



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Untersuchung von Prozessparametern zur Optimierung der pDNA-Ausbeute in kontinuierlicher Kultur am Konzept des Chemostaten

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von Roman Lemke
Hamburg
am 22. Mai 2013

Erstgutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Zweitgutachter: Dr. Christian Kaiser
Richter-Helm BioLogics Hamburg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist mit freundlicher Unterstützung des Unternehmens Richter-Helm BioLogics möglich geworden. Hierfür bedanke ich mich bei Richter-Helm BioLogics insbesondere dem gesamten Team der Prozessentwicklung, das stets für Fragen offen war und ein angenehmes und produktives Arbeiten miteinander ermöglicht hat.

Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen und Herrn Dr. Christian Kaiser danke ich für die Übernahme der Gutachten. Dr. Christian Kaiser möchte ich zudem für die Betreuung der praktischen Arbeiten sowie den Anmerkungen zur schriftlichen Ausarbeitung danken.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei allen, die mich in der Zeit meiner Abschlussarbeit unterstützt haben, ganz besonders bei meinen Eltern, die mir stets helfend zur Seite gestanden und mein Studium erleichtert haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Plasmid-DNA als Medikament	1
1.2 Zielsetzung.....	2
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Plasmid-DNA	4
2.3 Fermentationsverfahren.....	5
2.3.1 Bioprozessmodelle	6
2.3.2 Batch-Verfahren	7
2.3.3 Kontinuierliches Verfahren	9
2.3.4 Fed-Batch-Verfahren.....	18
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Fermentation.....	19
3.1.1 Vorkultur	19
3.1.2 Hauptkultur	20
3.1.3 Fermentationsmedien.....	21
3.1.4 Bioreaktor und Versuchsaufbau	24
3.2 Optische Dichte.....	29
3.3 Biotrockenmasse	29
3.4 Probenvorbereitung zur pDNA-Analytik	30
3.5 Restriktionsverdau	30
3.6 pDNA Analytik mittels AEX-Chromatographie.....	31
3.7 pDNA Analytik mittels Agarose-Gel-Elektrophorese	33
3.8 Glucose- und Acetat-Analytik mittels AEX-Chromatographie.....	34
4 Experimentelle Arbeiten und Diskussion	36
4.1 Vorversuche zum Aufbau des Chemostaten.....	38
4.2 pDNA Analytik mittels AEX-Chromatographie.....	40
4.3 pDNA Analytik mittels Agarose-Gel-Elektrophorese	44
4.4 Glucose- und Acetat-Analytik mittels AEX-Chromatographie.....	48
4.5 Variation der Temperatur	51

4.6 Variation der zellspezifischen Wachstumsrate	58
4.7 Variation der Zelldichte	67
4.8 Chemostat-Modell	73
5 Zusammenfassung	80
6 Ausblick	82
Literaturverzeichnis	83
Erklärung	85
Anhang	86

Abkürzungsverzeichnis

<i>A</i>	Peakfläche
<i>a</i>	Geradensteigung
<i>b</i>	Ordinatenabschnitt
AGE	Agarose-Gel-Elektrophorese
ccc	Covalently Closed Circular
<i>c</i>	Konzentration
<i>c_{Ace}</i>	Acetatkonzentration
<i>c_{Glu}</i>	Glucosekonzentration
<i>c_P</i>	Plasmidkonzentration
<i>c_S</i>	Substratkonzentration
<i>c_X</i>	Biomassekonzentration
<i>D</i>	Verdünnungsrate
<i>D_{crit}</i>	kritische Verdünnungsrate
DCU	Digital Control Unit
DSP	Downstream Processing
<i>F</i>	Volumenstrom
<i>g</i>	Gramm
<i>g_{P/X}</i>	zellspezifischer Plasmidgehalt
GMP	Good Manufacturing Practice
<i>h</i>	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>K_S</i>	Sättigungskonstante
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kalium-Di-Hydrogenphosphat
<i>L</i>	Liter
<i>m</i>	Meter
<i>m</i>	Masse
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
<i>N_{st}</i>	Rührerdrehzahl
NaCl	Natriumchlorid
<i>N_g</i>	Generationszahl

oc	Open Circular
OD	optische Dichte
pDNA	Plasmid-DNA
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
r	Reaktionsgeschwindigkeit
RCB	Research Cell Bank
rpm	Revolutions Per Minute
TAE	Tris-Acetat-EDTA
t	Zeit
t_d	Verdopplungszeit
t_e	Zeit zum Austausch des Reaktorvolumens
t_g	Generationszeit
$q_{S/X}$	Substratverbrauchsrate
q_{S/X_g}	Substratverbrauchsrate des Wachstums
q_{S/X_m}	Substratverbrauchsrate des Erhaltungstoffwechsel
USP	Upstream Processing
V	Volumen
$y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient
$y_{X/S}^*$	tatsächlicher Ausbeutekoeffizient
$^{\circ}C$	Grad Celsius
θ	Temperatur in Grad Celsius
μ	zellspezifische Wachstumsrate
μ_{max}	maximale zellspezifische Wachstumsrate

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Unternehmen Richter-Helm BioLogics am Standort Hamburg im USP-Bereich (USP – Upstream Processing) der Prozessentwicklung angefertigt. Richter-Helm BioLogics ist ein Auftragsunternehmen (contract manufacturing organization) der Biotech-Branche und produziert GMP-gerecht pharmazeutische Wirkstoffe in rekombinanten Mikroorganismen.

Der Produktionsprozess gliedert sich in zwei aufeinander folgende Schritte, dem Fermentationsprozess (USP), bei dem das Zielprodukt synthetisiert wird sowie dem folgenden Aufreinigungsprozess (DSP – Downstream Processing), bei dem der Wirkstoff von weiteren Substanzen abgetrennt und aufgereinigt wird.

Neben der Produktion gehört auch das Aufgabenfeld der Entwicklung zu den Leistungen des Unternehmens. Hier werden skalierbare Upstream- und Downstreamprozesse entwickelt. Es werden ausschließlich einzellige Mikroorganismen, hauptsächlich das Bakterium *Escherichia coli*, aber auch der Hefepilz *Pichia pastoris* eingesetzt.

Neben rekombinanten Proteinen nimmt auch die Plasmid-DNA (pDNA) eine immer wichtiger werdende Rolle als biotechnologisch produziertes pharmazeutisches Produkt ein. Plasmid-DNA, wird zunehmend in der Medizin bzw. medizinischen Forschung eingesetzt. Alleine im Jahr 2012 befanden sich 200 klinische Studien in Phase I bis III. [Daten: <http://clinicaltrials.gov>] Der Einsatz von pDNA als pharmazeutischer Wirkstoff wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.1 Plasmid-DNA als Medikament

Pharmazeutische Wirkstoffe bestehen aus jeglichen Molekülklassen oder deren Verbindungen. Während für die Pharmaindustrie jegliche Stoffe interessant sind, wurden pharmazeutisch wirksame Proteine durch ihre rekombinante Produktion hauptsächlich für die Biotechnologie interessant. Das bekannteste Beispiel ist wohl Insulin. Neben der rekombinanten Produktion von Proteinen beginnt auch die Herstellung von pDNA immer wichtiger zu werden. Neue Therapien setzen Plasmide im Zuge der Gentherapie und in Form von Vakzinen ein.

Die **Gentherapie** verwendet geklonte Gene zu therapeutischen Zwecken. Der Grundgedanke ist es, durch Einbringen von neuem Genmaterial eine Erkrankung zu bekämpfen. Die Ansätze sind unterschiedlich und die eingebrachte DNA-Sequenz könnte:

- mutierte oder defekte Gene ersetzen,
- regulatorischen Einfluss auf mutierte Gene haben,
- regulatorischen Einfluss auf Gene pathogener Erreger (z. B. HIV) haben,
- selbst pharmazeutisch wirksame Proteine exprimieren.

Der Gentransfer kann z. B. mittels Retroviren oder durch direkte Verabreichung eines Plasmids oder Inkubation der Zielzellen mit diesem erfolgen [Efferth 2006].

Plasmid-Vakzine basieren auf dem gleichen Grundgedanken. DNA soll in das Zielgewebe eingebracht werden, jedoch mit dem Ziel der aktiven Immunisierung. Dies geschieht durch die Expression eines Antigens und die darauf folgende Immunantwort [Ganten 2008].

Die konventionelle Impfung verwendet den abgeschwächten oder toten Erreger sowie entgiftete Toxine (Toxoide). Dabei besteht immer das Risiko, dass der Erreger oder die Toxoide dennoch pathogen wirken. Mit der Plasmid-Vakzinierung wird nur das Antigen exprimiert, welches meist selbst keine pathogene Wirkung hat, wodurch das Risiko von Komplikationen deutlich minimiert wird.

Die Sicherheit von DNA-Impfstoffen konnte bereits sowohl im Tiermodell [Fazi 2004] als auch in klinischen Studien am Menschen [MacGregor 1998] demonstriert werden.

1.2 Zielsetzung

Um kommerziell ein Plasmid-Medikament zur Impfung oder Gentherapie zu vertreiben, bedarf es zu Beginn eines optimierten Produktionsprozess mit möglichst hoher Ausbeute. Der Produktionsprozess ist in dieser Arbeit die Fermentation mit rekombinantem *E. coli*.

Die Fed-Batch-Fermentation wird beinahe ausschließlich zur Produktion von pDNA eingesetzt, da diese im Vergleich zum Batch-Verfahren bessere zellspezifische Ausbeuten liefert. Bei konstanten Parametern im Fed-Batch-Prozess hat eine niedrigere zellspezifische Wachstumsrate, welche sich im Batch-Verfahren nicht regulieren lässt, einen positiven Effekt auf die Ausbeute [Singer 2009].

Auch die Temperatur wird im Zuge von Fed-Batch-Verfahren variiert, um die Plasmidausbeute zu verbessern [Carnes 2006, Singer 2009].

Um einen Produktionsprozess mit maximaler Ausbeute zu entwickeln, müssen die optimalen Einstellungen für die verschiedenen Parameter ermittelt werden. Außerdem muss ein Produktionsprozess robust sein und auch bei geringen Schwankungen der Parameter vergleichbare Ausbeuten liefern. Optimale Prozessparameter, aber

deutliche Produkteinbußen bei geringen Abweichungen der Parameter von ihrem Sollwert könnten zu erheblichen Verlusten führen. Der Prozess könnte damit aus wirtschaftlichen und regulatorischen Gründen nicht in der Produktion eingesetzt werden. Daher ist es für die Prozessentwicklung äußerst wichtig, neben den optimalen Bedingungen auch die Auswirkungen einer Parameterabweichung vom Sollwert zu ermitteln. Damit kann letztendlich die optimale Einstellung eines Parameters festgelegt werden, welche nicht unbedingt die maximale Ausbeute liefert, aber einen robusten Prozess garantiert.

Um den Einfluss verschiedener Parameter sowie Auswirkungen einer Parameterabweichung zu ermitteln, sind daher äußerst viele Versuche nötig, da im Zuge der Entwicklung eines Fed-Batch-Verfahrens für jede neue Parametereinstellung ein neuer Versuch durchgeführt werden muss. Dies ist mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden.

Mit dem Ziel, diesen Arbeitsaufwand zu reduzieren, soll in der vorliegenden Arbeit ein kontinuierliches Verfahren im Chemostat-Reaktor aufgebaut und in Betrieb genommen werden. Mit der Etablierung dieses Fermentationsprozesses sollen Untersuchungen von Prozessparametern durchgeführt werden, die den Einfluss dieser auf die Produktausbeute beschreiben. Aufgrund der kontinuierlichen Prozessführung können unterschiedliche Parameter und deren Änderungen während eines einzelnen Versuchs untersucht werden. Damit können Rückschlüsse zur Optimierung der pDNA-Ausbeute gemacht werden und auf einen Fed-Batch-Prozess zur Produktion angewendet werden.

Zu Beginn muss das Laborfermentersystem BIOSTAT[®] B für die kontinuierliche Prozessführung aufgebaut und funktionell ausgestattet werden. Im Anschluss soll der kontinuierliche Prozess gestartet werden und bei konstanter Verdünnungsrate ein Fließgleichgewicht eingestellt werden. An der laufenden Kultivierung gilt es, den Einfluss von Prozessparametern auf die Plasmidausbeute zu untersuchen. Hierzu werden Variationen der Temperatur, der zellspezifischen Wachstumsrate und der Zelldichte durchgeführt. Anhand der begleiteten Analytik sollen dann Aussagen zum Optimum der untersuchten Parameter für einen pDNA-Prozess getroffen werden. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen für diese Arbeit erläutert.

2 Theoretische Grundlagen

Die wichtigsten Bestandteile eines Produktionsprozess sind der produzierende Organismus, das Produkt selbst sowie der Prozess. In dieser Arbeit findet als Organismus *E. coli* Anwendung, das Produkt ist Plasmid-DNA und der eingesetzte Prozess die Fermentation. Im Folgenden werden deren theoretische Grundlagen erläutert.

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein gram-negatives stäbchenförmiges Bakterium und der am häufigsten eingesetzte Mikroorganismus zur Produktion industrieller und pharmazeutischer Proteine. Zum rekombinanten Einsatz von *E. coli* wird ein Plasmid in die Zellen transformiert, welches die gewünschte Gensequenz zur Expression des Zielproteins enthält. Da sich das Bakterium in der Industrie und Forschung als rekombinanter Organismus durchgesetzt hat, liegt es nahe, diesen auch für die Produktion von Plasmiden zu verwenden. Der Einzeller und dessen Genom ist gut erforscht und die Zahl an Vektoren und neuer Stämme steigt ständig. Die wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Stämme sind *E. coli* BL21 und K12 sowie deren Derivate [Terpe 2006].

Einer dieser Derivat-Stämme ist der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm DH10B. Dieser zeichnet sich durch verschiedene Mutationen aus. So wird der Abbau von zellfremder DNA durch Mutationen verschiedener Gene verhindert, die für Restriktionsnukleasen codieren und dadurch z. B. fremde Methylierungsmuster der DNA nicht erkennen (*mcrA*-Gen). Außerdem verhindern bestimmte Genmutationen (z.B. *recA1*) die homologe Rekombination, wodurch das Genom vor Mutationen durch den Einbau von Gensequenzen geschützt ist. Dies ist nur ein Auszug der betroffenen Gensequenzen [http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes (12.05.2013)].

2.2 Plasmid-DNA

Plasmide sind extrachromosomale ringförmig geschlossene DNA Doppelstränge und liegen meist in mehreren Kopien pro Zelle vor. Es sind verschiedene Sequenzen auf einem Plasmid enthalten. Zum einen die Sequenz für den Replikationsstart, auch Origin genannt. Diese Sequenz entscheidet über die Kopienzahl eines Plasmids und definiert das High-Copy-Plasmid mit mehreren hundert Kopien pro Zelle sowie das Low-Copy-Plasmid mit weniger als 20 Kopien pro Zelle. Die Plasmidreplikation ist

unabhängig von der Replikation des Genoms. Neben dem Replikationsursprung ist ein Resistenzgen, wie z. B. das für die Kanamycin-Resistenz, typisch. Es codiert für ein Protein, das zur Inaktivierung von Kanamycin führt. Damit können Zellen, welche dieses Plasmid besitzen, in Kanamycin-Medien überleben, während plasmidfreie Zellen lysieren. Durch den Einsatz von Kanamycin kann gewährleistet werden, dass die lebenden Zellen im Besitz des Plasmids sind. Außerdem enthalten Plasmide eine Klonierungsstelle, an der ein Fremdgen (Insert) eingefügt wird und durch einen Promoter im Organismus exprimiert wird. [Mülhardt, 2009]

Dieser Promoter ist auch für die Expression des Zielproteins im Zuge einer Gentherapie oder DNA-Vakzinierung im Zielgewebe nötig. Dabei bietet sich der Einsatz eines konstitutiv aktiven Promoters an [Fazio 2004, MacGregor 1998]. Dieser Promoter führt zu einer kontinuierlichen Expression des Zielproteins und die Expression muss nicht erst induziert werden. Damit wird das Zielprotein im Zielgewebe automatisch und andauernd exprimiert.

Die Form, in der ein Plasmid vorliegt, kann variieren und hängt von der helikalen Windung des Plasmids ab. Da das Plasmid üblicherweise als kovalent geschlossener zirkulärer (covalently close circular - ccc) DNA-Doppelstrang vorliegt, kommt es aufgrund der helikalen Windung zu einer Windung des Doppelstrangs. Dieser verwundene Doppelstrang ist besonders kompakt und wird als superspiralisierte DNA oder ccc-DNA bezeichnet. Kommt es zu einem Strangbruch der DNA, entspannt diese sich zu einem offenen zirkulären (open circular – oc) DNA-Doppelstrang. Ein doppelter Strangbruch führt zur linearen Form des Plasmids. Eine weitere Form ist das Dimer. Sie entsteht durch Replikationsfehler oder homologe Rekombination zweier Plasmide [Bates 2005].

2.3 Fermentationsverfahren

Für Produktionsverfahren mit rekombinanten *E. coli* hat sich die Kultivierung der Zellen in flüssiger Phase in Bioreaktoren etabliert. Der Bioreaktor ist ein abgegrenzter Raum, in dem katalytische Stoffumwandlungen geschehen. Durch einen definierten Wärme- und Stoffaustausch des Bioreaktors mit der Umgebung lässt sich der Prozess zielgerichtet steuern. Diese Stoffwechselforgänge innerhalb der Zelle sowie die Wärme- und Stoffaustauschvorgänge, welche den Fermentationsprozess definieren, lassen sich im Wesentlichen durch grundlegende Bioprozessmodelle beschreiben. Optimaler Weise wird der Reaktor gerührt und als ideal durchmischt betrachtet. Damit ist die Zusammensetzung der Flüssigkeit im Reaktor überall die

gleiche, wodurch die mathematische Beschreibung wesentlich vereinfacht wird. Im Folgenden werden verschiedene Fermentationsverfahren beschrieben und die mathematischen Grundlagen dargestellt, welche im Wesentlichen Anlehnungen an die Kinetik und Prozesstechnik von [Chmiel 2011] sind.

2.3.1 Bioprozessmodelle

Um das Verhalten eines Bioprozesses zu beschreiben, bedient man sich verschiedener mathematischer Modelle, die sowohl Aspekte der Biokinetik als auch Aspekte des Reaktors berücksichtigen. Die Grundlage folgender Modelle bildet die Massenbilanz (2.1). Sie beschreibt die Änderung einer Masse im System mit der Zeit durch die Zu- sowie Abführung dieser Masse und deren Umsatz mit der Zeit. Indizes (*ein* bzw. *aus*) kennzeichnen für den Volumenstrom sowie für die Konzentration einer Substanz *i*, den Eintritt in das System bzw. deren Austritt aus diesem. Der Transfer einer Substanz aus der Flüssig- in die Gasphase und das zugeführte Volumen der Korrekturmittel wird hierbei vernachlässigt.

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d[c_i(t) \cdot V(t)]}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i_ein} - F_{aus} \cdot c_{i_aus}(t) + r_i(t) \cdot V(t) \quad (2.1)$$

Mit	m_i :	Masse der Substanz <i>i</i>	[g]
	t :	Zeit	[h]
	c_i :	Konzentration der Substanz <i>i</i>	[gL ⁻¹]
	V :	Kulturvolumen	[L]
	F :	Volumenstrom	[Lh ⁻¹]
	r_i :	Reaktionsgeschwindigkeit der Substanz <i>i</i>	[gh ⁻¹ L ⁻¹]

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird im Folgenden als positiv für Produkte und als negativ für Substrate angenommen.

Das Zellwachstum r_X wird als autokatalytische Reaktion betrachtet und ergibt sich unter der Annahme das Zellwachstum sei die einzige Eigenschaft der Zellmasse.

$$r_X(t) = \mu(t) \cdot c_X(t) \quad (2.2)$$

Mit	μ :	zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
	c_X :	Biomassekonzentration	[gL ⁻¹]

In Anlehnung an die Michaelis-Menten-Gleichung ergibt sich vereinfacht das Monod-Modell.

$$\mu(t) = \mu_{max} \cdot \frac{c_S(t)}{c_S(t) + K_S} \quad (2.3)$$

Mit	μ_{max} :	maximale zellspezifische Wachstumsrate	$[h^{-1}]$
	c_S :	Substratkonzentration	$[gL^{-1}]$
	K_S :	Sättigungskonstante	$[gL^{-1}]$

Die Sättigungskonstante K_S von *E. coli* für das Substrat Glucose wird in der Literatur mit unterschiedlichen Werten von $0,22 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ (entspricht ca. $0,004 \text{ gL}^{-1}$) [Monod 1949] bis $0,05 \text{ gL}^{-1}$ [Xu 1999] angegeben. Für $\mu \leq \frac{\mu_{max}}{2}$ ($K_S = c_S$) liegt die Glucosekonzentration unterhalb eines Wertes, welcher mit den hier zur Verfügung stehenden analytischen Methoden zu bestimmen ist.

Der Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ beschreibt das Verhältnis von Biomassezuwachs zu Substratverbrauch und ergibt sich auch hier aus der Annahme, die einzige Eigenschaft der Zellmasse sei das Wachstum.

$$y_{X/S} = \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} \quad (2.4)$$

Damit wird im selben Maße Substrat verbraucht, wie Zellmasse generiert wird.

$$r_X = -r_S \cdot y_{X/S} \quad (2.5)$$

2.3.2 Batch-Verfahren

Das Batch-Verfahren findet als Vorkultur für einen folgenden Prozess und auch als Hauptkultur im Schüttelkolben sowie im Bioreaktor Anwendung.

Im Schüttelkolben ist aufgrund des einfachen Aufbaus kein kontrollierter Stoffaustausch möglich. Nur der definierte Wärmeaustausch ist durch die geregelte Umgebungstemperatur im Schüttelinkubator gewährleistet.

Im Falle eines Reaktorverfahrens beschränkt sich der Wärme- und Stoffaustausch

auf die Temperierung, die Begasung, also die Zufuhr von Sauerstoff und damit auch die Abfuhr von CO_2 , und auf die Zufuhr von Korrekturlösungen zur pH-Wert-Regelung und Schaumminderung.

Das Batch-Verfahren ist damit das einfachste und am häufigsten genutzte Fermentationsverfahren und steht im geringsten Maße mit der Umgebung im Austausch.

Die Medienkomponenten liegen für die Prozessdauer im Überschuss vor ($c_s \gg K_s$), wodurch der Sättigungsterm ($\frac{c_s}{c_s + K_s}$) in Gleichung (2.3) gegen Eins strebt, und den Zellen das Wachstum mit maximaler zellspezifischer Wachstumsrate ($\mu = \mu_{max}$) über beinahe den gesamten Prozess ermöglicht wird.

Da es zu keiner Zu- und Abfuhr von Flüssigkeit kommt (Korrekturmittel werden vernachlässigt) und das Volumen als konstant betrachtet wird, ergibt sich aus Gleichung (2.1) für die Biomassebilanz im Batch-Verfahren,

$$\frac{dc_X(t)}{dt} = r_X(t) \quad (2.6)$$

und mit Gleichung (2.2),

$$\frac{dc_X(t)}{dt} = c_X(t) \cdot \mu(t) \quad (2.7)$$

Im Batch-Verfahren mit $\mu = \mu_{max} = \text{konstant}$, folgt die Lösung der Differentialgleichung durch Trennung der Variablen und Integration.

$$c_X(t) = c_X(t = 0) \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (2.8)$$

Das Zellwachstum verläuft unter diesen Bedingungen unlimitiert und exponentiell. Jedoch nimmt mit steigender Zellkonzentration die Substratkonzentration ab bis letztendlich mindestens ein Substrat nicht mehr im Überschuss vorliegt und dieses das Wachstum limitiert. Die zellspezifische Wachstumsrate nimmt weiter ab, bis das Substrat komplett aufgebraucht ist und damit die Wachstumsphase endet. In den meisten Fällen endet der Prozess zu diesem Zeitpunkt oder die Zufütterung von Nährmedium beginnt, womit der Prozess in eine neue Phase mit neuer Strategie startet. Mögliche Strategien sind in den folgenden zwei Kapiteln erläutert.

2.3.3 Kontinuierliches Verfahren

Das kontinuierliche Verfahren ist durch die kontinuierliche Zufuhr von Nährlösung in den Reaktor und Abfuhr von Suspension aus dem Reaktor gekennzeichnet. Außerdem charakteristisch für den kontinuierlichen Betrieb ist, dass sich ein Fließgleichgewicht einstellt. Hierbei bleiben Zufluss und Abfluss für die Dauer einer Prozessphase gleich und konstant,

$$F_{ein} = F_{aus} = F \quad (2.9)$$

und somit bleibt auch das Volumen konstant. Die Verdünnungsrate D ,

$$D = \frac{F}{V} \quad (2.10)$$

(engl. dilution rate) ergibt sich aus dem Quotient von Zufütter- bzw. Ernterate F und dem Kulturvolumen V . Im Fließgleichgewicht bleiben außerdem alle Konzentrationen konstant. Der Zustand wird als pseudostationär bezeichnet (engl. steady state) und ist zeitinvariant. Für die Biomassebilanz gilt somit,

$$\frac{dc_X \cdot V}{dt} \equiv 0 \quad (2.11)$$

und mit Gleichung (2.2), (2.9) und (2.10)

$$\mu \cdot c_X = D(c_{X_{aus}} - c_{X_{ein}}) \quad (2.12)$$

Das Medium ist steril und die Konzentrationen c_i , im als ideal betrachteten Reaktor, entsprechen denen unmittelbar am Ausgang. Somit lässt sich das Gleichgewicht,

$$\mu \cdot c_X = D \cdot c_X \quad (2.13)$$

aufstellen und mit $c_X = 0$, was unsinnig für einen Bioprozess wäre, sowie mit $\mu = D$ lösen.

Damit hat der kontinuierliche Prozess den Vorteil, die zellspezifische Wachstumsrate über eine operative Größe einstellen und variieren zu können.

Der Volumenstrom F ergibt sich durch das geförderte Volumen ΔV_F pro Zeit Δt .

$$F = \frac{\Delta V_F}{\Delta t} \quad (2.14)$$

Entspricht das geförderte Volumen ΔV_F dem Reaktorvolumen V , ergibt sich mit Gleichung (2.10) die Zeit t_e , die benötigt wird um das Reaktorvolumen im Mittel einmal auszutauschen.

$$t_e = \frac{1}{D} \quad (2.15)$$

An Gleichung (2.12) ist zu erkennen, dass im gleichen Maße Biomasse entsteht, wie ausgetragen wird. Damit ergibt sich die entstandene Biomasse Δm_x .

$$\Delta m_x(t) = D \cdot c_x \cdot \Delta V_F \cdot \Delta t \quad (2.16)$$

Zum Zeitpunkt t_e ($\Delta t = t_e = \frac{1}{D}$) entspricht das geförderte Volumen V_F dem Kulturvolumen V . Damit entspricht die entstandene Biomasse Δm_x ,

$$\Delta m_x(t_e) = c_x \cdot V = m_x \quad (2.17)$$

der Biomasse m_x , welche im Reaktor vorliegt und, aufgrund der Zeitinvarianz, auch zum Zeitpunkt $t = 0$ vorlag. Somit ergibt sich im Fließgleichgewicht eine konstante Verdopplungszeit t_d und unter der Annahme, die Zellen seien identisch und das Wachstum beschränke sich ausschließlich auf die Zellzahl, auch eine konstante Generationszeit t_g .

$$t_d = t_g = t_e = \frac{1}{D} = \frac{1}{\mu} \quad (2.18)$$

Somit verdoppelt sich die Kultur in der Zeit $t = t_e$ einmal und nach dieser Zeit besteht der Großteil der Population aus Zellen die sich in dieser Zeit gebildet haben. Denn mit dem Austausch des Reaktorvolumens (Gleichung (2.15)) ist auch der Großteil der Zellen, aus dem die Population zum Zeitpunkt $t = 0$ bestand, ausgewaschen.

Damit besteht eine Kultur zum Zeitpunkt $t = t_e$ hauptsächlich aus Zellen, die unter dem Einfluss der Parametereinstellungen zum Zeitpunkt $t = 0$ entstanden sind und nur diese Parametereinstellung kennen, also repräsentativ für diese sind. Vorausgesetzt, dass die Parameter für diese Zeit konstant waren.

Mit dem Prozessalter t_p ergibt sich die Zahl der Generationszyklen N_g welche die Kultur im Laufe der Fermentation durchlaufen hat.

$$N_g = t_p \cdot D \quad (2.19)$$

Für die Massebilanz des Substrats gilt Gleichung (2.11) genauso. Analog zu Gleichung (2.12) ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit des Substrats r_S ,

$$r_S = D(c_{S_aus} - c_{S_ein}) \quad (2.20)$$

und daraus mit Gleichung (2.2) und (2.5) die Biomassekonzentration c_X .

$$c_X = y_{X/S} \cdot (c_{S_ein} - c_{S_aus}) \quad (2.21)$$

Mit $\mu = D$ ergibt sich aus Gleichung (2.3) die Substratkonzentration im Reaktor.

$$c_S = K_S \cdot \frac{D}{\mu_{max} - D} \quad (2.22)$$

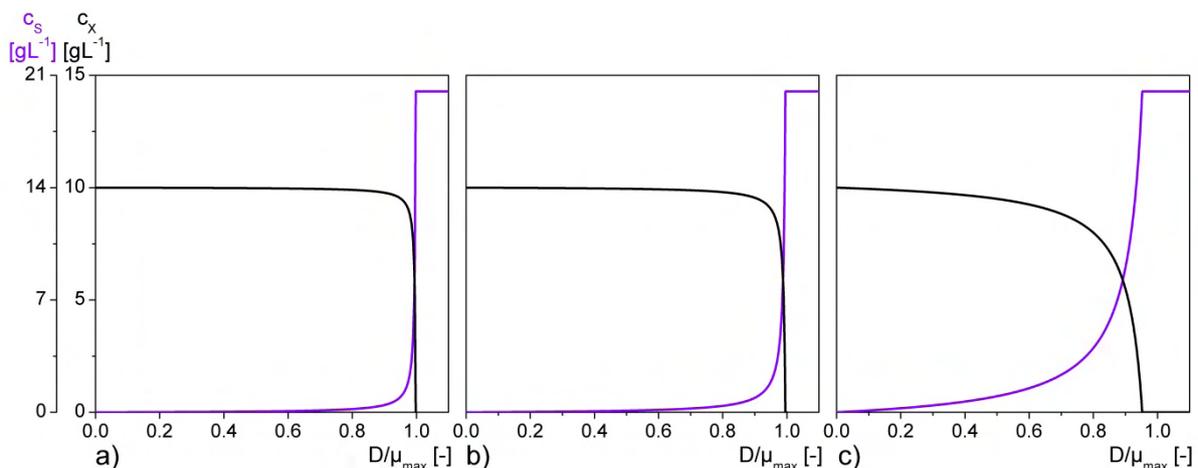


Abbildung 2.1: cD-Diagramm. Mit $y_{X/S} = 0,5 \text{ gg}^{-1}$, $c_{S_ein} = 20 \text{ gL}^{-1}$ und einem K_S für *E. coli* auf Glucose von a) $0,05 \text{ gL}^{-1}$, b) $0,1 \text{ gL}^{-1}$, c) $1,0 \text{ gL}^{-1}$.

In Abbildung 2.1 ist deutlich zu erkennen, dass mit steigendem D bzw. μ ($\mu = D$) die Zellkonzentration bis zu der kritischen Verdünnungsrate D_{crit} , an der sie Null wird, abnimmt, da hier auf Grund der hohen Verdünnungsrate das Zellwachstum das Auswaschen der Zellen nicht mehr kompensieren kann. Die Substratkonzentration steigt mit steigender Verdünnungsrate. Anhand der Graphen wird deutlich, welchen Einfluss K_s hat. Wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben, kann für $\mu \leq \frac{\mu_{max}}{2}$ ($c_S = K_S$) die Substratkonzentration nicht bestimmt werden und wird als vernachlässigbar klein angenommen.

An Gleichung (2.22) ist zu erkennen, dass sich durch Regulierung der Verdünnungsrate und damit der Regulierung des Substrats bzw. einer **Chemikalie**, ein pseudostationärer Zustand einstellen lässt. Davon leitet sich der Begriff **Chemostat** ab. Für den linken Bereich mit flachem Kurvenverlauf ändern sich die Konzentrationen im Reaktor mit der Verdünnungsrate kaum. Kleinere Schwankungen des Volumens oder des Volumenstroms, welche Einfluss auf die Verdünnungsrate haben, führen somit zu keiner signifikanten Änderung der Konzentrationen im Reaktor und bringen das System nicht aus dem Fließgleichgewicht. In diesem Bereich verhält sich das Chemostat-System stabil und die Regulierung anhand der Verdünnungsrate bzw. Zufüterraterate lässt sich hier praktisch realisieren.

Stärkere Eingriffe in das System haben Einfluss auf das Fließgleichgewicht und es kann, abhängig von der Störung, mehrere Stunden bis hin zu einem Tag oder länger dauern, bis sich das Fließgleichgewicht wieder eingestellt hat.

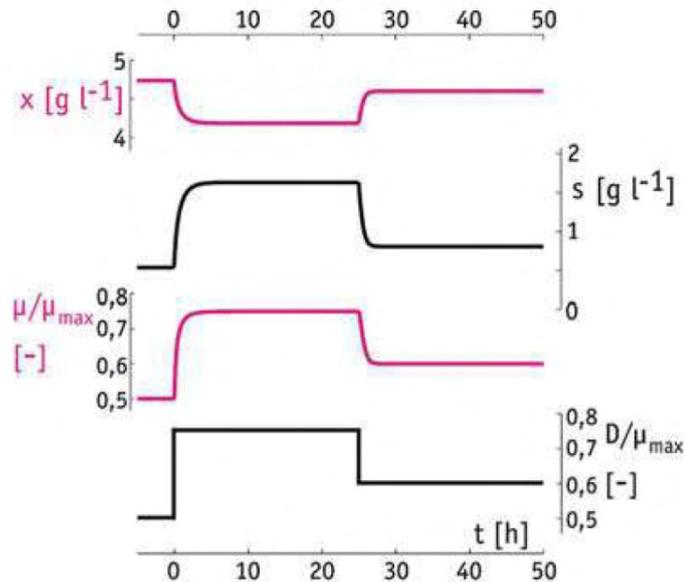


Abbildung 2.2: Verhalten des Chemostat-Systems bei Erhöhung sowie Verringerung der Verdünnungsrate. Quelle [Chmiel 2011].

Abbildung 2.2 zeigt das Verhalten des Systems, wenn durch Änderung der Verdünnungsrate das Fließgleichgewicht gestört wird. Eine Änderung der Pumprate auf einen höheren Wert führt sofort zu einer Erhöhung der Verdünnungsrate. Dieser Eingriff hat wiederum Einfluss auf die Zelldichte, die Substratkonzentration und die zellspezifische Wachstumsrate.

