

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

**Untersuchung des Einflusses von Glycerin- und
Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die
Plasmidausbeute in *Escherichia coli* DH10B**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Sophia Weber



Hamburg

am 20. August 2024

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit 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.

Ort, Datum

Unterschrift

Vorwort

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Bioverfahrenstechnik der HAW Hamburg. Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Abschlussarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Christian Kaiser bedanken, der diese Bachelorarbeit begutachtet und mit einer außerordentlichen Unterstützung betreut hat.

Zudem geht mein Dank an Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank geht an Petra Derr, die mich bei der praktischen Durchführung mit herausragender Tatkraft und Hilfsbereitschaft unterstützt und mir mit vielen konstruktiven Diskussionen einen großen Input für die Erstellung dieser Arbeit gegeben hat. Für die gemeinsame Zeit im Labor bin ich sehr dankbar.

Bei Florian Schiffel möchte ich mich für die hilfreichen Ratschläge bei mikrobiologischen Fragen, sowie für die ausgezeichnete Unterstützung bei praktischen Arbeiten im Mikrobiologielabor bedanken.

Mein tiefster Dank geht an meine Eltern, Gulnara Weber und Bernhard Weber, und an meinen großen Bruder Ayaz Anafinov, die immer für mich da sind und ein offenes Ohr für mich haben, an Zeynep Cetin und Kira Sturm, mit denen ich während des Studiums und der Abschlussarbeit eine grandiose gemeinsame Zeit und gegenseitige Unterstützung erleben durfte, an Geti Haref, die es mit ihren aufmunternden Worten und ihrer positiven Energie stets schafft, mir Kraft und Beistand zu leisten und an meinen Partner Carlos Hartleben, der mir immer die größte Stütze in jeder Lebensphase ist.

Zusammenfassung

Eine effiziente Plasmidproduktion in rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen ist von großer Bedeutung für eine Vielzahl biotechnologischer Anwendungen. Faktoren wie die Medienzusammensetzung und Kultivierungstemperatur können die Plasmidausbeute beeinflussen [1], [2]. In dieser Bachelorarbeit wurde der Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die Plasmidausbeute in *Escherichia coli* DH10B untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Medienzusammensetzungen und Kultivierungstemperaturen für den Batchprozess im Bioreaktor eingesetzt. Durch die Verwendung verschiedener analytischer Methoden wurden Informationen über die Prozessverläufe und das Stoffwechselverhalten des Organismus erhoben und beurteilt. Am Ende der Kultivierungsprozesse wurde das Plasmid isoliert und quantifiziert. Auf dieser Basis wurden die spezifischen Ausbeuten und Gesamtausbeuten ermittelt. Eine Agarose-Gelelektrophorese zeigte, in welchen Konformationen das Plasmid nach der Fermentation und Aufarbeitung vorlag.

Die Untersuchung zeigte, dass die Plasmidausbeute signifikant durch die Temperatur und Medienkomposition beeinflusst werden kann. Die spezifische Plasmidausbeute stieg mit einer zunehmenden Temperatur an. Bei einer Temperatur von 41 °C ergab sich mit 2,13 mg_{pDNA}/g_{BTM} die höchste spezifische Ausbeute. Die niedrigste spezifische Ausbeute ergab sich bei einer Kultivierungstemperatur von 35 °C mit 1,32 mg_{pDNA}/g_{BTM}. Dabei haben sich die Temperaturen nicht erheblich auf die Zelldichte und folglich auf die Gesamtausbeute ausgewirkt. Bei 41 °C wurde die höchste Gesamtausbeute mit 227 mg erreicht. Variierende Verhältnisse von Glycerin zu Hefeextrakt im Medium ergaben ebenfalls verschiedene spezifische Ausbeuten. Bei einer niedrigeren Wachstumsrate durch einen höheren Glycerinanteil wurde eine spezifische Ausbeute von 1,82 mg_{pDNA}/g_{BTM} erreicht. Allerdings folgten auf die Reduzierung der Medienkomponenten niedrigere Zelldichten, was sich auf die Gesamtausbeute auswirkte. Die niedrigste Gesamtausbeute wurde mit 120 mg bei 25 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt erreicht.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	III
Zusammenfassung	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
Variablen	XI
1 Einleitung und theoretische Grundlagen	1
1.1 <i>E.coli</i> DH10B	1
1.2 Das pUC19 Plasmid	1
1.3 Plasmidkonformationen	2
1.4 Batch-Kultivierung	3
1.4.1 Vor- und Nachteile	3
1.4.2 Wachstumsphasen	4
1.5 Glycerin als Kohlenstoffquelle	5
2 Zielsetzung	6
3 Material	7
3.1 Geräte	7
3.2 Chemikalien	8
3.3 Lösungen	9
3.4 Nährmedien	10
4 Methoden	11
4.1 Transformation von <i>E. Coli</i> DH10B mit dem pUC19 Plasmid	11
4.2 Mikrobielle Dauerkultur	11
4.2.1 Vorkultur	11
4.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben	11
4.3 Vorversuche	12
4.3.1 Untersuchung der Kloneffizienz	12
4.3.2 Abschätzung der optimalen Bedingungen für die Vorkulturen	12
4.4 Kultivierung im Bioreaktor	12
4.4.1 Reaktorsystem	12
4.4.2 Vorbereitung	15
4.4.3 Vorkultur und Inokulation	16
4.4.4 Probenahme	16
4.5 Isolierung der pDNA	16
4.6 Analytik	18
4.6.1 Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm	18
4.6.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	18

4.6.3	Bestimmung der Glycerin- und Acetatkonzentration.....	19
4.6.4	Quantifizierung der pDNA.....	19
4.6.5	Berechnung der spezifischen Plasmidausbeute.....	19
4.6.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
5	Ergebnisse und Diskussion.....	21
5.1	Transformation.....	21
5.2	Kloneffizienz.....	22
5.2.1	Wachstumsverhalten von vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen.....	22
5.2.2	Plasmidausbeute aus vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen.....	24
5.2.3	Vergleich.....	24
5.3	Ermittlung der Kultivierungsbedingungen für Vorkulturen.....	25
5.4	Überprüfung der Vergleichbarkeit zwischen den Reaktorsystemen CTA und CTB.....	27
5.4.1	Wachstumsverhalten.....	27
5.4.2	Substratverbrauch.....	29
5.4.3	Verlauf der on-line Messdaten.....	30
5.4.4	Plasmidausbeute.....	31
5.4.5	Einschätzung der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit.....	31
5.5	Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen.....	32
5.5.1	Wachstum.....	32
5.5.2	Substratverbrauch.....	34
5.5.3	Verlauf der on-line Messdaten.....	35
5.5.4	Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen auf die Plasmidausbeute.....	37
5.6	Einfluss der Kultivierungstemperatur.....	38
5.6.1	Wachstum.....	38
5.6.2	Substratverbrauch.....	40
5.6.3	Verlauf der on-line Messdaten.....	41
5.6.4	Auswirkung der Kultivierungstemperaturen auf die Plasmidausbeute.....	43
5.6	Acetatkonzentration am Ende der Fermentationen.....	44
5.7	Vergleich der Plasmidausbeuten.....	46
5.7.1	Spezifische Plasmidausbeute.....	46
5.7.2	Gesamtausbeute.....	47
5.8	Einfluss der Glycerin- und Hefeextraktkonzentration sowie Temperaturvariationen auf die pDNA-Konformation.....	48
6	Fazit und Ausblick.....	50
	Literatur.....	53
	Anhang A: Übersicht der Kultivierungsdaten.....	56
	Anhang B: Übersicht der MFCS-Plots.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das pUC19 Plasmid [9]	2
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Plasmidkonformationen [15].....	3
Abbildung 3: Involvierte Stoffwechselwege bei der Verstoffwechslung von Glycerin [20]...	5
Abbildung 4:Aufbau des Reaktorsystems	13
Abbildung 5: Modifiziertes Fließschema des BIOSTAT® CTA und CTB [21].....	14
Abbildung 6: Isolierung von pDNA mit dem Monarch® Plasmid Miniprep Kit [22].....	17
Abbildung 7: Koloniebildung nach der Transformation von <i>E. coli</i> DH10B mit 1 ng pUC19 Plasmid.....	21
Abbildung 8: Wachstumskurven von vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen im Vergleich	22
Abbildung 9: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate von vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen.....	23
Abbildung 10: Optische Dichten der Übernachtskulturen bei 20 °C und 28,5 °C	25
Abbildung 11: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) im CTA und CTB bei gleichen Kultivierungsbedingungen	27
Abbildung 12: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} im CTA und CTB unter gleichen Bedingungen	28
Abbildung 13: Abnahme der Glycerinkonzentration unter identischen Kultivierungsbedin- gungen im CTA und CTB	29
Abbildung 14: Kultivierungsplots der on-line Messdaten bei identischen Kultivierungsbedin- gungen in zwei Reaktorsystemen.....	30
Abbildung 15: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) bei unter- schiedlichen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen.....	32
Abbildung 16: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} bei verschiede- nen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen	33
Abbildung 17: Abnahme der Glycerinkonzentration bei unterschiedlicher Medienzusammen- setzung.....	34
Abbildung 18: Kultivierungsplots der on-line Messdaten beim Einsatz unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen	36
Abbildung 19: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) bei 35 °C, 39 °C und 41 °C	38
Abbildung 20: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} bei 35 °C, 39 °C und 41 °C	39
Abbildung 21: Abnahme der Glycerinkonzentration bei 35 °C, 39 °C und 41 °C	40

Abbildung 22: Kultivierungsplots der on-line Messdaten bei 35 °C und 39 °C	41
Abbildung 23: Kultivierungsplot der on-line Messdaten bei 41 °C.....	42
Abbildung 24: Acetatkonzentrationen am Ende der Fermentationen	44
Abbildung 25: Spezifische pDNA-Ausbeute nach Variation der Kultivierungstemperatur und Medienkomposition.....	46
Abbildung 26: Gesamtausbeuten an pDNA nach Variation der Kultivierungstemperatur und Medienkomposition.....	47
Abbildung 27: Agarose-Gelelektrophorese Analyse der pDNA nach verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	7
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.....	8
Tabelle 3: Verwendete Lösungen.....	9
Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährmedien.....	10
Tabelle 5: Eingesetzte Sonden und Geräte für die Kultivierung im Bioreaktor.....	14
Tabelle 6: Prozessparameter für die Kultivierung von <i>E. coli</i> DH10B::pUC19.....	15
Tabelle 7: Vergleich der erreichten ΔOD und maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} von vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen.....	23
Tabelle 8: Vergleich der spezifischen Plasmidausbeute aus vier <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 Klonen.....	24
Tabelle 9: Vergleich der spezifischen Plasmidausbeute bei 40 μL und 400 μL Inokulationsvolumen nach 15,67 Stunden.....	26
Tabelle 10: Kultivierungsparameter zur Überprüfung der Vergleichbarkeit zwischen den Reaktorsystemen CTA und CTB.....	27
Tabelle 11: Vergleich der Plasmidausbeute bei gleichen Kultivierungsbedingungen im CTA und CTB.....	31
Tabelle 12: Vergleich der erreichten ΔOD , μ_{\max} und c_{XL} von <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung.....	34
Tabelle 13: Vergleich der Plasmidausbeute bei unterschiedlichen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen.....	37
Tabelle 14: Vergleich der erreichten ΔOD , μ_{\max} und c_{XL} von <i>E. coli</i> DH10B::pUC19 bei 35 °C, 39 °C und 41 °C.....	39
Tabelle 15: Vergleich der Plasmidausbeuten bei 35 °C, 39 °C und 42 °C.....	43

Abkürzungen

DCU	<i>Digital Control Unit</i>
DHAP	<i>Dihydroxyacetonphosphat</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Gly	<i>Glycerin</i>
kb	<i>Kilobase</i>
KK	<i>Kryokultur</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
lin	<i>linear</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MFCS/win	<i>Multi Fermentor Control System for Windows</i>
oc	<i>open circular</i>
ori	<i>Origin of Replication</i>
pDNA	<i>Plasmid-DNA</i>
sc	<i>super coiled</i>
VE-Wasser	<i>Vollentsalztes Wasser</i>
YE	<i>Hefeextrakt</i>

Variablen

c_{Acetat}	<i>Acetatkonzentration</i>	g L^{-1}
c_{Gly}	<i>Glycerinkonzentration</i>	g L^{-1}
c_{pDNA}	<i>Plasmidkonzentration</i>	mg L^{-1}
c_{XL}	<i>Biotrockenmassekonzentration</i>	g L^{-1}
c_{YE}	<i>Hefeextraktkonzentration</i>	g L^{-1}
$F_{\text{G,Luft}}$	<i>Begasungsrate für Druckluft</i>	L min^{-1}
$F_{\text{G,O}_2}$	<i>Begasungsrate für Sauerstoff</i>	L min^{-1}
ΔOD	<i>Optische Dichte</i>	-
p_{O_2}	<i>Sauerstoffpartialdruck</i>	%
x_{CO_2}	<i>Kohlendioxidstoffmengenanteil</i>	%
x_{O_2}	<i>Sauerstoffstoffmengenanteil</i>	%
ϑ	<i>Temperatur</i>	$^{\circ}\text{C}$
μ_{max}	<i>Maximale spezifische Wachstumsrate</i>	h^{-1}

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

Plasmid-DNA wird in der Gentherapie häufig als genetische Vorlage für mRNA-Impfstoffe und für die Herstellung viraler Vektoren verwendet [3]. Virale Systeme bergen jedoch Nachteile, wie eine akute Immunantwort, eine begrenzte Kapazität für die Menge des transportierten genetischen Materials, das Risiko einer Insertionsmutagenese sowie eine bereits vorhandene Immunität des Patienten gegen den Virusvektor [4]. Fortschritte in den Methoden zur gezielten und effizienten Einführung der Plasmid-DNA (pDNA) in die Zellen sowie die Optimierung der Struktur ermöglichen eine potenzielle Nutzung der pDNA für pharmazeutische Anwendungen [5]. Im Gegensatz zu viralen Systemen sind Plasmide als Vektoren weniger immunogen, sicherer, können größere Mengen an genetischem Material transportieren und sind einfacher herzustellen [4], [6]. Darüber hinaus sind DNA-Vektoren dazu befähigt, die Proteinexpression *in vivo* für unterschiedliche therapeutische Zwecke zu vermitteln, die bei Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen Krankheiten, seltenen Krankheiten und Infektionskrankheiten vielversprechende therapeutische Ergebnisse erzielt hat [4]. Im kleinen Maßstab sind Plasmide relativ einfach zu produzieren und aufzureinigen. Für potenzielle Impfanwendungen werden allerdings häufig Dosen im Milligrammbereich benötigt [2]. Der Erhalt hoher Ausbeuten an aufgereinigter Plasmid-DNA bleibt ein weit verbreitetes Problem bei der effizienten Produktion von pDNA [6].

1.1 *E.coli* DH10B

Rekombinante *Escherichia coli* Stämme werden aufgrund ihres gut charakterisierten Genoms und zellulären Metabolismus häufig für industrielle Bioprozesse eingesetzt [6]. Die Produktion von pDNA wird oft mit Stämmen durchgeführt, die von *E.coli* K12 abgeleitet sind. Dazu gehört der Stamm DH10B [1]. Hierbei handelt es sich um einen vielfach eingesetzten Klonierungsstamm, der über vorteilhafte Eigenschaften verfügt. Er eignet sich für die Klonierung großer Plasmide und DNA, die Methylzytosin und Methyladenin enthalten [7]. Darüber hinaus verfügt der Stamm über eine hohe Transformationseffizienz. Gegenüber dem Wildtyp fällt die Wachstumsrate des DH10B-Stammes jedoch geringer aus. Grund hierfür ist unter anderem, dass der Stamm aufgrund der Deletion des *leuLABCD*-Gens kein Leucin synthetisieren kann. Insbesondere im Minimalmedium benötigt der Stamm Leucin, um wachsen zu können und reagiert daher im Vergleich zum Wildtyp empfindlicher auf Nährstofflimitierungen [8].

1.2 Das pUC19 Plasmid

Das pUC19 Plasmid ist ein häufig eingesetzter *high-copy* Klonierungsvektor für rekombinante *E. coli* Stämme [9]. Die Bezeichnung *high copy* bezieht sich auf die Kopienzahl eines Plasmids

pro Zelle [7]. Mit 2686 bp gehört pUC19 zu den kleineren Plasmiden. Es verfügt über eine *Multiple Cloning Site* (MCS) mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die im Leseraster des lacZ-Gens inseriert ist. Zudem verfügt das Plasmid über ein Ampicillin-Resistenzgen, welches zur Selektion transformierter Zellen genutzt wird (siehe Abbildung 1).

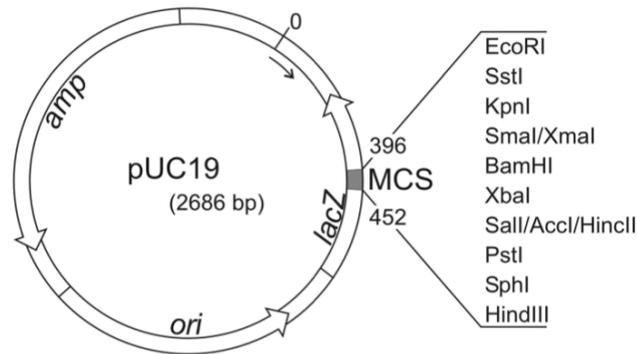


Abbildung 1: Das pUC19 Plasmid [9]

Dargestellt ist der Aufbau des pUC19 Plasmids. Zu sehen ist die Position des Ampicillin-Resistenzgens, der *Origin of Replication* (ori) und die MCS, welche im Leseraster des lacZ-Gens inseriert ist, sowie die Auflistung der Restriktionsenzyme, für die bestimmte Erkennungssequenzen in der MCS codiert sind.

Bei dem pUC19 Plasmid handelt es sich um ein Derivat des pBR322 Vektors [2]. Im Gegensatz zum pBR322 Plasmid wird es in einer höheren Anzahl von der Zelle repliziert. Dies wird bei den sogenannten ColE1-Plasmiden durch ein fehlendes Gen für das Rop/Rom-Protein verursacht. Das Protein katalysiert die Bindung der RNA I und II Komplexe, die für die Regulation der pDNA-Synthese sorgen [10]. Es gibt jedoch eine weitere Besonderheit im pUC19-Plasmid, die eine temperaturabhängige Erhöhung der Kopienzahl verursacht. Das Plasmid hat eine G → A Punktmutation in der RNA II Primersequenz. Diese Mutation wurde nicht in der erstmalig veröffentlichten Gensequenz des pUC19 Plasmids erkannt [2], [10]. Laut Herstellerangaben liegt die Kopienzahl bei ca. 70-80 bei 37 °C und erhöht sich auf über 200 bei 42 °C [9].

1.3 Plasmidkonformationen

Der geforderte Reinheitsgrad eines plasmidbasierten Produkts ist von dem Anwendungszweck abhängig und wird durch die Konformation des Plasmids definiert [11]. Die Plasmidkonformation wird größtenteils durch den Downstreamprozess nach der Fermentation beeinflusst [12]. Die Konformation eines Plasmids resultiert aus intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den negativen Ladungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats [13]. Die häufigsten Isoformen sind die *super coiled* (sc) Form, die *open circular* (oc) Form und die lineare (lin) Form. Während der Fermentation von *E. coli* wird in der Zelle überwiegend die *super coiled* Konformation der Plasmide durch zelleigene Enzyme aufrechterhalten. Die oc- und lineare Form entstehen häufig durch Konformationsänderungen während Downstreamprozessen und dem dabei auftretenden mechanischen Stress sowie durch die Formulierung und Lagerung des Produkts [12]. Ein Bruch

in einem der DNA-Stränge führt zu einer oc-Form. Brechen beide DNA-Stränge des Plasmids, erhält es eine lineare Form [14]. In Abbildung 2 sind die genannten Isoformen dargestellt.

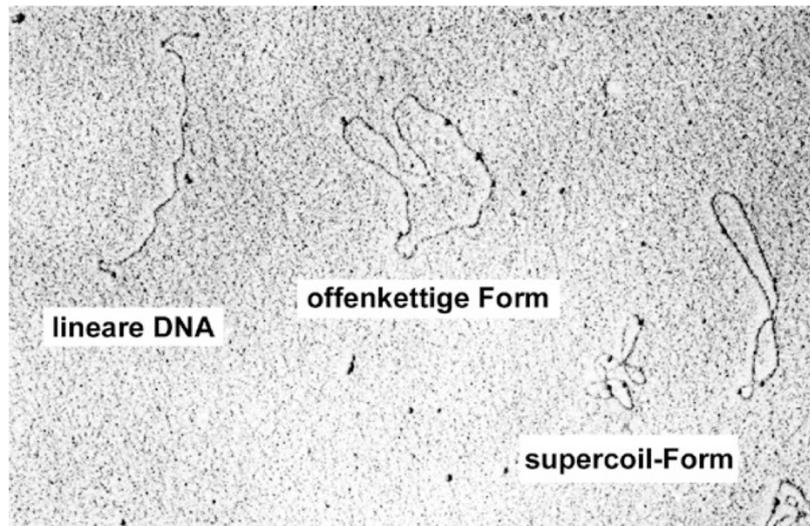


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Plasmidkonformationen [15]

Dargestellt sind die lineare, oc- (in der Abbildung offenkettige Form genannt) und sc-Form.

Die Reinheit wird durch einen möglichst hohen Anteil an pDNA in sc-Form definiert, da diese als besonders stabil und effektiv gilt. Durch den hohen Anteil wird wiederum sichergestellt, dass der Anteil an RNA, genomischer DNA, Proteinen und anderen Isoformen niedrig ist. Diese werden als Verunreinigungen aus dem Zelllysat angesehen, welche die Sicherheit und Effektivität des Produkts gefährden können [6], [7], [14]. Die Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration (FDA) empfehlen einen sc-pDNA Gehalt von über 80% [14]. Zur Sicherung von Qualität und Reinheit wird für pharmazeutische Anwendungen, beispielsweise Gentherapien, ein Gehalt von über 95 % erwartet [7].

1.4 Batch-Kultivierung

Die für diese Arbeit gewählte Prozessführungsstrategie ist die Batch-Kultivierung. Charakteristisch für eine Batch-Kultivierung ist das konstante Volumen. Man spricht auch von einem geschlossenen System. Die Änderung des Volumens durch Korrekturmittel wie Säure, Base und Antischaummittel sowie durch Probenahmen und der Stoffaustausch durch die Begasung werden vernachlässigt. Ausschlaggebend ist, dass kein Substrat ergänzt wird.

1.4.1 Vor- und Nachteile

Batch-Prozesse funktionieren typischerweise ohne einen großen apparativen sowie mess- und regelungstechnischen Aufwand und lassen sich gut automatisieren. Aufgrund der vergleichsweise kurzen Prozesszeit und dem konstanten Volumen besteht eine geringe Infektions- und Mutationsgefahr. Nachteilig sind jedoch eine aufwändige Vorbereitung durch notwendige Vorkulturen und die Sterilisierung von Materialien und Medien als auch eine aufwändige Nachbereitung des Prozesses, zu der die Ernte der Zellsuspension und die Reinigung des

Reaktorsystems gehört. Des weiteren werden die Materialien durch häufiges Sterilisieren und Reinigen beansprucht. Zustandsgrößen der Flüssigphase wie die Zellkonzentration c_{XL} , die Substratkonzentration c_{SL} und die spezifische Wachstumsrate μ sind anders als bei kontinuierlichen oder Fed-Batch Prozessen nicht beeinflussbar. [16]

1.4.2 Wachstumsphasen

Eine Kultivierung im Batchbetrieb startet typischerweise mit einer lag-Phase. In dieser Phase findet zunächst kein Wachstum statt. Die Zellen der Vorkultur adaptieren sich an die neuen Umgebungsbedingungen, gegeben durch das Medium, durch die Synthese von Enzymen und Proteinen, die für ihr Wachstum notwendig sind. Die spezifische Wachstumsrate μ beträgt in dieser Phase nahezu null.

Ist das Substrat für die Zellen zugänglich und unlimitiert, beginnen die Zellen mit ihrer Vermehrung. Während dieser Phase findet ein exponentielles Wachstum mit der spezifischen Wachstumsrate $\mu = \mu_{\max}$ statt. Die Veränderung der Zellkonzentration c_{XL} über die Zeit lässt sich durch die folgende Gleichung (1) beschreiben:

$$\frac{dc_{XL}(t)}{dt} = \mu_{\max} \cdot c_{XL}(t) \quad (1)$$

Nach Trennung der Variablen und Integration erhält man eine Exponentialfunktion

$$c_{XL}(t) = c_{XL,0} \cdot e^{\mu_{\max}(t-t_{\text{lag}})} \text{ für } t_{\text{lag}} \leq t \leq t_{\text{exp}} \quad (2)$$

c_{XL}	Zellkonzentration in g L^{-1}
$c_{XL,0}$	Zellkonzentration bei t_0 in g L^{-1}
μ_{\max}	maximale spezifische Wachstumsrate in h^{-1}
t_{lag}	Dauer der lag-Phase in h
t_{exp}	Dauer der exponentiellen Wachstumsphase in h

für die Zellkonzentration c_{XL} .

Wird das Substrat aufgebraucht oder das Wachstum inhibiert, erfolgt der Übergang in die stationäre Phase. Die spezifische Wachstumsrate μ beträgt in dieser Phase null. Die maximale Zelldichte ist erreicht.

In der Lysephase sterben die Zellen ab. Durch die abnehmende Zellkonzentration ergibt sich für die spezifische Wachstumsrate $\mu < 0$. [16]

1.5 Glycerin als Kohlenstoffquelle

In dieser Arbeit wird reines Glycerin ($\geq 98\%$) als Kohlenstoffquelle bei der aeroben Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19 verwendet.

Schätzungsweise 1 kg Rohglycerin entsteht bei der Produktion von 10 kg Biodiesel [17]. Für die Etablierung erneuerbarer Energien kann es daher von großem Interesse sein, das in hohen Mengen entstehende Nebenprodukt zu verwerten, zum Beispiel für die Gewinnung von Wasserstoff für den Einsatz als nachhaltigen Energieträger. Glycerin kann von vielen Mikroorganismen, darunter auch *E. coli*, als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Aus dem entstehenden Pyruvat kann Formiat gebildet werden, das als Vorläufer für die Produktion von Wasserstoff dient. Vorteilhaft für die Kultivierungsbedingungen ist, dass im Vergleich zur Verstoffwechslung von Glucose weniger Acetat und Milchsäure entsteht [15].

