



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Analyse der Plasmid-DNA Bildung in Kultivierungen rekombinanter *Escherichia coli* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessführungsstrategien

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Janis Brockhaus
2000124

Hamburg-Bergedorf

Am 28. November 2013

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

Zweitgutachter: Dr. Christian Kaiser
Richter-Helm BioLogics Hamburg

Danksagung

Mein Dank gilt der Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG, welche mir die Durchführung dieser Bachelorarbeit ermöglicht hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Kaiser sowie seinem Team für die sehr gute Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Betreuung dieser Bachelorarbeit sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Für die immerwährende Unterstützung gilt meiner Familie der größte Dank.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung und Zielsetzung	1
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1.	Prozessführungsstrategien	3
2.1.1.	Kontinuierliche Prozessführung	6
2.1.2.	Fed-Batch Prozessführung	11
2.2.	Kultivierungsorganismus <i>Escherichia coli</i>	13
2.3.	Glycerin als Kohlenstoffquelle	13
2.4.	Zielprodukt: Plasmid-DNA	14
2.5.	Analytische Verfahren	17
2.5.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.5.2.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	18
3.	Material und Methoden.....	22
3.1.	Durchführung der Vorkultur	23
3.2.	Realisierung der kontinuierlichen Prozessführung.....	23
3.2.1.	Aufbau des Bioreaktorsystems	23
3.2.2.	Zentrale Steuereinheit und Instrumentierung	27
3.2.3.	Vorbereitungen für die Kultivierung	27
3.2.4.	Eingesetzte Medien	30
3.2.5.	Off-line und on-line Messgrößen	31
3.3.	Ausführung der Fed-Batch Prozessführung	32
3.3.1.	Aufbau des Multibioreaktorsystems	32
3.3.2.	Vorbereitende Maßnahmen.....	36
3.3.3.	Eingesetzte Medien	36
3.3.4.	Prozessparameter und Messgrößen	37
3.4.	Messung der optischen Dichte	38
3.5.	Bestimmung der Zellkonzentration	39
3.6.	Probenvorbereitung für die HPLC- und AGE-Analytik	40
3.7.	pDNA-Analytik	43
3.7.1.	Konzentrationsbestimmung mittels HPLC	43
3.7.2.	Analyse der Konformationsverteilung mittels AGE	46
3.8.	Bestimmung der Substrat- und Metabolitkonzentration	47

4.	Auswertung und Diskussion der durchgeführten Arbeiten.....	49
4.1.	Erster kontinuierlicher Prozess.....	49
4.1.1.	Analyse des Plasmidkonzentrationsanstiegs zu Beginn der Zufütterung	50
4.1.2.	Untersuchung der Kulturalterung.....	51
4.1.3.	Einfluss des blockierten Feedschlauchs auf die Kulturalterung.....	53
4.1.4.	Steigerung der Plasmidkonzentration durch Verringerung von μ	57
4.1.5.	Vergleich der Kultivierungen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	58
4.1.6.	Analyse der pDNA-Konformationsverteilung	60
4.1.7.	Nachweis der circular single stranded DNA	63
4.2.	Zweiter kontinuierlicher Prozess.....	66
4.2.1.	Reproduzierbarkeit des Anstiegs der Plasmidkonzentration	67
4.2.2.	Analyse der Kulturalterung	69
4.2.3.	Plasmidkonzentrationssteigerung durch eine Reduktion von μ	72
4.2.4.	Vergleich der letzten Prozessphase mit der ersten Zufütterungsphase.....	73
4.2.5.	Vergleich des zellspezifischen Plasmidgehalts.....	74
4.2.6.	Verteilung der pDNA-Konformationen	75
4.3.	Fed-Batch Prozesse	77
4.3.1.	Analyse der Fed-Batch Prozesse	80
5.	Zusammenfassung.....	90
6.	Ausblick.....	92
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Eidesstattliche Erklärung	96
9.	Anhang	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Darstellung zweier X/D-Diagramme mit unterschiedlichen Sättigungskonstanten K_S	8
Abbildung 2.2: Darstellung des X/D-Diagramms unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels.....	10
Abbildung 2.3: Grundaufbau eines gentechnisch genutzten Plasmids.....	15
Abbildung 2.4: Übersicht über die Plasmidkonformationen [27].....	16
Abbildung 2.5: Trennschema einer Säulenflüssigkeitschromatographie [12].....	19
Abbildung 2.6: Trennmechanismus eines Ligandenaustauschers mit einem sulfonierten DVB-Polymer als stationärer Phase.....	20
Abbildung 3.1: Übersicht der einzelnen Prozessschritte sowie der prozessbegleitenden Analytik inklusive Probenvorbereitung.....	22
Abbildung 3.2: Aufbau des Kultivierungssystems für die kontinuierliche Prozessführung.....	24
Abbildung 3.3: R&I-Fließschema des Versuchsaufbaus für die kontinuierliche Kultivierung nach DIN EN ISO 10628.....	26
Abbildung 3.4: On-line Messdaten der ersten kontinuierlichen Kultivierung bis zu 15 Stunden Prozesszeit.....	30
Abbildung 3.5: Aufbau des Multibioreaktorsystems.....	32
Abbildung 3.6: R&I-Fließschema des Versuchsaufbaus eines Bioreaktors für die Fed-Batch Kultivierung nach DIN EN ISO 10628.....	35
Abbildung 3.7: Ablauf der alkalischen Lyse und der Probenvorbereitung für die Analytik.....	41
Abbildung 3.8: pDNA-Standardgerade.....	45
Abbildung 3.9: Chromatogramm des pDNA-Standards.....	46
Abbildung 3.10: Acetatstandardgerade (a) und Glycerinstandardgerade (b).....	48
Abbildung 4.1: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD_{600} bis 170 Stunden des ersten kontinuierlichen Prozesses.....	52
Abbildung 4.2: On-line Messdaten der ersten 130 Stunden Prozesszeit des ersten Prozesses.....	54
Abbildung 4.3: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD_{600} ab 170 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses.....	57