Der oberste Graph in Abbildung 2.2 zeigt die Auswirkung des Shifts auf die Zellkonzentration (hier x). Eine höhere Verdünnungsrate ($D > \mu$) trägt im höheren Maße Zellmasse aus dem Reaktor aus. Dies können die Zellen nicht sofort kompensieren, da die zellspezifische Wachstumsrate von der Substratkonzentration im Reaktor abhängt (vgl. Gleichung (2.3)). Somit nimmt die Zellkonzentration mit einer höheren Verdünnungsrate zuerst ab.

Das Verhalten der Substratkonzentration (hier s) ist unter dem Graphen für die Zellmasse dargestellt. Da die Biomasse wie beschrieben abnimmt und somit weniger Zellen das Substrat verbrauchen, kommt es nach dem Shift zur Zunahme der Substratkonzentration.

Dies hat wiederum Einfluss auf die zellspezifische Wachstumsrate, da diese von der Substratkonzentration abhängt. Die zellspezifische Wachstumsrate ist normiert auf μ_{max} unter dem Graph für die Substratkonzentration dargestellt. Aufgrund des Substratanstiegs steigt auch die zellspezifische Wachstumsrate.

Da die zellspezifische Wachstumsrate nach dem Shift steigt, werden schneller neue

Zellen gebildet und das Auswaschen der Zellen wird durch die erhöhte Verdünnungsrate allmählich kompensiert. Die Zelldichte stellt sich bei einem konstanten Wert ein.

Aus der konstanten Zelldichte resultiert ein konstanter Substratverbrauch und die Substratkonzentration steigt nicht mehr an. Somit stellt sich auch die Substratkonzentration bei einem konstanten Wert ein und damit auch μ .

Das Fließgleichgewicht stellt sich also bei niedrigerer Zellkonzentration, höherer Substratkonzentration und damit auch höherer zellspezifischer Wachstumsrate ein.

Auch der Shift auf eine niedrigere Verdünnungsrate ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Mit niedrigerer Flussrate ($D < \mu$) werden weniger Zellen ausgetragen und die Zellkonzentration steigt.

Die höhere Zellkonzentration verbraucht mehr Substrat, wodurch es zu einer Abnahme der Substratkonzentration kommt.

Da die zellspezifische Wachstumsrate direkt von der Substratkonzentration abhängt nimmt auch μ ab.

Letztendlich stellen sich die Zelldichte, damit die Substratkonzentration und damit die zellspezifische Wachstumsrate auf einen konstanten Wert ein.

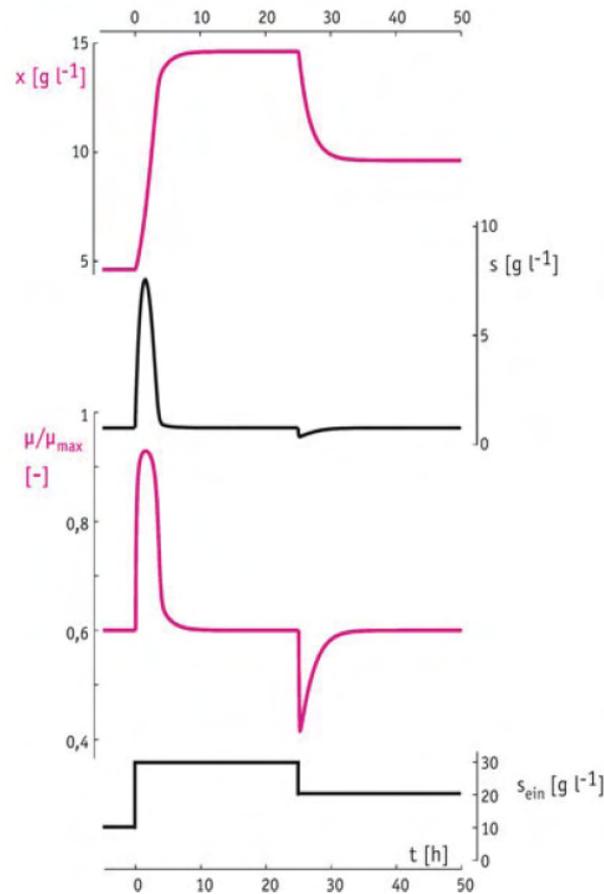


Abbildung 2.3: Verhalten des Chemostat-Systems bei Erhöhung sowie Verringerung der Glucosezulaufkonzentration. Quelle [Chmiel 2011].

Abbildung 2.3 zeigt das Verhalten des Systems nach einer Störung des Fließgleichgewichts durch Änderung der Substratzulaufkonzentration (hier s_{ein}).

Der zweite obere Graph in Abbildung 2.3 stellt die Substratkonzentration im Reaktor dar. Durch die höhere Substratzulaufkonzentration wird mehr Substrat zugeführt als durch die momentan vorliegende Biomasse verbraucht wird. Dadurch kommt es zur Zunahme der Substratkonzentration.

Die zellspezifische Wachstumsrate ist unter dem Graph der Substratkonzentration dargestellt und ist von dieser abhängig. Sie nimmt in Folge der höheren Substratkonzentration zu.

Die Zellmasse wächst nun schneller ($\mu > D$), womit mehr Zellen entstehen als ausgewaschen werden und die Zellmassekonzentration (im obersten Graph dargestellt) steigt.

Durch Zunahme der Zellmasse steigt der Substratverbrauch und die Substratkonzentration nimmt wieder ab und nähert sich ihrem Ausgangswert.

Durch Abnahme der Substratkonzentration nimmt auch wieder die zellspezifische Wachstumsrate ab und stellt sich bei ihrem Ausgangswert ein.

Das Fließgleichgewicht stellt sich bei gleicher Wachstumsrate und Substratkonzentration wie vor dem Shift und höherer Zellkonzentration ein.

Eine Verringerung der Substratkonzentration im Feed-Medium hat den gegenteiligen Effekt. Da weniger Substrat zugeführt wird, als die Zellen verbrauchen, nimmt die Substratkonzentration ab. Das führt zur Abnahme der zellspezifischen Wachstumsrate ($\mu < D$) und wiederum dazu, dass weniger Zellen entstehen als mit dem Volumenstrom ausgetragen werden. Die Zellkonzentration nimmt ab.

Mit sinkender Zellkonzentration wird wieder weniger Substrat verbraucht. Die Substratkonzentration steigt und stellt sich langsam wieder bei ihrem alten Wert ein. Damit steigt auch die zellspezifische Wachstumsrate und stellt sich bei ihrem alten Wert ein ($\mu = D$). Dies führt dazu, dass keine Zellen mehr ausgewaschen werden und die Zelldichte sich bei einem niedrigeren Wert als vor dem Shift einstellt.

Die Zeit t_c , die das System braucht um nach einem Konzentrationsshift im Feed-Medium wieder ins Fließgleichgewicht zu kommen, ergibt sich aus der Massenbilanz, wobei das Volumen weiterhin konstant und das zugeführte Medium steril ist ($c_{x, \text{ein}} = 0$). Außerdem gilt Gleichung (2.11) für die Zeit, bis das Fließgleichgewicht wieder eingestellt ist, nicht mehr.

$$\frac{dc_X(t)}{dt} = \mu \cdot c_X(t) - D \cdot c_X(t) \quad (2.23)$$

Eigentlich kommt es zu einem Anstieg, gefolgt von einem Abfall der zellspezifischen Wachstumsrate auf den Ausgangswert. Wird ein konstantes $\mu > D$ angenommen, kann nach Variablentrennung und Integration die Einstellzeit t_c berechnet werden.

$$t_c = \frac{\ln(c_X(t = t_c)/c_X(t = 0))}{\mu - D} \quad (2.24)$$

Die dargestellte mathematische Beschreibung zeigt, dass sich im Chemostat auf einfache Art und Weise die zellspezifische Wachstumsrate und die Zelldichte variieren lassen. Gegenüber kleineren Schwankungen der Verdünnungsrate ist das System nicht anfällig. Andere Parameter, wie z. B. die Temperatur oder der pH-Wert, haben in einem zellspezifischen Rahmen nur geringen Einfluss auf μ_{max} und damit

keinen wahrnehmbaren Einfluss auf c_S (siehe Formel (2.22)) und damit auch nicht auf c_X (siehe Formel (2.21)).

Durch die Variation eines Parameters in verschiedenen Phasen kann der Einfluss des Parameters (bei sonst gleichen Bedingungen) auf z. B. die Produktausbeute oder Zellkonzentration untersucht werden. Neben diesen können natürlich viele weitere Faktoren beobachtet werden. Durch Vergleich der Phasen können dann Rückschlüsse auf das Optimum des Parameters für einen Fermentationsprozess getroffen werden. Diese Analysen lassen sich zwar auch im Batch- oder Fed-Batch-Verfahren durchführen. Dies ist aber mit einem deutlich höheren Arbeitsaufwand verbunden, da für jede Parameteränderung eine neue Kultivierung gestartet werden muss.

Neben dem Vergleich der Phasen lässt sich durch zeitliche Betrachtung einer Phase das Kulturverhalten während dieser beschreiben. Damit zeigt sich auch direkt der Einfluss einer Parameteränderung auf die Kultur.

Die Rückschlüsse auf das Optimum der untersuchten Parameter lassen sich dann wiederum im Zuge der Prozessentwicklung auf ein Fed-Batch-Verfahren zur Produktion anwenden.

In der Produktion selbst eignet sich das kontinuierliche Verfahren mit *E. coli* nur bedingt. Zwar würde sich der Arbeitsaufwand reduzieren, da theoretisch nur eine Kultivierung gestartet werden muss und diese nach Einstellung des Fließgleichgewichts, beispielsweise mit einem geringen D von $0,1 \text{ h}^{-1}$, alle 10 Stunden die Zellmasse eines Fed-Batch-Verfahrens liefern würde. Außerdem würde es durch das kontinuierlich anfallende Ausgangsmaterial zu einer effizienteren Ausnutzung des DSP kommen und damit automatisch zur Steigerung der Produktivität. Jedoch besteht gerade in kontinuierlicher Kultur aufgrund der langen Laufzeiten eine erhöhte Mutationsgefahr der Organismen. Zudem sind die Flussraten und damit benötigten Feed-Volumina im Produktionsmaßstab nicht zu unterschätzen. So wird in 24 Stunden bei einem D von $0,1 \text{ h}^{-1}$, das 2,4 fache Reaktorvolumen an Feed-Medium verbraucht. Für einen 100 L-Reaktor würden somit täglich 240 L Medium gebraucht. Für Produktionsverfahren mit rekombinanten *E. coli* eignet sich neben dem Batch- also hauptsächlich das Fed-Batch-Verfahren. Dieses ist daher im folgenden Kapitel kurz erläutert.

2.3.4 Fed-Batch-Verfahren

Das Fed-Batch-Verfahren zeichnet sich durch die kontinuierliche Nachfütterung von Nährmedium aus. Da es zu keiner Abfuhr aus dem Reaktor kommt, ändert sich das Volumen mit der Zeit. Meistens folgt der Feed-Start und damit der Start des Fed-Batch-Verfahrens am Ende einer Batch-Phase. Es ist aber auch möglich, ein Fermentationsmedium ohne C-Quelle vorzulegen und mit der Inokulation die Zufütterung zu starten. Das Fed-Batch-Verfahren findet in dieser Arbeit keine Anwendung. Es sei aber angemerkt, dass sich mittels beschriebener Grundlagen, die spezifische Wachstumsrate über ein exponentielles Feed-Profil definieren lässt. Somit ließen sich gewonnene Erkenntnisse aus kontinuierlicher Kultur für den Produktionsmaßstab im Fed-Batch-Modell anwenden.

3 Material und Methoden

Die Umsetzung der kontinuierlichen Kultur ist in einem kleinen Fermentersystem mit kleinen Umbauten und Ergänzungen durch laborübliches Equipment zu realisieren. Der Aufbau des Fermentersystems und die Umsetzung des Projekts und der Fermentationen mit zugehöriger Analytik werden im Folgenden genauer beschrieben.

3.1 Fermentation

Der Fermentationsprozess besteht in dieser Arbeit aus zwei Schritten: einer Vorkultur und einer Hauptkultur. Die Vorkultur wird im Batch-Verfahren im Schüttelkolben durchgeführt und dient der Anzucht ausreichender Zellmasse für die Inokulation der Hauptkultur. Während der Hauptkultur im Bioreaktor wird der Prozess durch Online-Messdaten verschiedener Sonden (Leitfähigkeit, pH, pO₂, Temperatur) überwacht und die entsprechenden Variablen auf ihren Sollwert geregelt. Neben der Aufnahme der Online-Messdaten werden repräsentative Proben der Zellsuspension entnommen und offline analysiert, um das Kulturverhalten zu beschreiben.

3.1.1 Vorkultur

Der Prozess startet mit der Vorkultur. Diese wird im Verhältnis 1:1000 (150 µl Zellsuspension:150 mL Medium) aus der RCB (OD~2,5) angeimpft. Die Inkubationszeit beträgt 15 h im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 35 °C in einem 1 L-Schikanenkolben. Die Kultur wird nach 15 h mit einer OD von ca. 5,5 als Inokulum für die Hauptkultur verwendet. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Medienzusammensetzung ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Geräte Vorkultur.

Gerät	Hersteller
Schüttelinkubator: innova® 4230	New Brunswick Scientific
Schikanenkolben 1000mL	Schott Duran

Tabelle 3.2: Zusammensetzung Vorkulturmedium.

Substanz	Konzentration [gL ⁻¹]	Hersteller	Artikelnummer
Erbsenpepton	13,5	Oxoid	VG0100
Hefeextrakt	7,0	Oxoid	LP0021
NaCl	2,5	Merck	1.16224
K ₂ HPO ₄	1,75	Merck	1.05101
KH ₂ PO ₄	1,5	Merck	1.04871
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25	Merck	1.05882
Glucose-Monohydraht	5,5	Merck	1.00563
Kanamycin	0,05	AppliChem	1R002280

3.1.2 Hauptkultur

Aus der Vorkultur werden 100 mL der Zellsuspension als Inokulum für die Hauptkultur mit einem Gesamtvolumen von 1400 mL verwendet. Mit dem Überführen der Zellen in den Reaktor wird die Überwachung und Regelung des Prozesses gestartet.

Der Prozess beginnt mit einer Batch-Phase, welche bis zum Verbrauch der C-Quelle Glucose im Fermentationsmedium andauert. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch die Batch-Phase und den Übergang in die kontinuierliche Phase. Der Verbrauch der Glucose zeigt sich mit dem Anstieg des pO₂-Wertes bei knapp 6 h, da die Zellen aufgrund der Glucoselimitierung ihr Wachstum deutlich reduzieren und weniger Sauerstoff verbrauchen. Bis zu diesem Zeitpunkt wächst die Zellmasse exponentiell. Aufgrund des Glucoseüberschuss wird während der Batch-Phase ein Teil der Glucose auch auf anaeroben Weg zur Energiegewinnung genutzt und es kommt zur Acetatbildung. Mit dem pO₂-Peak beginnt die kontinuierliche Phase durch Start des kontinuierlichen Feedings und Einschalten der Levelregulierung. Mit dem Start der kontinuierlichen Kultur kommt es nach gewisser Zeit zur Einstellung des Fließgleichgewichts.

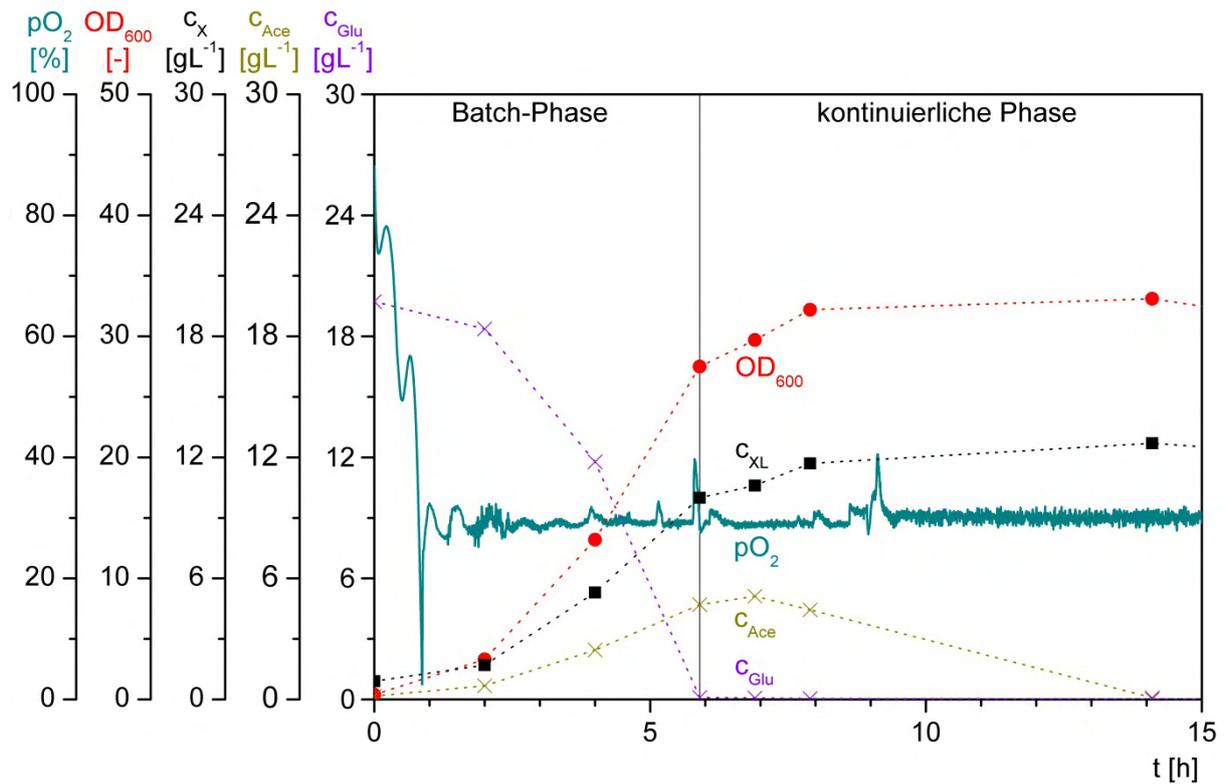


Abbildung 3.1: Batch-Phase und Start der kontinuierlichen Phase von Versuch U62. Legende: pO_2 - Sauerstoffpartialdruck; OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_X - Zellkonzentration; c_{Ace} - Acetatkonzentration; c_{Glu} - Glucosekonzentration.

Um den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die pDNA-Ausbeute zu untersuchen und damit Rückschlüsse zur Optimierung eines pDNA-Prozesses zu treffen, werden im Laufe der Kultivierung die Temperatur, die Verdünnungsrate und damit die zellspezifische Wachstumsrate (im Fließgleichgewicht gilt $\mu = D$) sowie die Glucosezulaufkonzentration und damit die Zelldichte variiert. Die eingestellten Prozessgrößen sind detailliert in Kapitel 4 aufgelistet.

Abgesehen von der Strategie mit der eine Fermentation durchgeführt wird, ist es wichtig, eine fest definierte Nährquelle zu verwenden, welche den Mikroorganismen alle benötigten Nährstoffe weitestgehend im Überschuss bereitstellt. Hierzu werden die verschiedenen Bestandteile alle einzeln oder zum Teil in Form von Komplexbestandteilen, wie z. B. Peptonen oder Hefeextrakt, als Medium in Wasser gelöst. Die verwendeten Medien sind im folgenden Kapitel aufgeführt.

3.1.3 Fermentationsmedien

Als Medium wird ein einfaches Komplex-Medium verwendet. Die definierte C-Quelle ist Glucose und die Komplexbestandteile sind Erbsenpepton und Hefeextrakt. Das

Medium enthält ein Phosphat-Puffer-System. Außerdem wird dem Medium Kanamycin zugesetzt. Damit steht die Kultur unter Selektionsdruck und ein Verlust des Plasmids, in Folge einer Parameteränderung, würde zur deutlichen Abnahme der Zelldichte und letztendlich zum Ende der Kultur führen. Somit kann ein Plasmidverlust im laufenden Prozess erkannt werden und eventuell, durch Rückstellen des Parameters, der Plasmidverlust in allen Zellen verhindert und das alte Fließgleichgewicht wieder eingestellt werden. Das Feed-Medium entspricht in seiner Zusammensetzung dem Batch-Medium, da durch den kontinuierlichen Volumenstrom in und aus dem Reaktor das reine Nachfüttern einer Glucose-Lösung zum Auswaschen der anderen Komponenten führen würde. Nur die Glucosekonzentration wird teils variiert um die Zelldichte zu ändern.

Da Kanamycin hitzeempfindlich ist und durch die Maillard-Reaktion bei hohen Temperaturen aus Glucose und Medienkomponenten teils inhibierende Substanzen entstehen, wird das Medium ohne Glucose und Kanamycin bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Das Medium wird durch sterilfiltrierte Glucose- und Kanamycin-Lösung komplettiert. Des Weiteren wird das Feed-Medium möglichst genau auf pH 7 eingestellt um übermäßigen Korrekturmittelverbrauch zu vermeiden. Der Sterilisiervorgang sowie die aseptische Zugabe von steriler Glucose- und Kanamycin-Lösung haben keinen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert. Dies wurde experimentell ermittelt. Die genauen Medienzusammensetzungen für Batch- und Feed-Medium sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 3.3: Batch-Medium.

Substanz	Konzentration [gL⁻¹]	Hersteller	Artikelnummer
Erbсенpepton	13,5	Oxoid	VG0100
Hefeextrakt	5,0	Oxoid	LP0021
NaCl	2,5	Merck	1.16224
K ₂ HPO ₄	1,75	Merck	1.05101
KH ₂ PO ₄	1,5	Merck	1.04871
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25	Merck	1.05882
Glucose-Monohydraht	5,5	Merck	1.00563
Kanamycin	0,05	AppliChem	1R002280
Desmophen	0,1	RheinChem	000927914

Tabelle 3.4: Feed-Medium.

Substanz	Konzentration [gL ⁻¹]	Hersteller	Artikelnummer
Erbsenpepton	13,5	Oxoid	VG0100
Hefeextrakt	5,0	Oxoid	LP0021
NaCl	2,5	Merck	1.16224
K ₂ HPO ₄	1,75	Merck	1.05101
KH ₂ PO ₄	1,5	Merck	1.04871
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25	Merck	1.05882
Glucose-Monohydraht	5,5	Merck	1.00563
Kanamycin	0,05	AppliChem	1R002280

Um eine kontinuierliche Prozessführung zu realisieren musste der Laborfermenter entsprechend aufgebaut werden. Der Versuchsaufbau des Chemostaten sowie die Regelungs-, Steuerungs- und Überwachungseinheiten sind im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

3.1.4 Bioreaktor und Versuchsaufbau

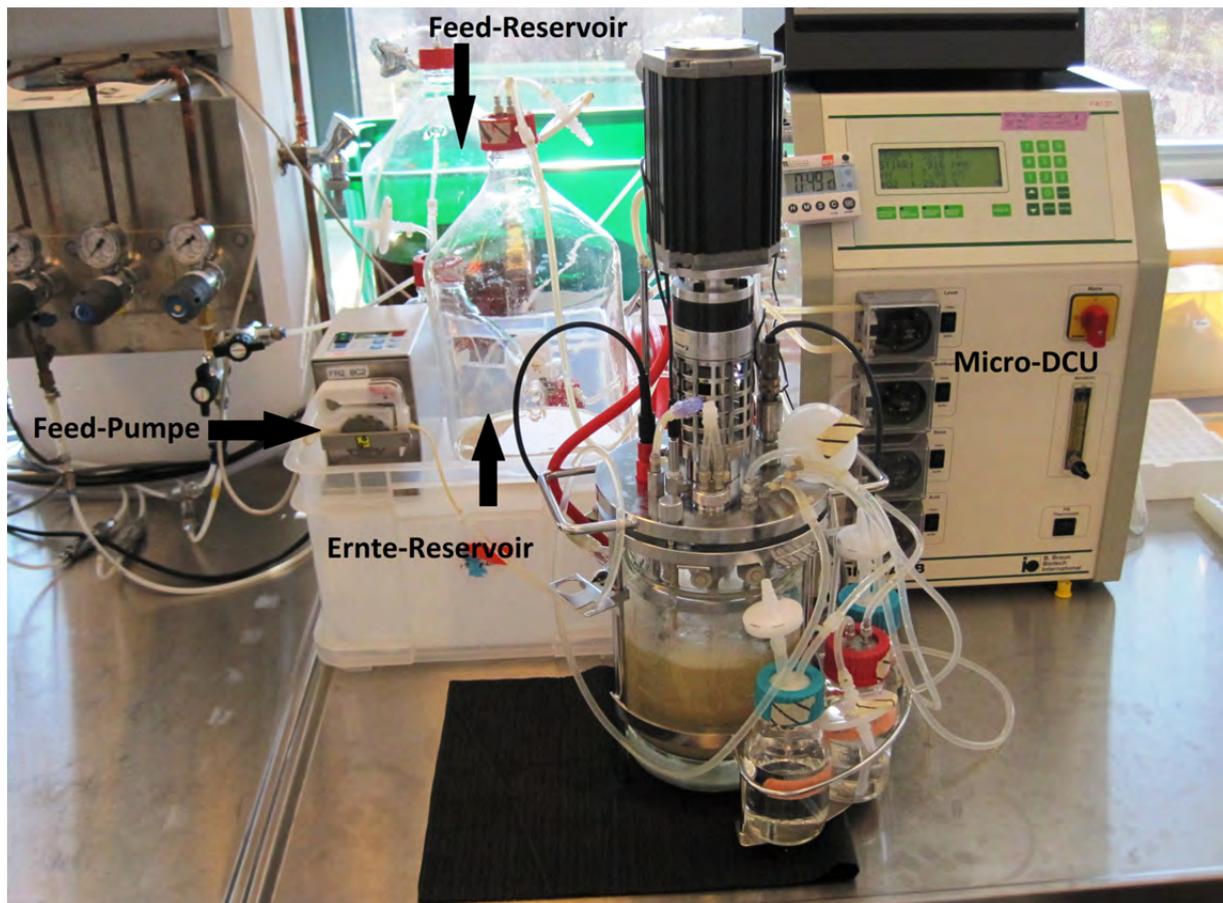


Abbildung 3.2: Versuchsaufbau des BIostat[®] B Laborfermentersystem mit Kulturgefäß Typ B 2 sowie Peripherie.

Das Herzstück des Chemosaten bildet das Laborfermentersystem BIostat[®] B mit dem Kulturgefäß Typ B2. Das Kulturgefäß ist ein Doppelmantelglasgefäß mit Edelstahldeckel, 3 L Totalvolumen und einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 L. Es wird *ex-situ* im Autoklaven bei 121 °C für 20 min inklusive des Batch-Mediums (ohne Glucose und Kanamycin) sterilisiert. Abbildung 3.2 zeigt den Laboraufbau des Chemosaten.

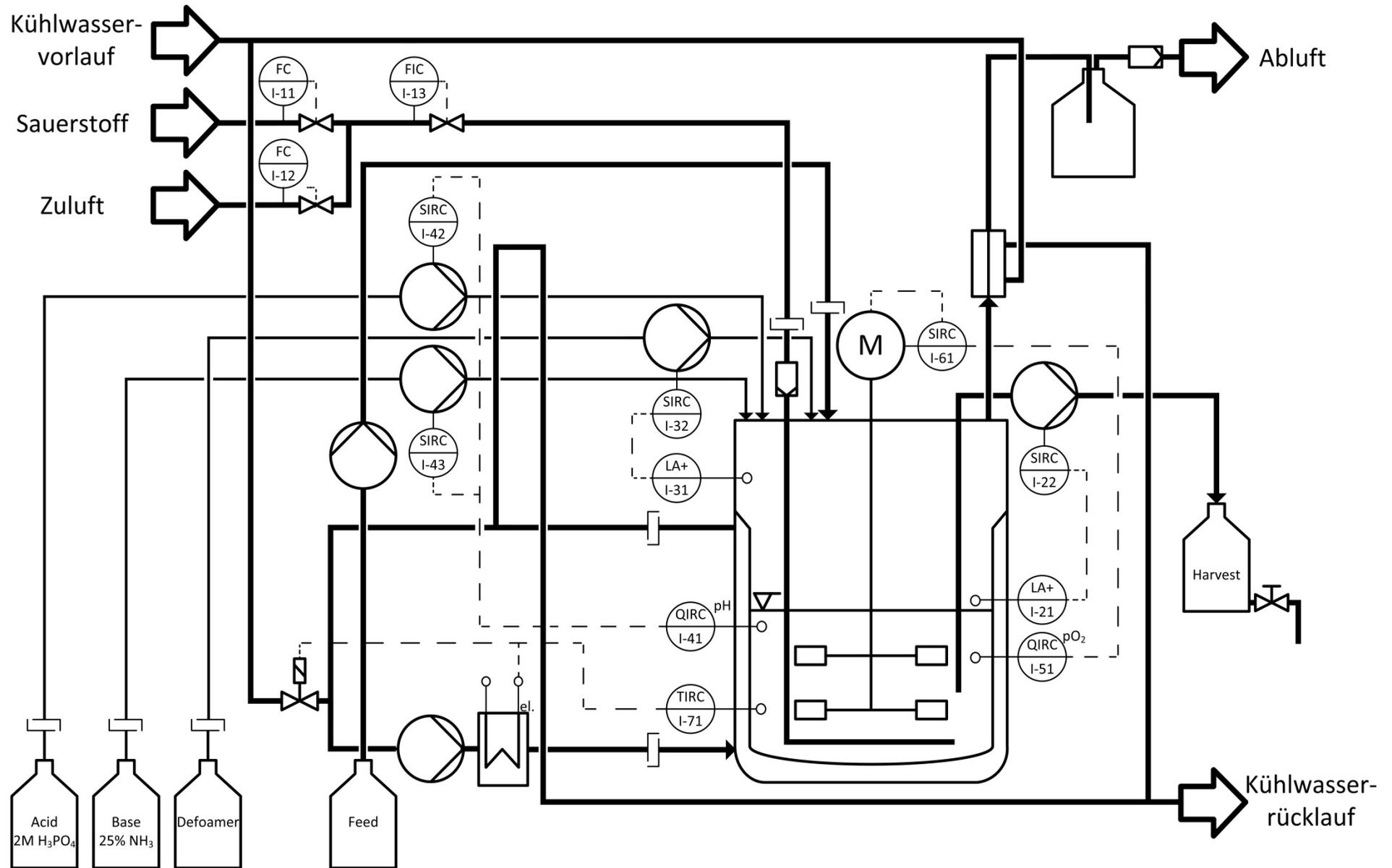


Abbildung 3.3: RI-Fließbild des Chemostaten mit Peripherie und Regelungs-, Steuerungs-, und Überwachungseinrichtungen nach DIN EN ISO 10628.

Abbildung 3.3 zeigt das RI-Fließbild des Chemostaten mit Peripherie und den Regelkreisen. Die Temperaturregelung erfolgt durch Temperierung des Doppelmantels. Eine interne Heizung der Micro-DCU heizt den Temperierkreislauf auf. Durch Einspülen von Kühlwasser wird die Temperatur im Temperierkreislauf gemindert. Dabei muss ein Teil der Temperierflüssigkeit verdrängt werden. Dies geschieht über ein Steigrohr, weswegen darauf zu achten ist, dass ein ausreichender Vordruck anliegt.

Die Sauerstoffversorgung erfolgt über Begasung mit Luft durch einen Begasungsring in der Zellsuspension. Die Begasungsrate ist auf $2,5 \text{ NLmin}^{-1}$ eingestellt und bei Bedarf (höhere Zelldichte oder zellspezifische Wachstumsrate) wird über eine Gasmischstation der Zuluft Sauerstoff beigemischt. Der prozentuale Anteil des Sauerstoffs wird manuell an der Gasmischstation festgelegt. Die Zuluft wird über einen Membranfilter sterilfiltriert. Die Abluft wird im Abluftkühler mit Kühlwasser gekühlt um die Luftfeuchtigkeit zu senken, den Flüssigkeitsaustrag zu minimieren und damit das Verblocken des Abluftfilters zu verhindern. Dem Abluftfilter ist eine Schaumfalle vorgeschaltet, um den direkten Kontakt des Filters mit Schaum und somit das Verblocken zu verhindern.

Der Gelöstsauerstoff in der Zellsuspension ist eine Funktion der Begasungsrate, dem Sauerstoffanteil der Zuluft, der Temperatur, dem Druck, dem Verbrauch durch die Mikroorganismen und der Übergangsfläche zwischen Gas- und Flüssigphase. Die Übergangsfläche wird durch die Rührerdrehzahl beeinflusst. Da die anderen Parameter direkt oder indirekt vorgegeben sind, wird der pO_2 -Wert über die Rührerdrehzahl auf 30% geregelt.

Der pH-Wert wird mit 2 molarer Phosphorsäure und 25%iger Ammoniaklösung auf pH 7 geregelt. Aufgrund der langen Prozessdauer besteht die Gefahr, dass Korrekturmittel aufgebraucht werden und ausgetauscht werden müssen, weswegen die Korrekturmittelflaschen per Luer-Lock-Kupplung mit dem Reaktor verbunden sind. Bei der Base-Flasche besteht die Möglichkeit die Förderstrecke mit auszutauschen, da es hier aufgrund des Ammoniaks häufiger zu Verklebung des Pumpschlauchs und damit zu Förderproblemen kommen kann.

Das Antischaummittel wird entweder manuell oder durch Auslösen der Schaumsonde über eine Pumpe in den Reaktor dosiert.

Der Verbrauch der Korrekturmittel wird aufgezeichnet. Diese Daten sind nicht absolut verlässlich und geben die wahren Volumina nicht immer korrekt wieder. Dies liegt zum einem daran, dass dem aufgezeichneten Volumen lediglich das Signal des jeweiligen Reglerausgangs zugrunde liegt. Dieses wird auch aufgezeichnet wenn die zugehörigen

Pumpen nicht in der Remote-Einstellung sind und somit trotz Signal des Reglers nicht auslösen oder aufgrund von Schlauchproblemen nicht fördern können. Zum anderen werden durch Ausgasen des Ammoniaks höhere Volumina aufgezeichnet als eigentlich gefördert, da der Schlauch immer wieder befüllt werden muss. Diese Messdaten können trotz der Störanfälligkeit teils Rückschlüsse aufgrund besonderer Auffälligkeiten geben und dienen der Überwachung des Prozesses. Beispielsweise nimmt mit Acetatbildung durch die Mikroorganismen der pH-Wert ab. Bei funktionstüchtiger pH-Wert-Regelung wird die Abnahme des pH-Werts durch Zufuhr von Base kompensiert. Nimmt der pH-Wert jedoch weiterhin ab, obwohl der aufgezeichnete Baseverbrauch immer stärker steigt, ist das ein Zeichen dafür, dass die Baseförderung in den Reaktor nicht funktioniert.

