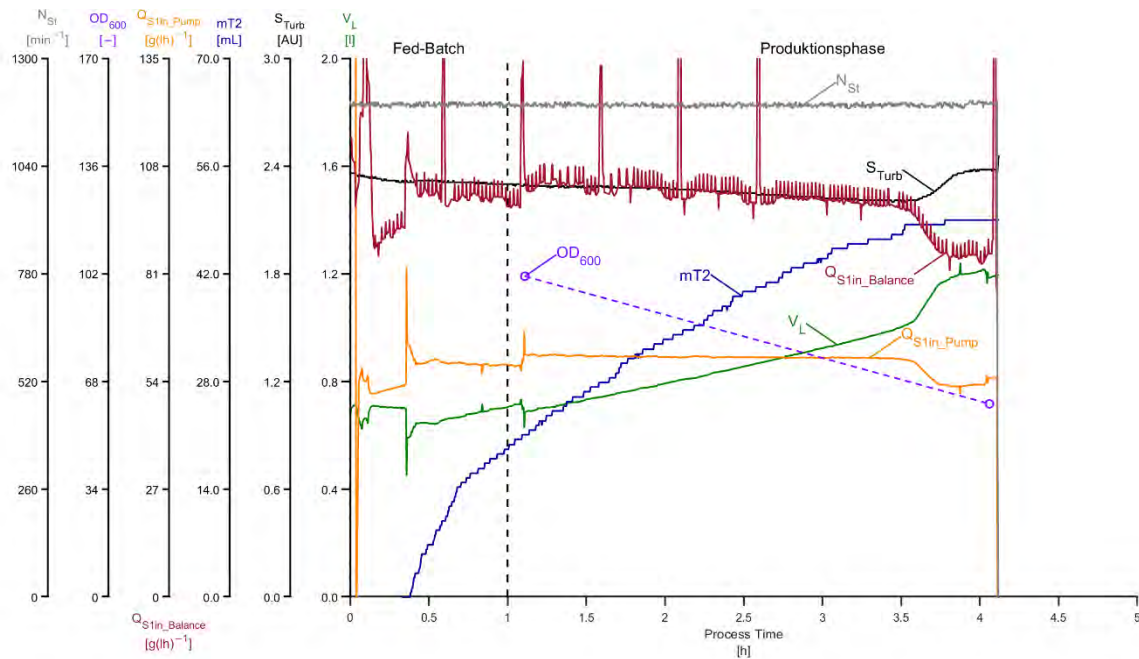


Abbildung 63: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW02. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4 Kultivierung KW04

5.1.4.1 ED5

Die Zellen weisen innerhalb der Batch-Phase eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von 0,595 auf. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Kultivierung in KW02. Dennoch liegt er unter dem μ_{max} der Kultivierung in der KW50. Somit wird das Substrat im Batchmedium später aufgebraucht als in der KW50. Bereits nach 9,5 h wurde der Gasmix angepasst, wodurch dieser aus 5 L min^{-1} Luft und 1 L min^{-1} Sauerstoff besteht (siehe Abbildung 64). Bei den anderen Kultivierungen geschieht dies erst nach ca. 15 h. Nach 21,7 h besteht der Gasmix zu 5 L min^{-1} aus reinem Sauerstoff, dennoch kann der Sauerstoffbedarf der Zellen nicht gedeckt werden, weswegen der Anteil an Luft erhöht wurde. Dies war notwendig, da 5 L min^{-1} die maximale Sauerstoffbegasungsrate des Systems darstellt. Nach 22,3 h wurde der Anteil von Luft auf 2 L min^{-1} erhöht, somit erhöhte sich die gesamte Begasungsrate von 6 L min^{-1} auf 7 L min^{-1} . Im Anschluss wurde der Anteil von Luft auf 3 L min^{-1} erhöht. Trotz der Anpassungen der Begasungsrate und des Gasmix reichte der Gaseintrag nicht aus, um den Bedarf der Zellen zu decken, weswegen die Wachstumsrate auf $0,075 \text{ h}^{-1}$ verringert wurde. Bei dieser Wachstumsrate reichte der Sauerstoffeintrag aus, um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern.

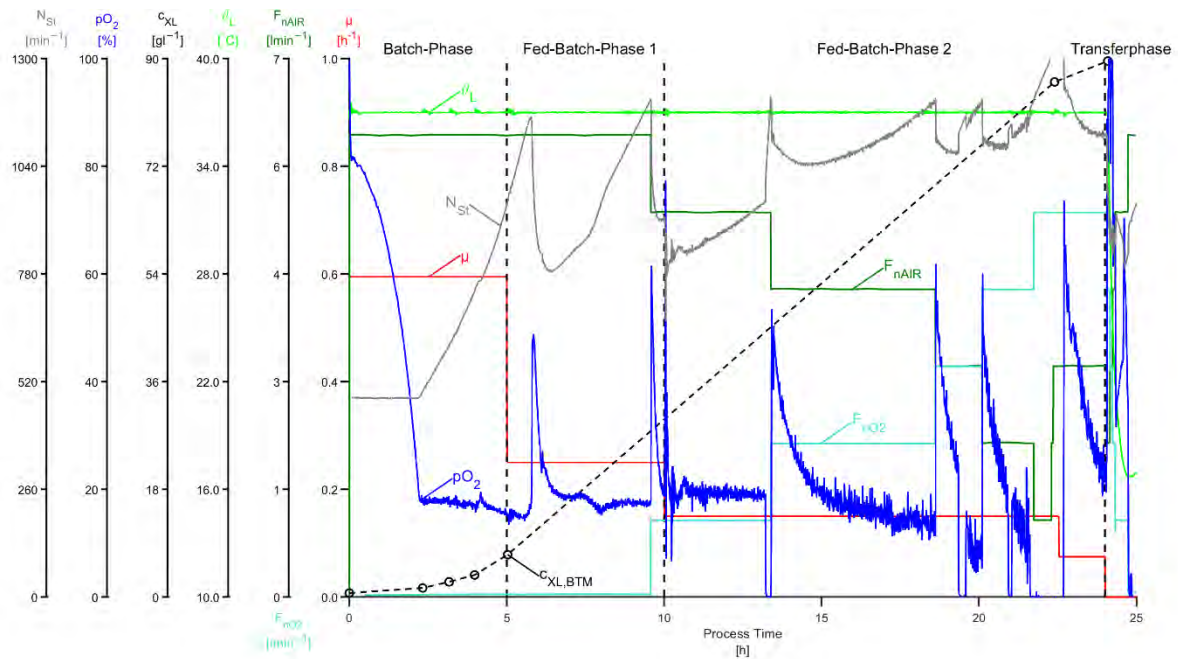


Abbildung 64: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW04. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), die Begasungsrate mit Luft (F_{nAir}) und Sauerstoff (F_{nO_2}), die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (θ_L), die Zellkonzentration bestimmt über die BTM (c_{XL}), der gelöste Sauerstoff (pO_2) und die Rührerdrehzahl (N_{St}).

Es ist unwahrscheinlich, dass sich der Sauerstoffbedarf pro Zelle bei gleicher Wachstumsrate geändert hat. Die Zellkonzentration im Reaktor liegt sogar höher als bei der Kultivierung KW50. Durch die Abweichung zwischen der theoretischen volumetrischen Glucoseeintragsrate (berechnet aus der Pumprate) und der tatsächlichen volumetrischen Glucoseeintragsrate (berechnet aus dem Waagensignal), sind die Zellen in den jeweiligen Fed-Batch-Phasen schneller gewachsen als vorgesehen (siehe Abbildung 65). Dadurch wurde eine höhere Zellkonzentration erreicht. Durch eine höhere Wachstumsrate nimmt auch der Sauerstoffbedarf zu, da dieser durch die Wachstumsrate beeinflusst wird. Durch die hohe Zellkonzentration und die erhöhte Wachstumsrate, war der Sauerstoffbedarf signifikant höher. Für solche Abweichungen und generelle Batch to Batch Variabilität, wurden jedem Screeningdurchlauf Zentralpunkte hinzugefügt, damit diese Abweichungen im Modell berücksichtigt werden können.

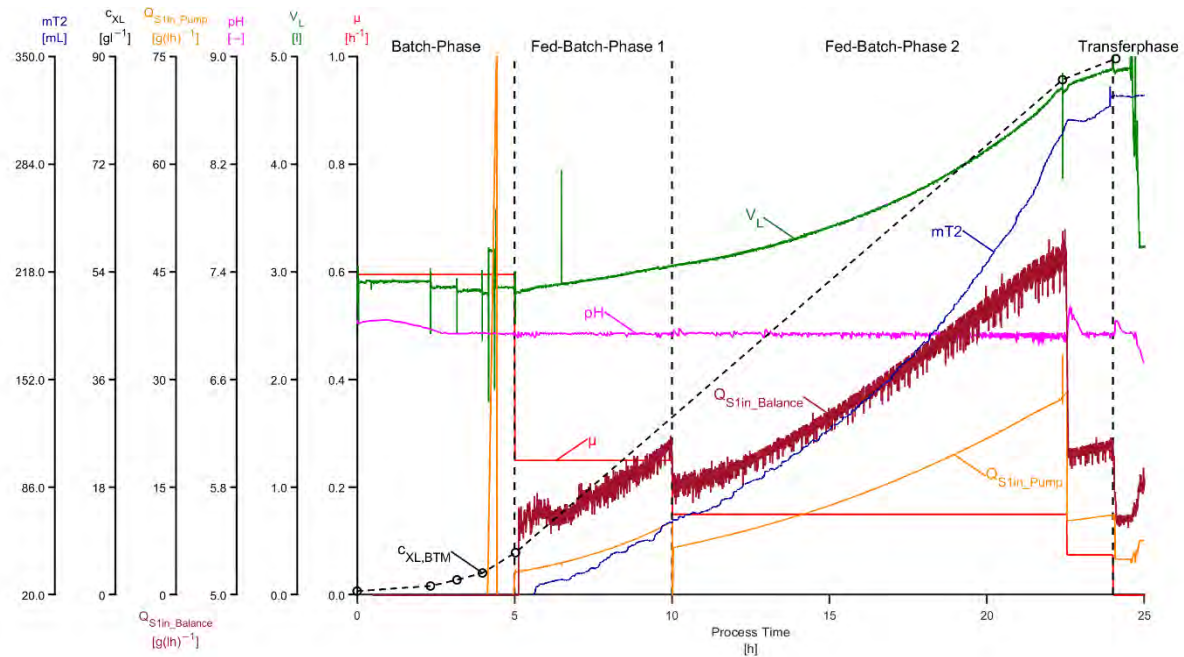


Abbildung 65: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im ED5 der Kultivierung in der KW04. Dargestellt ist die Wachstumsrate (μ), das Volumen der Flüssigkeitsphase im Reaktor (V_L), der pH-Wert, die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), die Zellkonzentration berechnet aus der BTM (c_{XL}) und der Eintrag an Base ($mT2$).

5.1.4.2 Screeningreaktor Q1

Um den Einfluss der Sauerstofflimitierung besser einschätzen zu können, wurden die Screeningreaktoren Q1 und Q5 mit Schikanen ausgestattet und zusätzlich wurden die transferierten Zellen mit Phosphatpuffer verdünnt (1:5). Somit konnte der $k_L a$ -Wert erhöht werden und der Sauerstoffbedarf verringert. Durch diese Maßnahmen konnte der gelöste Sauerstoffgehalt über die gesamte Kultivierung über Null gehalten werden (siehe Abbildung 66). Die pO_2 -Sonde wurde bei $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Luftbegasung als 100 % kalibriert, weswegen sie bei der Kultivierung den Wert von 100 % übersteigt, da der Gasmix aus $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Luft und $1,5 \text{ L min}^{-1}$ reinen Sauerstoff besteht. Während der Kultivierung kam es zu keiner Sauerstofflimitierung, wodurch die Zellen Substratlimitiert waren und somit mit der eingestellten Wachstumsrate gewachsen sind.

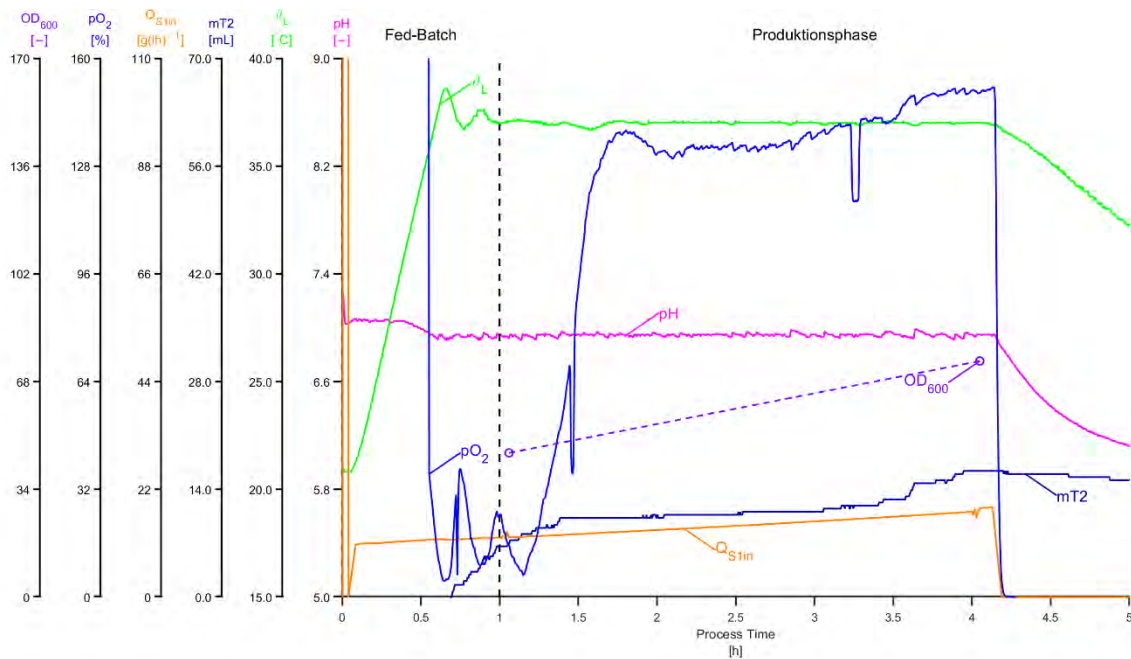


Abbildung 66: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Aufgrund der Probleme mit den Feedschläuchen wurde mehr Glucose in den Reaktor gepumpt als eingestellt (siehe Abbildung 67), wodurch die Wachstumsgeschwindigkeit über den eingestellten $0,15 \text{ h}^{-1}$ lag. Dennoch kommt es bei dieser Kultivierung nicht zu einem Verdünnen der Zellen, wodurch die OD über den gesamten Prozess ansteigt. Aufgrund der geringeren Zellkonzentration im Screeningreaktor lag die volumetrische Eintragsrate niedriger als bei den bisherigen Kultivierungen, wodurch das Reaktorvolumen nicht so stark ansteigt. Zusätzlich liegt der Basenverbrauch ebenfalls niedriger.

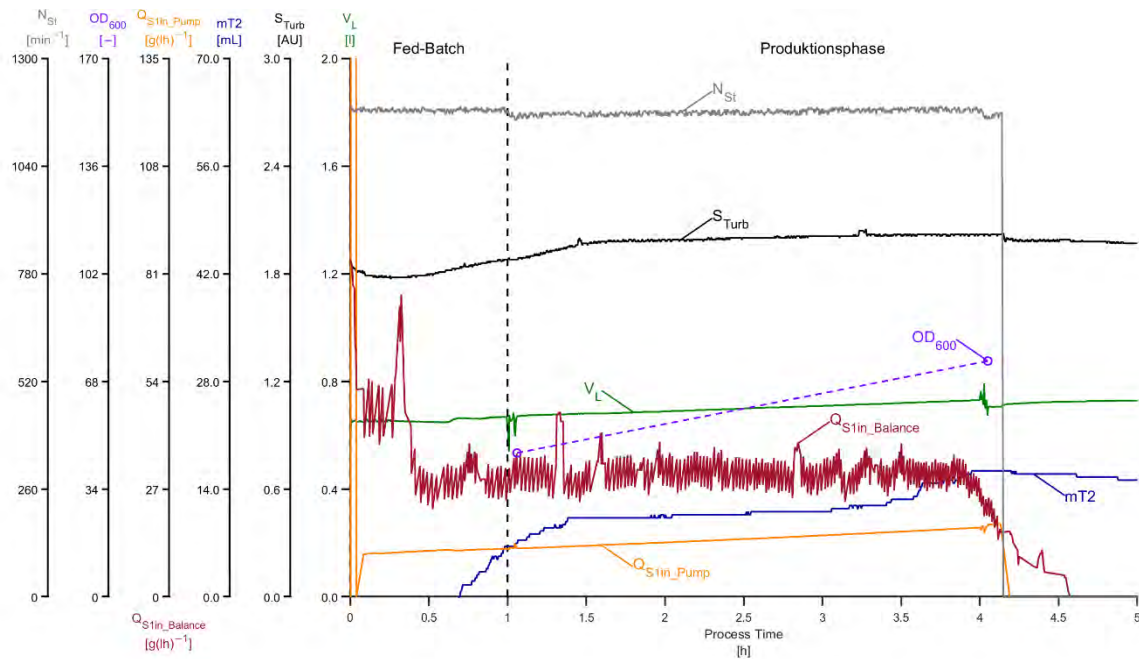


Abbildung 67: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q1 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4.3 Screeningreaktor Q2

Aufgrund des hohen Antifoameintrages im Screeningreaktor Q4 aus Kultivierung KW02, wurde die Screeningbedingungen in diesem Screeningreaktor wiederholt. Dennoch kam es ebenfalls nach ca. 3.5 h zu einem Eintrag von Antifoam (siehe Abbildung 69). Dies wurde zeitig erkannt, wodurch die Levelsonde deaktiviert werden konnte. Somit war der Eintrag weit geringer als beim letzten Experiment. Somit sollte der Einfluss nahezu nicht vorhanden sein. Die OD war bei der ersten Probenahme mit einem Wert von 145 weit höher als beim Q4 KW02, wodurch der Baseverbrauch ebenfalls höher ausfällt (siehe Abbildung 68). Abgesehen davon sind die Plots vergleichbar.

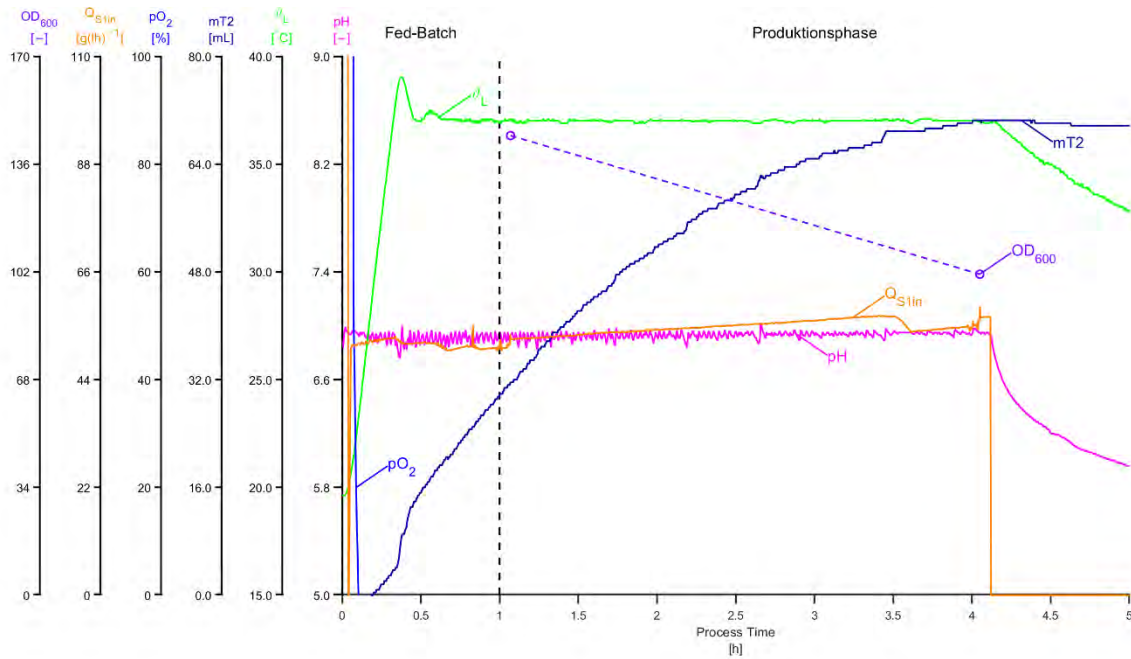


Abbildung 68: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

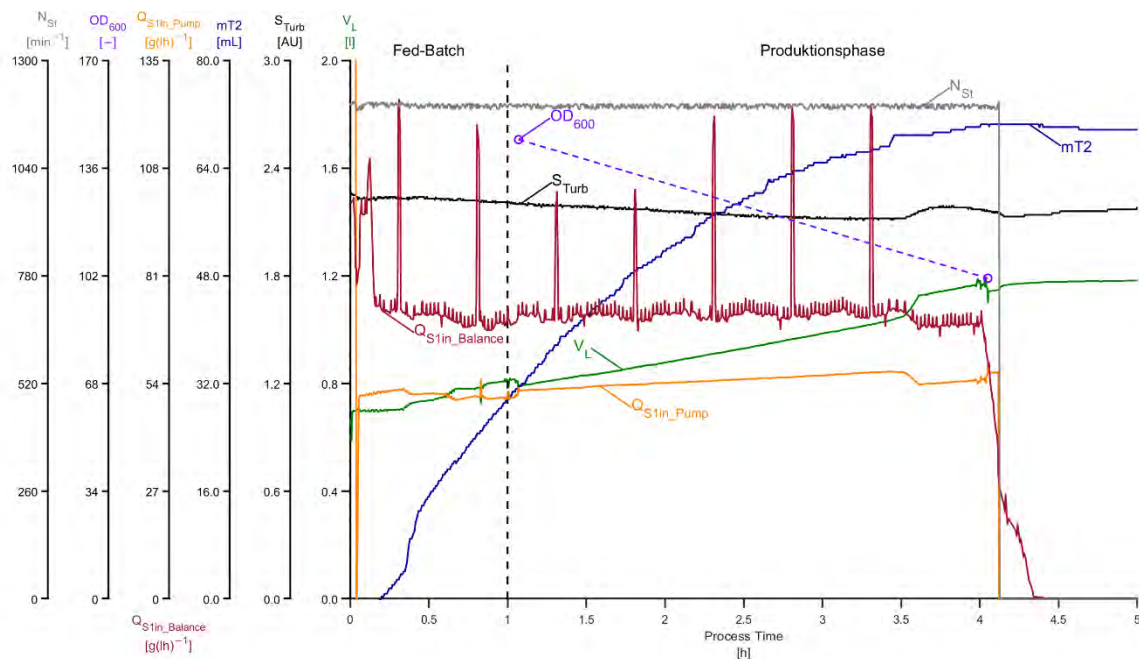


Abbildung 69: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q2 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4.4 Screeningreaktor Q3

Die Screeningreaktoren verfügen über separate Temperierkreisläufe. Kurz vor der Kultivierung KW04 ist der Temperaturkreislauf des Q3 ausgefallen. Der Screeningreaktor Q3 wurde mit dem Screeningreaktor Q1 in Reihe geschaltet. Die Inputsignal der Regelung stammte aus dem Q1, wodurch die Regelung für den Q3 nicht ideal war (siehe Abbildung 70). Die Screeningbedingungen entsprechen den Screeningbedingungen des Q5 der Kultivierung KW02. Wie bereits beschrieben, war die initiale Zellkonzentration höher als bei der vorherigen Kultivierung (siehe Abbildung 71).

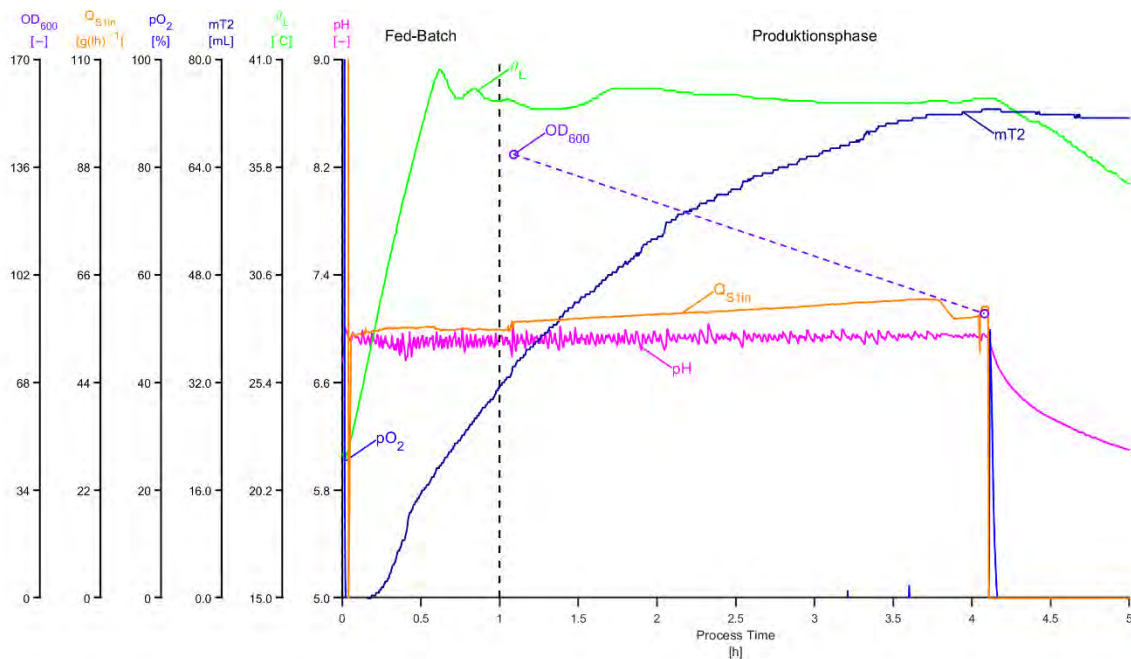


Abbildung 70: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

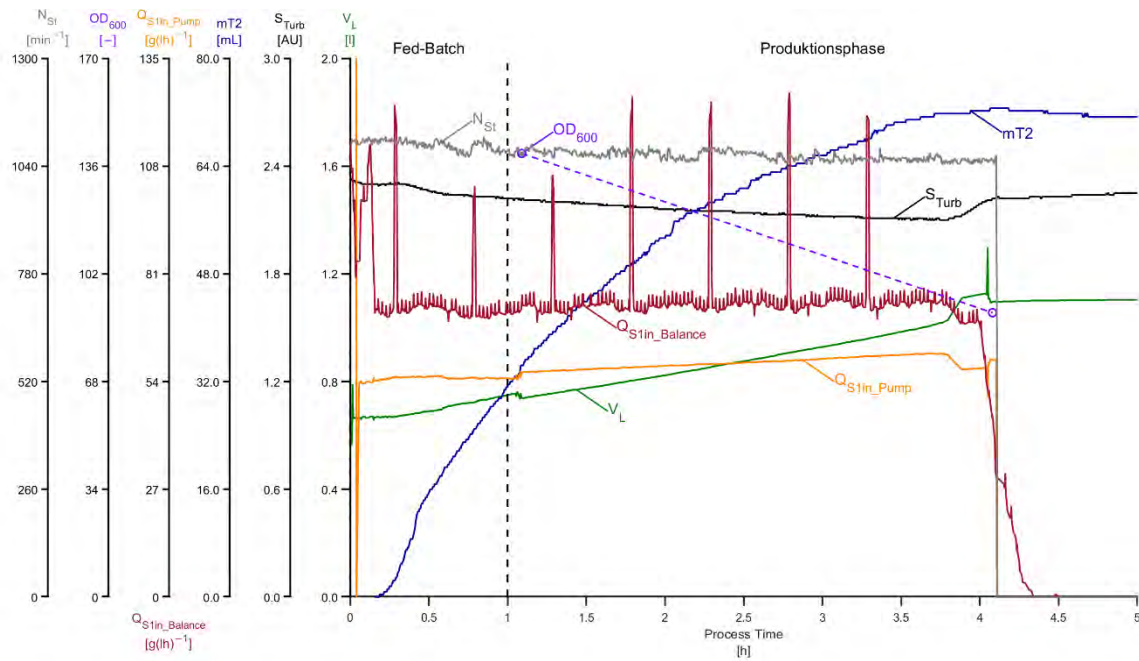


Abbildung 71: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4.5 Screeningreaktor Q4

Die Screeningparameter dieser Kultivierung entsprechen denen eines Zentralpunktes und sollten somit vergleichbare Verläufe zu den Kultivierungen KW48 Q2 und Q3, KW50 Q3 und KW02 Q1 liefern. In Abbildung 72 ist der Verlauf der Kultivierung dargestellt. Der Baseverbrauch ist höher als in den restlichen Zentralpunkten, obwohl KW50 Q3 eine höhere OD bei der ersten Probenahme aufweist. Sonst sind die Verläufe wie erwartet, vergleichbar.