Glycerin gelangt über passive Diffusion durch die zytoplasmatische Membran [17]. Die Abbildung 3 veranschaulicht den aeroben Metabolismus von Glycerin. Die Glycerinkinase phosphoryliert unter Verbrauch von ATP das Glycerin zu Glycerin-3-phosphat. Dieses Zwischenprodukt kann von der Zelle für den Energiestoffwechsel, aber auch für die Biosynthese weitergenutzt werden [19]. Im Falle der Energiegewinnung wandeln zwei Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenasen das Glycerin-3-phosphat unter Bildung von Ubichinol zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) um. Unter Freisetzung von 2 ATP und NADH entsteht Pyruvat [20].

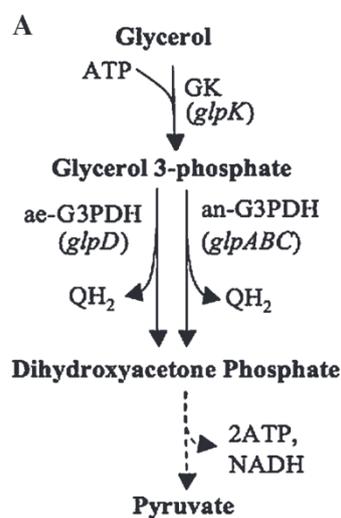


Abbildung 3: Involvierte Stoffwechselwege bei der Verstoffwechslung von Glycerin [20]

Glycerin wird unter Verbrauch von ATP durch eine Kinase und zwei Dehydrogenasen zu Pyruvat umgewandelt.

2 Zielsetzung

Die Medienzusammensetzung und Kultivierungstemperatur sind fundamentale Bestandteile biotechnologischer Prozesse. Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist es, den Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die Plasmidausbeute in *Escherichia coli* DH10B zu untersuchen.

Für die Untersuchung wird der rekombinante *E. coli* DH10B Stamm mit dem pUC19-Plasmid transformiert. Um den Einfluss von Glycerin als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt als Stickstoffquelle auf die Plasmidausbeute zu untersuchen, werden die Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen im Kultivierungsmedium variiert. Dafür wird, ausgehend von den Standardkonzentrationen von 50 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt, das Kultivierungsmedium zusammen mit dem Verhältnis von Glycerin zu Hefeextrakt folgendermaßen verändert:

- Reduktion der Glycerinkonzentration auf 25 g L^{-1} , während die Hefeextraktkonzentration bei 60 g L^{-1} bleibt.
- Reduktion der Hefeextraktkonzentration auf 30 g L^{-1} , während die Glycerinkonzentration bei 50 g L^{-1} bleibt.
- Reduktion der Glycerinkonzentration auf 25 g L^{-1} und der Hefeextraktkonzentration auf 30 g L^{-1} .

Für die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungstemperaturen auf die Plasmidausbeute wird der transformierte Stamm bei Temperaturen von $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $39 \text{ }^\circ\text{C}$ und $41 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert.

Der transformierte *E. coli* Stamm wird in einem Batchprozess bei den gewählten Temperatur- und Mediumsbedingungen im Bioreaktor kultiviert. Durch die anschließende Isolierung des Plasmids und der Anwendung quantitativer und qualitativer Methoden wird der Einfluss auf die spezifische und gesamte Ausbeute an Plasmid-DNA bestimmt. Darüber hinaus wird überprüft, welche Plasmidkonformationen das produzierte Plasmid hat und ob veränderte Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf diese haben.

Es wird erwartet, dass die Veränderung der Kultivierungstemperatur aufgrund der Eigenschaften des pUC19-Plasmids vor Allem einen Einfluss auf die Kopienzahl und die spezifische Plasmidausbeute haben wird. Das Wachstum könnte dabei beeinträchtigt werden, weshalb eine niedrigere Gesamtausbeute erwartet wird.

Die Medienkomposition kann das komplexe Regulationssystem der Zellen, aber auch ihre Wachstumsrate und somit die Kopienzahl beeinflussen [1], [2]. Hier wird ebenfalls ein Unterschied in der Kopienzahl und spezifischen Ausbeute erwartet, sowie auch in der Gesamtausbeute, die durch die erreichte Zelldichte bestimmt wird.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Angegeben sind Name, Modell und Hersteller der eingesetzten Geräte.

Name	Modell	Hersteller
Analysenwaage	BP 221 S	Sartorius AG Göttingen
Autoklav	VX-150	Systec GmbH
Bioreaktor CTA	BIOSTAT® CT5-2	B. Braun Biotech International GmbH
Bioreaktor CTB	BIOSTAT® CT5-2	B. Braun Biotech International GmbH
Dampferzeuger	Steamboy DG 18	ZIRBUS technology GmbH
Elektrophorese-System	Compact XS/S	Analytik Jena GmbH+Co. KG
Elektrophorese Spannungsquelle	EPS 301	Pharmacia Biotech
Elektroporator	Eporator	Eppendorf AG
Gel-Dokumentationsgerät	GelStick IMAGER	Intas Scientific GmbH
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Magnetrührer	RCT basic	IKA®- Werke GmbH & Co.KG
pH-Elektrode	pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Schüttelinkubator	New Brunswick Innova® 42	Eppendorf AG
Schüttelinkubator	Innova® 4200	Eppendorf AG
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Spektrophotometer	NanoDrop 2000C	Thermo Fischer Scientific Inc.
Spektrophotometer	Genesys 10uv	Thermo Fischer Scientific Inc.
Spektrophotometer	Ultrospec	Biochrom Ltd.
Thermoschüttler	ThermoMixer F2.0	Eppendorf AG

Material

Name	Modell	Hersteller
Trockenschrank	Vacutherm	Heraeus Holding GmbH
Vortexer	VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Vortexer	RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH
Waage	QUINTIX3102 – 1S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Centrisart A-14	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH

3.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Angegeben sind Name, Artikelnummer und Hersteller der eingesetzten Chemikalien.

Name	Artikelnummer	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	5210.2	Carl Roth GmbH
Agarose	15510-027	Life Technologies
Ammoniaklösung 25 %	5460.2	Carl Roth GmbH
Ampicillin-Natriumsalz	K029.2	Carl Roth GmbH
(NH ₄) ₂ HPO ₄	P736.1	Carl Roth GmbH
Ethanol	9065.1	Carl Roth GmbH
6x Gel Loading Dye Purple	B7024S	New England Biolabs Inc.
Gibco™ Bacto™ Hefeextrakt	212750, 212720	Life Technologies Corporation
Glycerin	7530.5	Carl Roth GmbH
KH ₂ PO ₄	P018.2	Carl Roth GmbH
L-Leucin	1699.1	Carl Roth GmbH
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	P828.3	Carl Roth GmbH
NaCl	3957.1	Carl Roth GmbH
ortho-Phosphorsäure 85 %	1.005.731.000	Merck KGaA

Material

Name	Artikelnummer	Hersteller
Pepton aus Casein	8986.1	Carl Roth GmbH
Plasmid-DNA pUC19	X911.1	Carl Roth GmbH
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	N0550G	New England Biolabs Inc.
SafeGel green stain	/	GENAXXON bioscience GmbH

3.3 Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Lösungen

Angegeben sind die Komponenten sowie ihre Konzentration der eingesetzten Lösungen.

Name	Komponente	Konzentration
Ampicillin-Lösung	Ampicillin	100 mg mL ⁻¹
	VE-Wasser	50 % v/v
	Ethanol	50 % v/v
Leucin-Lösung	L-Leucin	15 mg mL ⁻¹
	VE-Wasser	
Magnesiumsulfat-Lösung	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	240 g L ⁻¹
	VE-Wasser	
Saline	NaCl	9 g L ⁻¹
	VE-Wasser	
Spurenelementlösung	Citronensäure	170 g L ⁻¹
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	150 mg L ⁻¹
	EDTA	840 mg L ⁻¹
	Eisen(III)-Citrate-Hydrat	10 g L ⁻¹
	Zink(II)-Acetat-Dihydrat	1,3 g L ⁻¹

3.4 Nährmedien

Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährmedien

Der pH-Wert wurde mit 4 M NaOH auf 7 eingestellt. Nach der Sterilisation wurde autoklavierte Magnesiumsulfatlösung, nach Bedarf sterilfiltrierte Ampicillin-Lösung zur Selektion der transformierten *E. coli* DH10B Klone und aufgrund der Leucin-Auxotrophie des Stammes sterilfiltrierte Leucin-Lösung zugegeben.

Name	Komponente	Konzentration
LB-Medium	Gibco™ Bacto™ Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
	NaCl	5 g L ⁻¹
	Pepton aus Casein	10 g L ⁻¹
	Agar-Agar, Kobe I	15 g L ⁻¹
	Ampicillin	100 mg L ⁻¹
Glycerolmedium im Schüttelkolben	Gibco™ Bacto™ Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
	Glycerin	10 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	13,3 g L ⁻¹
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g L ⁻¹
	Spurenelementlösung	1:100
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2 g L ⁻¹
	Ampicillin	100 mg L ⁻¹
	L-Leucin	0,3 g L ⁻¹
Glycerolmedium im Bioreaktor	Gibco™ Bacto™ Hefeextrakt	60 g L ⁻¹
	Glycerin	50 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	13,3 g L ⁻¹
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g L ⁻¹
	Spurenelementlösung	1:100
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2 g L ⁻¹
	Ampicillin	100 mg L ⁻¹
	L-Leucin	0,3 g L ⁻¹

4 Methoden

In diesem Abschnitt wird die praktische Durchführung der für diese Arbeit verwendeten Methoden erläutert.

4.1 Transformation von *E. Coli* DH10B mit dem pUC19 Plasmid

Ein elektrokompetenter *E. coli* DH10B Stamm wurde durch das Labor für Mikrobiologie der HAW Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Transformation erfolgte durch eine Elektroporation.

Zu Beginn wurde der Gehalt des pUC19 Plasmids (Carl Roth GmbH) in Lösung mittels Spektralphotometer zu $408,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ bestimmt. Die Transformation wurde im Elektroporator nach der Zugabe von 1 ng des pUC19 Plasmids zu 100 μL des *E. coli* Stammes in einer Elektroporationsküvette bei 1630 V für 5 ms durchgeführt. Die Zellsuspension wurde danach mit 900 μL sterilem LB-Medium aus der Elektroporationskammer gespült und in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert, damit das Ampicillinresistenzgen exprimiert und β -Lactamase synthetisiert wird. Die Zellsuspension wurde 1:10 und 1:100 verdünnt. Danach erfolgte ein Ausstrich auf Luria-Bertani (LB) Agarmedium (s. Tabelle 4), welches zur Selektion der transformierten Zellen mit Ampicillin versetzt wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2 Mikrobielle Dauerkultur

Aus vier transformierten *E. coli* DH10B Klonen sollten für die Bestimmung der Kloneffizienz hinsichtlich der Plasmidproduktion und für spätere Kultivierungen im Bioreaktor mikrobielle Dauerkulturen hergestellt werden.

4.2.1 Vorkultur

Die vier Klone wurden jeweils mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen und in einen 100 mL Schikanenkolben mit 10 mL ampicillinhaltigen Glycerolmedium (s. Tabelle 4) überführt. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

4.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Mit 4 mL der Vorkultur wurden für jeden Klon jeweils zwei 1000 mL Schüttelkolben mit 100 mL ampicillinhaltigen Glycerolmedium (s. Tabelle 4) angeimpft. Die Schüttelkulturen wurden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Eine Schüttelkultur diente der Entnahme von Proben unter der Sicherheitswerkbank für die Messung der ΔOD . Bei einer ΔOD von 2 wurde der zweite, unbeprobte Schikanenkolben für die mikrobielle Dauerkultur entnommen. Die Kulturen wurden mit sterilem Glycerin versetzt, sodass sich innerhalb der Zellsuspension eine Glycerinkonzentration von 15 % v/v ergab. Anschließend wurden die Kulturen unter der

Sicherheitswerkbank in 1,5 mL sterile Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der beprobte Kolben wurde weiter über Nacht inkubiert und die finale ΔOD am nächsten Morgen bestimmt.

4.3 Vorversuche

Vor der Kultivierung des transformierten Stammes im Bioreaktor wurde zunächst das Wachstumsverhalten und die pDNA-Produktion der Klone im Schüttelkolben überprüft. Dazu wurden Wachstumskurven aufgenommen. Ein ausgewählter Klon wurde nach der Überprüfung des pDNA-Gehalts zusätzlich bei niedrigeren Temperaturen und unterschiedlichen Animpfvolumina über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Dies diente der Abschätzung der optimalen Bedingungen für die Vorkulturen, um eine überwachsene Vorkultur für die anschließende Kultivierung im Bioreaktor zu vermeiden.

4.3.1 Untersuchung der Kloneffizienz

Für die Untersuchung der Kloneffizienz wurde das Wachstumsverhalten und die pDNA-Produktion überprüft. Hierfür wurden unter der Sicherheitswerkbank im 1000 mL Schikanenkolben 100 mL Glycerolmedium mit 900 μL Kryokultur angeimpft. Die Schüttelkulturen wurden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Wachstumskurven wurden für die vier Klone anhand der in regelmäßigen Zeitabständen gemessenen ΔOD aufgenommen. Bei einer ΔOD von ungefähr 2 wurden 2 mL der Zellsuspensionen zentrifugiert, sodass die erhaltenen Pellets einer ΔOD von ungefähr 4 entsprachen. Anschließend wurde die pDNA isoliert und quantifiziert.

4.3.2 Abschätzung der optimalen Bedingungen für die Vorkulturen

Zur Festlegung der Wachstumsbedingungen für die Vorkulturen, die für die Kultivierungen im Bioreaktor eingesetzt werden sollten, wurde ein ausgewählter Klon über Nacht im Schüttelinkubator bei 20 und $28,5\text{ °C}$ sowie 220 rpm im 1000 mL Schikanenkolben inkubiert. Für beide Temperaturen wurden 100 mL Glycerolmedium mit je 400 und 40 μL der Kryokultur angeimpft. Angeimpft wurde um 17:00. Am nächsten Tag wurde die ΔOD bestimmt und bis 13:25 weiter inkubiert. Im Anschluss wurde die pDNA isoliert und quantifiziert.

4.4 Kultivierung im Bioreaktor

Für die Versuche dieser Arbeit wurde der BIOSTAT® CT von der B. Braun Biotech International GmbH verwendet. Von diesem Typ wurden zwei Reaktoren parallel mit einem Arbeitsvolumen von 3 L betrieben, folglich CTA und CTB genannt.

4.4.1 Reaktorsystem

Das Reaktorsystem setzt sich aus dem *in-situ* sterilisierbaren doppelwandigen 5 L Edelstahlkulturgefäß mit Glaszylinder und der *Digital Control Unit* (DCU) zusammen.

Die Rührwelle ist mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern ausgestattet und durch den Edelstahldeckel in den Rührkessel geführt. Der Begasungsring ist mit dem Zuluftanschluss im Deckel verbunden. Darüber hinaus enthält der Deckel Durchgänge für den Abluftkühler- und -filter, das Tauchrohr, das Sicherheitsventil und die Antischaumsonde sowie Stutzen für Anstechgarnituren. An die Anstechgarnituren wurden Korrekturmittel wie Säure, Base und Antischaummittel über Schnellkupplungen angeschlossen. Zudem wurde über die Anstechgarnitur angeimpft. Um eine Ausfällung von Salzen zu vermeiden, wurde die Base über eine separate Anstechgarnitur zugeführt. Bei Bedarf wurden die Korrekturmittel über Pumpen der DCU in den Reaktor geleitet. Sonden für die Messung von pH, pO_2 und Temperatur wurden in den Stutzenkranz eingebaut (siehe Abbildung 4).

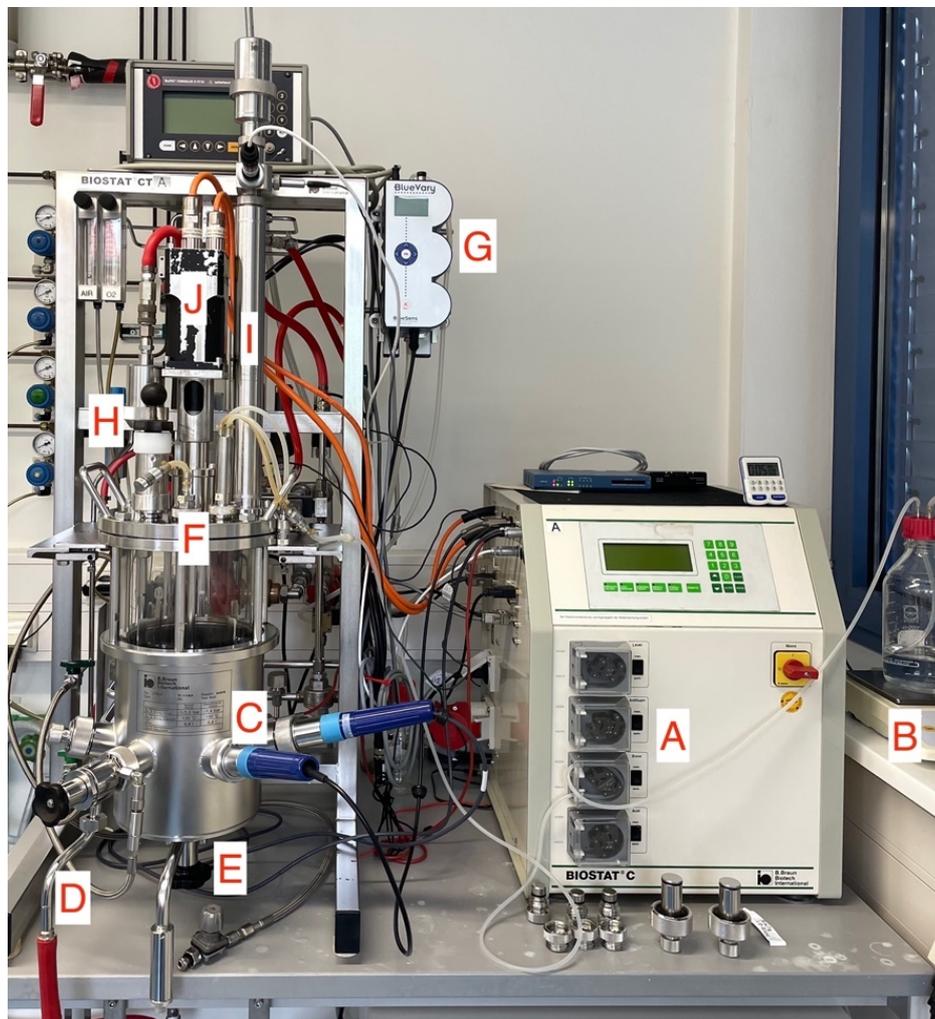


Abbildung 4: Aufbau des Reaktorsystems

Das Reaktorsystem wird über die DCU (A) kontrolliert. Über die Pumpen an der DCU wird Korrekturmittel in den Bioreaktor geleitet. Der Basenverbrauch wird über eine systemintegrierte Waage bestimmt (B). Den Input für das Regelsystem liefern die pH- und pO_2 -Sonde (C). Die Probenahme erfolgt über ein Ventil am Stutzenkranz (D). Die Ernte erfolgt über ein Bodenablassventil (E). Korrekturmittel und Animpfflasche werden an die Anstechgarnituren im Deckel angeschlossen (F). Die gefilterte Abluft wird durch ein Abgasanalysesystem (G) geleitet. Die Zu- (H) und Abluft (I) werden durch den Deckel geführt. Die Rührwelle wird durch einen Gleichstrom-Servomotor (J) angetrieben.

Die zugehörigen Geräte des Reaktorsystems sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Eingesetzte Sonden und Geräte für die Kultivierung im Bioreaktor

Angegeben sind Name, Modell und Hersteller der eingesetzten Geräte.

Name	Modell	Hersteller
Abgasanalysator	BlueVary	Blue Sens gas sensor GmbH
Waage	TE6101	Sartorius Stedim Biotech GmbH
pH-Sonde	HA405-DPA-SC-S8/120 combination pH	Mettler-Toledo GmbH
pO_2 -Sonde	InPro6800/12/070	Mettler-Toledo GmbH

Die Regelkreise der relevanten Prozessgrößen sind in der DCU realisiert. Das Fließschema sowie die relevanten Regelkreise der Reaktoranlage sind in Abbildung 5 dargestellt.

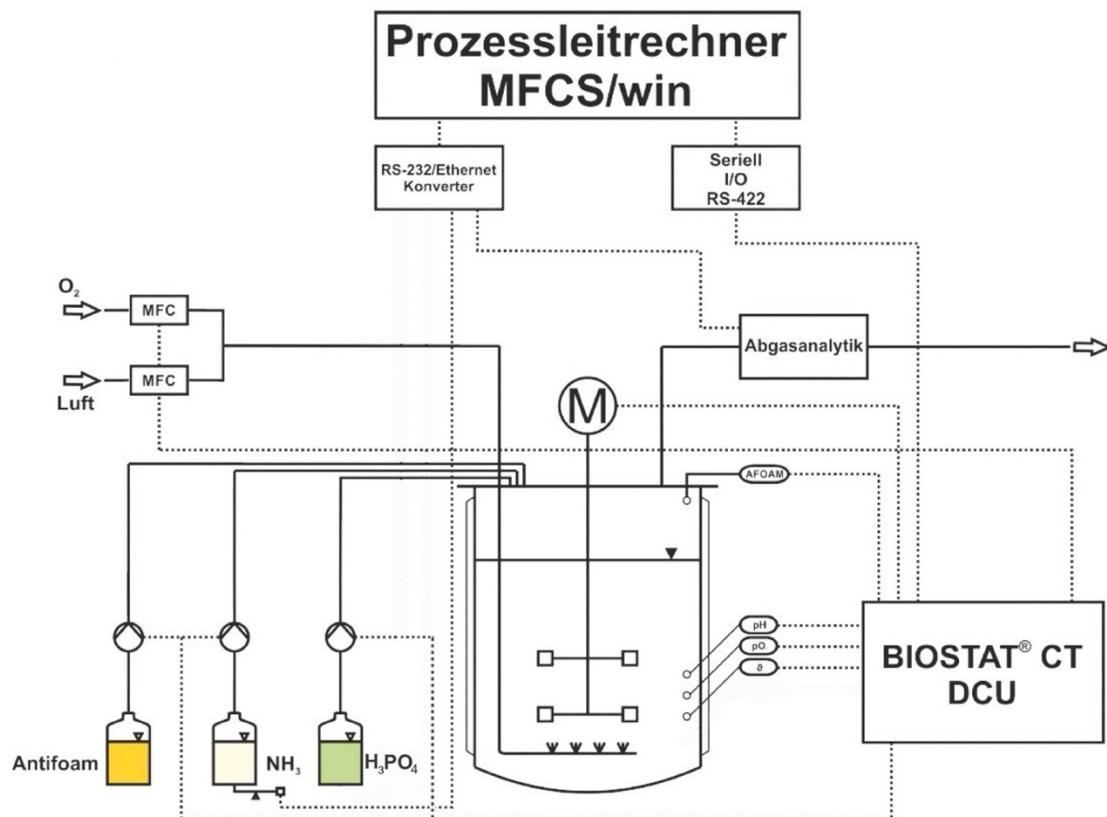


Abbildung 5: Modifiziertes Fließschema des BIOSTAT® CTA und CTB [21]

Dargestellt ist das Reaktorsystem des 5 L Rührkesselreaktors inklusive der digitalen Kontrolleinheit (DCU) und dem Prozessleitreehner MFCS/win, sowie die Regelung von Druckluft- und Sauerstoffbegasung, Temperatur, pH-Wert, pO_2 und Antischaum. Darüber hinaus verfügte das Reaktorsystem über eine Highfoamsonde in der Abluftstrecke (nicht dargestellt).

Die in Tabelle 6 aufgeführten Prozessparameter wurden an der DCU eingestellt und geregelt.

Tabelle 6: Prozessparameter für die Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19

Der pH-Wert wurde über die Zugabe von 25 % Ammoniaklösung bzw. 1,5 M Phosphorsäure geregelt. Die Rührerdrehzahl wurde durch einen pO_2 -Kaskadenregler geregelt. Der Gasmix aus Luft und O_2 wurde bei Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl manuell am CTA und automatisch am CTB angepasst.

Parameter	Sollwert
pH-Wert	7,0
ϑ	37 °C
pO_2	$\geq 20 \%$
Begasungsrate	3 L min ⁻¹
F_{G,O_2}	≥ 0 L min ⁻¹
$F_{G,Luft}$	≤ 3 L min ⁻¹
Rührerdrehzahl	≤ 1500 rpm

Bei maximaler Rührerdrehzahl wurde die Sauerstoffzufuhr erhöht und die Druckluftzufuhr gesenkt, sodass sich insgesamt eine Begasungsrate von 3 L min⁻¹ ergab und ein pO_2 -Wert von ca. 20 % aufrechterhalten wurde. Im CTB wurde dies durch einen pO_2 -Kaskadenregler geregelt. Für den CTA wurden, sobald die maximale Rührerdrehzahl erreicht wurde, die Begasungsraten manuell an der DCU angepasst. Der genaue Basenverbrauch wurde über eine systemintegrierte Waage bestimmt. Für die kontinuierliche Datenaufzeichnung wurde das *Multi Fermentor Control System for Windows* (MFCS/win) von Sartorius Stedim Biotech verwendet.

4.4.2 Vorbereitung

Der Bioreaktor wurde am Tag vor der Kultivierung zusammengebaut. Die pH-Sonde wurde durch eine Zweipunktkalibrierung (pH 4 und 7) mit der DCU kalibriert und in den Reaktorkegel eingebaut. Das Medium wurde gemäß den Angaben in Tabelle 4 vorbereitet, wobei die Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen als Kohlen- und Stickstoffquelle bei einigen Versuchen variiert wurden. Nach dem Befüllen des Reaktors mit dem Medium wurde dieser *in-situ* sterilisiert. Bei 121 °C wurde der Nullpunkt der pO_2 -Sonde kalibriert. Der durch die Sterilisation entstandene Kondensatverlust wurde durch Zugabe von autoklaviertem vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) und steriler Leucin- sowie Magnesiumsulfatlösung ausgeglichen, sodass das Flüssigvolumen 2,8 L betrug. Zur Überprüfung der Sterilität des Reaktorinhalts wurde ein Sterillauf bei 500 rpm und der für den Versuch gewählten Temperatur über Nacht durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde bei maximaler Rührerdrehzahl der Sättigungspunkt der pO_2 -Sonde kalibriert.