Zur Realisierung einer kontinuierlichen Kultur ist des Weiteren eine Volumen-Regelung nötig. Diese wurde mittels Level-Sonde realisiert, die bei Kontakt von mind. 5 Sekunden mit der Zellsuspension auslöst und eine Pumpe ansteuert. Diese Pumpe fördert durch ein Ernterohr direkt Zellsuspension aus dem Reaktor. Dem aufgezeichneten Volumen liegt, wie erwähnt, nur das Signal des Reglerausgangs zugrunde. Da neben Zellsuspension auch Luft aus dem begasten Reaktor gefördert wird, ist das aufgezeichnete Volumen geringer als das tatsächlich geförderte Volumen und daher unzuverlässig. Die abgeführte Zellsuspension wird in einem Reservoir aufgefangen, welches über zwei Ausgänge verfügt. Ein unterer Ausgang mit Ventil ermöglicht das Ablassen der geernteten Zellsuspension. Ein oberer Ausgang ermöglicht über eine Luer-Lock-Kupplung den Anschluss eines zweiten sterilen Reservoirs, um bei längerer Abwesenheit und/oder höheren Verdünnungsraten das Reservoirvolumen zu vergrößern.

Das Volumen über einen konstanten Zu- sowie Abfluss zu regulieren würde den Korrekturmittelverbrauch nicht berücksichtigen und zu einer Volumenzunahme führen. Außerdem würden Abweichungen der Kalibrierungen und Abnutzungen des Förder-schlauchs in der Schlauchpumpe zu Differenzen im Volumenstrom in und aus dem Reaktor führen, wodurch es wiederum zu einer Änderung des Volumens kommen würde.

Die Pumprate der Feedpumpe bleibt über die Dauer der einzelnen Phasen konstant. Da sich der Feedschlauch abnutzt, sind die Kalibrierwerte der Pumpe nicht für die gesamte Kultivierung verlässlich. Deshalb wird das Erntevolumen der jeweiligen Prozessphase ausgelitert, um die Verdünnungsrate zu bestimmen. Für die Feedvorlage wird eine 10 L Glasflasche verwendet. Diese kann über eine Luer-Lock-Kupplung mit frischem sterilem

Medium versorgt werden. Eine Luer-Lock-Kupplung in der Feed-Strecke ermöglicht außerdem den Austausch des Reservoirs um Medien mit anderer Glucosekonzentration anzuschließen. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Geräte und Materialien Chemostat.

Gerät/Material	Hersteller	Artikelnummer/Bezeichnung
Biostat B Micro-DCU	B. Braun Biotech	8840326
Biostat B Kulturgefäß Typ B2	B. Braun Biotech	884036/9
Ismatec Schluchpumpe	Ismatec	ISM5960
Ismatec Pumpschlauch	Ismatec	070539MX11i
Kryostat	Julabo	F25-HE
Luftfilter Midisart® 2000 0,2 µm	Sartorius Stedim	17805 E
Luer-Lock Female	Roth	CT60.1
Luer-Lock Male	Roth	CT64.1
Desmophen	RheinChem	000927914
NH ₃ 25%	Merck	1.05422
Phosphorsäure	Merck	1.05882

Die online- und atline-Prozessparameter werden an der Micro-DCU registriert und vom Leitrechner mittels MFCS aufgezeichnet. Mit der Probenanalytik werden die offline-Messdaten erhoben. Eine Übersicht der Daten ist in Tabelle 3.6 zu sehen. Die Ernterate wird durch Auslitern des Erntevolumens, in Abhängigkeit von der Zeit, bestimmt und wird zur Berechnung der Verdünnungsrate verwendet. Die offline-Analytik wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Tabelle 3.6: Messdatenübersicht.

online-Messdaten	atline-Messdaten	offline-Messdaten
pH-Wert [-]	Säureverbrauch [mL]	Optische Dichte [-]
pO ₂ -Wert [%]	Baseverbrauch [mL]	Biotrockenmasse [gL ⁻¹]
Rührerdrehzahl [rpm]	Antischaumverbrauch [mL]	pDNA-Quantität [mgL ⁻¹]
Temperatur [°C]	Erntevolumen [mL]	pDNA Qualität [%]
	Ernterate [mLh ⁻¹]	Glucose [gL ⁻¹]
		Acetat [gL ⁻¹]

3.2 Optische Dichte

Die optische Dichte OD_{600} wird bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmt und dient als Maß für die Zelldichte. Bei Absorptionswerten über 0,6 wird die Zellsuspension mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Verdünnungsfaktoren größer 10 werden mit Verdünnungsreihen eingestellt. Als Referenzwert für die Messung im Photometer wird reine 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet.

3.3 Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wird gravimetrisch bestimmt. Pro Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Es werden die Trockengewichte m_{0A} und m_{0B} von 1,5 mL Reagiergefäßen bestimmt. 1 mL der Zellsuspension wird im Reagiergefäß mit 1300 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und für weitere Analytik aufbewahrt (-20 °C). Die Zellpellets werden bei 80 °C für 24 h bis zur Massenkonzanz getrocknet und die Massen m_{1A} und m_{1B} ausgewogen, um die Zellkonzentration c_X ,

$$c_X = \frac{m_{1A} - m_{0A} + m_{1B} - m_{0B}}{2 \cdot 0,001 \text{ L}} \quad (3.1)$$

zu bestimmen.

Da es sich um einen Projekt zur Optimierung der pDNA-Ausbeute handelt, betrifft der zentrale Teil der Analytik die pDNA. Zur Quantifizierung muss die Zellmasse einer Probe in der Probenvorbereitung aufgeschlossen und das Plasmid aufgereinigt werden. Die Durchführung ist im folgenden Kapitel beschrieben.

3.4 Probenvorbereitung zur pDNA-Analytik

Zur Probenvorbereitung wurde das kommerziell erhältliche Plasmidaufreinigungs-kit QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen® (Artikelnr. 27106) verwendet. Die Zellpellets für die Analytik werden während der Fermentation aus 0,5 mL Zellsuspension durch Zentrifugieren mit 13000 rpm bei 4 °C für 10 min hergestellt. Der Überstand wird verworfen. Zur Aufreinigung wird nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Der Zellaufschluss basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei fallen die Proteine aus und die genomische DNA denaturiert. Die Präzipitate werden inklusive Zelltrümmer abzentrifugiert und nur die Plasmide bleiben in Lösung. Diese Plasmidlösung wird direkt für die HPLC-Analytik verwendet.

Die Salze in der Plasmidlösung stören die Agarose Gel Elektrophorese (AGE), weswegen der salzhaltige Puffer, in dem die Plasmide gelöst sind, ausgetauscht wird. Hierfür wird die Plasmidlösung auf eine Kieselgel-Säule, an welcher die pDNA bindet, aufgetragen. Anschließend folgt ein Waschschriff und daraufhin die Elution der pDNA in Wasser (DNase-/RNase-frei).

Neben der Quantifizierung soll die Qualität, also der Anteil anderer DNA-Topologien neben der ccc-Form bestimmt werden. Um die Referenz-DNA-Formen herzustellen muss der Standard, der hauptsächlich als ccc-Form vorliegt, mit Restriktionsenzymen behandelt werden.

3.5 Restriktionsverdau

Um die ccc-Form zur oc-Form zu entwinden oder um das Plasmid zu linearisieren werden zwei Restriktionsenzyme verwendet. Diese Enzyme erkennen spezifisch eine DNA-Sequenz und schneiden die DNA an dieser Stelle. Das Enzym FastDigest BamHI schneidet den Doppelstrang und öffnet somit das zirkuläre Plasmid, womit das Plasmid als linearer Doppelstrang vorliegt. Hierfür wird 1 µL Enzymlösung pro 1 µg pDNA eingesetzt. Dazu wird der 10x FastDigest Green Buffer (für AGE) oder 10x FastDigest Buffer (für HPLC) zugegeben. Der Puffer wird durch seine Zugabe um den Faktor 10 verdünnt. Der Ansatz wird für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym für 5 min bei 80 °C inaktiviert.

Das Enzym Nb.Mva1269I schneidet nur einen Strang des DNA-Doppelstranges, womit sich die Doppelhelix entwindet und damit auch die Superspiralisierung. Damit liegt das Plasmid relaxiert, aber noch zirkulär als oc-Form vor. Hierfür wird 0,1 µL Enzymlösung pro 1 µg pDNA eingesetzt und mit 50 µL Reaktionspuffer 0, für 1 h bei 37 °C, inkubiert.

Anschließend wird das Enzym bei 80 °C für 20 min inaktiviert.

Die oc-Form und die linearisierte Form werden in der folgenden pDNA-Analytik zur Qualitätsbestimmung verwendet. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Restriktionsenzyme.

Enzym	Hersteller	Artikelnummer
FastDigest BamHI 10x FastDigest Buffer 10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific	FD0054
Nb.Mva1269I Reaktionspuffer 0	Thermo Scientific	ER2051

3.6 pDNA Analytik mittels AEX-Chromatographie

Um Aussagen bezüglich der Produktausbeute treffen zu können, wird mittels HPLC die Plasmidkonzentration der vorbereiteten Proben (Kapitel 3.4) bestimmt. Die Proben werden bei 8 °C im Autosampler gekühlt und es wird 20 µL Probe injiziert. Nur bei sehr niedrigen Konzentrationen werden Wiederholungsmessungen mit höherem Injektionsvolumen durchgeführt. In Tabelle 3.8 sind die wichtigsten Angaben zur Methode aufgeführt. Als Säule wird ein Anionenaustauscher verwendet. Die verwendete Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Methodenübersicht zur pDNA-Quantifizierung mittels HPLC.

Eluent A	20 mM Tris-HCl, pH 9
Eluent B	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9
Total Flow	1 mLmin ⁻¹
Start-Konzentration Eluent B	50%
End-Konzentration Eluent B	75%
Gradient	2,5%min ⁻¹
Wellenlänge des UV-Detektors	260 nm

Tabelle 3.9: Geräte und Materialien pDNA-HPLC.

Gerät/Material	Hersteller	Artikelnummer/Bezeichnung
Säule TSK-Gel DNA-NPR	Tosoh Bioscience	18249
Vorsäule TSK-Gel DNA-NPR	Tosoh Bioscience	18253
Auto Injector	Shimadzu	SIL-10AD
Systemcontroller	Shimadzu	SCL-10A
Pumpe	Shimadzu	CC-10AT
Säulenofen	Shimadzu	CTO-10A
Prominence Diod Array Detector	Shimadzu	SPD-M20A

Anhand der gemessenen Peakfläche A und der Steigung der Kalibriergeraden a_{std} lässt sich die Konzentration im Lysat c_{Lysat} ,

$$c_{Lysat} = A \cdot a_{std} \quad (3.2)$$

berechnen. Mit dem Puffervolumen für die Lyse V_{Lysat} und dem Probevolumen V_{Probe} für das Zellpellet ergibt sich die Plasmidkonzentration c_P ,

$$c_P = \frac{c_{Lysat} \cdot V_{Lysat}}{V_{Probe}} \quad (3.3)$$

in der Zellsuspension. Das Verhältnis von Plasmidkonzentration zu Zellkonzentration beschreibt den zellspezifischen Plasmidgehalt $g_{P/X}$.

$$g_{P/X} = \frac{c_P}{c_X} \quad (3.4)$$

Neben der quantitativen Bestimmung des Produktes wird versucht auch eine qualitative Aussage, durch Trennung der verschiedenen DNA-Formen, zu treffen. Um das Trennungverhalten der Säule zu beobachten werden die Referenzen des Restriktionsverdau (Kapitel 3.5) verwendet.

Weitere Aussagen über mögliche Auffälligkeiten der pDNA werden anhand der AGE gemacht. Außerdem kann mit dieser Methode die pDNA auch nochmals qualitativ bewertet werden. Dies ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.7 pDNA Analytik mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur AGE werden mit Ethidiumbromid gefärbte Gele verwendet. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Nucleinsäuren und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Dadurch wird die DNA unter UV-Strahlung sichtbar. Das Gel wird in eine Laufkammer mit TAE-Puffer gegeben und mit Proben beladen. Die AGE wird für 60 min bei 90 Volt durchgeführt. Die negativ geladene DNA läuft in Richtung der Anode, weswegen darauf zu achten ist, dass die Geltaschen zur Kathode orientiert sind.

Im Anschluss zur AGE wird das Gel mit dem Gelschlitten aus der Laufkammer entnommen und in die Geldokumentationsanlage gelegt. Hier wird das Gel mit UV-Strahlung bestrahlt und mit der Software Quantity One[®] (Bio-Rad), bei der Einstellung UV Transillumination, ein Bild aufgenommen. Das Bild wird mit der Software ImageLab[™] (Bio-Rad) ausgewertet.

Vor der Beladung des Gels muss die Plasmidlösung aus der Probenvorbereitung (Kapitel 3.4) mit einem Loading-Dye versetzt werden. Dieser dient der farblichen Markierung, um die Lauffront während der AGE im Gel zu erkennen. Außerdem erhöht der Loading-Dye die Dichte der Proben damit diese in die Geltaschen absinken. Die Probenvorbereitung ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Zu hohe Mengen DNA auf dem Gel führen zur Überbelichtung bei der anschließenden Dokumentation weswegen die Proben entsprechend verdünnt werden.

Tabelle 3.10: Probenvorbereitung für AGE.

Auftragsvolumen	Loading-Dye	Probe	Wasser
18 µL	3 µL	x µl	15-x µL

Zur Identifizierung der Laufweiten wird das Gel neben den Proben mit dem ccc-Standard sowie dem oc-Standard und der linearisierten Form aus dem Restriktionsverdau (Kapitel 3.6) beladen. In Tabelle 3.11 sind die verwendeten Geräte und Materialien zur AGE aufgeführt.

Tabelle 3.11: Geräte und Materialien AGE.

Gerät/Material	Hersteller	Artikelnummer
TAE Ready Wide Agarose Mini Gels 1% Agarose plus EtBr	Bio-Rad	161-3044
Wide Mini Ready Sub-Cell GT cell	Bio-Rad	170-4489
Spannungsquelle Power PAC 200	Bio-Rad	165-5052
Geldokumentationsanlage Molecular Imager ChemiDoc XRS	Bio-Rad	170-8195
Laufpuffer Rotiphorese 10x TAE Puffer	Roth	T845.2
Probenpuffer 6 x Loading Dye Solution	Thermo Scientific	#R0611
GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific	#SM0313

3.8 Glucose- und Acetat-Analytik mittels AEX-Chromatographie

Die Glucose- und Acetatkonzentration wurde im Überstand der Fermentationsproben bestimmt. Dazu wird eine Anionenaustauschersäule verwendet und isokratisch mit verdünnter Schwefelsäure betrieben. Die Proben werden in der Vorbereitung filtriert, um eine Verschmutzung der Säule zu verhindern. Die Detektion der Analyten erfolgt in einem Refraktometer. Für die Methode kann eine Einpunktkalibrierung verwendet werden. Anhand der gemessenen Peakfläche A und der Steigung der Kalibriergeraden a_{std} lässt sich die Konzentration des Analyten c_A ,

$$c_A = A \cdot a_{std} \quad (3.5)$$

im Überstand bestimmen. In Tabelle 3.12 sind die wichtigsten Angaben zur Methode aufgeführt. Da es aufgrund der verschiedenen Bestandteile des Fermentationsmediums zu Überlagerung von Peaks kommen kann, sind zwei ähnliche Methoden aufgeführt, um möglicherweise Verbesserungen in der Trennung der Peaks zu erreichen.

Tabelle 3.12: Methoden-Übersicht zur Acetat und Glucoseanalytik mittels HPLC.

Methode	1	2
Eluent	0,013 M Schwefelsäure	0,001 M Schwefelsäure
Flow	0,8 mLmin ⁻¹	0,5 mLmin ⁻¹
Injektionsvolumen	20 µL	20 µL
Glucosestandardkonzentration	20 gL ⁻¹	20 gL ⁻¹
Glucosenachweisgrenze	0,2 gL ⁻¹	0,2 gL ⁻¹
Acetatstandardkonzentration	5 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹
Acetatsnachweisgrenze	0,05 gL ⁻¹	0,05 gL ⁻¹

Neben der HPLC-Methode wird ein Enzym-Assay zu Acetatbestimmung sowie ein Enzym-Assay zur Glucosebestimmung verwendet, um Kontrollwerte für die HPLC-Ergebnisse zu ermitteln. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

Tabelle 3.13: Geräte und Materialien Acetat- und Glucoseanalytik.

Gerät/Material	Hersteller	Artikelnummer/Bezeichnung
Säule Hi-Plex H	Aligent Technologies	PL1170-6830
Autosampler	Merck	AS-4000
Interface	Merck	D-6000
Pumpe	Merck	C-6200A
RI-Detektor	ERMA INC.	ERC-7512
Säulenofen	Mistral	Spark Holland
Schwefelsäure	Merck	1.00713
Glucose-Assay	Böhringer Mannheim	10 716 251 035
Acetat-Assay	Böhringer Mannheim	10 148 261 035

4 Experimentelle Arbeiten und Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, einen funktionsfähigen und stabilen Chemostaten aufzubauen. An diesem sollte der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die pDNA-Ausbeute untersucht werden. Anhand der gewonnenen Ergebnisse können dann Rückschlüsse zur Optimierung eines Produktionsprozesses, in Form eines Fed-Batch-Verfahrens, getroffen werden.

Bevor die Fermentation in kontinuierlicher Kultur durchgeführt werden konnte, musste das Laborfermentersystem nach längerem Stillstand wieder in Betrieb genommen und auf seine vollständige Funktionsfähigkeit geprüft werden. Im Folgenden wurde das Verhalten der Volumenregelung untersucht und das Fermentersystem mit dem nötigen Equipment, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, ausgestattet und aufgebaut.

Anschließend wurden 2 Kultivierungen (U62 und U63) mit einer Dauer von jeweils ca. 10 Tagen durchgeführt. Währenddessen wurden Variationen der Temperatur, der Wachstumsrate und der Zelldichte untersucht. Die während der Prozesse U62 und U63 variierten Parameter sowie die Zuordnung zu den jeweiligen Prozesszeiten sind in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 aufgeführt. Die einzelnen Phasen sind fortlaufend durchnummeriert. Phase 1 entspricht jeweils der Batch-Phase. In Versuch U62 wurde in Phase 3 und in Versuch U63 in Phase 2 sowie 9 eine geringe Anpassung der Verdünnungsrate durchgeführt um die Abnutzung des Pumpschlauchs auszugleichen. Diese Phasen sind in den Tabellen nicht aufgeführt und für die Betrachtung wurden diese Phasen mit der darauffolgenden Phase dargestellt und die mittlere Verdünnungsrate angegeben.

Tabelle 4.1: Phasenübersicht von U62. Parameteränderungen sind hervorgehoben.

Phase	Prozesszeit der jeweiligen Phase [h]	Proben	Temperatur θ [°C]	D [h ⁻¹]	Glucosezulaufkonzentration $c_{s, ein}$ [gL ⁻¹]
1	0,0 - 5,9	0 - 3	35	0,000	20
2	5,9 - 24,3	4 - 8	35	0,103	20
4	24,3 - 31,3	9 - 12	36	0,103	20
5	31,3 - 49,8	13 - 15	37	0,103	20
6	49,8 - 55,8	16 - 18	38	0,103	20
7	55,8 - 72,1	19 - 20	39	0,103	20
8	72,1 - 78,2	21 - 23	40	0,103	20
9	78,2 - 103,3	24	30	0,103	20
10	103,3 - 145,6	25 - 26	35	0,103	20
11	145,6 - 150,3	27 - 29	35	0,053	20
12	150,3 - 167,1	30 - 31	35	0,083	20
13	167,1 - 175,5	32 - 34	35	0,213	20
14	175,5 - 192,8	35 - 36	35	0,150	20
15	192,8 - 217,6	37 - 38	35	0,124	20
16	217,6 - 223,3	39 - 41	35	0,267	20
17	223,3 - 239,8	42 - 43	35	0,142	20
18	239,8 - 245,8	44 - 48	35	0,349	20

Tabelle 4.2: Phasenübersicht von U63. Parameteränderungen sind hervorgehoben.

Phase	Prozesszeit der jeweiligen Phase [h]	Proben	Temperatur θ [°C]	D [h ⁻¹]	Glucosezulaufkonzentration $C_{s, \text{ein}}$ [gL ⁻¹]
1	0,0 - 6,0	0 - 3	35	0,000	20
3	6,0 - 25,1	4 - 6	35	0,073	20
4	25,1 - 35,6	7 - 11	35	0,102	20
5	35,6 - 49,1	12 - 13	35	0,119	20
6	49,1 - 56,6	14 - 17	35	0,149	20
7	56,6 - 72,5	18 - 19	35	0,209	20
8	72,5 - 77,1	20 - 22	35	0,245	20
10	77,1 - 123,3	23 - 24	35	0,051	20
11	123,3 - 144,1	25	35	0,097	20
12	144,1 - 155,1	26 - 30	34	0,097	20
13	155,1 - 171,9	31 - 32	35	0,097	20
14	171,9 - 194,1	33 - 40	35	0,097	30
15	194,1 - 215,6	41 - 45	35	0,097	40
16	215,6 - 243,1	46 - 56	35	0,097	50

4.1 Vorversuche zum Aufbau des Chemostaten

Da das Chemostatmodell im Wesentlichen auf der Annahme eines konstanten Volumens basiert, ist die Levelregulierung eine äußerst wichtige Funktion. Um diese zu testen und den Einfluss der Rührerdrehzahl zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente zur Füllstandsregelung durchgeführt.

Da die Höhe des Flüssigkeitsstands von der Rührerdrehzahl abhängt, wurde experimentell ermittelt welchen Einfluss die Rührerdrehzahl auf das Volumen hat. Dazu wurde der Reaktor mit 0,2%iger NaCl-Lösung (entspricht etwa der NaCl-Konzentration des Mediums) leicht überfüllt. Die Levelsonde wurde eingeschaltet und es wurde abgewartet bis diese nicht mehr auslöst und die Erntepumpe abschaltet. Daraufhin wurde der Rührer eingeschaltet und Stufenweise die Rührerdrehzahl erhöht. Nach jeder Drehzahl-erhöhung wurde abgewartet bis die Levelsonde nicht mehr auslöst und anschließend das Ertevolumen bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Versuche zur Volumenschwankung aufgrund der Rührerdrehzahl:

Versuch 1		Versuch 2	
Rührerdrehzahl [rpm]	Erntevolumen nach Drehzahländerung [mL]	Rührerdrehzahl [rpm]	Erntevolumen nach Drehzahländerung [mL]
0 auf 200	3	0 auf 200	11
200 auf 400	38	200 auf 400	32
400 auf 600	15	400 auf 600	11
600 auf 800	22	600 auf 800	20

Die Volumenschwankungen sind nicht sehr stark. Versuch 1 zeigt bei der Erhöhung der Drehzahl von 200 rpm auf 400 rpm eine Volumenänderung von 38 mL. Somit sollte in einem Schwankungsbereich der Rührerdrehzahl von ± 100 rpm die Unsicherheit des Volumens ΔV bei maximal ± 19 mL liegen.

Da zur Berechnung der Verdünnungsrate neben der Zufütter- bzw Ernterate das Volumen im Reaktor benötigt wird, wurde ein Volumen von 1330 mL bei einer Drehzahl von 700 rpm bestimmt. Da sich die Rührerdrehzahl die meiste Zeit der Fermentationen in einem Bereich von 600 rpm bis 800 rpm bewegt, wird dieses Volumen für die gesamte Kultivierungsdauer angenommen. Mit Gleichung (2.10) und Gleichung (2.14) ergibt sich Verdünnungsrate D .

$$D = \frac{V_F}{V \cdot t} \quad (4.1)$$

Für ein μ bzw D von $0,35 \text{ h}^{-1}$ (höchste eingestellte Verdünnungsrate während der Kultivierungen), einer Zeit t von 1 h für die Bestimmung des Flusses und einer Unsicherheit des Erntevolumens ΔV_F von ± 5 mL durch die Ablesung am Messzylinder ergibt sich mit dem arithmetischen Fortpflanzungsgesetz eine maximale Abweichung $\Delta \mu$,

$$\Delta \mu = \Delta D = \left| \frac{\partial D}{\partial V} \cdot \Delta V \right| + \left| \frac{\partial D}{\partial V_F} \cdot \Delta V_F \right| \quad (4.2)$$

von $0,01 \text{ h}^{-1}$. Für niedrigere Verdünnungsraten und längere Zeiten zur Bestimmung der Flussrate nimmt $\Delta \mu$ ab. Damit lässt sich μ relativ genau einstellen, trotz geringer Volumenschwankungen durch die Änderung der Rührerdrehzahl sowie einer

Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Erntevolumens.

Um sicherzustellen, dass es bei konstanter Begasung (2 NLmin^{-1}) und Rührerdrehzahl (750 rpm) durch die Levelregulierung zu einem konstanten Volumen kommt, wurde die Levelsonde bei Begasung und eingeschaltetem Rührer eingeschaltet und abgewartet bis der überfüllte Reaktor soweit geleert ist, dass die Levelsonde nicht mehr auslöst. Die Feedpumpe wurde mit konstanter Pumprate auf einen Flow von 2 mLmin^{-1} eingestellt und das Erntevolumen jede Minute notiert. In Abbildung 4.1 ist zu erkennen, dass nach 15 min das Verhältnis von Erntevolumen zu Feedvolumen konstant bleibt. Damit ist auch der Fluss in sowie aus dem Reaktor gleich. Und da die Pumprate einen konstanten Fluss in den Reaktor vorgibt, ist auch der Fluss aus dem Reaktor konstant. Es braucht somit eine gewisse Zeit bis das Volumen eingeregelt und damit fortlaufend konstant ist.

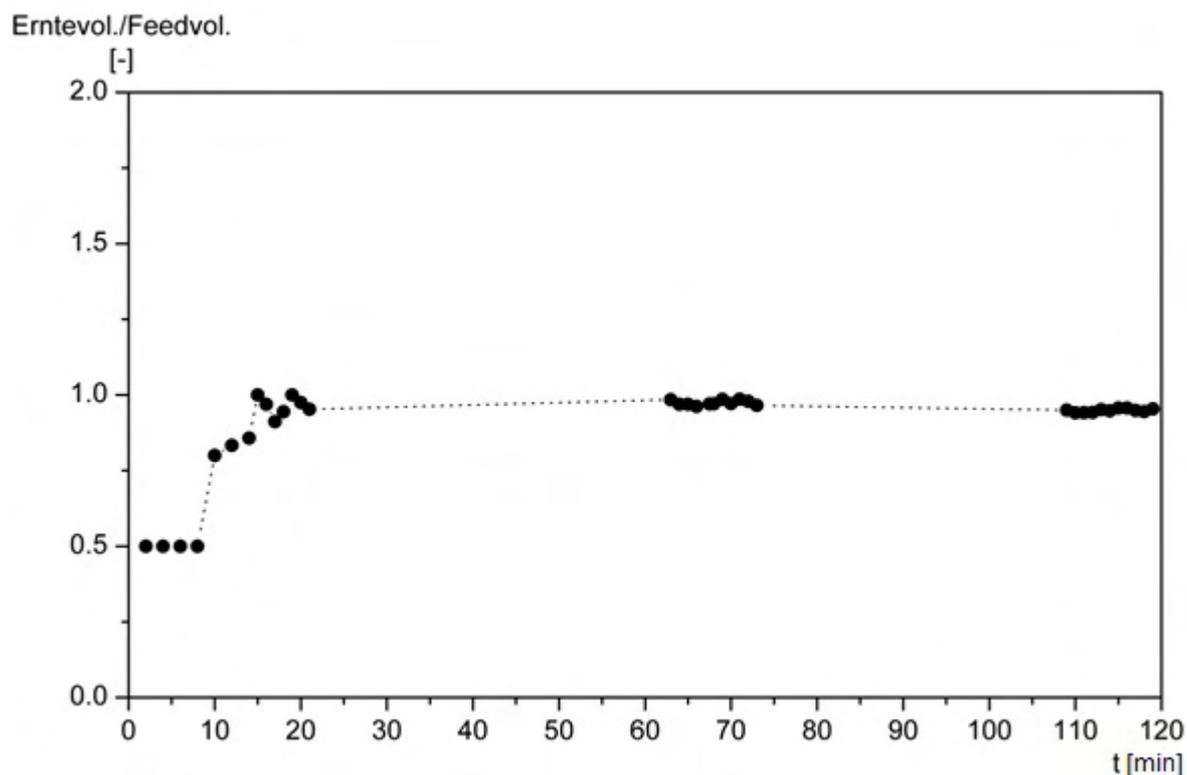


Abbildung 4.1: Levelregulierung.

4.2 pDNA Analytik mittels AEX-Chromatographie

Um Aussagen bezüglich der Produktausbeute treffen zu können wurde mittels HPLC die Plasmidkonzentration bestimmt. Dazu wurde zu Beginn eine Standardreihe injiziert, außerdem die oc-Form des Plasmids, das linearisierte Plasmid sowie ein Mix aus ccc-

Form und entweder oc-Form oder linearer Form.

Anhand der Standardreihe konnte überprüft werden, ob das Antwortverhalten des Detektors für den ausgewählten Konzentrationsbereich linear ist. In Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass die Messwerte sich für den ausgewählten Konzentrationsbereich linear verhalten ($R^2=0,9994$). Daher kann die Kalibriergerade mit nur einem Messwert erstellt werden. Um bei jedem HPLC-Lauf wirklich die gleiche Referenzkonzentration zu haben, wurde der Standard außerdem unverdünnt verwendet. Durch den Fehler der Pipetten könnte es sonst zu Schwankungen in der Konzentration der Standardverdünnung kommen, welche wiederum das Messergebnis beeinflussen.

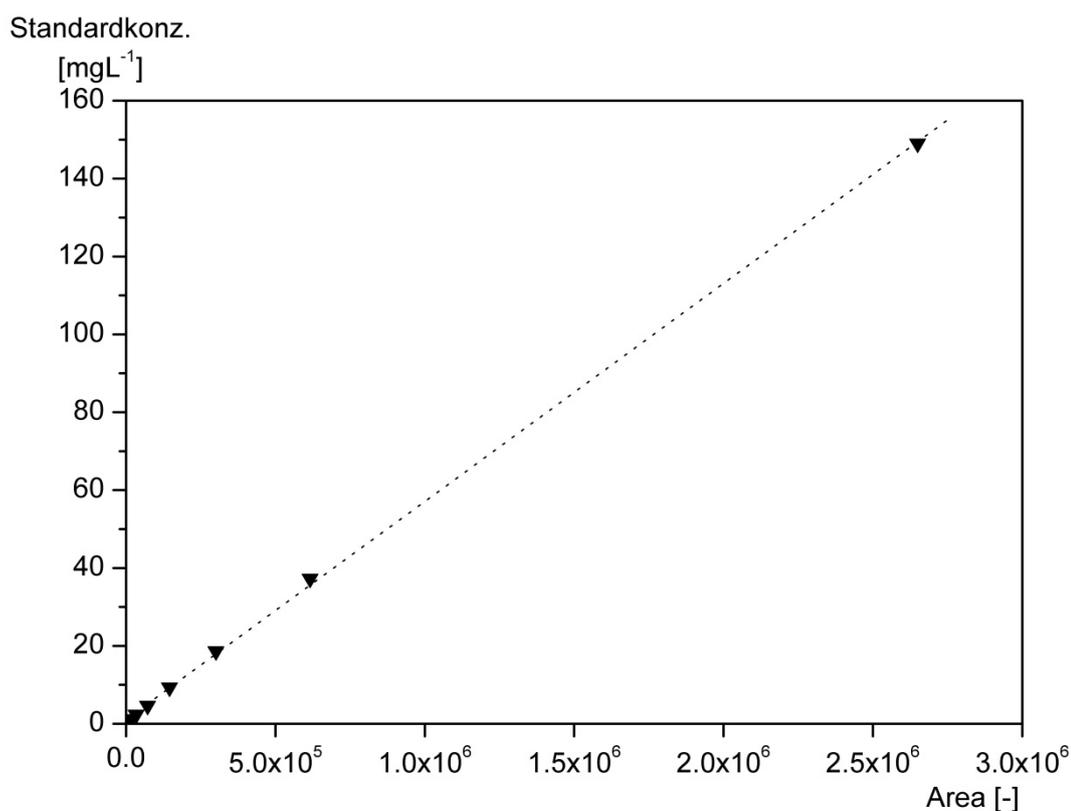


Abbildung 4.2 Kalibriergerade erstellt mittels pDNA-Standardreihe bei 260 nm im UV-Detektor.

In Abbildung 4.3 ist ein Chromatogrammausschnitt des ccc-Standards zu sehen. Es ist zu erkennen, dass der Peak ein starkes Tailing zeigt. Auch der Peak einer Probeninjektion (Abbildung 4.4) zeigt ein deutliches Tailing. Das Tailing wurde nicht durch einen falschen pH-Wert oder Totvolumina zwischen Säule und Kapillare bedingt. Weitere Untersuchungen zur Verminderung des Tailings konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

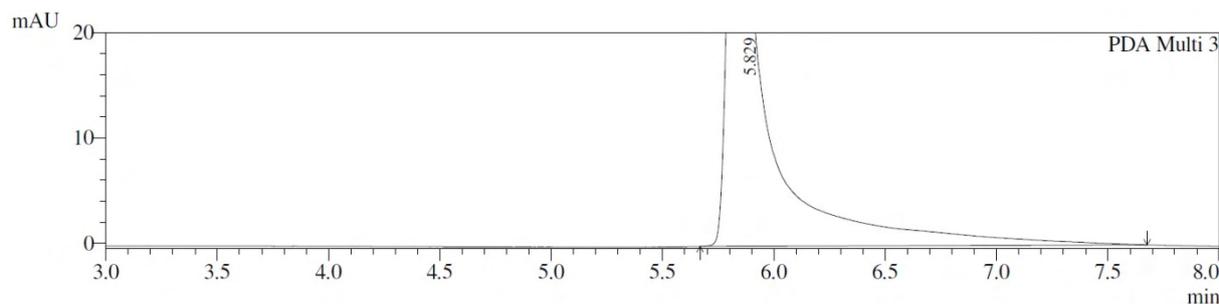


Abbildung 4.3: Chromatogrammausschnitt des Standards in ccc-Form.

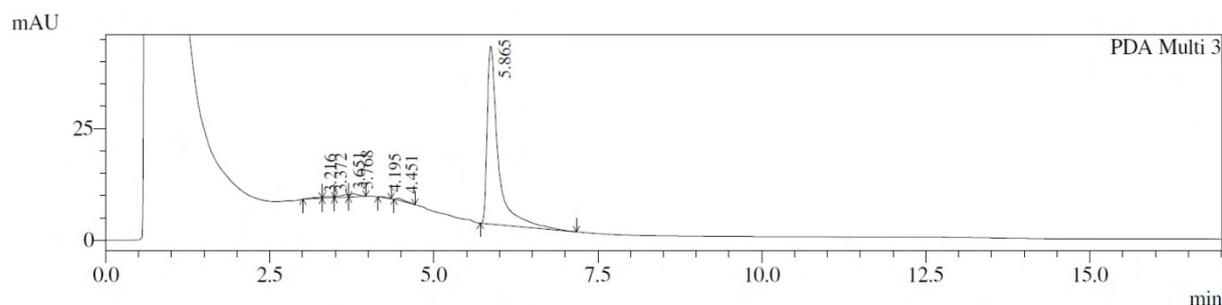


Abbildung 4.4: Chromatogramm einer Probeninjektion.