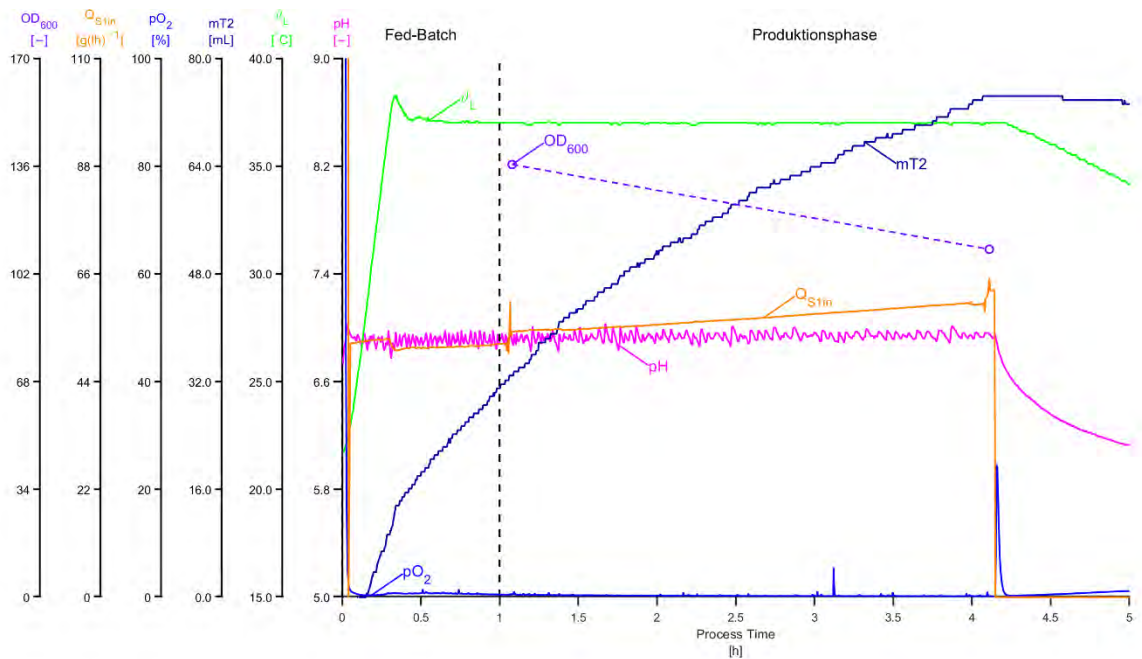


Abbildung 72: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q4 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Das Reaktorvolumen in den Zentralpunkten Q2 und Q3 in der Kultivierung KW48, weisen ein Offset auf, verglichen mit den Restlichen Kultivierungen. Bei der Kultivierung wurden die Waage vor dem Autoklavieren der Reaktoren tariert, wodurch die 90 mL Vorlagevolumen im Signal berücksichtigt worden sind. In den anderen Kultivierungen wurden die Waagen kurz vor dem Transfer der Zellen tariert, wodurch die 90 mL nicht im Waagensignal berücksichtigt sind. Deswegen ist das Reaktorvolumen zu Beginn der Kultivierung bei 0,66 L statt bei 0,75 L (siehe Abbildung 73)

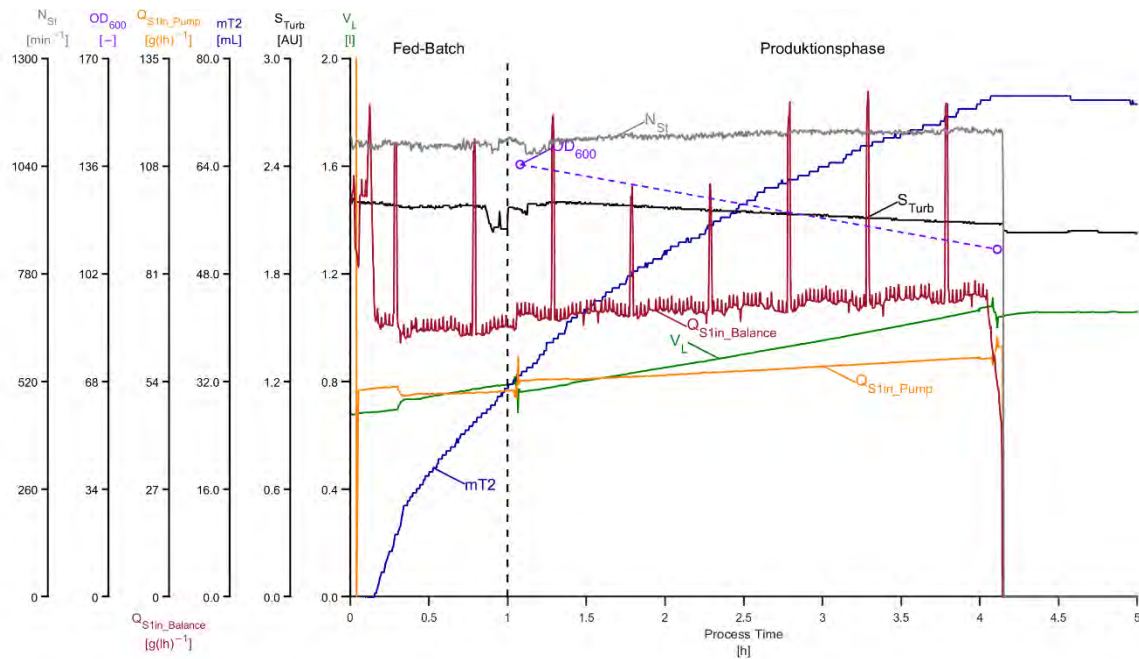


Abbildung 73: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q4 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4.6 Screeningreaktor Q5

Direkt nach dem Transfer der Zellen, liegt der pO_2 bei über 800 % (siehe Abbildung 74). Dies ist eine relative Angabe zu der Kalibrierung, welche mit Luft durchgeführt worden ist. Bei der Kultivierung wird mit einem Sauerstoff:Luft Gemisch begast, weswegen der pO_2 -Wert die 100 % übersteigen kann. Direkt nach dem Transfer werden die Zellen auf 37 °C erwärmt, wodurch sich deren Stoffwechsel beschleunigt. Infolgedessen sinkt der pO_2 -Wert. Trotz der Verdünnung der Zellen und der Erhöhung des k_La -Wertes, durch den Einbau der Schikanen, wird nicht ausreichend genug Sauerstoff in Lösung gebracht. Deshalb fällt der pO_2 -Wert auf um die 0 %. Nach 1,4 h steigt der pO_2 -Wert wieder an. Weder der Gasmix noch die Rührerdrehzahl sind verändert worden, somit muss sich der Sauerstoffbedarf der Zellen verändert haben (siehe Abbildung 75). Dies geschieht unter anderem bei einer Veränderung der Wachstumsrate. Durch die Induktion kann es zu hohen metabolischen Belastungen kommen, wodurch die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen sinkt (Marisch et al. 2013). Dieses Phänomen ist ebenfalls im Screeningreaktor Q1 zu beobachten und wahrscheinlich auf den gleichen Umstand zurückzuführen.

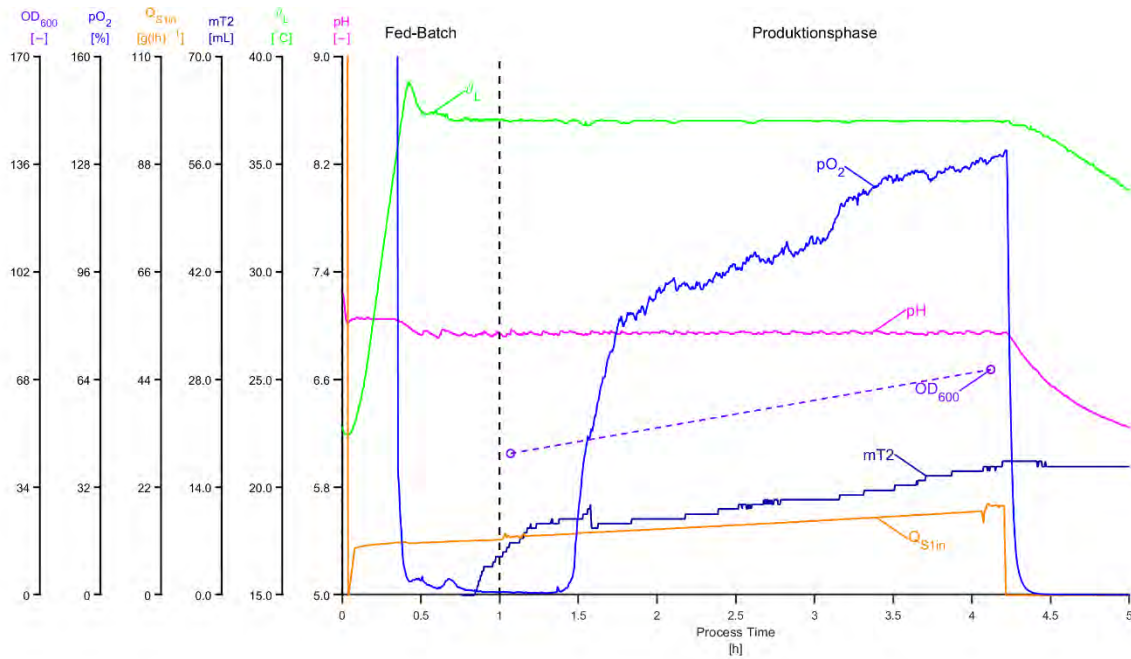


Abbildung 74: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (ϑ_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

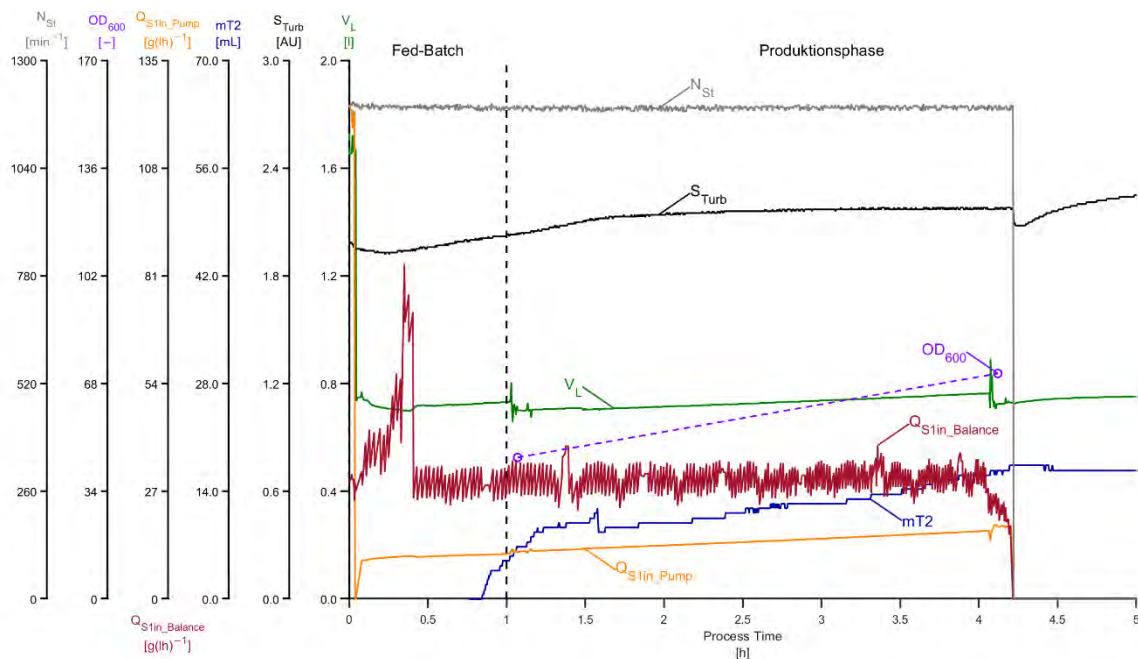


Abbildung 75: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q5 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.1.4.7 Screeningreaktor Q6

Das durchgeführte Experiment entspricht einem Zentralpunkt und gleicht somit den Kultivierungen KW48 Q2 und Q3, KW50 Q3, KW02 Q1 und KW04 Q4. Im Verlauf der Kultivierung wurde die Pumprate mehrfach angepasst, da die Abweichung zwischen der bestimmten maximalen Pumprate und der vorliegenden maximalen Pumprate besonders groß war und dies bereits im Prozess auffällig war. Nach 1,36 h wurde die Pumprate kurzzeitig ausgesetzt, um das Feedingprofil anzupassen. Anschließend wurde F_{Rmax} im Profil angepasst, sodass es näher an der Realität liegt (siehe Abbildung 76). Nach 1,9 h wurde das Profil erneut angepasst.

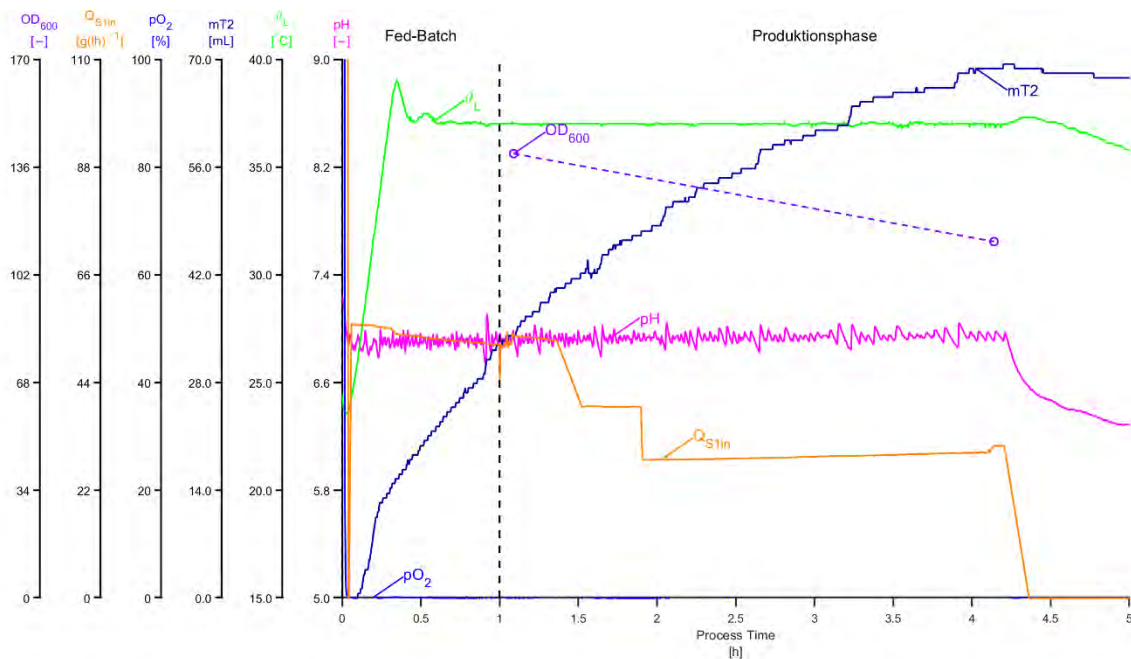


Abbildung 76: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q6 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist der pH-Wert, die Temperatur in der Flüssigphase des Reaktors (T_L), der Eintrag an Base (mT2), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in}) und die OD.

Zu Beginn der Kultivierung liegt die volumetrische Eintragsrate, ausgehend von dem Waagensignal des Reservoirs, weit über dem berechneten Wert (siehe Abbildung 77). Nach den Korrekturen im Feedprofil liegt die volumetrische Eintragsrate etwas unterhalb des berechneten Wertes. Dennoch war die Abweichung nicht in dem Maße groß, dass es im Prozess selbst auffällig wäre. Im Verlaufe der Kultivierung wurden 68,8 mL Base verbraucht und am Ende der Kultivierung umfasst das Reaktorvolumen 995 mL. In der Kultivierung im Q4 wurden 74,4 mL Base verbraucht und am Ende der Kultivierung umfasste das Reaktorvolumen 1080 mL. Somit unterscheidet sich der Volumeneintrag durch das Feedmedium um ca. 8 %. Über den gesamten Prozess weist das Waagensignal des Reservoirs starke Schwankungen auf, obwohl dieses Signal unter Verwendung eines Filters bereits bearbeitet worden ist.

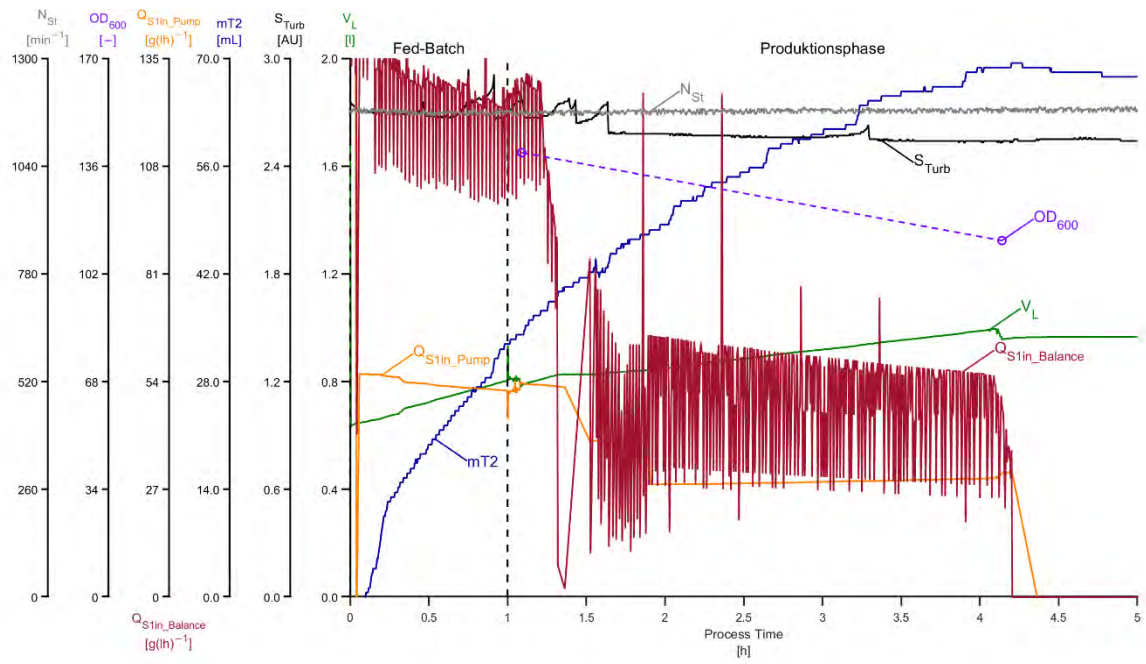


Abbildung 77: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q6 der Kultivierung der KW04. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{St}).

5.2 Tricin-SDS-PAGE

Zur Ermittlung der Produktkonzentration in den Prozessproben wurde die Tricin-SDS-PAGE verwendet. Mit der Tricin-SDS-PAGE ist es möglich Proteine und Peptide im Bereich von 1 bis 100 kDa der Größe nach aufzutrennen. Gängige Tricinkonzentrationen sind 10 % und 16,5 % Tricin, wobei sich 16,5 % besonders für sehr kleine Proteine/Peptide mit <10 kDa eignet. (Schägger und Jagow 1987)

Die Quantifizierung der Banden geschah mittels Coomassie-Färbung in Verbindung eines externen Standards. Als externer Standard wurde Lysozym verwendet. Dieses liegt mit einer molekularen Masse von 14,3 kDa leicht unterhalb des Fusionskonstrukts, welches eine molekulare Masse von 16,7 kDa aufweist. Zusätzlich wurde Bovine Serumalbumin (BSA) getestet. Dieses liegt mit einer molekularen Masse von 66 kDa weit über der vom Fusionskonstrukt. (Gallagher 2012)

Um eine Verschleppung zwischen den Prozessproben auf dem Gel zu vermeiden, wurden zwischen den Proben jeweils eine Lane frei gelassen. Diese Lane wurde für die Standards verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Massen sind diese weniger anfällig für Verschleppungen. Falls kein Standard in der freien Lane verwendet wurde, wurde diese mit Wasser und Probenpuffer beladen. Pro Gel pro Standard wurden drei Lanes zur Erstellung einer Kalibriergeraden verwendet. Zur Identifizierung der entsprechenden Banden für das Fusionskonstrukt und der Standardproteine wurde zusätzlich eine Proteinleiter als Marker aufgetragen. Es konnte kein Leakage des Plasmids festgestellt werden (siehe Anhang Abbildung 99), weswegen lediglich die Prozessprobe nach 3h Produktion untersucht worden ist. Es wurden jeweils alle Zentralpunkte auf ein Gel aufgetragen. Dies wurde wiederholt, wodurch eine Doppelbestimmung erreicht worden ist. Die Screeningexperimente mit einer Induktionskonzentration von 1 mM und die mit einer von 0,1 mM wurden ebenfalls auf separaten Gelen aufgetragen. Das gleiche Vorgehen wie bei den Zentralpunkten wurde angewendet. Abbildung 78 zeigt das Datenset der Screeningexperimente mit einer Induktion mit 1 mM als Beispiel. Die restlichen Gele sind im Anhang 9.5.

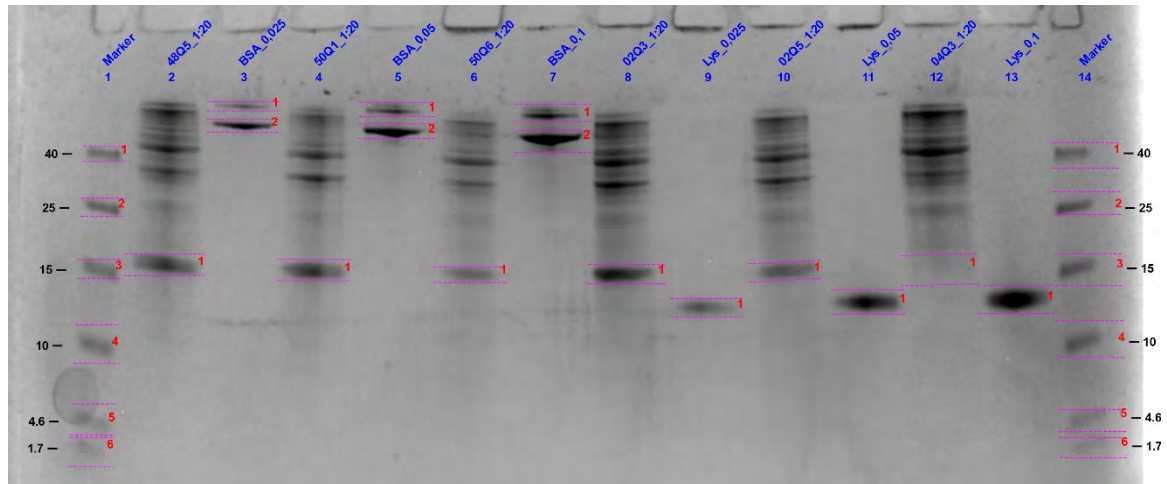


Abbildung 78: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 1 mM IPTG (Gel 4.1). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

Durch die Verwendung von DTT sollen Disulfidbrückenbindungen aufgebrochen werden, wodurch Proteine als einzelne Polypeptide vorliegen sollen. Bei dem BSA ist es zu Aggregatbildung gekommen, wodurch zu mindestens Dimere entstanden sind (zwei Banden in der BSA Lane/ siehe Abbildung 78). Diese wurden nicht durch das DTT aufgebrochen. Bei älteren BSA-Lösungen kann Aggregatbildung nachgewiesen werden, welche sich trotz Reduktionsmittel auf einem Gel wiederfinden lassen. (Levi und González Flecha 2002)

Ob es sich bei den Aggregaten um Dimere oder höhere Oligomere handelt, ist aufgrund der Auflösung des Gels nicht erkennbar. Die Aufteilung zwischen den beiden Banden ist annähernd konstant. Die untere Bande macht $26,5 \pm 2,8$ % und die obere Bande macht $73,5 \pm 2,8$ % aus (siehe Tabelle 44). Die untere Bande ist hierbei das BSA-Monomere.

Zusätzlich zu den drei Messwerten der Standard lässt sich der Nullpunkt als vierter Messwert ergänzen. Dieses Vorgehen ist für die Kalibrierung mit dem BSA-Standard nur möglich, wenn beide Banden zusammen ausgewertet werden. Die einzelnen Banden lassen sich auch für die Kalibrierung verwenden, hierbei darf der Nullpunkt nicht als zusätzlicher Messwert in die Kalibrierung aufgenommen werden. Somit beschränkt sich die Auswertung mit der Kalibriergerade auf den Kalibrierbereich der drei Standardmesswerte. In Abbildung 79 sind die Kalibriergeraden des BSA-Standards aller Gele dargestellt. Zur Erstellung der Kalibrierung wurden beide Banden berücksichtigt und durch den Nullpunkt forciert. Durch die Berücksichtigung des Hintergrundes der Gele in der Auswertesoftware (Image Lab von Bio Rad), hat der Peak eine Fläche von 0, wenn kein Protein vorliegt, weswegen die Forcierung möglich ist.

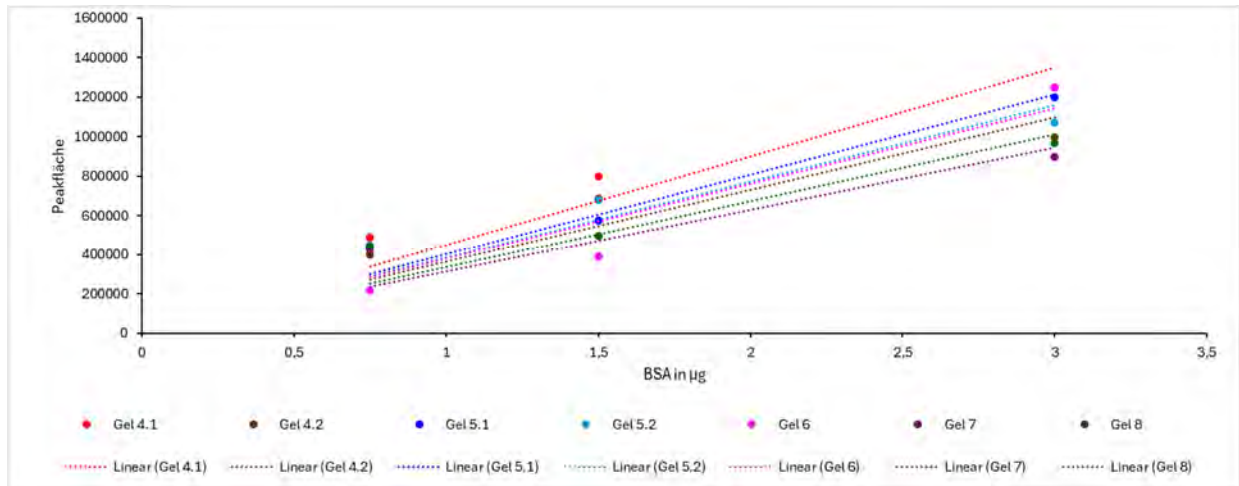


Abbildung 79: Kalibrierungsgeraden des SDS-Gels mit BSA als Standard.

Die daraus resultierenden Steigungen sind in Tabelle 22 dargestellt, zusammen mit den Ergebnissen der Kalibrierung mit Lysozym. Auch wenn die Kalibriergeraden einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen, gibt es dennoch leichte Unterschiede zwischen den Kalibrierungen, diese spiegeln die Gel zu Gel Variabilität wider. Das gleiche Verhalten ist bei der Kalibrierung mit Lysozym zu beobachten (siehe Abbildung 80).

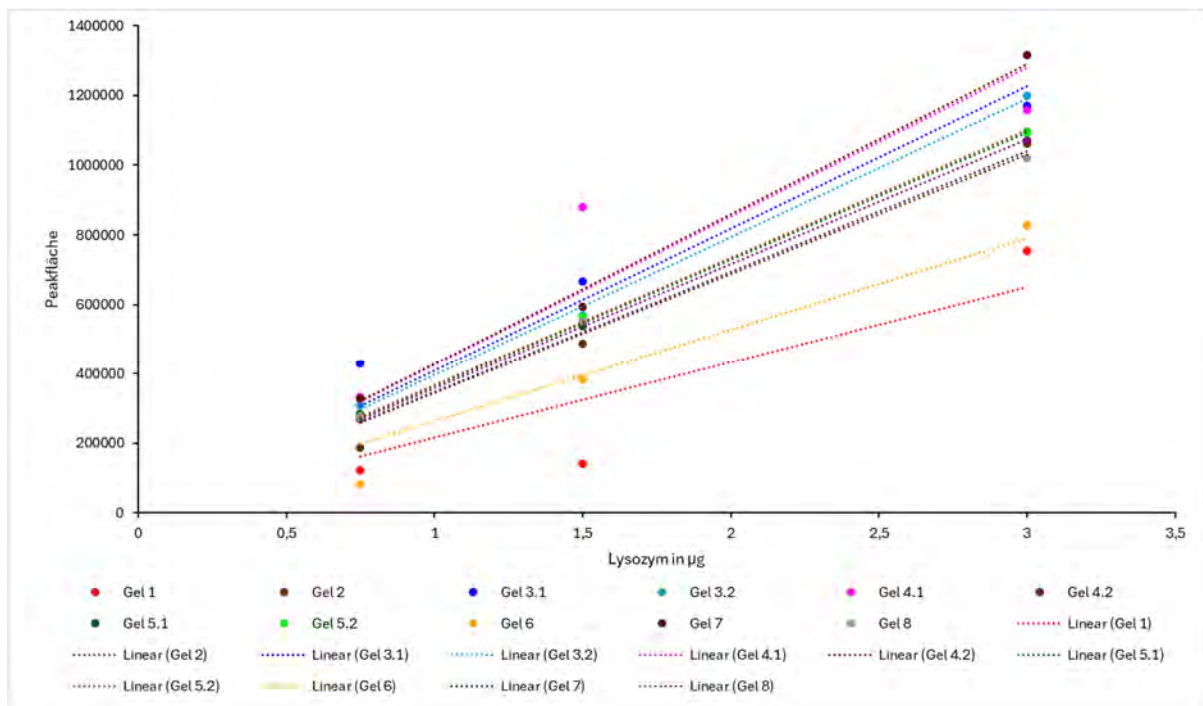


Abbildung 80: Kalibrierungsgeraden des SDS-Gels mit Lysozym als Standard.

Die Kalibrierung von Gel 1 weist dabei einen besonders auffälligen Verlauf auf. Dies spiegelt sich sowohl visuell auf dem Gel als auch in dem schlechten Bestimmtheitsmaß von 0,92 wider. Insgesamt weist die Kalibrierung mit Lysozym eine Gel zu Gel Variabilität von 18,4 % auf

(siehe Tabelle 22). Ohne Gel 1 weist die Kalibrierung noch eine Variabilität von 13,3 % auf, was signifikant geringer ist. Aufgrund der hohen Gel zu Gel Variabilität werden alle Gele mit einer individuellen Kalibrierung ausgewertet anstelle von einer universellen Kalibrierung. Die individuellen Kalibrierungen weisen mit einem Bestimmtheitsmaß von >97 % eine gute Genauigkeit auf. Dennoch stützt sich diese Berechnung auf drei Messwerte und den Nullpunkt als zusätzlichen Punkt, was bezüglich der Belastbarkeit berücksichtigt werden muss. Die Kalibrierung mit BSA weist nur eine Variabilität von 11,7 % auf. Diese Berechnung beruht auf weniger Gelen als die Berechnung des Lysozyms Standard. Werden die Kalibrierungen innerhalb der gleichen Gele verglichen, weist die Kalibrierung mit Lysozym eine Gel zu Gel Variabilität von 15,3 % und die von BSA eine von 11,7 % auf. Die Gel zu Gel Variabilität von BSA ist somit geringer, dennoch ist das Bestimmtheitsmaß bei der Kalibrierung mit Lysozym etwas höher, dennoch weniger konstanter. Aufgrund der geringen Messwerte innerhalb der Kalibrierungen ist der Unterschied dennoch zu vernachlässigen. Aufgrund der hohen molekularen Masse von BSA, kann es durch die Verschleppung der nebenliegenden Probe, zu Einflüssen der BSA-Bande kommen. Dies ist beim Gel 7 passiert, weswegen der Standard mit der Konzentration von $0,05 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ nicht ausgewertet werden konnte (siehe Abbildung 107). Aufgrund dieses Risikos und der potenziellen Bildung von Aggregaten, eignet sich BSA nicht so gut als Standard verglichen mit Lysozym. Je nachdem welcher Standard zur Auswertung verwendet wird, gibt es im Schnitt Unterschiede von 5,5 %. Diese Abweichungen sind besonders hoch bei den Gel 6 und Gel 7 mit 44,5 % bzw. -26,8 %. Für die Auswertung der Proben wurde der Lysozym-Standards anstelle des BSA-Standards gewählt.