Abbildung 4.4: Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts sowie der Zellkonzentration bis 170 Stunden des ersten Prozesses.....	59
Abbildung 4.5: 1%iges Agarosegel mit ausgewählten Proben aus dem ersten kontinuierlichen Prozess (GM: Größenmarker; S: Standard)	60
Abbildung 4.6: Beweis der css-DNA auf einem 1%igen Agarosegel	64
Abbildung 4.7: Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Auftretens der css-DNA (GM: Größenmarker)	65
Abbildung 4.8: Nachweis der permanent vorliegenden css-DNA mit einem 1%igen Agarosegel (GM: Größenmarker).....	66
Abbildung 4.9: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD ₆₀₀ des zweiten kontinuierlichen Prozesses.....	70
Abbildung 4.10: Verlauf der on-line Messdaten der ersten 125 Stunden des zweiten kontinuierlichen Prozesses.....	71
Abbildung 4.11: Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts und der Zellkonzentration des zweiten kontinuierlichen Prozesses.....	74
Abbildung 4.12: Ausgewählte Proben aus dem zweiten Prozess (GM: Größenmarker).....	76
Abbildung 4.13: Verlauf der on-line Messgrößen von D3 mit Kennzeichnung des Feedstarts sowie der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate	79
Abbildung 4.14: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat- und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D1 und D2.....	80
Abbildung 4.15: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat-, und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D3	83
Abbildung 4.16: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat-, und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D4	86
Abbildung 4.17: Darstellung der pDNA-Konformationsverteilung, der Zell-, Plasmid-, Acetat- und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts am Ende der Fed-Batch Prozesse	88
Abbildung 9.1: On-line Messgrößen bis 130 Stunden Prozesszeit des ersten Prozesses.....	97
Abbildung 9.2: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 130 und 260 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses	97