Um neben der quantitativen auch eine qualitative Aussage treffen zu können, wurde das Trennverhalten von ccc-, oc- und linearer Form untersucht. Eine klare Trennung ermöglicht die Integration der einzelnen Peaks und damit deren Quantifizierung. Um damit letztendlich eine qualitative Aussage zu treffen, wird jeweils das Verhältnis der einzelnen Konzentrationen zur Gesamtkonzentration der pDNA bestimmt.

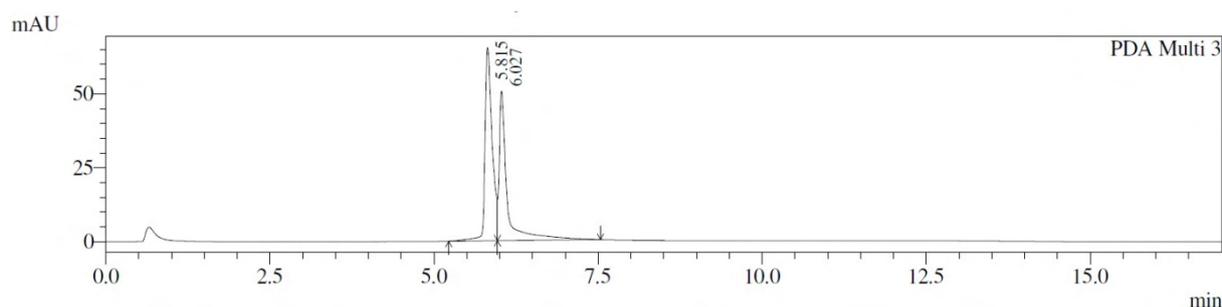


Abbildung 4.5: Chromatogramm einer Mixprobe aus ccc-Form und linearer Form.

Um das Trennverhalten von linearisiertem Standard und dem ccc-Standard zu beobachten, wurde ein Mix dieser Formen injiziert (Abbildung 4.5). Die beiden Standardformen eluieren zu unterschiedlichen Zeiten, werden dennoch nicht gänzlich getrennt. Da die linearisierte Form in den Proben nur einen geringen Teil der pDNA ausmacht, verschwindet der Peak im Tailing des ccc-Peaks.

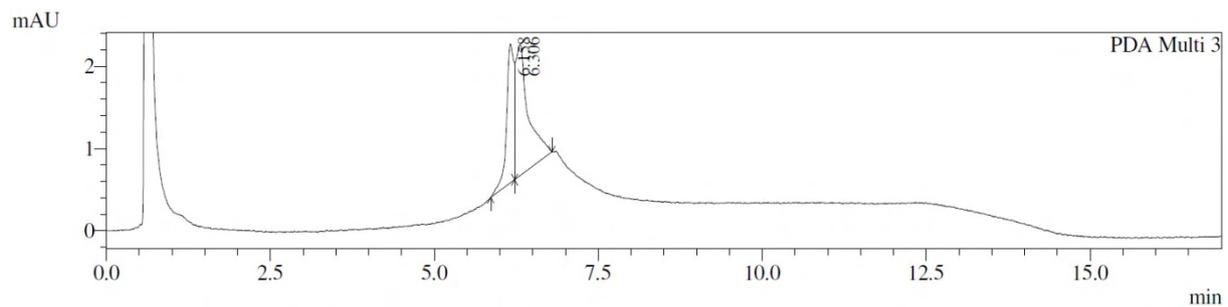


Abbildung 4.6: Chromatogramm der oc-Form

Die oc-Form (Abbildung 4.6) liefert einen doppelten Peak. Der erste Peak könnte aufgrund der Retentionszeit eventuell die linearisierte Form sein, die durch unspezifisches Schneiden des Enzyms oder durch Scherkräfte beim Pipettieren entstanden ist. Der zweite Peak müsste dann die oc-Form sein. Dieser ist viel zu klein und hätte von der Größe mit den Peaks aus Abbildung 4.5 vergleichbar sein müssen, da eine ähnliche Konzentration verwendet wurde. Außerdem folgt dem Peak ein sehr langer flacher Peak, bevor die Basislinie wieder ihren Nullwert erreicht. Eine Wiederholung mit einem neuen Restriktionsverdau brachte das gleiche Ergebnis. Auf dem ersten Agarosegel (Abbildung 4.8) ist die oc-Form aufgetragen, welche durch die exakt gleiche Behandlung mit dem Restriktionsenzym aus der ccc-Form hergestellt wurde. Es zeigt sich eine schwache Bande auf Höhe der linearisierten Form. Die Bande der oc-Form ist deutlich zu erkennen. Das Gel liefert keinen Hinweis, dass der Verdau auf die durchgeführte Art und Weise nicht die oc-Form liefert.

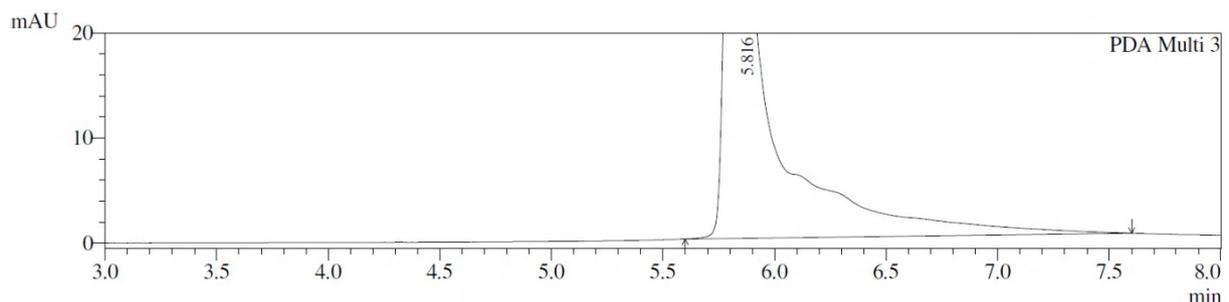


Abbildung 4.7: Chromatogrammausschnitt einer Mixprobe aus ccc-Form und oc-Form.

In Abbildung 4.7 wurde ein Mix aus ccc-Standard und dem zur oc-Form verdauten Standard injiziert. Es sind Peaks im Tailing zu erkennen, eine Zuordnung und Quantifizierung ist nicht möglich.

Der Grund des Tailings konnte nicht identifiziert werden. Die Injektion von Eluent B

zwischen den Probeninjektionen zeigte eine konstante Basislinie. Es sind also keine Verschmutzungen auf der Säule, welche während der Messungen teilweise mit der pDNA eluiert werden und das Tailing verursachen. Das Tailing tritt außerdem bei Proben wie auch beim Standard auf und da der Standard nur pDNA enthält, muss es sich beim gesamten Peak um pDNA handeln. Daher wird die gesamte Fläche des Peaks inklusive Tailing zur Quantifizierung integriert.

Das Tailing, die schlechte Trennung und das auffällige Verhalten der oc-Form lassen keine Quantifizierung der einzelnen Formen bei Probeninjektionen zu, weshalb mit dieser Methode keine qualitative Bewertung möglich ist.

In der Probenvorbereitung (Kapitel 3.4) werden die Zellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen um die pDNA aufzureinigen. Für eine quantitative Bestimmung der pDNA ist es wichtig, dass alle Zellen aufgeschlossen werden. Für eine Zelldichte bis 11 gL^{-1} konnte experimentell ermittelt werden, dass die Lyse des Plasmidaufreinigungskits mit dem vom Hersteller angegebenen Puffervolumina vollständig für ein 0,5 mL-Pellet funktioniert. Da teilweise höhere Zelldichten vorlagen, wurde teils das 1,5-fache Volumen verwendet. Bei der Analytik für U63 wurde ausschließlich das 1,5-fache Lysevolumen verwendet. Mit der letzten Erhöhung der Zelldichte in Versuch U 63 (Phase 16) wurde das Zellpellet nur noch aus 0,25 mL anstatt aus 0,5 mL hergestellt, um mit dem eingesetzten Puffervolumen die vollständige Zellyse zu gewährleisten.

Da keine Aussagen zur pDNA-Qualität gemacht werden konnten, wurden die Endproben der Phasen im Agarosegel betrachtet. Neben Aussagen zur pDNA-Qualität kann das Agarose-Gel auch Hinweise auf Veränderungen des Plasmids o.ä. geben. Dies wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.3 pDNA Analytik mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Die pDNA-Analytik mittels HPLC konnte lediglich Aufschluss über die Quantität geben. Um weitere Faktoren zu untersuchen, wurden zwei Agarosegele (Gel 1, Abbildung 4.8, mit Proben aus U62 und Gel 2, Abbildung 4.9, mit Proben aus U63 und U62) mit den Endproben der jeweiligen Phasen gemacht. Da in der AGE DNA in Abhängigkeit ihrer Größe, aber auch ihrer Topologie aufgetrennt wird, können Aussagen bezüglich der DNA-Qualität und bezüglich Veränderungen der DNA getroffen werden.

In die äußeren Taschen wurde ein DNA-Größenstandard (M) aufgetragen. Bei Gel 1 wurde die erste Lane durch die Aufnahme abgeschnitten. Auf das Gel 1 wurde neben dem Plasmid-Standard in der ccc-Form (c) auch der verdaute Standard als

oc-Form (oc) und als linearisierte Form (lin) aufgegeben. Auf Gel 2 wurde nur der Plasmid-Standard in der ccc-Form aufgegeben.

Tabelle 4.4: Probenauftragung der AGE Gel1.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Versuch U	-	-	-	-	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	-
Phase	-	-	-	-	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	-
Standard	M	c	oc	lin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M

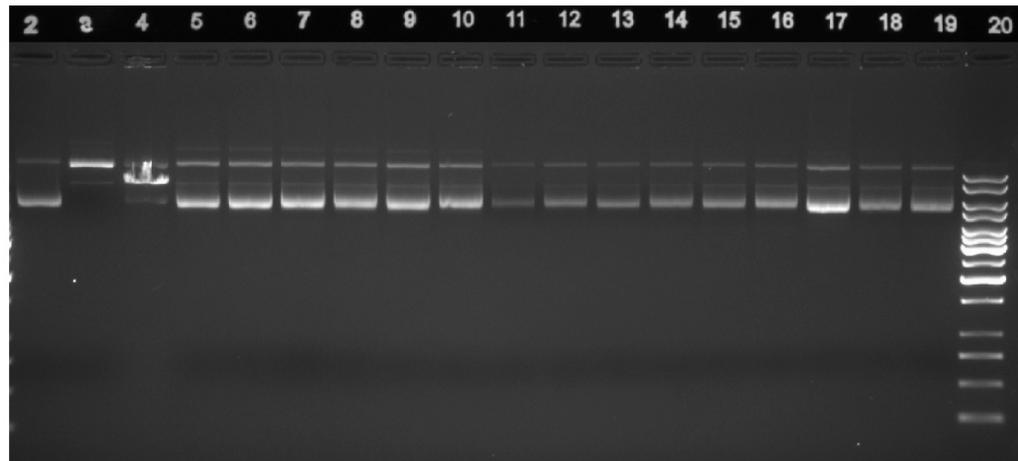


Abbildung 4.8: Gel 1 mit Proben aus U62. Probenauftragung in Tabelle 4.4.

Aufgrund ihrer kompakten Struktur wandert die ccc-Form am besten durch die vernetzten Aggarosemoleküle und zeigt damit die weiteste Wegstrecke im Gel. Die oc-Form wandert aufgrund ihrer offenen Struktur schlechter durch das Gel und zeigt die kürzeste Wegstrecke. Die lineare Form liegt zwischen der oc- und ccc-Form.

Neben den Banden dieser drei Formen ist bei den Proben noch eine weitere Bande kurz oberhalb der oc-Bande zu erkennen. Hierbei muss es sich um die Dimer-Form des Plasmids handeln, welche üblicherweise kurz oberhalb der oc-Bande läuft. Plasmid-Dimere können durch Fehler bei der Replikation entstehen und können die Plasmidreplikation des Monomers negativ beeinflussen. Die Dimer-Hypothese [Summers 1993] beschreibt die Verdrängung des Monomers durch das Dimer und die Abnahme der Plasmidkonzentration. Eine deutlich höhere Dimerkonzentration im Verhältnis zur Monomerkonzentration ist nicht zu erkennen. Ab Lane 11 sind keine Dimer-Banden mehr zu erkennen. Das resultiert vermutlich aus der geringeren Auftragsmenge an DNA, weswegen die Dimer-Bande nicht mehr zu erkennen ist.

Das Gel weist sonst keine weiteren Auffälligkeiten auf. Veränderungen der Laufweite im Vergleich zum Standard könnten auf eine erhebliche Größenänderung der DNA durch Deletion oder Rekombination hinweisen. Deletionen kleinerer Sequenzen oder

Punktmutationen können nicht ausgeschlossen werden. Diese hätten keinen signifikanten Einfluss auf die Laufweite, könnten aber einen erheblichen Einfluss auf die Funktion des Plasmids haben. Sofern sie den Replikationsursprung betreffen würden, könnten sie die Plasmidreplikation beeinflussen [mündliche Kommunikation].

Eine erhöhte Nukleaseaktivität in der Zelle kann auch ausgeschlossen werden. Diese würde dazu führen, dass die Plasmide in der Zelle in kleine Bruchteile oder gänzlich zu Nukleotiden zerlegt werden. Diese Bruchteile würden sich hinter der ccc-Bande in Form eines langen hellen Flecks zu erkennen geben.

Tabelle 4.5: Probenauftragung der AGE Gel2.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Versuch U	-	-	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	62	62	62	-
Phase	-	-	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	1	18	18	-
Standard	M	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M

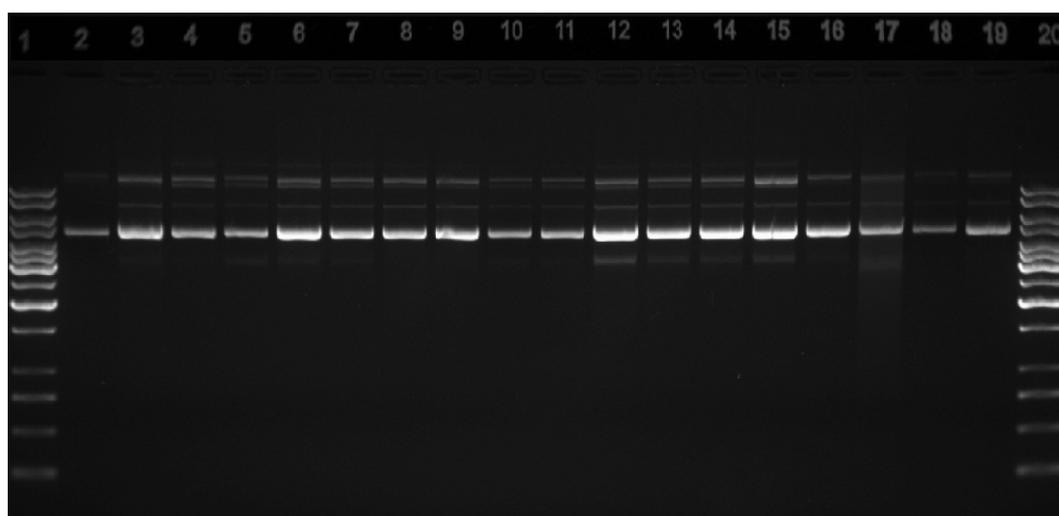


Abbildung 4.9: Gel 2 mit Proben aus U63 und U62. Probenauftragung in Tabelle 4.5.

Abbildung 4.9 zeigt zwei Auffälligkeiten. Die oc-Bande stellt sich als Doppelbande dar und hinter der der ccc-Bande ist eine weitere Bande zu erkennen. Da die Proben auf Lane 17 und 19 dies zum Teil auch aufweisen, ist diese Auffälligkeit nicht spezifisch für eine der Kultivierungen und der Grund hierfür muss somit beide Fermentationen betreffen.

Bei der Doppelbande muss es sich um zwei Formen der oc-Form handeln, welche unterschiedlich relaxiert sind. Es könnten unterschiedlich viele helikale oder superhelikale Windungen vorliegen, die wiederum einen Einfluss auf die Form und somit auf die Laufweite der DNA haben. Eine Trennung von unterschiedlich stark gewundener DNA in der AGE ist durchaus möglich [Hardin 2011]. Der Grund, dass diese

Doppelbände nicht bei Gel 1 beobachtet werden konnte, liegt wahrscheinlich in der Probenvorbereitung. Bei Gel 2 wurden die Proben durch Schnippen an das Reagiergefäß gemischt, bei Gel 1 durch Pipettieren. Das Pipettieren führt zu Scherkräften, die Strangbrüche in der DNA verursachen. Liegt nun ein Teil der pDNA aufgrund intrazellulärer Fehler bei der Superspiralisierung nur mit einer superhelikalen Windung vor und wird diese nicht durch einen Strangbruch gänzlich relaxiert, könnte diese Form als eine zweite Bande kurz hinter der cc-Bande erkennbar sein.

Die extra Bande hinter der ccc-Form kann nicht erklärt werden. Eine Verunreinigung während der Probenvorbereitung müsste sich in allen Lanes abzeichnen. Weitere DNA-Topologien, die kompakter als die ccc-Form sind und somit eine längere Wegstrecke im Gel zeigen würden, wurden bisher nicht beschrieben. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Bande um ein kleineres Plasmid handelt, welches durch Deletion entstanden ist. Beschreibungen dieser Art wurden in der Literatur aber nicht gefunden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die RCB bereits kontaminiert ist und somit ein geringer Teil der Kultur ein anderes Plasmid beinhaltet. Dieser Teil, sofern er existiert, nimmt aber zu keiner Zeit zu. Außerdem wurde mittels Quantifizierungssoftware bestimmt, dass der Anteil dieser Bande an der gesamten DNA in einer Lane kaum über 1% beträgt. Somit hätte diese Kontamination keinen signifikanten Einfluss auf die Kultur und die Plasmidausbeute.

Um endgültig zu klären, worum es sich bei dieser Bande handelt, wäre eine Sequenzierung dieser DNA nötig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies nicht durchgeführt werden.

Tabelle 4.6: Mittelwert und Standardabweichung der ccc-Form auf Gel 1 und Gel 2:

Gel	Mittelwert der ccc-Form [%]	Standardabweichung der ccc-Form [%]
1	81,43	4,58
2	89,26	2,68

Da mittels HPLC-Analytik keine Aussage bezüglich der DNA-Qualität getroffen werden konnte, wurde mit einer Quantifizierungssoftware das Verhältnis der drei Formen bestimmt, bzw. der vier Formen, wenn das Dimer zu erkennen war. Wie in Tabelle 4.6 zu erkennen ist, weichen die Werte für die ccc-Form auf einem Gel nur geringfügig voneinander ab. Es ist äußerst wahrscheinlich, dass die Werte durch die Probenvorbereitung beeinflusst sind. Der höhere Mittelwert von Gel 2 bestätigt diese Annahme. Wie bereits beschrieben, wurde bei Gel 2 weniger pipettiert um die Proben

zu mischen. Somit liegt es nahe, dass weniger Plasmide der ccc-Form einen Strangbruch durch Scherkräfte erlitten haben und in die oc-Form, oder bei einem doppelten Strangbruch in die lineare Form, übergegangen sind.

Es ist schwer, die Ergebnisse bezüglich der DNA-Qualität zu bewerten. Hierfür müssten weitere analytische Versuche und Verfahren durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren. Klar zu erkennen ist, dass die verschiedenen Phasen keinen erheblichen Einfluss auf die Qualität der DNA haben. Der Vollständigkeit halber wurden die Ergebnisse im Folgenden mit aufgeführt.

4.4 Glucose- und Acetat-Analytik mittels AEX-Chromatographie

Neben der Produkt-Analytik wurde auch eine Glucose- und Acetat-Analytik durchgeführt. Hauptsächlich wurde die Analytik mittels HPLC durchgeführt. Jedoch kann es möglich sein, dass sich die Peaks von Substanzen mit ähnlicher Retentionszeit im Chromatogramm überlagern, weswegen zum Teil Vergleichsmessungen mit einem Enzym-Assay für Acetat oder Glucose durchgeführt wurden.

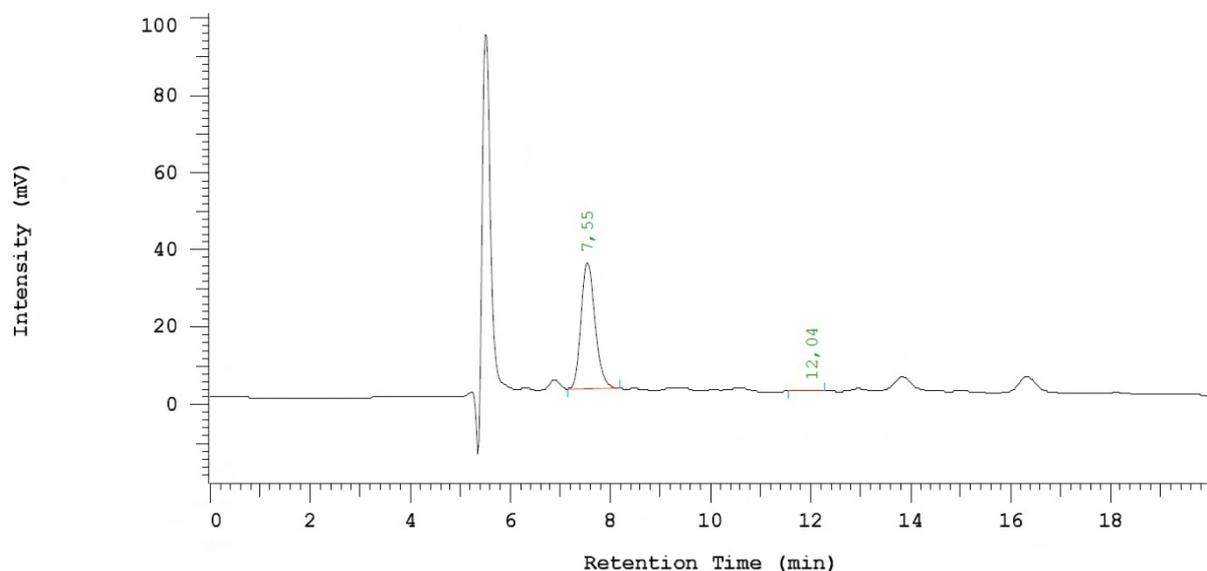


Abbildung 4.10: Chromatogramm einer Messung zur Acetat- und Glucosebestimmung mit Methode 1.

In Kapitel 3.8 sind die Methoden aufgeführt. Methode 1 (0,013 M Schwefelsäure, Flow=0,8 mLmin⁻¹) wurde für die Proben von Versuch U62 angewendet. Die Retentionszeit von Glucose liegt bei 7,40 min, die von Acetat bei 11,65 min. Abbildung 4.10 zeigt das Chromatogramm einer Probe bei der erwartungsgemäß kein Acetat und keine Glucose (im messbaren Bereich) vorliegen. Die Vergleichsmessungen mit Enzym-Assays bestätigen das. Bei einer Retentionszeit von 7,55 min erscheint ein

Peak, der sich bei vorhandener Glucose mit deren Peak überlagert. Das würde den Peak der Glucose vergrößern und fälschlich zu einem höheren Glucosewert führen. Vergleichsmessungen mit dem Assay konnten keine Glucose für die Endproben der Phasen nachweisen und bestätigen damit den Fehler der HPLC-Messungen. Die Acetatanalytik wurde durch keine Peaküberlagerung beeinflusst.

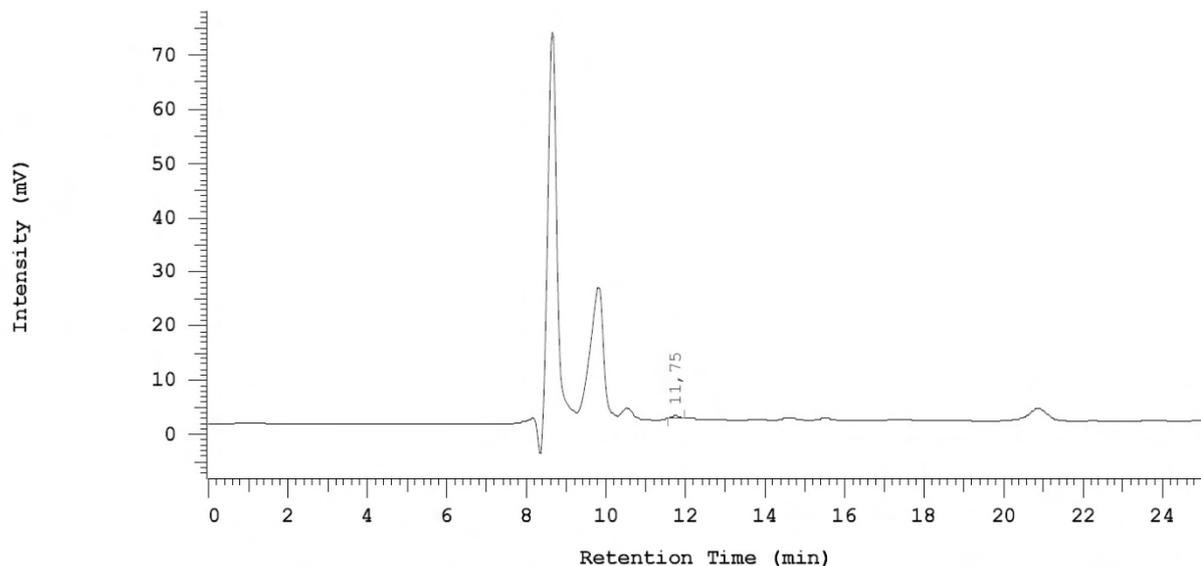


Abbildung 4.11: Chromatogramm einer Messung zur Acetat- und Glucosebestimmung mit Methode 2.

Methode 2 ($0,001\text{ M}$ Schwefelsäure, $\text{Flow}=0,5\text{ mLmin}^{-1}$) wurde zur Analytik von Versuch U63 angewendet. Glucose eluiert bei einer Retentionszeit von $11,75\text{ min}$ und Acetat bei $18,85\text{ min}$. Abbildung 4.11 zeigt das Chromatogramm einer Probe bei der erwartungsgemäß kein Acetat und keine Glucose (im messbaren Bereich) vorliegen. Bei $11,75\text{ min}$ ist ein sehr kleiner Peak zu erkennen. Dieser liegt unter der Nachweisgrenze für Glucose. Bei der Retentionszeit von Acetat erscheint kein Peak und die Acetatkonzentration ist Null. Vergleichsmessungen mit den Enzym-Assays ergaben, dass die Messergebnisse dieser Methode zuverlässig sind.

Die Acetat- und Glucoseanalytik für Fermentationsüberstände dient der Analyse des Kulturverhaltens. Eine Glucoseakkumulation könnte darauf hinweisen, dass das System nicht im Fließgleichgewicht ist. Nach einer Erhöhung der Verdünnungsrate kommt es durch das stärkere Ausspülen der Zellen zur Zunahme der Glukosekonzentration. Erst mit Zunahme der zellspezifischen Wachstumsrate kommt es dann wieder zu einer konstanten Glucosekonzentration. Aufgrund des niedrigen K_S und dem Bereich der eingestellten Verdünnungsraten dürfte die Änderung der Glucosekonzentration nicht messbar sein.

Ein Grund, der dennoch zu einem messbaren Anstieg führen würde, wäre, dass die Zellen Probleme haben mit steigender Substratkonzentration ihr Zellwachstum anzupassen. Somit würden die Zellen länger ausgewaschen und die Glucosekonzentration könnte über einen längeren Zeitraum bis auf einen messbaren Wert ansteigen. Ein Grund hierfür wäre z. B. eine niedrige Zellaktivität durch zellinterne Inhibitoren oder ähnliches.

Auch nach einem Shift der Glucosezulaufkonzentration kommt es zuerst zu einer Zunahme der Glucosekonzentration und in Folge der höheren Wachstumsrate zum Anstieg der Zelldichte.

Ein weiterer Grund, der zur Zunahme der Glucosekonzentration führt, wäre eine Substratlimitierung durch eine andere Komponente. Dies könnte z. B. ein Komplexbestandteil sein, aber z. B. auch Sauerstoff. Eine Sauerstofflimitierung wäre jedoch sofort aufgrund des pO_2 -Abfalls erkennbar. Mit einer Substratlimitierung wäre das Zellwachstum gemindert und die zugeführte Glucose würde nicht mehr gänzlich für das Zellwachstum benötigt. Solch ein Zustand könnte durch ein Shift der Glucosezulaufkonzentration verursacht werden, da die Zelldichte steigt, der einzige geänderte Parameter aber die Glucose ist.

Die Ergebnisse der HPLC bzw. teilweise die Ergebnisse der Vergleichsmessungen mit dem Assay ergaben, dass am Ende der einzelnen Phasen keine (nachweisbare) Glucosekonzentration vorliegt. Nach einem Shift der Verdünnungsrate (exemplarisch an Phase 8 von U63 untersucht) oder der Glucosezulaufkonzentration konnte keine messbare Zunahme der Glucosekonzentration beobachtet werden (Messwerte im Anhang, Tabelle 0.1 und Tabelle 0.2). Die Ergebnisse der Glucoseanalytik lassen keinen Schluss zu, dass das System-Verhalten des Chemostaten in irgendeiner Weise gestört oder die Kultur beeinträchtigt war.

Ein Metabolit, der von *E. coli* gebildet wird, ist Acetat. Acetatbildung ist häufig bei einer hohen oder maximalen zellspezifischen Wachstumsrate zu beobachten. Hier kommt es aufgrund der hohen Auslastung des aeroben Stoffwechsels neben diesem zum anaeroben Abbau der C-Quelle und damit zur Bildung von Acetat. Aber auch der Einfluss anderer Faktoren (z. B. pH-Wert) könnte einen Stressfaktor für die Mikroorganismen darstellen und zu einer Acetatbildung führen. Die Acetatkonzentration wurde für die Endprobe jeder Phase bestimmt. Wenn es in einer Phase zu Umstellungen im Stoffwechsel und in Folge dessen zu einer andauernden Acetatbildung kommt, müsste dies mit der Analyse der Endprobe erkennbar sein. Messbare Acetat-

konzentrationen konnten nur im Laufe der Batch-Phase und zum Start der kontinuierlichen Phase beobachtet werden sowie in Folge des letzten Shifts der Glucosezulaufkonzentration (Messwerte im Anhang, Tabelle 0.1 und Tabelle 0.2). Die Auswirkungen des Shifts in der Glucosezulaufkonzentration werden in Kapitel 4.7 diskutiert. Da es sonst (abgesehen von der Batch-Phase) zu keiner Acetatbildung kam, wurde die Kultur weder extremen Stressfaktoren, die zur Acetatbildung führen, ausgesetzt, noch teilte sie sich entgegen der Chemostat-Theorie über einen längeren Zeitraum mit einer höheren Wachstumsrate (annähernd μ_{max}) als erwartet.

Um das Verhalten der Kultur, hauptsächlich in Bezug auf die Produktbildung, zu beobachten und um optimale Prozessparamtereinstellungen zu finden, wurden verschiedene Variationen während den Kultivierungen durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln genauer betrachtet werden.

4.5 Variation der Temperatur

Zuallererst wurde der Einfluss der Temperatur auf die Plasmidreplikation untersucht. In der Literatur wird ein positiver Einfluss einer höheren Temperatur bzw. eines Shifts auf eine höhere Temperatur beschrieben [Carnes 2006, Singer 2009]. Für den Versuch wurde daher eine Starttemperatur von 35 °C gewählt, da erwartet wurde, dass mit steigender Temperatur die Plasmidreplikation zunimmt. Zum einen aufgrund des in der Literatur beschriebenen Verhaltens, zum anderen da *E. coli* ein Darmbakterium (u. a. im Menschen) ist und es nahe liegt, dass 37 °C die optimale Temperatur für *E. coli* ist. Nach Einstellung des Fließgleichgewichts wurden die Variation der Temperatur bei einem durchschnittlichen μ von $0,103 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt, beginnend bei 35 °C und in 1 °C-Schritten aufsteigend.

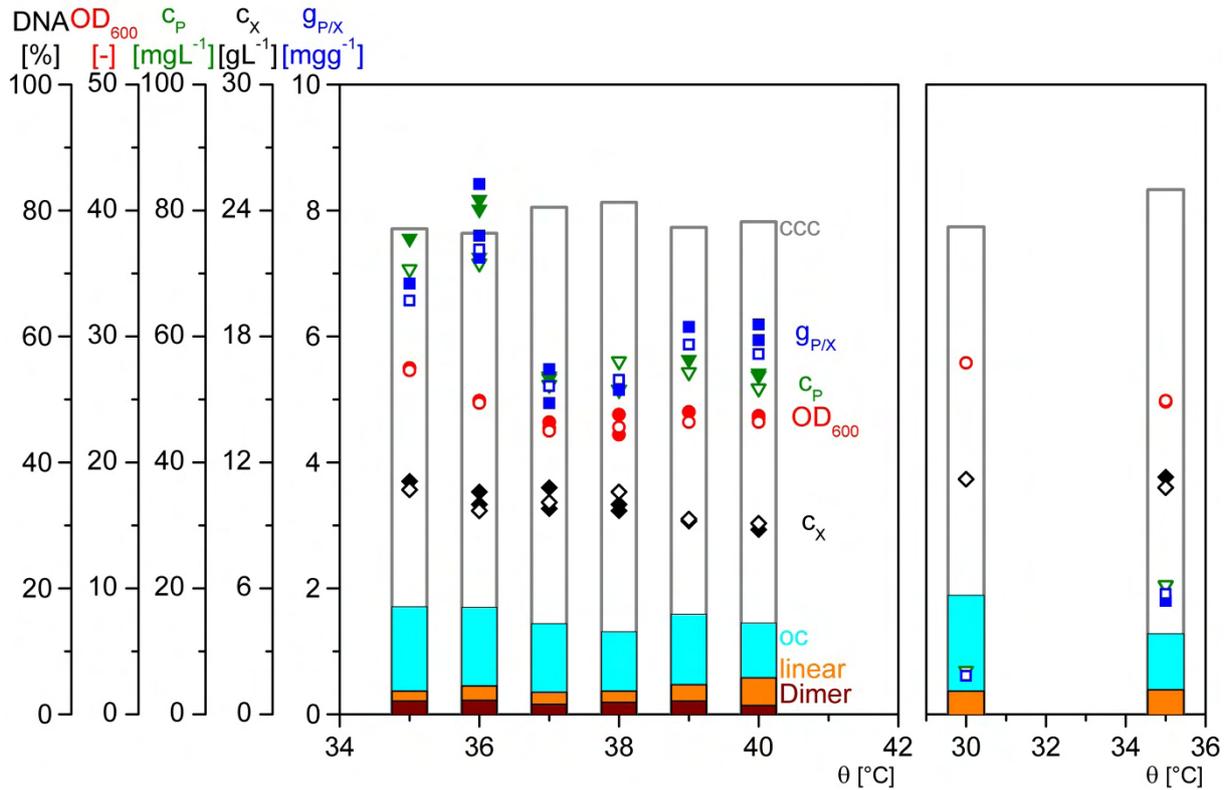


Abbildung 4.12: Messdaten von U62 in Abhängigkeit der Temperatur der jeweiligen Phase. Chronologische Darstellung der Temperaturzustände von links nach rechts. Nicht gefüllte Symbole markieren den Endwert der Phase. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; θ - Temperatur. Die Balken geben den prozentuellen Anteil der einzelnen Plasmidformen in Bezug auf die Gesamtplasmidmenge an.