Tabelle 22: Kalibrierung mit Lysozym und BSA

| | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3.1 | Gel 3.2 | Gel 4.1 | Gel 4.2 | Gel 5.1 | Gel 5.2 | Gel 6 | Gel 7 | Gel 8 | Mittelwert | Stabw. |
|------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|------------|--------|
| Lys Steigung | 217244 | 343574 | 408995 | 396843 | 426860 | 358344 | 364644 | 366941 | 263584 | 430513 | 346707 | 356750 | 18,4% |
| Bestimmtheitsmaß | 0,92 | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 0,97 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 2,4% |
| Steigung | - | 343574 | 408995 | 396843 | 426860 | 358344 | 364644 | 366941 | 263584 | 430513 | 346707 | 370701 | 13,3% |
| Bestimmtheitsmaß | - | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 0,97 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 1,1% |
| Steigung | - | - | - | - | 426860 | 358344 | 364644 | 366941 | 263584 | 430513 | 346707 | 365370 | 15,3% |
| Bestimmtheitsmaß | - | - | - | - | 0,97 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 1,3% |
| BSA Steigung | - | - | - | - | 449297 | 365115 | 404511 | 386648 | 380807 | 314981 | 336535 | 376842 | 11,7% |
| Bestimmtheitsmaß | - | - | - | - | 0,98 | 0,97 | 0,99 | 0,98 | 0,97 | 0,96 | 0,97 | 0,97 | 0,9% |
| Abweichung | - | - | - | - | 5,3% | 1,9% | 10,9% | 5,4% | 44,5% | -26,8% | -2,9% | 3,1% | 5,5% |

Gemäß der Proteinleiter weist Lysozym eine molekulare Masse von $12,5 \pm 0,5$ kDa auf, was etwas unter den erwarteten $14,3$ kDa liegt (siehe Tabelle 23). Um die Kalibrierung mittels Lysozyms zu beurteilen, wurde die Kalibrierung verwendet um ausgehend von der Peakfläche der Standardproben die Masse zu berechnen. Das Gel 1 wurde hierbei nicht berücksichtigt. Bei hohen Konzentrationen gleicht die berechnete Menge an Lysozym der theoretischen

Menge. Sie weicht bei 3 µg Lysozym im Durchschnitt nur um $-1 \pm 4 \%$ ab. Je geringer die Masse an Lysozym, desto größer die Abweichung. Bei 1,5 µg Lysozym steigt die Abweichung auf 3 % und die Standardabweichung (Stabw) auf 13 %. Bei einer Masse von 0,75 µg Lysozym beträgt die Abweichung $-3 \pm 25 \%$. Hierbei handelt es sich um potenzielle Fehlerquellen, welche idealerweise näher untersucht werden sollten.

Tabelle 23: Lysozym Kalibrierung der SDS-Gele. Gel 1 wurde dabei nicht berücksichtigt.

| Standard Gel | Mol. Wt. (KDa) | Abw | Adj. Volume (Int) | Abs. Quant. (ug) | Abs. Quant. (ug) (calc) | Abw. | Mittelwert | Stabw |
|--------------|----------------|-------|-------------------|------------------|-------------------------|------|------------|---------|
| Lyz_0,025 | Gel 1 | 11,04 | -11,7% | 122636 | 0,75 | 0,56 | -25% | |
| | Gel 2 | 12,47 | -0,2% | 187460 | 0,75 | 0,55 | -27% | -3% 25% |
| | Gel 3.1 | 12,91 | 3,2% | 428670 | 0,75 | 1,05 | 40% | |
| | Gel 3.2 | 11,72 | -6,3% | 309232 | 0,75 | 0,78 | 4% | |
| | Gel 4.1 | 12,11 | -3,1% | 332100 | 0,75 | 0,78 | 4% | |
| | Gel 4.2 | 12,24 | -2,1% | 270180 | 0,75 | 0,75 | 1% | |
| | Gel 5.1 | 12,39 | -0,9% | 284680 | 0,75 | 0,78 | 4% | |
| | Gel 5.2 | 11,89 | -4,9% | 274320 | 0,75 | 0,75 | 0% | |
| | Gel 6 | 12,50 | 0,0% | 82818 | 0,75 | 0,31 | -58% | |
| | Gel 7 | 12,38 | -1,0% | 328458 | 0,75 | 0,76 | 2% | |
| Gel 8 | 12,28 | -1,8% | 276642 | 0,75 | 0,80 | 6% | | |
| Lyz_0,05 | Gel 1 | 11,48 | -8,2% | 140180 | 1,50 | 0,65 | -57% | |
| | Gel 2 | 12,80 | 2,4% | 487080 | 1,50 | 1,42 | -5% | 3% 13% |
| | Gel 3.1 | 12,84 | 2,7% | 666594 | 1,50 | 1,63 | 9% | |
| | Gel 3.2 | 12,40 | -0,8% | 569525 | 1,50 | 1,44 | -4% | |
| | Gel 4.1 | 12,45 | -0,5% | 879030 | 1,50 | 2,06 | 37% | |
| | Gel 4.2 | 12,54 | 0,3% | 543750 | 1,50 | 1,52 | 1% | |
| | Gel 5.1 | 12,51 | 0,1% | 538164 | 1,50 | 1,48 | -2% | |
| | Gel 5.2 | 12,37 | -1,1% | 565828 | 1,50 | 1,55 | 3% | |
| | Gel 6 | 12,87 | 2,9% | 382585 | 1,50 | 1,45 | -3% | |
| | Gel 7 | 12,49 | -0,1% | 595296 | 1,50 | 1,38 | -8% | |
| Gel 8 | 12,52 | 0,2% | 551808 | 1,50 | 1,59 | 6% | | |
| Lyz_0,1 | Gel 1 | 12,57 | 0,6% | 754650 | 3,00 | 3,47 | 16% | |
| | Gel 2 | 13,15 | 5,2% | 1062418 | 3,00 | 3,09 | 3% | -1% 4% |
| | Gel 3.1 | 12,92 | 3,4% | 1169952 | 3,00 | 2,86 | -5% | |
| | Gel 3.2 | 12,92 | 3,3% | 1200500 | 3,00 | 3,03 | 1% | |
| | Gel 4.1 | 12,59 | 0,7% | 1158222 | 3,00 | 2,71 | -10% | |
| | Gel 4.2 | 13,08 | 4,6% | 1071560 | 3,00 | 2,99 | 0% | |
| | Gel 5.1 | 12,60 | 0,7% | 1095534 | 3,00 | 3,00 | 0% | |
| | Gel 5.2 | 12,78 | 2,2% | 1093338 | 3,00 | 2,98 | -1% | |
| | Gel 6 | 13,05 | 4,4% | 825864 | 3,00 | 3,13 | 4% | |
| | Gel 7 | 12,89 | 3,1% | 1315384 | 3,00 | 3,06 | 2% | |
| Gel 8 | 12,87 | 2,9% | 1020096 | 3,00 | 2,94 | -2% | | |

Die Screeningexperimente aus der KW04 zeigten der verwendeten Verdünnung ein geringes Ergebnis, weswegen diese erneut analysiert wurden. Hierbei wurden die Proben unverdünnt

aufs Gel aufgetragen. Durch die Vermischung mit dem Probenpuffer ergibt sich eine 1:2 Verdünnung, was der geringsten möglichen Verdünnung entspricht. Mit Gel 8 wurden die sechs auffälligsten Proben erneut untersucht, um die Ergebnisse zu verifizieren. Die gemessenen Konzentrationen wurden auf die BTM der Proben bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Produktausbeute der einzelnen Screeningversuche angegeben in μg Produkt pro Gramm BTM. KW04 Q1 und Q5 sind vor dem Transfer mit Phosphatpuffer verdünnt worden.

| KW | Reaktor | H | P | I | c_p (3h) [$\mu\text{g g}^{-1}$] |
|----|---------|----|----|----|-------------------------------------|
| 48 | Q2 | 0 | 0 | 0 | 10,88 |
| 48 | Q3 | 0 | 0 | 0 | 20,28 |
| 48 | Q5 | 1 | 1 | 1 | 18,37 |
| 50 | Q1 | -1 | -1 | 1 | 21,13 |
| 50 | Q2 | -1 | -1 | -1 | 28,21 |
| 50 | Q3 | 0 | 0 | 0 | 10,20 |
| 50 | Q5 | -1 | 1 | -1 | 12,79 |
| 50 | Q6 | -1 | 1 | 1 | 9,37 |
| 02 | Q1 | 0 | 0 | 0 | 14,64 |
| 02 | Q2 | 1 | 1 | -1 | 23,03 |
| 02 | Q3 | -1 | -1 | 1 | 23,74 |
| 02 | Q4 | 1 | -1 | -1 | 13,76 |
| 02 | Q5 | 1 | -1 | 1 | 15,41 |
| 04 | Q1 | 0 | 0 | 0 | 4,91 |
| 04 | Q2 | 1 | -1 | -1 | 1,15 |
| 04 | Q3 | 1 | -1 | 1 | 1,07 |
| 04 | Q4 | 0 | 0 | 0 | 1,17 |
| 04 | Q5 | 0 | 0 | 0 | 4,74 |
| 04 | Q6 | 0 | 0 | 0 | 0,54 |

Aufgrund der Auffälligkeiten der Screeningversuche KW02 Q4 und Q5, wurden diese bei der Modellierung nicht berücksichtigt. Außerdem wurde der Versuch KW48 Q3 ebenfalls exkludiert. Die Kultivierung in der KW04 wies bereits im ED5 Auffälligkeiten auf, diese spiegelt sich unter anderem in der Berechnung des Umrechnungsfaktors zwischen OD und BTM wider. Außerdem gab es Schwierigkeiten die Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Die Auswertung der Produktausbeute dieser Versuche zeichnet sich durch sehr geringe Produktausbeuten aus, weswegen diese Kultivierung ebenfalls nicht in Modell aufgenommen wurde. Aufgrund der erhöhten volumetrischen Eintragsrate von Glucose konnten die Zellen mit sehr hohen Wachstumsraten wachsen, weswegen es zu Problemen mit der Sauerstoffversorgung kam. Außerdem wird dem Batch Medium kein Kanamycin hinzugefügt. Somit besteht kein Selektionsvorteil für Zellen mit Plasmid. Zellen ohne Plasmid können schneller wachsen als Zellen ohne Plasmid, da die Replikation und Instandhaltung des Plasmides viel Energie benötigt. Aufgrund der hohen Glucosezufüterraße waren hohe Wachstumsraten möglich. Zellen, welche

ihr Plasmid verloren haben, könnten somit schneller gewachsen sein, da ihnen mehr Energie fürs Wachstum zur Verfügung stand. Wodurch ein gewisser Anteil der Zellen ihr Plasmid beim Transfer bereits verloren haben könnten, was zu geringeren Produktausbeuten führen würde. Dies wäre eine mögliche Erklärung für geringer Produktausbeuten, wenn auch keine allumfassende Erklärung. (Marisch et al. 2013; Sandén et al. 2003)

Der Hauptfokuspunkt dieser Kultivierung (KW04) war die Untersuchung des Einflusses der Sauerstofflimitierung. Die Versuche Q1 und Q5 zeigen dabei sehr ähnliche Ergebnisse, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht. Bezogen auf die Screeningbedingungen, glichen diese beiden Screeningreaktoren den Reaktoren Q4 und Q6. Diese beiden weisen einen signifikanten Unterschied zueinander auf. Dennoch ist die Ausbeute in den Reaktoren Q1 und Q5 bedeutend höher als in den Reaktoren Q4 und Q6. Sauerstoff hat somit einen positiven Einfluss auf die Produktausbeute. Für eine ideale Produktausbeute sollte somit auf eine Sauerstofflimitierung verzichtet werden, soweit es das System zulässt. Bei einem System mit geringen k_{La} -Wert wie bei den Screeningreaktoren, bedeutet eine Kultivierung ohne Sauerstofflimitierung eine viel geringere Zellkonzentration im Reaktor. Die Ausbeute an Produkt pro Batch kann somit dennoch geringes Ausfallen, verglichen mit der Kultivierung unter Sauerstofflimitierung. Ausgehend von den Berechnungen bezogen auf die Reaktoren, wurde in Reaktor Q1 nur 6,0 % mehr Produkt produziert als im Reaktor Q4. Im Reaktor Q5 waren es nur 3,2 %.

In den meisten Kultivierungen wird eine Sauerstofflimitierung vermieden, da bei *E. coli* beim aeroben Stoffwechsel mehr Energie pro Glucose Molekül produziert und somit steht *E. coli* mehr Energie für metabolische Prozesse und Proteinsynthese zur Verfügung. Dennoch gibt es bei der Expression von rekombinanten Proteinen sauerstoffempfindliche Schritte. Diese können durch hohen Sauerstoffgehalt, niedrigen Sauerstoffgehalt oder einem Wechsel vom Sauerstoffgehalt beeinflusst werden. Diese Einflüsse beziehen sich nicht nur auf die Produktivität, sondern besonders auf die Qualität des Produktes. In den meisten Fällen stellt eine Sauerstofflimitierung einen weiteren Stressfaktor dar, welcher sich zu dem bestehenden Stress, induziert durch die Produktion, hinzukommt. (Tripathi 2009; Konz et al. 1998; Carneiro et al. 2013)

5.3 Modellierung

Für die Auswertung des DOE wurde die Software MODDE® von Sartorius verwendet. Hierzu wurden die berechneten Produktausbeuten in das angelegte Projekt übertragen. Das daraus resultierende Model wird im Folgenden evaluiert. MODDE liefert dabei hilfreiche Diagramme um die Funktionalität des Models zu bewerten. In Abbildung 81 ist der Design Region des Screenings dargestellt. Hierbei stellen die Achsen die Input Variablen des Designs dar und die Produktausbeute ist als Response Variable mit einem Farbcode hinterlegt.

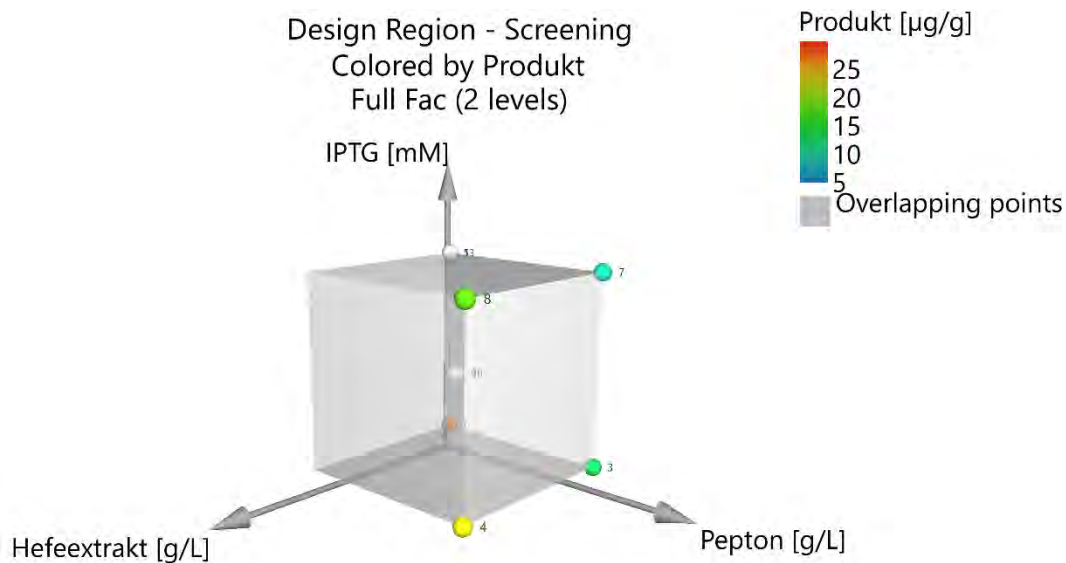


Abbildung 81: Design Region des Screening DOE

Der Replikate Plot dient zur ersten Analyse der Daten (siehe Abbildung 82). Hierbei werden replizierte Experimente als blauer Kasten dargestellt und verbunden. Die restlichen Experimente sind als grüner Kreis dargestellt. Innerhalb dieser Darstellung ist die Variabilität der Replikate einfach zu identifizieren. Je kleiner die Variabilität der Replikate ist, desto besser. Generell sollte die Variabilität der Experimente größer sein als die Variabilität der Replikate. Eine hohe Variabilität innerhalb der Replikate kann in einem schlechten Modell resultieren. Die Variabilität der Duplikate innerhalb dieses DOE ist gering.

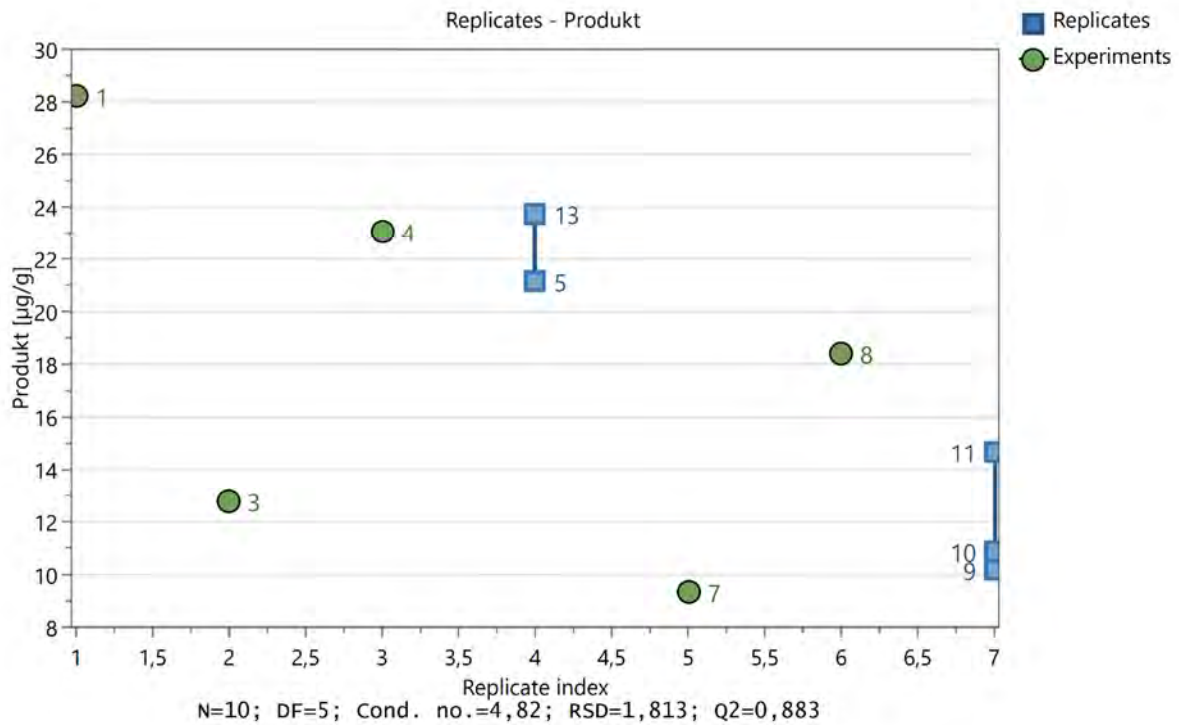


Abbildung 82: Replikat Plot des Screening DOE

In Abbildung 83 ist eine Häufigkeitsverteilung der Responses, ein Histogramm, dargestellt. Dieses sollte einer normalen Verteilung folgen und somit eine glockenförmige Verteilung aufweisen. Die Verteilung lässt sich mit dem Skewness bzw. Schiefe Test bewerten, je nach Ergebnis dieses Testes sollten die Daten ggf. transformiert werden, damit ein besseres Modell erzeugt werden kann. Gemäß des Skewness Testes ist eine Transformation der Daten diese Screening DOEs nicht notwendig.

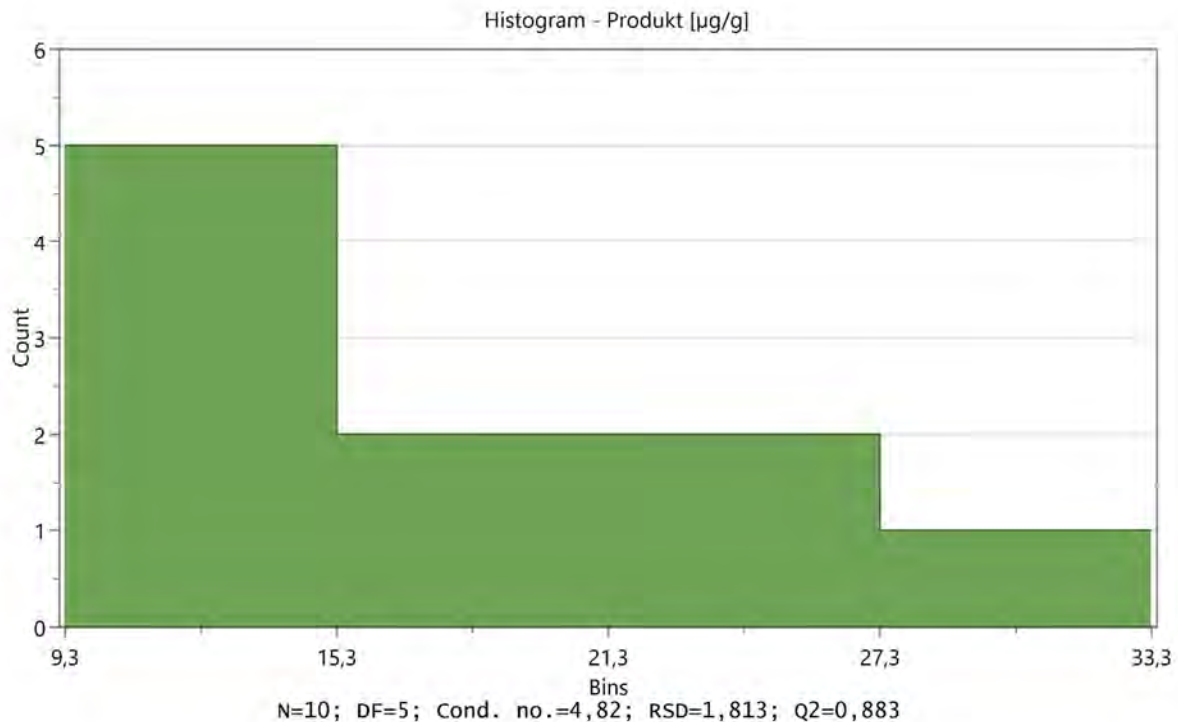


Abbildung 83: Histogramm der Responses des Screening DOE

Abbildung 84 zeigt die Regressionskoeffizienten. In diesem wird dargestellt inwiefern die Input Variablen die Response beeinflussen. Hierbei werden die einzelnen Faktoren betrachtet, aber auch die kombinierten Faktoren. Die kombinierten Faktoren zeigen an inwiefern es Interaktionen zwischen den Faktoren gibt. Somit finden sich in dem Diagramm sowohl lineare als auch quadratische Ausdrücke. Zusätzlich wird die Ungewissheit der Faktoren angezeigt. Dieses wurde durch das Konfidenzintervall von 95 % berechnet. Je größer der Balken der linearen Einflussfaktoren, desto größer ist dieser Einfluss. Bei kombinierten Faktoren ist der Einfluss des einen Faktors abhängig von dem anderen Faktor, wodurch sich das Oberflächen (engl. Surface) Diagramm krümmt. Solange die Ungewissheit die x-Achse nicht kreuzt, kann der Faktor als signifikant angesehen werden. Faktoren, welche keinen signifikanten Einfluss aufweisen, sollten aus dem Modell entfernt werden, um das Modell zu verbessern. (Eriksson et al. 2008)

Deswegen wurden die Interaktionsterme zwischen Hefeextrakt und IPTG und Pepton und IPTG entfernt. Die Zugabe von Hefeextrakt hat einen negativen Einfluss auf die Produktion, sowie auch erhöhte Konzentrationen von IPTG. Die Zugabe von Pepton hat einen positiven Effekt auf die Produktion. Es gibt eine positive Interaktion von Pepton und Hefeextrakt, welche die Produktion steigert.

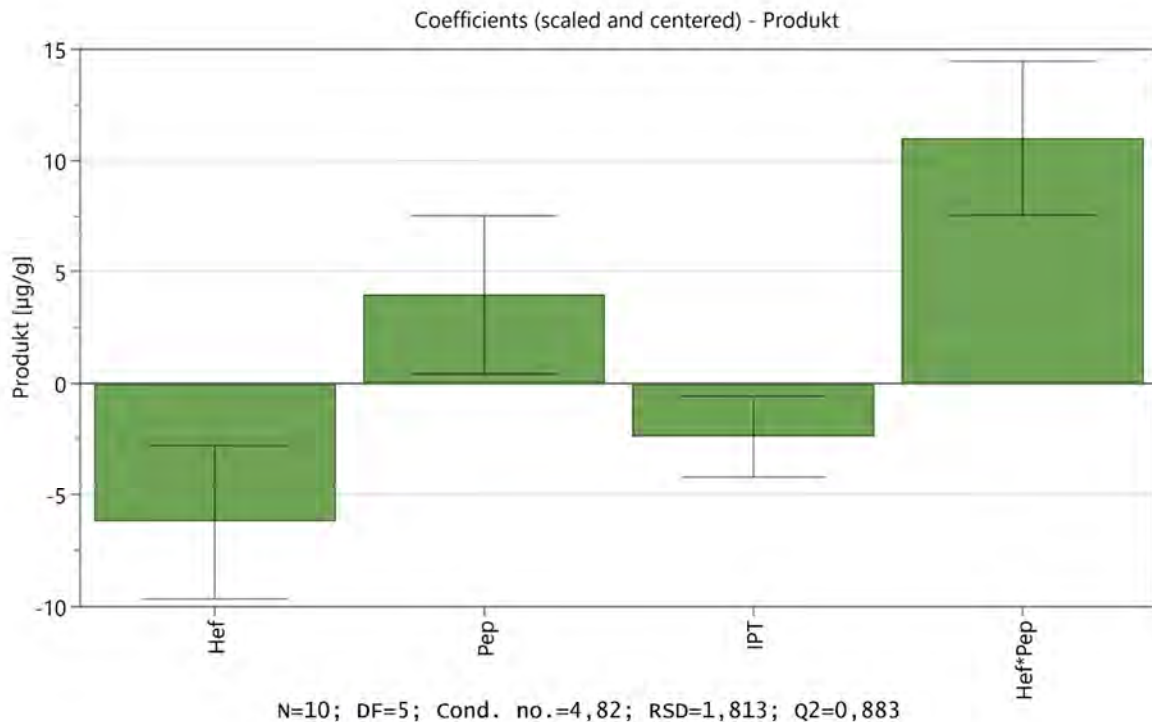


Abbildung 84: Regressionskoeffizienten des Modells

Abbildung 85 zeigt das Summary of fit Diagramm. Eine statistische Bewertung des Modells. Dargestellt ist der R^2 -Wert, der Q^2 -Wert, die Model Gültigkeit und die Reproduzierbarkeit. R^2 gibt dabei an wie gut die Modeldaten den Rohdaten entsprechen. Dieser Wert kann zwischen 0 und 1 variieren, je näher dieser an 1 ist, desto besser kann das Model an die Rohdaten angepasst werden. Eins symbolisiert hierbei das perfekte Model. Q^2 steht für die Fähigkeit zur Vorhersage, je höher dieser Wert ist, desto besser eignet sich das Model Werte vorherzusagen. Im Gegensatz zu R^2 hat dieser Wert minus unendlich als untere Grenze. Der dritte Wert gibt wieder, inwiefern der gewählte Modeltyp zu dem vorliegenden Problem passt. Der letzte Wert gibt an wie reproduzierbar die Experimente sind. (Eriksson et al. 2008)

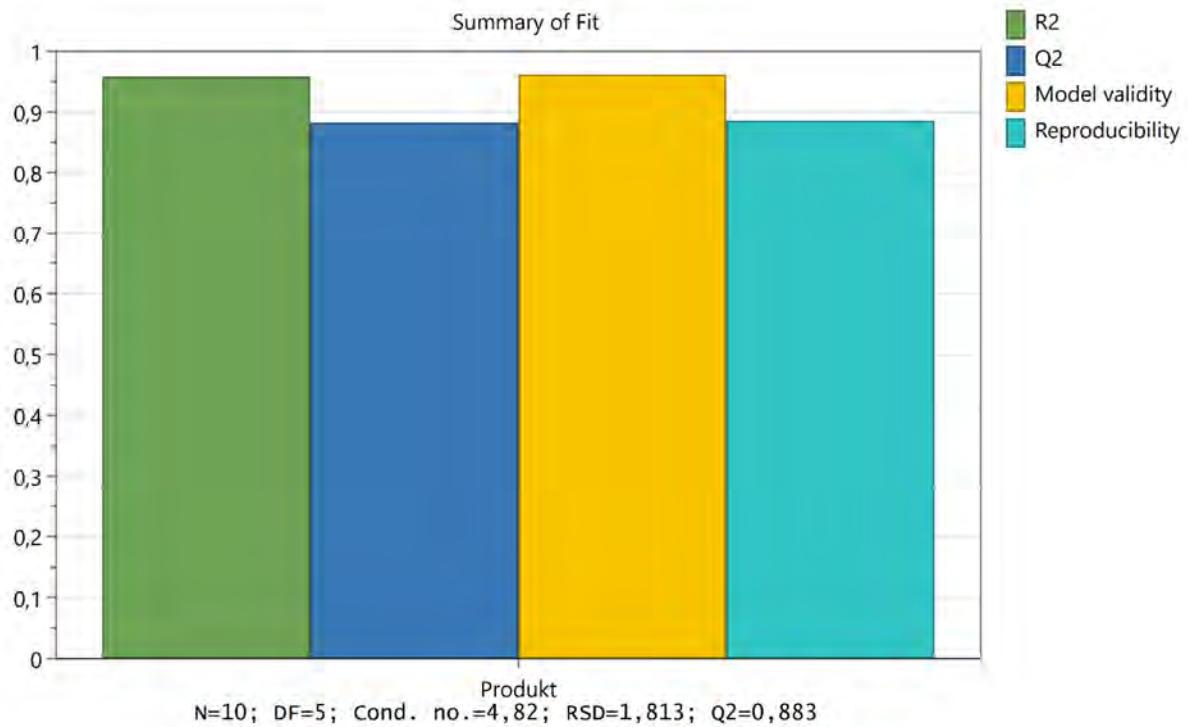


Abbildung 85: Summary of fit Diagramm des Screening DOE

Ein Model sollte gewissen Werte überschreiten um als gut bzw. geeignet bewertet zu werden. Diese Kriterien sind in Tabelle 25 aufgeführt. Das vorliegende Model erfüllt alle Kriterien. Zusätzlich zeichnet es sich durch hohe Werte in allen vier Punkte aus. Somit passt es gut zu den vorliegenden Rohwerten und eignet sich für die Vorhersage. Außerdem eignet sich der ausgewählte Modeltyp für das vorliegende System und weist auch eine gute Reproduzierbarkeit auf.