4.4.3 Vorkultur und Inokulation

Die Reaktoren wurden mit 200 mL Inokulum angeimpft. Für die Vorkultur wurden in zwei 1000 mL Schikanenkolben 100 mL Glycerolmedium mit 40 μ L Kryokultur um 17:00 angeimpft. Die Kulturen inkubierten über Nacht im Schüttelinkubator bei 28,5 °C und 220 rpm. Am nächsten Tag wurde um ca. 08:00 die ΔOD bestimmt. Die Vorkulturen wurden unter der Sicherheitswerkbank in eine autoklavierte Animpfflasche überführt. Über eine Schnellkupplung wurde die Animpfflasche mit der Anstechgarnitur des Reaktors verbunden und das Inokulum zugegeben. Anschließend wurde das Rezept für die Batch-Kultivierung in MFCS/win gestartet.

4.4.4 Probenahme

Während der Kultivierungen wurde in regelmäßigen Zeitabständen die ΔOD gemessen. Zeitgleich wurden Proben für die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration sowie der Acetat- und Glycerinkonzentration abgenommen. Die Probenahme erfolgte über ein Probenahmeventil, welches hinterher für 5 min durchdämpft wurde. Am Ende der Fermentationen wurden Proben entnommen, die für eine pDNA-Isolierung und Gehaltsbestimmung auf eine ΔOD von 10 verdünnt, pelletiert und bei -20 °C eingefroren wurden.

4.5 Isolierung der pDNA

Die produzierte pDNA wurde mit dem Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs GmbH, Artikelnr. T1010L) isoliert. Die Schritte des Aufarbeitungsprozesses sind auf Abbildung 6 veranschaulicht.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13000 rpm durchgeführt. Kulturproben wurden in 2 mL Mikroreaktionsgefäßen auf eine ΔOD von 10 aufkonzentriert bzw. verdünnt und zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20 °C eingefroren. Für die Isolierung wurde das Pellet bei Raumtemperatur aufgetaut und in 200 μ L Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Plasmide wurden durch eine alkalische Lyse mit 200 μ L Lysepuffer freigesetzt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde vorsichtig 5–6-mal invertiert und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 400 μ L Neutralisationspuffer gestoppt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde erneut vorsichtig invertiert, bis das Lysat eine einheitlich gelbe Farbe erhalten hat. Danach wurde für 2 min inkubiert. Das Lysat wurde anschließend für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Silica-Säule überführt. Die Säule wurde im mitgelieferten Mikroreaktionsgefäß für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde 200 μ L des ersten Waschpuffers auf die Säule gegeben. Dieser entfernt Verunreinigungen wie RNA, Proteine und Endotoxine. Nach einminütiger Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses wurde zur Entfernung von Salzen 400 μ L des zweiten Waschpuffers zugegeben und für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde danach in ein sauberes 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dabei wurde

darauf geachtet, dass sich keine Reste des Waschpuffers an der Säule befanden. Die gebundene pDNA wurde zum Schluss mit 40 µL Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach Zugabe des Elutionspuffers wurde 1 min gewartet und anschließend 1 min zentrifugiert. Abweichend von der Anleitung wurde ein zweites Mal in ein weiteres 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß eluiert. [22]

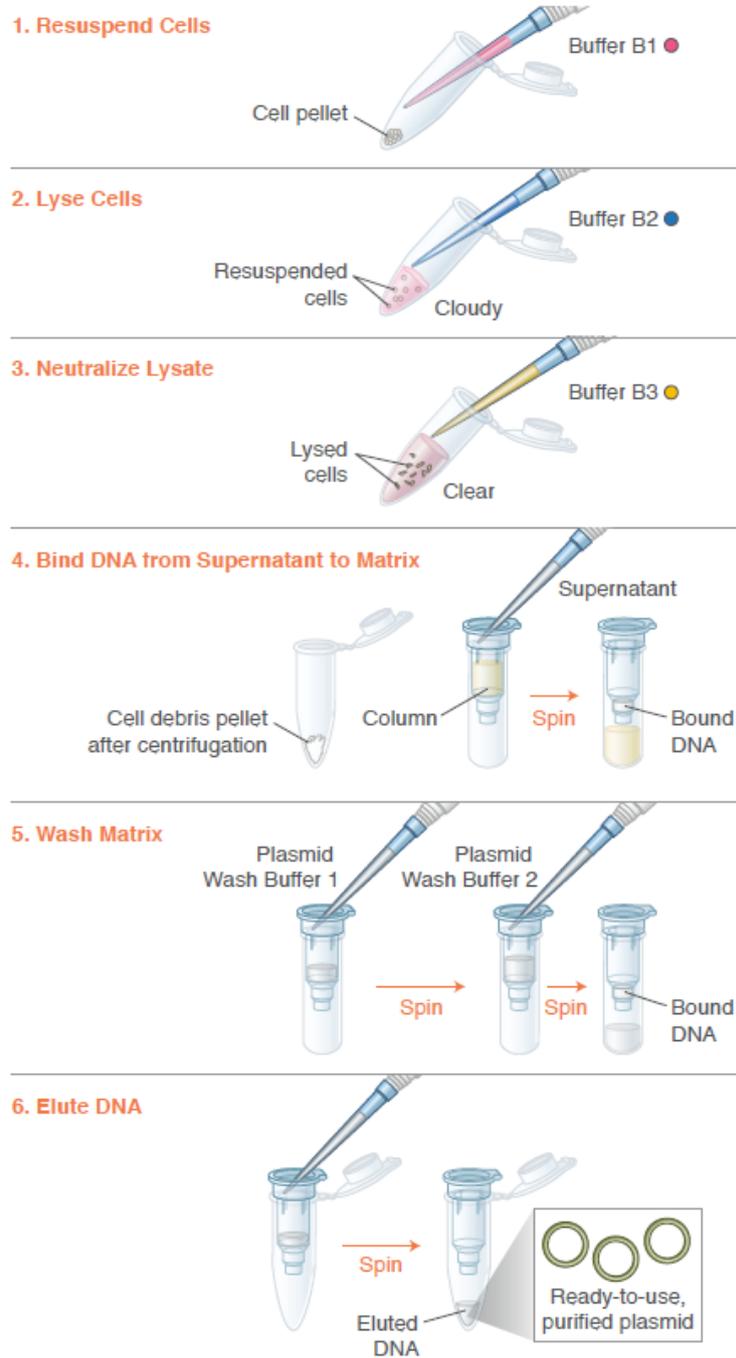


Abbildung 6: Isolierung von pDNA mit dem Monarch® Plasmid Miniprep Kit [22]
Dargestellt sind die Schritte zum Erhalt von pDNA aus *E. coli*.

4.6 Analytik

Um Rückschlüsse auf den Verlauf der Kultivierung und das Wachstumsverhalten der Zellen zu ziehen, wurde während der Batchkultivierung in den Bioreaktoren CTA und CTB die Optische Dichte bei 600 nm (ΔOD) gemessen. Am folgenden Tag wurde die Biotrockenmassekonzentration bestimmt.

Die Messung der Acetat- und Glycerinkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten im Medium dient der Untersuchung des Substratverbrauches und liefert Informationen über eingeschlagene Stoffwechselwege. Die Isolierung der pDNA und deren anschließende Quantifizierung ermöglicht die Ermittlung der pDNA-Ausbeute unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Eine Agarose-Gelelektrophorese gibt Aufschluss über die Isoformen der produzierten pDNA.

4.6.1 Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm

Die Optische Dichte (ΔOD) wurde in einem Photometer bei 600 nm in Doppelbestimmung gemessen. Die Proben wurden bei Bedarf mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, sodass der ablesbare Extinktionswert zwischen 0,12 und 0,6 liegt. In diesem Bereich sind die Biotrockenmassekonzentration und die Optische Dichte proportional zueinander. Der Nullabgleich erfolgte mit Luft. Nachdem die OD_{600} der Suspension gemessen wurde, wurde diese in einem Mikroreaktionsgefäß für 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Optische Dichte des Mediums im Überstand bestimmt. Mit der Formel (3) wurde die ΔOD der Suspension berechnet.

$$\Delta OD = F(OD_{\text{susp}} - OD_{\text{med}}) \quad (3)$$

F	Verdünnungsfaktor
OD_{susp}	OD_{600} der Zellsuspension
OD_{med}	OD_{600} des Mediums

4.6.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Für die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration c_{XL} wurden zunächst Mikroreaktionsgefäße beschriftet, bei 105 °C über Nacht getrocknet und mit einer Analysenwaage ausgewogen. Während der Kultivierungsprozesse wurde 1 mL gut vermischte Probe in das entsprechende Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde dann für 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und für die spätere Bestimmung der Glycerin- und Acetatkonzentration in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C eingefroren. Das Pellet wurde im geöffneten Mikroreaktionsgefäß erneut bei 105 °C

über Nacht getrocknet und mit einer Analysenwaage ausgewogen. Die Ermittlung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte in Doppelbestimmung. Mit der Formel (4) wurde die c_{XL} der Suspension berechnet.

$$c_{XL} = \frac{m_2 - m_1}{V_{Probe}} \quad (4)$$

m_2 Masse des getrockneten Mikroreaktionsgefäß mit Probe in g

m_1 Masse des getrockneten Mikroreaktionsgefäß in g

V_{Probe} Volumen der Probe in L

4.6.3 Bestimmung der Glycerin- und Acetatkonzentration

Die Glycerinkonzentration wurde für den Verlauf der Kultivierungen über eine enzymatische UV-Bestimmung mit dem Enzytec™ Liquid Glycerol (R-Biopharm AG, Artikelnr. E8360) gemäß der Anleitung gemessen.

Die Acetatkonzentration wurde für das Ende aller Fermentationen über eine enzymatische UV-Bestimmung mit dem Enzytec™ Liquid Acetic acid (R-Biopharm AG, Artikelnr. E8226) gemäß der Anleitung gemessen.

4.6.4 Quantifizierung der pDNA

Die Quantifizierung der pDNA erfolgte mit dem NanoDrop 2000C Spektrophotometer bei 260 nm. Als Blank diente der Monarch® Elutionspuffer. Verunreinigungen durch Proteine können durch das Verhältnis A260/A280 überprüft werden, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Ein Wert von 1,8 oder höher deutet auf eine reine Probe hin. Phenole, Urea, EDTA und Moleküle mit Peptidbindungen oder aromatischen Verbindungen absorbieren bei 230 nm. Solche Verunreinigungen können durch das Verhältnis A260/A230 überprüft werden. Werte im Bereich 1,8 – 2,2 deuten auf eine reine Probe hin. Werte unter 1,8 bedeuten oft, dass eine Verunreinigung vorliegt. [23]

4.6.5 Berechnung der spezifischen Plasmidausbeute

Nach der Isolierung aus einem Pellet, welches durch Zentrifugation von 1 mL Zellsuspension einer ΔOD von 10 erhalten wird, liegt die Plasmid-DNA in 40 μ L Eluat vor. Die Software des NanoDrop 2000C Spektrophotometers liefert den Messwert der c_{pDNA} in $ng \mu L^{-1}$. Diese kann anhand von dem Volumen des Eluats in eine Masse umgerechnet werden

$$m_{pDNA,Eluat} = c_{pDNA,Eluat} \cdot V_{Eluat} \quad (5)$$

mit der anschließend die Menge an pDNA pro ΔOD -Einheit bestimmt wird.

$$\text{pDNA pro } \Delta OD \text{ 1} = \frac{m_{\text{pDNA,Eluat}}}{\Delta OD_{\text{Pellet}}} \quad (6)$$

Darauffolgend wird die Menge an pDNA pro ΔOD -Einheit in die Konzentration der pDNA in der Flüssigphase des Bioreaktors umgerechnet.

$$c_{\text{pDNA,Bioreaktor}} = \frac{\text{pDNA pro } \Delta OD \text{ 1} \cdot \Delta OD_{\text{Bioreaktor}}}{1000} \quad (7)$$

Anhand der Konzentration wird der Plasmidgehalt pro Gramm Biotrockenmasse bestimmt.

$$mg_{\text{pDNA}}/g_{\text{BTM}} = \frac{c_{\text{pDNA,Bioreaktor}}}{c_{\text{XL}}} \quad (8)$$

$m_{\text{pDNA, Eluat}}$	Gesamtmenge an pDNA im Eluat in ng
pDNA pro ΔOD 1	pDNA-Menge pro ΔOD -Einheit in ng
$c_{\text{pDNA,Bioreaktor}}$	Plasmidkonzentration im Bioreaktor in mg L^{-1}
$mg_{\text{pDNA}}/g_{\text{BTM}}$	spezifische Plasmidausbeute in $\text{mg}_{\text{Plasmid}} g_{\text{BTM}}^{-1}$

4.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung und Aufreinigung der isolierten Nukleinsäuren.

Zunächst wurde zur Herstellung eines 1 % Agarosegels 500 mg Agarose eingewogen und in 50 mL 1x TAE-Puffer gegeben. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst. Die Lösung wurde in die Gießform der Elektrophoresekammer gegossen. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde TAE-Puffer bis zur angegebenen Füllhöhe in die Elektrophoresekammer gegeben. Die Fermentationsproben wurden auf eine Plasmidkonzentration von $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Als pUC19-Standard diente die pDNA-Lösung, die auch zur Transformation des Stammes verwendet wurde. Diese wurde ebenfalls auf eine Konzentration von $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ verdünnt. Die Taschen wurden mit 6 μL Probe, bestehend aus 200 ng Plasmidprobe, Nuklease-freiem Wasser und 1 μL 6x Probenpuffer, beladen. Der Größenstandard wurde unverdünnt mit 1 μL des Probenpuffers in die Taschen gegeben. Die Gelelektrophorese lief bei einer konstanten Spannung von 120 V. Nachdem die Lauffront am Ende des Gels angekommen war, wurde das Gel für 1 Stunde mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Für die Färbelösung wurde die 10000x Färbelösung 1:3300 mit 0,1 M NaCl verdünnt, sodass eine dreifach konzentrierte Färbelösung erhalten wurde. Zur Dokumentation wurden die Banden des Gels durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mittels UV-Transilluminator kenntlich gemacht im Geldokumentationsgerät festgehalten.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit zur Untersuchung des Einflusses von Glycerol- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die Plasmidausbeute in *Escherichia coli* DH10B vorgestellt und diskutiert.

5.1 Transformation

Nach der Transformation von *E. coli* DH10B mit dem pUC19 Plasmid mittels Elektroporation wurden zwei Verdünnungen der transformierten Zellsuspension erstellt und auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Um die Transformation und die Selektion transformierter Zellen durch das Antibiotikum zu überprüfen, wurde *E. coli* DH10B mit 10 μ L Wasser elektroporiert und anschließend ausgestrichen.

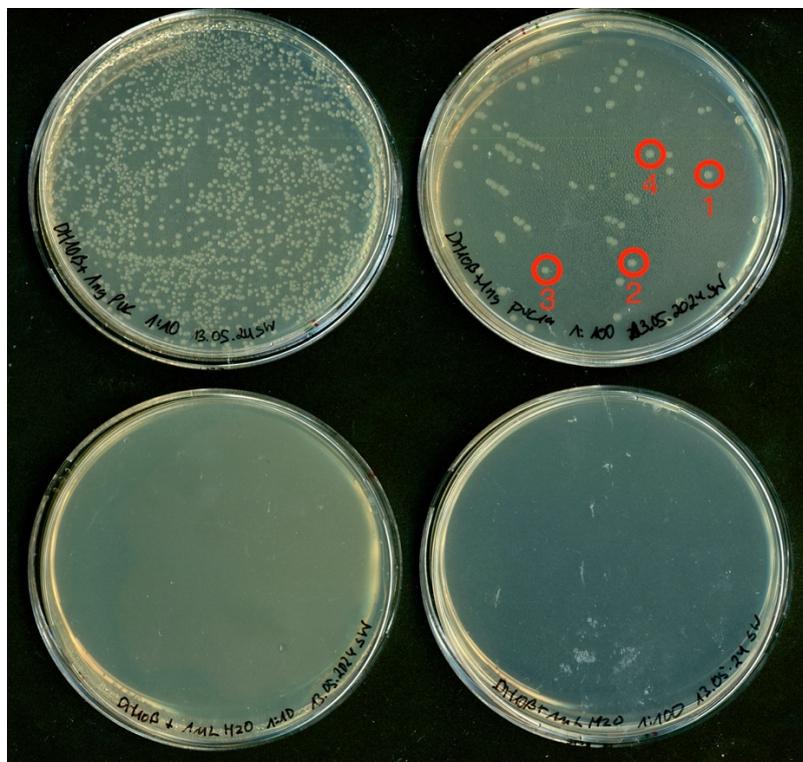


Abbildung 7: Koloniebildung nach der Transformation von *E. coli* DH10B mit 1 ng pUC19 Plasmid

Die transformierte Zellsuspension wurde 1:10 (oben links) und 1:100 (oben rechts) verdünnt und auf ampicillinhaltigem LB-Agarmedium ausplattiert. Zur Kontrolle wurde die Zellsuspension unter Zugabe von 10 μ L Wasser elektroporiert und ebenfalls 1:10 (unten links) und 1:100 verdünnt (unten rechts) und ausplattiert.

Mit Ausnahme der Negativkontrolle konnte auf jeder Agarplatte Wachstum festgestellt werden. Die Transformation des Stammes verlief damit erfolgreich. Aus der ausplattierten 1:10 Verdünnung wurden die Klone aus vier Kolonien für die Untersuchung der Kloneffizienz ausgewählt (siehe Abbildung 7). Zudem wurden mikrobielle Dauerkulturen für jeden Klon erstellt.

5.2 Kloneffizienz

Die Klone 1-4 wurden im Schüttelkolben kultiviert. Für den Vergleich der Kloneffizienz wurden Wachstumskurven aufgenommen und anschließend der pDNA-Gehalt bestimmt.

5.2.1 Wachstumsverhalten von vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen

Das Wachstum der Klone 1-4 wurde durch eine regelmäßige Messung der ΔOD überprüft. Die Kultivierungsbedingungen wurden für jeden Klon identisch gehalten. Die folgende Abbildung 8 zeigt den Verlauf der ΔOD über die Zeit.

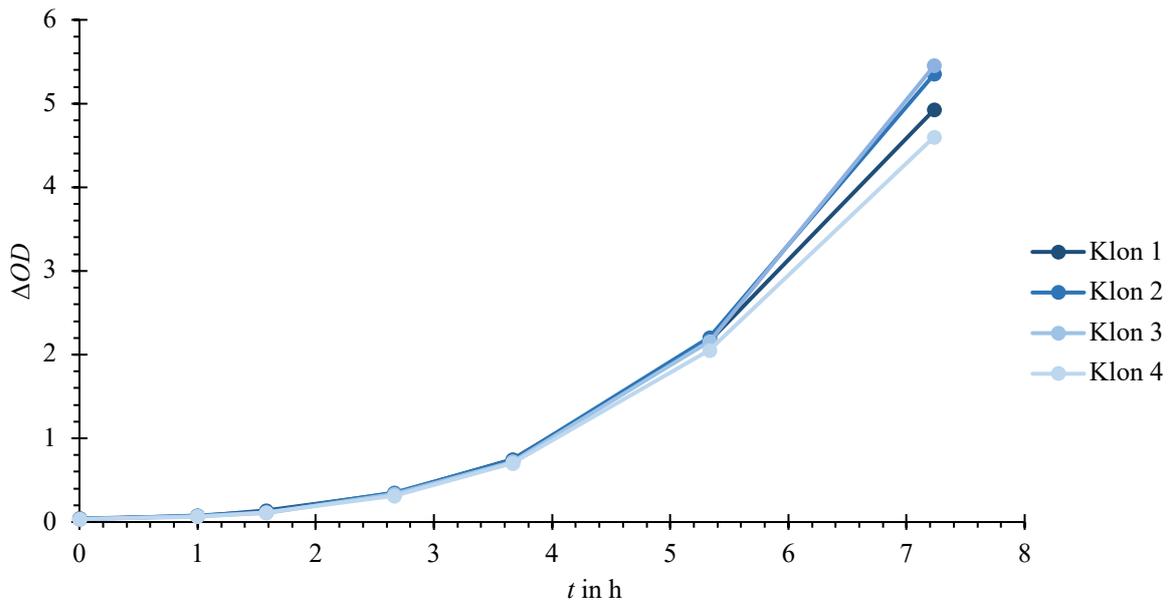


Abbildung 8: Wachstumskurven von vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen im Vergleich

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der ΔOD von vier 100 mL Schüttelkulturen unterschiedlicher DH10B::pUC19 Klone. Die Klone wurden bei 37 °C und 220 rpm in Glycerolmedium kultiviert.

Die Formen der Wachstumskurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Das Wachstumsverhalten für die Kultivierung im Schüttelkolben ist somit für alle Klone gleich. Es beginnt mit einer kurzen lag-Phase, gefolgt von einer exponentiellen Wachstumsphase bis ca. 4 h. Ab hier ist davon auszugehen, dass eine Nährstofflimitierung zu einem verlangsamten Wachstum und einer geringeren spezifischen Wachstumsrate führte. Nach 4 h werden trotz identischer Kultivierungsbedingungen Unterschiede zwischen den ΔOD -Werten sichtbar.

Um die maximalen spezifischen Wachstumsraten (μ_{\max}) der Klone zu vergleichen, wird eine Regressionsgerade durch den linearen Bereich des aufgetragenen natürlichen Logarithmus der ΔOD -Werte über die Zeit erstellt (siehe Abbildung 9). Die Steigung der Regressionsgerade entspricht μ_{\max} .

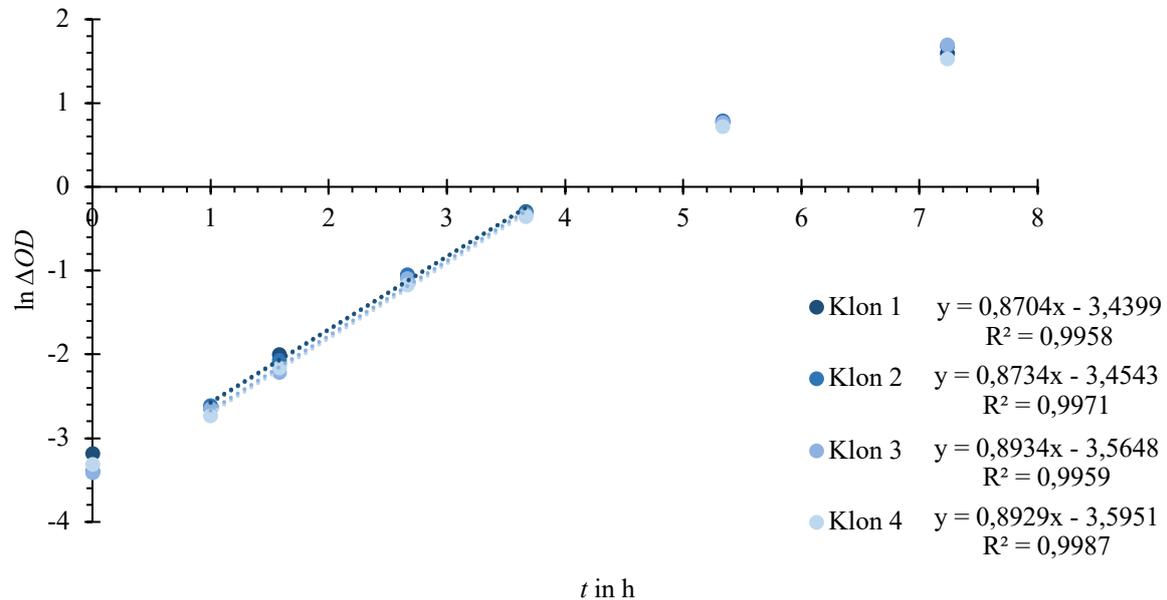


Abbildung 9: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate von vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen

Abgebildet sind die Regressionsgeraden über den linearen Bereich der logarithmierten ΔOD und die zugehörigen Geradengleichungen sowie Bestimmtheitsmaße.

Die folgende Tabelle fasst die ΔOD -Werte am Ende der Kultivierung und die maximalen spezifischen Wachstumsraten zusammen.

Tabelle 7: Vergleich der erreichten ΔOD und maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} von vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen

Die ΔOD Werte wurden nach 7,23 h Stunden gemessen. Im Bereich des exponentiellen Wachstums wurde μ_{\max} ermittelt.

Klon	$\Delta OD(t_{\text{end}})$	μ_{\max}
1	4,93	0,87
2	5,35	0,87
3	5,45	0,89
4	4,60	0,89

Die maximalen spezifischen Wachstumsraten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Der Klon 3 konnte mit 5,45 die höchste Optische Dichte erreichen, gefolgt von Klon 2 mit 5,35. Der Klon 4 erreichte am Ende der Kultivierung mit 4,60 die niedrigste optische Dichte. Es ergab sich ein deutlicher Unterschied von 0,85 OD -Einheiten zwischen den Klonen 3 und 4. Dies ergibt eine signifikante Abweichung von 15,6 %.

5.2.2 Plasmidausbeute aus vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen

Im Anschluss an die Batch-Kultivierung im Schüttelkolben wurde aus vier Klonen pDNA isoliert und quantifiziert. Die Messwerte und Ausbeuten sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Vergleich der spezifischen Plasmidausbeute aus vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen
Pellets wurden aufgeschlossen und die pDNA isoliert. Pro Klon wurden 2 Isolierungen durchgeführt. Der Gehalt im Eluat wurde in Doppelbestimmung quantifiziert. Die pDNA wurde in einem Gesamtvolumen von 80 μ L eluiert.

Klon	Isolierung	ΔOD Pellet	$m_{pDNA, \text{Pellet}}$ in ng	$ng_{pDNA}/\Delta OD$
1	1	4,32	3136	726
	2	4,32	2440	565
2	1	4,41	3292	747
	2	4,41	3088	701
3	1	4,32	2708	628
	2	4,32	2840	658
4	1	4,11	2720	663
	2	4,11	2464	600

Die höchste spezifische Ausbeute wurde durch Klon 2 mit 747 $ng_{pDNA}/\Delta OD$ -Einheit erzielt, gefolgt von Klon 1 mit 726 $ng_{pDNA}/\Delta OD$. Bei Klon 1 unterscheiden sich die Werte innerhalb der zwei Isolierungen jedoch deutlich. Grund hierfür könnte ein Fehler bei der Aufkonzentrierung sein. Die spezifischen Ausbeuten aus Klon 3 und 4 sind mit 600 $ng_{pDNA}/\Delta OD$ und 663 $ng_{pDNA}/\Delta OD$ vergleichbar.

5.2.3 Vergleich

In Bezug auf die maximale spezifische Wachstumsrate und die erreichte optische Dichte in der Batch-Kultivierung im Schüttelkolben unterscheiden sich die Klone 2 und 3 nicht signifikant voneinander. Im Hinblick auf die Plasmid-Ausbeute erzielten Klon 1 und 2 die höchsten Werte. Klon 1 erreichte jedoch im Vergleich zu Klon 2 eine niedrigere ΔOD , was sich negativ auf die Gesamtausbeute an Plasmid auswirken könnte. Auf Grundlage dieser Daten wurde der Klon 2 für weitere Versuche gewählt, die der Untersuchung des Einflusses von Glycerol- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die pDNA-Ausbeute dienen.