Abbildung 9.3: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 260 und 390 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses	98
Abbildung 9.4: Verlauf der on-line Messgrößen der ersten 125 Stunden Prozesszeit der zweiten kontinuierlichen Kultivierung	101
Abbildung 9.5: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 125 und 250 Stunden Prozesszeit der zweiten kontinuierlichen Kultivierung.....	101
Abbildung 9.6: Verlauf der on-line Messgrößen des ersten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$	104
Abbildung 9.7: Verlauf der on-line Messgrößen des zweiten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$	105
Abbildung 9.8: Verlauf der on-line Messgrößen des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$	106
Abbildung 9.9: Verlauf der on-line Messgrößen des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Zusammensetzung des Vorkulturmediums.....	23
Tabelle 3.2:	Equipment für die kontinuierliche Prozessführung.....	24
Tabelle 3.3:	Verwendete Korrekturmedien	27
Tabelle 3.4:	Material für die kontinuierliche Prozessführung	28
Tabelle 3.5:	Abhängigkeit des Arbeitsvolumens des Bioreaktors von der Drehzahl.....	29
Tabelle 3.6:	Prozessparameter für den Kultivierungsstart.....	29
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung des Batchkultur- und Feedmediums.....	31
Tabelle 3.8:	On-line Messgrößen der kontinuierlichen Prozessführung	31
Tabelle 3.9:	Off-line Messgrößen der kontinuierlichen Prozessführung	32
Tabelle 3.10:	Komponenten des Fed-Batch Systems	33
Tabelle 3.11:	Material für das Fed-Batch System.....	33
Tabelle 3.12:	Eingesetzte CIP-Lösungen im Fed-Batch Prozess.....	36
Tabelle 3.13:	Zusammensetzung der Feedmedien der Fed-Batch Prozesse.....	37
Tabelle 3.14:	Prozessparameter für den Fed-Batch Prozess.....	38
Tabelle 3.15:	On-line und off-line Messgrößen bei den Fed-Batch Prozessen	38
Tabelle 3.16:	Geräte zur Bestimmung der Biotrockenmasse	39
Tabelle 3.17:	Komponenten des <i>Qiagen</i> Miniprepkits	40
Tabelle 3.18:	Puffer und Restriktionsenzyme für die Restriktion der pDNA	43
Tabelle 3.19:	Software und Materialien zur Analyse der pDNA.....	43
Tabelle 3.20:	Komponenten der HPLC-Anlage für die pDNA-Messung	44
Tabelle 3.21:	Verlauf der Elutionspufferkonzentration.....	44
Tabelle 3.22:	Methodenüberblick für die HPLC-Analytik der pDNA.....	44
Tabelle 3.23:	HPLC-Puffer für die pDNA-Analytik	45
Tabelle 3.24:	Geräte zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	46
Tabelle 3.25:	Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese	47
Tabelle 3.26:	HPLC-System für die Bestimmung der Metabolit- und Sub- stratkonzentration.....	47
Tabelle 3.27:	Material und Puffer für die Bestimmung der Metabolit- und Substratkonzentration	48
Tabelle 4.1:	Prozessparameter des ersten kontinuierlichen Prozesses	49
Tabelle 4.2:	Prozessphasen des ersten kontinuierlichen Prozesses.....	50

Tabelle 4.3: Prozessdaten der ersten und zweiten Prozessphase des ersten Prozesses.....	50
Tabelle 4.4: Prozessdaten der dritten Prozessphase des ersten Prozesses.....	51
Tabelle 4.5: Prozessdaten der dritten Prozessphase nach Austausch des Feedschlauchs des ersten Prozesses	55
Tabelle 4.6: Prozessdaten der vierten Prozessphase des ersten Prozesses.....	56
Tabelle 4.7: Prozessdaten vom Ende der achten und anteilig der neunten Prozessphase.....	58
Tabelle 4.8: Maximale zellspezifische Plasmidgehälter der kontinuierlichen Prozesse mit Glycerin und Glucose als primäre Kohlenstoffquelle	60
Tabelle 4.9: Prozentuale Konformationsverteilung der Plasmide des ersten Prozesses	61
Tabelle 4.10: Prozessparameter des zweiten kontinuierlichen Prozesses	67
Tabelle 4.11: Aufteilung der Phasen des zweiten Prozesses.....	67
Tabelle 4.12: Prozessdaten der ersten und anteilig der zweiten Phase des zweiten Prozesses	68
Tabelle 4.13: Prozessdaten ab der maximalen Plasmidkonzentration der zweiten Prozessphase des zweiten Prozesses.....	69
Tabelle 4.14: Prozessdaten der dritten Prozessphase des zweiten Prozesses	72
Tabelle 4.15: Prozessdaten der vierten Phase des zweiten Prozesses	74
Tabelle 4.16: Maximaler zellspezifischer Plasmidgehalt beider Prozesse mit Glycerin und der Kultivierung mit Glucose als primäre Kohlenstoffquelle	75
Tabelle 4.17: Prozessparameter für die Fed-Batch Prozesse	78
Tabelle 4.18: Zell- und Plasmidkonzentration sowie zellspezifische Plasmidgehalt von D1 und D2.....	81
Tabelle 4.19: Acetat- und Glycerinkonzentration von D1 und D2.....	82
Tabelle 4.20: Prozessdaten des Fed-Batch Prozesses D3	84
Tabelle 4.21: Prozessdaten des Fed-Batch Prozesses D4	87
Tabelle 9.1: Übersicht der off-line Parameter des ersten kontinuierlichen Prozesses bis Probe 40	99
Tabelle 9.2: Übersicht der off-line Parameter des ersten kontinuierlichen Prozesses ab Probe 41	100