Tabelle 25: Bewertungskriterien eines Models

| | R ² | Q ² | R ² -Q ² | Model Gültigkeit | Reproduzierbarkeit |
|---------------------|----------------|----------------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| Gutes Model | > 0,5 | > 0,5 | <0,2-0,3 | >0,25 | >0,5 |
| Screening DOE Model | 0,96 | 0,88 | 0,08 | 0,96 | 0,89 |

In Abbildung 86 ist das Wahrscheinlichkeitsnetz und eignet sich dazu Ausreißer zu identifizieren. Wert außerhalb von $\pm 4 \times$ Standardabweichung sollten besonders betrachtet werden. Gleichzeitig sollten die Werte auf einer Geraden liegen welche durch den Punkt (0/0,5) geht. Keiner der Werte liegt außerhalb der vierfachen Standardabweichung. Somit gibt es keine statistischen Ausreißer.

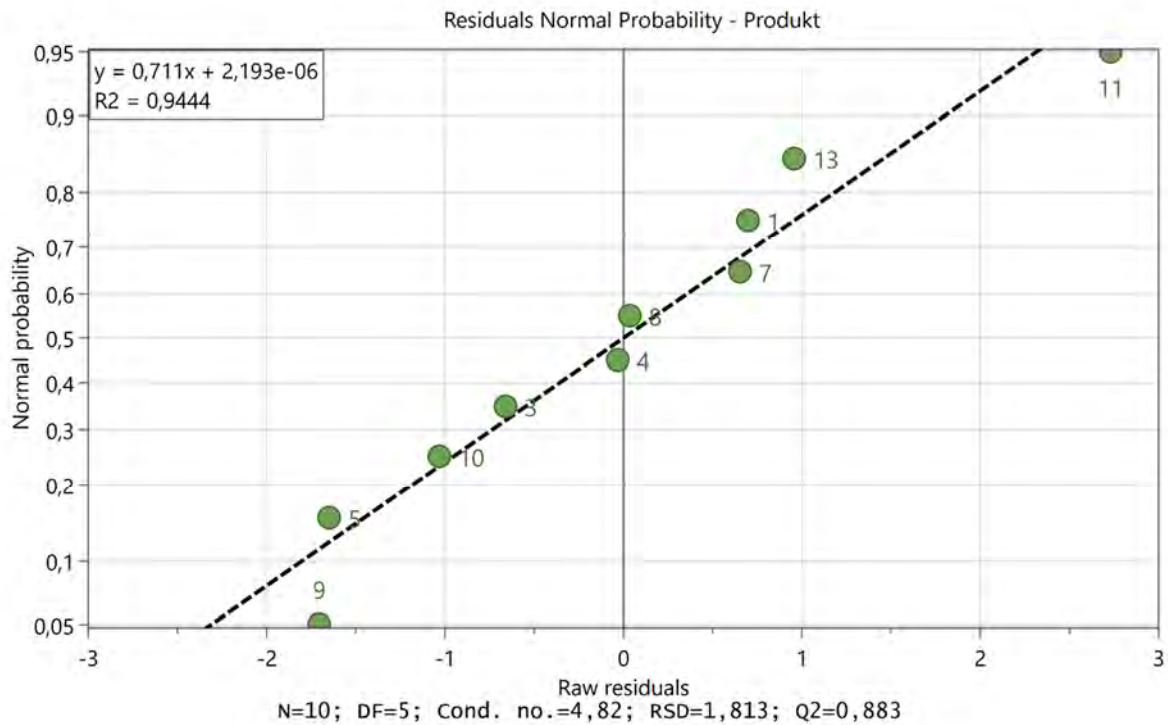


Abbildung 86: Wahrscheinlichkeitsnetz der Daten

Gute Modelle sind in der Lage das untersuchte Model gut zu beschreiben und somit sollten sie in der Lage sein, das Verhalten des Systems vorherzusagen. In Abbildung 87 sind die beobachteten Produktausbeuten gegen die vom Model berechneten Produktausbeuten aufgetragen. Je besser das Model die Antwort des Systems vorhersagen kann, desto eher liegen die Werte auf einer Geraden. In dem vorliegenden Model liegen die Punkte sehr nah an einer Geraden. Das Model kann gut die Antwort des Systems vorhersagen, was sich im hohen Q^2 -Wert widerspiegelt.

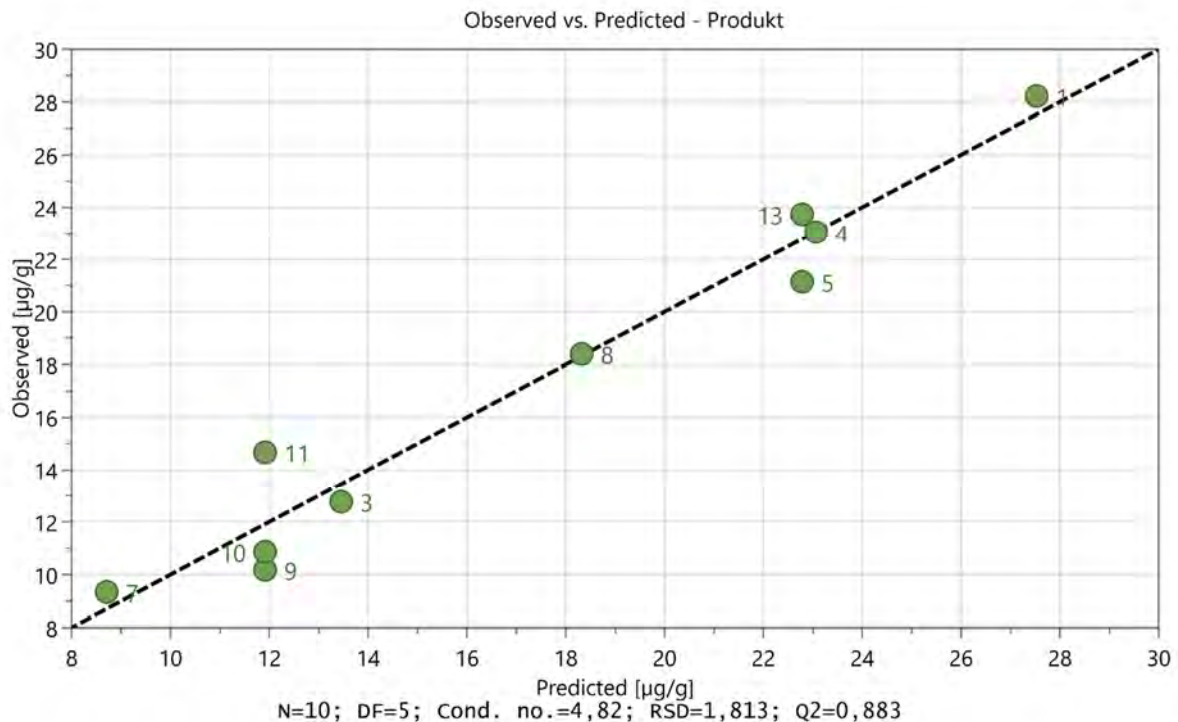


Abbildung 87: Beobachtet gegen berechnet Diagramm

In Abbildung 88 ist ein Response Contour Plot. Dargestellt ist die Produktausbeute als Antwort des Modells in einer zweidimensionalen Darstellung der Inputfaktoren. Auf der x-Achse ist die Konzentration an IPTG und auf der y-Achse ist die Konzentration an Hefeextrakt aufgeführt. Dadurch wurden drei Diagramme erzeugt, welche jeweils eine konstante Einstellung für den dritten Faktor, die Konzentration von Pepton, aufweisen. Die Ausbeute wird durch einen Farbcode dargestellt. Niedrige IPTG-Konzentrationen resultieren in einer größeren Produktausbeute. Bei einer niedrigen Konzentration von Pepton (untere Grenze, linker Plot) wird der negative Einfluss vom Hefeextrakt deutlich. Die Ausbeute steigt, je niedriger die Konzentration an Hefeextrakt ist. So wird beim Fehlen vom Pepton eine maximale Ausbeute bei niedrigen IPTG und einer niedrigen Konzentration an Hefeextrakt erhalten. Bei höheren Pepton Konzentrationen (obere Grenze, rechter Plot) wird der positive Faktor zwischen Hefeextrakt und Peptone deutlich, sodass hier höhere Hefeextrakt Konzentrationen zu einem Anstieg der Ausbeute führen. Dieser Effekt war im linken Diagramm nicht zu erkennen, da hier die Pepton Konzentration null betrug.

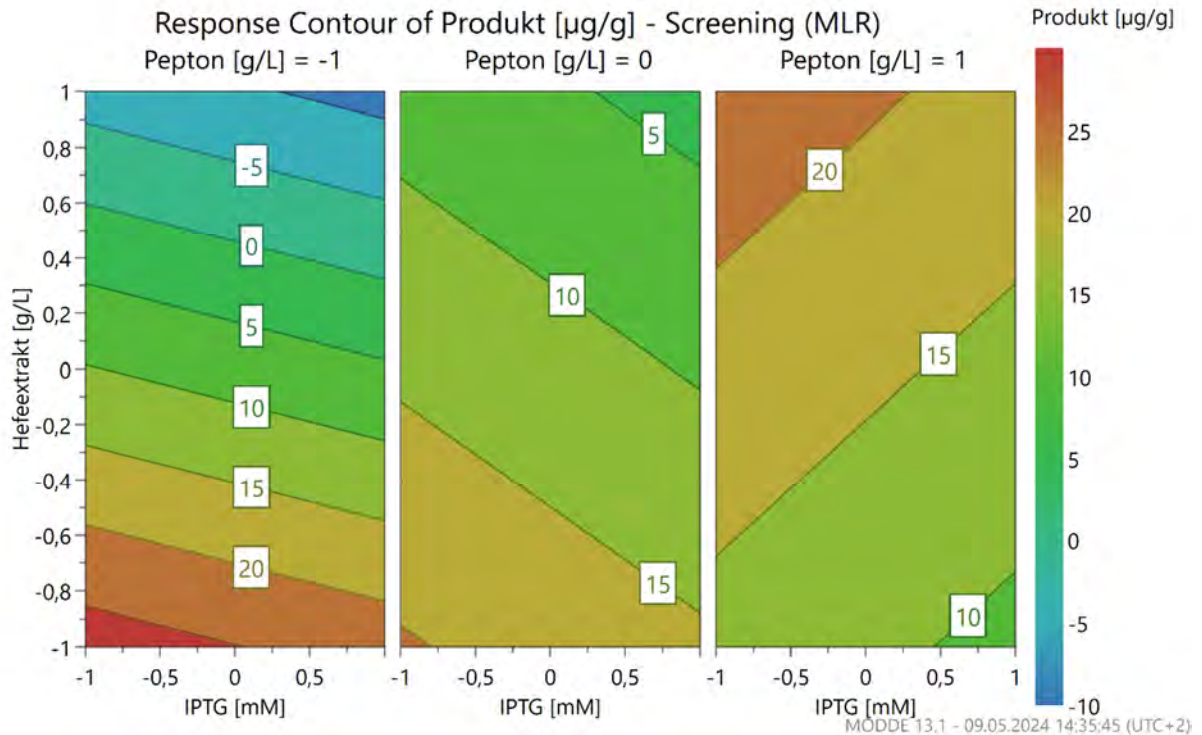


Abbildung 88: Response Contour Plot. Die Konzentration von IPTG auf der x-Achse und die Konzentration an Hefeextrakt auf der y-Achse. Die drei Stufen an Pepton stellen jeweils einen Plot dar

Der Effekt zwischen Hefeextrakt und Pepton wird deutlicher, wenn man IPTG konstant und Pepton variable darstellt in den Contour Plots. Dies stellt Abbildung 89 dar. Der Einfluss von IPTG ist auch in dieser Darstellung klar erkennbar. So wird im linken Plot (untere Grenze IPTG) eine Produktausbeute von $>25 \mu\text{g g}^{-1}$ erreicht, welche bei keiner anderen Einstellung für IPTG erreicht wird. Gleichzeitig wird die Interaktion zwischen Pepton und Hefeextrakt deutlich. In Abbildung 90 ist ein Response Surface Plot für diese Einstellung dargestellt. Die Oberfläche entspricht hierbei einer Sattelstruktur. Das ermittelte Optimum von keinem Hefeextrakt, keinem Pepton und 0,1 mM IPTG ist nicht zwangsläufig ein globales Optimum. Einerseits könnte eine weitere Verringerung von IPTG eine weitere Erhöhung der Produktivität zur Folge haben. Andererseits könnte eine Erhöhung der Pepton und Hefeextrakt Konzentration ebenfalls zu einem Maximum der Produktivität führen. Eine weitere Untersuchung diesbezüglich wäre notwendig, um das globale Maximum des Prozesses zu finden.

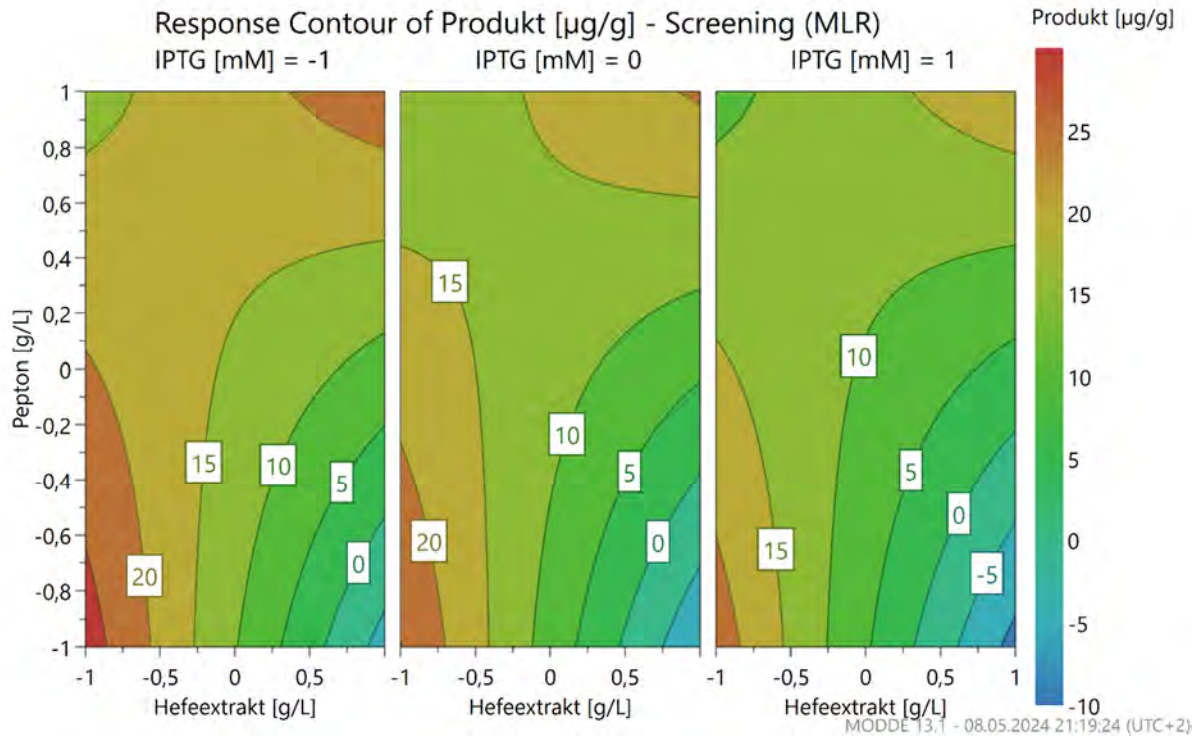


Abbildung 89: Response Contour Plot. Die Konzentration von Hefeextrakt auf der x-Achse und die Konzentration an Pepton auf der y-Achse. Die drei Stufen an IPTG stellen jeweils einen Plot dar

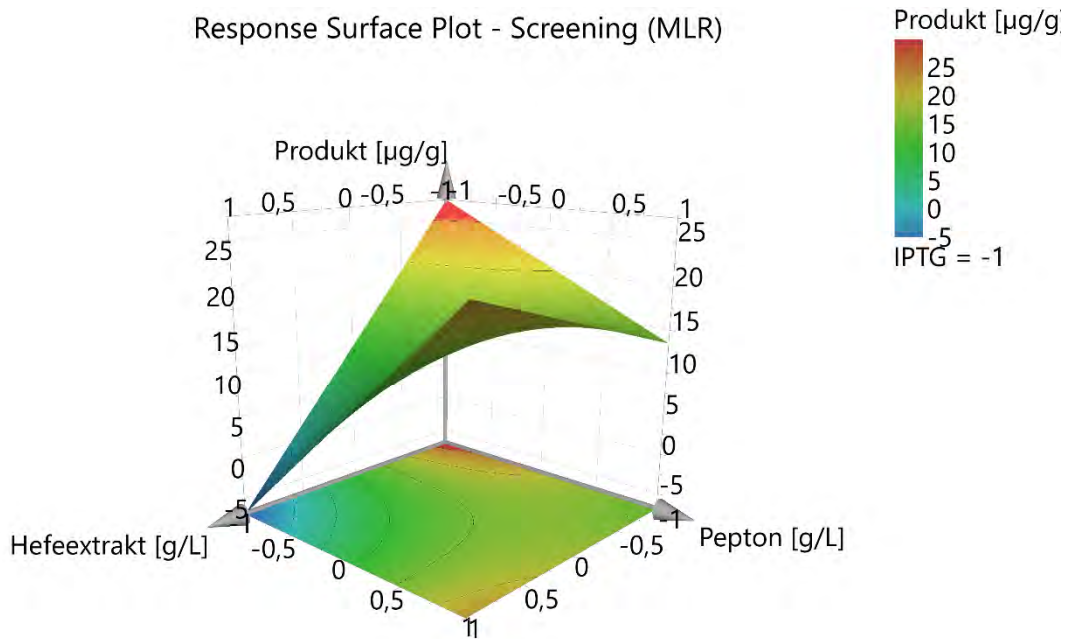


Abbildung 90: Response Surface Plot. Für eine IPTG-Konzentration von 0,1 mM

IPTG sorgt für eine schnelle und starke Überexpression des Produktes, was eine starke Belastung des Wirtes zur Folge hat. Dies spiegelt sich unter anderem in der Fitness des Wirtes

wider. Durch die Produktion kommt es zu einer metabolistischen Belastung (metabolic burden), da Stoffwechselvorläufer wie Aminosäuren, rRNA, ATP und reduzierende Energie für die Produktion benötigt werden. Diese fehlen dem Organismus bei den restlichen Stoffwechselprozessen, was unter anderem auch das Wachstum einschränkt. (Dvorak et al. 2015; Marisch et al. 2013)

Dvorak et al. 2015 konnten eine Abnahme von 40% Zellvariabilität durch die Induktion feststellen. Gleichzeitig hatte die IPTG-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Produktausbeute, hierbei verwiesen die Autoren auch auf weitere Publikationen. Die Konzentration an IPTG hat meist auch einen Einfluss auf die Qualität des Produktes und kann gerade bei Proteinen für eine irreversible Denaturierung führen. (Wurm et al. 2016)

Den Einfluss von IPTG auf die Qualität des Peptides wurde nicht untersucht. Aufgrund der starken schnellen und starken Induktion durch IPTG wäre der Einfluss auf Wachstumsrate und Dauer der Produktion besonders interessant.

Eine niedrige Konzentration sorgt einerseits für eine Reduktion der Produktionskosten, da IPTG verhältnismäßig teuer ist, andererseits erhöhte es die Produktausbeute, wie das Model zeigt. Dies spiegelt sich in der Literatur wider.

Eine zu niedrige IPTG-Konzentration kann zu einer nicht vollständigen Induktion führen, was sich ebenfalls negativ auf die Produktausbeute auswirkt. Die benötigte Menge stellt ein Charakteristikum des Systems dar. (Larentis et al. 2014)

Hefeextrakt und Peptone stellen eine Quelle für Kohlenhydrate, Aminosäure, Peptide, Vitamine und Spurenelemente dar und werden oft verwendet, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verbessern. Dennoch unterliegen diese Produkte einer hohen Variabilität zwischen einzelnen Chargen und Herstellern. (Tachibana et al. 2019; Tao et al. 2023)

Durch die zusätzliche Verfügbarkeit an Aminosäuren, könnte die metabolistische Belastung auf den Organismus verringert werden und dadurch die Produktivität gesteigert werden. Somit hätten sowohl Hefeextrakt als auch Pepton eine positive Wirkung. (Chiang et al. 2020)

Für Pepton stimmt diese Annahme mit den Ergebnissen überein. Dennoch weist Hefeextrakt einen negativen Effekt auf die Produktivität auf.

Hefeextrakt wird aus Bäcker- oder Bierhefe gewonnen. Besonders in die Biotechnologie wird meistens Bierhefe als Ausgangsmaterial verwendet. Beim Bierbrauen sammeln sich Bitterstoffe vom Hopfen auf der Zellmembran von Hefezellen an. Diese Bitterstoffe werden bei der Entbitterung vor der Weiterverarbeitung entfernt, weswegen diese eigentlich nicht im Hefeextrakt vorkommen sollten. Diese Bitterstoffe wie Resin und Tannin haben einen negativen Effekt auf

die Mikroorganismen und könnten somit für den negativen Effekt verantwortlich sein. (Tao et al. 2023)

Die Entbitterung ist ein gängiger Verarbeitungsschritt und es sehr unwahrscheinlich, dass dieser Weggelassen worden ist. Außerdem wäre die positive Interaktion von Pepton und Hefeextrakt darüber nicht erklärbar.

Verschiedene Autoren haben eine Selbstinduktion von Zellen, ausgelöst durch Hefeextrakt, beobachtet. Die Anfälligkeit für Autoinduktion ist hierbei stark Plasmid und nicht nur Promotor abhängig. Der genaue Stoff, welche zur Selbstinduktion führt, konnte bisher nicht klar identifiziert werden. Nair et al. 2009 vermuten Lactose als Auslöser, welche ebenfalls zu einer Induktion des Promotors in der Lage wäre. Jia et al. 2011 bestätigt die Autoinduktion, sieht Lactose jedoch nicht als Auslöser und bezieht sich dabei auf Grossman et al. 1998. Glucose reduziert die Autoinduktion, kann diese beim lacUV5 Promotor nicht komplett unterbinden. Diese Autoinduktion konnte jedoch nur bei Hefeextrakt und nicht bei Pepton/Trypton nachgewiesen werden. (Jia et al. 2011)

Komplexbestandteile werden dem Medium zugegeben, um das Zellwachstum zu steigern, da sich oftmals ein gesteigertes Zellwachstum positiv auf die Proteinsynthese auswirkt. (Tachibana et al. 2021)

Sollte zwischen dem Zellwachstum und der Produktausbeute ein negativer Zusammenhang herrschen, kann sich das erhöhte Zellwachstum, durch den Hefeextrakt, negativ auf die Produktausbeute auswirken.

Bestandteile im Hefeextrakt könnten die Induktion durch IPTG behindern, weswegen eine negative Wirkung zwischen Hefeextrakt Konzentration und Produktausbeute besteht. Inhaltsstoffe des Peptons könnten dieser Interaktion entgegenwirken, wodurch dem negativen Effekt entgegengewirkt wird. Dies könnte eine Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse darstellen. Aufgrund der hohen Variabilität zwischen Hefeextrakten, könnte ein anderer Hefeextrakt ein anderes Verhalten aufweisen und ggf. über keine negative Interaktion verfügen.

6 Zusammenfassung

Die Entdeckung und Produktion von Antibiotika hatten einen riesigen Einfluss auf die moderne Medizin, ohne den der aktuelle medizinische Stand nicht möglich wäre. Die wachsende Krise der Antibiotikaresistenzen bedroht diesen Stand, weswegen an Lösungen geforscht werden muss. Neben der Erforschung von AMPs stellt auch die günstige und verlässliche Produktion von diesen einen wichtigen Schritt in den Lösungsstrategien dar. Um die Produktion optimieren zu können, muss der Herstellungsprozess und dessen Einflussfaktoren möglichst gut verstanden werden. Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Hefeextrakt, Pepton und IPTG auf den Herstellungsprozess zu untersuchen. Der Herstellungsprozess setzt sich dabei aus sechs Phasen zusammen. Der Prozess startet im ED5 mit einer fünfstündigen Batch Phase bei maximaler Wachstumsgeschwindigkeit. Anschließend startet eine fünfstündige Fed-Batch Phase mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von $0,25 \text{ h}^{-1}$. Danach folgt eine 14-stündige Fed-Batch Phase mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von $0,15 \text{ h}^{-1}$. Die Zellen werden dann in einer Transferphase vom ED5 in die Qplus Screeningreaktoren transferiert. In diesen startet nach einer einstündigen Fed-Batch Phase eine dreistündige Produktionsphase. Die Prozessproben wurden mit Tris-Tricin SDS PAGE ausgewertet, wodurch sich die Produktausbeute analysieren ließ. Mit diesen Ergebnissen war es möglich ein gutes Model zu erzeugen welches die Einflüsse der drei Faktoren auf die Produktausbeute beschreiben konnte. Es konnte ein negativer Effekt der IPTG und Hefeextrakt Konzentration nachgewiesen werden. Die Konzentration an Pepton hat einen positiven Effekt auf die Produktausbeute. Außerdem weisen Hefeextrakt und Pepton zusammen eine positive Interaktion auf. Innerhalb des Design Spaces, welcher mit diesem DOE untersucht wurde, konnte kein globales Maximum einwandfrei identifiziert werden, weswegen die Grenzen der Parameter angepasst und mit weiteren DOE genauer untersucht werden sollten. Zusätzlich könnten Interaktionen zwischen IPTG und andere Faktoren, wie z.B. Wachstumsrate in der Produktion oder Dauer der Produktion, interessant sein.

7 Ausblick

Die Qplus Screeningreaktoren weisen einen weit schlechteren k_{La} -Wert auf als der ED5. Dennoch ist ein Screening in diesen Reaktoren besonders vorteilhaft, da somit Batch zu Batch Variabilitätsfaktoren verringert bzw. besser erfasst werden können, da die Zellen gemeinsam angezüchtet werden. Für weitere Screeningexperimente mit der Multifermenteranlage sollte der Prozess den Bedingungen entsprechend angepasst werden. Die Zellkonzentration in den Qplus Screeningreaktoren sollte signifikant verringert werden, sodass eine Sauerstofflimitierung, auch bei geringeren Rührerdrehzahlen und Begasungsraten, ausgeschlossen werden kann. Dies kann einerseits durch Verdünnung erreicht werden oder durch weit geringere Zellkonzentrationen im Anzuchtreaktor.

Die Auswertung mittels Tris-Tricin SDS Page weist verschiedene Risiken auf, weswegen über ein alternatives Auswerteverfahren nachgedacht werden sollte. Dies kann auch als Ergänzung bzw. zur Verifizierung der Ergebnisse verwendet werden. Reverse Phase HPLC oder Größenausschluss-Chromatographie sind dabei mögliche Verfahren. Deren Methodik vorher etabliert werden muss.

8 Literaturverzeichnis

14-tage-wettervorhersage.de: Wetter, Wettervorhersage, Wettertrend (2024a): Wetterbericht Hamburg (Land) 14.12.2023 | 14-tage-wettervorhersage.de. Online verfügbar unter <https://14-tage-wettervorhersage.de/wetter/wetterbericht/hamburg/?val=2023-12-14>, zuletzt aktualisiert am 27.03.2024, zuletzt geprüft am 27.03.2024.

14-tage-wettervorhersage.de: Wetter, Wettervorhersage, Wettertrend (2024b): Wetterbericht Hamburg (Land) 25.01.2024 | 14-tage-wettervorhersage.de. Online verfügbar unter <https://14-tage-wettervorhersage.de/wetter/wetterbericht/hamburg/?val=2024-01-25>, zuletzt aktualisiert am 27.03.2024, zuletzt geprüft am 27.03.2024.

14-tage-wettervorhersage.de: Wetter, Wettervorhersage, Wettertrend (2024c): Wetterbericht Hamburg (Land) 30.11.2023 | 14-tage-wettervorhersage.de. Online verfügbar unter <https://14-tage-wettervorhersage.de/wetter/wetterbericht/hamburg/?val=2023-11-30>, zuletzt aktualisiert am 27.03.2024, zuletzt geprüft am 27.03.2024.

Ahmad, Irshad; Nawaz, Nighat; Darwesh, Nizam M.; Ur Rahman, Sadeeq; Mustafa, Mohammad Z.; Khan, Sher B.; Patching, Simon G. (2018): Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. In: *Protein expression and purification* 144, S. 12–18. DOI: 10.1016/j.pep.2017.11.005.

Alexander Fleming (1945): Penicillin. Nobel Lecture. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>, zuletzt geprüft am 29.02.2024.

Andersson, M.; Gunne, H.; Agerberth, B.; Boman, A.; Bergman, T.; Sillard, R. et al. (1995): NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. In: *The EMBO journal* 14 (8), S. 1615–1625. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07150.x.

Andrä, J.; Leippe, M. (1999): Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin. In: *Medical microbiology and immunology* 188 (3), S. 117–124. DOI: 10.1007/s004300050113.

Andrä, Jörg; Beyer, Falk; Cornelissen, Gesine; Einfeldt, Jörn; Heseding, Jens; Kümmerer, Klaus et al. (2018): PharmCycle: a holistic approach to reduce the contamination of the aquatic environment with antibiotics by developing sustainable antibiotics, improving the environmental risk assessment of antibiotics, and reducing the discharges of antibiotics in the wastewater outlet. In: *Environ Sci Eur* 30 (1). DOI: 10.1186/s12302-018-0156-y.