5.3 Ermittlung der Kultivierungsbedingungen für Vorkulturen

Zur Vermeidung überwachsender Vorkulturen, die im Anschluss als Inokulum für die Kultivierung im Bioreaktor dienen sollen, wurde die Optische Dichte und der spezifische pDNA-Gehalt nach einer Übernachtskultivierung im Schüttelkolben bei 20 °C und 28,5 °C untersucht. Dabei wurde zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher Inokulationsvolumina der Kryokultur (KK) überprüft.

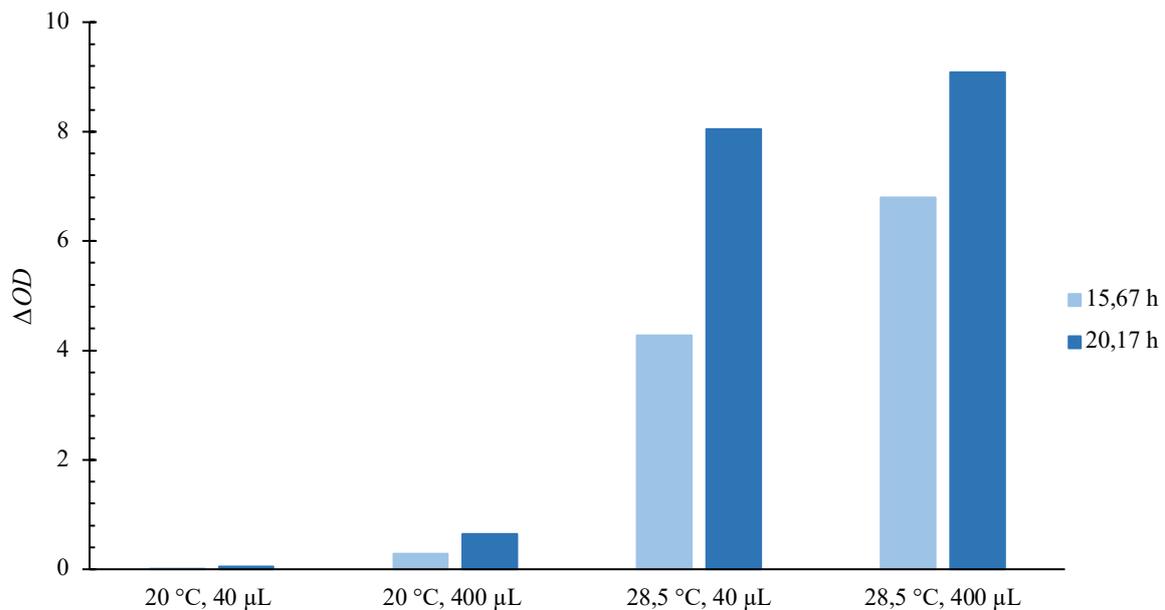


Abbildung 10: Optische Dichten der Übernachtskulturen bei 20 °C und 28,5 °C

Die ΔOD von vier 100 mL *E. coli* DH10B::pUC19 Übernachtskulturen wurde nach 15,67 Stunden und nach 20,17 Stunden gemessen. Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 20 °C und 28,5 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 rpm in Glycerolmedium inkubiert. Als Inokulum diente die Kryokultur von Klon 2. Für beide Temperaturen wurden Inokulationsvolumina von 40 μL und 400 μL verwendet.

Aus der Abbildung geht hervor, dass eine Temperatur von 20 °C die Wachstumsrate deutlich reduziert und ungeeignet für die Vorkultivierung ist. Da das Inokulationsvolumen, die Schüttelfrequenz und das Medium für beide Temperaturen gleich waren, ist davon auszugehen, dass die niedrige Temperatur das Wachstum stark beeinträchtigt hat.

Bei einer Temperatur von 28,5 °C nimmt die ΔOD bei einem V_{KK} von 40 μL zwischen 15,67 h und 20,17 h stärker zu als bei einem V_{KK} von 400 μL . Dies spricht für eine höhere Wachstumsrate bei einem V_{KK} von 40 μL in dem betrachteten Zeitraum. Da für den Einsatz als Inokulum für die Kultivierung im Bioreaktor möglichst eine Übernachtskultur verwendet werden soll, die sich noch nicht in der Wachstumslimitierung befindet, wäre ein V_{KK} von 400 μL ungeeignet.

In Anbetracht der ΔOD nach 15,67 h ist zu erkennen, dass sich die Übernachtskultur bei 28,5 °C und einem V_{KK} von 40 μL in dem ΔOD -Bereich befindet, bei dem sich die Schüttelkulturen bei 37 °C im gleichen Medium und bei der gleichen Schüttelfrequenz noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden (siehe Abbildung 8). Es wird aus diesem Grund angenommen, dass

die Zellen sich bei 28,5 °C ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer geringeren maximalen spezifischen Wachstumsrate befinden. Unter der Annahme, dass bei dieser Temperatur das Substrat der wachstumslimitierende Faktor ist, ist eine Übernachtkultivierung bei 28,5 °C, einer Schüttelfrequenz von 220 rpm und einem Inokulationsvolumen von 40 µL geeignet für die Nutzung als Inokulum für die Kultivierungen im Bioreaktor.

Tabelle 9: Vergleich der spezifischen Plasmidausbeute bei 40 µL und 400 µL Inokulationsvolumen nach 15,67 Stunden

Zellsuspension wurde auf eine ΔOD von 10 aufkonzentriert und durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden aufgeschlossen und die pDNA isoliert. Pro Probe wurden 2 Isolierungen durchgeführt. Die pDNA wurde zwei Mal in 40 µL Elutionspuffer eluiert. Der Gehalt im Eluat wurde in Doppelbestimmung quantifiziert. Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summe der Gehälter beider Elutionen.

V_{KK} in µL	Isolierung	$m_{pDNA, \text{gesamt}}$ in ng	Ausbeute in $ng_{pDNA}/\Delta OD$
40	1	1852	185
	2	4642	464
400	1	2788	278
	2	2828	283

Der Wert 464 $ng_{pDNA}/\Delta OD$ erscheint unrealistisch, weil die Kultur mit dem niedrigeren Inokulationsvolumen im Gegensatz zur Kultur mit einem Inokulationsvolumen von 400 µL nicht so fortgeschritten war und der gemessene Wert deutlich höher ist. Der Wert wird daher nicht berücksichtigt. Möglicherweise ist ein Fehler bei der Aufkonzentrierung der Zellpellets aufgetreten, was zu einer größeren Menge an Pellet und einem höheren pDNA-Gehalt führt. Ein Vergleich der spezifischen pDNA-Ausbeuten bei 28,5 °C mit denen der Kultivierungen bei 37 °C zeigt, dass diese signifikant geringer ausfallen (siehe Tabelle 8). Für die Verwendung als Vorkultur ist dies jedoch unbedenklich, da die Kultivierungstemperatur im Reaktor höher ist und ausreichend Nährstoffe für die pDNA-Synthese zur Verfügung stehen.

5.4 Überprüfung der Vergleichbarkeit zwischen den Reaktorsystemen CTA und CTB

Für die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die Plasmidausbeute in *E. coli* DH10B wurden zwei Reaktorsysteme, CTA und CTB genannt, verwendet. Um zu überprüfen, ob die darauffolgenden Kultivierungen in beiden Systemen miteinander vergleichbar sind, wurde *E. coli* DH10B::pUC19 parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Bedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10: Kultivierungsparameter zur Überprüfung der Vergleichbarkeit zwischen den Reaktorsystemen CTA und CTB

Die variablen Kultivierungsparameter ϑ , c_{Gly} und c_{YE} wurden in beiden Reaktoren gleich gewählt. Der pH-Wert wurde auf 7,0 geregelt. Der $p\text{O}_2$ -Wert wurde auf ein Minimum von 20 % geregelt.

Parameter	Wert
ϑ	37 °C
c_{Gly}	50 g L ⁻¹
c_{YE}	60 g L ⁻¹

5.4.1 Wachstumsverhalten

Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der ΔOD verfolgt. Zudem wurde der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration c_{XL} über die Zeit aufgenommen. Der Verlauf beider Variablen ist für den CTA und CTB in der folgenden Abbildung dargestellt.

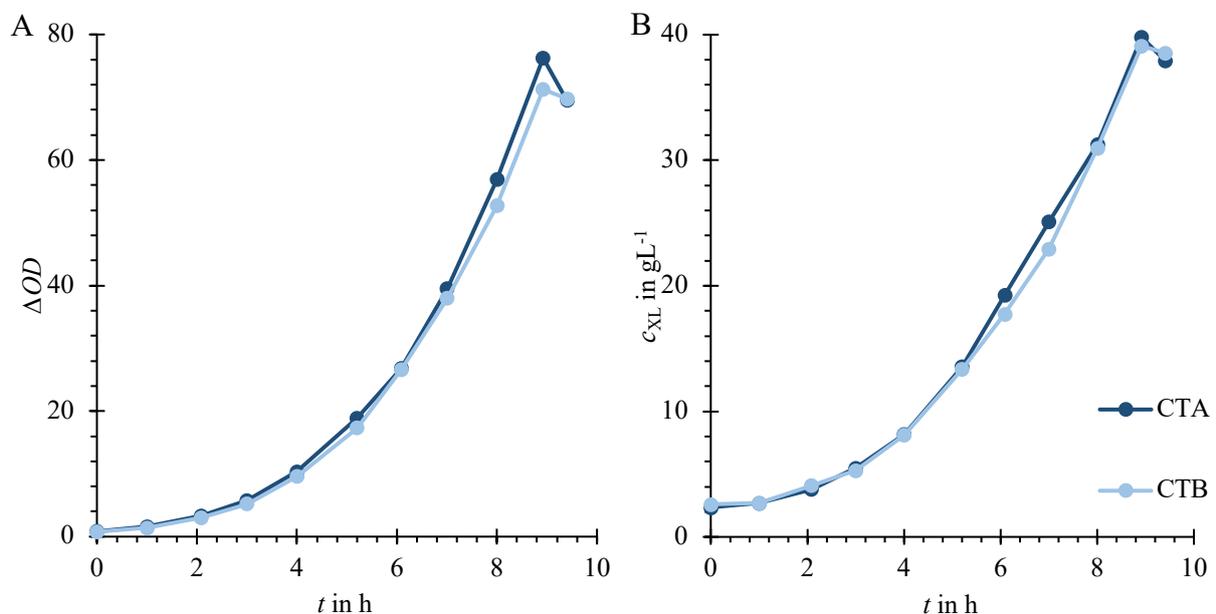


Abbildung 11: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) im CTA und CTB bei gleichen Kultivierungsbedingungen

E. coli DH10B::pUC19 wurde bei $\vartheta = 37$ °C, $c_{\text{Gly}} = 50$ g L⁻¹, $c_{\text{YE}} = 60$ g L⁻¹, pH = 7,0 und $p\text{O}_2 \geq 20$ % in zwei Reaktorsystemen des gleichen Typs kultiviert.

Der Verlauf der ΔOD und der Biotrockenmassekonzentration unterscheidet sich zwischen den beiden Reaktorsystemen nicht signifikant. Beide Kulturen starten mit einer exponentiellen Wachstumsphase. Durch die Verwendung der Vorkulturen konnten lag-Phasen vermieden werden. Das Wachstum verlangsamt sich nach ungefähr 4 Stunden, bis eine maximale ΔOD von 76,25 im CTA und eine maximale ΔOD von 71,24 im CTB erreicht wird. Zwischen 8,92 h und 9,40 h besteht ein leichter Rückgang in der ΔOD . Eventuell ist hier die Lysephase eingetreten, wodurch die verstärkte Schaumbildung am Ende der Kultivierungen in den Reaktoren erklärt werden könnte. Die finalen Biotrockenmassekonzentrationen betragen $37,95 \text{ g L}^{-1}$ im CTA und $38,55 \text{ g L}^{-1}$ im CTB. Sie weichen nur um 1,56 % voneinander ab. Die ΔOD betrug nach Inokulation im CTA 0,83 und im CTB 0,78. Gründe für die geringe Abweichung in der Biotrockenmassekonzentration könnten geringfügig abweichende Substratkonzentrationen, verschiedene Optische Dichten nach Inokulation, Messfehler in der Bestimmung der c_{XL} oder unterschiedliche Verdunstungsraten in den Reaktoren sein.

Einen weiteren Vergleich liefert die maximale spezifische Wachstumsrate beider Zellkulturen. Die Bestimmung von μ_{\max} ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

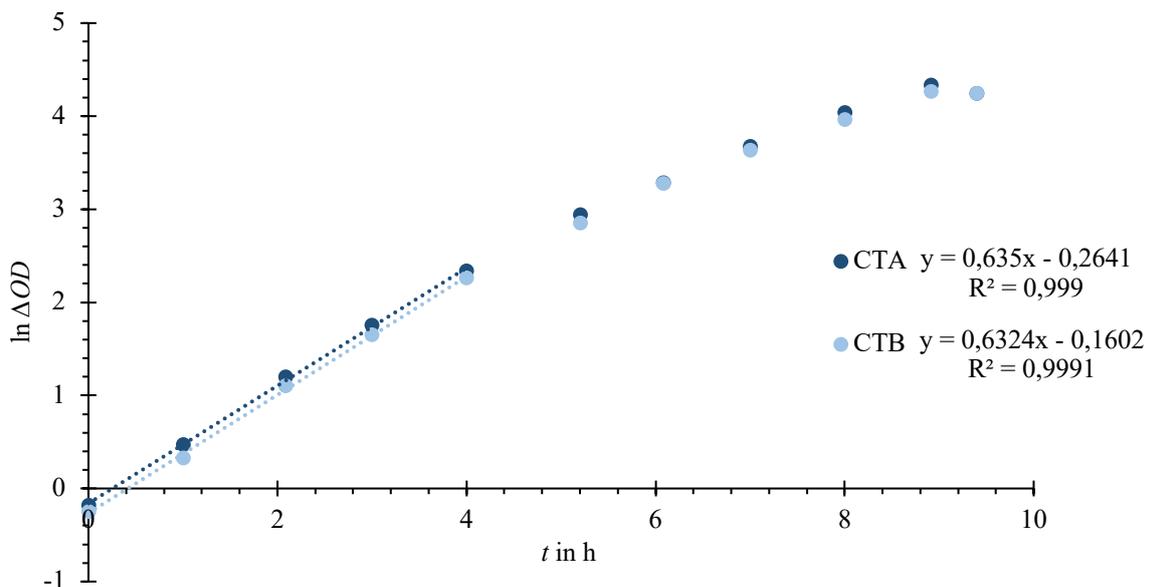


Abbildung 12: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} im CTA und CTB unter gleichen Bedingungen

Abgebildet sind die Regressionsgeraden über den linearen Bereich der logarithmierten ΔOD und die zugehörigen Geradengleichungen sowie Bestimmtheitsmaße.

Die maximalen spezifischen Wachstumsraten liegen mit $0,635 \text{ h}^{-1}$ im CTA und $0,632 \text{ h}^{-1}$ im CTB sehr nahe beieinander. Die Wachstumsgeschwindigkeit verringert sich in beiden Reaktoren zeitgleich nach 4 h.

5.4.2 Substratverbrauch

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf des Substratverbrauchs bei gleichen Kultivierungsbedingungen in zwei Reaktorsystemen dargestellt.

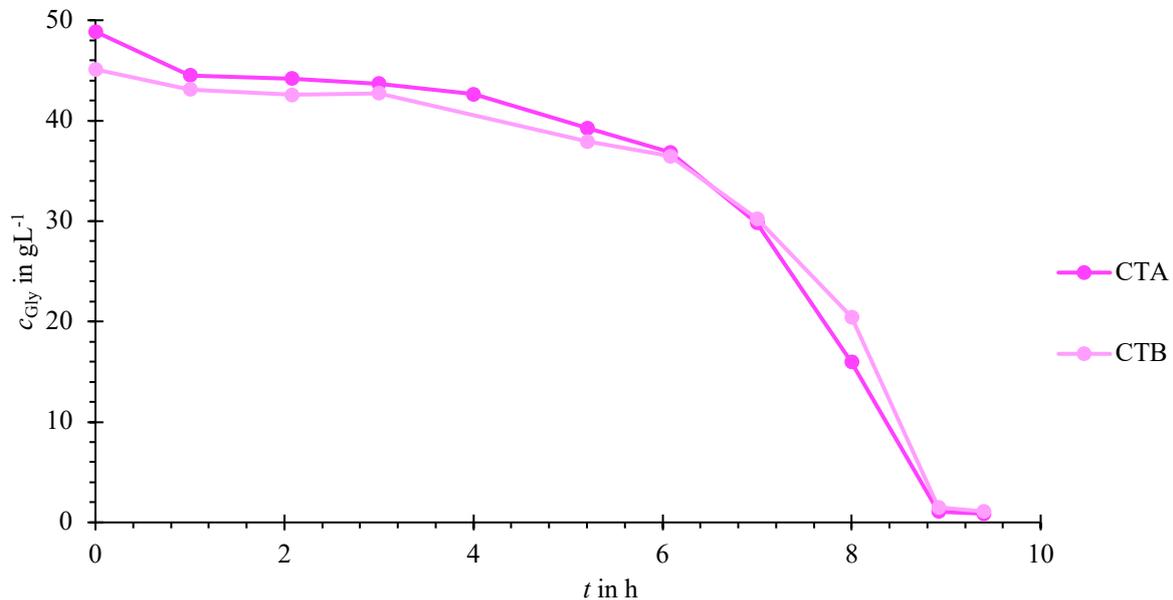


Abbildung 13: Abnahme der Glycerinkonzentration unter identischen Kultivierungsbedingungen im CTA und CTB

Das Medium wurde für beide Reaktoren mit einer Glycerinkonzentration von 50 g L^{-1} angesetzt. Die Glycerinkonzentration wurde durch eine enzymatische UV-Bestimmung ermittelt.

Die Anfangskonzentrationen weichen deutlich voneinander ab. Das abrupte Sinken der Glycerinkonzentration von t_0 bis 1 h im CTA ist auffällig. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Prozessen zu gewährleisten, wurden die Reaktoren mit Medium aus dem gleichen Ansatz befüllt. Ein Fehler im Ansatz des Mediums, z.B. bei der Einwaage des Glycerins, ist somit ausgeschlossen. Allerdings ist es möglich, dass die Konzentrationen durch Volumenänderungen abweichen, da nach der *in-situ* Sterilisierung der Kondensatverlust ausgeglichen wurde. Weil das Substrat zu Beginn durch die geringe Zellkonzentration langsam verbraucht wird, ist zu vermuten, dass der wahre Wert bei dem des CTB liegt. Die Abweichung könnte durch die Messabweichung des Spektrophotometers, welches für die enzymatische Bestimmung der Glycerinkonzentration verwendet wurde oder durch einen Fehler in der Durchführung begründet werden. Mit dem Enzym-Kit lassen sich Glycerinkonzentrationen im Bereich von $8\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$ bestimmen. Möglicherweise ist ein Fehler in der Verdünnung der Probe unterlaufen.

Insgesamt verläuft die Abnahme der Glycerinkonzentration in beiden Reaktoren gleich. Die Kurven geben den theoretischen Verlauf der Substratabnahme wieder. Sie sind zunächst flach und sinken mit zunehmender Zellkonzentration abrupter. Die Messpunkte liegen mit geringen Abständen aneinander. Das Substrat ist am Ende der Kultivierung in beiden Reaktoren

aufgebraucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass in beiden Bioreaktoren zu keinem Zeitpunkt die Substrataufnahme der Zellen durch technisch bedingte Veränderungen in den Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise eine mangelhafte Sauerstoffversorgung oder Veränderungen in der Temperatur und im pH-Wert, beeinträchtigt wurde.

5.4.3 Verlauf der on-line Messdaten

Mit dem Programm MFCS/win wurden on-line Messdaten kontinuierlich aufgezeichnet. Der Verlauf im CTA und CTB unter identischen Kultivierungsbedingungen ist auf den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Kultivierungsplots sind zusätzlich in Anhang B dargestellt.

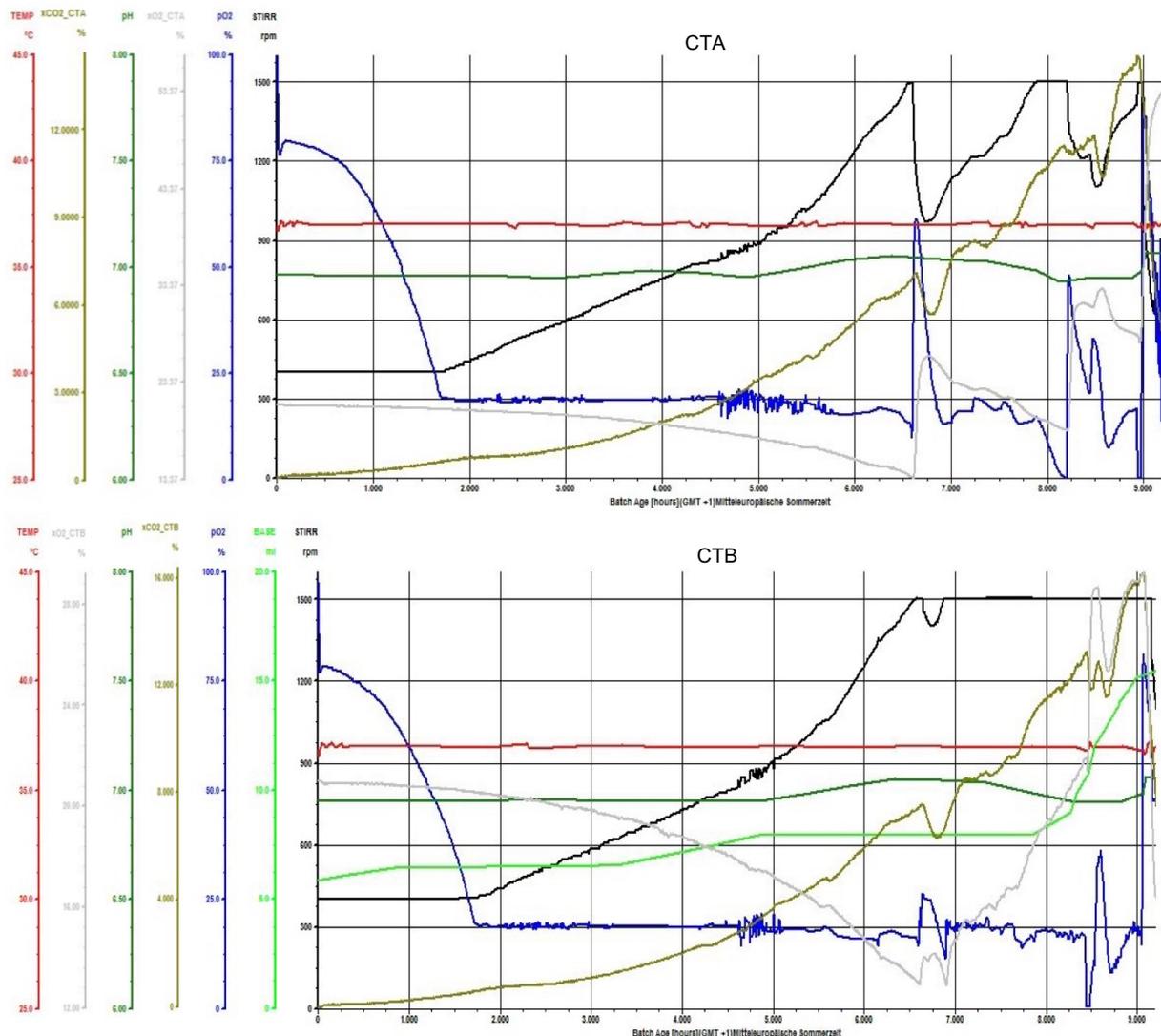


Abbildung 14: Kultivierungsplots der on-line Messdaten bei identischen Kultivierungsbedingungen in zwei Reaktorsystemen

Dargestellt ist der Verlauf von Rührerdrehzahl (schwarz), Basenverbrauch (hellgrün), pO_2 (blau), Sauerstoffstoffmengenanteil x_{O_2} (grau) und Kohlendioxidstoffmengenanteil x_{CO_2} (grünbraun) im Abgas, pH (grün) und Temperatur (rot) im CTA (oben) und CTB (unten) für die Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19 in zwei Reaktorsystemen.

Der pO_2 -Wert erreicht in beiden Kultivierungen ungefähr zum selben Zeitpunkt einen Sollwert von 20 %. Im Anschluss wurde der pO_2 -Wert über die Rührerdrehzahl geregelt, was in ihrem

kontinuierlichen Anstieg zu erkennen ist. Nach 6 h Prozesszeit wird das pO_2 -Signal unruhiger. Ausreißer im Sauerstoffpartialdruck entstehen durch die Zugabe von Antischaummittel sowie durch die Regelung des pO_2 . Im CTB verursacht dies durch den pO_2 -Kaskadenregler kleinere Ausreißer. Analog dazu ist in der Rührerdrehzahl des CTB ein Ausreißer nach unten durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks zu erkennen. Die großen Ausreißer im pO_2 -Wert des CTAs entstehen durch die manuelle Erhöhung von F_{G,O_2} bei Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl. Analog dazu sind auch hier die Ausreißer in der Rührerdrehzahl stärker zu sehen. Der Anstieg des pH-Wertes verläuft in beiden Kultivierungen ebenfalls nahezu identisch und lässt sich mit den Schwankungen im pO_2 -Wert begründen, die vermutlich zu Sauerstofflimitierungen bei der erhöhten Zelldichte nach 5,2 h ($13,55 \text{ g L}^{-1}$ im CTA und $13,35 \text{ g L}^{-1}$ im CTB) und folglich zur Produktion von Acetat führten. Das Ende der Kultivierung erkennt man durch den plötzlichen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks, der in beiden Reaktoren zeitgleich mit dem vollständigen Verbrauch des Glycerins einhergeht (siehe Abbildung 13).

5.4.4 Plasmidausbeute

In der folgenden Tabelle sind die Plasmidkonzentrationen c_{pDNA} und -ausbeuten aus beiden Kultivierungen zusammengefasst.

Tabelle 11: Vergleich der Plasmidausbeute bei gleichen Kultivierungsbedingungen im CTA und CTB
 Zellsuspension wurde auf eine ΔOD von 10 aufkonzentriert und durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden aufgeschlossen und die pDNA isoliert. Pro Reaktorprobe wurden 2 Isolierungen durchgeführt. Die pDNA wurde zwei Mal in $40 \mu\text{L}$ Elutionspuffer eluiert. Der Gehalt im Eluat wurde in Doppelbestimmung quantifiziert. Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summe der Gehälter beider Elutionen.