Aus Abbildung 4.12 erkennt man, dass die Produktausbeute bei 35 °C und 36 °C am höchsten ist. Mit weiterer Erhöhung der Temperatur nimmt die Produktausbeute zuerst ab und steigt dann geringfügig an. Der shift von 40 °C auf 30 °C zeigt, dass dieser Zustand sich deutlich negativ auf die Plasmidproduktion auswirkt. Die Einstellung auf den Ausgangszustand führt zu einer Verbesserung der Plasmidproduktion, liegt aber nach über 42 h bei 35 °C bei weitem nicht in dem Bereich wie ursprünglich.

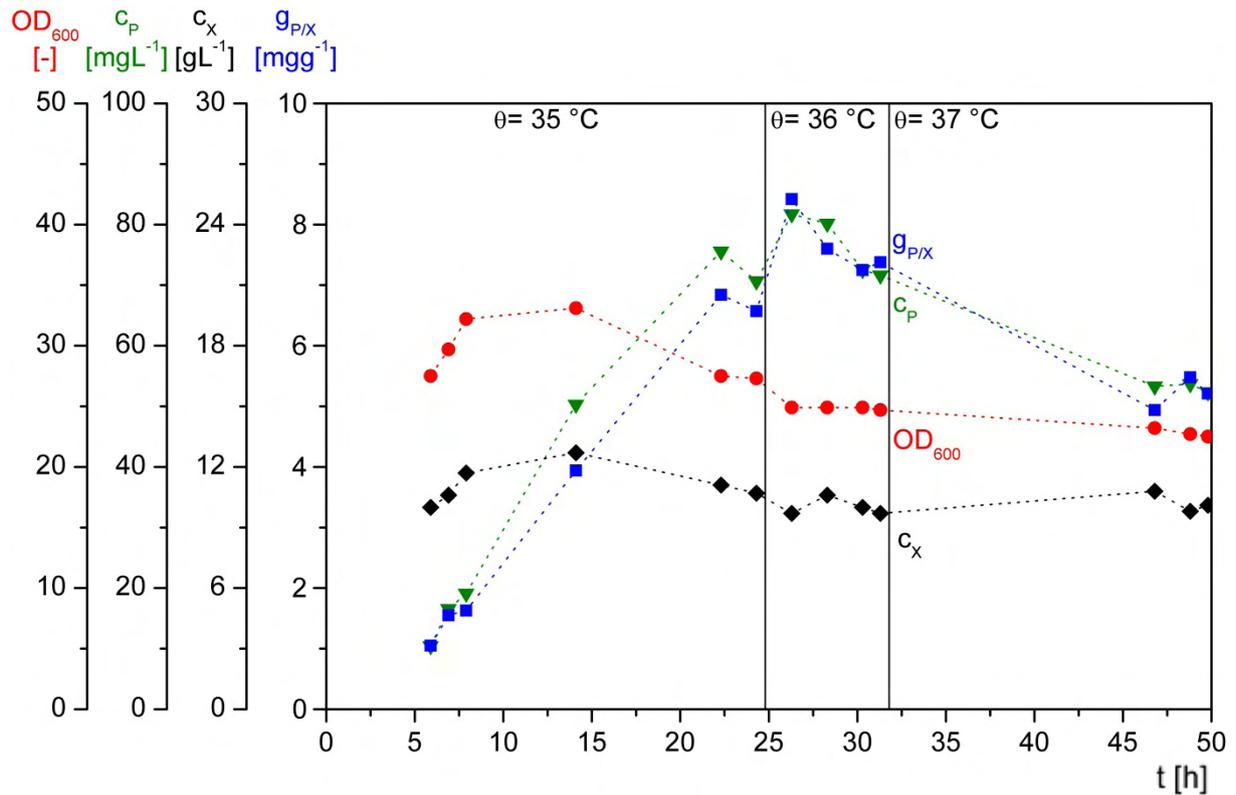


Abbildung 4.13: Verlauf der Temperaturphasen von U62. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; θ - Temperatur.

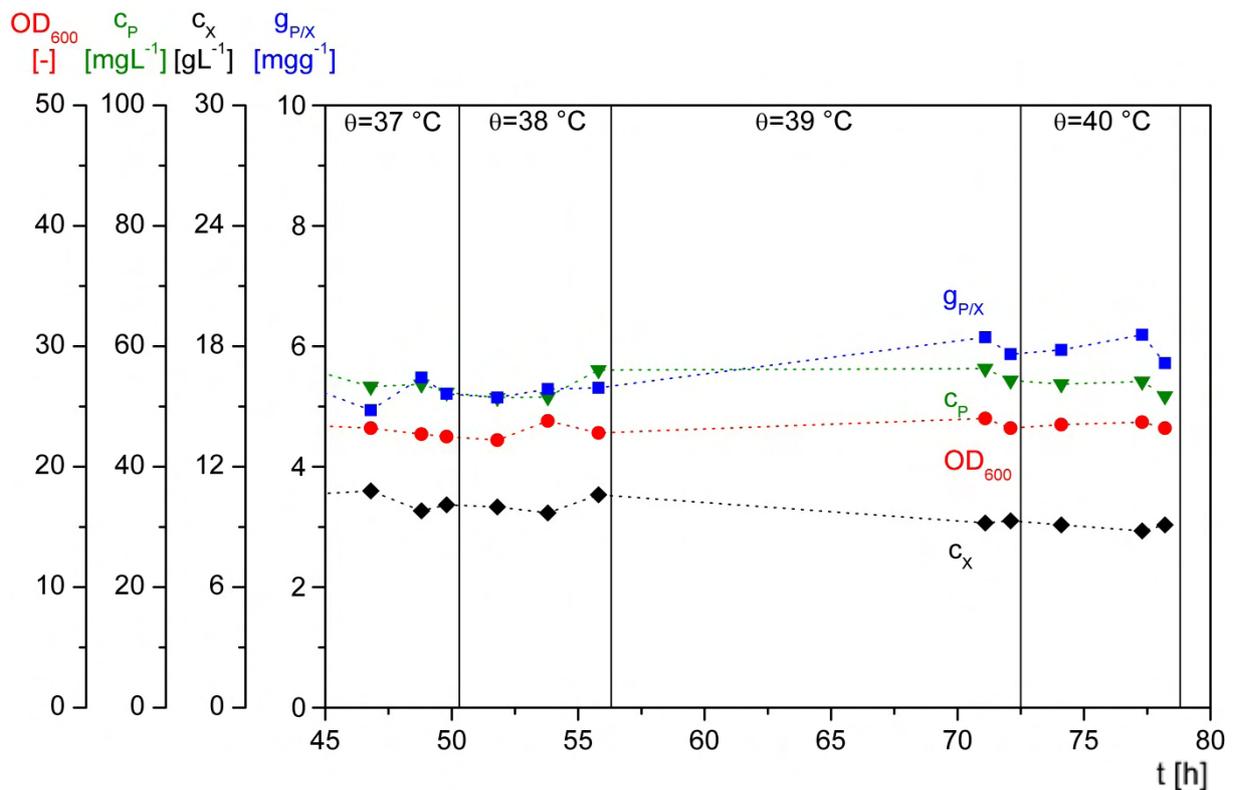


Abbildung 4.14: Verlauf der Temperaturphasen von U62. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; θ - Temperatur.

Abbildung 4.13 zeigt den Start in die kontinuierliche Phase und den Verlauf der Temperaturphasen. Abbildung 4.14 zeigt den weiteren Verlauf der Temperaturphasen. Der Anstieg auf 36 °C führt zuerst zu einer verbesserten Plasmidproduktion. Im Verlauf der Phase nimmt diese wieder ab und erreicht für eine Stunde einen konstanten Wert, der leicht über dem Ausgangswert liegt. Mit dem Temperaturshift auf 37 °C nimmt die Plasmidproduktion weiter ab. Der Shift auf 38 °C bringt keine Veränderung und der zellspezifische Plasmidgehalt bleibt konstant. Mit der Erhöhung auf 39 °C verbessert sich die Plasmidproduktion wieder und verhält sich auch für die folgende Phase konstant.

Dem Anschein nach ist die Plasmidreplikation für die untersuchten Zustände bei 35 °C und 36 °C am stärksten. Mit Abbildung 4.12 wird aber deutlich, dass die Zellen auch nach über 42 h bei 35 °C nicht auf ihre Ausgangsaktivität bezüglich der Plasmidreplikation zurückkommen. Mit dieser Phase ist aber auch klar erkennbar, dass auf eine Phase mit negativem Einfluss auf die Plasmidproduktion durchaus ein deutlicher Anstieg der Plasmidzahl folgen kann. Die Anzahl der Generationszyklen ist mit 20,4 zu diesem Zeitpunkt nicht außergewöhnlich hoch.

Anhand der Ergebnisse kann noch keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Temperatur auf die Plasmidproduktion gemacht werden. Es sind Trends erkennbar und einzelne Zustände sind durch das Verhalten nach dem Shift vergleichbar, wodurch auch klar wird, dass die Temperatur einen Einfluss hat. Klar erkennbar ist, dass es durch Änderung eines Parameters zu einer Verschlechterung der Plasmidproduktion kommen kann. Diese Verschlechterung kann sich auch noch in folgenden Generationen bei anderen Parametern (u. a. Ausgangsparameter) widerspiegeln.

Aus welchem Grund auch in Folgegenerationen die Plasmidproduktion schlechter ist, kann nicht gesagt werden. Es ist möglich, dass eine Parameteränderung zu einer Veränderung der Zellen führt, welche sich auch noch in folgenden Generationen, negativ auf die Plasmidreplikation auswirkt und so trotz vergleichbarer Parametereinstellungen keine vergleichbare Plasmidkonzentration erreicht wird.

Es ist aber auch möglich, dass die Kultur lediglich einem Alterungsprozess unterliegt und daher mit der Zeit die Plasmidreplikation nicht mehr vergleichbar ist. Um dies zu bestätigen bzw. auszuschließen müsste die kontinuierliche Kultur bei konstanten Parametern über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

Die Verschlechterung der Plasmidproduktion, auch noch in Folgegenerationen, könnte ebenfalls durch beide Faktoren bedingt sein.

Die Analyse der pDNA-Qualität auf Basis der AGE (Kapitel 4.3) liefert keine Hinweise, die Rückschlüsse auf eine Veränderung des Plasmids erlauben, die Dimer-Hypothese bestätigen oder eine erhöhte Nukleaseaktivität nachweisen. Zwar können kleinere Deletionen oder Punktmutationen nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wäre es nicht zu erklären, wie sich solch ein verändertes Plasmid innerhalb von etwa 13 Generationen (Phase 2 bis 10) gegen das ursprüngliche Plasmid durchsetzt bzw. einen Einfluss auf dessen Replikation hat, so dass letztendlich die Plasmidzahl in diesem Maße sinkt. Nachweislich ausgeschlossen werden kann eine Mutation in der Plasmidsequenz jedoch nicht. Mutationen im Genom, welche Einfluss auf das Origin haben (hier *colE1*), werden in der Literatur beschrieben [Ederth 2002]. Die Mutation führt zu einer verminderten Replikation des Plasmids, hat aber keinen Einfluss auf die Genomreplikation und das Verhalten der Zelle. Damit sich eine Mutation innerhalb von 13 Generationszyklen so signifikant durchsetzt, müsste sie zumindest mit einer Häufigkeit von 10^{-2} oder höher auftreten. Außerdem wäre ein Stamm mit dieser Mutationsrate nicht für den Einsatz in der Gentechnik geeignet. Die Häufigkeit dieser Mutation wird mit 10^{-7} beschrieben. Es ist daher äußerst unwahrscheinlich, dass durch Mutationen des Genoms der zellspezifische Plasmidgehalt so extrem abnimmt. Warum es letztendlich zu der deutlichen Abnahme des zellspezifischen Plasmidgehalts kommt kann jedoch nicht geklärt werden.

Einen deutlichen Einfluss auf die Qualität der pDNA haben die untersuchten Temperaturzustände nicht. Die Schwankungen liegen im Bereich der Methode und die Ergebnisse sind aufgrund der Scherkräftempfindlichkeit von pDNA durchaus durch die Probenvorbereitung beeinflusst.

Mit zunehmender Zeit und zunehmender Temperatur ist eine Abnahme der Zellkonzentration zu beobachten. Ein direkter Zusammenhang mit der Generationszahl ist ausgeschlossen, da die Zellkonzentration zu späteren Zeitpunkten wieder höhere Werte annimmt.

Ein direkter Zusammenhang mit der Temperatur scheint erkennbar zu sein, da die Zellkonzentration mit steigender Temperatur sinkt und nach dem Shift auf 30 °C wieder einen höheren Wert annimmt. Mit diesem Temperaturshift wurde aber auch das Feed-Reservoir mit frischem Medium befüllt. Durch die Hitzesterilisation entstehen Präzipitate im Medium, welche sich auch wieder lösen, aber nicht mit Sicherheit vollständig. Es ist möglich, dass diese Präzipitate absinken und aufgrund der Medienentnahme am Boden des Reservoirs zu Beginn vermehrt der Kultur zugeführt

werden. Bei den Präzipitaten handelt es sich um Bestandteile der Komplexkomponenten, welche durchaus zu einem Teil als C-Quelle verwendet werden. Außerdem dienen die Komplexbestandteile teils als wichtige Bausteine der Biosynthese, wodurch die Mikroorganismen mehr Energie auf deren Synthese verwenden müssen, wenn zu einem späteren Zeitpunkt nur noch weniger dieser Bestandteile zugeführt werden. Dies führt wiederum dazu, dass weniger Energie zur Bildung der Biomasse bereitgestellt wird und die Zelldichte abnimmt. Aufgrund dieser Annahme wurde das Medium, welches bei Start der Kultur noch nicht gerührt wurde, fortan gerührt und die Zunahme der Zellkonzentration bei 30 °C könnte durchaus mit der Zufuhr von frischem Medium in Zusammenhang stehen.

Im weiteren Kultivierungsverlauf kommt es zu Änderungen der Zelldichte, jedoch stehen diese, den Beobachtungen nach, mit dem zellspezifischen Plasmidgehalt in Zusammenhang (Kapitel 4.6). Ein direkter Zusammenhang mit dem Füllstand des Feedreservoirs und der Zelldichte konnte nicht mehr beobachtet werden. Mit absoluter Sicherheit lässt sich der Einfluss der Präzipitatbildung und der durchmischten Feedlösung nicht klären.

Da die Ergebnisse keinen eindeutigen Schluss zulassen, aber keine eindeutige Begründung für die Abnahme der Plasmidreplikation gefunden wurde, musste zunächst von der Annahme ausgegangen werden, dass 35 °C und 36 °C im Vergleich zu den betrachteten Zuständen eine bessere Plasmidreplikation bedingen. Da Variationen der zellspezifischen Wachstumsrate im Laufe des Versuches U62 bei 35 °C durchgeführt wurden, wurde auch für den Folgeversuch (U63) eine Temperatur von 35 °C gewählt. Um das Verhalten der Kultur gegenüber 34 °C zu beobachten, wurden im Laufe dieser Kultivierung (U63) zwei Temperatur-Shifts, von 35 °C auf 34 °C und wieder zurück, durchgeführt (Abbildung 4.15).

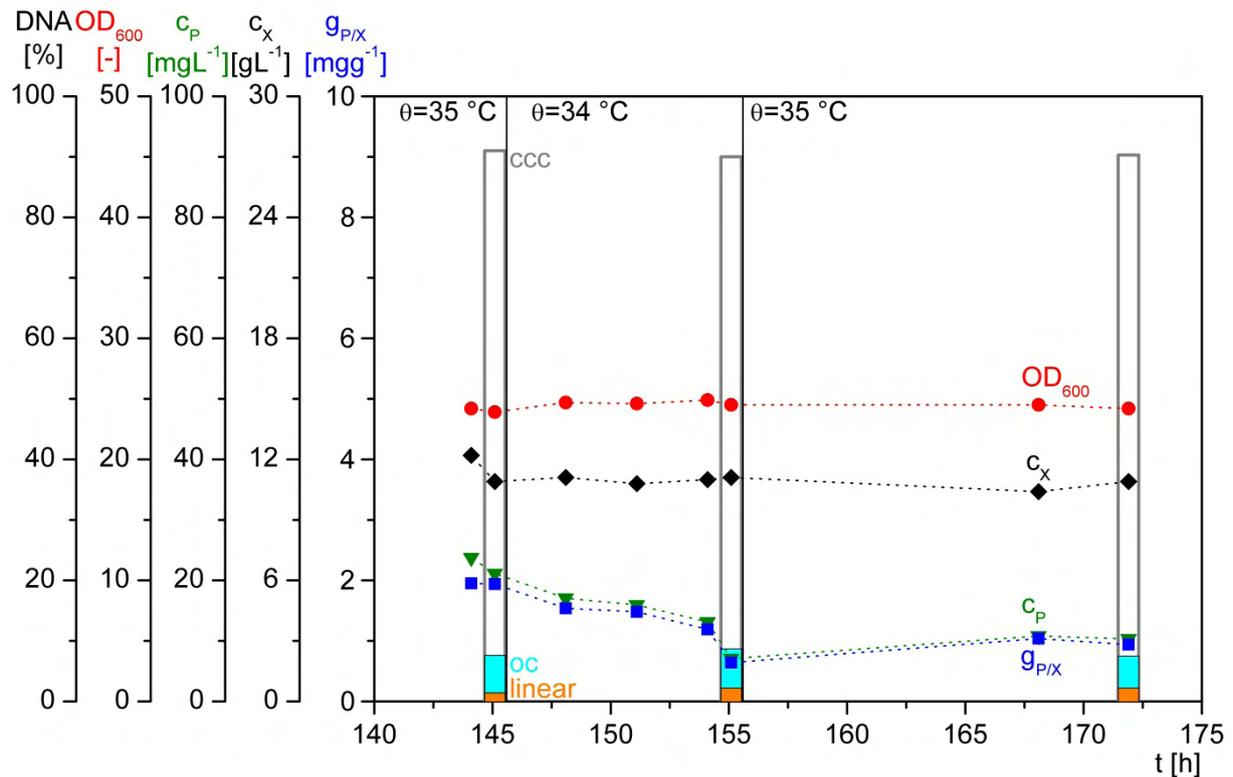


Abbildung 4.15: Verlauf der Temperaturphasen von U63. . Legende: OD₆₀₀ - Optische Dichte bei 600 nm; C_P - Plasmidkonzentration; c_x - Zellkonzentration; g_{P/X} - Zellspezifischer Plasmidgehalt; θ - Temperatur. Die Balken geben den prozentuellen Anteil der einzelnen Plasmidformen in Bezug auf die Gesamtplasmidmenge an.

Durch den Shift auf 34 °C kommt es zu einer Verschlechterung der Plasmidproduktion. Die Einstellung auf den Ausgangszustand führt aber nicht wieder zum Anstieg der Produktion auf den Ausgangswert. Der Wert bleibt nahezu konstant und die Änderung ist aufgrund der Schwankungen der Methode nicht zu bewerten. Im Agarosegel (Abbildung 4.8) konnten keine Auffälligkeiten entdeckt werden.

Die Zelldichte und Qualität der pDNA ist für die drei Phasen vergleichbar.

Es bleibt ungeklärt aus welchem Grund die Zellen nicht wieder den Wert zum Start der kontinuierlichen Kultur erreichen. Eine Aussage über den Einfluss von 34 °C im Vergleich zu 35 °C lässt sich auf Basis der erzielten Ergebnisse nicht treffen.

4.6 Variation der zellspezifischen Wachstumsrate

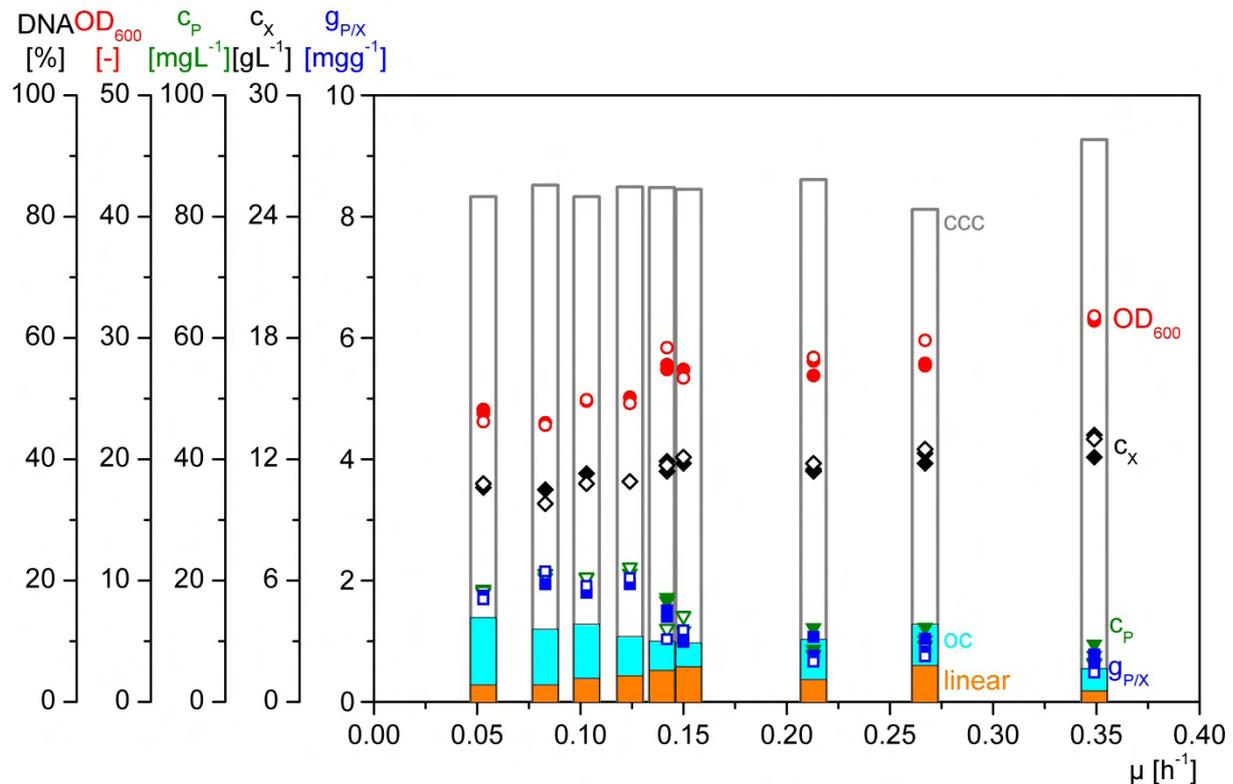


Abbildung 4.16: Messdaten von U62 in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate der jeweiligen Phase. Nicht gefüllte Symbole markieren den Endwert der Phase. Legende: OD₆₀₀ - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; g_{P/X} - Zellspezifischer Plasmidgehalt. Die Balken geben den prozentuellen Anteil der einzelnen Plasmidformen in Bezug auf die Gesamtplasmidmenge an.

In Folge zu den Temperaturvariationen im Versuch U62 wurden Variationen der zellspezifischen Wachstumsrate durchgeführt, durch Veränderung der Förderrate der Feed-Pumpe und damit der Veränderung der Verdünnungsrate D . Die einzelnen Phasen in Abbildung 4.16 sind nicht chronologisch dargestellt. Nach einer Phase mit einem niedrigen μ folgte meist eine Phase mit höherem μ und umgekehrt. Damit wird ein möglicher Einfluss des Kulturalters auf die Ergebnisse minimiert, da immer zwei deutlich unterschiedliche Wachstumsraten direkt miteinander verglichen werden können. Der Zeitliche Verlauf ist in Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass mit steigendem μ der zellspezifische Plasmidgehalt abnimmt. Im Bereich der zellspezifischen Wachstumsrate von 0,05 h⁻¹ bis 0,125 h⁻¹ sind die Werte vergleichbar. Der zellspezifische Plasmidgehalt bei einem μ von 0,142 h⁻¹ und 0,150 h⁻¹ ist vergleichbar, liegt aber niedriger. Der zellspezifische Plasmidgehalt bei einem μ von 0,213 h⁻¹ und 0,267 h⁻¹ ist vergleichbar, liegt aber wiederum niedriger. Ein noch höheres μ führt zu einer weiteren Abnahme des zellspezifischen Plasmidgehalts.

Es zeigt sich, dass die Produktausbeuten für eine gewisse Breite der Verdünnungsrate vergleichbar sind. So auch im niedrigen Bereich, in dem sie am höchsten sind.

Damit wäre es möglich einen Produktionsprozess als Fed-Batch-Modell zu entwickeln und einem definierten μ von $0,1 \text{ h}^{-1}$ zu betreiben, ohne durch Schwankungen in der zellspezifischen Wachstumsrate Verluste in der Produktausbeute zu verzeichnen. Die Ergebnisse basieren jedoch auf einem allgemeinen Vergleich der Zustände und nicht auf einem direkten Vergleich ähnlicher Wachstumsraten, da sie nicht auf- oder absteigend nacheinander eingestellt wurden.

Die Zelldichte scheint im Verhältnis zum zellspezifischen Plasmidgehalt zu stehen. Ein höherer zellspezifischer Plasmidgehalt scheint eine geringere Zelldichte zu bedingen. Dies steht im Widerspruch zur Chemostat-Theorie. Diese besagt, dass die Zelldichte hauptsächlich von der Glucosezulaufkonzentration (Gleichung (2.21)), welche zu den betrachteten Phasen immer konstant war, sowie von der Verdünnungsrate (Gleichung (2.22)) abhängt. Der Einfluss der Verdünnungsrate auf die Zelldichte ist für die betrachteten Verdünnungsraten äußerst gering und theoretisch nicht wahrnehmbar. Jedoch wird für diese Theorie vereinfacht angenommen, dass die einzige Eigenschaft der Biomasse ihr Wachstum sei und jeglicher Energieverbrauch somit dem Wachstum zugeschrieben wird. Es liegt nahe, dass die Zellmasse aber neben dem Wachstum für weitere Vorgänge Energie verbraucht. Dies wird in Kapitel 4.8 genauer erörtert.

Allgemein kann gesagt werden, dass ein höherer Energieverbrauch wahrscheinlich mit der metabolischen Belastung, die aus einer höheren Plasmidzahl resultiert, in Zusammenhang steht. Durch eine höhere Plasmidzahl kommt es automatisch zu einer höheren Expression von Proteinen, welche von Plasmidsequenzen codiert sind. Denn mit höherer Plasmidzahl liegt ein Plasmidgen häufiger vor und kann parallel exprimiert werden. Dies ist zum einen das Gen für die Kanamycin-Resistenz, zum anderen das Gen für das Zielprotein, welches in diesem Fall von einem konstitutiv aktivem Promoter reguliert wird. Und auch weitere Proteine werden durch Gensequenzen auf dem Plasmid codiert und mit steigender Kopienzahl des Plasmides häufiger exprimiert. Daher verbraucht die Zelle mehr Energie für die Proteinexpression und kann weniger Energie auf das Zellwachstum verwenden. Im Fall des Chemostaten bedeutet das, dass die Kultur weiterhin mit einem konstanten μ wächst, jedoch weniger Energie auf die Biomassebildung verwendet werden kann, weswegen die Zelldichte abnimmt.

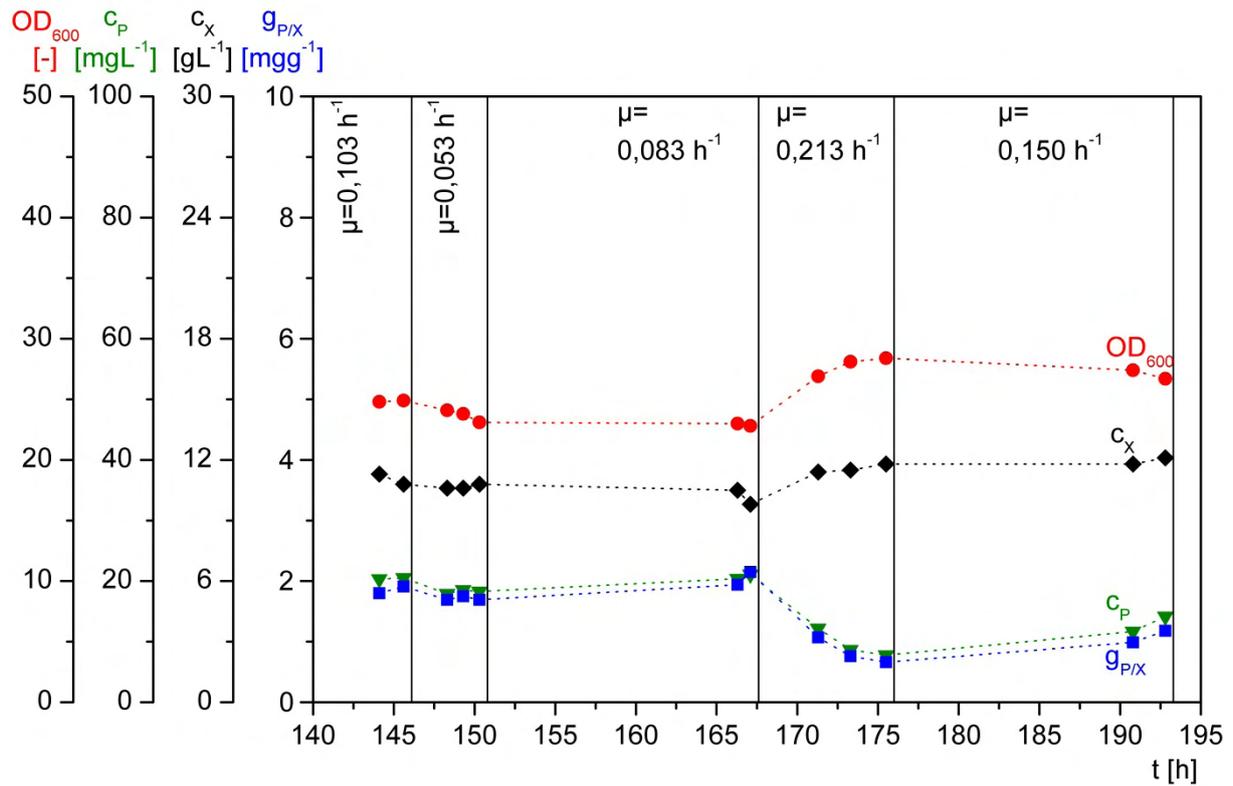


Abbildung 4.17: Verlauf der Phasen der spez. Wachstumsrate von U62. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt.

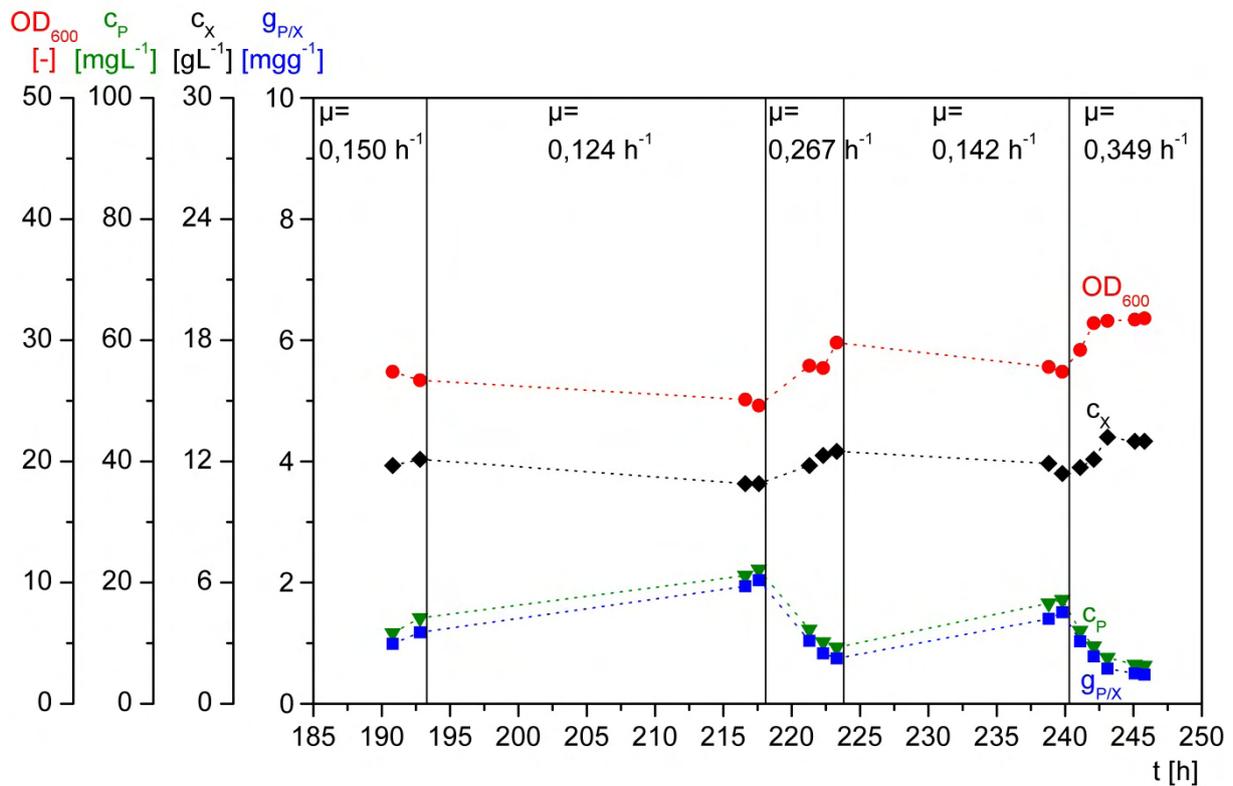


Abbildung 4.18: Verlauf der Phasen der spez. Wachstumsrate von U62. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt.