Andrä, Jörg; Monreal, Daniel; Martinez de Tejada, Guillermo; Olak, Claudia; Brezesinski, Gerald; Gomez, Susana Sanchez et al. (2007): Rationale for the design of shortened derivatives

of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (20), S. 14719–14728. DOI: 10.1074/jbc.M608920200.

Aslam, Bilal; Wang, Wei; Arshad, Muhammad Imran; Khurshid, Mohsin; Muzammil, Saima; Rasool, Muhammad Hidayat et al. (2018): Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In: *Infection and drug resistance* 11, S. 1645–1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.

Beal, Jacob; Farny, Natalie G.; Haddock-Angelli, Traci; Selvarajah, Vinoo; Baldwin, Geoff S.; Buckley-Taylor, Russell et al. (2020): Robust estimation of bacterial cell count from optical density. In: *Communications biology* 3 (1), S. 512. DOI: 10.1038/s42003-020-01127-5.

Bechinger, B.; Gorr, S-U (2017): Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. In: *Journal of dental research* 96 (3), S. 254–260. DOI: 10.1177/0022034516679973.

Boparai, Jaspreet Kaur; Sharma, Pushpender Kumar (2020): Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. In: *Protein and peptide letters* 27 (1), S. 4–16. DOI: 10.2174/0929866526666190822165812.

Browne, Katrina; Chakraborty, Sudip; Chen, Renxun; Willcox, Mark Dp; Black, David StClair; Walsh, William R.; Kumar, Naresh (2020): A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. In: *International journal of molecular sciences* 21 (19). DOI: 10.3390/ijms21197047.

Cao, Bing; Adutwum, Lawrence A.; Oliynyk, Anton O.; Luber, Erik J.; Olsen, Brian C.; Mar, Arthur; Buriak, Jillian M. (2018): How To Optimize Materials and Devices via Design of Experiments and Machine Learning: Demonstration Using Organic Photovoltaics. In: *ACS nano* 12 (8), S. 7434–7444. DOI: 10.1021/acsnano.8b04726.

Cardoso, Valdemir M.; Campani, Gilson; Santos, Maurício P.; Silva, Gabriel G.; Pires, Manuella C.; Gonçalves, Viviane M. et al. (2020): Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21(DE3). In: *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)* 26, e00441. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00441.

Carneiro, Sónia; Ferreira, Eugénio C.; Rocha, Isabel (2013): Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. In: *Journal of biotechnology* 164 (3), S. 396–408. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.026.

Chiang, Chung-Jen; Hu, Mu-Chen; Chao, Yun-Peng (2020): A Strategy to Improve Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Based on a Glucose-Glycerol Mixture and Glutamate. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 68 (33), S. 8883–8889. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c03671.

Cornelissen, Gesine (2004): Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologischer wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*. Dissertation. Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

Du, Fei; Liu, Yun-Qi; Xu, Ying-Shuang; Li, Zi-Jia; Wang, Yu-Zhou; Zhang, Zi-Xu; Sun, Xiao-Man (2021): Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. In: *Microbial cell factories* 20 (1), S. 189. DOI: 10.1186/s12934-021-01680-6.

Dvorak, Pavel; Chrast, Lukas; Nickel, Pablo I.; Fedr, Radek; Soucek, Karel; Sedlackova, Miroslava et al. (2015): Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. In: *Microbial cell factories* 14, S. 201. DOI: 10.1186/s12934-015-0393-3.

Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Wikström, C.; Wold, S. (Hg.) (2008): Design of experiments. Principles and applications. Third revised and enlarged edition. Umeå: Umetrics Academy.

Fricke, Jens (2011): Optimierung eines Herstellungsprozesses artifizieller Malaria-Vakzine mittels Design of Experiments. Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover.

Fry, Donald E. (2018): Antimicrobial Peptides. In: *Surgical infections* 19 (8), S. 804–811. DOI: 10.1089/sur.2018.194.

Gallagher, Sean R. (2012): SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). In: *CP Essential Lab Tech* 6 (1). DOI: 10.1002/9780470089941.et0703s06.

Ganczarski, Jasmin; Oelbracht, Jonas (2023): Produktion eines antibiotisch wirkenden Peptides in *Pichia pastoris*. Laborprojekt. HAW Hamburg.

Gomes, Amitha Reena; Byregowda, Sonnahallipura Munivenkatappa; Veeregowda, Belamaranahally Muniveerappa; Balamurugan, Vinayagamurthy (2016): An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. In: *Adv. Anim. Vet. Sci.* 4 (7), S. 346–356. DOI: 10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356.

Grossman, T. H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R.; Osburne, M. S. (1998): Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. In: *Gene* 209 (1-2), S. 95–103. DOI: 10.1016/s0378-1119(98)00020-1.

Gujral, Gaurav; Kapoor, Devesh; Jaimini, Manish (2018): AN UPDATED REVIEW ON DESIGN OF EXPERIMENT (DOE) IN PHARMACEUTICALS. In: *J. Drug Delivery Ther.* 8 (3). DOI: 10.22270/jddt.v8i3.1713.

ICH (2005): Q8(R2) Guideline. Online verfügbar unter <https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29%20Guideline.pdf>, zuletzt geprüft am 19.02.2024.

isa.org (2024): ISA88, Batch Control- ISA. Online verfügbar unter <https://www.isa.org/standards-and-publications/isa-standards/isa-standards-committees/isa88>, zuletzt aktualisiert am 14.02.2024, zuletzt geprüft am 14.02.2024.

Jia, Baolei; Jeon, Che Ok (2016): High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. In: *Open biology* 6 (8). DOI: 10.1098/rsob.160196.

Jia, Lianghai; Cheng, Hairong; Wang, Hengwei; Luo, Huairong; Yan, Hua (2011): From shake flasks to bioreactors: survival of *E. coli* cells harboring pGST-hPTH through auto-induction by controlling initial content of yeast extract. In: *Applied microbiology and biotechnology* 90 (4), S. 1419–1428. DOI: 10.1007/s00253-011-3179-5.

Karmakar, Sanat; Maity, Pabitra; Halder, Animesh (2017): Charge-Driven Interaction of Antimicrobial Peptide NK-2 with Phospholipid Membranes. In: *ACS omega* 2 (12), S. 8859–8867. DOI: 10.1021/acsomega.7b01222.

Kim, Sinyeon; Jeong, Haeyoung; Kim, Eun-Youn; Kim, Jihyun F.; Lee, Sang Yup; Yoon, Sung Ho (2017): Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3). In: *Nucleic acids research* 45 (9), S. 5285–5293. DOI: 10.1093/nar/gkx228.

Konz, J. O.; King, J.; Cooney, C. L. (1998): Effects of oxygen on recombinant protein expression. In: *Biotechnology progress* 14 (3), S. 393–409. DOI: 10.1021/bp980021l.

Larentis, Ariane Leites; Nicolau, Júlia Fabiana Monteiro Quintal; Esteves, Gabriela dos Santos; Vareschini, Daniel Tait; Almeida, Fernanda Vicente Ribeiro de; dos Reis, Mitermayer Galvão et al. (2014): Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and micro-bioreactor. In: *BMC research notes* 7, S. 671. DOI: 10.1186/1756-0500-7-671.

Lei, Jun; Sun, Lichun; Huang, Siyu; Zhu, Chenhong; Li, Ping; He, Jun et al. (2019): The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. In: *American Journal of Translational Research* 11 (7), S. 3919–3931.

Lessard, Juliane C. (2013): Growth media for *E. coli*. In: *Methods in enzymology* 533, S. 181–189. DOI: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00011-8.

Levi, Valeria; González Flecha, F. Luis (2002): Reversible fast-dimerization of bovine serum albumin detected by fluorescence resonance energy transfer. In: *Biochimica et biophysica acta* 1599 (1-2), S. 141–148. DOI: 10.1016/S1570-9639(02)00414-4.

Lewis, Mitchell (2005): The lac repressor. In: *Comptes rendus biologiques* 328 (6), S. 521–548. DOI: 10.1016/j.crvl.2005.04.004.

Liepinsh, E.; Andersson, M.; Ruyschaert, J. M.; Otting, G. (1997): Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. In: *Nature structural biology* 4 (10), S. 793–795. DOI: 10.1038/nsb1097-793.

Mahlapuu, Margit; Björn, Camilla; Ekblom, Jonas (2020): Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. In: *Critical reviews in biotechnology* 40 (7), S. 978–992. DOI: 10.1080/07388551.2020.1796576.

Marisch, Karoline; Bayer, Karl; Cserjan-Puschmann, Monika; Luchner, Markus; Striedner, Gerald (2013): Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. In: *Microbial cell factories* 12, S. 58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.

Moravej, Hoda; Moravej, Zahra; Yazdanparast, Maryam; Heiat, Mohammad; Mirhosseini, Ali; Moosazadeh Moghaddam, Mehrdad; Mirnejad, Reza (2018): Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. In: *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24 (6), S. 747–767. DOI: 10.1089/mdr.2017.0392.

N Politis, Stavros; Colombo, Paolo; Colombo, Gaia; M Rekkas, Dimitrios (2017): Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. In: *Drug development and industrial pharmacy* 43 (6), S. 889–901. DOI: 10.1080/03639045.2017.1291672.

Nair, Rahul; Salvi, Pankaj; Banerjee, Sampali; Raiker, Veena A.; Bandyopadhyay, Suman; Soorapaneni, Sudheerbabu et al. (2009): Yeast extract mediated autoinduction of lacUV5 promoter: an insight. In: *New biotechnology* 26 (6), S. 282–288. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.002.

National Library of Medicine (2024): Muramidase. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Muramidase%22%5BMeSH+Terms%5D>, zuletzt aktualisiert am 06.03.2024, zuletzt geprüft am 06.03.2024.

Nayab, Sehrish; Aslam, Muhammad Aamir; Rahman, Sajjad ur; Sindhu, Zia ud Din; Sajid, Sanaullah; Zafar, Nishat et al. (2022): A Review of Antimicrobial Peptides: Its Function, Mode of Action and Therapeutic Potential. In: *Int J Pept Res Ther* 28 (1). DOI: 10.1007/s10989-021-10325-6.

Noguère, Christophe; Larsson, Anna M.; Guyot, Jean-Christophe; Bignon, Christophe (2012): Fractional factorial approach combining 4 Escherichia coli strains, 3 culture media, 3 expression temperatures and 5 N-terminal fusion tags for screening the soluble expression of recombinant proteins. In: *Protein expression and purification* 84 (2), S. 204–213. DOI: 10.1016/j.pep.2012.05.011.

Optek (2024): ASD25-N und ASD25-BT-N Sonden-Sensoren. Online verfügbar unter <https://www.optek.com/de/asd25-n.asp>, zuletzt aktualisiert am 14.02.2024, zuletzt geprüft am 14.02.2024.

Pane, Katia; Durante, Lorenzo; Pizzo, Elio; Varcamonti, Mario; Zanfardino, Anna; Sgambati, Valeria et al. (2016): Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in Escherichia coli. In: *PloS one* 11 (1), e0146552. DOI: 10.1371/journal.pone.0146552.

Papaneophytou, Christos P.; Kontopidis, George (2014): Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. In: *Protein expression and purification* 94, S. 22–32. DOI: 10.1016/j.pep.2013.10.016.

Pham, Hop Thi Bich; Larsson, Gen; Enfors, Sven-Olof (1999): Precultivation technique for studies of microorganisms exhibiting overflow metabolism. In: *Biotechnology Techniques* 13 (1), S. 75–80. DOI: 10.1023/a:1008883212002.

Pouresmaeil, Mahin; Azizi-Dargahlou, Shahnám (2023): Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. In: *Archives of microbiology* 205 (5), S. 212. DOI: 10.1007/s00203-023-03541-9.

Ranga, Sonam; Jaimini, Manish; Sharma, Sanjay Kumar; Chauhan, Bhupendra Singh; Kumar, Amit (2014): A Review on Design OF Experiments (DOE). In: *Int. J. Pharm. Chem. Sci* 3 (1), S. 216–224.

Román-Ramírez, L. A.; Marco, J. (2022): Design of experiments applied to lithium-ion batteries: A literature review. In: *Applied Energy* 320, S. 119305. DOI: 10.1016/j.apenergy.2022.119305.

Rosano, Germán L.; Ceccarelli, Eduardo A. (2014): Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Rosano, Germán L.; Morales, Enrique S.; Ceccarelli, Eduardo A. (2019): New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 28 (8), S. 1412–1422. DOI: 10.1002/pro.3668.

Sabtu, N.; Enoch, D. A.; Brown, N. M. (2015): Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? In: *British medical bulletin* 116, S. 105–113. DOI: 10.1093/bmb/ldv041.

Sandén, Anna Maria; Prytz, Ingela; Tubulekas, Ioannis; Förberg, Cecilia; Le, Ha; Hektor, Andrea et al. (2003): Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. In: *Biotechnology and bioengineering* 81 (2), S. 158–166. DOI: 10.1002/bit.10457.

Sartorius (2024): BioPAT® MFCS SCADA Software | Sartorius. Online verfügbar unter <https://www.sartorius.com/en/products/process-analytical-technology/process-control-automation/biopat-mfcs>, zuletzt aktualisiert am 14.02.2024, zuletzt geprüft am 14.02.2024.

Schägger, H.; Jagow, G. von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Analytical biochemistry* 166 (2), S. 368–379. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.

Schulze, Garry (2020): Development of a biotechnological process suitable for the large-scale production of antimicrobial peptides. Masterarbeit. HAW Hamburg. Online verfügbar unter <https://reposit.haw-hamburg.de/handle/20.500.12738/9936>, zuletzt geprüft am 05.03.2024.

Shi, Guobang; Kang, Xinyue; Dong, Fanyi; Liu, Yanchao; Zhu, Ning; Hu, Yuxuan et al. (2022): DRAMP 3.0: an enhanced comprehensive data repository of antimicrobial peptides. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D488-D496. DOI: 10.1093/nar/gkab651.

Siebertz, Karl; van Bebber, David; Hochkirchen, Thomas (2017): Statistische Versuchsplanung. Design of Experiments (DoE). 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Vieweg (VDI-Buch).

Swint-Kruse, L.; Matthews, K. S. (2013): lac Operon. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*: Elsevier, S. 694–700.

Tachibana, Seiga; Chiou, Tai-Ying; Konishi, Masaaki (2021): Machine learning modeling of the effects of media formulated with various yeast extracts on heterologous protein production in *Escherichia coli*. In: *MicrobiologyOpen* 10 (3), e1214. DOI: 10.1002/mbo3.1214.

Tachibana, Seiga; Watanabe, Kazuki; Konishi, Masaaki (2019): Estimating effects of yeast extract compositions on *Escherichia coli* growth by a metabolomics approach. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 128 (4), S. 468–474. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.03.012.

Tao, Zekun; Yuan, Haibo; Liu, Meng; Liu, Qian; Zhang, Siyi; Liu, Hongling et al. (2023): Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 33 (2), S. 151–166. DOI: 10.4014/jmb.2207.07057.

Thoma, Alexander (2021): Investigation of peptide based antibiotic production: Fully automated three stage process using *Pichia pastoris* as host expression system. Masterarbeit. HAW Hamburg.

Tong, Shifeng; Shi, Ningkun; Zheng, Kaichen; Yin, Zongjun; Zhang, Xiaodong; Liu, Yang (2022): Genomic Variant in NK-Lysin Gene Is Associated with T Lymphocyte Subpopulations in Pigs. In: *Genes* 13 (11). DOI: 10.3390/genes13111985.

Tripathi, N. (2009): High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. In: *DSJ* 59 (2), S. 137–146. DOI: 10.14429/dsj.59.1501.

Tripathi, Nagesh K. (2016): Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. In: *ChemBioEng Reviews* 3 (3), S. 116–133. DOI: 10.1002/cben.201600002.

Tye, Heather (2004): Application of statistical 'design of experiments' methods in drug discovery. In: *Drug discovery today* 9 (11), S. 485–491. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03086-7.

Universität Nebraska (2024): Antimicrobial Peptide Database. Online verfügbar unter <https://aps.unmc.edu/>, zuletzt aktualisiert am 06.03.2024, zuletzt geprüft am 06.03.2024.

Weissman, Steven A.; Anderson, Neal G. (2015): Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. In: *Org. Process Res. Dev.* 19 (11), S. 1605–1633. DOI: 10.1021/op500169m.

World Health Organization (2024): Antimicrobial resistance [Fact sheet]. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, zuletzt aktualisiert am 02.03.2024, zuletzt geprüft am 04.03.2024.

Wurm, David Johannes; Veiter, Lukas; Ulonska, Sophia; Eggenreich, Britta; Herwig, Christoph; Spadiut, Oliver (2016): The *E. coli* pET expression system revisited-mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (20), S. 8721–8729. DOI: 10.1007/s00253-016-7620-7.

Xu, B.; Jahic, M.; Enfors, S. O. (1999): Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology progress* 15 (1), S. 81–90. DOI: 10.1021/bp9801087.

9 Anhang

9.1 Materialien

Tabelle 26: Übersicht der verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller | Bestellnummer |
|---|-------------------------------|---------------|
| 1,4-Dithiothreit (DTT) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6908.3 |
| Ammoniaklösung (≥25%) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6774.3 |
| Ammoniumeisen(III)-citrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 0618.1 |
| Benzonase® Nuklease (≥250 U/μL) | Sigma-Aldrich | E1014-5KU |
| Borsäure | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6943.2 |
| BugBuster® Protein Extraction Reagent | Merck Millipore | 70584-3 |
| D(+)-Glucose Monohydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6887.5 |
| di-Ammoniumhydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co. KG | P736.2 |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co. KG | P030.1 |
| Essigsäure (100%) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6755.2 |
| Ethanol (≥99,8%) | Carl Roth GmbH & Co. KG | K928.2 |
| Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 8040.1 |
| Glycerin (≥99,5%) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 3783.5 |
| Harnstoff (Urea) | Carl Roth GmbH & Co. KG | X999.3 |
| Hefeextrakt | Carl Roth GmbH & Co. KG | 2363.4 |
| IPTG | Carl Roth GmbH & Co. KG | CN08.3 |
| Kaliumchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6781.2 |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co. KG | P018.2 |
| Kanamycinsulfat (≥750 I.U./mg) | Carl Roth GmbH & Co. KG | T832.3 |
| Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 7095.1 |
| Kupfer(II)-chlorid Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 2623.1 |
| Lysozym (≥45 000 FIP U/mg) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 8259.2 |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | P027.1 |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | T881.3 |
| Marker (Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder) | Thermo Fisher Scientific Inc. | 26628 |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6773.1 |
| Natriumazid | Carl Roth GmbH & Co. KG | K305.1 |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG | 9265.1 |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6771.2 |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 0183.2 |
| Natriummolybdat Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | 0274.1 |
| Orange G (C.I. 16230) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 0318.2 |
| ortho-Phosphorsäure (≥85%) | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6366.1 |
| Pepton aus Casein | Carl Roth GmbH & Co. KG | 8986.2 |
| Protein-Standard (BSA) | Sigma-Aldrich | P0834-10X1ML |
| ROTI®BLUE (5x konz.) | Carl Roth GmbH & Co. KG | A152.1 |
| Tricin | Carl Roth GmbH & Co. KG | 6977.3 |
| Tris | Carl Roth GmbH & Co. KG | 4855.2 |
| Zinkacetat Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG | X893.1 |
| Zitronensäure | Carl Roth GmbH & Co. KG | 1818.1 |

Beim Hefeextrakt wurde die Charge 293340547 und beim Pepton die Charge 293339976 verwendet.

Tabelle 27: Verwendete Verbrauchsgegenstände

| Verbrauchsmaterial | Hersteller | Bestellnummer |
|---|----------------------------|---------------|
| 16,5 % Criterion™ Tris-Tricin Gel, 12 + 2 Taschen, 45 µL | Bio-Rad Laboratories, Inc. | 3450063 |
| Kanüle (0,80 x 40 mm) | B. Braun | 4657527 |
| Küvette | Carl Roth GmbH & Co. KG | XK20 |
| Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL) | nerbe plus GmbH & Co. KG | 04-212-1000 |
| Mikroreaktionsgefäß (2 mL) | nerbe plus GmbH & Co. KG | 04-232-3100 |
| Pipettenspitzen (10 µL) | nerbe plus GmbH & Co. KG | 07-802-0000 |
| Pipettenspitzen (1000 µL) | nerbe plus GmbH & Co. KG | 07-132-0095 |
| Pipettenspitzen (200 µL) | nerbe plus GmbH & Co. KG | 07-122-0073 |
| Spritze (2 mL) | B. Braun | 4606701V |
| Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm) | Sartorius AG | 16534 |
| Spritzenaufsatzfilter (0,45 µm) | VWR International | 514-0067 |
| Zentrifugationsröhrchen (15 mL) | Carl Roth GmbH & Co. KG | N459.1 |
| Zentrifugationsröhrchen (50 mL) | Carl Roth GmbH & Co. KG | N463.1 |

In Tabelle 28 ist das Equipment und das Zubehör des Reaktors BIOSTAT ED5 dargestellt. Zusätzlich verfügt der Reaktor über eine Temperatursonde, diese entsprach einem pt-100.

Tabelle 28: Equipment und Zubehör Reaktor BIOSTAT ED5

| Equipment | Hersteller | Bestellnummer/Name |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------|
| Abgasfilter | Sartorius Stedim Biotech GmbH | 5231507H9 |
| Abgassensor | Bluesens gas sensor GmbH | BlueInOne |
| Bioreaktor | B. Braun Biotech International | ES 5 K |
| Dampferzeuger | ZIRBUS technology | Steamboy - 9 |
| DCU | B. Braun Biotech International | ED5 |
| Fluorescence system | DELTA Lights and Optics | BioView® |
| pH Sonde | Mettler Toledo | 45-DPAS-SC-K8S/425 |
| pO ₂ Sonde | Mettler Toledo | INGOLD |
| Pumpe (Fed-Batch) | Ismatec | ISM597D |
| Trübungssonde | Optec-Danulat GmbH | AS16 |
| Waage (Base) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | LP6200 |
| Waage (Fed-Batch) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | QA7DCE - S |
| Waage (Fed-Batch) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | LP6200 |
| Waage (Säure) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | CP2202S |
| Zuluftfilter | Sartorius Stedim Biotech GmbH | 5181407T7-----B |

In Tabelle 29 sind das Equipment und das Zubehör der Qplus Reaktoren der Multifermenteranlage dargestellt, hierbei wurden Dopplungen vermieden. Zusätzlich verfügen alle Reaktoren noch über pt-100 als Temperatursonden.

Tabelle 29: Zusammenfassende Übersicht über das Equipment und Zubehör der Qplus Reaktoren der Multifermeteranlage

| Equipment | Hersteller | Bestellnummer/Name |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Abgasfilter | Sartorius Stedim Biotech GmbH | 5181307T5--00 |
| Abgassensor | Bluesens gas sensor GmbH | BlueInOne |
| Bioreaktor | Sartorius Stedim Biotech GmbH | BIOSTAT Qplus |
| Dampferzeuger | ZIRBUS technology | Steamboy DG 9 |
| pH Sonde | Hamilton Company | EasyFerm Plus PHI K8 160 |
| pO ₂ Sonde | Hamilton Company | OxyGold G 225 / 237396 |
| Probeentnahme-Entgasungsfilter | Carl Roth GmbH & Co. KG | P666.1 |
| Pumpe (Fed-Batch/Produktion) | Ismatec | ISM596D |
| Trübungssonde | Optek-Danulat GmbH | ASD19-N-EC-05 |
| Waage (Base) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | TE4101 |
| | Sartorius Stedim Biotech GmbH | CP6201 |
| Waage (Feed) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | TE4101/ TE2101 |
| | Sartorius Stedim Biotech GmbH | CP6201 |
| | Sartorius Stedim Biotech GmbH | LP12000S |
| Waage (Reaktor) | Sartorius Stedim Biotech GmbH | CP34001 S |
| | Sartorius Stedim Biotech GmbH | CP 16001 S |
| Zuluftfilter | Sartorius Stedim Biotech GmbH | Midisart® 2000 |

Tabelle 30: Verwendetes Laborequipment

| Equipment | Hersteller | Bestellnummer/Name |
|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Analytische Waage | B. Braun Biotech International | 23713 |
| | Kern u. Sohn GmbH | ABS220 - 4N |
| | PAG Oerlikon AG | 240 - 9063 |
| | Sartorius AG | ED 4202S |
| | Sartorius AG | LA 230S |
| Autoklave | Systec GmbH & Co. KG | VX - 150 |
| Fotometer | Thermo Scientific | Genesys 20 |
| | VWR | UV/Visible Spectrophotometer, P9 |
| Gel Imaging-System | Bio-Rad Laboratories, Inc. | Gel Doc™ EZ System |
| Gel-Elektrophorese-Zelle | Bio-Rad Laboratories, Inc. | Criterion™ Cell |
| Gel-Färber-Elektrophorese | Amersham pharmacia biotech | Hoefer Processor Plus |
| Heizblock | Eppendorf | Thermomixer comfort |
| | Eppendorf | Thermomixer compact |
| Hochstrom-Netzteil | Bio-Rad Laboratories, Inc. | PowerPac HC™ |
| Laborzentrifuge | Eppendorf | Centrifuge 5417 R |
| | Sigma Laborzentrifugen GmbH | 6K15 |
| Magnetrührer | Heidolph Instruments | MR Hei - Standard |
| | IKA | Combimag RCO |
| | IKA | RH basic 2 |
| pH-Meter | Mettler Toledo | FiveEasy |
| Reaktionsgefäß Schüttler | IKA | Vortex 2 |
| | IKA | Vortex 4 basic |
| Schüttel Inkubator | New Brunswick Scientific Co. | Innova 42 |
| Sterilwerkbank | Heraeus Instruments | HERA Safe |
| | Heraeus Instruments | HERA Safe HS 12 |
| Tischzentrifuge | Sigma Laborzentrifugen GmbH | Sigma 1-14 |
| Trockenschrank | Heraeus Instruments | VacuTherm |
| Ultraschallgerät | B. Braun Biotech International | Labsonic U |

9.2 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die folgenden Puffer und Lösung unter der Verwendung von VE-Wasser angesetzt.

Tabelle 31: Zusammensetzung des PBS-Urea (2M) Puffers verwendet bei der Probenvorbereitung. Aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

| Chemikalie | Konzentration |
|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl | 8,00 g L ⁻¹ |
| KCl | 0,20 g L ⁻¹ |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,42 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 0,27 g L ⁻¹ |
| Urea | 120,12 g L ⁻¹ |

Tabelle 32: Zusammensetzung der 1M DTT Lösung. Aliquotiert und bei -20 °C gelagert

| Chemikalie | Konzentration |
|----------------------|---------------------------|
| Dithiothreitol (DTT) | 154,253 g L ⁻¹ |

Tabelle 33: Zusammensetzung der Lysozym Standards. 1: 0,1 mg/mL. 2: 0,2 mg/mL. Aliquotiert und bei -20 °C gelagert

| Chemikalie | Konzentration |
|----------------------------------|--|
| NaCl | 8,00 g L ⁻¹ |
| KCl | 0,20 g L ⁻¹ |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,42 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 0,27 g L ⁻¹ |
| Lysozym | 0,1 ¹ /0,2 ² g L ⁻¹ |

Tabelle 34: Zusammensetzung des 10x Laufpuffer für Tris-Tricin Gele. Vor der Verwendung wird dieser 1:10 verdünnt, sodass eine 1x Laufpuffer Konzentration erhalten wird.

| Chemikalie | Konzentration |
|------------|-------------------------|
| TRIS-Base | 121,1 g L ⁻¹ |
| Tricin | 179,2 g L ⁻¹ |
| SDS | 10 g L ⁻¹ |

Tabelle 35: Zusammensetzung der Färbelösung zum anfärben der Tris-Tricin Gele.

| Chemikalie | Konzentration |
|---------------------|------------------------|
| ROTI®BLUE (5x konz) | 200 mL L ⁻¹ |
| Ethanol (≥99,8%) | 200 mL L ⁻¹ |

Tabelle 36: Zusammensetzung der Entfärbelösung zum Entfärben der Tris-Tricin Gele

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------|------------------------|
| Ethanol (≥99,8%) | 100 mL L ⁻¹ |
| Essigsäure (100%) | 100 mL L ⁻¹ |

Tabelle 37: Puffer S für die Herstellung des Probenpuffers für Tris-Tricin SDS-PAGE, pH = 6,8 (eingestellt mit NaOH und HCl)

| Chemikalie | Konzentration |
|-------------------------|------------------------|
| Tris | 61 g L ⁻¹ |
| SDS | 4,24 g L ⁻¹ |
| Natriumazid (1% Lösung) | 10 mL L ⁻¹ |

Tabelle 38: Probenpuffer für die Tris-Tricin SDS-PAGE

| Chemikalie | Konzentration |
|----------------|------------------------|
| Puffer S | 25 mL L ⁻¹ |
| SDS | 20 g L ⁻¹ |
| Orange G | 400 mL L ⁻¹ |
| Glycerol (87%) | 200 mg L ⁻¹ |