Bioreaktor	Isolierung	c_{pDNA} in mg L^{-1}	Ausbeute in $\text{mg}_{pDNA}/\text{g}_{BTM}$	Gesamtausbeute in mg
CTA	1	67,0	1,68	201
	2	62,7	1,58	188
CTB	1	63,2	1,62	190
	2	59,0	1,51	177

Die Werte befinden sich vergleichbaren Bereich. Der höchste und niedrigste Wert der pDNA-Konzentration weichen um 11,9 % voneinander ab. In der spezifischen Ausbeute besteht eine Abweichung von 4,2 %. Angesichts der Ungenauigkeit in dem Verfahren zur Plasmidisolierung sind die Abweichungen akzeptabel.

5.4.5 Einschätzung der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit

Die Prozessverläufe und analytischen Ergebnisse zeigen eine sehr gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit unabhängig vom eingesetzten Reaktorsystem. Die spezifischen Wachstumsraten sind nahezu identisch. Unterschiede in der Optischen Dichte und

Biotrockenmassekonzentration am Ende der Fermentation wurden durch externe Faktoren verursacht, wie unterschiedliche Zelldichten im Inokulum und möglicherweise unterschiedliche Substratkonzentrationen. Auch im Hinblick auf die Plasmidproduktion ergaben sich vergleichbare Werte mit geringen Abweichungen.

5.5 Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen

Für die Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19 dient Glycerin (Gly) als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt (YE) als Stickstoffquelle. Diese Komponenten sind essenziell für das Wachstum der Bakterien und die Synthese von Plasmid-DNA.

Im folgenden Abschnitt werden die Auswirkungen unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen (c_{Gly} und c_{YE}) im Kultivierungsmedium vorgestellt und diskutiert.

5.5.1 Wachstum

Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der ΔOD verfolgt. Zudem wurde der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration c_{XL} aufgenommen. Der Verlauf beider Wachstumsgrößen ist bei unterschiedlichen Kombinationen aus der Glycerin- und Hefeextraktkonzentration in der Abbildung 15 dargestellt.

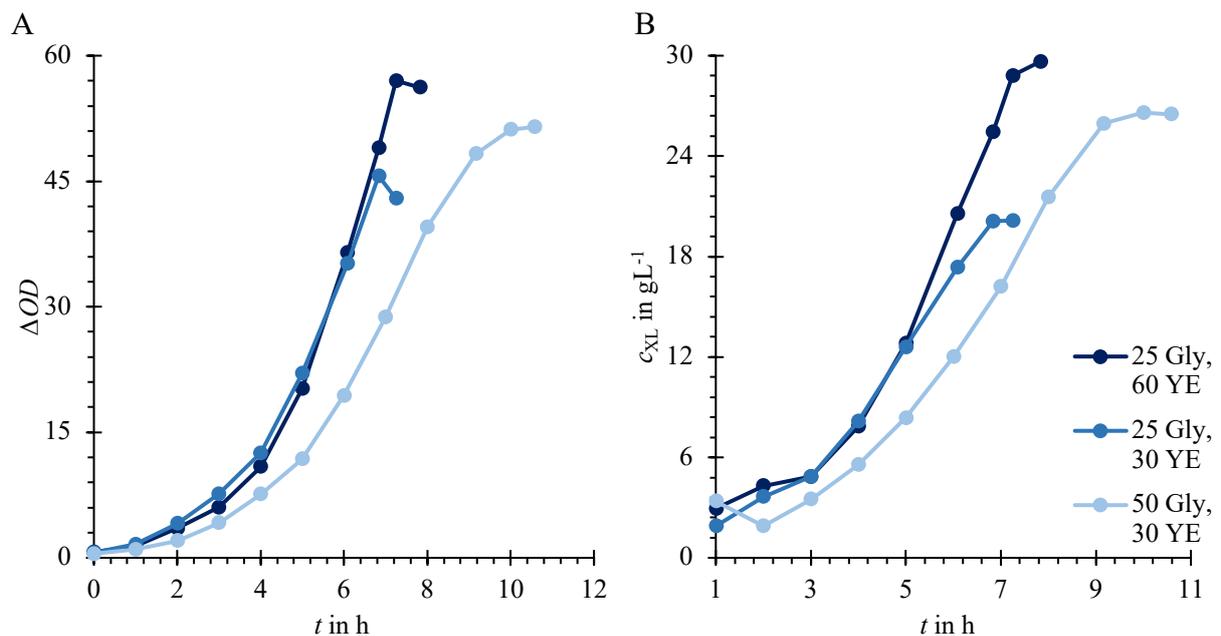


Abbildung 15: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) bei unterschiedlichen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen

E. coli DH10B::pUC19 wurde bei $\theta = 37$ °C, $\text{pH} = 7,0$, $pO_2 \geq 20$ % kultiviert.

Die Kultivierungen beginnen mit einer exponentiellen Wachstumsphase. Bereits hier sind deutliche Unterschiede im Wachstumsverlauf durch die verschiedenen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen zu erkennen. Bei Halbierung der c_{Gly} auf 25 g L^{-1} und c_{YE} auf 30 g L^{-1} verkürzt sich die Prozesszeit auf 7 h und es wird lediglich eine Biotrockenmassekonzentration von $20,15 \text{ g L}^{-1}$ erreicht (siehe Abschnitt 5.4). In den Kulturen, die ein Medium mit einer

Glycerinkonzentration von 25 g L^{-1} erhalten haben, verhalten sich die Biotrockenmassekonzentrationen zunächst ähnlich, besonders zwischen 3 h und 5 h. Darauffolgend nimmt die Biotrockenmassekonzentration bei 60 g L^{-1} Hefeextrakt rapider zu. Hier entsteht durch den hohen Anteil an Hefeextrakt, der essenzielle Grundbausteine für die Biosynthese wie Vitamine, Aminosäuren und Peptide zur Verfügung stellt, die höchste Biotrockenmassekonzentration. Auffällig ist, dass die c_{XL} und ΔOD der Kultur bei 50 g L^{-1} Glycerin weniger schnell ansteigen. Die Kultur, welche bei 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt wächst, ist ihr ungefähr 2 h voraus.

Die Biotrockenmassekonzentration nimmt bei 50 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt mit 9 h so lange zu, wie bei der gleichen Glycerinkonzentration und 60 g L^{-1} Hefeextrakt, erreicht jedoch mit $26,50 \text{ g L}^{-1}$ eine rund 30 % geringere Biotrockenmassekonzentration (siehe Abbildung 11).

Die Bestimmung der maximal spezifischen Wachstumsraten, dargestellt in Abbildung 16, bietet Informationen über die Wachstumsgeschwindigkeit beim Einsatz von verschiedenen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen.

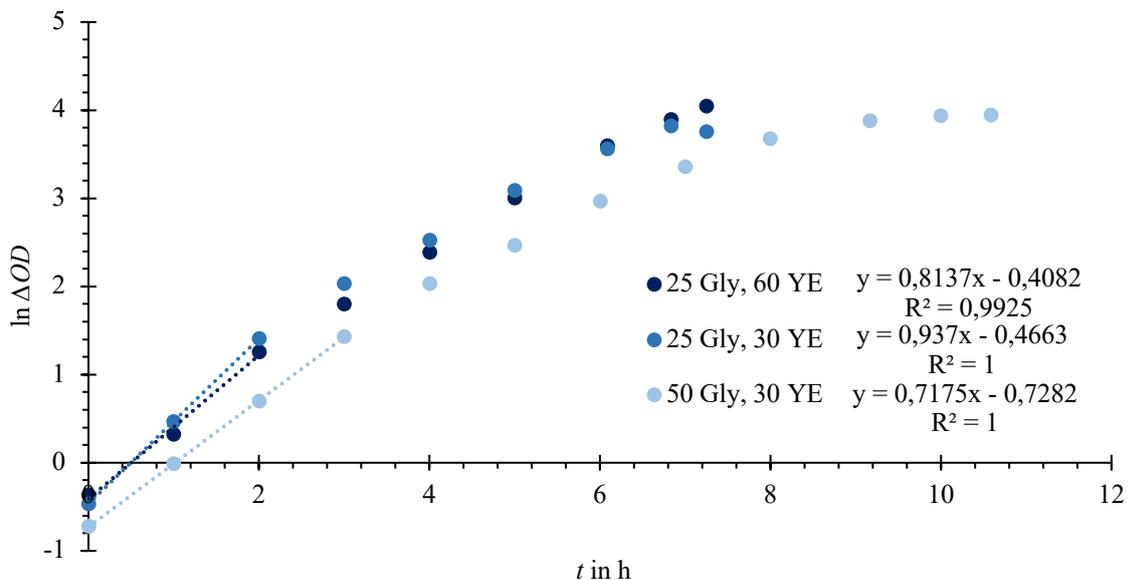


Abbildung 16: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} bei verschiedenen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen

Abgebildet sind die Regressionsgeraden über den linearen Bereich der logarithmierten ΔOD und die zugehörigen Geradengleichungen sowie Bestimmtheitsmaße.

Mit 25 g L^{-1} Glycerin wachsen die Zellen unabhängig von der Hefeextraktkonzentration 2 h lang mit der maximalen spezifischen Wachstumsrate. Im Vergleich dazu befinden sich die Zellen bei einer Glycerinkonzentration von 50 g L^{-1} eine Stunde länger in dieser Wachstumsphase. Die maximalen spezifischen Wachstumsraten fallen deutlich unterschiedlich aus. Sowohl die Erhöhung der Hefeextraktkonzentration als auch eine Steigerung der Glycerinkonzentration führen zu einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate um rund $0,1 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,2 \text{ h}^{-1}$.

Die diskutierten Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 12: Vergleich der erreichten ΔOD , μ_{\max} und c_{XL} von *E. coli* DH10B::pUC19 bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung

Zusammengefasst sind ΔOD und c_{XL} am Ende der Kultivierungen. Im Bereich des exponentiellen Wachstums wurde μ_{\max} ermittelt.

c_{Gly} in $g L^{-1}$	c_{YE} in $g L^{-1}$	$\Delta OD(t_{end})$	μ_{\max} in h^{-1}	$c_{XL}(t_{end})$ in $g L^{-1}$
25	30	45,63	0,937	20,15
25	60	57,01	0,814	29,65
50	30	51,50	0,714	26,50

Aus den Daten geht hervor, dass bei einer erhöhten Hefeeextraktkonzentration in einer kürzeren Prozesszeit am meisten Biomasse produziert werden kann. Eine Erhöhung der Glycerinkonzentration führt zu niedrigeren Wachstumsraten und ebenfalls mehr Zellmasse. Die Konzentrationserhöhung beider Bestandteile äußert sich in einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate. Eine größere Verfügbarkeit beider Bestandteile würde sich in einer verlängerten Prozesszeit durch Verringerung der Wachstumsraten und Erhöhung der Biomasseproduktion äußern, wie bereits in Abschnitt 5.4.1 gezeigt.

5.5.2 Substratverbrauch

Der Verbrauch des Glycerins bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

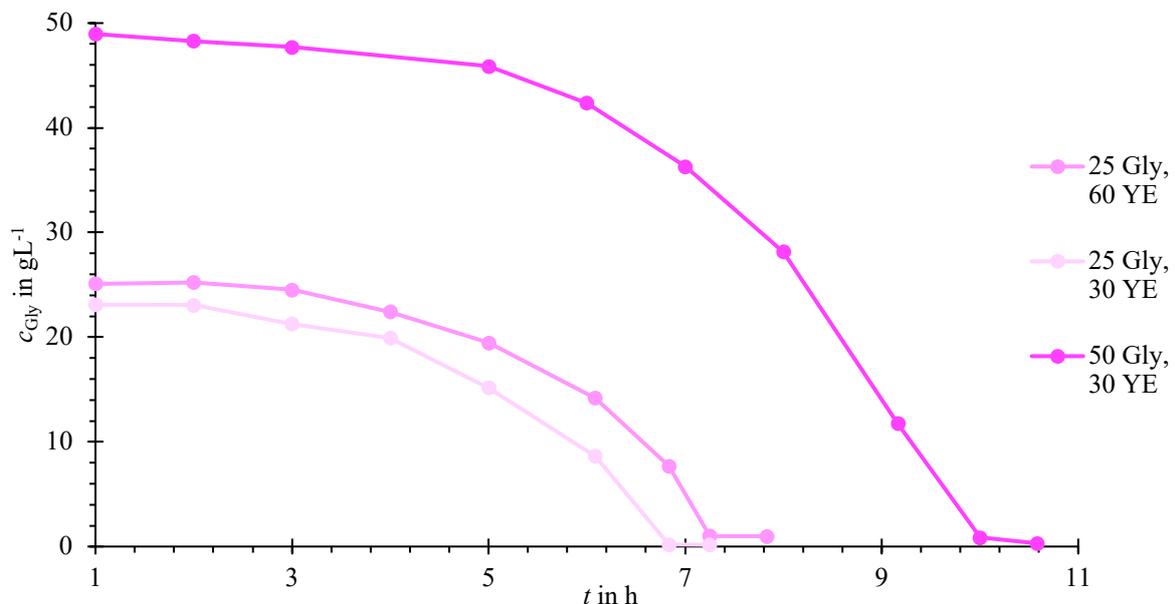


Abbildung 17: Abnahme der Glycerinkonzentration bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung

Der Glycerinverbrauch wurde bei Wachstum in Medien mit $c_{Gly} = 25 g L^{-1}$ und $c_{YE} = 60 g L^{-1}$, $c_{Gly} = 25 g L^{-1}$ und $c_{YE} = 30 g L^{-1}$, $c_{Gly} = 50 g L^{-1}$ und $c_{YE} = 30 g L^{-1}$ untersucht. Die Glycerinkonzentration wurde durch eine enzymatische UV-Bestimmung ermittelt.

Es besteht ein leichter Unterschied in den Anfangskonzentrationen bei 25 g L^{-1} . Der Unterschied könnte durch einen Fehler im Ansatz des Mediums, den Ausgleich des Kondensatverlusts nach der *in-situ* Sterilisierung, bei der Verdünnung der Probe oder in der Durchführung der enzymatischen Glycerinbestimmung entstanden sein.

Anhand des größer werdenden Abstands zwischen den Messpunkten wird deutlich, dass bei 25 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt das Glycerin schneller verbraucht wird als bei 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt. Da hier die Zellkonzentration stärker zunimmt, sinkt die Glycerinkonzentration schneller. Je höher die maximal spezifische Wachstumsrate ist, desto früher wird das Glycerin aufgrund der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit verbraucht.

5.5.3 Verlauf der on-line Messdaten

Mit dem Programm MFCS/win wurden on-line Messdaten kontinuierlich aufgezeichnet. Der Verlauf ist in der Abbildung 18 dargestellt. Die Kultivierungsplots sind zusätzlich in Anhang B dargestellt.

Der pO_2 -Wert ist bei einer Glycerinkonzentration von 25 g L^{-1} und einer Hefeextraktkonzentration von 30 g L^{-1} am frühesten auf einen Sollwert von 20 % gesunken. Da hier die maximale spezifische Wachstumsrate am höchsten ist, nimmt die Zellkonzentration (siehe Abbildung 15) und folglich der Sauerstoffverbrauch zunächst am stärksten zu und der Sauerstoffpartialdruck ab. Die maximale Rührerdrehzahl wurde hier nach 6 h erreicht und die Zumischung von Sauerstoff zur Begasungsluft setzte ein, um die Sauerstoffversorgung aufrechtzuerhalten. Im Vergleich dazu erfolgte dies bei 50 g L^{-1} Glycerin aufgrund der niedrigeren μ_{\max} eine Stunde später. Auffallend ist, dass der Basenverbrauch bei 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt trotz der höchsten erreichten Zellkonzentration innerhalb einer kürzeren Prozesszeit am niedrigsten ist. Er steigt bereits zu Beginn des Prozesses kontinuierlich an. Bei den Kultivierungen mit 30 g L^{-1} Hefeextrakt steigt der Basenverbrauch abrupt an. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei einer hohen Konzentration an komplexen Inhaltsstoffen im Medium die Acetatproduktion früher einsetzt. Der Verlauf des Basenverbrauchs stimmt mit der Kultivierung bei 50 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt überein (siehe Abbildung 14). Die Kurvenverläufe lassen vermuten, dass bei niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeiten und Hefeextraktkonzentrationen die Acetatbildung und somit der Basenverbrauch stärker zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt. Die Acetatbildung könnte durch Sauerstofflimitierungen verursacht werden, welche durch die hohe Zelldichte auftreten können. Der Sauerstoffbedarf steigt erheblich an und durch eine gegenseitige Behinderung der Zellen kann der Sauerstoff möglicherweise nicht effektiv an alle Zellen transportiert werden.

Die diskutierten Verläufe der on-line Messdaten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

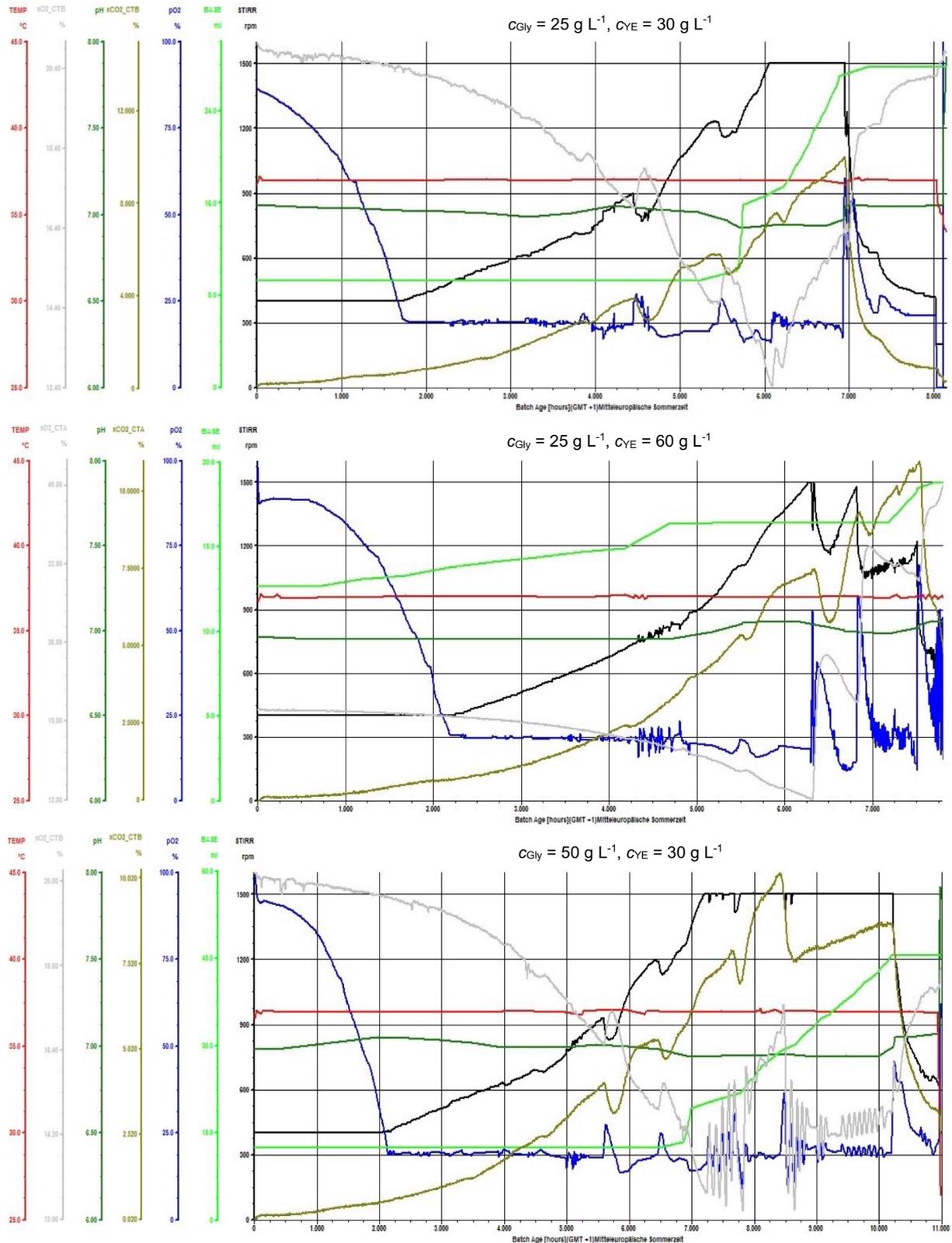


Abbildung 18: Kultivierungsplots der on-line Messdaten beim Einsatz unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextrakt-konzentrationen

Dargestellt ist der Verlauf von Rührerdrehzahl (schwarz), Basenverbrauch (hellgrün), pO_2 (blau), Sauerstoffstoffmengenanteil (grau), Kohlendioxidstoffmengenanteil (grünbraun), pH (grün) und Temperatur (rot) bei Konzentrationen von 25 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt (oben), 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt (Mitte) sowie 50 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt (unten).

5.5.4 Einfluss von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen auf die Plasmidausbeute

In der folgenden Tabelle sind die Plasmidkonzentrationen und -ausbeuten nach dem Einsatz verschiedener Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen im Kultivierungsmedium zusammengefasst.

Tabelle 13: Vergleich der Plasmidausbeute bei unterschiedlichen Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen

Zellsuspension wurde auf eine ΔOD von 10 aufkonzentriert und durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden aufgeschlossen und die pDNA isoliert. Pro Probe wurden 2 Isolierungen durchgeführt. Die pDNA wurde zwei Mal in 40 μL Elutionspuffer eluiert. Der Gehalt im Eluat wurde in Doppelbestimmung quantifiziert. Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summe der Gehälter beider Elutionen.

c_{Gly} in g L^{-1}	c_{YE} in g L^{-1}	Isolierung	c_{pDNA} in mg L^{-1}	spezifische Ausbeute in $\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$	Gesamtausbeute in mg
25	30	1	42,0	2,08	126
		2	37,7	1,87	113
25	60	1	51,4	1,74	154
		2	47,8	1,61	143
50	30	1	50,0	1,89	150
		2	46,4	1,75	139

Für höhere spezifische Ausbeuten müsste die Kopienzahl innerhalb der Zelle erhöht werden. Dies wird durch reduzierte Wachstumsraten begünstigt [1]. Vermutlich können dadurch die Nährstoffe des Mediums nicht nur überwiegend für die Zellsynthese, sondern auch für den Erhalt und die Replikation von pDNA eingesetzt werden. Da die Zelldichte der Kultur, welche mit 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} wächst, am schnellsten ansteigt (siehe 5.5.1), ist die spezifische Wachstumsrate über den Prozess am höchsten. Dies spiegelt sich in der spezifischen Plasmidausbeute wider, welche zwischen einem Bereich von 1,61 $\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ bis 1,74 $\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ liegt und im Vergleich am niedrigsten ausgefallen ist. Bei der Kultur mit der geringsten Wachstumsgeschwindigkeit (50 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt) ist die spezifische Ausbeute hingegen erhöht. Da die Kultur mit 60 g L^{-1} Hefeextrakt eine höhere ΔOD erreicht, liegt die Plasmidkonzentration und damit die Gesamtausbeute im vergleichbaren Bereich. Weil die Kultur mit 25 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt zur niedrigsten Zellkonzentration führt, fällt die Gesamtausbeute mit 113 mg und 126 mg um Einiges geringer aus. Allerdings ist der spezifische Gehalt am höchsten, obwohl die Zellen rapid wachsen. Möglicherweise stellen die niedrigeren Konzentrationen bessere Bedingungen für den Erhalt des Plasmids dar.

5.6 Einfluss der Kultivierungstemperatur

Da die Kopienzahl des pUC19 Plasmids laut Hersteller temperaturabhängig ist [9], wurde der Einfluss auf die Plasmidausbeute bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen untersucht. Da bisher bei 37 °C kultiviert wurde, wurde eine niedrigere Temperatur, 35 °C, und zwei höhere Temperaturen, 39 °C und 41 °C, gewählt.

5.6.1 Wachstum

Der Verlauf der Wachstumsvariablen ΔOD und c_{XL} bei 35 °C, 39 °C und 41 °C ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

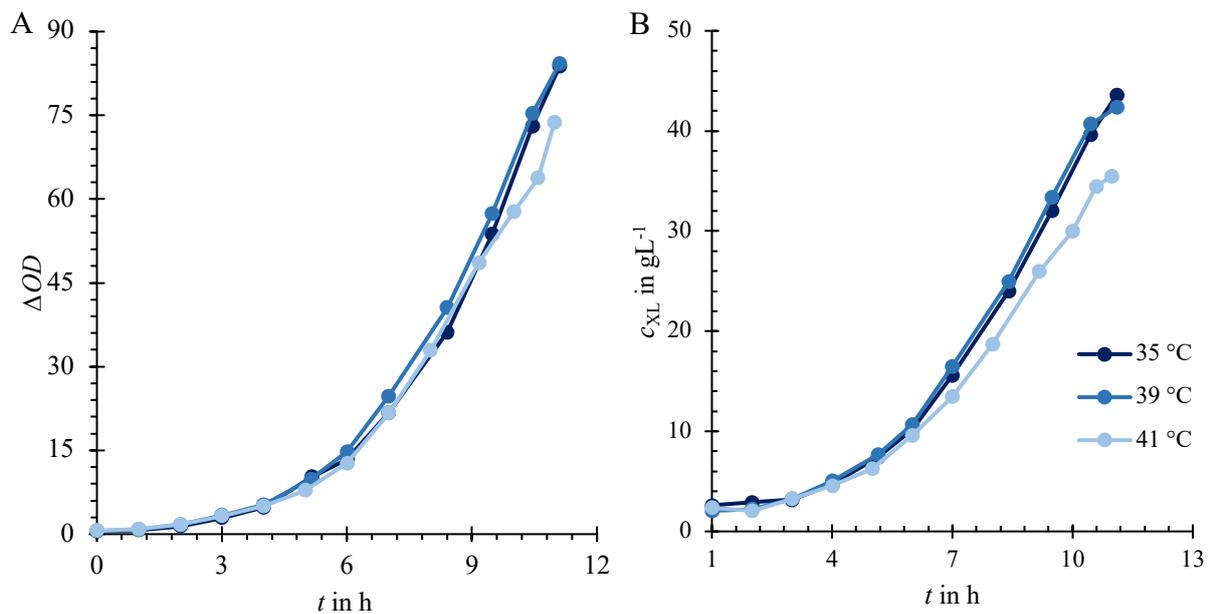


Abbildung 19: Verlauf der ΔOD (A) und Biotrockenmassekonzentration c_{XL} (B) bei 35 °C, 39 °C und 41 °C
E. coli DH10B::pUC19 wurde bei $c_{Gly} = 50 \text{ g L}^{-1}$, $c_{YE} = 60 \text{ g L}^{-1}$, $pH = 7,0$ und $pO_2 \geq 20 \%$ kultiviert.