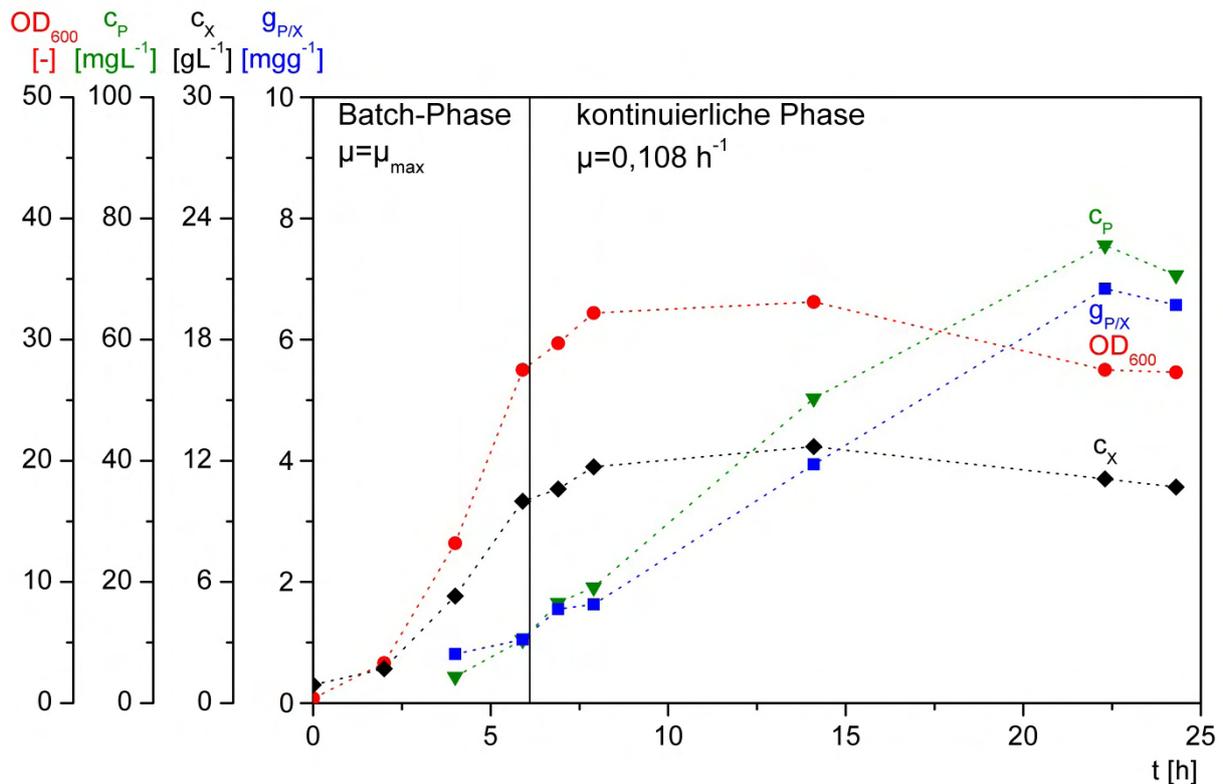


Abbildung 4.19: Darstellung der Batchphase und dem Übergang in die kontinuierliche Phase von U62.
 Legende: OD₆₀₀ - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration;
 c_X - Zellkonzentration; g_{P/X} - Zellspezifischer Plasmidgehalt.

Die Qualität der pDNA scheint nicht durch die zellspezifische Wachstumsrate beeinflusst zu werden. Die Schwankungen liegen im Bereich der Methode und die höhere ccc-Ausbeute bei einem μ von $0,349 \text{ h}^{-1}$ ist vermutlich durch die Probenvorbereitung bedingt (siehe Kapitel 4.3).

Bei Betrachtung der einzelnen Phasen (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18) erkennt man nochmal deutlich, wie mit der Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate die Plasmidreplikation abnimmt und mit Verringern der zellspezifischen Wachstumsrate diese wieder zunimmt. Um eine sichere Aussage über die Plasmidreplikation bei einem μ von $0,053 \text{ h}^{-1}$ treffen zu können, hätte diese Phase für die Zeit t_e eingestellt werden sollen. Anhand von Abbildung 4.19 ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass mit dem Übergang aus der Batch-Phase ($\mu = \mu_{max}$) und dem Eintritt in die kontinuierlichen Phase mit einem definierten und relativ niedrigem μ der zellspezifische Plasmidgehalt deutlich ansteigt. Das unterstreicht wiederum, dass niedrigere zellspezifische Wachstumsraten einen positiven Effekt auf die Plasmidreplikation haben und mit der Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate die Plasmidreplikation direkt positiv beeinflusst wird.

Mit dem Verlauf der einzelnen Phasen ist nochmals deutlich zu erkennen, wie mit sinkendem zellspezifischen Plasmidgehalt die Zelldichte steigt.

Da die Versuche zur zellspezifischen Wachstumsrate nach dem Einbruch des zellspezifischen Plasmidgehalts durchgeführt wurden, wurde versucht die Ergebnisse in der folgenden Kultivierung (U63) zu reproduzieren. Bei dieser Kultivierung wurden die Wachstumsraten beginnend mit einem μ von $0,073 \text{ h}^{-1}$ aufsteigend bis zu einem μ von $0,245 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Daraufhin wurde ein μ von $0,051 \text{ h}^{-1}$ und anschließend ein μ von $0,097 \text{ h}^{-1}$ eingestellt, um die Kultur wieder bei vergleichbaren Parametern zu untersuchen. Die konsequente Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,073 \text{ h}^{-1}$ bis $0,245 \text{ h}^{-1}$ wurde gewählt, damit die Auswirkung einer geringen Änderung auf die Produktausbeute durch direkten Vergleich zweier Phasen untersucht werden kann. Damit können für einen späteren Produktionsprozess Rückschlüsse auf die Anfälligkeit der Produktausbeute gegenüber einer Abweichung oder Schwankung des Parameters getroffen werden.

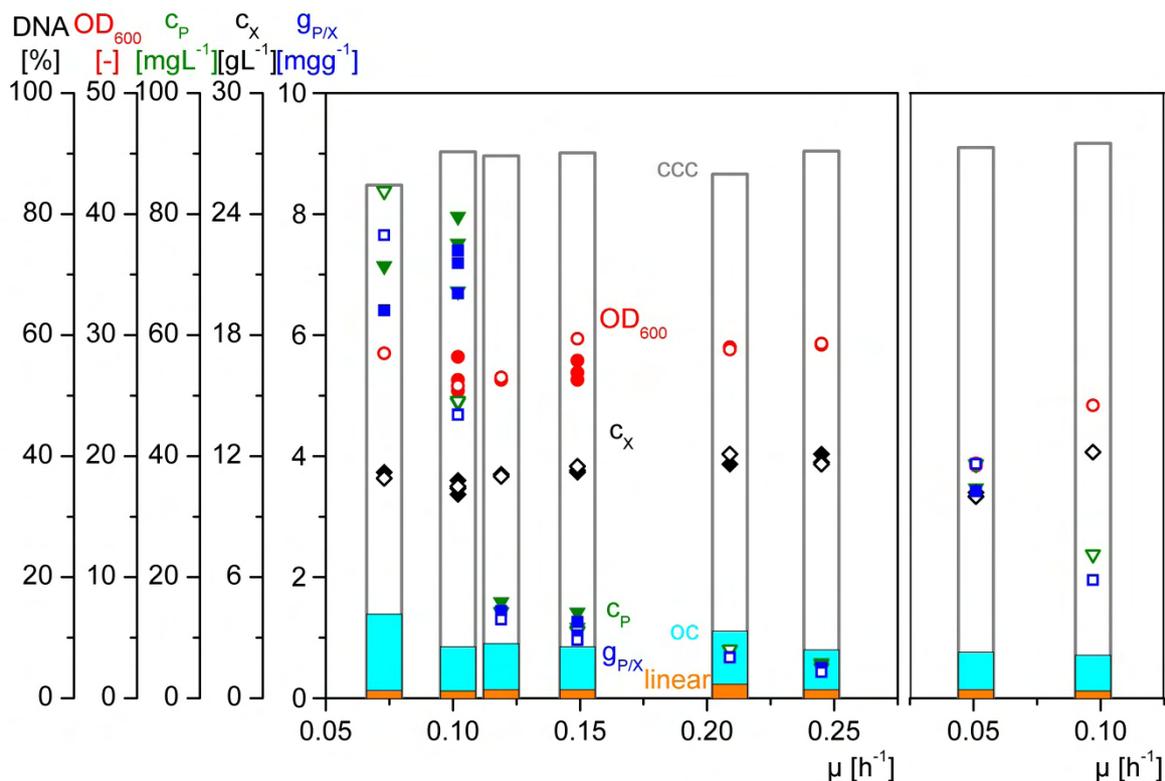


Abbildung 4.20: Messdaten von U63 in Abhängigkeit der spez. Wachstumsrate der jeweiligen Phase. Chronologische Darstellung der spez. Wachstumsrate von links nach rechts. Nicht gefüllte Symbole markieren den Endwert der Phase. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt. Die Balken geben den prozentuellen Anteil der einzelnen Plasmidformen in Bezug auf die Gesamtplasmidmenge an.

Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 4.20), dass bei einem μ von $0,073 \text{ h}^{-1}$ die Plasmidausbeute am höchsten ist und mit steigendem μ der zellspezifische Plasmidgehalt konsequent abnimmt.

Es ist nicht zu beobachten, dass (wie in Abbildung 4.16 dargestellt) sich der zellspezifische Plasmidgehalt über einen gewissen Bereich der zellspezifischen Wachstumsrate konstant verhält. Stattdessen zeigt sich eindeutig, dass mit einer geringen Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,073 \text{ h}^{-1}$ auf $0,102 \text{ h}^{-1}$ und von $0,102 \text{ h}^{-1}$ auf $0,119 \text{ h}^{-1}$ der zellspezifische Plasmidgehalt jeweils stark abnimmt. Dies widerspricht der Annahme, dass geringe Änderungen der Wachstumsrate keinen Einfluss auf die Plasmidreplikation haben. Für einen Produktionsprozess im Fed-Batch müsste damit eine äußerst exakte Regelung der zellspezifischen Wachstumsrate realisiert werden, um die gewünschte Ausbeute und damit einen robusten Produktionsprozess zu erzielen. Es muss aber angemerkt werden, dass aufgrund der konsequenten Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate, im Bereich von $0,073 \text{ h}^{-1}$ bis $0,245 \text{ h}^{-1}$, der Einfluss des Kulturalters auch zur Verschlechterung der Plasmidproduktion geführt haben könnte.

Außerdem ist zu erkennen, dass mit der Einstellung auf ein μ von $0,097 \text{ h}^{-1}$ der zellspezifische Plasmidgehalt nach ca. 21 h nicht wieder auf einen vergleichbaren Wert ansteigt. Das deckt sich mit den bisherigen Beobachtungen, dass die Kultur nicht in der Lage ist, nach einem gewissen Zellalter oder Änderungen der Parameter, welche negativen Einfluss auf die Produktausbeute haben, einen vergleichbaren zellspezifischen Plasmidgehalt bei gleichzeitig vergleichbaren Parametereinstellungen zu erreichen. Die begleitende Analytik liefert aber keine Hinweise, die dieses Verhalten erklären (Kapitel 4.3).

Der Shift der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,051 \text{ h}^{-1}$ auf $0,097 \text{ h}^{-1}$ zeigt jedoch noch einmal, dass sich eine höhere Wachstumsrate negativ auf die Plasmidreplikation auswirkt.

Die Qualität der pDNA verändert sich nicht mit der zellspezifischen Wachstumsrate. Die Schwankungen liegen im Bereich der Methode.

Die Zelldichte scheint mit Abnahme des zellspezifischen Plasmidgehalts zu steigen. Nur die Werte für die erste Phase mit einem μ von $0,073 \text{ h}^{-1}$ passen nicht zu dieser Aussage.

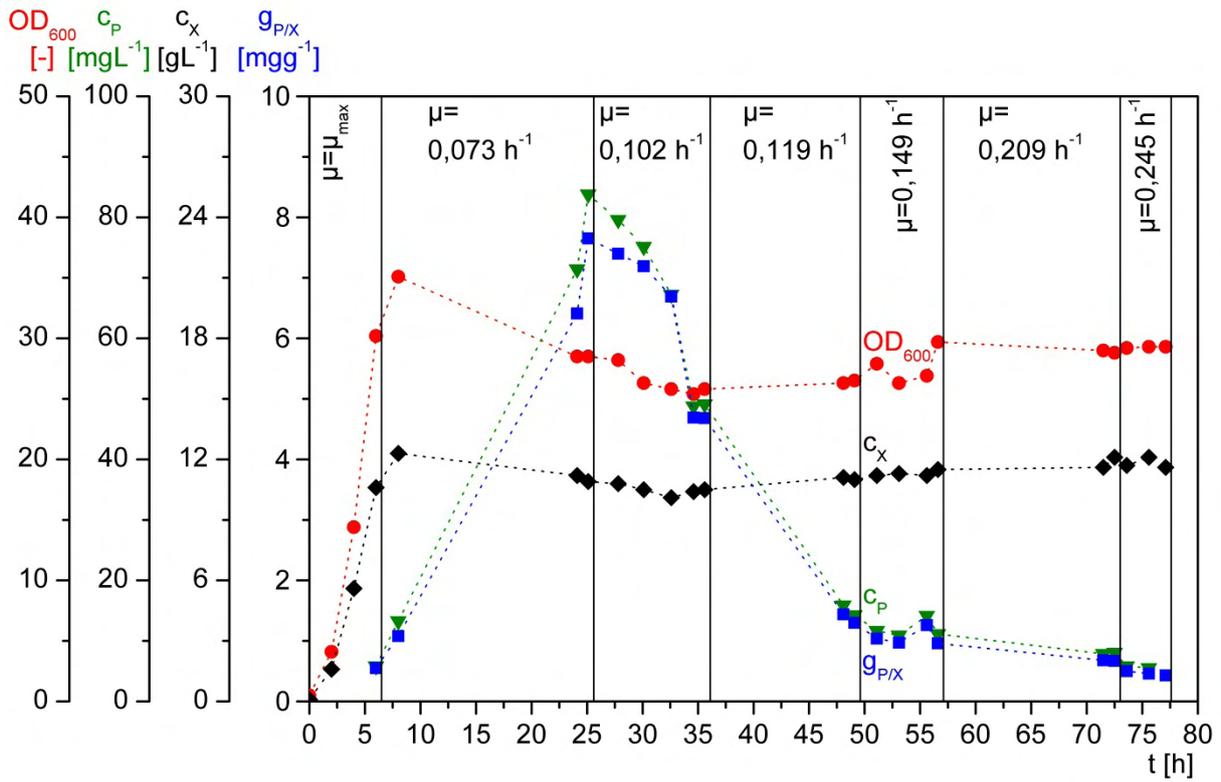


Abbildung 4.21: Verlauf der Phasen der spez. Wachstumsrate von U63 mit Darstellung der Batch-Phase. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt.

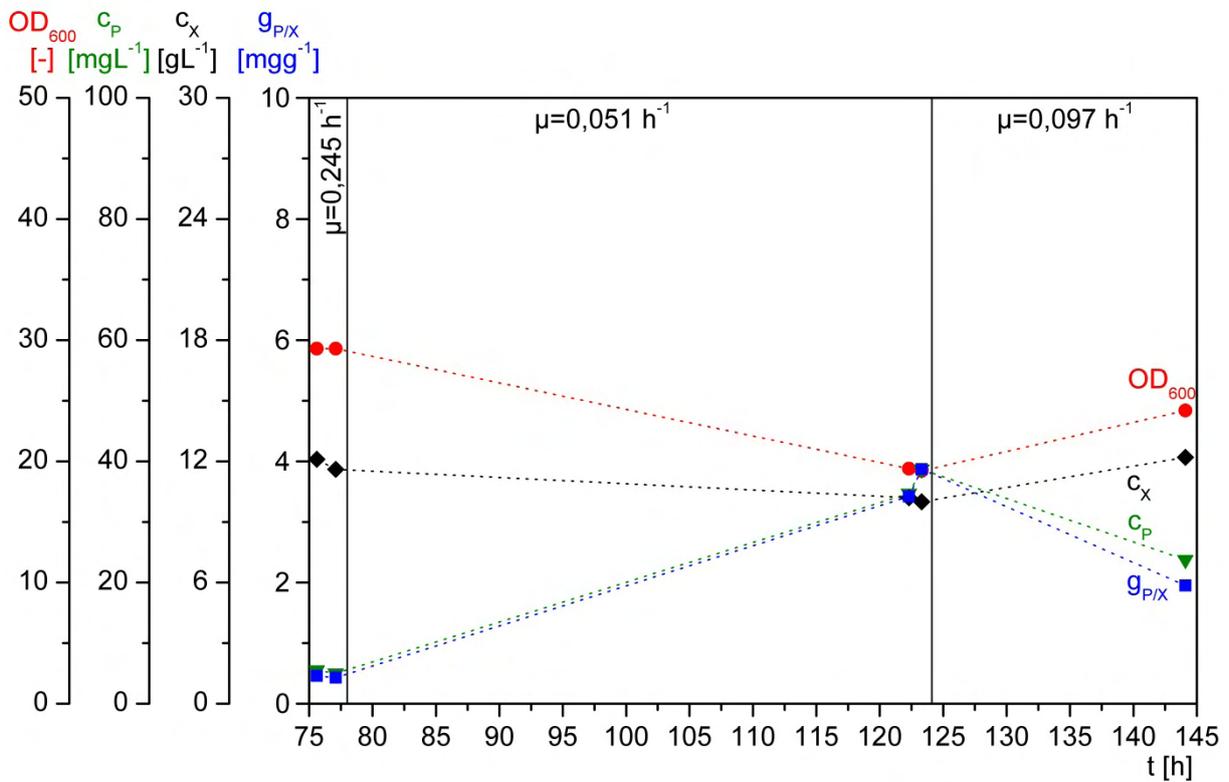


Abbildung 4.22: Verlauf der Phasen der spez. Wachstumsrate von U63. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt.

In Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22 ist der zeitliche Verlauf der Phasen dargestellt. Der Übergang aus der Batch-Phase in die kontinuierliche Phase unterstreicht die Aussage, dass ein deutlich niedrigeres μ eine deutliche Verbesserung der Plasmidreplikation mit sich bringt.

Aus den folgenden Phasen geht hervor, dass mit der Erhöhung von μ der zellspezifische Plasmidgehalt sinkt und mit einer Verringerung dieser wieder steigt. Außerdem kann mit der deutlichen Reduzierung der Wachstumsrate von $0,245 \text{ h}^{-1}$ auf eine äußerst geringe zellspezifische Wachstumsrate von $0,051 \text{ h}^{-1}$ ein deutlicher Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts beobachtet werden. In der Literatur wird ein Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts beim Übergang in die stationäre Phase beschrieben [Silva 2012]. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass mit diesem geringen μ von $0,051 \text{ h}^{-1}$ die Ausbeute steigt, da beim Übergang in die stationäre Phase μ abnimmt und sehr gering wird. In der stationären Phase bleibt die Zelldichte konstant. Da aber wenige Mikroorganismen lysieren wächst die restliche Population mit einer sehr geringen zellspezifischen Wachstumsrate.

Bei Betrachtung der Zelldichte bestätigt sich die Beobachtung aus Versuch U62, dass die Zellkonzentration mit steigendem zellspezifischem Plasmidgehalt abnimmt. Besonders auffällig ist die deutliche Abnahme der Biomasse bei der niedrigsten eingestellten zellspezifischen Wachstumsrate.

Wie erwähnt, wurde bisher davon ausgegangen, dass die einzige Eigenschaft der Biomasse das Wachstum ist. Das ist eine sehr vereinfachte Betrachtung. Es liegt nahe, dass die intrazellulären Stoffwechselforgänge nicht nur dem Zellwachstum dienen, sondern dass manche Proteine auch zur Erhaltung der Zelle exprimiert werden und durch diesen Vorgang sowie der Arbeit der Proteine Energie verbraucht wird. Ein naheliegenderes Beispiel ist das Protein für die Kanamycinresistenz. Ohne dieses wäre die Zelle unter Selektionsdruck nicht in der Lage zu überleben, sprich sich zu erhalten. Aber auch Arbeiten wie Reparaturen in der Zellwand oder der DNA verbrauchen Energie. Eine Wachstumsrate von $0,051 \text{ h}^{-1}$ ist jedoch so gering, dass der Glucoseanteil, der Energie für den Erhaltungsstoffwechsel liefert, stärker ins Gewicht fällt und somit die Zellmasse sinkt. Eine genauere Betrachtung des Erhaltungsstoffwechsels findet sich in Kapitel 4.8.

Bei Betrachtung der Phase mit einem μ von $0,102 \text{ h}^{-1}$ fällt auf, dass mit Eintritt in diese Phase der zellspezifische Plasmidgehalt langsam abnimmt und dann innerhalb von 2 Stunden stark abfällt. Während der zellspezifische Plasmidgehalt langsam abnimmt,

nimmt auch die Zellkonzentration ab. Zum Zeitpunkt als der zellspezifische Plasmidgehalt nochmal deutlich abgenommen hat, hat die Zellkonzentration wieder zugenommen. Diese Zunahme der Zellkonzentration deckt sich wieder mit der Annahme, dass der zellspezifische Plasmidgehalt Einfluss auf die Zellkonzentration hat. Der Verlauf der Zellkonzentration zu Beginn dieser Phase widerspricht dieser Annahme zwar, könnte aber ein Anzeichen dafür sein, dass die Zellen während der kontinuierlichen Kultur einem gewissen Alterungsprozess unterliegen, welcher auch Einfluss auf die Tochterzellen hat. Dies ist lediglich eine Annahme, die aufgrund der erhobenen Daten nicht belegt werden kann und genauerer Untersuchungen bedarf. Weitere Auffälligkeiten konnten nicht festgestellt werden. Auch das Agarosegel lieferte keine weiteren als die bisher diskutierten Ansätze.

Abschließend kann gesagt werden, dass deutlich zu erkennen ist, dass ein höheres μ eine schlechtere Plasmidreplikation bedingt. Eine Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate führt wiederum zu einer Verbesserung der Plasmidreplikation. Weswegen der zellspezifische Plasmidgehalt sich aber nicht wieder bei seinem Ausgangswert einstellt, bleibt ungeklärt.

Trotzdem lässt sich daraus ein durchaus interessanter Ansatz für einen Produktionsprozess im Fed-Batch-Verfahren ableiten. In der Literatur wurde ein Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts mit Eintritt in die stationäre Phase beschrieben [Silva 2012]. Hierbei kommt es aufgrund von Limitierungen zu einer Abnahme der zellspezifischen Wachstumsrate und die Zellen betreiben beinahe ausschließlich ihren Erhaltungsstoffwechsel. Ein kleiner Teil der Population lysiert, weshalb die restliche Population mit sehr geringem μ wächst.

Die Ergebnisse zur Variation der zellspezifischen Wachstumsrate zeigten, dass durch Abnahme der zellspezifischen Wachstumsrate der zellspezifische Plasmidgehalt steigt. Dies wird am deutlichsten mit dem Übergang von der Batch-Phase in die kontinuierliche Phase. Außerdem zeigte sich, dass mit Einstellung auf ein sehr geringes μ von $0,051 \text{ h}^{-1}$ die Plasmidausbeute verbessert wird. Für das Fed-Batch-Verfahren könnte das bedeuten, die Kultur mit einem definierten μ möglichst schnell (um die Prozesszeit zu verkürzen) auf eine hohe Zelldichte wachsen zu lassen, um dann die zellspezifische Wachstumsrate zu reduzieren um die Plasmidausbeute zu steigern. Welche zellspezifischen Wachstumsraten dafür gewählt werden und ob eine einfache Umstellung des μ oder eine schrittweise Reduzierung durchgeführt wird, müsste hierbei experimentell ermittelt werden.

4.7 Variation der Zelldichte

In Anschluss an die Variation der zellspezifischen Wachstumsrate im Versuch U63 wurde die Glucosekonzentration im Feed-Medium variiert. Die Ausgangskonzentration lag bei 20gL^{-1} und wurde in 10gL^{-1} -Schritten auf 50gL^{-1} erhöht. Mit Erhöhung der Glucosekonzentration sollte die Biomassekonzentration erhöht werden. Das Verhalten des zellspezifischen Plasmidgehalts mit steigender Biomassekonzentration ist für den Produktionsprozess als Fed-Batch-Prozess interessant, da hier zwangsläufig die Zelldichte steigt und es das Ziel ist, mit einer möglichst hohen aber für den DSP tragbaren Zelldichte in die folgende Aufreinigung zu starten.

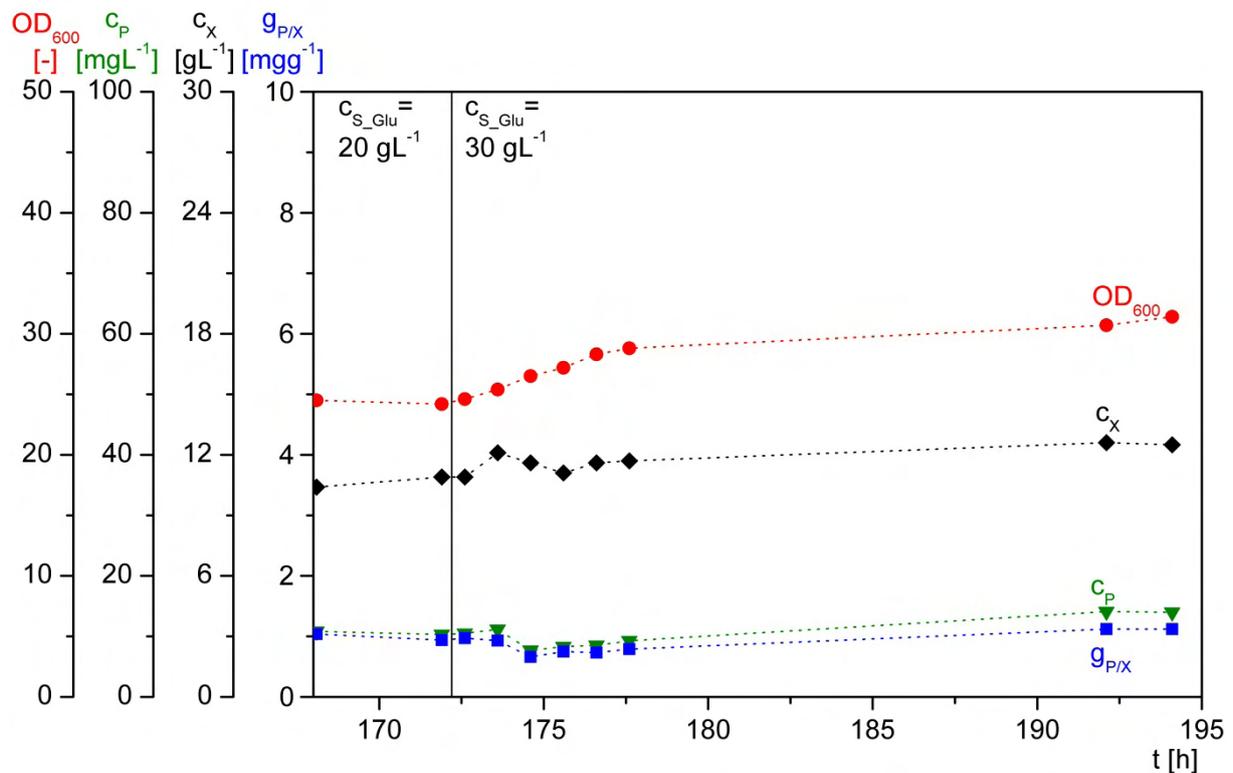


Abbildung 4.23: Verlauf der Phasen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen im Feed von U63.
 Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration;
 c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; c_{S_Glu} - Glucosekonzentration
 im Feedmedium

Die Erhöhung der Glucosekonzentration im Feed-Medium auf 30gL^{-1} führt zu einem leichten Anstieg der Zellkonzentration (Abbildung 4.23). Im Gegensatz dazu, dass 50% mehr Glucose zugeführt wurde, und selbst unter Berücksichtigung, dass die Komplexbestandteile des Mediums zum Teil C-Quellen enthalten, ist der Anstieg relativ gering. Für den Ausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$ für *E. coli* auf Glucose kommt es durch

unterschiedliche Bedingungen zu verschiedenen Werten von $0,34 \text{ gg}^{-1}$ bis $0,52 \text{ gg}^{-1}$ [Bäcklund 2008]. Nimmt man einen konstanten Ausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$ von $0,34 \text{ gg}^{-1}$ an, würde pro Variation der Glucosekonzentration von 10 gL^{-1} ein Anstieg der Biomassekonzentration von $3,4 \text{ gL}^{-1}$ erwartet. Der Anstieg durch den Shift der Glucosekonzentration beträgt maximal 2 gL^{-1} .

Die Plasmidreplikation bleibt unverändert.

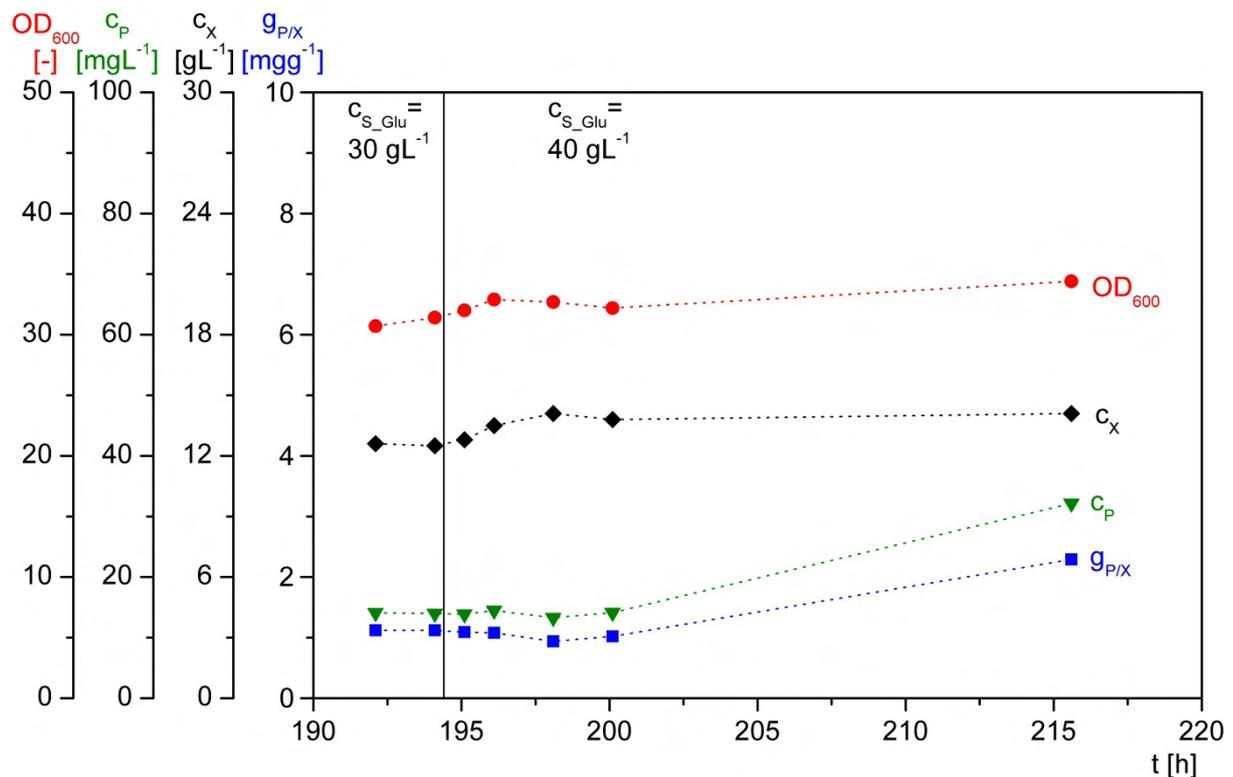


Abbildung 4.24: Verlauf der Phasen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen im Feed von U63. Legende: OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; c_{S_Glu} - Glucosekonzentration im Feedmedium

Die nächste Erhöhung der Glucosekonzentration im Feed führte wiederum zu einem leichten Anstieg der Biomassekonzentration (Abbildung 4.24). Auch diese Erhöhung liegt deutlich niedriger als mit einem konstanten $y_{X/S}$ zuerst erwartet, ist aber vergleichbar mit dem Anstieg der Biomasse in der vorherigen Phase (Abbildung 4.26).

Mit der Erhöhung der Glucosekonzentration im Feed und dem Anstieg der Biomassekonzentration erhöht sich der zellspezifische Plasmidgehalt um etwa 100%.

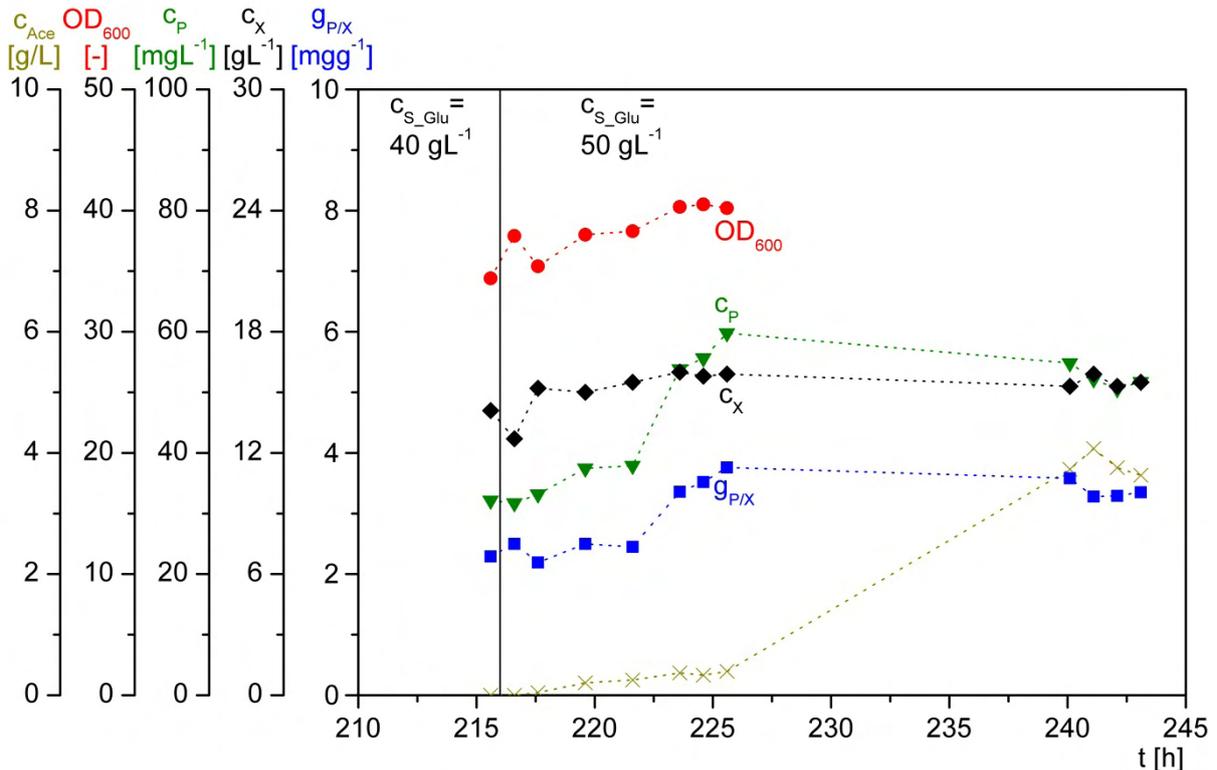


Abbildung 4.25: Verlauf der Phasen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen im Feed von U63. Legende: c_{ACE} - Acetatkonzentration; OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm; c_P - Plasmidkonzentration; c_X - Zellkonzentration; $g_{P/X}$ - Zellspezifischer Plasmidgehalt; c_{S_Glu} - Glucosekonzentration im Feedmedium

Auch die letzte Erhöhung führt zu einer vergleichbaren Zunahme der Biomassekonzentration und zu einer Erhöhung des zellspezifischen Plasmidgehalts um etwa 60% (Abbildung 4.25). Die OD -Messwerte zum Ende der Phase sind in Abbildung 4.25 nicht aufgeführt, da es zu starken Schwankungen dieser kam. Selbst die wiederholte Messung einer Probenverdünnung lieferte mehrmals unterschiedliche Messergebnisse.