9.3 Reaktoren

9.3.1 Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5

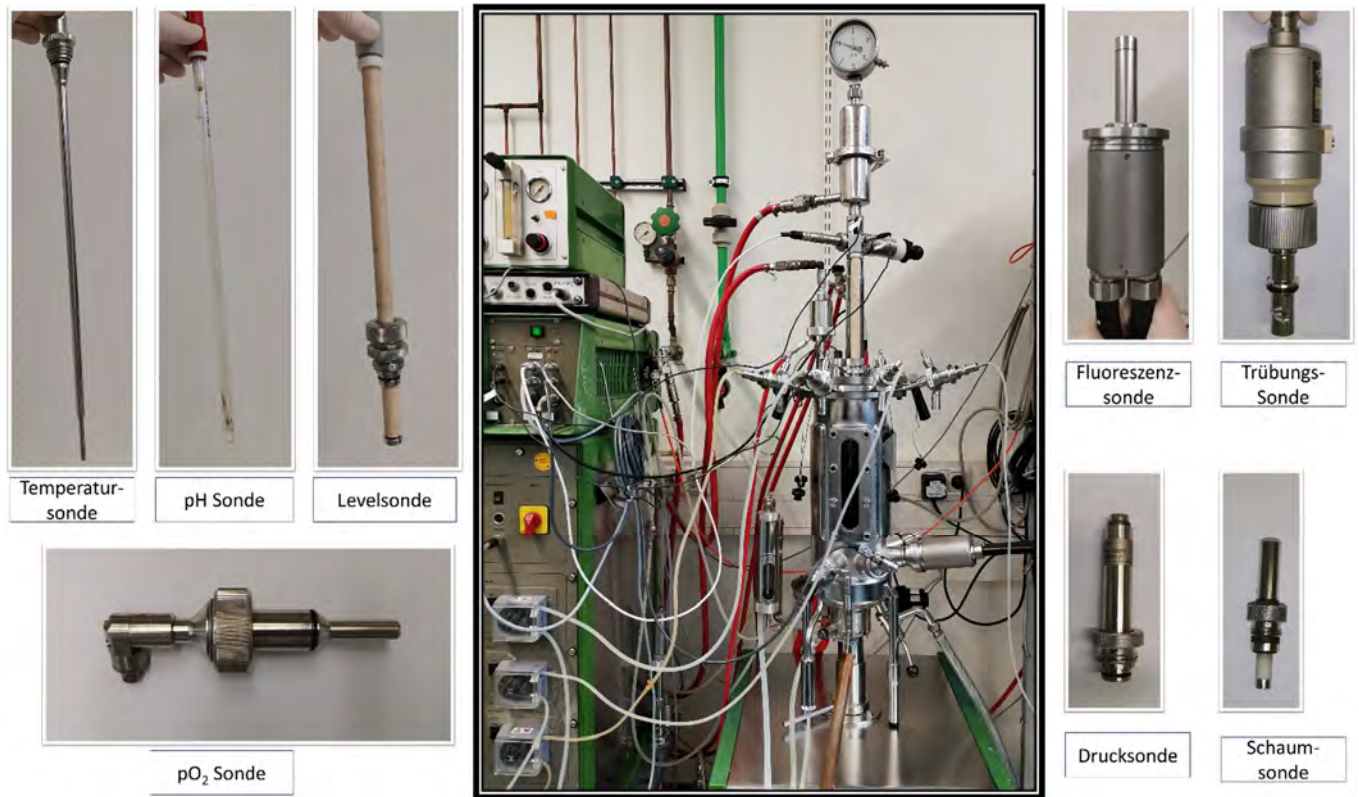


Abbildung 91: Bioreaktorsystem BIOSTAT® ED5 mit den verwendeten Sonden

9.3.2 Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus

9.3.2.1 Reaktor und Sonden



Abbildung 92: BIOSTAT® Qplus mit den entsprechenden Sonden und der Probenentnahmevorrichtung

9.3.2.2 Rohrleitungs- und Instrumentenfließbild

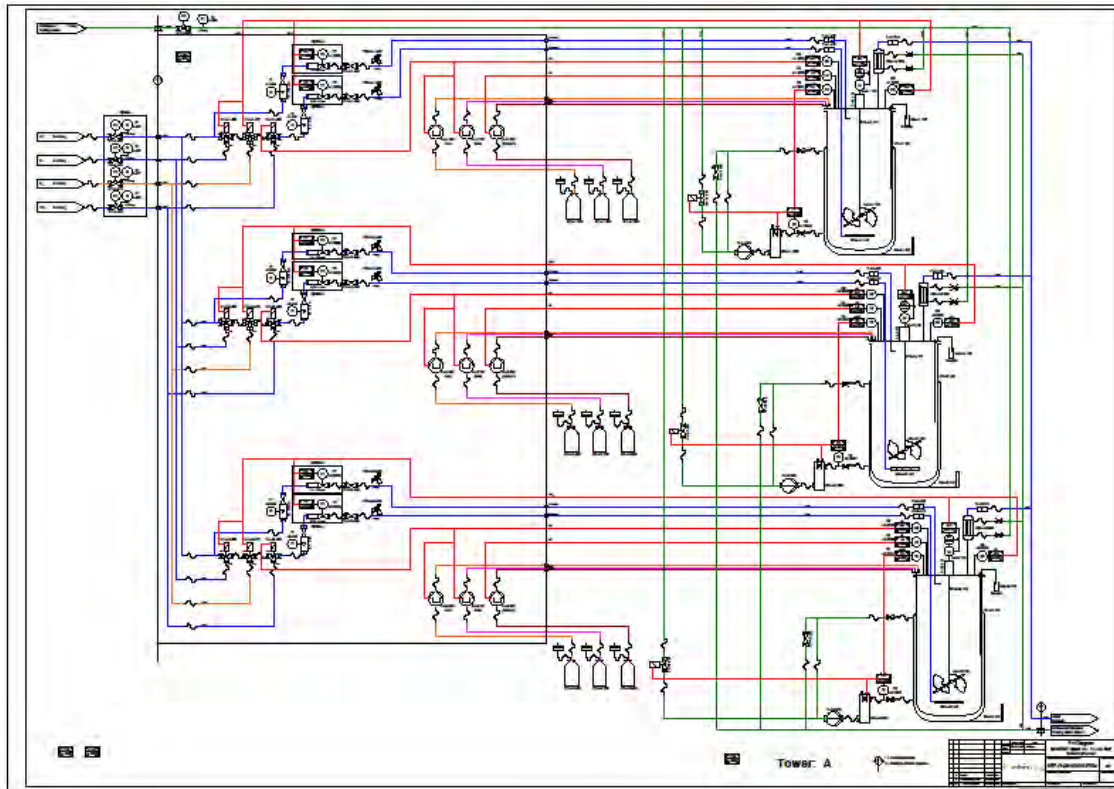


Abbildung 93: Ausführliches RI-Fließbild einer Untereinheit des Multifermenteranlage

9.4 Kultivierungen

9.4.1 Übersicht

In Tabelle 39 sind alle Kultivierungen und deren Zuordnung zu den Experimenten dargestellt. Bei der Kultivierung von der KW 47 kam es aufgrund von Problemen in der pH-Regelung während des Sterillaufes zu einer starken Verdünnung des Batchmediums vor der Animpfung. Die Zellen sind daraufhin nicht ausreichend angewachsen, weswegen von einem Transfer abgesehen worden ist. Die bereits vorbereiteten Qplus Reaktoren wurden für die Kultivierung der KW48 verwendet. Bei Q1 gab es anfänglich Probleme mit der Base, wodurch der pH-Wert nicht auf pH 7 geregelt werden konnten, deswegen wurde diese Kultivierung von der Auswertung ausgeschlossen. Beim Q4 brach die Zufuhr von Medium im Verlaufe der Produktionsphase ab, weshalb diese Kultivierung ebenfalls verworfen worden ist. Die Zellen für den Q6 wurden im ED5 durch die pH-Regelung zu stark verdünnt, wodurch diese innerhalb des Qs nicht mehr ausreichend angewachsen sind, außerdem war die initiale Konzentration weit geringer als bei den anderen Reaktoren.

Aufgrund des hohen Druckes innerhalb der Reaktoren und generellen Problemen mit den Feedpumpen, war die Feedpumpe vom Q4 bei der Fermentation in der KW50 nicht in der Lage ausreichend Medium zu pumpen, weshalb diese Kultivierung ebenfalls verworfen werden musste.

Bei der Kultivierung in der KW02 war das Volumen im ED5 nicht ausreichend, um alle sechs Reaktoren mit ausreichend Zellen zu versorgen, weshalb die Zellen im Q6 mit HEPES-Puffer aufgefüllt worden sind. Deshalb wurde diese Kultivierung ebenfalls von der Auswertung ausgenommen. Sie diente als Orientierung wie weit Zellen verdünnt werden müssen, sodass keine Sauerstofflimitierung vorliegt.

Tabelle 39: Übersicht über alle durchgeführten Kultivierungen. Markiert sind die Kultivierungen, welche aufgrund von offensichtlichen Problemen, von der Auswertung ausgenommen worden sind.

| KW | Reaktor | Experiment | Hefeextrakt | Peptone | IPTG |
|----|---------|------------|-------------|---------|------|
| 48 | Q1 | N2 | 1 | -1 | -1 |
| 48 | Q2 | N10 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Q3 | N12 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Q4 | N4 | 1 | 1 | -1 |
| 48 | Q5 | N8 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | Q6 | N6 | 1 | -1 | 1 |
| 50 | Q1 | N5 | -1 | -1 | 1 |
| 50 | Q2 | N1 | -1 | -1 | -1 |
| 50 | Q3 | N11 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | Q4 | N9 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | Q5 | N3 | -1 | 1 | -1 |
| 50 | Q6 | N7 | -1 | 1 | 1 |
| 02 | Q1 | N9 | 0 | 0 | 0 |
| 02 | Q2 | N4 | 1 | 1 | -1 |
| 02 | Q3 | N5 | -1 | -1 | 1 |
| 02 | Q4 | N2 | 1 | -1 | -1 |
| 02 | Q5 | N6 | 1 | -1 | 1 |
| 02 | Q6 | Z | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q1 | VZ | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q2 | N2 | 1 | -1 | -1 |
| 04 | Q3 | N6 | 1 | -1 | 1 |
| 04 | Q4 | Z | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q5 | VZ | 0 | 0 | 0 |
| 04 | Q6 | Z | 0 | 0 | 0 |

9.4.2 BTM/OD

In Tabelle 40 sind die Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW48 im ED5 dargestellt.

Tabelle 40: Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW48 im ED5

| KW48 | | |
|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| Batch age [h] | OD ₆₀₀ | c _{XL} [g L ⁻¹] |
| 2,12 | 1,243 | 1,525 |
| 3,00 | 2,36 | 1,575 |
| 4,06 | 4,72 | 3,65 |
| 5,10 | 9,425 | 5,85 |
| 6,00 | 10,525 | 11,35 |
| 7,01 | 27,1 | 15,225 |
| 21,11 | 93,9 | 64,05 |
| 22,06 | 126 | 66,85 |
| 23,05 | 136,6 | 70,325 |
| 24,30 | 132,4 | 67,125 |

In Tabelle 41 sind die Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW50 im ED5 dargestellt.

Tabelle 41: Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW50 im ED5

| KW50 | | |
|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| Batch age [h] | OD ₆₀₀ | c _{XL} [g L ⁻¹] |
| 2,00 | 1,815 | 2,45 |
| 3,00 | 3,46 | 2,85 |
| 3,97 | 6,75 | 4,375 |
| 4,96 | 14,05 | 7,95 |
| 5,98 | 21,175 | 11,425 |
| 22,00 | 127,2 | 69,675 |
| 22,68 | 138 | 73,625 |
| 23,26 | 148 | 76,325 |
| 24,00 | 148,75 | 78,525 |

In Tabelle 42 sind die Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW02 im ED5 dargestellt.

Tabelle 42: Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW02 im ED5

| KW02 | | |
|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| Batch age [h] | OD ₆₀₀ | c _{XL} [g L ⁻¹] |
| 2,00 | 1,56 | 1,85 |
| 3,00 | 2,99 | 2,8 |
| 4,00 | 5,59 | 3,65 |
| 4,97 | 10,45 | 6,25 |
| 19,89 | 107,6 | 53,9 |
| 20,69 | 110,2 | 55,225 |
| 21,48 | 114,4 | 55,075 |
| 22,20 | 119 | 55,95 |
| 22,95 | 123 | 56,625 |
| 23,75 | 113,4 | 56,975 |
| 24,64 | 108,2 | 56,325 |

In Tabelle 43 sind die Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW02 im ED5 dargestellt.

Tabelle 43: Messwerte der OD und der BTM über den gesamten Prozess der Kultivierung KW04 im ED5

| KW04 | | |
|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| Batch age [h] | OD ₆₀₀ | c _{XL} [g L ⁻¹] |
| 2,33 | 2,055 | 1,525 |
| 3,17 | 3,515 | 2,55 |
| 3,98 | 6,39 | 3,7 |
| 5,03 | 12,8 | 7,1 |
| 22,4 | 112,8 | 86,1 |
| 24,09 | 119,4 | 89,6 |

In Abbildung 94 ist die Bestimmung des Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD über die Batch Phase für alle Kultivierungen dargestellt.

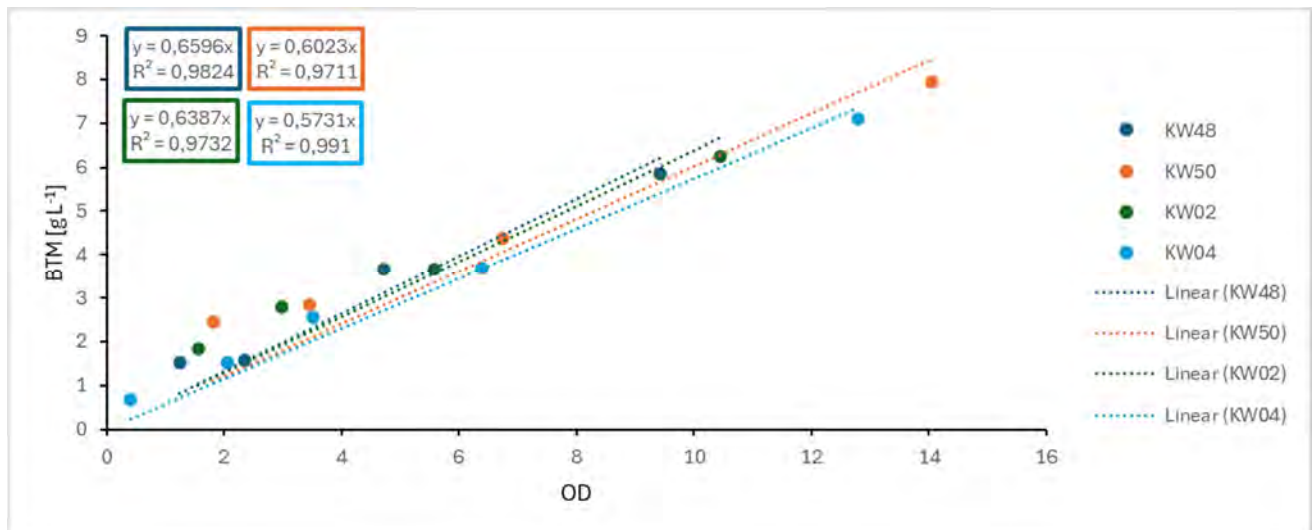


Abbildung 94: Bestimmung des Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD über die Batch Phase

In Abbildung 95 wurde ein universeller Umrechnungsfaktor zwischen BTM und OD bestimmt, dabei wurden alle datenpunkte berücksichtigt. Die roten Datenpunkte sind offensichtliche Ausreißer. Der orange Datenpunkt könnte ebenfalls ein Ausreißer sein.

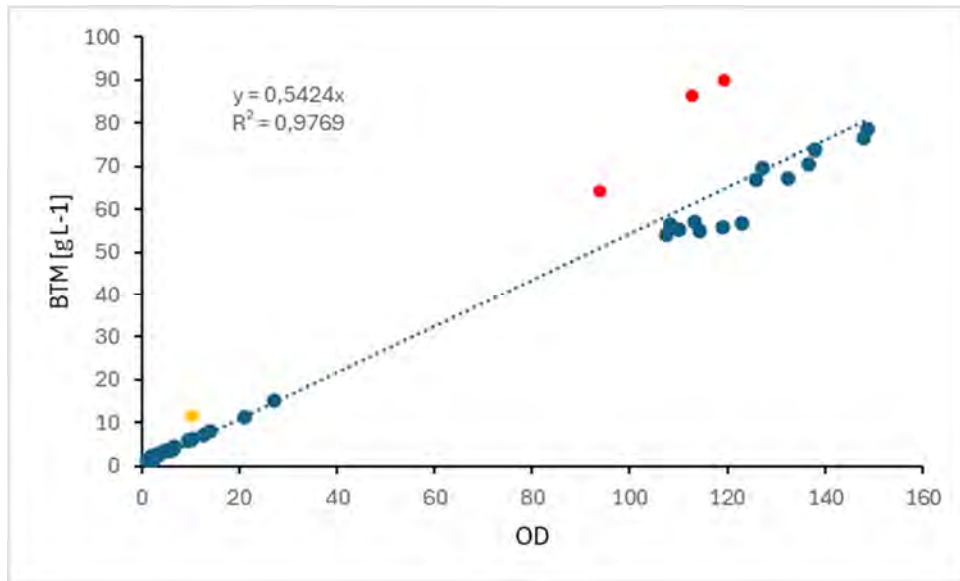


Abbildung 95: Bestimmung eines universellen Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD auf Grundlage der vier Kultivierungen unter Berücksichtigung aller Datenpunkte. Markierte Datenpunkte sind mögliche Ausreißer.

Durch das Ausschließen der drei roten Ausreißer, konnte das Bestimmtheitsmaß von 0,977 auf 0,997 erhöht werden. Dadurch sinkt der Umrechnungsfaktor von 0,54 auf 0,51 (siehe Abbildung 96).

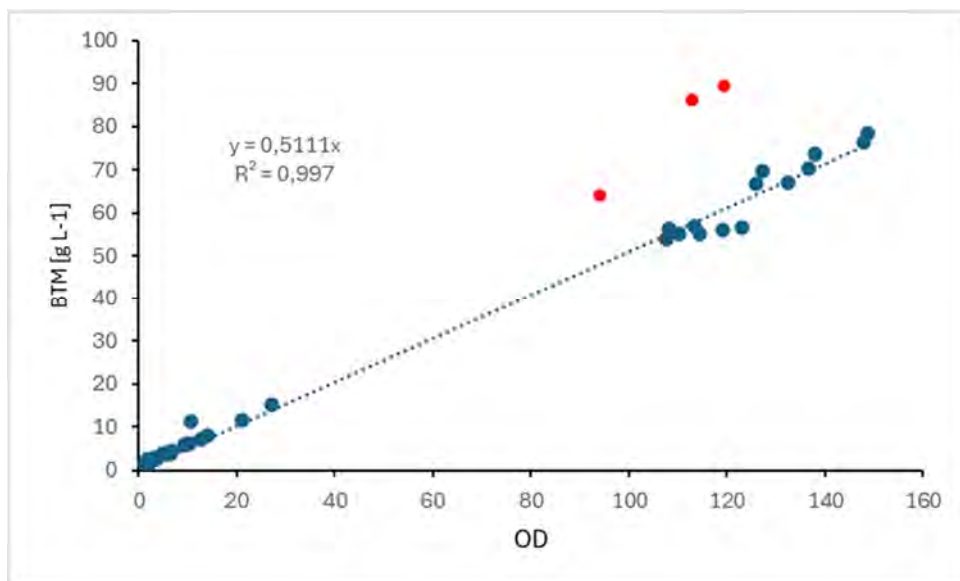


Abbildung 96: Bestimmung eines universellen Umrechnungsfaktors zwischen BTM und OD auf Grundlage der vier Kultivierungen unter Berücksichtigung aller Datenpunkte. Markierte Datenpunkte sind mögliche Ausreißer

Ausgehend von diesem Umrechnungsfaktor wurde der erwartete OD bzw. BTM-Wert des orangenen Datenpunktes berechnet, um eine Bewertung von diesem durchzuführen. Die theoretischen Werte weichen um 51 % bzw. 196 % von den gemessenen Werten ab. Auf Grundlage dessen wurde dieser Datenpunkt ebenfalls als Ausreißer eingestuft.

9.4.3 KW50 Screeningreaktor Q3

Das Waagsignal des Reservoirs unterlag in dieser Kultivierungen sehr starken Schwankungen, weswegen die Berechnungen der volumetrischen Eintragsrate keine sinnvollen Werte ergeben haben (siehe Abbildung 97).

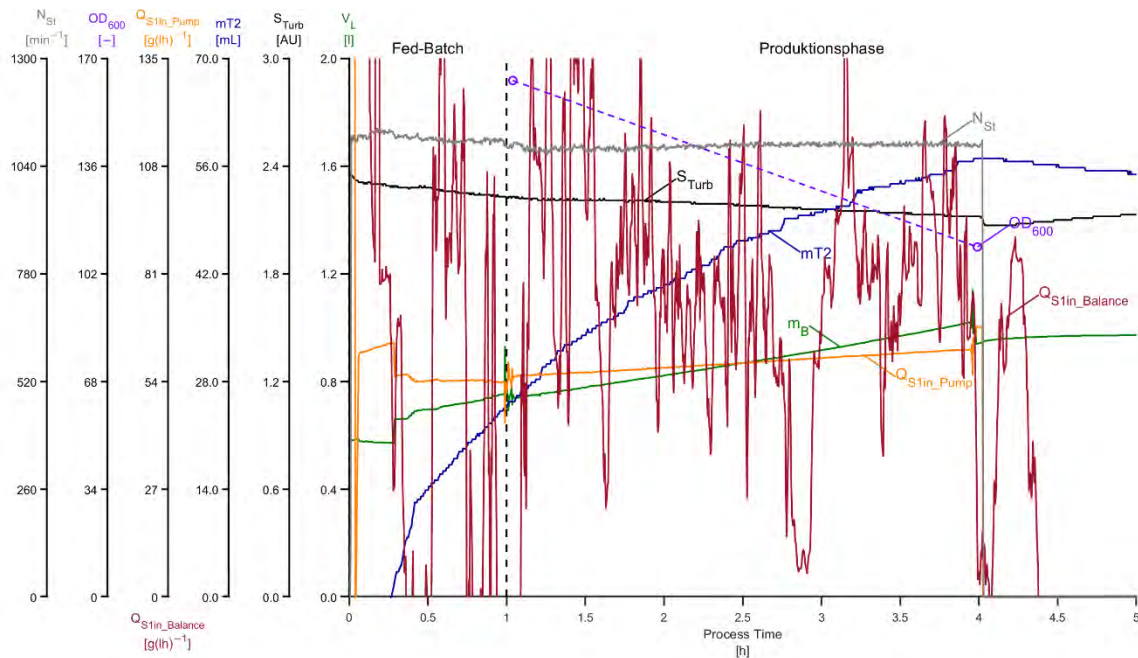


Abbildung 97: Kultivierungsverlauf der *E. coli* Zellen im Screeningreaktor Q3 der Kultivierung der KW50. Dargestellt ist das Volumen der Flüssigphase des Reaktors (V_L), der Rohwert der Trübungssonde (S_{Turb}), der Eintrag an Base ($mT2$), die volumetrische Glucoseeintragsrate berechnet aus der Pumprate (Q_{S1in_Pump}) und aus dem Waagen Signal ($Q_{S1in_Balance}$), der OD und der Rührerdrehzahl (N_{Si}).

9.4.4 Mikroskopische Aufnahmen

Die Produktion des Produktes belastet die Zellen, wodurch es theoretisch zu morphologischen Änderungen der Zelle kommen könnte. Die Messung der OD ist eine einfache und schnelle Methode, um die Zellkonzentration zu messen. Im Gegensatz zur BTM-Bestimmung, lässt sich die OD atline des Prozesses bestimmen. Um vergleichbare Proben zu nehmen, werden alle Proben auf eine einheitliche OD von 50 eingestellt. Um sicherzustellen, dass sich die Morphologie der Zellen über den Prozess nicht maßgeblich verändert, wurden Proben unter dem Mikroskop analysiert (siehe Abbildung 98). Die Zellen der Vorkultur gleichen den Zellen in der Batch Phase. Die Zellen in der Fed-Batch Phase bleiben über den Verlauf der Produktionsphase vergleichbar.

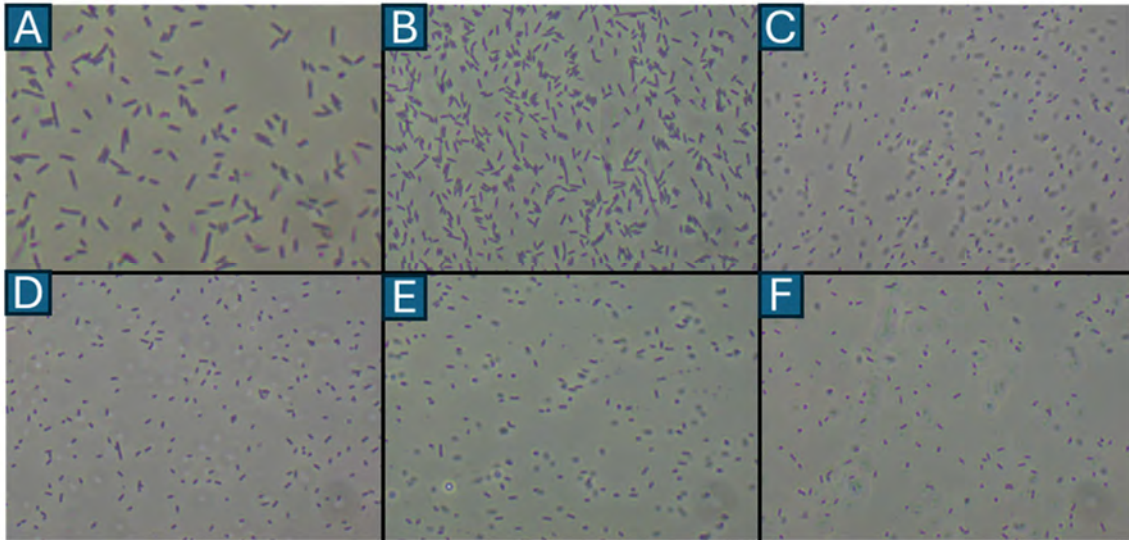


Abbildung 98: Mikroskopische Aufnahmen der Zellen über den Verlauf einer Kultivierung mit einer Batch-, einer Fed-Batch und einer Produktionsphase. A: Zellen der Vorkultur, unverdünnt, 630-fach vergrößert, nach 19h Wachstum. B: Zellen in der Batch Phase, unverdünnt, 630-fach vergrößert, nach 4h Wachstum im Bioreaktor. C: Zellen in der Fed-Batch Phase, 1:100 verdünnt, 630-fach vergrößert, nach 22h Wachstum im Bioreaktor. D: Zellen in der Produktionsphase, 1:100 verdünnt, 630-fach vergrößert, nach 24h Wachstum im Bioreaktor (2h Produktionsphase). E: Zellen in der Produktionsphase, 1:100 verdünnt, 630-fach vergrößert, nach 26h Wachstum im Bioreaktor (4h Produktionsphase). F: Zellen in der Produktionsphase, 1:100 verdünnt, 630-fach vergrößert, nach 28h Wachstum im Bioreaktor (6h Produktionsphase)

9.5 Tricin-SDS-PAGE

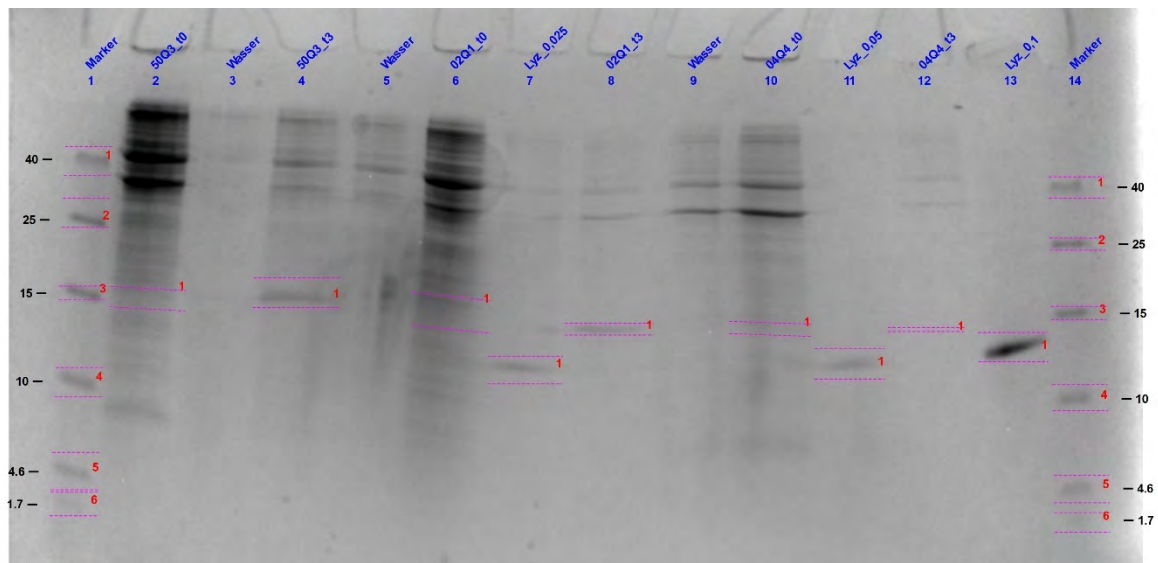


Abbildung 99: Gel der Zentralpunkte 50Q3, 02Q1 und 04Q4. Aufgetragen sind jeweils die Probe von Zeitpunkt t_0 (direkt nach der Induktion) und t_3 (nach 3 h Produktion) (Gel 1). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

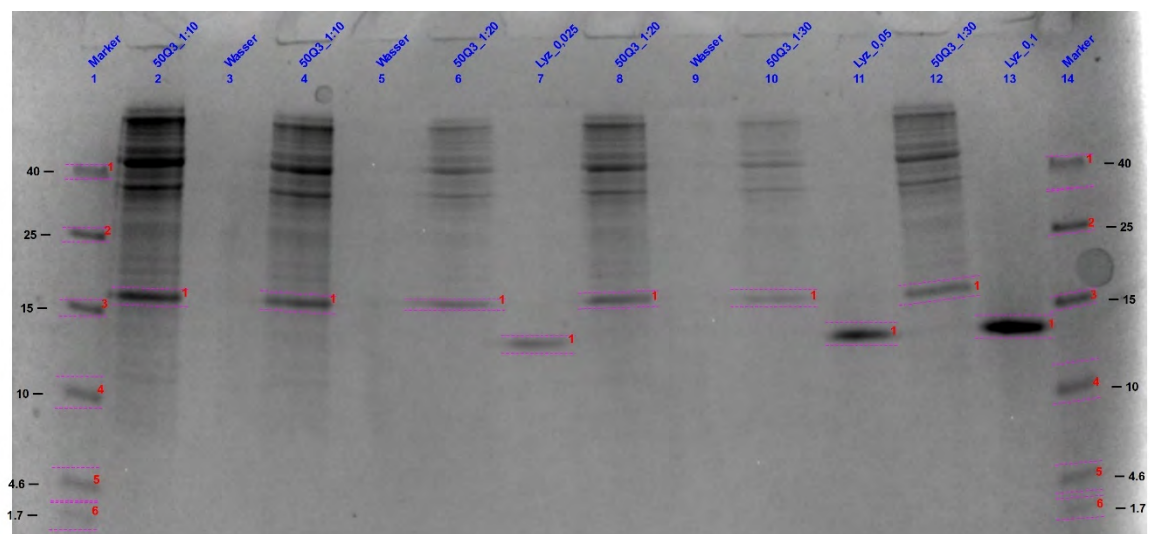


Abbildung 100: Gel zur Untersuchung von Verdünnungseinflüssen und Ermittlung einer guten Verdünnung der Proben. Aufgetragen ist die Prozessprobe 50Q3 (t_3) mit unterschiedlichen Verdünnungen (Gel 2). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