Der Beginn der Kultivierungen verläuft bei allen Temperaturen bis 4,2 h sehr ähnlich. Ab da verlangsamt sich die Zunahme der Zellkonzentration bei 41 °C. Bei 35 °C und 39 °C verlaufen die Kurven der Biotrockenmassekonzentration trotz einer Temperaturdifferenz von 4 °C nahezu identisch. Die ΔOD und c_{XL} erreichen bei 35 °C und 39 °C sehr ähnliche Endwerte. Die Biotrockenmassekonzentrationen betragen am Ende der Fermentationen $43,60 \text{ g L}^{-1}$ bei 35 °C und $42,35 \text{ g L}^{-1}$ bei 39 °C. Bei 41 °C scheint die Biomasseproduktion beeinträchtigt, hier wird eine Biotrockenmassekonzentration von lediglich $35,50 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Aufgrund der sonst identischen Kultivierungsbedingungen scheint die Temperatur bei 41 °C der wachstumshemmende Faktor zu sein. Wahrscheinlich wird aus dem Substrat mehr Energie für metabolische Stoffwechselaktivitäten verwendet. Da der Hersteller eine Erhöhung der Kopienzahl bei 42 °C berichtet [9], wäre eine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch die pDNA-Produktion möglich.

Die folgende Abbildung stellt die maximalen spezifischen Wachstumsraten bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen dar.

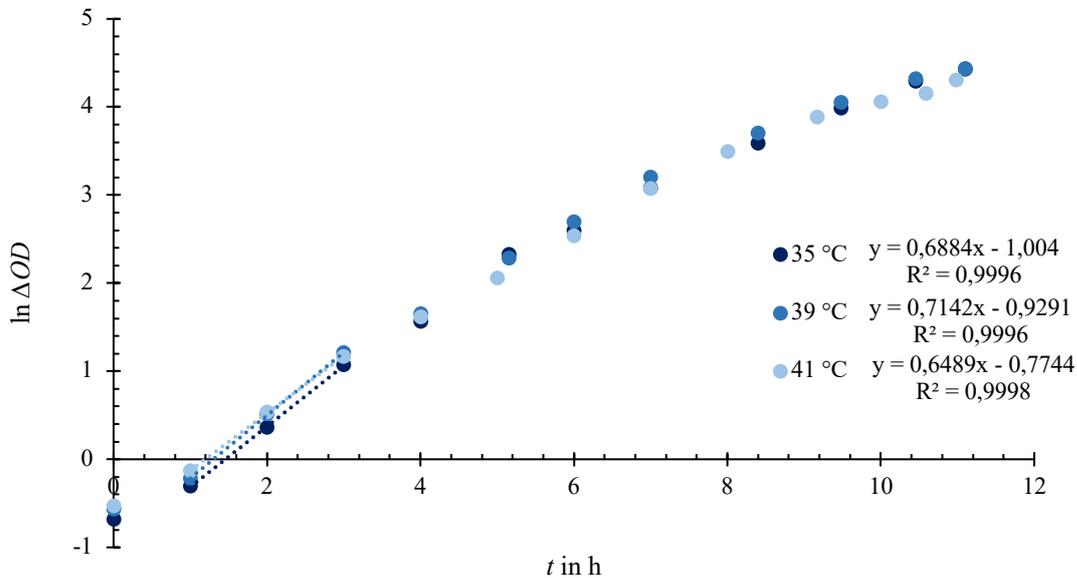


Abbildung 20: Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} bei 35 °C, 39 °C und 41 °C
Abgebildet sind die Regressionsgeraden über den linearen Bereich der logarithmierten ΔOD und die zugehörigen Geradengleichungen sowie Bestimmtheitsmaße.

Im Gegensatz zu den Kultivierungen bei Standardbedingungen (Abschnitt 5.4.1) oder variierten Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen im Medium (Abschnitt 5.5.1) fällt hier auf, dass die exponentielle Wachstumsphase mit der maximalen spezifischen Wachstumsrate bei der Veränderung der Kultivierungstemperatur auf 35 °C, 39 °C und 41 °C erst nach einer Stunde beginnt. Die Kulturen starten mit einer lag-Phase. Die Vorkulturen müssen sich , anders als bei 37 °C, vermutlich zunächst an die Temperaturen adaptieren.

Die diskutierten Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 14: Vergleich der erreichten ΔOD , μ_{\max} und c_{XL} von *E. coli* DH10B::pUC19 bei 35 °C, 39 °C und 41 °C

Zusammengefasst sind die ΔOD und c_{XL} am Ende der Fermentationen. Im Bereich des exponentiellen Wachstums wurde μ_{\max} ermittelt.

ϑ in °C	$\Delta OD(t_{\text{end}})$	μ_{\max} in h^{-1}	$c_{XL}(t_{\text{end}})$ in g L^{-1}
35	83,75	0,688	43,60
39	84,25	0,714	42,35
41	73,75	0,649	35,50

5.6.2 Substratverbrauch

Der Verbrauch des Glycerins bei 35 °C, 39 °C und 41 °C ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

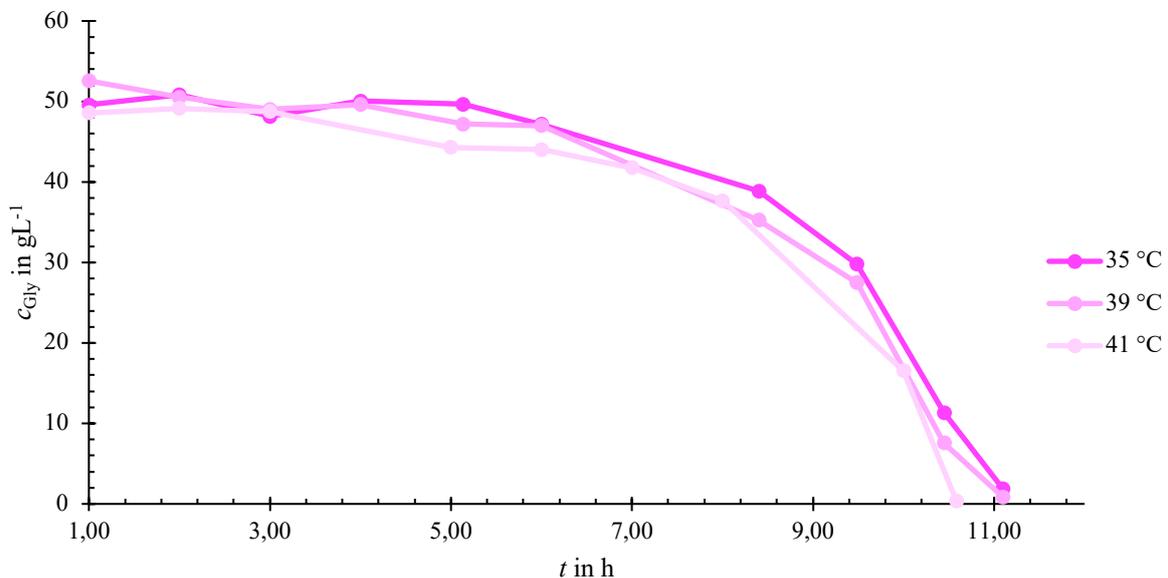


Abbildung 21: Abnahme der Glycerinkonzentration bei 35 °C, 39 °C und 41 °C

Dargestellt ist der Glycerinverbrauch bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen. Die Medien wurden für alle Temperaturen mit einer Glycerinkonzentration von 50 g L⁻¹ angesetzt.

Die Kurven haben insbesondere bei 39 °C und 41 °C einen eher schwankenden Verlauf. Begründet werden könnte dies durch mögliche Fehler in der Verdünnung der Proben oder in der Durchführung der enzymatischen Bestimmung. Trotz der Schwankungen zeigen die Kurven den charakteristischen Verlauf des Substratverbrauchs bei Batch-Kultivierungen.

Die Anfangskonzentration weicht bei 39 °C ab. Da die Kurve trotz eines normalerweise anfänglich niedrigen Verbrauchs innerhalb von einer Stunde fällt, wird angenommen, dass es sich hier um einen Ausreißer handelt. Grund hierfür könnte ein Fehler in der Verdünnung der Probe oder in der Durchführung der enzymatischen Glycerinbestimmung sein.

Aus der Abbildung geht hervor, dass das Glycerin bei 41 °C trotz gleicher Kultivierungsbedingungen und einer geringeren Endzellkonzentration früher aufgebraucht ist. Dies deutet auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität und einen ineffizienteren Substratverbrauch hin. Bei 35 °C und 39 °C ist das Glycerin dem Wachstumsverhalten entsprechend gleichzeitig aufgebraucht. Allerdings liegen die Messpunkte bei 39 °C ein Stück niedriger, was auf einen stärkeren Substratverbrauch hindeutet.

5.6.3 Verlauf der on-line Messdaten

Mit dem Programm MFCS/win wurden on-line Messdaten kontinuierlich aufgezeichnet. Der Verlauf wird für die Kultivierungen bei 35 °C, 39 °C und 41 °C in diesem Abschnitt dargestellt und diskutiert. Die Kultivierungsplots sind zusätzlich in Anhang B dargestellt.

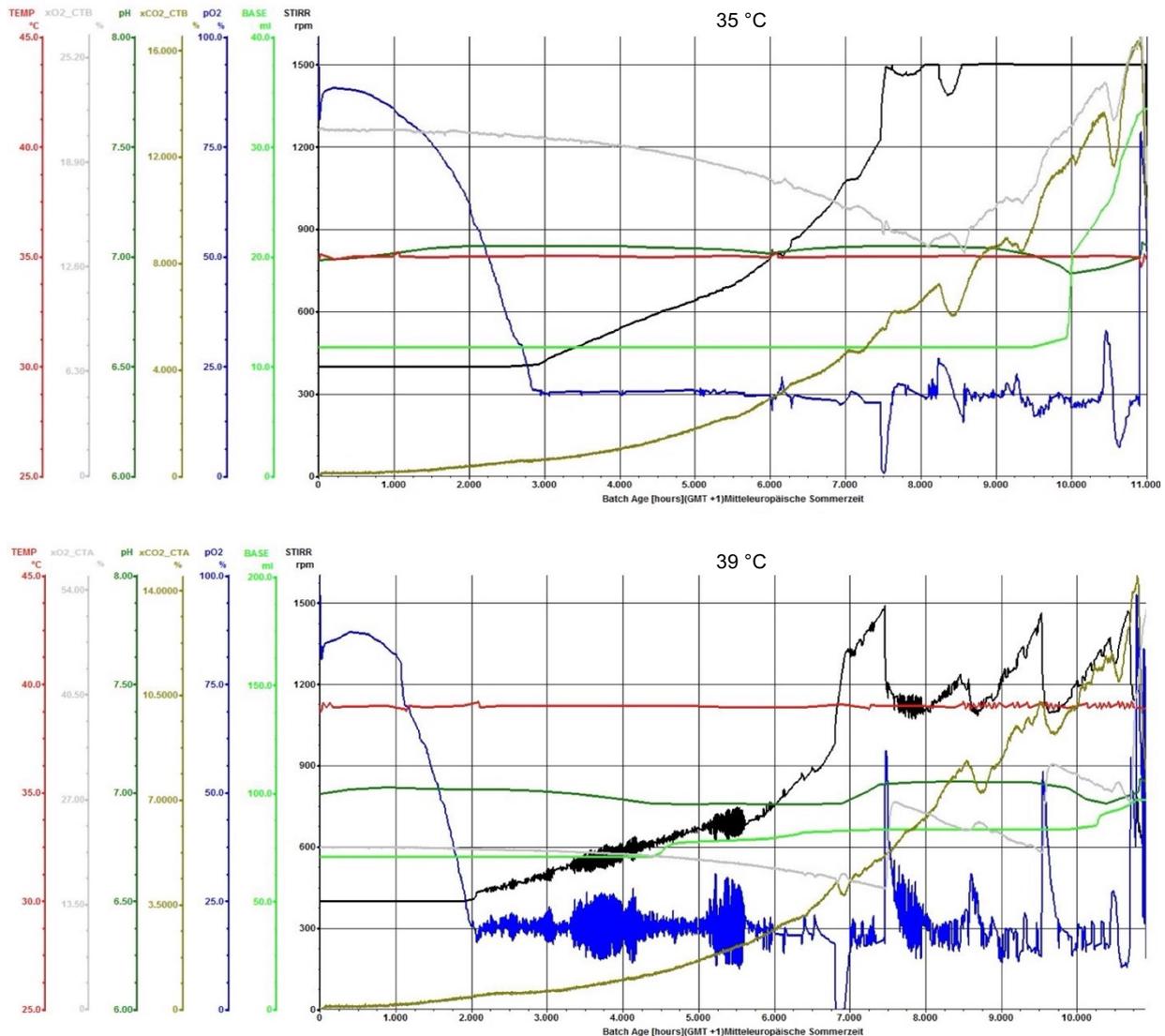


Abbildung 22: Kultivierungsplots der on-line Messdaten bei 35 °C und 39 °C

Dargestellt ist der Verlauf von Rührerdrehzahl (schwarz), Basenverbrauch (hellgrün), pO₂ (blau), Sauerstoffstoffmengenanteil (grau), Kohlendioxidstoffmengenanteil (grünbraun), pH (grün) und Temperatur (rot) für die Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19 bei 35 °C und 39 °C.

Ein Vergleich der Kultivierungsplots liefert vorwiegend Informationen über die Stoffwechselaktivität der Zellen bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen. Bei 39 °C sinkt der pO₂ im Vergleich zu den Kultivierungen bei 35 °C und 41 °C (siehe Abbildung 23) bereits nach 2 h auf einen Sollwert von 20 %. Dies deutet auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch durch die Zellatmung und folglich eine stärkere Stoffwechselaktivität der Zellen bei 39 °C hin. Darauf folgen starke Fluktuationen im pO₂-Signal und in der zunehmenden Rührerdrehzahl. Dies könnte auf Stressbedingungen innerhalb der Kultur hindeuten. Die Löslichkeit von Sauerstoff

nimmt in wässrigen Lösungen mit zunehmender Temperatur ab. Die Stressbedingungen könnten durch eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung der Zellen verursacht worden sein. Die geringere Wasserlöslichkeit und die erhöhte Zellaktivität gehen mit einem hohen Sauerstoffbedarf einher. Dieser konnte womöglich nicht vollständig gedeckt werden, wenn der Sauerstoff nicht effizient an jede Zelle transportiert werden kann. Durch die erhöhte Aktivität können die Zellen bei 39 °C dennoch ihr Wachstumsverhalten ähnlich dem bei 35 °C aufrechterhalten (siehe Abbildung 19). Bei einer erhöhten Temperatur von 41 °C erreicht der pO_2 -Wert nach ungefähr 3 h die untere Grenze von 20 % (siehe Abbildung 23). Auch hier sind, im Vergleich zu der Kultivierung bei 39 °C, leichtere Fluktuationen im pO_2 -Signal vorhanden.

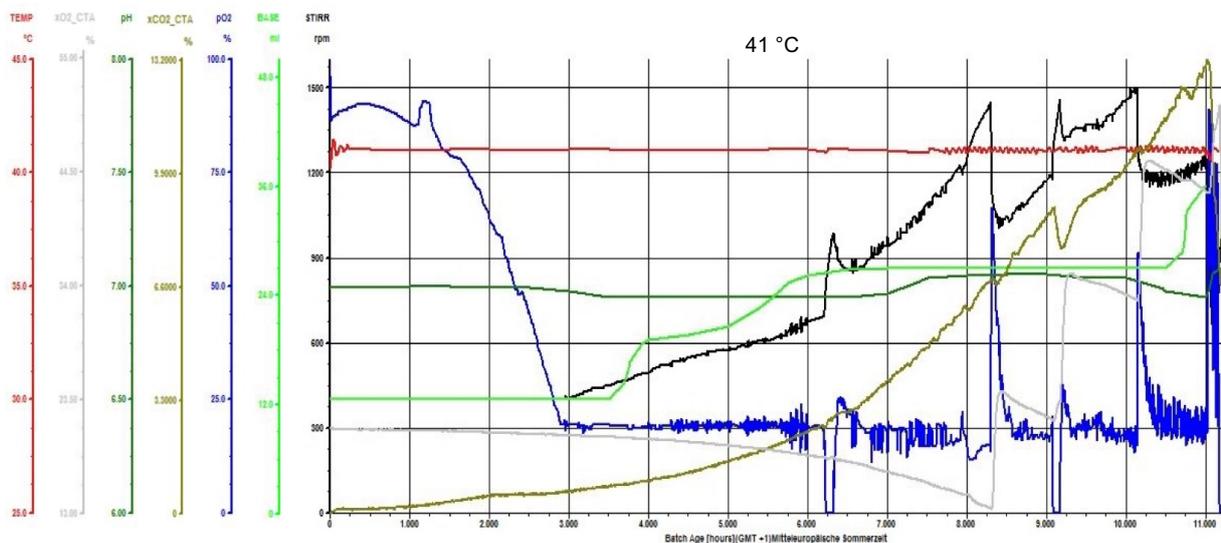


Abbildung 23: Kultivierungsplot der on-line Messdaten bei 41 °C

Dargestellt ist der Verlauf von Rührerdrehzahl (schwarz), Basenverbrauch (hellgrün), pO_2 (blau), Sauerstoffstoffmengenanteil (grau), Kohlendioxidstoffmengenanteil (grünbraun), pH (grün) und Temperatur (rot) für die Kultivierung von *E. coli* DH10B::pUC19 bei 41 °C.

Die Zunahme des Basenverbrauchs beginnt bei 35 °C nach 10 h. Bei einer Kultivierungstemperatur von 39 °C steigt der Basenverbrauch nach 4,5 h, bei 41 °C bereits nach 3,5 h. Der Basenverbrauch wird durch das Sinken des pH-Wertes ausgelöst, was oftmals eine Folge der Acetatproduktion ist. Die Acetatproduktion scheint bei höheren Temperaturen in früheren Phasen des Batchprozesses einzusetzen, möglicherweise verursacht durch die verringerte Löslichkeit des Sauerstoffs.

5.6.4 Auswirkung der Kultivierungstemperaturen auf die Plasmidausbeute

Der Hersteller des Plasmids gibt eine Kopienzahl von ca. 70-80 bei 37 °C und über 200 bei 42 °C an [9]. Inwiefern sich Temperaturen von 35 °C, 39 °C und 41 °C auf die Höhe der Plasmidausbeute in *E. coli* DH10B auswirken, ist in der Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Vergleich der Plasmidausbeuten bei 35 °C, 39 °C und 42 °C

Zellsuspension wurde auf eine ΔOD von 10 in ein Volumen von 1 mL verdünnt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden aufgeschlossen und die pDNA isoliert. Pro Probe wurden 2 Isolierungen durchgeführt. Die pDNA wurde zwei Mal in 40 μ L Elutionspuffer eluiert. Der pDNA-Konzentration im Eluat wurde in Doppelbestimmung quantifiziert und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summe der Gehälter beider Elutionen.

ϑ in °C	Isolierung	c_{pDNA} in mg L ⁻¹	spezifische Ausbeute in mg _{pDNA} /g _{BTM}	Gesamtausbeute in mg
35	1	51,7	1,30	155
	2	52,6	1,33	158
39	1	68,9	1,69	207
	2	69,1	1,70	207
41	1	73,4	2,02	220
	2	78,1	2,23	234

Generell zeigen die Ergebnisse, dass die spezifische Ausbeute mit erhöhten Kultivierungstemperaturen zunimmt. Bei einer spezifischen Ausbeute von 1,33 mg_{pDNA}/g_{BTM} bei 35 °C zu 2,23 mg_{pDNA}/g_{BTM} bei 41 °C besteht eine Steigerung von 67,7 %. In der Gesamtausbeute besteht ein signifikanter Unterschied von rund 70 mg. Zwischen der spezifischen Ausbeute von 1,70 mg_{pDNA}/g_{BTM} bei 39 °C und 2,23 mg_{pDNA}/g_{BTM} bei 41 °C beträgt die Steigerung 31,2 %. Da bei 39 °C zusätzlich eine hohe Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde, fällt die Gesamtausbeute mit 207 mg ähnlich hoch aus wie bei 41 °C. Auf Grundlage der Daten wird pro °C eine Steigerung von ungefähr 15 % in der spezifischen Ausbeute vermutet. Die Steigerung zwischen 37 °C auf 42 °C würde damit 75 % betragen. Dies entspräche nicht ganz den Angaben des Herstellers, der eine Steigerung in der Kopienzahl von 70-80 auf 200 berichtet [9], wenn man annehmen würde, dass die Kopienzahl des Plasmids innerhalb der Zelle mit der möglichen spezifischen Ausbeute nach einem Fermentationsprozess im Bioreaktor und der darauffolgenden Aufarbeitung korreliert. Von Seiten des Herstellers werden bis auf die Temperatur keine anderen Kultivierungsbedingungen oder Bakterienstämme angegeben, die eine Auswirkung auf die Plasmidkopien haben könnten [9]. Es kann mit Sicherheit gesagt werden, dass bei den entstehenden Stressbedingungen im Bioreaktor, beispielsweise durch hohe Zelldichten oder

Acetatbildung, und bei der darauffolgenden Aufarbeitung nicht alle Plasmidkopien erhalten bleiben.

5.6 Acetatkonzentration am Ende der Fermentationen

Ein häufiges Problem bei der Fermentation rekombinanter *E. coli* Stämme ist die Produktion von wachstumshemmendem Acetat. Die Absonderung von Acetat ist eine Folge des anaeroben Stoffwechselweges, welcher durch eine unzureichende Sauerstoffversorgung und hohe Wachstumsraten einsetzen kann [24]. Sie verursacht eine Abnahme in der Produktivität und eine Verschwendung der Kohlenstoffquelle [25]. In der nachstehenden Abbildung sind die Acetatkonzentrationen c_{Acetat} zum Ende der Fermentationen dargestellt.

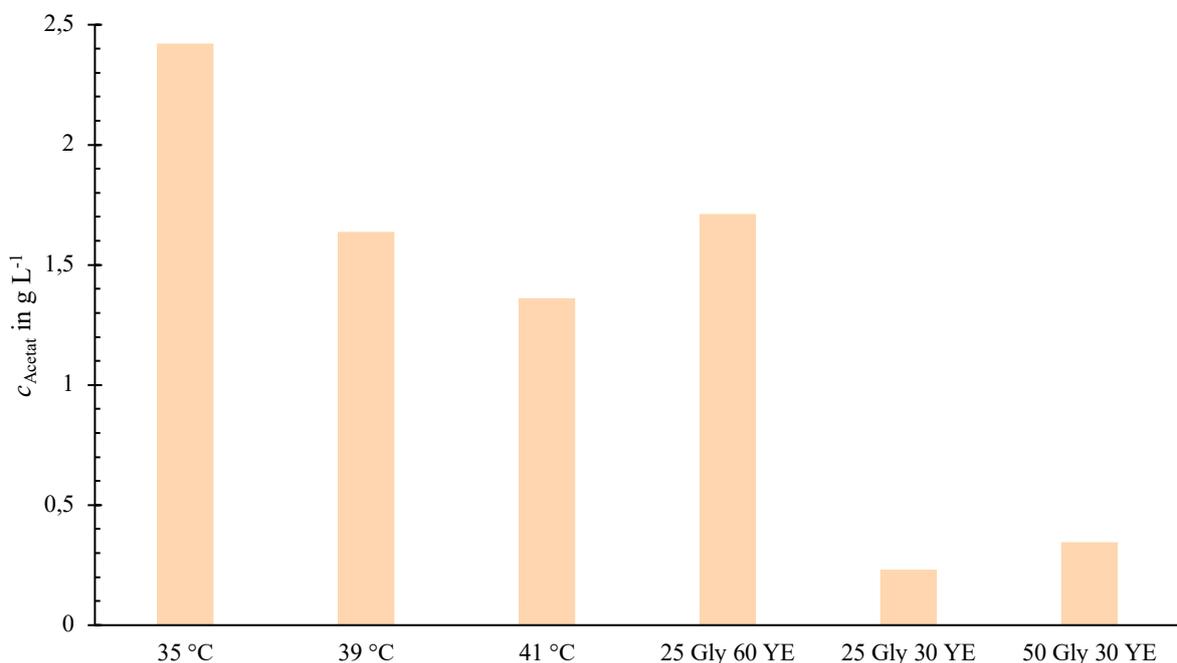


Abbildung 24: Acetatkonzentrationen am Ende der Fermentationen

Die Acetatkonzentration in g L^{-1} wurde für das Ende aller Fermentationen, die im Bioreaktor stattfanden, mittels enzymatischer UV-Bestimmung gemessen. Dargestellt sind die Konzentrationen bei Kultivierungstemperaturen von 35 °C, 39 °C und 41 °C und bei unterschiedlichen Medienzusammensetzungen von 25 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt, 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt und 50 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt.

Bei dem Einsatz einer Hefeextraktkonzentration von 30 g L^{-1} im Medium entstanden die niedrigsten Acetatkonzentrationen. Dies könnte durch die geringe Menge an Komplexanteilen im Medium begründet werden, wodurch geringere Zelldichten gebildet wurden. Da die Acetatkonzentration bei 50 g L^{-1} Glycerin mit 0,3 g L^{-1} etwas höher ausgefallen ist als bei 25 g L^{-1} Glycerin im Medium, wird eine höhere Acetatproduktion durch die größere Zelldichte am Ende der Kultivierung vermutet (siehe Tabelle 12). Bei einem höheren Hefeextraktanteil von 60 g L^{-1} und einer Glycerinkonzentration von 25 g L^{-1} besteht am Ende der Kultivierung mit 1,7 g L^{-1} eine sehr viel höhere Acetatkonzentration im Medium. Dies könnte durch den hohen Anteil an komplexen Inhaltsstoffen im Medium liegen, der zu einer hohen Wachstumsrate und Zelldichte

geführt hat (siehe Tabelle 12). Bei erhöhten Kultivierungstemperaturen wurde ebenfalls mehr Acetat produziert. Die Hefeextraktkonzentration betrug im Medium 60 g L^{-1} . Die erhöhten Acetatkonzentrationen am Ende der Fermentation könnten sowohl durch den hohen Komplexanteil des Mediums und die hohen Zelldichten begründet werden als auch durch die hohe Temperatur und dem damit einhergehenden Zellstress. Bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ bestand am Ende der Fermentation mit $2,4 \text{ g L}^{-1}$ die höchste Acetatkonzentration. Der hohe Basenverbrauch am Ende der Kultivierung (siehe Abbildung 22), deutet darauf hin, dass die Acetatproduktion erst gegen Ende der Fermentation eingesetzt ist.