Die erste Erhöhung der Glucosekonzentration und der damit einhergehende Anstieg der Zelldichte führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Plasmidreplikation. Durch den zweiten und dritten Shift kam es mit dem Anstieg der Biomasse auch zu einer deutlich verbesserten Plasmidreplikation. Mit höherer Biomassekonzentration steigt somit der Plasmidgehalt der Biomasse. Diese Beobachtung wird auch für einen Fed-Batch-Prozess mit Temperaturprofil (über die gesamte Dauer sowie in der Phase konstanter Parameter) und einem niedrigen μ von $0,14 \text{ h}^{-1}$ [Singer 2009] beschrieben.

Weswegen es zu diesem Anstieg kommt, ist nicht klar. Er ist aber ein Indiz dafür, dass

die Zellen immer noch fähig sind im höheren Maße das Plasmid zu replizieren, obwohl die gleichen Parameter vorliegen. Zwar hat sich die Zelldichte aufgrund der höheren Glucosekonzentration geändert, dennoch sind die anderen Parameter (auch μ) und die theoretische Glucosekonzentration in der Zellsuspension gleich. Damit ist es unwahrscheinlich, dass sich Mutationen (im Genom oder Plasmid) in der Kultur durchgesetzt haben und verantwortlich für den Einbruch des zellspezifischen Plasmidgehalts, im Laufe einer Kultivierung, waren. Mögliche Mutationen konnten mit der im Rahmen dieser Arbeit angestellten Analytik jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Eine höhere Zelldichte wirkt sich positiv auf den zellspezifischen Plasmidgehalt aus. Inwieweit mit der Zunahme der Zelldichte der Plasmidgehalt der Biomasse steigt, muss weiter untersucht werden. Die Ergebnisse sprechen aber dafür, dass im Verlauf eines Fed-Batch-Verfahrens die Ausbeute mit steigender Zelldichte gesteigert werden kann. Damit kann in einem Produktionsprozess ohne negative Auswirkungen eine hohe Biomassekonzentration erzielt werden.

Außer in der Batch-Phase und zum Start der kontinuierlichen Phase wurde bisher kein Acetat gemessen. Mit der Erhöhung der Glucosekonzentration im Feed auf 50 g/L kommt es erstmals zu Acetatbildung. Die Acetatkonzentration steigt mit der Biomassekonzentration. Beide Konzentrationen erreichen bei 224 h einen konstanten Wert für weitere 2 h. Die Biomassekonzentration bleibt auch für den weiteren Verlauf der Phase konstant. Die Acetatkonzentration ist nach 14 h deutlich angestiegen. Die Glucosekonzentration liegt für die gesamte Phase unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei 240 h hat der zellspezifische Plasmidgehalt wieder abgenommen und die Acetatkonzentration deutlich zugenommen. Aufgrund verstärkter Schaumbildung konnten Säure und Base nicht direkt in die Zellsuspension gelangen und es kam zu Schwankungen des pH-Wertes. Es ist äußerst wahrscheinlich, dass die Zellen daher gestresst waren und vermehrt Acetat gebildet haben. Dieser Stress könnte ein Grund für die Abnahme der Plasmidzahl sein. Außerdem ist unter dem Mikroskop zu erkennen, dass die Zellen extrem filamentös sind, was wiederum ein Anzeichen für einen gestressten Mikroorganismus ist. Die filamentösen Zellen könnten auch der Grund für die extrem schwankenden OD-Messwerte sein.

Ein Grund für die Acetatbildung direkt nach der Erhöhung der Glucosekonzentration im Feed könnte eine Zunahme der Glucosekonzentration in der Suspension sein. Dadurch kommt es wiederum zum Anstieg der zellspezifischen Wachstumsrate (Gleichung

(2.3)). Eine höhere Glucosekonzentration in der Kultur als vor dem Shift der Zulaufkonzentration könnte aufgrund des niedrigen K_s vorliegen, ohne mit der bestehenden Analytik nachgewiesen zu werden.

Durch einen Shift in der Glucosekonzentration des Feeds kommt es zur Zunahme der Glucosekonzentration im Reaktor und einem Anstieg von μ (siehe Abbildung 2.3). Bei einem Anstieg der Biomassekonzentration von etwa $13,5 \text{ gL}^{-1}$ ($c_{x,0}$) auf etwa 16 gL^{-1} (c_x) ergibt sich eine Einstellzeit (Gleichung (2.24)) von unter einer Stunde. Für die Berechnung wurde ein μ von $0,35 \text{ h}^{-1}$ angenommen, da bei den bisherigen zellspezifischen Wachstumsraten ($\mu < 0,35 \text{ h}^{-1}$) keine Acetatbildung beobachtet wurde. In dieser Zeit wäre nicht einmal die ausreichende Menge Glucose zugeführt worden um den beobachteten Anstieg der Biomasse von $2,5 \text{ gL}^{-1}$ zu bewirken ($y_{X/S} = 0,16 \text{ gg}^{-1}$, Abbildung 4.26). Das bedeutet, die zellspezifische Wachstumsrate kann aufgrund des Substratshifts für keinen längeren Zeitraum, und erst recht nicht für über 10 h, so stark erhöht sein, dass es zu einer andauernden Acetatbildung kommt.

Ein dennoch höheres μ ergibt sich im Falle des Chemostaten nur mit einer höheren Verdünnungsrate D (Gleichung (2.13)). Oder man nimmt an, die Population besteht aus zwei Zelltypen: x_1 welche mit einem $\mu > D$ wächst und x_2 welche nicht mehr teilungsfähig ist ($\mu = 0$). Ein $\mu < D$ wäre für die Zellen x_2 nicht zu erklären, da unterschiedliche zellspezifische Wachstumsraten bei gleicher Glucoseverfügbarkeit unverständlich wären. Nicht teilungsfähige Zellen wären aber bei einem μ von $0,1 \text{ h}^{-1}$ nach 10 h, also zur Prozesszeit von 226 h (10 h nach Änderung der Glucosekonzentration), großteils ausgewaschen. Und genau genommen wäre das μ , mit dem die teilungsfähigen Zellen wachsen nicht konstant und würde mit dem Auswaschen der teilungsunfähigen Zellen abnehmen. Dass die Acetatkonzentration für 2 h konstant bleibt und nicht wieder abnimmt, deutet aber darauf hin, dass die Acetatbildung zu diesem Zeitpunkt stressinduziert ist. Welcher Faktor für den Stress verantwortlich ist, bleibt ungeklärt. Die einzigen erkenntlichen Veränderungen sind der Anstieg der Biomassekonzentration und die höhere Plasmidzahl. In bisherigen Fed-Batch-Verfahren konnten aber bereits höhere Zelldichten ohne Acetatbildung erreicht werden. Und auch im Verlauf der kontinuierlichen Kultur (U62 sowie U63) gab es vergleichbare Werte für $g_{P/X}$ ohne Acetatbildung.

Die Qualität der pDNA ist in Tabelle 4.7 dargestellt. Nur die Werte der Glucosezulaufkonzentration von 40 gL^{-1} sind auffällig. Hier ist der Anteil der ccc-Form niedriger und der Anteil der oc-Form höher. Es gibt keinen erkennbaren Grund, weswegen die

Zunahme der Zelldichte die Plasmidqualität in nur einem Fall negativ beeinflusst. Zumal die Zunahme der Zelldichte durch immer gleiche Änderung der Glucosezulaufkonzentration bewirkt wurde. Es ist wahrscheinlich, dass dies der Probenvorbereitung geschuldet ist.

Tabelle 4.7: Anteil der pDNA Formen bei verschiedenen Zelldichten bzw. Glucosezulaufkonzentrationen.

Glucosekonz. Im Feed [gL ⁻¹]	20	30	40,0	50
ccc-Form [%]	90,3	89,8	82,5	91,5
oc-Form [%]	7,5	08,6	15,1	6,9
Lineare Form [%]	2,2	2,2	1,8	1,6

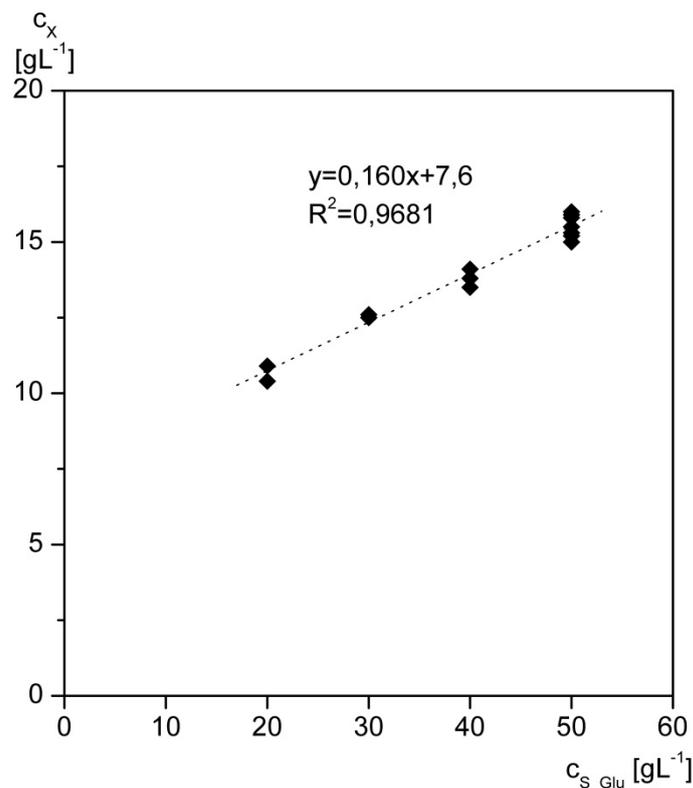


Abbildung 4.26: Zelldichte in Abhängigkeit der Glucosekonzentration im Feed-Medium. Legende: c_x - Zellkonzentration.

Mit dem Verlauf der einzelnen Phasen war zu erkennen, dass mit Erhöhung der Glucosezulaufkonzentration c_{S_ein} die Biomassekonzentration c_X zunimmt. Abbildung 4.26 verdeutlicht dies noch einmal.

Die Auftragung der Biomassekonzentration der jeweiligen Phase gegen die Glucosezulaufkonzentration ergibt mittels linearer Regression eine Gerade mit der Steigung von

0,160. Die Geradensteigung definiert die Änderung der Biomassekonzentration Δc_X zur Änderung der Glucosekonzentration Δc_{S_ein} . Da die Konzentration im Reaktor von der Verdünnungsrate abhängt, ändert sich die Konzentration im Reaktor durch eine Änderung der Zulaufkonzentration nicht. Damit wird im gleichen Maße mehr Substrat im Reaktor verbraucht wie auch mehr Substrat zugeführt wird und die Steigung der Geraden ergibt damit den Substratausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ (siehe Gleichung (2.4)) von $0,160 \text{ gg}^{-1}$. Der ermittelte Substratausbeutekoeffizient liegt wie erwähnt im Vergleich mit der Literatur relativ niedrig, deckt sich aber mit dem einer älteren Fed-Batch-Kultivierung mit vergleichbarem Medium und einem μ von $0,081 \text{ h}^{-1}$.

Die Gerade schneidet die Y-Achse beim einer Zellkonzentration von $7,6 \text{ gL}^{-1}$. Das bedeutet, dass mit einer Glucosezulaufkonzentration von 0 gL^{-1} eine Biomassekonzentration von $7,6 \text{ gL}^{-1}$ im Reaktor vorliegen müsste. Was wiederum bedeutet, dass neben Glucose auch noch andere Medienbestandteile als Substrat zur Biomassebildung verwendet werden. Da außer den Komplexbestandteilen und der Glucose sonst keine weiteren Medienbestandteile Kohlenstoff enthalten, müssen Komplexbestandteile als weitere C-Quelle verwendet werden. Die Konzentration der Komplexbestandteile im Reaktor ist nicht bekannt und es kann nicht gesagt werden, ob diese komplett zur Biomassebildung aufgebraucht werden oder ein Teil den Reaktor wieder unverbraucht verlässt. Eine niedrige Affinität der Zellen zu den Komplexbestandteilen wäre der Grund, dass die Komplexbestandteile nicht ganz verbraucht werden. Um dennoch den Ausbeutekoeffizienten der Komplexbestandteile zu bestimmen müsste deren Zulaufkonzentration variiert werden. Anschließend könnte anhand der Änderung der Biomassekonzentration der Ausbeutekoeffizient der Komplexbestandteile wie im Falle der Glucose bestimmt werden.

4.8 Chemostat-Modell

Die Betrachtung der einzelnen Phasen und Parameter gibt Aufschluss darüber, ob sich die Theorie des Chemostaten (Kapitel 2.3.3) mit den Messergebnissen und Beobachtungen deckt. Abweichungen von der Theorie sind ein Hinweis darauf, dass bestimmte Annahmen nicht korrekt sind und das System von weiteren Faktoren beeinflusst wird.

Die Glucosekonzentration sollte für die eingestellten Parameter annähernd Null sein. Für die Endprobe jeder Phase wurde die Glucosekonzentration bestimmt und war zu jeder Phase unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnten keine Auffälligkeiten festgestellt

werden, die darauf hinweisen, dass das Fließgleichgewicht in einer der Phasen gestört war.

Die Variation der Glucosezulaufkonzentration führte zu einem Anstieg der Biomassekonzentration und zur Einstellung des Fließgleichgewichts bei höherer Biomassekonzentration. Die Erhöhung der Biomassekonzentration mit höherer Glucosezulaufkonzentration entspricht der Theorie des Chemostaten. Da die Glucosekonzentration im Reaktor von der Verdünnungsrate abhängt (Gleichung (2.22)), wird bei konstanter Verdünnungsrate mit höherer Glucosezulaufkonzentration mehr Glucose im Reaktor verbraucht und die Biomassekonzentration steigt (Gleichung (2.21)). Anhand der aufgenommenen Messwerte ließ sich der Ausbeutekoeffizient bestimmen (Kapitel 4.7), der mit dem einer älteren Fed-Batch-Kultivierung ($\mu = 0,081 \text{ h}^{-1}$) übereinstimmte.

Abbildung 4.21 zeigt den Verlauf der Phasen verschiedener zellspezifischer Wachstumsraten. Im Fließgleichgewicht ist die Zelldichte konstant. Am besten zu erkennen ist dies an der Phase mit einem μ von $0,149 \text{ h}^{-1}$. Da sich hier alle (beobachteten) Konzentrationen, auch die Plasmidkonzentration, relativ konstant verhalten, beschreibt diese das Fließgleichgewicht am besten. Denn die Theorie besagt, dass im Fließgleichgewicht alle Konzentrationen konstant sind. In anderen Phasen kommt es, wie beschrieben und diskutiert, mit der Änderung des zellspezifischen Plasmidgehalts auch zur Änderung der Zelldichte. Erst mit konstanter Plasmidkonzentration stellt sich auch eine konstante Zelldichte ein.

Das zeigt, dass die Zellkonzentration gewissen Schwankungen unterliegt (Abbildung 4.27). Sie liegt aber für alle Phasen mit gleicher Glucosezulaufkonzentration in einem vergleichbaren Bereich. Dennoch entspricht das nicht der Theorie des Chemostaten. Wie in Abbildung 2.1 zu erkennen, sollten die Schwankungen der Zelldichte im untersuchten Bereich (μ von $0,5 \text{ h}^{-1}$ bis $0,35 \text{ h}^{-1}$) theoretisch nicht wahrnehmbar sein. Eine genauere Untersuchung dieser Beobachtung wird im Folgenden beschrieben.

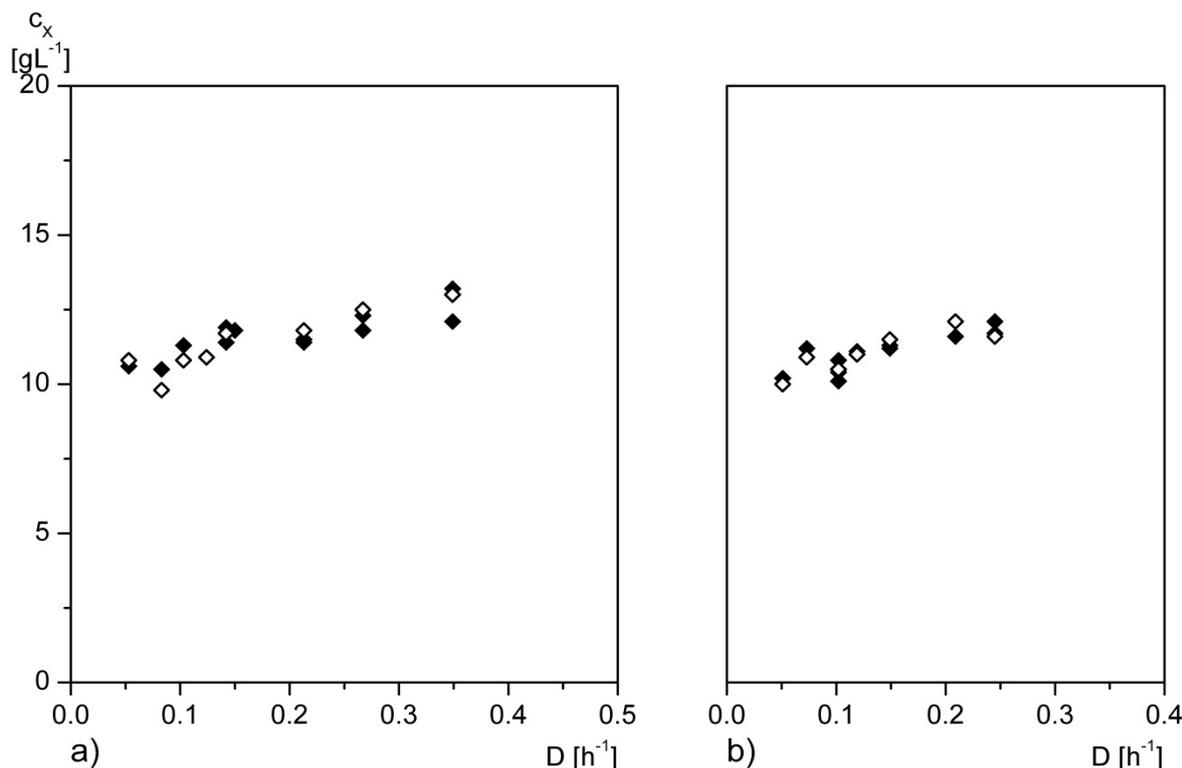


Abbildung 4.27: Zellichte in Abhängigkeit der Verdünnungsrate D von a) U62 und b) U63. Nicht ausgefüllte Symbole markieren den Endwert der jeweiligen Phase.

In Abbildung 4.27 erkennt man die erwähnte Abnahme der Zellichte mit kleiner werdendem μ . Die Glucosekonzentration im Reaktor und damit auch am Ausgang ist annähernd Null und kann vernachlässigt werden. Außerdem ist die Glucosezulaufkonzentration konstant. Daher ergibt sich aus Gleichung (2.21), dass sich der Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ mit c_X ändert. Damit ergibt sich für unterschiedliche Verdünnungsraten ein unterschiedlicher Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$. Dies erscheint ungewöhnlich, da man annimmt, es kann immer im gleichen Maße Substrat zu Biomasse umgesetzt werden. Dennoch ist dieser Wert nicht falsch. Eine genauere Betrachtung, wie der Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ eigentlich definiert ist, gibt Aufschluss. Es muss beachtet werden, dass der Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ das Verhältnis von gebildeter Biomasse zu verbrauchtem Substrat angibt. Neben dem Wachstum beansprucht aber auch die Erhaltung der Zelle Energie und das verbrauchte Substrat wird nicht ausschließlich zur Biomassebildung verwendet.

Um zu ermitteln, welcher Anteil des Substrats direkt für die Biomassebildung und welcher Anteil wiederum zur Erhaltung der Biomasse verbraucht wird, wurde die Substratverbrauchsrate $q_{S/X}$ betrachtet.

$$q_{S/X} = \frac{c_{S_ein} - c_{S_aus}}{c_x} \cdot D \quad (4.3)$$

Für die Darstellung der Ergebnisse und die folgenden Berechnungen wurde die Substratkonzentration im Reaktor und damit unmittelbar am Ausgang vernachlässigt, da sie theoretisch beinahe Null beträgt und praktisch unter der Nachweisgrenze lag.

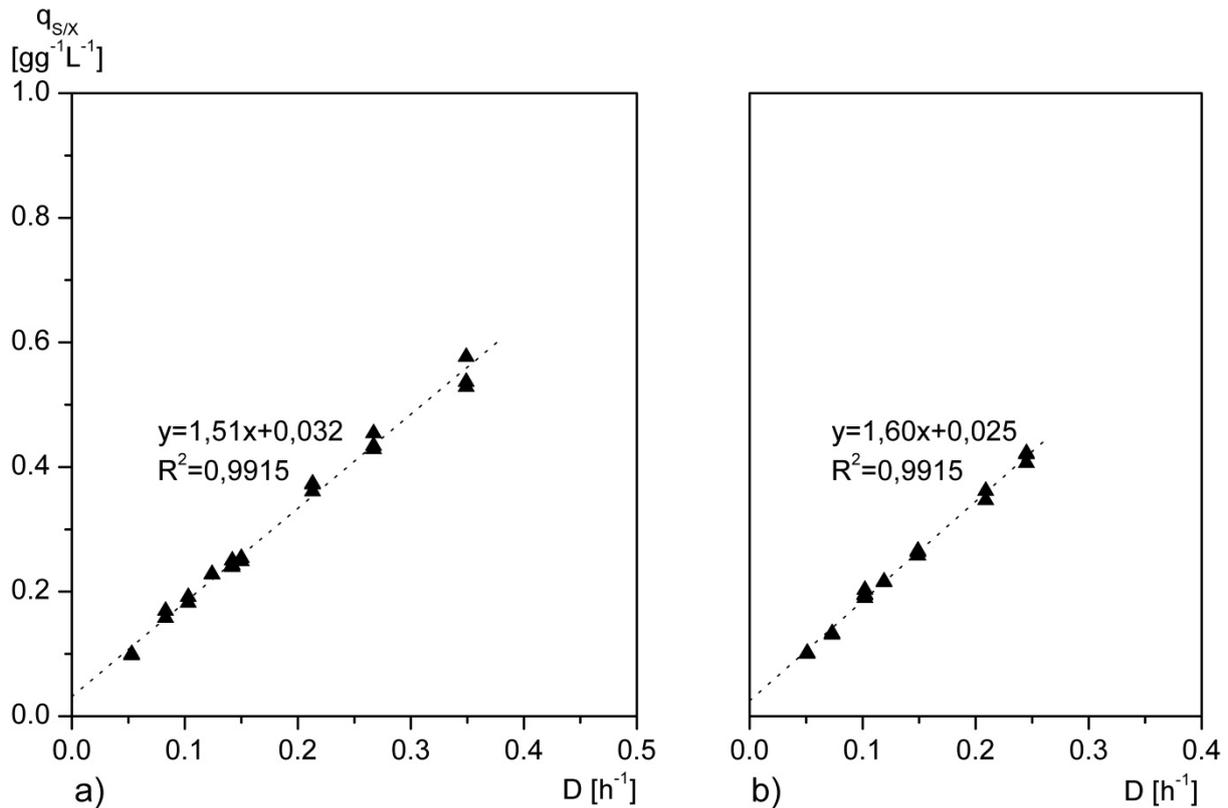


Abbildung 4.28: Substratverbrauchsrate $q_{S/X}$ in Abhängigkeit von D für a) U62 und b) U63.

Trägt man die Substratverbrauchsrate $q_{S/X}$ über der Verdünnungsrate D auf, erhält man mittels linearer Regression eine Gerade, welche die Y-Achse im positiven Bereich schneidet (Abbildung 4.28). Da an diesem Punkt das Wachstum Null ist ($\mu = D$), $q_{S/X}$ aber positiv, also Glucose von den Zellen verbraucht wird, entspricht dieser Wert dem Glucoseverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel q_{S/X_m} .

Die Substratmaintenancerate q_{S/X_m} und die Substratverbrauchsrate des Wachstums q_{S/X_g} , ergeben somit die Substratverbrauchsrate $q_{S/X}$.

$$q_{S/X} = q_{S/X_g} + q_{S/X_m} \quad (4.4)$$

Anhand der Gleichung der Regressionsgeraden ($q_{S/X} = a \cdot D + b$) erkennt man, dass die Substratverbrauchsrate des Wachstums q_{S/X_g} teils durch D bzw. μ beschrieben wird. Die Steigung a der Geraden ergibt sich damit aus dem Verhältnis der verbrauchten Glucose für das Wachstum Δc_{S_g} , zu entstandener Biomasse Δc_x .

$$a = \frac{\Delta c_{S_g}}{\Delta c_x} = \frac{1}{y_{X/S}^*} \quad (4.5)$$

Aus dem Kehrwert der Steigung der Geraden ergibt sich damit der tatsächliche Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}^*$, der unabhängig von D ist. Er beschreibt das Verhältnis von gebildeter Biomasse zu dem direkt dazu verwendeten Substrat.

Es ergibt sich die Substratverbrauchsrate $q_{S/X}$,

$$q_{S/X} = \frac{D}{y_{X/S}^*} + q_{S/X_m} = \frac{\mu}{y_{X/S}^*} + q_{S/X_m} \quad (4.6)$$

und mit Gleichung (4.3) die Zellkonzentration c_X .

$$c_X = \frac{(c_{S_{ein}} - c_{S_{aus}}) \cdot D}{q_{S/X}} = \frac{(c_{S_{ein}} - c_{S_{aus}}) \cdot D}{\frac{\mu}{y_{X/S}^*} + q_{S/m}} \quad (4.7)$$

Da die Glucose im Reaktor beinahe vollständig verbraucht wird, kann $c_{S_{aus}}$ hier vernachlässigt werden.

Mit der Abnahme der Verdünnungsrate kommt es also zur Abnahme der Zelldichte, da weniger Glucose zum Zellwachstum zur Verfügung steht. Bei höheren Verdünnungsraten ist der Anteil der durchgesetzten Glucose, der für den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht wird, verhältnismäßig klein, weswegen hier die Änderung der Zelldichte mit Variation von D weniger ins Gewicht fällt.

Bei dieser vereinfachten Betrachtung wird davon ausgegangen, dass sich der Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel nicht ändert. Dass mit steigender Plasmidzahl der Zelle aber auch die Expression steigt, ist eine logische Konsequenz. Die Abnahme der Zelldichte steht sicherlich mit dem Erhaltungsstoffwechsel in Verbindung, welcher wiederum von der Plasmidzahl beeinflusst wird. Somit ist die Aussage, dass die Zelldichte durch den zellspezifischen Plasmidgehalt beeinflusst wird,

nicht falsch. Dass der Erhaltungsstoffwechsel aber unabhängig von äußeren Einflüssen ist, ist eine vereinfachte Betrachtung.

Abbildung 4.28 zeigt die Auftragung der Substratverbrauchsrate über D für U62 und U63. Für die Betrachtung wurde nur Glucose als C-Quelle berücksichtigt. Für eine wirklich sichere Aussage bezüglich des Erhaltungsstoffwechsel und dem wahren Ausbeutekoeffizient $y_{X/S}^*$ wäre ein definiertes Medium geeigneter und eine höhere Anzahl von Daten nötig.

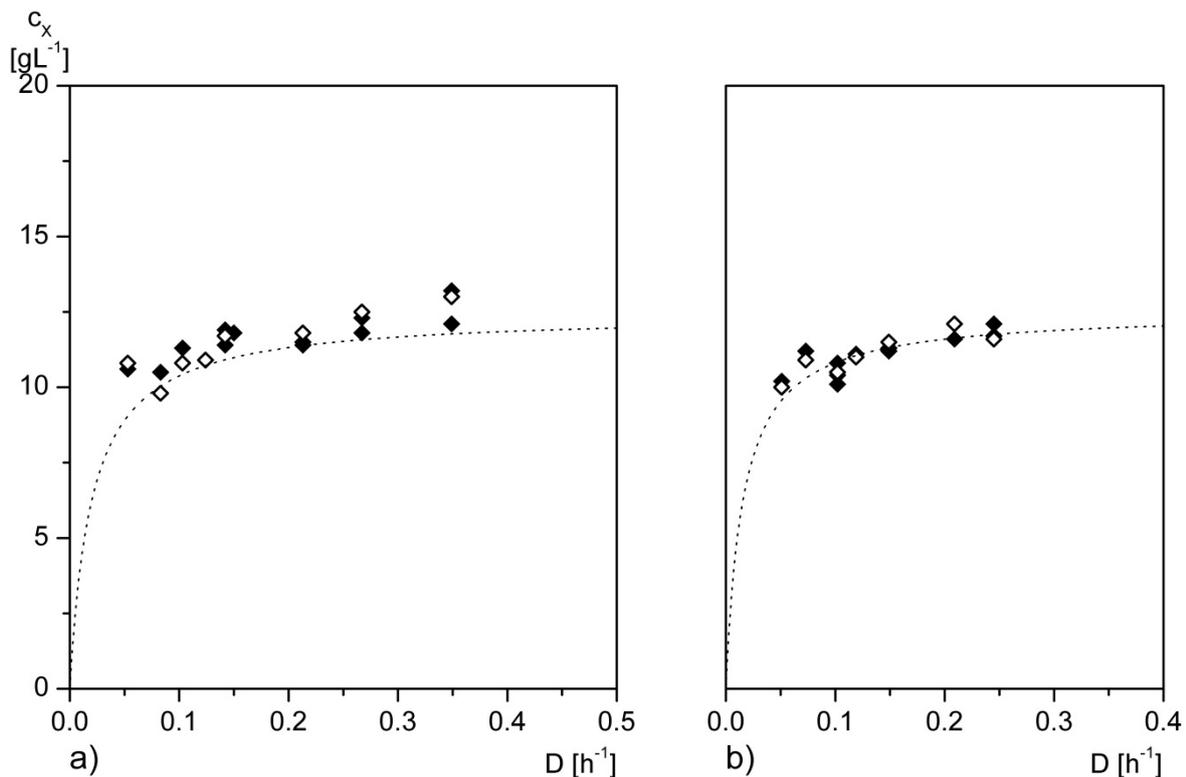


Abbildung 4.29: Zellichte in Abhängigkeit der Verdünnungsrate D von a) U62 und b) U63. Nicht ausgefüllte Symbole markieren den Endwert der jeweiligen Phase. Der Kurvenverlauf ergibt sich mit Gleichung (4.7) und den Werten aus Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Koeffizient q_{S/X_m} für den Erhaltungsstoffwechsel und $y_{X/S}^*$

Versuch	q_{S/X_m} [gg ⁻¹ h ⁻¹]	$y_{X/S}^*$ [gg ⁻¹]
U62	0,032	0,622
U63	0,025	0,625

In Abbildung 4.29 ist zu erkennen, dass mit der Näherungsrechnung (Gleichung (4.7)) und den Ergebnissen aus Tabelle 4.8 der Verlauf der Zellichte durchaus beschreibbar ist. Im Graph von U62 ist zu erkennen, dass die Zellichte mit steigendem D stärker

zunimmt als durch die Kurve der Näherungsrechnung beschrieben. Dies könnte wiederum ein Hinweis sein, dass der Erhaltungskoeffizient q_{S/X_m} in Wirklichkeit nicht konstant ist.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Chemostat-Bioreaktor aufgebaut und etabliert. Anschließend wurden Untersuchungen zum Einfluss von Prozessparametern auf die pDNA-Ausbeute in kontinuierlicher Prozessführung mit *E. coli* durchgeführt.

Der Aufbau des Chemostaten und die Inbetriebnahme waren erfolgreich. Mit dem Einstellen einer definierten Verdünnungsrate im Anschluss an die Batch-Phase konnte ein Fließgleichgewicht eingestellt werden, welches der Grundgedanke des Chemostaten ist. Auch in Folge von Systemstörungen stellte sich wieder ein stabiles Fließgleichgewicht ein.

In Laufe zweier Kultivierungen, von jeweils 10 Tagen Dauer, wurden Variationen der Temperatur, der zellspezifischen Wachstumsrate und der Zelldichte durchgeführt und deren Einfluss auf die Plasmidausbeute untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit den untersuchten Parametern die Plasmidreplikation positiv beeinflusst werden kann.

Der Einfluss der zellspezifischen Wachstumsrate zeigte sich deutlich. Durch erhebliche Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate konnte ein auffällig starker Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts verzeichnet werden. Am deutlichsten zeigte sich dies am Übergang aus der Batch-Phase in die kontinuierliche Phase mit einem Anstieg der Ausbeute um das 8-fache.

Die optimale Fermentationstemperatur konnte noch nicht sicher definiert werden. Eine Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 35 °C bewirkte jedoch eine deutliche Verbesserung der Plasmidreplikation.

Eine Frage, die nicht komplett geklärt werden konnte, ist, ob das Kulturalter einen negativen Einfluss auf die Plasmidreplikation hat. Denn nach einem deutlichen Einbruch der Plasmidausbeute konnte die maximale Ausbeute nicht wieder erreicht werden. Trotzdem war es möglich die Plasmidausbeute in Folge eines Einbruchs durch Variation der Prozessparameter wieder zu erhöhen.

Dies zeigte sich deutlich mit der Änderung der Glucosezulaufkonzentration. Eine Erhöhung um je 10 gL⁻¹ und der damit verbundene Anstieg der Zellkonzentration konnten zu deutlichen Steigerungen des Plasmidgehalts der Biomasse von bis zu 100% führen.