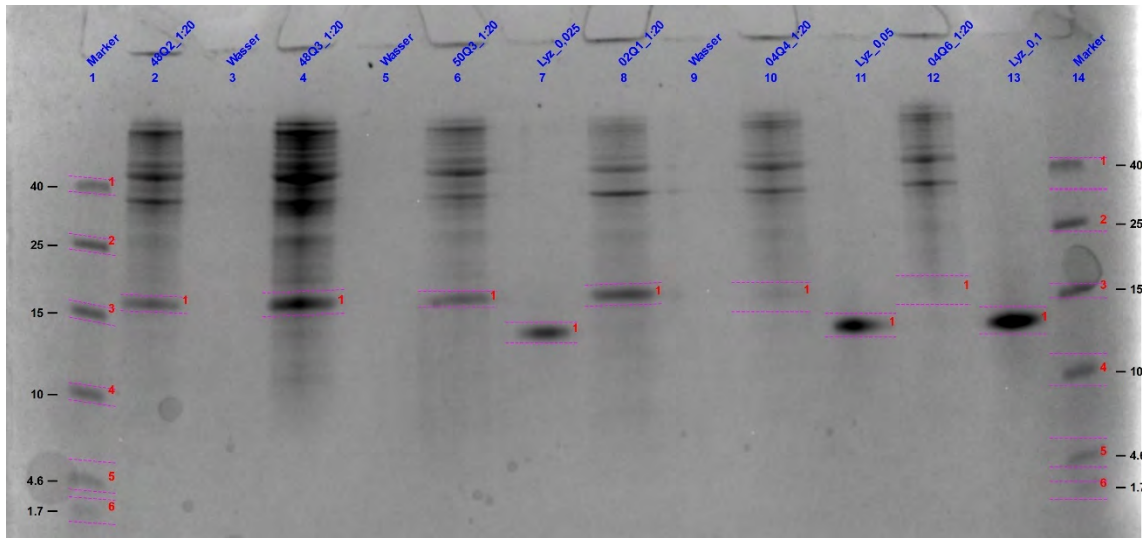


Abbildung 101: Gel aller Zentralpunkte aller Screeningversuche (Gel 3.1). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

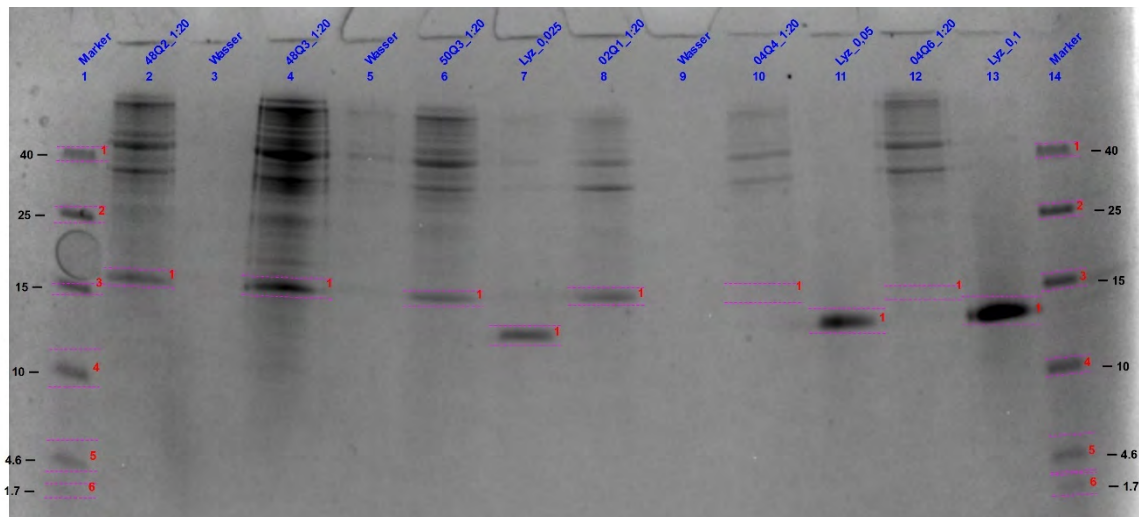


Abbildung 102: Gel aller Zentralpunkte aller Screeningversuche (Gel 3.2). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

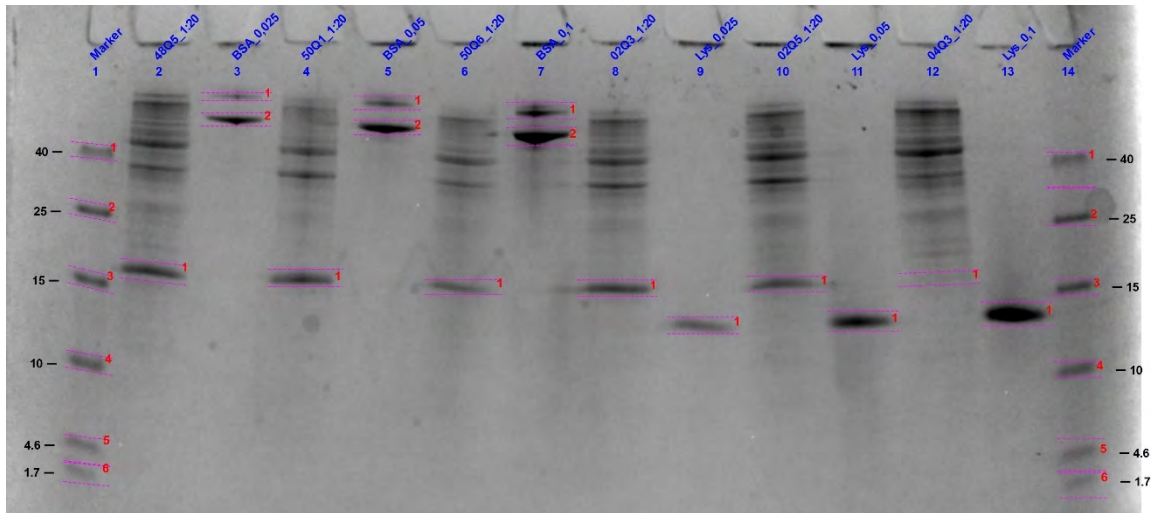


Abbildung 103: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 1 mM IPTG (Gel 4.2). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

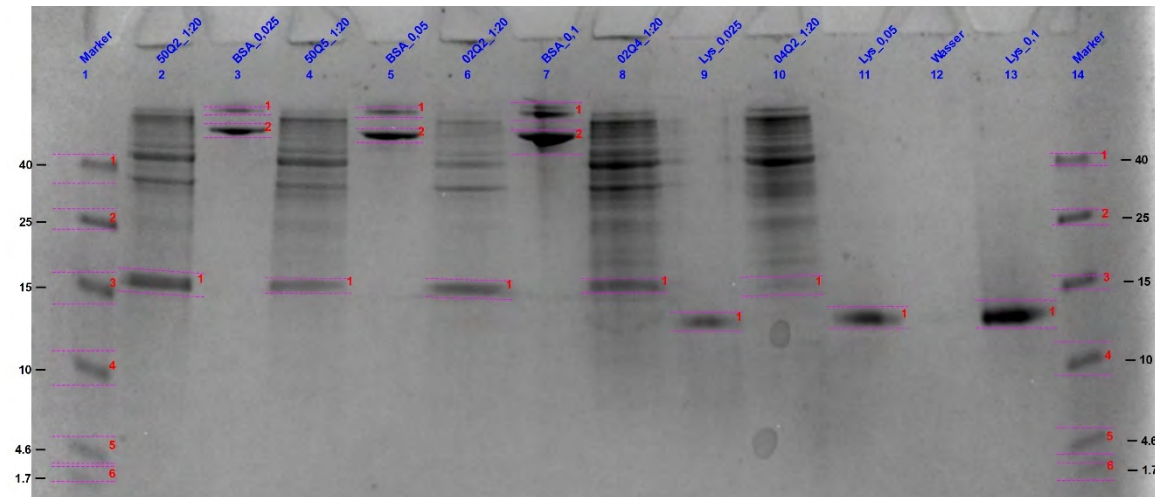


Abbildung 104: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 0,1 mM IPTG (Gel 5.1). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

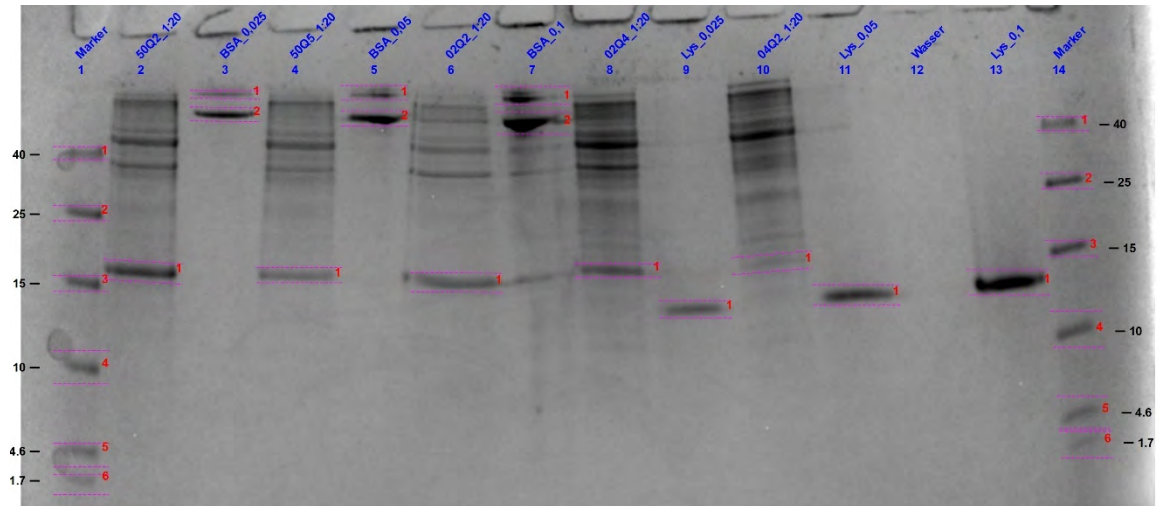


Abbildung 105: Gel aller Screeningexperimente mit einer Induktion mit 0,1 mM IPTG (Gel 5.2). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

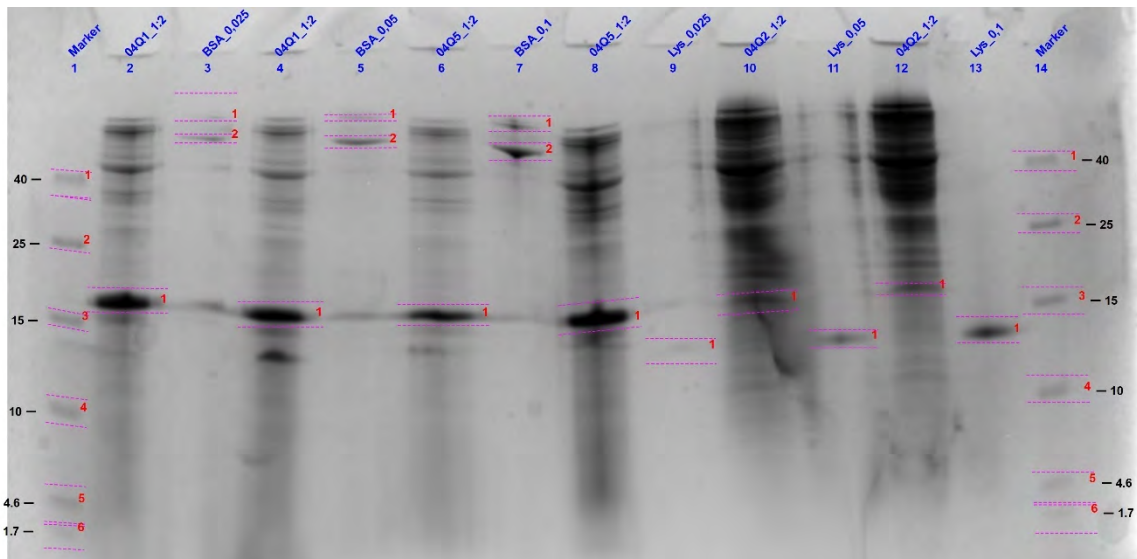


Abbildung 106: Gel der Screeningexperimente 04Q1, 04Q5 und 04Q2 (Gel 6). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

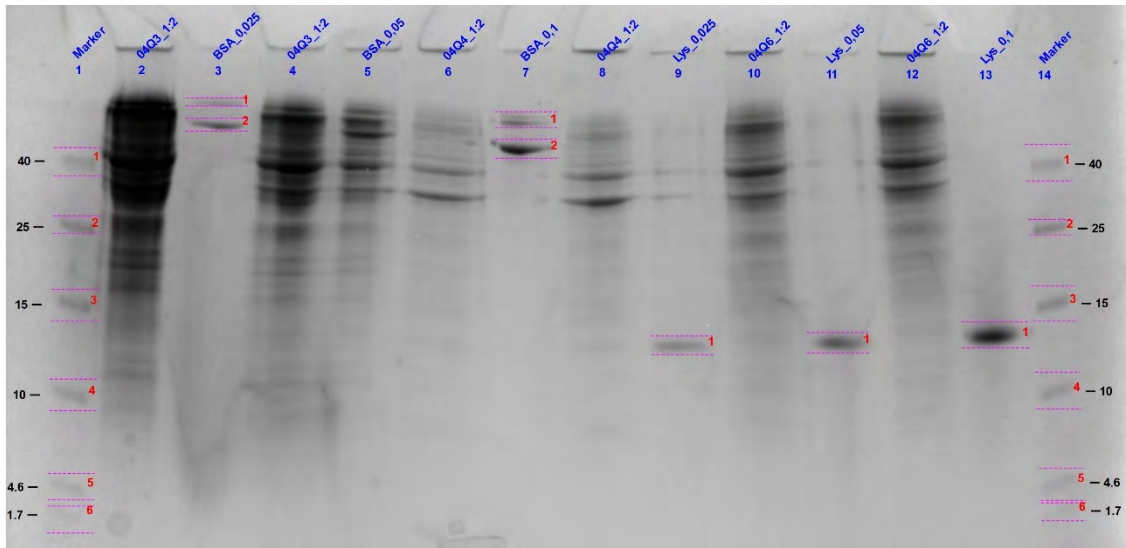


Abbildung 107: Gel der Screeningexperimente 04Q3, 04Q4 und 04Q6 (Gel 7). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

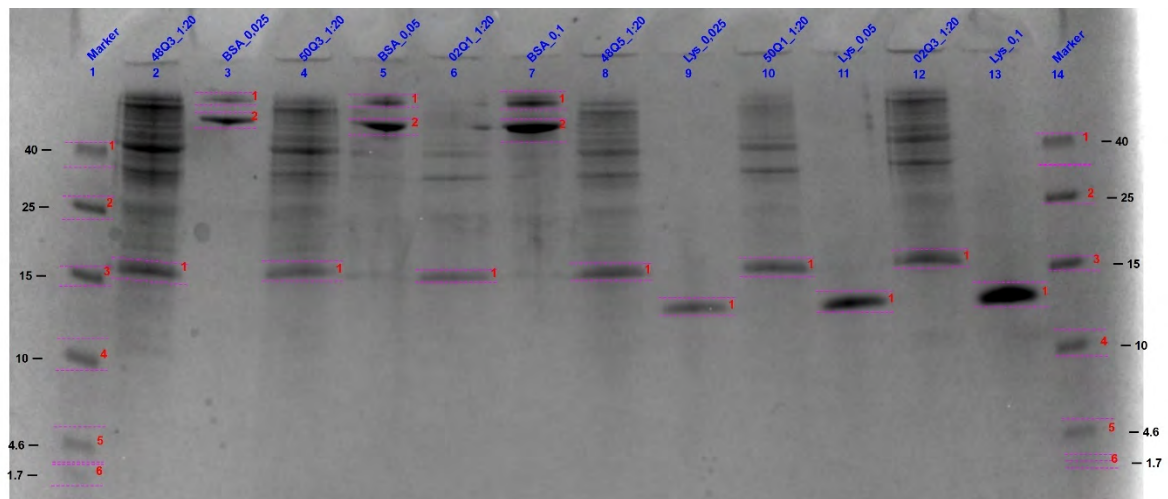


Abbildung 108: Gel der Screeningexperimente 48Q3, 50Q3, 02Q1, 48Q5, 50Q1 und 02Q3 (Gel 8). Verwendet wurde eine Proteinleiter mit sechs Proteinen und synthetischen Peptiden mit einer molekularen Masse von 40, 25, 15, 10, 4,6 und 1,7 kDa.

Tabelle 44: Auswertung der Kalibrierung des BSA-Standards

| | | Adj. Volume (Int) | | | Abs. Quant. (μg) | Band % | | Lane % | | |
|-----------|------------|-------------------|--------|---------|----------------------------------|--------|-------|--------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | ges. | | 1 | 2 | 1 | 2 | ges |
| BSA_0,025 | Gel 4.1 | 107008 | 382536 | 489544 | 0,75 | 21,9 | 78,1 | 14,1 | 50,3 | 64,3 |
| | Gel 4.2 | 86000 | 313814 | 399814 | 0,75 | 21,5 | 78,5 | 13,4 | 49,0 | 62,5 |
| | Gel 5.1 | 99185 | 334905 | 434090 | 0,75 | 22,8 | 77,2 | 14,5 | 49,1 | 63,6 |
| | Gel 5.2 | 99416 | 347010 | 446426 | 0,75 | 22,3 | 77,7 | 14,7 | 51,2 | 65,9 |
| | Gel 6 | 64974 | 153348 | 218322 | 0,75 | 29,8 | 70,2 | 5,1 | 11,9 | 17,0 |
| | Gel 7 | 118950 | 308334 | 427284 | 0,75 | 27,8 | 72,2 | 10,1 | 26,3 | 36,4 |
| | Gel 8 | 127998 | 316056 | 444054 | 0,75 | 28,8 | 71,2 | 14,5 | 35,9 | 50,4 |
| | BSA_0,05 | Gel 4.1 | 214696 | 583740 | 798436 | 1,5 | 26,9 | 73,1 | 20,2 | 55,0 |
| Gel 4.2 | | 189074 | 496091 | 685165 | 1,5 | 27,6 | 72,4 | 20,2 | 53,0 | 73,2 |
| Gel 5.1 | | 138768 | 436464 | 575232 | 1,5 | 24,1 | 75,9 | 16,4 | 51,6 | 68,0 |
| Gel 5.2 | | 180482 | 498478 | 678960 | 1,5 | 26,6 | 73,4 | 18,8 | 52,0 | 70,9 |
| Gel 6 | | 97944 | 292160 | 390104 | 1,5 | 25,1 | 74,9 | 6,8 | 20,3 | 27,1 |
| Gel 7 | | | | | 1,5 | | | | | |
| Gel 8 | | 139809 | 356526 | 496335 | 1,5 | 28,2 | 71,8 | 17,9 | 45,7 | 63,7 |
| BSA_0,1 | Gel 4.1 | 340938 | 906564 | 1247502 | 3 | 27,3 | 72,7 | 20,9 | 55,7 | 76,6 |
| | Gel 4.2 | 279328 | 715778 | 995106 | 3 | 28,1 | 71,9 | 22,1 | 56,7 | 78,9 |
| | Gel 5.1 | 328856 | 867768 | 1196624 | 3 | 27,5 | 72,5 | 22,7 | 59,8 | 82,5 |
| | Gel 5.2 | 271952 | 799388 | 1071340 | 3 | 25,4 | 74,6 | 18,2 | 53,5 | 71,7 |
| | Gel 6 | 395538 | 854256 | 1249794 | 3 | 31,6 | 68,4 | 14,4 | 31,2 | 45,6 |
| | Gel 7 | 247608 | 649572 | 897180 | 3 | 27,6 | 72,4 | 20,6 | 53,9 | 74,5 |
| | Gel 8 | 278883 | 687042 | 965925 | 3 | 28,9 | 71,1 | 22,7 | 55,8 | 78,5 |
| | Mittelwert | | | | | 26,49 | 73,51 | 16,42 | 45,90 | 62,33 |
| Stabw | Abs | | | | 2,77 | 2,77 | 5,02 | 13,40 | 18,04 | |
| | % | | | | 10,5% | 3,8% | 30,5% | 29,2% | 28,9% | |

Ausgehend von der Probe 50Q3 wurde die Verdünnung 1:20 als geeignet ausgewählt (siehe Abbildung 100). Es sind keine negativen Verdünnungseffekte zu beobachten, dennoch weist die Probe eine Stabw von 20 % auf (siehe Tabelle 45).

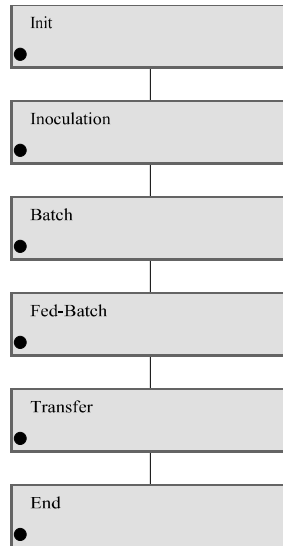
Tabelle 45: Verdünnungseinflüsse auf die Probe 50Q3

| Gel | Probe | Proteinmenge [μg] | Verdünnung | Proteinmenge [μg] | Konz [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] |
|---------|-------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Gel 2 | 50Q3_1:10_1 | 1,04 | 10 | 10,40 | 0,35 |
| | 50Q3_1:10_2 | 0,72 | 10 | 7,20 | 0,24 |
| | 50Q3_1:20_1 | 0,40 | 20 | 7,91 | 0,26 |
| | 50Q3_1:20_2 | 0,53 | 20 | 10,66 | 0,36 |
| | 50Q3_1:30_1 | 0,25 | 30 | 7,38 | 0,25 |
| | 50Q3_1:30_2 | 0,53 | 30 | 15,96 | 0,53 |
| Gel 3.1 | 50Q3_1:20_1 | 0,57 | 20 | 11,41 | 0,38 |
| Gel 3.2 | 50Q3_1:20_2 | 0,39 | 20 | 7,86 | 0,26 |