Tabelle 9.3: Übersicht der off-line Parameter der zweiten kontinuierlichen Kultivierung bis Probe 37	102
Tabelle 9.4: Übersicht der off-line Parameter der zweiten kontinuierlichen Kultivierung ab Probe 38	103
Tabelle 9.5: Übersicht der off-line Parameter des ersten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$	104
Tabelle 9.6: Übersicht der off-line Parameter der zweiten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$	105
Tabelle 9.7: Übersicht der off-line Parameter des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$	106
Tabelle 9.8: Übersicht der off-line Parameter des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$	107

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
μ	zellspezifische Wachstumsrate	$[h^{-1}]$
μL	Mikroliter	
μ_{max}	maximale zellspezifische Wachstumsrate	$[h^{-1}]$
A	Peakfläche der Probe	
AGE	Agarose-Gelelektrophorese	
APS	Ammoniumperoxodisulfat	
ATP	Adenosintriphosphat	
BIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino	
BRM	Broad Range Marker	
BSA	Bovines Serumalbumin	
C_{Ace}	Acetatkonzentration	$[gL^{-1}]$
C_{Analyt}	Konzentration des Analyten	$[mgL^{-1}]$
CCC	covalently closed circular	
C_{Gly}	Glycerinkonzentration	$[gL^{-1}]$
CIM	Convective Interaction Media	
CIP	Cleaning In Place	
C_P	Plasmidkonzentration	$[mgL^{-1}]$
C_S	Substratkonzentration	$[gL^{-1}]$
css	circular single stranded	
C_X	Zellkonzentration	$[gL^{-1}]$
$C_{X,0}$	Anfangszellkonzentration	$[gL^{-1}]$
$C_{X,B}$	Zellkonzentration zu Beginn der Zufütterung	$[gL^{-1}]$
$C_{X,R}$	Zellkonzentration im Feed	$[gL^{-1}]$
D	Verdünnungsrate	$[h^{-1}]$
DAD	Diodenarray-Detektor	
DCU	Digital Control Unit	
DEAE	Diethylaminoethyl	
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	
DNA	deoxyribonucleic acid	
DTT	Dithiothreitol	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
F	Verdünnungsfaktor	
F_{pDNA}	Verdünnungsfaktor der resuspendierten Zellen	
F_R	Volumenstrom	$[Lh^{-1}]$
$F_{R,B}$	Volumenstrom zu Beginn der Zufütterung	$[Lh^{-1}]$
g	Gramm	
GM	Größenmarker	
g_{max}	maximale Beschleunigung	
$g_{P/X}$	zellspezifischer Produktgehalt	$[mgg^{-1}]$
h	Stunde	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
kbp	Kilobasenpaare	
kD	Kilodalton	
K_S	Sättigungskonstante des Substrats	$[gL^{-1}]$
L	Liter	

lin	linear	
M	molar	
MCS	Multiple Cloning Site	
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	
mg	Milligramm	
MgSO ₄	Magnesiumsulfat	
min	Minute	
mL	Milliliter	
mM	millimolar	
mm	Millimeter	
m _{Std}	Steigung der linearen Regression des Standards	[L(mg) ⁻¹]
N	Rührerdrehzahl	[rpm]
n.n.	nicht nachweisbar	
NaCl	Natriumchlorid	
ng	Nanogramm	
NL	Normliter	
oc	open circular	
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm	
OD _{Leer}	Optische Dichte des Leerwerts	
OD _{Mess}	Gemessene optische Dichte einer Probe	
OD _{Probe}	Berechnete optische Dichte einer Probe	
pDNA	Plasmid-DNA	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration	
pO ₂	relativer Sauerstoffpartialdruck	[%]
q _{S/X,m}	zellspezifische Substratausbeute rate des Erhal- tungsstoffwechsels	[g(gh) ⁻¹]
R&I	Rohrleitungs- und Instrumenten	
RCB	Research Cell Bank	
RI	Refractive Index	
RNA	ribonucleic acid	
rpm	revolutions per minute	
S	Standard	
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
S-DVB	sulfoniertes Divinylbenzol	
t	Zeit	[h]
TAE	TRIS-Acetat-EDTA	
t _D	Verdopplungszeit	[h]
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
USP	Upstream Processing	
UV	Ultraviolett	
VIS	Sichtbares Licht	
V _L	Bioreaktorfüllvolumen	[L]
V _{L,B}	Reaktorfüllvolumen zu Beginn der Zufütterung	[L]
V _P	Probenvolumen	
vvm	volume per volume per minute	
y _{X/S}	Substratausbeutekoeffizient	[gg ⁻¹]
y _{X/S,g}	Zellertragskoeffizient	[gg ⁻¹]