Weil die Acetatmessungen nur für das Ende der Fermentationen durchgeführt wurden, sind die genauen Umstände für die Acetatbildung nicht aus diesen Daten zu erschließen. Genauere Informationen würde die Messung der Acetatkonzentration über den Kultivierungsverlauf bereitstellen. Die Endkonzentrationen wahrscheinlich stellen nicht die maximale Acetatkonzentration dar, die während der Fermentation im Medium vorhanden war. *Escherichia coli* kann Acetat als Kohlenstoffquelle verwerten [24], weshalb es durchaus möglich ist, dass während der Fermentationen höhere Acetatkonzentrationen vorhanden waren.

5.7 Vergleich der Plasmidausbeuten

Die Variation in den Kultivierungstemperaturen und der Medienzusammensetzung ergab unterschiedliche Plasmidausbeuten. In den folgenden Abschnitten werden die spezifischen Plasmidausbeuten und die Gesamtausbeuten aus allen Kultivierungsversuchen miteinander verglichen und diskutiert.

5.7.1 Spezifische Plasmidausbeute

Die spezifische Ausbeute pro Biotrockenmasse wird durch die Kopienzahl innerhalb der Zelle und die Kultivierungsbedingungen bestimmt. In der Abbildung 25 sind die spezifischen Plasmidausbeuten aus allen Kultivierungsversuchen dieser Arbeit dargestellt.

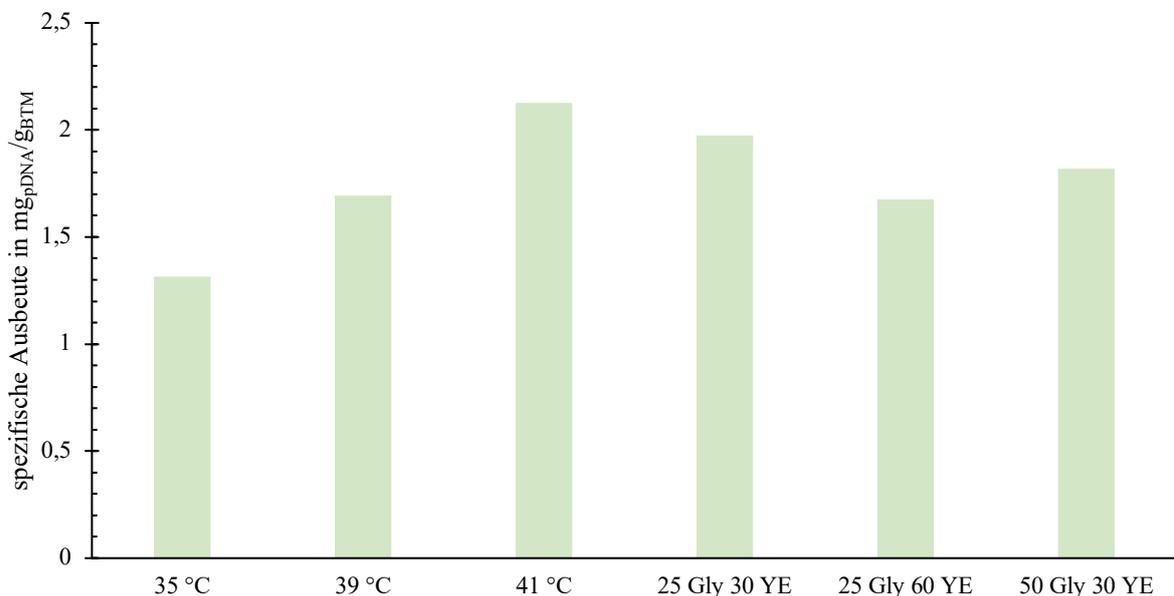


Abbildung 25: Spezifische pDNA-Ausbeute nach Variation der Kultivierungstemperatur und Medienkomposition

Dargestellt sind die spezifischen Ausbeuten der Fermentationen bei Kultivierungstemperaturen von 35 °C, 39 °C und 41 °C. Des Weiteren wurde mit unterschiedlichen Verhältnissen von Glycerin zu Hefeextrakt kultiviert, 25 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt, 25 g L⁻¹ Glycerin und 60 g L⁻¹ Hefeextrakt und 50 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt. Es wurde der Mittelwert aus zwei pDNA-Gehalten aus den Plasmidisolierungen für den gleichen Prozesszeitpunkt gebildet.

Bei einer Veränderung der Kultivierungstemperatur konnte bei 41 °C der höchste spezifische pDNA-Gehalt pro Gramm Biotrockenmasse erreicht werden. Darauf folgt die spezifische Ausbeute bei 39 °C. Bei 35 °C wurde mit Abstand die geringste spezifische Ausbeute erhalten. Anhand dieser Daten kann die erhöhte Kopienzahl, welche bei einer Temperaturerhöhung aufgrund einer Punktmutation im RNA II Primer ausgelöst wird [10], bestätigt werden.

Der Erhalt eines Plasmids stellt eine metabolische Belastung für die Zellen dar [26]. Der hohe spezifische Gehalt von 1,98 mg_{Plasmid}/g_{BTM} bei einer Medienkomposition mit 25 g L⁻¹ Gly und 30 g L⁻¹ YE könnte für eine niedrige metabolische Beanspruchung durch die reduzierten

Konzentrationen der Medienbestandteile sprechen, sodass das Plasmid in der Zelle gehalten werden konnte.

Da sich auch der spezifische Gehalt bei 50 g L^{-1} Gly und 30 g L^{-1} YE mit $1,84 \text{ mg}_{\text{Plasmid}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ im Vergleich zu dem spezifischen Gehalt bei Standardbedingungen (siehe Tabelle 11) erhöht hat, könnte eine Steigerung der Kopienzahl durch eine niedrig gehaltene Wachstumsrate vorliegen, von der auch in der Literatur berichtet wird [1].

5.7.2 Gesamtausbeute

Die Gesamtausbeute ist von der erreichten Zelldichte und dem spezifischen Plasmidgehalt abhängig. In der Abbildung 26 sind die spezifischen Plasmidausbeuten aus allen Kultivierungsversuchen dieser Arbeit dargestellt.

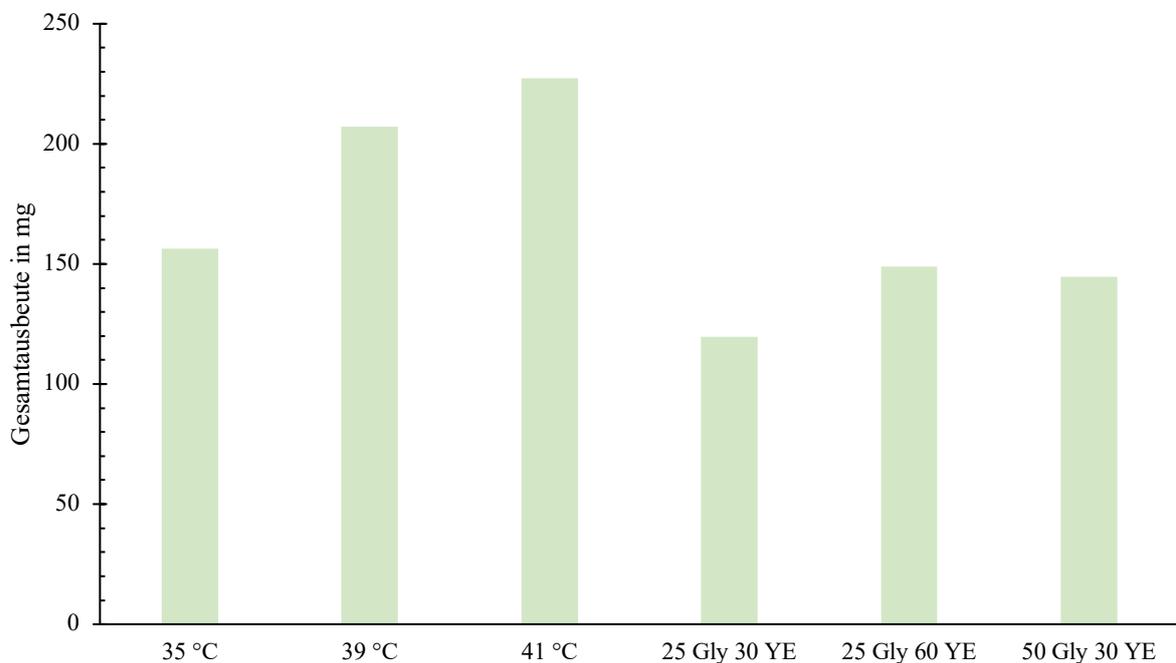


Abbildung 26: Gesamtausbeuten an pDNA nach Variation der Kultivierungstemperatur und Medienkomposition

Dargestellt sind die Gesamtausbeuten der Fermentationen bei Kultivierungstemperaturen von 35 °C , 39 °C und 41 °C . Des Weiteren wurde mit unterschiedlichen Glycerin- zu Hefeextraktkonzentrationen im Medium kultiviert, 25 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt, 25 g L^{-1} Glycerin und 60 g L^{-1} Hefeextrakt und 50 g L^{-1} Glycerin und 30 g L^{-1} Hefeextrakt. Es wurde der Mittelwert der pDNA-Gehälter aus zwei Plasmidisolationen für den gleichen Prozesszeitpunkt gebildet.

Da bei 35 °C , 39 °C und 41 °C hohe Zelldichten und spezifische Plasmidgehälter erreicht wurden, ist hier die Gesamtausbeute am größten. Sie nimmt mit steigender Temperatur zu. Danach folgen die Kultivierungen bei unterschiedlichen Medienzusammensetzungen. Obwohl bei 50 g L^{-1} Gly 30 g L^{-1} YE weniger Zellmasse produziert wurde, wird eine hohe Gesamtausbeute erreicht. Der Einfluss der geringen Biomasse auf die Gesamtausbeute wird durch den erhöhten spezifischen Gehalt ausgeglichen. Die Gesamtausbeute kommt nah an 25 g L^{-1} Gly 60 g L^{-1} YE ran, wo in kürzerer Zeit mehr Biomasse gebildet werden konnte. Bei 20 g L^{-1} Gly 30 g L^{-1} YE

entsteht mit Abstand der niedrigste Gesamtausbeute, verursacht durch die niedrigste Biomasseproduktion.

5.8 Einfluss der Glycerin- und Hefeextraktkonzentration sowie Temperaturvariationen auf die pDNA-Konformation

Um zu überprüfen, inwiefern die Kultivierungstemperatur und die Medienbestandteile Glycerin und Hefeextrakt einen Einfluss auf die Konformation des pUC19-Plasmids hatten, wurden die Eluate der Plasmidisolierungen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Gel und die Probenauftragung sind in Abbildung 27 dargestellt.

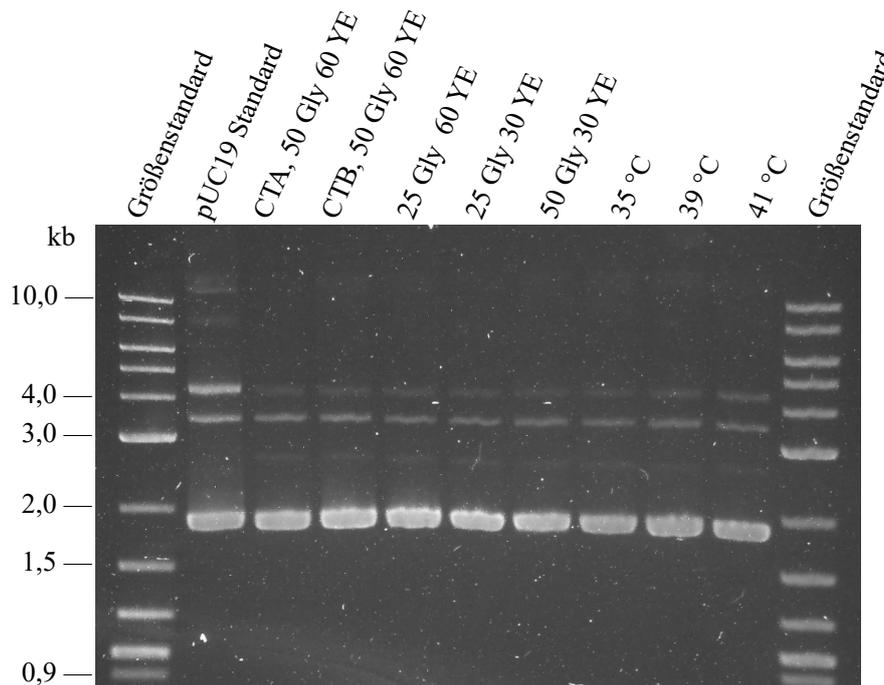


Abbildung 27: Agarose-Gelelektrophorese Analyse der pDNA nach verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor

E. coli DH10B::pUC19 wurde bei Temperaturen von 35 °C, 39 °C und 41 °C kultiviert. Des Weiteren wurde mit unterschiedlichen Glycerin- zu Hefeextraktkonzentrationen im Medium kultiviert; 50 g L⁻¹ Glycerin und 60 g L⁻¹ Hefeextrakt, 25 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt, 25 g L⁻¹ Glycerin und 60 g L⁻¹ Hefeextrakt und 50 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt. Die pDNA wurde am Ende der Prozesse isoliert. Das erste Eluat wurde auf einen Gehalt von 100 ng µL⁻¹ verdünnt. Anschließend wurden 2 µL der Proben zusammen mit Probenpuffer und RNase-freiem Wasser in die Taschen des 1 % Agarosegels aufgetragen.

Da sich im Größenstandard eine Reihe von Plasmiden befindet, die mit Restriktionsenzymen auf die jeweilige Basenpaarlänge zugeschnitten wurden, handelt es sich um lineare Plasmide [27]. Die breiten, intensiven Banden bei ca. 2,0 kb (Kilobase) stellen womöglich die *supercoiled* Form des pUC19-Plasmids dar. Die Plasmidkonformation wandert aufgrund ihrer kompakten Form und negativen Ladung am schnellsten durch das Agarosegel und über 2,0 kb hinaus, obwohl das pUC19-Plasmid eine Gesamtlänge von 2686 bp hat. Zwischen 2 kb und 3 kb ist bei allen Proben eine schwache Bande zu erkennen. Dies könnte die lineare Plasmidkonformation sein. Ein weiterer Grund, der für die lineare Form spricht, ist die fehlende Angabe des

Herstellers zum Anteil der linearen Isoform [9]. Da in der Spur des Standards diese Bande nicht vorhanden ist, könnte davon ausgegangen werden, dass die lineare Isoform im Standard nicht vorhanden ist. Gründe für das Auftreten der linearen Isoform in den Fermentationsproben könnten Zellstress durch die Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor oder Scherkräfte im Aufarbeitungsprozess sein. Die Bande bei 4,0 kb oder die Bande zwischen 3,0 kb und 4,0 kb könnten die *open circular* Form darstellen, welche von den drei Konformationen am langsamsten durch das Agarosegel läuft [28]. Aufgrund ihrer Form erfährt sie mehr Widerstand durch das Agarosegel. Welche der beiden Banden der oc-Form entspricht und welche möglicherweise eine Verunreinigung darstellt, ist unklar. Im Standard wird ein Anteil der oc-Form von < 3 % angegeben [9]. Im Vergleich zwischen den Fermentationsproben ist besonders bei 41 °C die Bande bei 4 kb deutlich zu sehen. Wenn es sich hier um die oc-Form handeln sollte, könnte die hohe Temperatur verstärkt zu Zellstress und zur Veränderung der *super coiled* Plasmidkonformation geführt haben. Normalerweise sorgen zelleigene Enzyme für den Erhalt der *super coiled* Plasmidkonformation [12]. Möglicherweise hat die Temperatur von 41 °C die Aktivität dieser Enzyme stärker beeinträchtigt als die anderen Fermentationstemperaturen. Im pUC19-Standard sind Banden bei 8 und 10 kb zu sehen. Dies spricht für Verunreinigungen durch genomische DNA. Der Hersteller des Standards gibt einen Anteil von < 2 % an [9]. Das Fehlen derartiger Banden in den Fermentationsproben spricht für eine effektive Auftrennung der pDNA von genomischer DNA durch die angewendete Methode des Miniprep Kits.

Im Allgemeinen erscheinen bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ähnliche Bandenmuster. Besonders im Hinblick auf die *super coiled* Konformation scheinen die Kultivierungsbedingungen keine signifikanten Unterschiede im Einfluss auf diese Konformation der pDNA zu haben. Fraglich bleibt, um was es sich genau bei der 4. Bande in allen Proben handeln könnte.

6 Fazit und Ausblick

Für die Untersuchung des Einflusses von Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen sowie Temperaturvariationen auf die Plasmidausbeute in *Escherichia coli* DH10B wurde der Stamm zunächst mit dem pUC19-Plasmid erfolgreich transformiert. Zwischen vier transformierten Klonen konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Mit dem Klon, bei dem die höchste spezifische Plasmidausbeute von $724 \text{ ng}_{\text{pDNA}}/\Delta\text{OD}$ -Einheit bestimmt wurde, wurde für darauffolgende Versuche eine mikrobielle Dauerkultur erstellt. Für die Vorkultivierung ergaben sich eine Temperatur von $28,5 \text{ }^\circ\text{C}$, ein Animpfvolumen von $40 \text{ }\mu\text{L}$ und eine Schüttelfrequenz von 220 rpm als geeignete Kultivierungsbedingungen. Es wurde eine sehr gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zwischen zwei Reaktorsystemen der gleichen Art festgestellt, in denen darauffolgend bei variierenden Kultivierungstemperaturen und Medienzusammensetzungen kultiviert wurde.

Bei dem Einsatz unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextraktkonzentrationen konnte festgestellt werden, dass diese sich vor allem auf das Wachstumsverhalten auswirken. Die Reduktion der Medienbestandteile von 50 g L^{-1} Gly und 60 g L^{-1} YE auf 25 g L^{-1} Gly und 30 g L^{-1} YE führte zu einer höheren Wachstumsrate und einer niedrigeren Endzellkonzentration. Interessanterweise ergab sich entgegen der Erwartung, dass die spezifische Ausbeute bei geringeren Wachstumsraten größer ausfällt, eine hohe spezifische Plasmidausbeute von $1,98 \text{ mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$. Bei einem höheren Verhältnis von Hefeextrakt zu Glycerin wird innerhalb einer kürzeren Prozesszeit mehr Biomasse produziert, jedoch war die spezifische Plasmidausbeute mit $1,68 \text{ mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ geringer. Ein höheres Verhältnis von Glycerin zu Hefeextrakt führt zu einer niedrigeren Wachstumsrate und einer spezifischen Plasmidausbeute von $1,87 \text{ mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$. Am Ende der Kultivierungen war bei einer Hefeextraktkonzentration von 30 g L^{-1} die Acetatkonzentration mit $0,23 \text{ g L}^{-1}$ und $0,34 \text{ g L}^{-1}$ am niedrigsten.

Bei der Variation der Kultivierungstemperatur fiel bei $41 \text{ }^\circ\text{C}$ die Endzellkonzentration etwas niedriger aus. Im Gegensatz zu rund $42\text{-}44 \text{ g L}^{-1}$ bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ und $39 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden hier 36 g L^{-1} erreicht. Es wird vor allem bei $39 \text{ }^\circ\text{C}$ eine erhöhte Stoffwechselaktivität vermutet, die dazu führte, dass das Wachstumsverhalten dem bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ähnelte. Entsprechend der Erwartung, dass sich die spezifische Plasmidausbeute durch Kultivierungstemperatur beeinflussen lässt, ergaben sich bei höheren Kultivierungstemperaturen signifikant größere spezifische Ausbeuten. Bei einer Temperatur von $41 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die höchste spezifische Ausbeute von $2,13 \text{ mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ erreicht. Die niedrigste spezifische Ausbeute ergab sich mit $1,32 \text{ mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ bei einer Kultivierungstemperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Entgegen der Erwartung, dass die Temperaturen die Gesamtausbeute durch eine Beeinträchtigung des Zellwachstums negativ beeinflussen, wurde auch bei

41 °C die höchste Gesamtausbeute von 227 mg erreicht. Die mit Abstand höchste Acetatkonzentration bestand nach der Kultivierung bei 35 °C mit 2,42 g L⁻¹. Die Acetatproduktion setzt bei 39 °C und 41 °C vermutlich früher ein.

In der Konformation der pDNA konnten zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich bei 41 °C wird ein höherer Anteil an oc-Form vermutet.

In Anbetracht der Versuchsdurchführung könnte in Zukunft bei der Bestimmung der Plasmidausbeute anders vorgegangen werden, indem vorher ein Umrechnungsfaktor von der Biofeucht- zur Biotrockenmasse bestimmt wird. Vor der Pelletierung wird das Mikroreaktionsgefäß getrocknet und ausgewogen. Nach der Pelletierung der Fermentationsprobe würde das genaue Gewicht der Biofeuchtmasse bestimmt und die Biotrockenmasse berechnet werden. Somit könnte die Plasmidausbeute ohne eine Berechnung über die Optische Dichte direkt auf die Biotrockenmasse bezogen werden. Diese Vorgehensweise könnte durch die Vermeidung der Messunsicherheiten bei der Bestimmung der Optischen Dichte und der Fehlerquellen bei der Verdünnung der Zellsuspension auf eine ΔOD von 10 für den Erhalt gleicher Pelletmengen präzisere Ergebnisse liefern.

Für weiterführende Versuche könnte ein Fed-Batch-Prozess erprobt werden. Fed-Batch-Prozesse können generell zu höheren spezifischen und volumetrischen Plasmidausbeuten führen [29]. Diese werden vor allem über die Möglichkeit, die Wachstumsraten gering zu halten, erreicht. Es wurde von Prozessen berichtet, in denen die volumetrische Ausbeute bei 100-250 mg L⁻¹ liegt [30].

Bei der Zusammensetzung des Mediums könnte man neben der Glycerin- und Hefeextraktkonzentration auch den Anteil an Aminosäuren in den Fokus setzen. Es lässt sich nicht genau definieren, wie hoch der Anteil an welchen Aminosäuren im Hefeextrakt ist. Im Allgemeinen werden Aminosäuren für die Proteinbiosynthese verwendet. Die Aminosäuren Glutamin, Asparaginsäure und Glycin werden zudem für die Synthese von RNA, DNA und pDNA benötigt. Wie sich die Zugabe dieser Aminosäuren in definierten Konzentrationen auf die Plasmidausbeute auswirkt, könnte weitergehend untersucht werden. Ein weiterer Ansatz wäre die Zugabe definierter Mengen an Adenin-, Thymin-, Cytosin- und Guanin-haltigen Nukleotiden, welche die grundlegenden Hauptbestandteile der DNA darstellen. [31]

In Bezug auf die Kultivierungstemperatur könnte eine Erhöhung der Temperatur auf 42 °C durchgeführt werden. Dabei würde es sich anbieten, die Erhöhung der Temperatur in den Prozess zu integrieren. Der Prozess könnte Aufschluss darüber geben, wie die Plasmidausbeute ausfällt, wenn die Zellen beispielsweise zunächst mit 50 g L⁻¹ Glycerin bei einer niedrigen

Wachstumsrate und 37 °C eine bestimmte Zelldichte erreichen und die Temperatur im Anschluss erhöht wird. Das Auftreten von metabolischen Belastungen und Stressbedingungen durch die Temperatur könnte damit auf einen Prozessabschnitt reduziert werden. Des Weiteren könnte ein lineares Profil für die Erhöhung der Temperatur verwendet werden. Es wurde bereits von einer volumetrischen Ausbeute 2590 mg L⁻¹ durch einen linearen Temperaturanstieg von 30 °C auf 42 °C über 16 h ab einer Optischen Dichte von 14-16 für den *E. coli* Stamm DH5α berichtet [1].

Literatur

- [1] A. E. Carnes u. a., „Plasmid DNA fermentation strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression“, *Biotechnology and Bioengineering*, Bd. 108, Nr. 2, S. 354–363, 2011, doi: 10.1002/bit.22936.
- [2] K. J. Prather, S. Sagar, J. Murphy, und M. Chartrain, „Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification“, *Enzyme and Microbial Technology*, Bd. 33, Nr. 7, S. 865–883, Dez. 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(03)00205-9.
- [3] R. Shankar, M. Schmeer, und M. Schlee, „Producing Plasmid DNA Template for Clinical Grade RNA Vaccine Manufacture“, in *RNA Vaccines: Methods and Protocols*, T. Kramps, Hrsg., New York, NY: Springer US, 2024, S. 303–319. doi: 10.1007/978-1-0716-3770-8_14.
- [4] X. Guan, Y. Pei, und J. Song, „DNA-Based Nonviral Gene Therapy—Challenging but Promising“, *Mol Pharm*, Bd. 21, Nr. 2, S. 427–453, Feb. 2024, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00907.
- [5] C. Marie und D. Scherman, „Antibiotic-Free Gene Vectors: A 25-Year Journey to Clinical Trials“, *Genes (Basel)*, Bd. 15, Nr. 3, S. 261, Feb. 2024, doi: 10.3390/genes15030261.
- [6] F. Silva, L. Passarinha, F. Sousa, J. A. Queiroz, und F. C. Domingues, „Influence of growth conditions on plasmid DNA production“, *J Microbiol Biotechnol*, Bd. 19, Nr. 11, S. 1408–1414, Nov. 2009, doi: 10.4014/jmb.0805.329.
- [7] S. Y. Yau, E. Keshavarz-Moore, und J. Ward, „Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes“, *Biotechnol Bioeng*, Bd. 101, Nr. 3, S. 529–544, Okt. 2008, doi: 10.1002/bit.21915.
- [8] T. Durfee u. a., „The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse“, *Journal of Bacteriology*, Bd. 190, Nr. 7, S. 2597–2606, Apr. 2008, doi: 10.1128/jb.01695-07.
- [9] „Plasmid-DNA pUC19 | von A bis Z | Chemikalien | Carl Roth - Deutschland“. Zugegriffen: 31. Juli 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.carlroth.com/de/de/von-a-bis-z/plasmid-dna-puc19/p/x911.1>
- [10] S. Lin-Chao, W.-T. Chen, und T.-T. Wong, „High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II“, *Molecular Microbiology*, Bd. 6, Nr. 22, S. 3385–3393, 1992, doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02206.x.
- [11] N. Pavlin u. a., „Analytical separation of plasmid DNA isoforms using anion exchanging chromatographic monoliths with 6 μm channels“, *ELECTROPHORESIS*, Bd. 44, Nr. 24, S. 1967–1977, 2023, doi: 10.1002/elps.202300031.
- [12] M. J. Molloy, V. S. Hall, S. I. Bailey, K. J. Griffin, J. Faulkner, und M. Uden, „Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the

- plasmid isoforms thereby observed“, *Nucleic Acids Research*, Bd. 32, Nr. 16, S. e129, Aug. 2004, doi: 10.1093/nar/gnh124.
- [13] Y. Li, D. Currie, und A. L. Zydney, „Enhanced purification of plasmid DNA isoforms by exploiting ionic strength effects during ultrafiltration“, *Biotechnology and Bioengineering*, Bd. 113, Nr. 4, S. 783–789, 2016, doi: 10.1002/bit.25836.
- [14] „Plasmid Isoform Separation and Quantification by Anion-Exchange Chromatography (AEX)“. Zugegriffen: 30. Juli 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.waters.com/nextgen/de/de/library/application-notes/2021/plasmid-isoform-separation-and-quantification-by-anion-exchange-chromatography-aex.html>
- [15] P. Ghazidezfuli, „Masterarbeit ‚Entwicklung von Methoden zur Trennung und Analytik von Plasmidisoformen und Plasmidtopoisomeren‘“. 2010.
- [16] C. Kaiser, „Vorlesungsskript Bioreaktionstechnik“. HAW Hamburg, 2022.
- [17] G. P. da Silva, M. Mack, und J. Contiero, „Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology“, *Biotechnology Advances*, Bd. 27, Nr. 1, S. 30–39, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.
- [18] K. Trchounian und A. Trchounian, „Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: An overview and perspectives“, *Applied Energy*, Bd. 156, S. 174–184, Okt. 2015, doi: 10.1016/j.apenergy.2015.07.009.
- [19] I. R. Booth, „Glycerol and Methylglyoxal Metabolism“, *EcoSal Plus*, Bd. 1, Nr. 2, S. 10.1128/ecosalplus.3.4.3, März 2005, doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.3.
- [20] G. Durnin u. a., „Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*“, *Biotechnol Bioeng*, Bd. 103, Nr. 1, S. 148–161, Mai 2009, doi: 10.1002/bit.22246.
- [21] B. Beckmann, „Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate von *Escherichia coli*“, *Doctoral Thesis*, Hannover: Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover, 2018. doi: 10.15488/3482.
- [22] „Monarch Plasmid Miniprep Kit Protocol“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.neb.com/en/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit>
- [23] „NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf“. Zugegriffen: 2. August 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- [24] W. Xue u. a., „Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA“, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Bd. 109, Nr. 3, S. 257–261, März 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.08.008.
- [25] G. M. Borja, E. Meza Mora, B. Barrón, G. Gosset, O. T. Ramírez, und A. R. Lara, „Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode“, *Microb Cell Fact*, Bd. 11, Nr. 1, S. 132, Sep. 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-132.