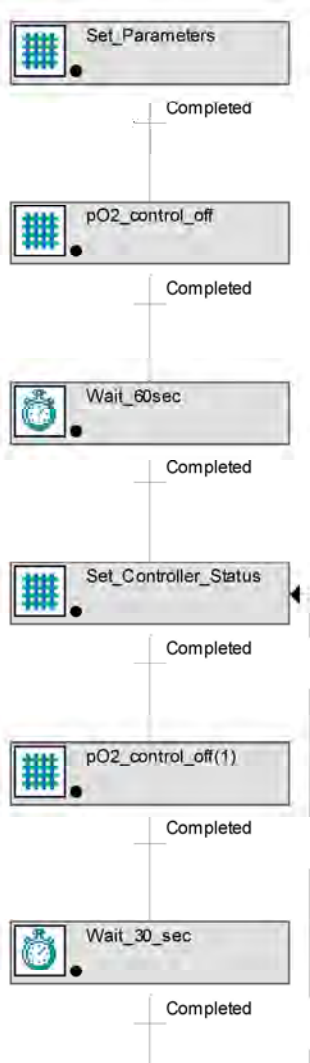
9.6 MFCS Rezepte

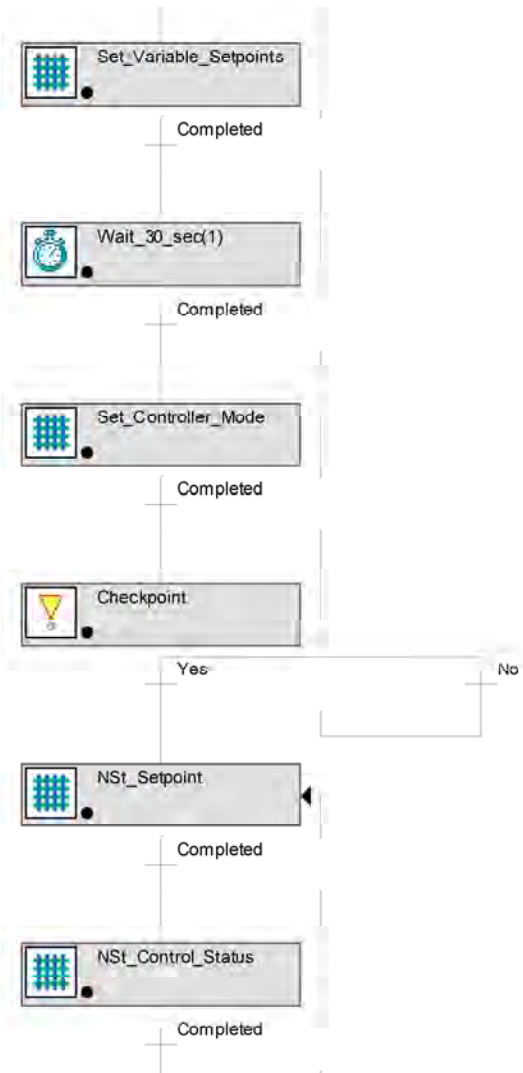
9.6.1 Rezept BIOSTAT® ED5

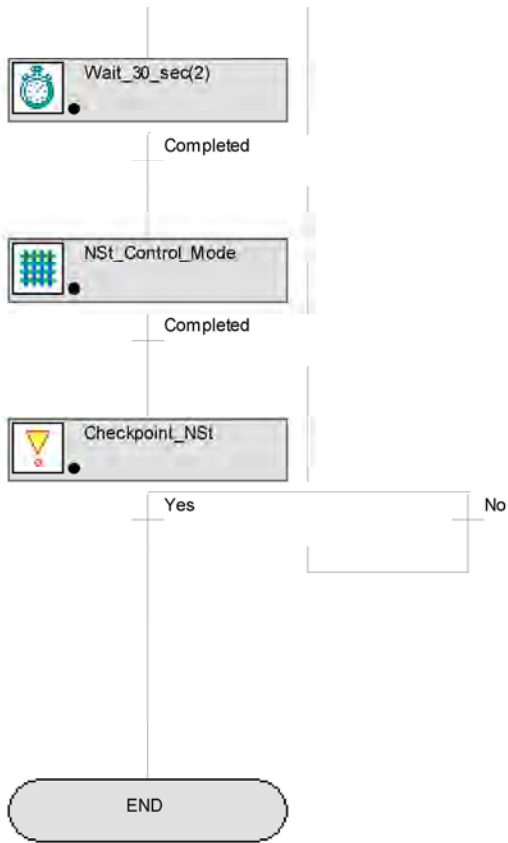
Recipe: E coli AMP Screening



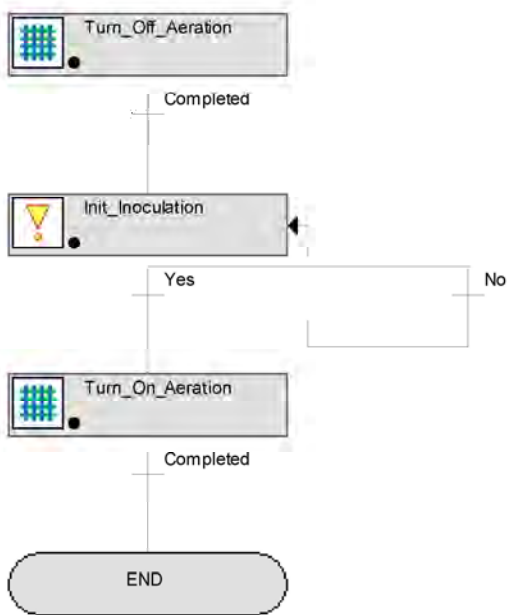
Operation : Init



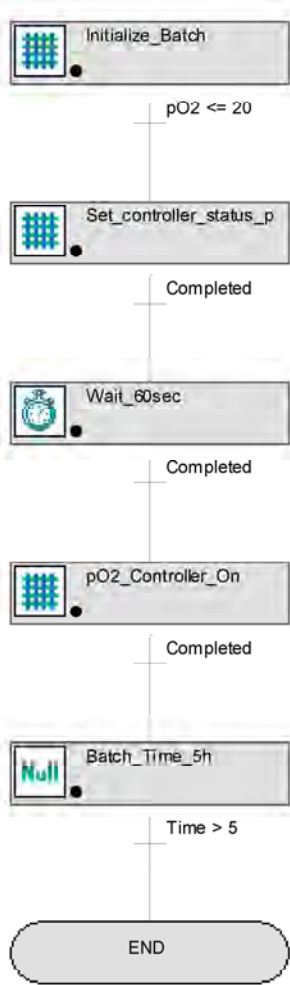




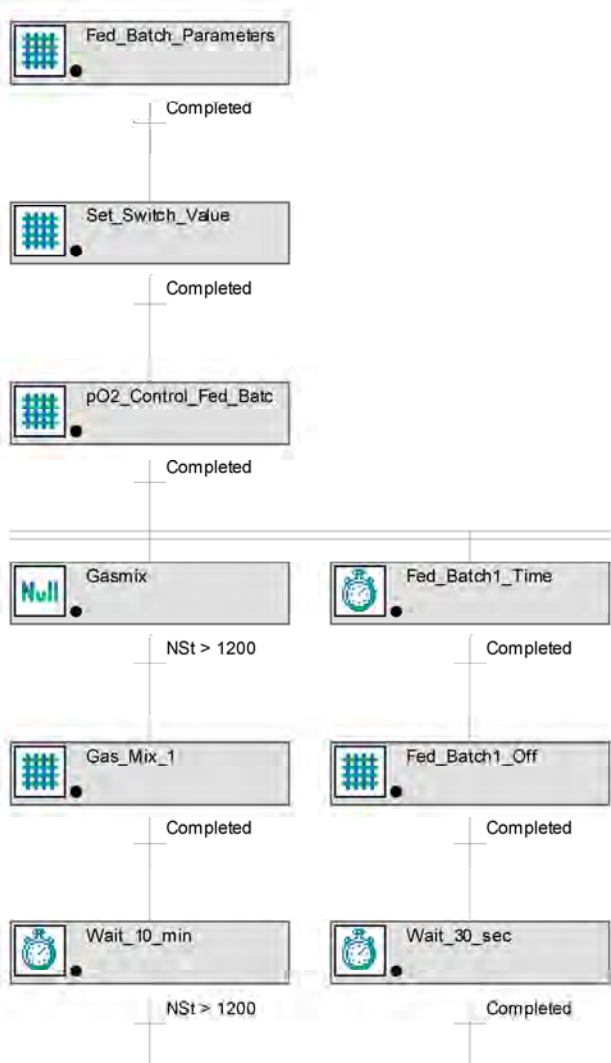
Operation : Inoculation

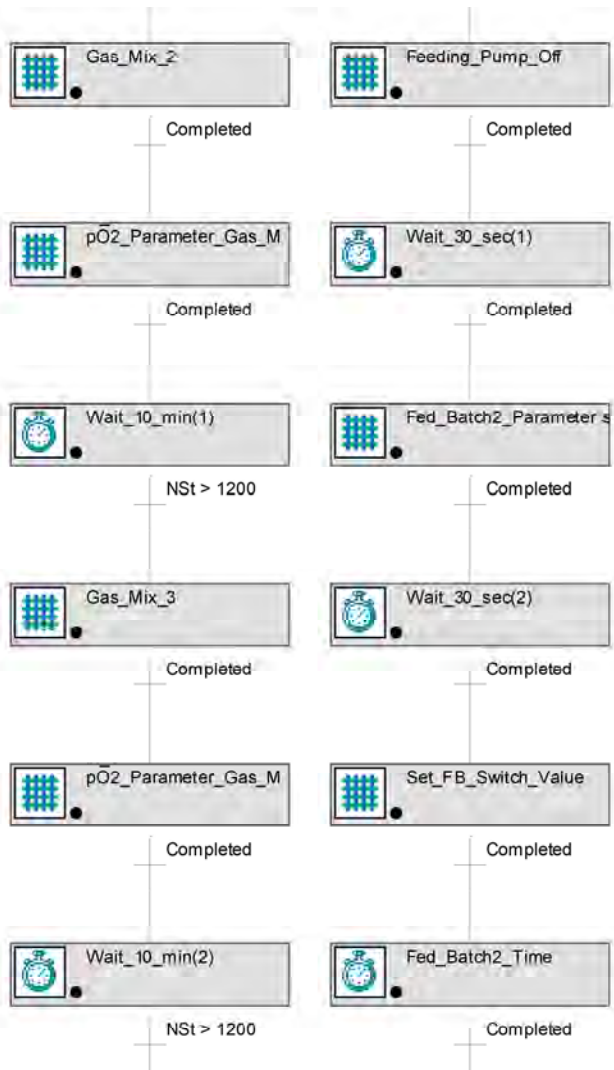


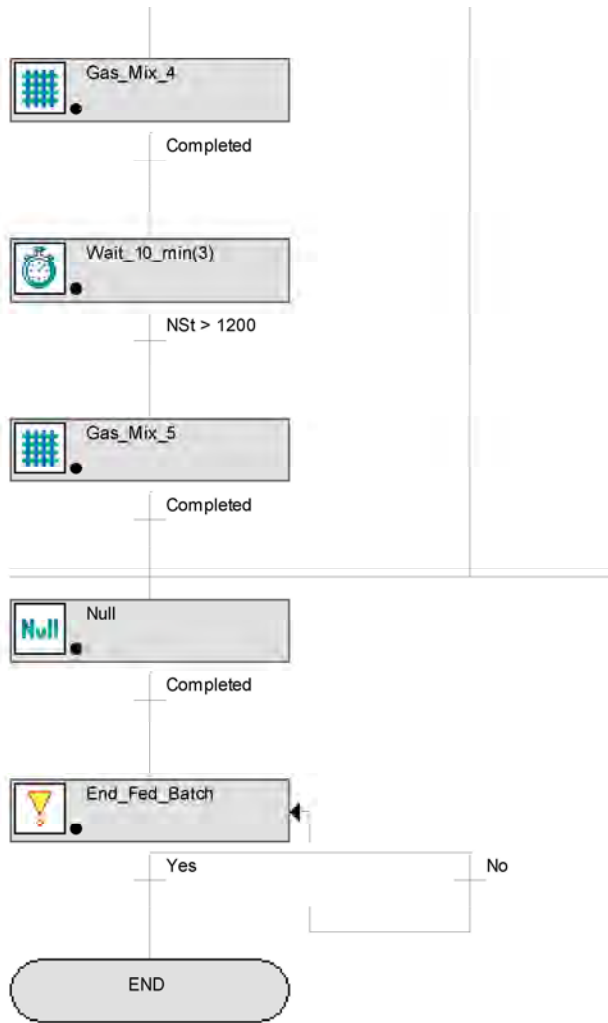
Operation : Batch



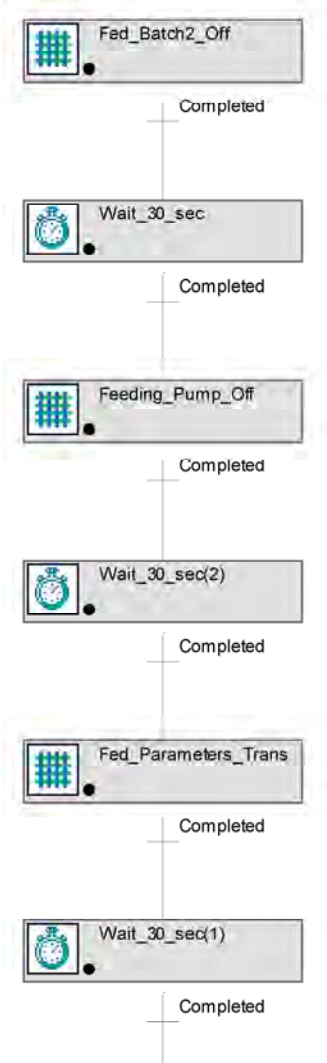
Operation : Fed-Batch

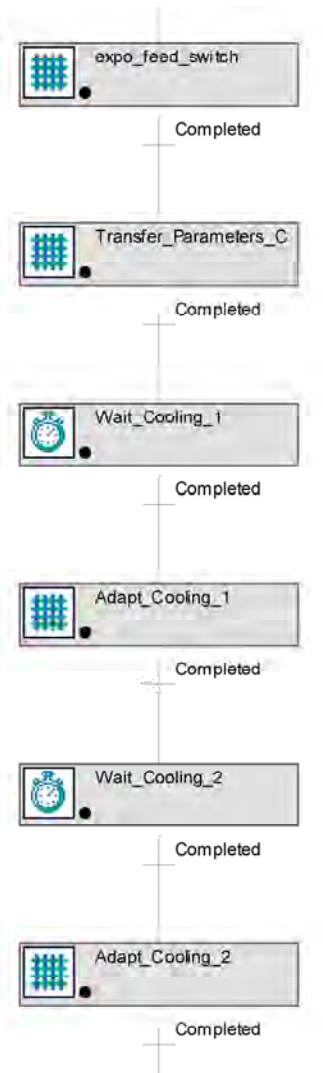






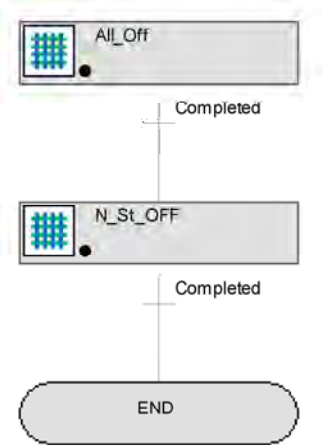
Operation : Transfer







Operation : End



Parameter Phase

Phase: Adapt_Cooling_1

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FO2 | Setpoint | 3 |
| FAIR | Setpoint | 3 |

Phase: Adapt_Cooling_2

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint | 4 |
| FO2 | Setpoint | 2 |

Phase: Adapt_Cooling_3

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint | 5 |
| FO2 | Setpoint | 1 |

Phase: All_Off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FR1 | Ctrl_mode | Off |
| FAIR | Ctrl_mode | Off |

| | | |
|---------------|-----------|-----|
| FOAM_ctrl | Ctrl_mode | Off |
| pH | Ctrl_mode | Off |
| TL | Ctrl_mode | Off |
| all variables | store | Off |
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Off |

| | | |
|-------------|-----------|-----|
| FO2 | Ctrl_mode | Off |
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |

Phase: expo_feed_switch

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-------------|-------|---|
| sw_ExpoFeed | Value | 1 |
|-------------|-------|---|

Phase: Fed_Batch_Parameters Variable Tag

Variable Property Variable Value

| | | |
|--------------------|-----------|--------|
| FR1 | Ctrl_mode | Auto |
| FR1max | Value | 0,306 |
| myS1w | Value | 0,25 |
| yXS1gr | Value | 0,43 |
| cS1R | Value | 700 |
| cXL_Start_FedBatch | Value | 5,2733 |
| qS1Xm | Value | 0,01 |

Phase: Fed_Batch1_Off

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-------------|-------|---|
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |
|-------------|-------|---|

Phase: Fed_Batch2_Off

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-------------|-------|---|
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |
|-------------|-------|---|

Phase: Fed_Batch2_Parameters Variable Tag

| Variable Property | | Variable Value |
|--------------------|-------|----------------|
| yXS1gr | Value | 0,43 |
| cXL_Start_FedBatch | Value | 18,4057 |
| qS1Xm | Value | 0,01 |
| cS1R | Value | 700 |
| myS1w | Value | 0,15 |
| FR1max | Value | 0,306 |

Phase: Fed_Parameters_Transfer Variable

| Tag Variable Property | | Variable Value |
|-----------------------|-------|----------------|
| myS1w | Value | 0,01 |
| cXL_Start_FedBatch | Value | 150,3039 |

Phase: Feeding_Pump_Off Variable Tag

| Variable Property | | Variable Value |
|-------------------|----------|----------------|
| FR1 | Value | 0 |
| FR1 | Setpoint | 0 |

Phase: Gas_Mix_1

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint | 5 |
| FO2 | Setpoint | 1 |

Phase: Gas_Mix_2

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint | 4 |
| FO2 | Setpoint | 2 |

Phase: Gas_Mix_3

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
|--------------|-------------------|----------------|

| | | |
|------|----------|---|
| FAIR | Setpoint | 3 |
| FO2 | Setpoint | 3 |

Phase: Gas_Mix_4

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|------|----------|---|
| FAIR | Setpoint | 2 |
| FO2 | Setpoint | 4 |

Phase: Gas_Mix_5

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|------|----------|---|
| FAIR | Setpoint | 1 |
| FO2 | Setpoint | 5 |

Phase: Initialize_Batch

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|------------|-------|-----|
| _BatchSync | Value | Set |
|------------|-------|-----|

Phase: N_St_OFF

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-----|-------------|--------|
| NSt | Ctrl_status | Remote |
| NSt | Ctrl_mode | Off |

Phase: NSt_Control_Mode

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-----|-----------|------|
| NSt | Ctrl_mode | Auto |
|-----|-----------|------|

Phase: NSt_Control_Status

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-----|-------------|--------|
| NSt | Ctrl_status | Remote |
|-----|-------------|--------|

Phase: NSt_Setpoint

Variable Tag Variable Property Variable Value

| | | |
|-----|----------|-----|
| NSt | Setpoint | 400 |
|-----|----------|-----|

Phase: pO2_Control_Fed_Batch Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2_agitation | Ctrl_XP | 500 |
| pO2_agitation | Ctrl_TI | 200 |
| pO2_agitation | Ctrl_TD | 0 |

Phase: pO2_control_off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Off |
| pO2 | Ctrl_mode | Off |
| pO2_aeration | Ctrl_mode | Off |

Phase: pO2_Controller_On Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|-------------------|
| pO2 | Ctrl_mode Off |
| pO2_agitation | Ctrl_mode Auto |
| pO2_agitation | Ctrl_XP 500 |
| pO2_agitation | Ctrl_TI 200 |
| pO2_agitation | Ctrl_TD 0 |

Phase: pO2_Parameter_Gas_Mix_2

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2_agitation | Ctrl_XP | 800 |
| pO2_agitation | Ctrl_TI | 800 |
| pO2_agitation | Ctrl_TD | 0 |

Phase: pO2_Parameter_Gas_Mix_3

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2_agitation | Ctrl_XP | 800 |
| pO2_agitation | Ctrl_TI | 800 |
| pO2_agitation | Ctrl_TD | 0 |

Phase: Set_Controller_Mode Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| TL | Ctrl_mode Auto |
| NSt | Ctrl_mode Auto |
| FAIR | Ctrl_mode Auto |
| FO2 | Ctrl_mode Auto |
| FR1 | Ctrl_mode Auto |
| FOAM_ctrl | Ctrl_mode Auto |
| pO2_agitation | Ctrl_mode Off |
| pO2 | Ctrl_mode Off |
| pH | Ctrl_mode Auto |
| pO2_aeration | Ctrl_mode Off |

Phase: Set_Controller_Status Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|--------------------|
| TL | Ctrl_status Remote |
| pH | Ctrl_status Remote |
| pO2 | Ctrl_status Remote |
| NSt | Ctrl_status Remote |
| FAIR | Ctrl_status Remote |
| FO2 | Ctrl_status Remote |
| FR1 | Ctrl_status Remote |
| FOAM_ctrl | Ctrl_status Remote |

Phase: Set_controller_status_pO2 Variable

| Tag Variable Property | Variable Value |
|-----------------------|----------------|
| pO2_agitation | Var_status On |

Phase: Set_FB_Switch_Value Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| sw_ExpoFeed | Value 1 |

Phase: Set_Parameters

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|------------------|-------------------|----------------|
| all variables | Var_status | On |
| all variables | store | On |
| VL0 | Value | 3 |
| sw_BatchEnd | Value | 0 |
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |
| cal_LiquidVolume | Calculation | On |

Phase: Set_Switch_Value

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| sw_ExpoFeed | Value | 1 |

Phase: Set_Variable_Setpoints Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| TL | Setpoint 37 |
| NSt | Setpoint 400 |

| | | |
|---------------|----------|----|
| FAIR | Setpoint | 6 |
| FO2 | Setpoint | 0 |
| pH | Setpoint | 7 |
| FR1 | Setpoint | 0 |
| pO2_agitation | Setpoint | 20 |
| pO2w | Value | 20 |
| pO2 | Setpoint | 20 |

Phase: Transfer_Parameters Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| pH | Ctrl_mode Off |
| FAIR | Setpoint 6 |

| | | |
|-----|----------|---|
| FO2 | Setpoint | 0 |
|-----|----------|---|

Phase: Transfer_Parameters_Cool Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|------|-------------------|----------------|
| pH | Setpoint | 7 |
| TL | Setpoint | 10 |
| FAIR | Setpoint | 2 |
| FO2 | Setpoint | 4 |

Phase: Turn_Off_Aeration Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint 0 |

Phase: Turn_On_Aeration Variable Tag

| Variable Property | Variable Value |
|-------------------|----------------|
| FAIR | Setpoint 6 |

Operator Prompt

Phase: Checkpoint

Prompt

| |
|---|
| Titrationpumps auto? Setpoints correct (except NSt)? Toolbox started? Driver for Ismatec pumps started? Driver off gas? |
|---|

Phase: Checkpoint_Cooling

Prompt

| |
|--|
| Temperature equals 10 °C? Transfer can be started? |
|--|

Phase: Checkpoint_NSt

Prompt

| |
|-------------------------|
| NSt in remote and auto? |
|-------------------------|

Phase: End_Fed_Batch

Prompt

End Fed-Batch?

Phase: Init_Inoculation

Prompt

Please start the inoculation.

After starting the Pump confirm with YES.

Phase: Stop_Transfer

Prompt

Stop transfer?

Wait Phase

Phase: Fed_Batch1_Time

Wait Until

Duration: 05 hour(s) 00 minute(s) 00 second(s)

Phase: Fed_Batch2_Time

Wait Until

Duration: 14 hour(s) 00 minute(s) 00 second(s)

Phase: Transfer_Time

Wait Until

Duration: 03 hour(s) 00 minute(s) 05 second(s)

Phase: Wait_10_min

Wait Until

Duration: 00 hour(s) 10 minute(s) 00 second(s)

Phase: Wait_30_sec

Wait Until

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 00 minute(s) 30 second(s) |
|-----------|--------------------------------------|

Phase: Wait_60sec

Wait Until

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 01 minute(s) 00 second(s) |
|-----------|--------------------------------------|

Phase: Wait_Cooling_1

Wait Until

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 05 minute(s) 00 second(s) |
|-----------|--------------------------------------|

Phase: Wait_Cooling_2

Wait Until

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 05 minute(s) 00 second(s) |
|-----------|--------------------------------------|

Transition

Phase: Batch_Time_5h Algo-

rithm Name Title Transition formula

| | | |
|-------------------------|----------|---|
| E coli AMP Screening001 | Time > 5 | Batch_Time_5h.Transition1_value = _BatchAge.Value > 5 |
|-------------------------|----------|---|

Phase: Gasmix Algo-

rithm Name Title Transition formula

| | | |
|-------------------------|------------|---|
| E coli AMP Screening002 | NSt > 1200 | Gasmix.Transition1_value = NSt.Value > 1200 |
|-------------------------|------------|---|

Phase: Initialize_Batch

Algorithm Name Title Transition formula

| | | |
|-------------------------|-----------|--|
| E coli AMP Screening000 | pO2 <= 20 | Initialize_Batch.Transition1_value = pO2.Value <= 20 |
|-------------------------|-----------|--|

Phase: Wait_10_min Algo-

rithm Name Title Transition formula

| | | |
|-------------------------|------------|--|
| E coli AMP Screening006 | NSt > 1200 | Wait_10_min.Transition1_value = NSt.Value > 1200 |
|-------------------------|------------|--|

| | | |
|-------------------------|------------|--|
| E coli AMP Screening005 | NSt > 1200 | Wait_10_min.Transition1_value = NSt.Value > 1200 |
|-------------------------|------------|--|

| | | |
|-------------------------|------------|--|
| E coli AMP Screening004 | NSt > 1200 | Wait_10_min.Transition1_value = NSt.Value > 1200 |
|-------------------------|------------|--|

E coli AMP Screening003

NSt > 1200

Wait_10_min.Transition1_value = NSt.Value > 1200

9.6.2 Rezept Multi-Bioreaktorsystem BIOSTAT® Qplus

Recipe: Q1 Produktion AMP

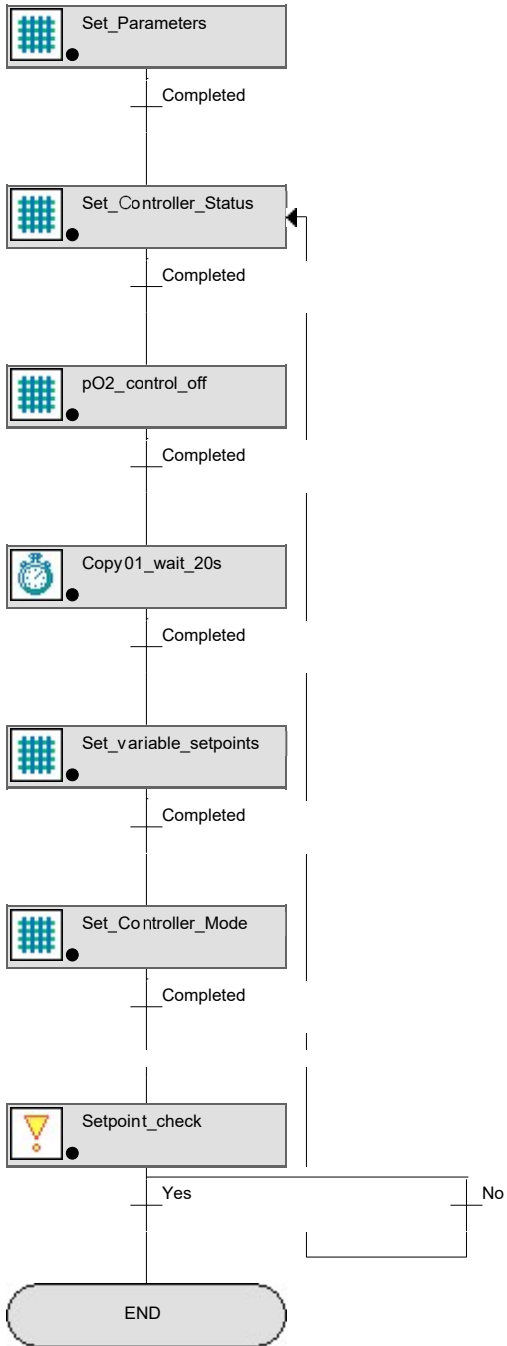
Init
●

Inoculation
●

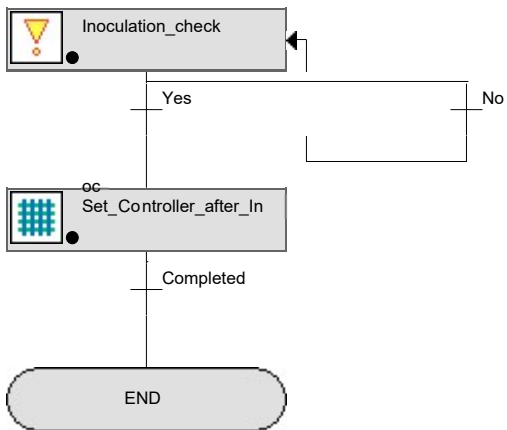
Fed-Batch+Produktion
●

End
●

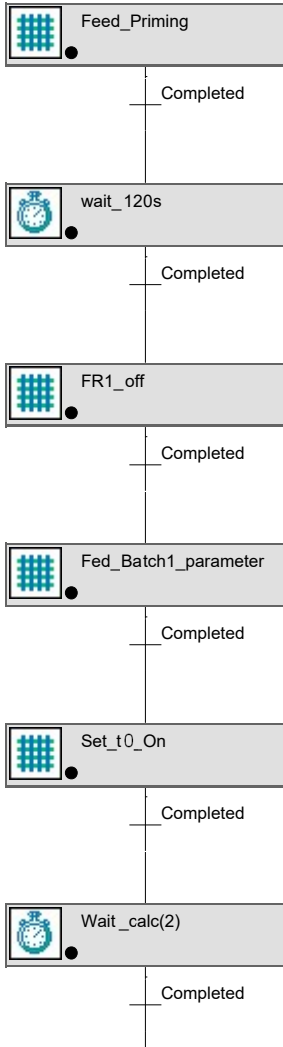
Operation : Init

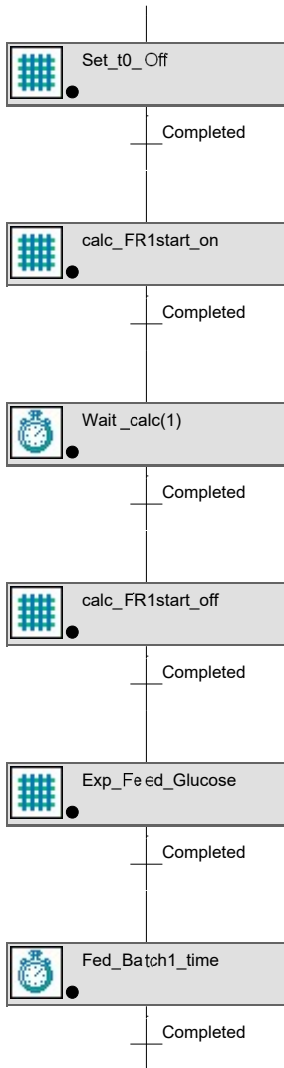


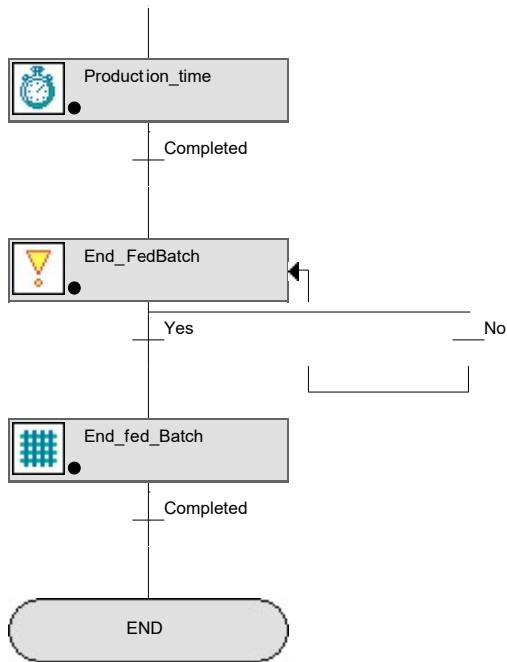
Operation : Inoculation



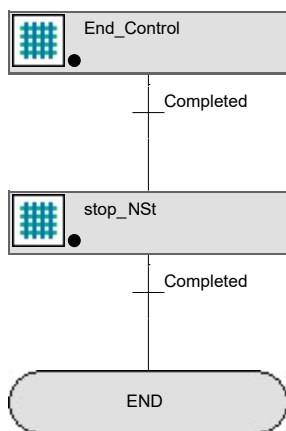
Operation : Fed-Batch+Produktion







Operation : End



Parameter Phase

Phase: calc_FR1start_off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| FR1start_calc | Calculation | Off |

Phase: calc_FR1start_on

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| FR1start_calc | Calculation | On |

Phase: End_Control

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| sw_pO2 | Value | 0 |
| FR1rel | Ctrl_mode | Off |
| FR2rel | Ctrl_mode | Off |
| pH | Ctrl_mode | Off |
| TL | Ctrl_mode | Off |
| FnAIR | Ctrl_mode | Off |
| FOAM | Ctrl_mode | Off |
| mLoffset | Value | 0 |
| pO2 | Setpoint | 0 |
| pO2 | Ctrl_mode | Off |
| pO2_MFCSPID | Var_status | Off |
| FnO2 | Ctrl_mode | Off |
| FnO2 | Setpoint | 0 |
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Off |

Phase: End_fed_Batch

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |
| FR1rel | Setpoint | 0 |

Phase: Exp_Feed_Glucose Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| calc_FR1real | Calculation | On |

Phase: Fed_Batch1_parameter Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|-----|-------------------|----------------|
|-----|-------------------|----------------|

| | | |
|----------|-----------|-------|
| FR1rel | Ctrl_mode | Auto |
| myw | Value | 0.15 |
| FR1max | Value | 0.293 |
| yXSgr | Value | 0.43 |
| cS1R1 | Value | 700 |
| cXLstart | Value | 26.45 |
| qSi_Xm | Value | 0.01 |
| VLstart | Value | 0.75 |

Phase: Feed_Priming

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FR1rel | Setpoint | 100 |
| FR1rel | Ctrl_mode | Auto |

Phase: FR1_off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| FR1rel | Setpoint | 0 |

Phase: Initialize_Batch

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| _BatchSync | Value | Set |

Phase: pO2_control_off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2 | Ctrl_mode | Off |
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Off |

Phase: pO2_controller_on

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| pO2 | Ctrl_mode | Off |
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Auto |

Phase: Set_Controller_after_Inoc Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|-------|-------------------|----------------|
| TL | Ctrl_mode | Auto |
| pH | Ctrl_mode | Auto |
| FnAIR | Ctrl_mode | Auto |
| FnO2 | Ctrl_mode | Auto |
| FOAM | Ctrl_mode | Auto |

| | | |
|------------|-------|-----|
| _BatchSync | Value | Set |
|------------|-------|-----|

Phase: Set_Controller_Mode Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| TL | Ctrl_mode | Off |
| NSt | Ctrl_mode | Auto |
| pH | Ctrl_mode | Off |
| FnAIR | Ctrl_mode | Off |
| FR1rel | Ctrl_mode | Auto |
| FR2rel | Ctrl_mode | Auto |
| FOAM | Ctrl_mode | Off |
| FnO2 | Ctrl_mode | Auto |
| pO2 | Ctrl_mode | Off |
| pO2_agitation | Ctrl_mode | Off |

Phase: Set_Controller_Status Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------|-------------------|----------------|
| TL | Ctrl_status | Remote |
| pH | Ctrl_status | Remote |
| pO2 | Ctrl_status | Remote |
| NSt | Ctrl_status | Remote |
| FnAIR | Ctrl_status | Remote |
| FnO2 | Ctrl_status | Remote |
| FR1rel | Ctrl_status | Remote |
| FR2rel | Ctrl_status | Remote |

| | | |
|---------------|-------------|--------|
| FOAM | Ctrl_status | Remote |
| pO2_agitation | Var_status | On |

Phase: Set_Parameters

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|---------------|-------------------|----------------|
| all variables | Var_status | On |
| all variables | store | On |
| VL0 | Value | 0.75 |
| rhoL | Value | 1000 |
| rhoR1 | Value | 1.113 |
| Kturb | Value | 2.4 |
| alphaturb | Value | 0.9 |
| betaturb | Value | 0.98 |
| sw_BatchEnd | Value | 0 |
| sw_ExpoFeed | Value | 0 |

Phase: Set_t0_Off

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| t0_calc | Calculation | Off |

Phase: Set_t0_On

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| t0_calc | Calculation | On |

Phase: Set_variable_setpoints Variable

| Tag | Variable Property | Variable Value |
|-------|-------------------|----------------|
| TL | Setpoint | 37 |
| NSt | Setpoint | 1200 |
| FnAIR | Setpoint | 1.5 |
| pH | Setpoint | 7 |
| FnO2 | Setpoint | 1.5 |

| | | |
|--------|----------|---|
| FR1rel | Setpoint | 0 |
| FR2rel | Setpoint | 0 |

Phase: stop_NSt

| Variable Tag | Variable Property | Variable Value |
|--------------|-------------------|----------------|
| NSt | Value | 0 |
| NSt | Setpoint | 0 |
| NSt | Ctrl_mode | Off |
| FnAIR | Setpoint | 0 |

Operator Prompt

Phase: End_FedBatch

Prompt

Do you want to end the fed-batch?

Phase: Inoculation_check

Prompt

Inoculation done?

Phase: Setpoint_check

Prompt

Values for setpoints checked?

Wait Phase

Phase: Copy01_wait_20s

Wait Until

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 00 minute(s) 20 second(s) |
|------------------|--------------------------------------|

Phase: Fed_Batch1_time

Wait Until

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Duration: | 01 hour(s) 00 minute(s) 00 second(s) |
|------------------|--------------------------------------|

Phase: Production_time

Wait Until

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Duration: | 07 hour(s) 00 minute(s) 00 second(s) |
|------------------|--------------------------------------|

Phase: wait_120s

Wait Until

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 02 minute(s) 00 second(s) |
|------------------|--------------------------------------|

Phase: Wait_calc

Wait Until

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Duration: | 00 hour(s) 00 minute(s) 20 second(s) |
|------------------|--------------------------------------|

Transition

Phase: Batchtime

| Algorithm Name | Title | Transition formula |
|----------------------|-------|---|
| Q1_Produktion_AMP000 | t > 6 | Batchtime.Transition1_value = _BatchAge.Value>6 |

Phase: Initialize_Batch

| Algorithm Name | Title | Transition formula |
|----------------------|-----------|---|
| Q1_Produktion_AMP001 | pO2 <= 20 | Initialize_Batch.Transition1_value = pO2.Value <=20 |

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Titel „Anwendung des *Design of Experiments*-Ansatzes zur Untersuchung und Weiterentwicklung des Produktionsverfahrens des rekombinanten antimikrobiellen Peptids NK2-ALK in *E. coli* BL21 in einer Multifermentieranlage“ ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum:

Unterschrift:

Jonas Oelbracht