Neben Aussagen zur Optimierung der Plasmidausbeute konnten auch Aussagen zum Substratausbeutekoeffizienten sowie zum Erhaltungsstoffwechsel von *E. coli* gemacht werden. Es wurde gezeigt, dass der Erhaltungsstoffwechsel, beschrieben durch die

Substratmaintenancerate q_{S/X_m} , den Substratausbeutekoeffizient beeinflusst. Bei Vernachlässigung von q_{S/X_m} ergibt sich ein relativ niedriger Substratausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$ von $0,16 \text{ gg}^{-1}$. Die Berücksichtigung von q_{S/X_m} führt zu einem höheren Substratausbeutekoeffizient $y_{X/S}^*$ von etwa $0,62 \text{ gg}^{-1}$. Dieser Wert deckt sich besser mit Literaturangaben [Bäcklund 2008]. Mit diesen Beobachtungen und der Berücksichtigung von q_{S/X_m} kann das Zellwachstum sowie die Substrataufnahme im Chemostat, durch ein vereinfachtes mathematisches Modell, beschrieben werden.

6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen zum Einfluss von Prozessparametern auf die pDNA-Ausbeute. Bei Untersuchungen der zellspezifischen Wachstumsrate zeigte sich deutlich, dass niedrige zellspezifische Wachstumsraten einen positiven Einfluss haben. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren und den möglichen Einfluss des Prozessalters auf die bisherigen Beobachtungen weiter zu minimieren, sollte die kontinuierliche Phase mit einer möglichst hohen Verdünnungsrate gestartet werden und anschließend stufenweise verringert werden. Außerdem könnte untersucht werden, ob noch niedrigere Verdünnungsraten als $0,05 \text{ h}^{-1}$ zu einer weiteren Verbesserung führen und damit im Fed-Batch-Verfahren durch (eventuell schrittweise) Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate die Ausbeute gesteigert werden kann. Es ist darauf zu achten, dass die Zelldichte mit der Verringerung der Verdünnungsrate nicht zu sehr abnimmt und eventuell der kontinuierliche Prozess gefährdet wird. Das entspricht zwar nicht der theoretischen Grundlage des Chemostaten, wird aber aus Kapitel 4.8 mit der Substratmaintenancerate q_{S/X_m} klar.

Für die Temperatur und die Glucosezulaufkonzentration sollten die Auswirkungen einer schrittweisen Verringerung der Parameter sowie die sprungweise Änderung eines Parameters und anschließende Rückstellung auf den Ausgangszustand untersucht werden. Damit könnten weitere Erkenntnisse gewonnen und der Einfluss des Prozessalters auf die Ergebnisse weiter minimiert werden.

Allgemein ist es sinnvoll, den Einfluss weiterer Prozessparameter mit diesen Strategien zu untersuchen. Also einen Parameter sowohl aufsteigend als auch absteigend zu ändern sowie den Parameter nach einer Änderung immer wieder auf einen Ausgangswert einzustellen.

Um Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluss des Kulturalters auf die Plasmidausbeute zu untersuchen, sollte der Prozess für mehrere Tage ohne Änderung der Prozessparameter beobachtet werden.

Letztendlich bedarf es einer Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse auf einen Fed-Batch-Prozess um die getroffenen Aussagen bezüglich der optimalen Parameter-einstellungen für einen Produktionsprozess zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

- [Bates 2005] Andrew D Bates, Anthony Maxwell: *DNA Topology*. 2. Auflage, OUP Oxford Verlag, 2005
- [Bäcklund 2008] Emma Bäcklund, et al.: *Cell engineering of Escherichia coli allows high cell density accumulation fed-batch process control*. Bioprocess and Biosystem Engineering 2008, **31**: 11-20
- [Carnes 2006] Aaron E. Carnes, et al.: *Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production*. Biotechnology and Applied Biochemistry 2006, **45**: 155-166
- [Chmiel 2011] Horst Chmiel: *Bioprozesstechnik*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [Ederth 2002] J. Ederth, et al.: *Origin-specific reduction of ColE1 plasmid copy number due to mutations in a distinct region of the Escherichia coli RNA polymerase*. Molecular Genetics and Genomics 2002, **267**: 587-592
- [Efferth 2006] Thomas Efferth: *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag, 2006
- [Fazio 2004] VM Fazio, et al.: *Immune response at birth, long-term immune memory and 2 years follow-up after in-utero anti-HBV DNA immunization*. Gene Therapy 2004, **11**: 544-551
- [Ganten 2008] Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 3. Auflage, Springer Verlag, 2008
- [Hardin 2011] Ashley H. Hardin, et al.: *Direct measurement of DNA bending by type IIA topoisomerases: implications for non-equilibrium topology simplification*. Nucleic Acids Research 2011, **39**: 5729–5743

- [MacGregor 1998] Rob Roy MacGregor, et al.: *First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response*. The Journal of Infectious Diseases 1998, **178**: 92–100
- [Monod 1949] Jacques Monod: *The growth of bacterial cultures*. Annual Review of Microbiology 1949, **3**: 371-394
- [Mülhardt 2009] C. Mülhardt: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [Silva 2012] Filomena Silva, et al.: *Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology*. Applied Microbiology and Biotechnology 2012, **93**: 2571–2580
- [Singer 2009] Adam Singer, et al.: *DNA plasmid production in different host strains of Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2009, **36**: 521–530
- [Summers 1993] David K. Summers, et al.: *Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis*. Molecular Microbiology 1993, **8**: 1031-1038
- [Terpe 2006] Kay Terpe: *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Applied Microbiology and Biotechnology 2006, **72**: 211–222
- [Xu 1999] Bo Xu, et al.: *Modeling of Overflow Metabolism in Batch and Fed-Batch Cultures of Escherichia coli*. Biotechnology Progress 1999, **15**: 81–90

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, Mai 2013

Anhang

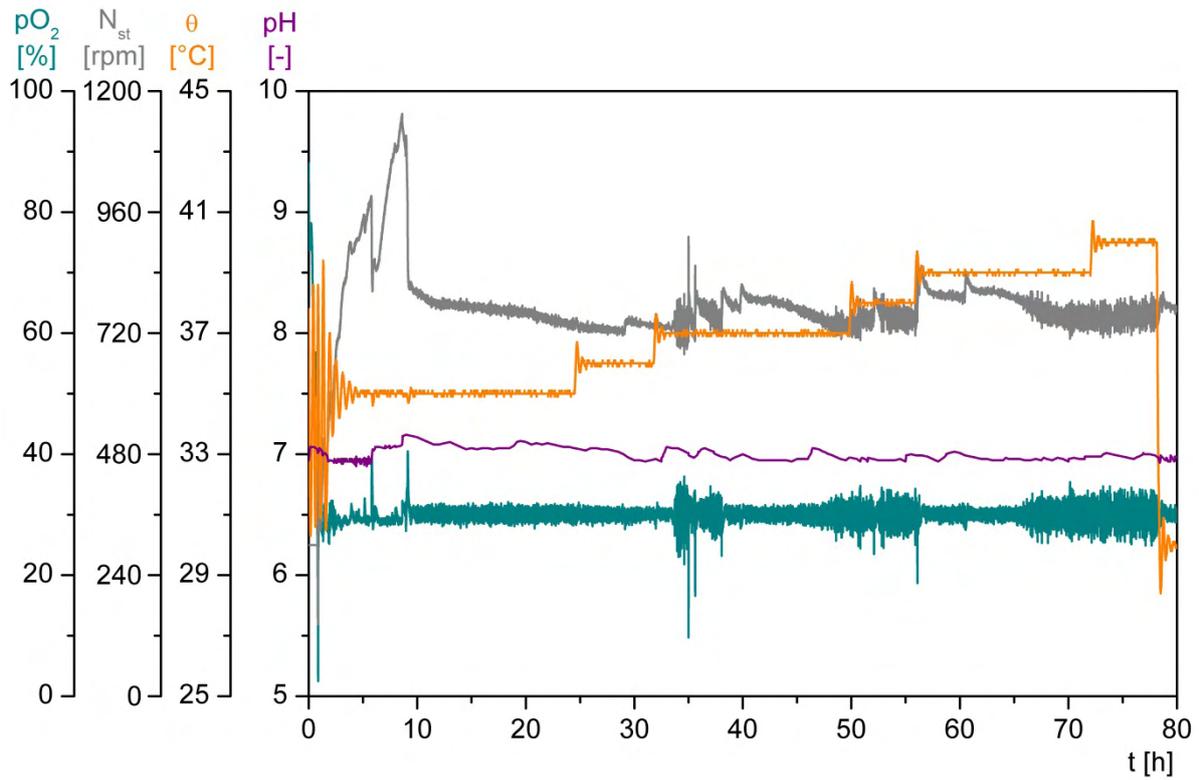


Abbildung 0.1: Onlinemessdaten U62. Legende: pO₂ – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

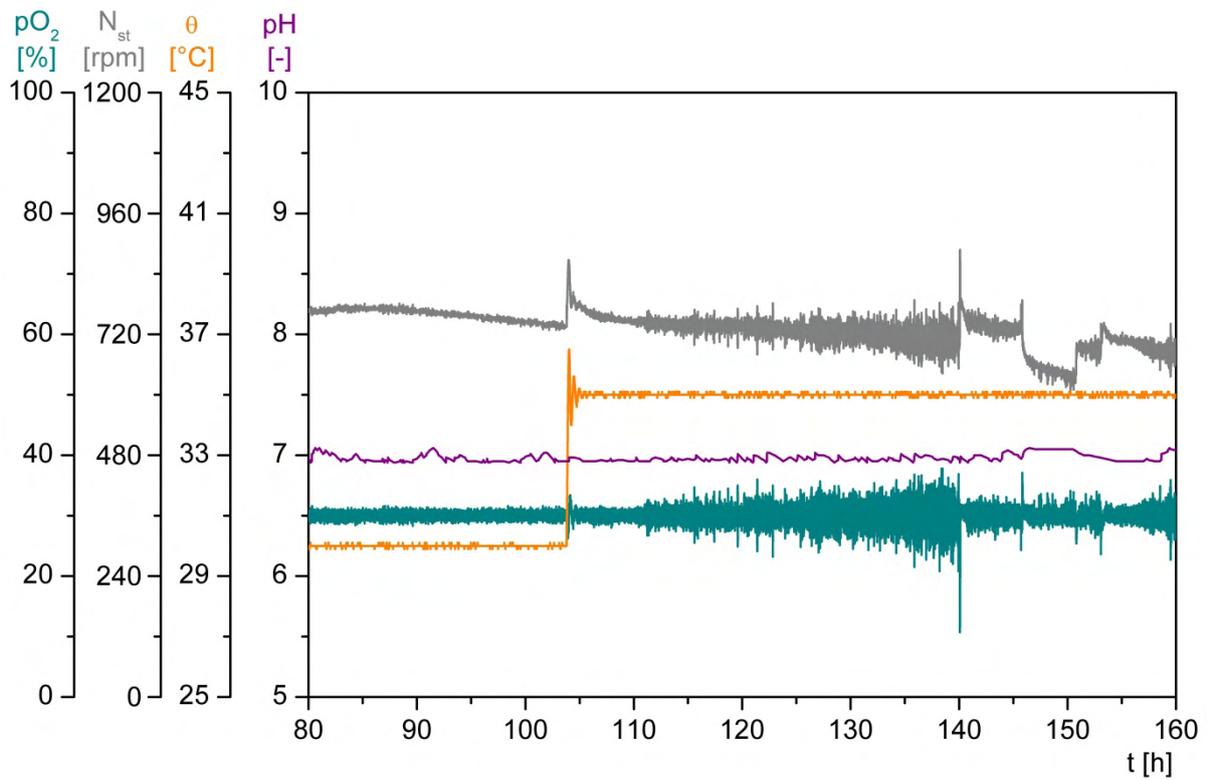


Abbildung 0.2: Onlinemessdaten U62. Legende: pO₂ – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

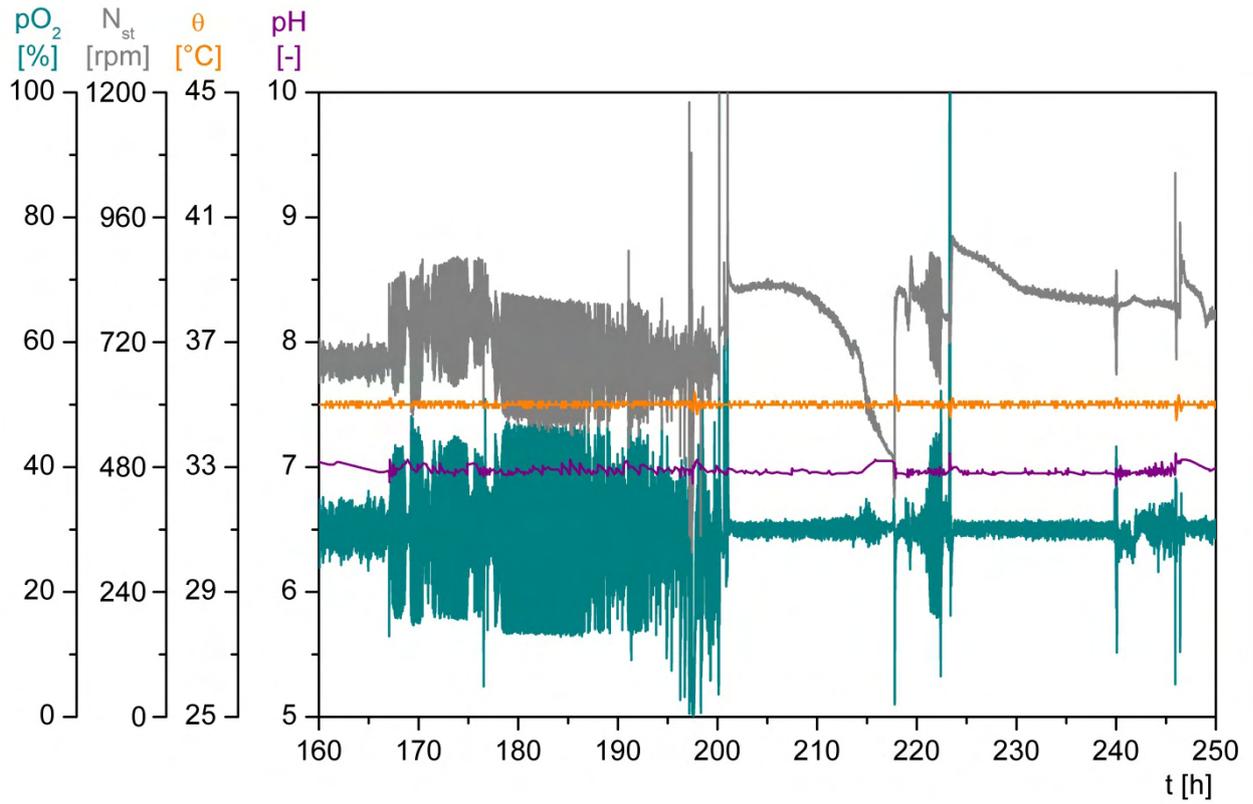


Abbildung 0.3: Onlinemessdaten U62. Legende: pO_2 – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

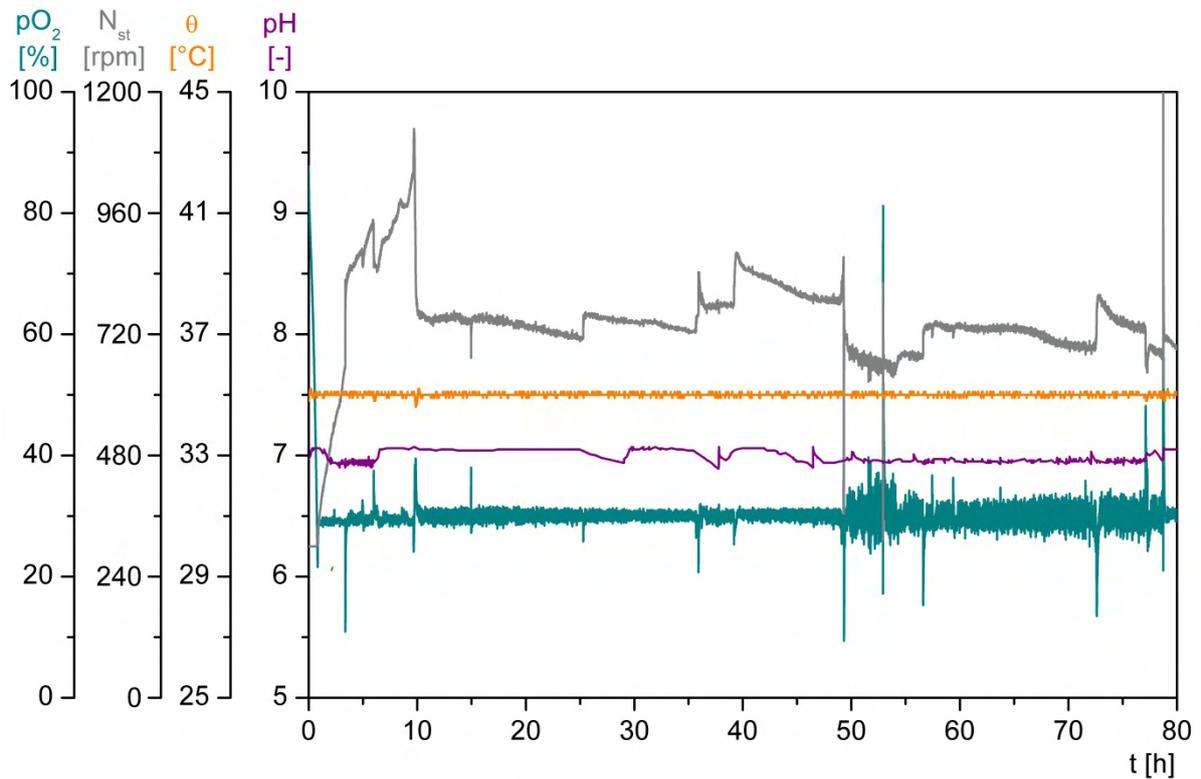


Abbildung 0.4: Onlinemessdaten U63. Legende: pO_2 – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

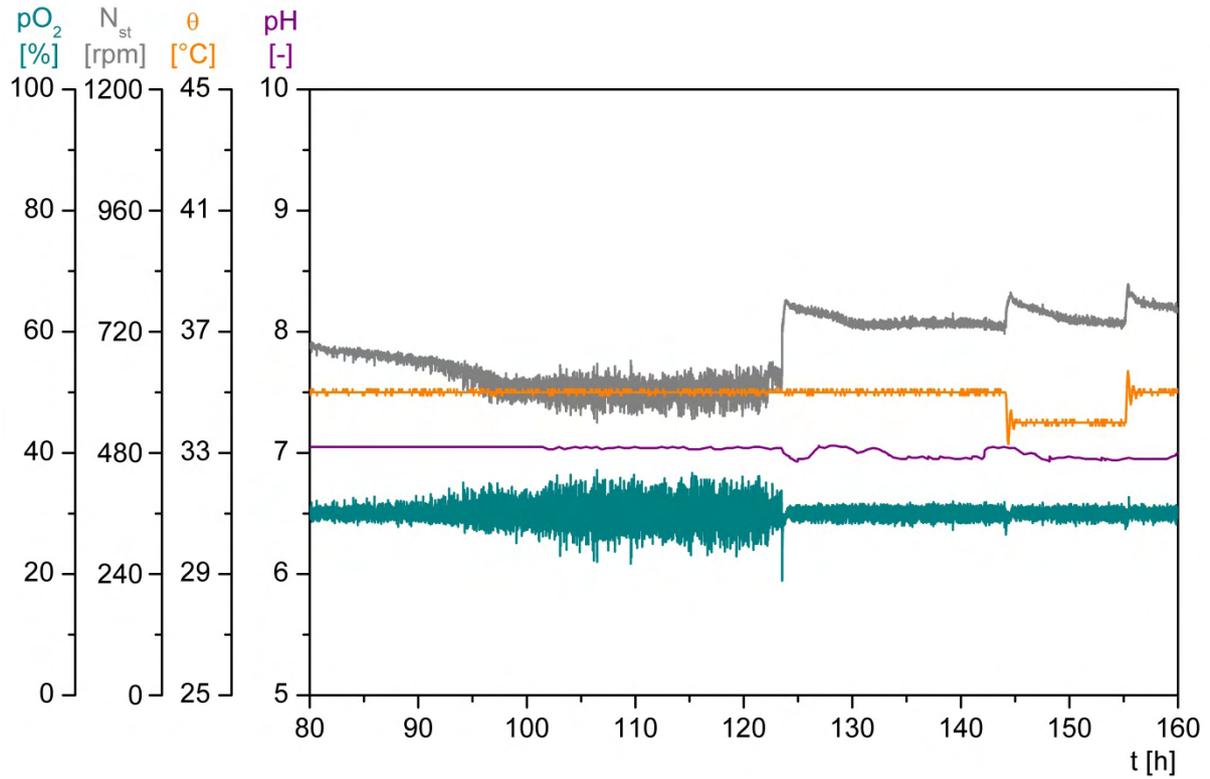


Abbildung 0.5: Onlinemessdaten U63. Legende: pO_2 – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

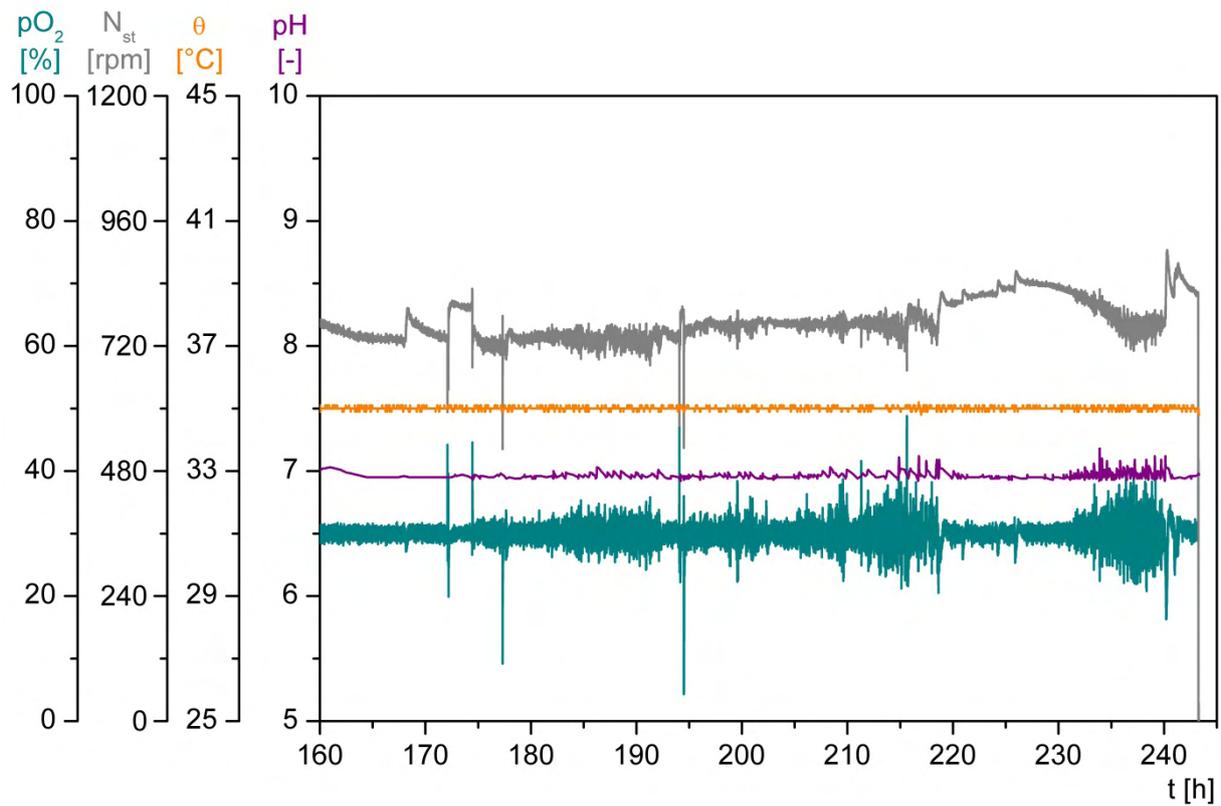


Abbildung 0.6: Onlinemessdaten U63. Legende: pO_2 – Sauerstoffpartialdruck; N_{st} – Rührerdrehzahl; θ - Temperatur

Tabelle 0.1: Übersicht Versuch U62.

Sample number	Phase	Time [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _X [gL ⁻¹]	C _P [mgL ⁻¹]	g _{P/X} [mgg ⁻¹]	N _g [-]	C _{GLU} [gL ⁻¹]	C _{ACE} [gL ⁻¹]	μ h ⁻¹	Temp °C
0	1	0,0	0,4	0,9	-	-	0	19,72	0,17	max	35
1	1	2,0	3,3	1,7	-	-	2	18,37	0,68	max	35
2	1	4,0	13,2	5,3	4,36	0,81	4	11,78	2,45	max	35
3	1	5,9	27,5	10,0	10,44	1,05	6	0,10	4,70	0,108	35
4	2	6,9	29,7	10,6	16,56	1,55	6	0,07	5,12	0,108	35
5	2	7,9	32,2	11,7	19,11	1,63	6	0,04	4,44	0,108	35
6	2	14,1	33,1	12,7	50,29	3,94	7	0,02	0,09	0,108	35
7	2	22,3	27,5	11,1	75,56	6,84	8	-	-	0,108	35
8	2	24,3	27,3	10,7	70,66	6,57	8	0,04	0,00	0,108	35
9	3	26,3	24,9	9,7	81,70	8,42	8	-	-	0,102	36
10	3	28,3	24,9	10,6	80,16	7,60	8	-	-	0,102	36
11	4	30,3	24,9	10,0	72,53	7,25	9	-	-	0,102	36
12	4	31,3	24,7	9,7	71,61	7,38	9	0,05	0,00	0,102	36
13	5	46,8	23,2	10,8	53,31	4,94	10	-	-	0,103	37
14	5	48,8	22,7	9,8	53,68	5,48	11	-	-	0,103	37
15	5	49,8	22,5	10,1	52,33	5,21	11	0,05	0,00	0,103	37
16	6	51,8	22,2	10,0	51,46	5,15	11	-	-	0,106	38
17	6	53,8	23,8	9,7	51,58	5,29	11	-	-	0,106	38
18	6	55,8	22,8	10,6	56,05	5,31	11	0,05	0,00	0,106	38
19	7	71,1	24,0	9,2	56,30	6,15	13	-	-	0,112	39
20	7	72,1	23,2	9,3	54,32	5,87	13	0,05	0,00	0,112	39
21	8	74,1	23,5	9,1	53,73	5,94	13	-	-	0,109	40
22	8	77,3	23,7	8,8	54,15	6,19	14	-	-	0,109	40
23	8	78,2	23,2	9,1	51,73	5,72	14	0,03	0,00	0,109	40
24	9	103,3	27,9	11,2	6,88	0,61	16	0,07	0,00	0,100	30
25	10	144,1	24,8	11,3	20,32	1,80	20	-	-	0,103	35
26	10	145,6	24,9	10,8	20,51	1,91	21	0,05	0,00	0,103	35
27	11	148,3	24,1	10,6	17,91	1,69	21	-	-	0,053	35
28	11	149,3	23,8	10,6	18,51	1,75	21	-	-	0,053	35
29	11	150,3	23,1	10,8	18,29	1,69	21	0,03	0,00	0,053	35
30	12	166,3	23,0	10,5	20,40	1,94	22	-	-	0,083	35
31	12	167,1	22,8	9,8	21,09	2,15	22	0,05	0,00	0,083	35
32	13	171,3	26,9	11,4	12,18	1,07	23	-	-	0,213	35
33	13	173,3	28,1	11,5	8,67	0,76	24	-	-	0,213	35
34	13	175,5	28,4	11,8	7,78	0,66	24	0,05	0,00	0,213	35
35	14	190,8	27,4	11,8	11,67	0,99	26	-	-	0,150	35
36	14	192,8	26,7	12,1	14,16	1,18	27	0,05	0,00	0,150	35
37	15	216,6	25,1	10,9	21,14	1,94	30	-	-	0,124	35
38	15	217,6	24,6	10,9	22,15	2,04	30	0,00	0,00	0,124	35
39	16	221,3	27,9	11,8	12,27	1,04	31	-	-	0,267	35
40	16	222,3	27,7	12,3	10,17	0,83	31	-	-	0,267	35
41	16	223,3	29,8	12,5	9,31	0,75	31	0,07	0,00	0,267	35
42	17	238,8	27,8	11,9	16,60	1,40	33	-	-	0,142	35
43	17	239,8	27,4	11,4	17,16	1,51	34	0,06	0,00	0,142	35
44	18	241,1	29,2	11,7	12,05	1,03	34	-	-	0,142	35
45	18	242,1	31,4	12,1	9,48	0,78	34	-	-	0,349	35
46	18	243,1	31,6	13,2	7,60	0,58	34	-	-	0,349	35
47	18	245,1	31,7	13,0	6,48	0,50	35	-	-	0,349	35
48	18	245,8	31,8	13,0	6,30	0,48	35	0,05	0,00	0,349	35

Tabelle 0.2: Übersicht Versuch U63.:

Sample number	Phase	Time [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _X [gL ⁻¹]	C _P [mgL ⁻¹]	g _{P/X} [mgg ⁻¹]	N _g [-]	C _{Glu} [gL ⁻¹]	C _{Ace} [gL ⁻¹]	μ h ⁻¹	Temp °C
0	1	0,0	0,5	0,1	-	-	0,0	25,18	0,19	max	35
1	1	2,0	4,1	1,6	-	-	2,0	23,28	0,97	max	35
2	1	4,0	14,4	5,6	-	-	4,0	14,96	2,64	max	35
3	1	6,0	30,2	10,6	5,82	0,55	6,0	0,06	5,02	max	35
4	3	8,0	35,1	12,3	13,27	1,08	6,3	0,03	5,07	0,073	35
5	3	24,1	28,5	11,2	71,43	6,41	7,5	-	0,00	0,073	35
6	3	25,1	28,5	10,9	83,80	7,65	7,4	0,02	0,00	0,073	35
7	4	27,8	28,2	10,8	79,58	7,40	7,7	-	-	0,102	35
8	4	30,1	26,3	10,5	75,13	7,19	7,9	-	-	0,102	35
9	4	32,6	25,8	10,1	67,23	6,69	8,2	-	-	0,102	35
10	4	34,6	25,4	10,4	48,76	4,69	8,4	-	-	0,102	35
11	4	35,6	25,8	10,5	49,11	4,68	8,5	0,03	0	0,102	35
12	5	48,1	26,3	11,1	15,89	1,44	10,0	-	-	0,119	35
13	5	49,1	26,5	11,0	14,27	1,30	10,1	0,03	0,00	0,119	35
14	6	51,1	27,9	11,2	11,67	1,04	10,4	-	-	0,149	35
15	6	53,1	26,3	11,3	10,92	0,97	10,7	-	-	0,149	35
16	6	55,6	26,9	11,2	14,15	1,26	11,0	-	-	0,149	35
17	6	56,6	29,7	11,5	11,14	0,96	11,2	0,03	0,00	0,149	35
18	7	71,5	29,0	11,6	7,88	0,68	14,3	-	-	0,209	35
19	7	72,5	28,8	12,1	8,04	0,67	14,5	0,03	0,00	0,209	35
20	8	73,6	29,2	11,7	5,83	0,50	14,8	0,04	0,00	0,245	35
21	8	75,6	29,3	12,1	5,53	0,46	15,3	0,04	0,00	0,245	35
22	8	77,1	29,3	11,6	5,00	0,43	15,6	0,04	0,00	0,245	35
23	10	122,3	19,4	10,2	34,69	3,42	17,9	-	-	0,051	35
24	10	123,3	19,2	10,0	38,67	3,87	18,0	0,02	0,00	0,051	35
25	11	144,1	24,2	12,2	23,75	1,95	20,0	0,03	0,00	0,097	35
26	12	145,1	23,9	10,9	21,11	1,94	20,1	-	-	0,097	34
27	12	148,1	24,7	11,1	17,07	1,54	20,4	-	-	0,097	34
28	12	151,1	24,6	10,8	15,95	1,48	20,7	-	-	0,097	34
29	12	154,1	24,9	11,0	13,14	1,19	21,0	-	-	0,097	34
30	12	155,1	24,5	11,1	7,07	0,64	21,1	0,03	0,00	0,097	34
31	13	168,1	24,5	10,4	10,83	1,04	22,3	-	-	0,097	35
32	13	171,9	24,2	10,9	10,33	0,94	22,7	0,02	0,00	0,097	35
33	14	172,6	24,6	10,9	10,51	0,97	22,8	0,02	0,00	0,097	35
34	14	173,6	25,4	12,1	11,15	0,93	22,9	0,01	0,00	0,097	35
35	14	174,6	26,5	11,6	7,69	0,66	23,0	0,02	0,00	0,097	35
36	14	175,6	27,2	11,1	8,31	0,75	23,1	0,02	0,00	0,097	35
37	14	176,6	28,3	11,6	8,52	0,73	23,2	0,01	0,00	0,097	35
38	14	177,6	28,8	11,7	9,26	0,79	23,3	0,02	0,00	0,097	35
39	14	192,1	30,7	12,6	14,11	1,12	24,7	0,03	0,00	0,097	35
40	14	194,1	31,4	12,5	13,99	1,12	24,9	0,03	0,00	0,097	35
41	15	195,1	32,0	12,8	13,87	1,09	25,0	0,02	0,00	0,097	35
42	15	196,1	32,9	13,5	14,49	1,08	25,1	0,02	0,00	0,097	35
43	15	198,1	29,0	14,1	13,27	0,94	25,3	0,02	0,00	0,097	35
44	15	200,1	32,2	13,8	14,12	1,02	25,4	0,02	0,00	0,097	35
45	15	215,6	34,4	14,1	32,14	2,29	26,9	0,04	0,00	0,097	35
46	16	216,6	37,9	12,7	31,70	2,50	27,0	0,05	0,00	0,097	35
47	16	217,6	35,4	15,2	33,19	2,19	27,1	0,05	0,04	0,097	35
48	16	219,6	38,0	15,0	37,45	2,50	27,3	0,06	0,20	0,097	35
49	16	221,6	38,3	15,5	37,88	2,45	27,5	0,06	0,25	0,097	35
50	16	223,6	40,3	16,0	53,82	3,36	27,7	0,05	0,37	0,097	35
51	16	224,6	40,5	15,8	55,64	3,52	27,8	0,07	0,33	0,097	35
52	16	225,6	40,2	15,9	59,77	3,76	27,9	0,06	0,39	0,097	35
53	16	240,1	-	15,3	54,84	3,58	29,3	0,06	3,73	0,097	35
54	16	241,1	-	15,9	52,17	3,28	29,4	0,07	4,07	0,097	35
55	16	242,1	-	15,3	50,57	3,29	29,5	0,06	3,76	0,097	35
56	16	243,1	-	15,5	51,74	3,35	29,6	0,06	3,63	0,097	35