- [26] T. Wein, Y. Wang, N. F. Hülter, K. Hammerschmidt, und T. Dagan, „Antibiotics Interfere with the Evolution of Plasmid Stability“, *Curr Biol*, Bd. 30, Nr. 19, S. 3841-3847.e4, Okt. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.07.019.
- [27] „1 kb Plus DNA Ladder | NEB“. Zugegriffen: 11. August 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.neb.com/en/products/n3200-1-kb-plus-dna-ladder>
- [28] T. Schmidt, K. Friehs, M. Schleef, C. Voss, und E. Flaschel, „Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis“, *Anal Biochem*, Bd. 274, Nr. 2, S. 235–240, Okt. 1999, doi: 10.1006/abio.1999.4291.
- [29] R. D. O’Kennedy, J. M. Ward, und E. Keshavarz-Moore, „Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production“, *Biotechnol Appl Biochem*, Bd. 37, Nr. Pt 1, S. 83–90, Feb. 2003, doi: 10.1042/ba20020099.
- [30] A. E. Carnes und J. A. Williams, „Plasmid DNA manufacturing technology“, *Recent Pat Biotechnol*, Bd. 1, Nr. 2, S. 151–166, 2007, doi: 10.2174/187220807780809436.
- [31] Z. Wang, G. Le, Y. Shi, und G. Węgrzyn, „Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model“, *Process Biochemistry*, Bd. 36, Nr. 11, S. 1085–1093, Mai 2001, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00149-2.

Anhang A: Übersicht der Kultivierungsdaten

Dieser Anhang enthält die tabellarischen Darstellungen der Parameter, die während und nach den Kultivierungen gemessen wurden und in den Abbildungen des Ergebnisteils präsentiert und diskutiert sind.

Tabelle A1: Übersicht der Optische Dichten der Übernachtskulturen bei 20 °C und 28,5 °C und verschiedener Animpfvolumina

Temperatur in °C	Animpfvolumen in µL	ΔOD	
		$t = 15,67 \text{ h}$	$t = 20,17 \text{ h}$
20,0	40	0,02	0,05
20,0	400	0,28	0,65
28,5	40	4,28	9,08
28,5	400	6,8	8,05

Tabelle A2: Übersicht der Optischen Dichten von vier *E. coli* DH10B::pUC19 Klonen

t in h	ΔOD			
	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4
0,00	0,04	0,03	0,03	0,04
1,00	0,07	0,07	0,07	0,06
1,58	0,14	0,13	0,11	0,12
2,67	0,34	0,35	0,33	0,31
3,67	0,75	0,74	0,72	0,70
5,33	2,16	2,20	2,16	2,05
7,23	4,93	5,35	5,45	4,6

Tabelle A3: Übersicht der Kultivierungsdaten bei der Überprüfung der Vergleichbarkeit zwischen den Reaktorsystemen CTA und CTB

t in h	ΔOD		c_{XL} in g L ⁻¹		c_{Gly} in g L ⁻¹	
	CTA	CTB	CTA	CTB	CTA	CTB
0,00	0,83	0,78	2,35	2,60	48,86	45,10
1,00	1,60	1,39	2,70	2,70	44,50	43,11
2,08	3,31	3,00	3,80	4,10	44,18	42,57
3,00	5,76	5,21	5,50	5,30	43,67	42,73
4,00	10,34	9,58	8,15	8,10	42,63	39,73
5,20	18,88	17,28	13,55	13,35	39,26	37,91

Anhang A: Übersicht der Kultivierungsdaten

<i>t</i> in h	ΔOD		c_{XL} in g L ⁻¹		c_{Gly} in g L ⁻¹	
	CTA	CTB	CTA	CTB	CTA	CTB
6,08	26,75	26,57	19,25	17,75	36,86	36,47
7,00	39,48	37,95	25,10	22,95	29,81	30,23
8,00	56,89	52,71	31,25	30,95	15,95	20,45
8,92	76,25	71,25	39,80	39,10	1,08	1,50
9,40	69,50	69,75	37,95	38,55	0,87	1,08

Tabelle A4: Übersicht der Kultivierungsdaten beim Einsatz unterschiedlicher Glycerin- und Hefeextraktkonzentration

Es wurde zeitgleich mit 25 g L⁻¹ Glycerin und 60 g L⁻¹ Hefeextrakt im CTA und 25 g L⁻¹ Glycerin und 30 g L⁻¹ Hefeextrakt im CTB kultiviert.

c_{Gly} in g L ⁻¹	25	25	25	25	25	25
c_{YE} in g L ⁻¹	60	30	60	30	60	30
<i>t</i> in h	ΔOD		c_{XL} in g L ⁻¹		c_{Gly} in g L ⁻¹	
0,00	0,69	0,63	-	-	-	-
1,00	1,38	1,60	2,95	1,90	25,10	23,09
2,00	3,53	4,09	4,30	3,65	25,22	23,05
3,00	6,05	7,65	4,85	4,85	24,53	21,27
4,00	10,88	12,51	7,85	8,15	22,43	19,93
5,00	20,17	22,02	12,80	12,60	19,46	15,15
6,08	36,47	35,18	20,55	17,35	14,18	8,64
6,83	48,95	45,63	25,45	20,10	7,68	0,19
7,25	57,01	42,93	28,80	20,15	1,03	0,17
7,83	56,21	-	29,65	-	0,98	-

Tabelle A5: Übersicht der Kultivierungsdaten bei Kultivierungstemperaturen von 35 °C und 39 °C Es wurde zeitgleich bei 39 °C im CTA und 35 °C im CTB kultiviert.

ϑ	35 °C	39 °C	35 °C	39 °C	35 °C	39 °C
<i>t</i> in h	ΔOD		c_{XL} in g L ⁻¹		c_{Gly} in g L ⁻¹	
0,00	0,51	0,57	-	-	-	-
1,00	0,74	0,80	2,60	2,05	49,56	52,56
2,00	1,43	1,68	2,90	2,25	50,83	50,51

Anhang A: Übersicht der Kultivierungsdaten

ϑ	35 °C	39 °C	35 °C	39 °C	35 °C	39 °C
t in h	ΔOD		c_{XL} in g L ⁻¹		c_{Gly} in g L ⁻¹	
3,00	2,91	3,34	3,15	3,25	48,14	49,01
4,00	4,79	5,23	4,70	5,05	50,06	49,60
5,13	10,24	9,79	7,45	7,70	49,64	47,18
6,00	13,41	14,76	10,20	10,70	47,16	47,00
7,00	21,71	24,66	15,60	16,50	38,32	46,42
8,40	36,10	40,53	24,00	24,95	38,86	35,24
9,48	53,75	57,38	32,05	33,40	29,77	27,46
10,45	73,00	75,25	39,65	40,70	11,32	7,56
11,10	83,75	84,25	43,60	42,35	1,85	0,83

Tabelle A6: Übersicht der Kultivierungsdaten bei einer Kultivierungstemperatur von 41 °C im CTA und $c_{Gly}=50$ g L⁻¹, $c_{YE}=30$ g L⁻¹ im CTB
Die Kultivierungen erfolgten zeitgleich.

t in h	c_{Gly} 50 g L ⁻¹ , c_{YE} 30 g L ⁻¹			$\vartheta = 41$ °C		
	ΔOD	c_{XL} in g L ⁻¹	c_{Gly} in g L ⁻¹	ΔOD	c_{XL} in g L ⁻¹	c_{Gly} in g L ⁻¹
0,00	0,49	-	-	0,59	-	-
1,00	0,99	3,38	48,96	0,88	2,38	48,57
2,00	2,02	1,90	48,30	1,71	2,05	49,13
3,00	4,18	3,50	47,71	3,21	3,25	48,75
4,00	7,61	5,55	44,95	5,01	4,55	44,22
5,00	11,80	8,35	45,88	7,83	6,25	44,31
6,00	19,37	12,00	42,37	12,65	9,60	44,02
7,00	28,78	16,20	36,30	21,65	13,45	41,77
8,00	39,54	21,55	28,16	32,84	18,70	37,69
9,17	48,28	25,95	11,74	48,59	25,95	-
10,00	51,17	26,60	0,86	57,69	30,00	16,52
10,58	51,50	26,50	0,30	63,75	34,45	0,39
10,98	-	-	-	73,75	35,50	-

Anhang B: Übersicht der MFCS-Plots

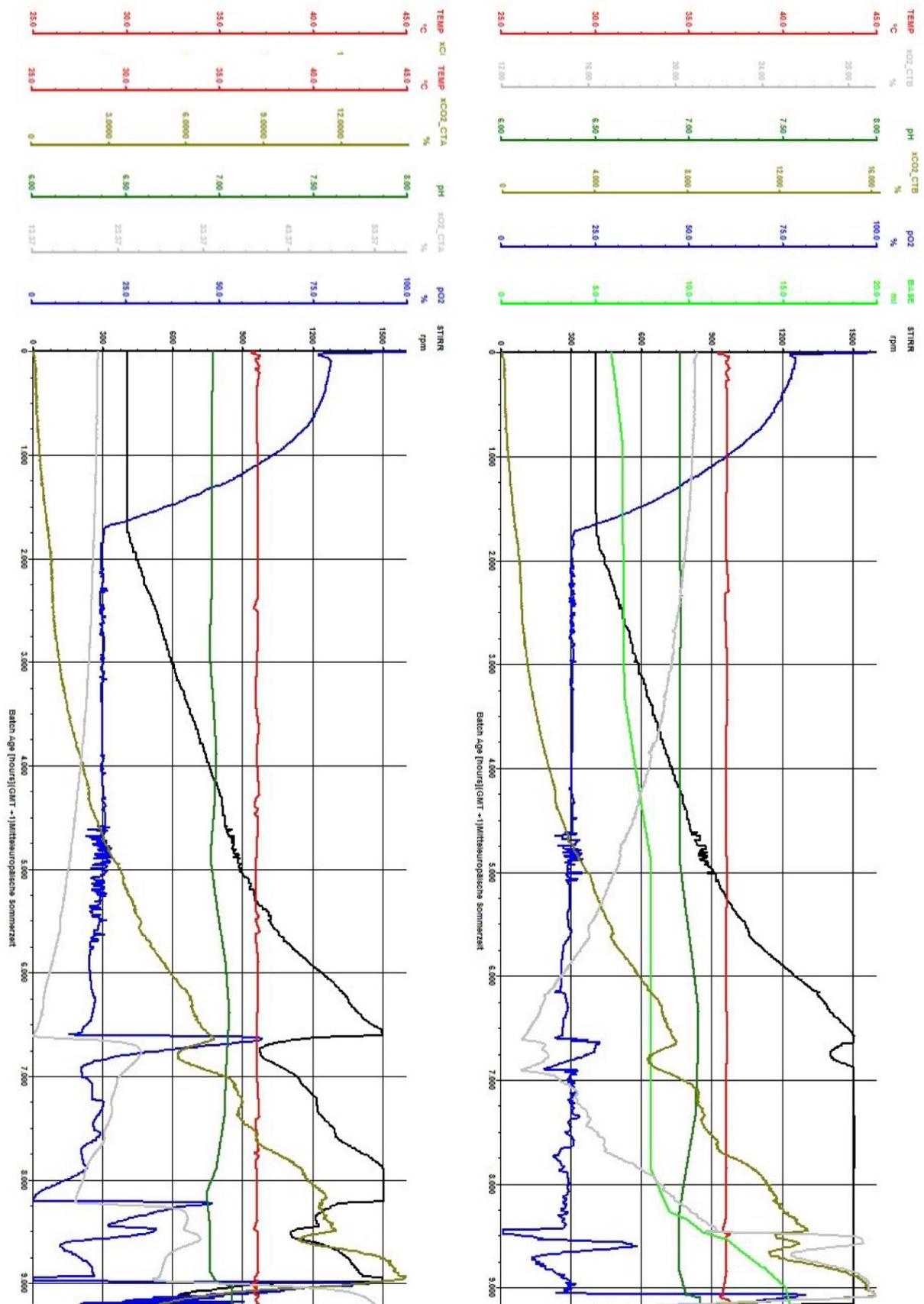


Abbildung C1: MFCS-Plots der Kultivierungen im CTA (links) und CTB (rechts) bei gleichen Kultivierungsbedingungen

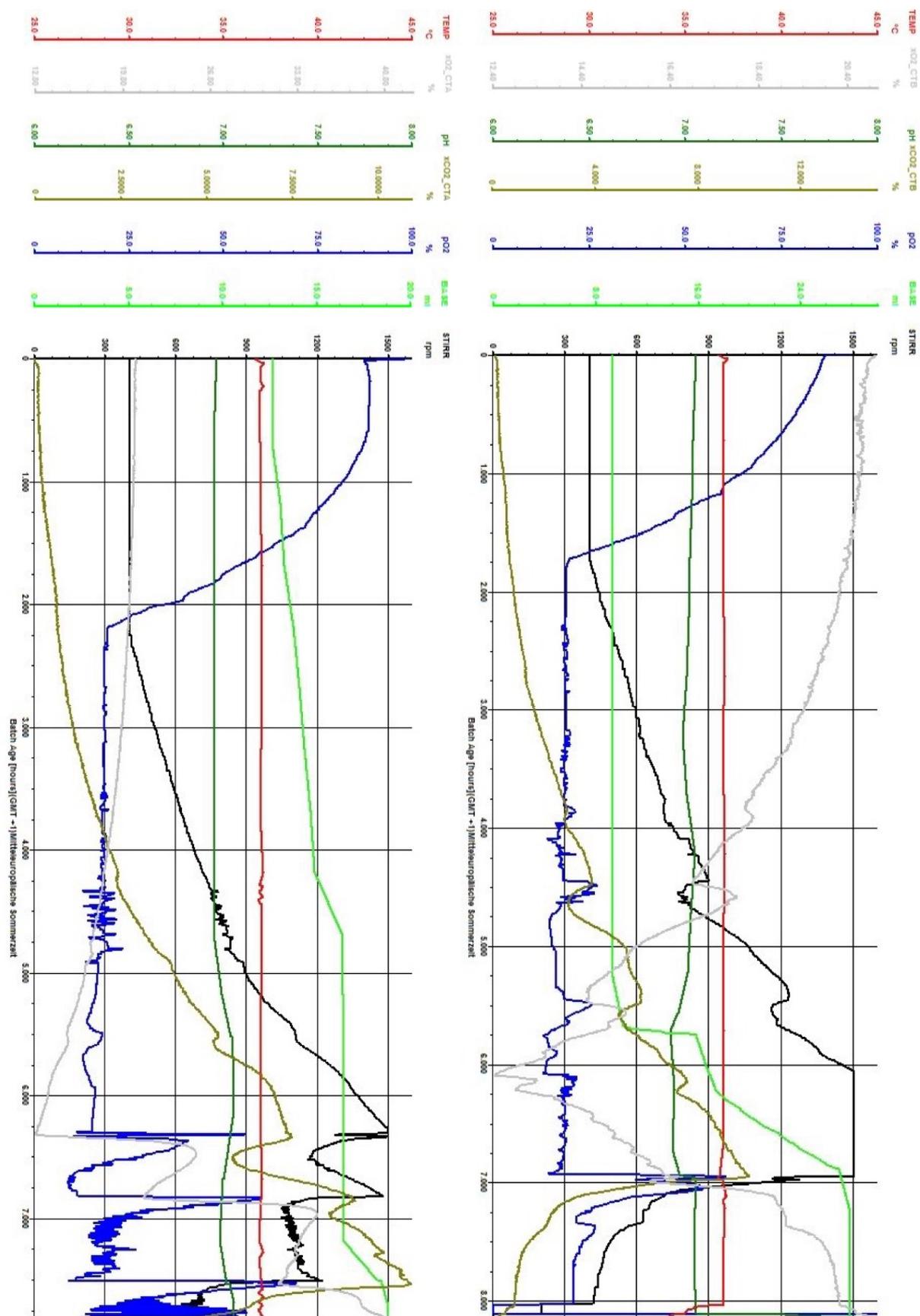


Abbildung C2: MFCS-Plots der Kultivierungen mit 25 g L⁻¹ Gly, 60 g L⁻¹ YE (links) und 25 g L⁻¹ Gly, 30 g L⁻¹ YE (rechts) im Medium

Anhang B: Übersicht der MFCS-Plots

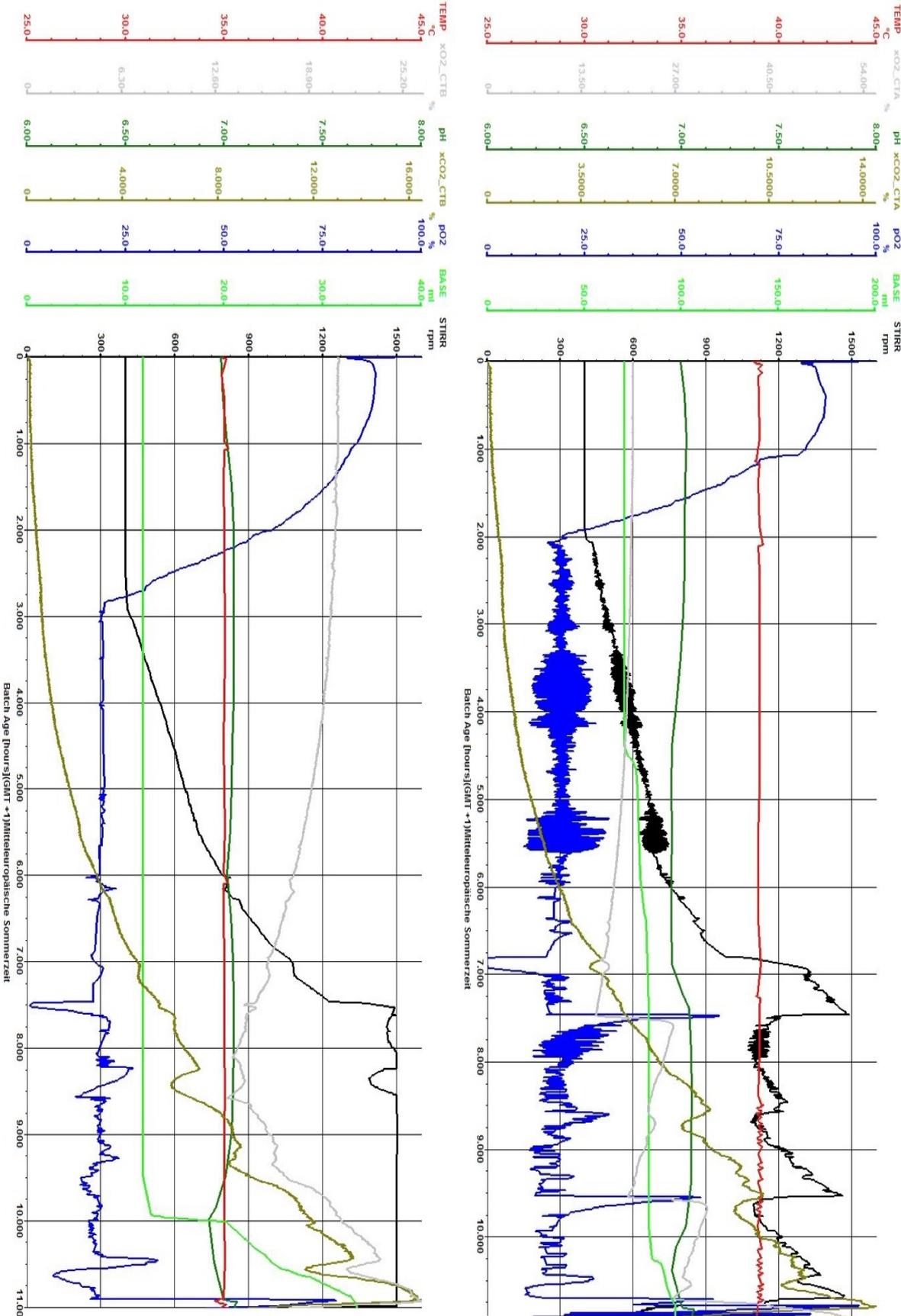


Abbildung C3: MFCS-Plots der Kultivierungen bei 35 °C (links) und 39 °C (rechts)

Anhang B: Übersicht der MFCS-Plots

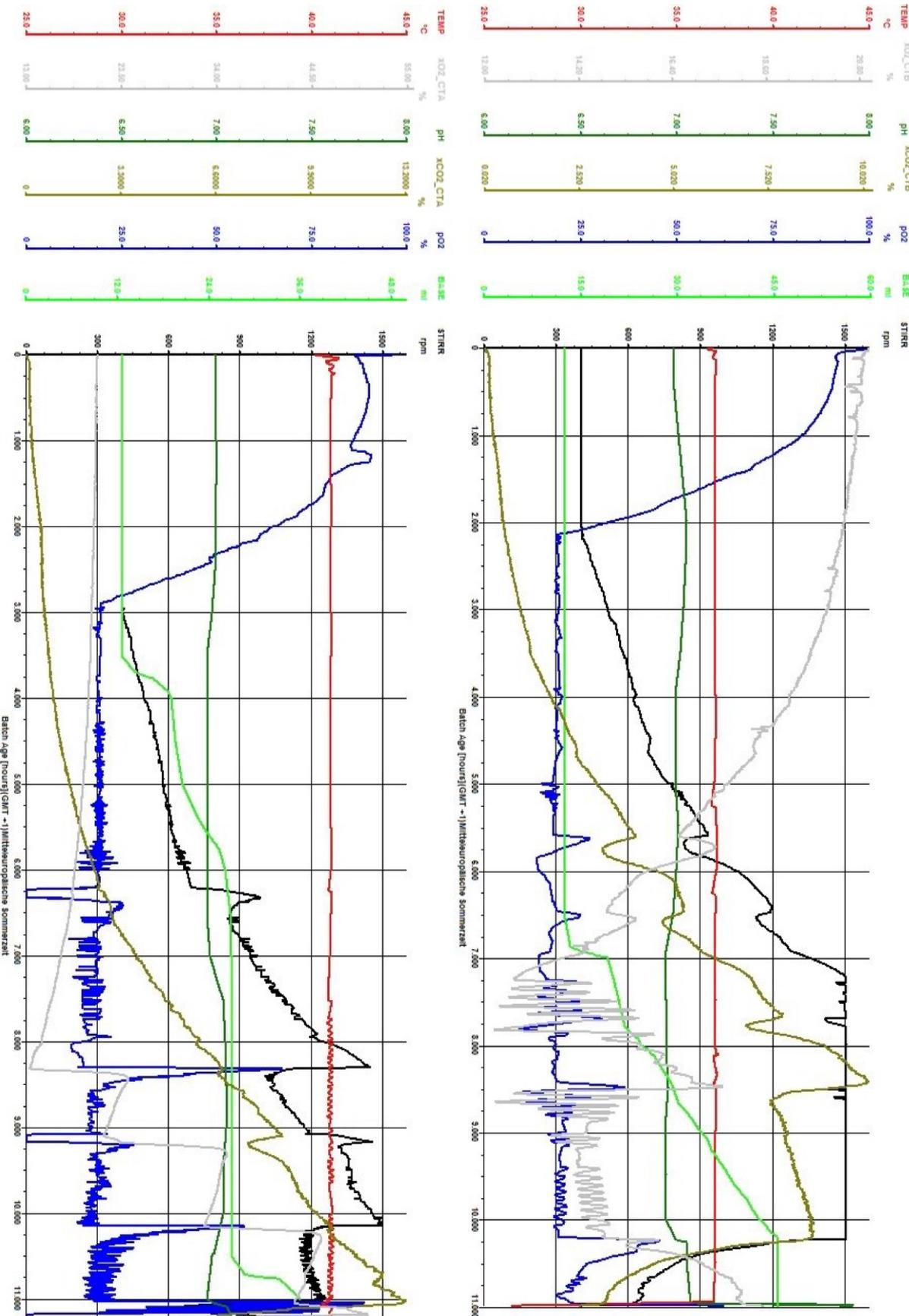


Abbildung C4: MFCS-Plots der Kultivierungen bei 41 °C (links) und 50 g L⁻¹ Gly, 30 g L⁻¹ YE im Medium (rechts)