1. Einführung und Zielsetzung

Mikroorganismen wurden schon vor mehreren Jahrhunderten durch den Menschen zur Herstellung von Produkten wie Wein, Sauerteig oder Bier eingesetzt [25]. Durch den Zuwachs an Wissen über die biologischen Eigenschaften der Mikroorganismen, seit Anfang des 20. Jahrhunderts, wurden die mikrobiell hergestellten Produkte immer komplexer. Als eines der ersten durch Mikroorganismen hergestellten pharmazeutischen Produkte gilt das in den 1930er Jahren von Alexander Fleming entdeckte Penicillin. Heutzutage basiert eine Vielzahl der von den Pharmaunternehmen hergestellten Medikamente auf rekombinanten Proteinen, die durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen produziert werden. Diese ermöglichen die Produktion komplexer Proteine, welche nicht durch chemische Synthesen herzustellen sind. Erkrankungen wie Krebs, neurodegenerative oder chronische Erkrankungen können trotz des großen Fortschritts in der Entwicklung der rekombinanten Proteine nach heutigem Stand nicht geheilt werden [18]. Die Erforschung an der nächsten Generation an Medikamenten, die ihre Wirkung erst in den betroffenen Zellen des Menschen entfalten, ist bereits angelaufen. Diese Medikamentenklasse basiert auf von Mikroorganismen produzierter gentechnisch veränderter Plasmid-DNA.

Plasmid-DNA ist ein Vektor der keine viralen Bestandteile aufweist und somit besonders geeignet ist für den Transfer von Genen mit therapeutischem Nutzen [18]. Des Weiteren können Medikamente auf Basis von Plasmid-DNA gezielt im menschlichen Körper eingesetzt werden, da die Plasmid-DNA durch Signalfaktoren in die gewünschten Körperzellen transportiert wird. Dadurch ist die Plasmid-DNA, nicht nur bei der Gentherapie, ein großer Hoffnungsträger für die Zukunft.

Pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA unterliegt strengen Qualitätsparametern, damit eine sichere und wirksame Anwendung garantiert werden kann. Es sollten für die Produktion und spätere Aufreinigung keine Substanzen tierischen Ursprungs eingesetzt werden [10]. Dies gilt für jegliche Herstellung von Medikamenten mit Mikroorganismen. Zusätzlich wird gefordert, dass der Anteil der covalently closed circular Konformation der Plasmid-DNA mindestens 95% beträgt [30], da nur diese effektiv in eukaryotische Zellen transportiert werden [6]. Des Weiteren müssen Grenzwerte für den Gehalt an bakterieller chromosomaler DNA und RNA sowie an Endotoxinen und bakteriellen Proteinen eingehalten werden.

Die Herstellung von Plasmid-DNA erfolgt über die Kultivierung des Bakteriums *Escherichia coli* [5] und ist unter anderem abhängig von der ausgewählten Prozessführungsstrategie sowie von den Prozessparametern. Diese Arbeit, angefertigt in der Abteilung für Prozessentwicklung des Biotechnologieunternehmens Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG am Standort Hamburg, beschäftigt sich mit dem Verhalten von *Escherichia coli* in Abhängigkeit der angewandten Prozessführungsstrategie. Die zellspezifische Wachstumsrate wird als alleiniger variabler Parameter gewählt. Untersucht werden neben dem Wachstum der Mikroorganismen die Auswirkungen auf die Bildung der Plasmid-DNA. Für die Realisierung einer Kultivierungszeit von mehreren Tagen wird eine kontinuierliche Prozessführung mit dem Prinzip des Chemostaten angewandt. Die Kultivierungen werden mit dem Stamm *Escherichia coli* DH10B durchgeführt. Als primäre Kohlenstoffquelle dient Glycerin. Der Kultivierungsorganismus trägt ein Plasmid mit einer Größe von 7.377 Basenpaaren.

Zur Bewertung der durchgeführten Prozesse werden unterschiedliche analytische Verfahren eingesetzt. Um die zellintern vorliegende Plasmid-DNA freizusetzen, werden die Zellen zunächst mit Hilfe einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Anschließend wird die Plasmidkonzentration mit einem Anionenaustauscher bestimmt. Für die Untersuchung der Plasmid-Qualität wird die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Das Wachstumsverhalten und der Metabolismus der Zellen werden mittels OD_{600} und der Biotrockenmasse sowie der Glycerin- und Acetatkonzentration näher untersucht.

Die aus zwei kontinuierlichen Kultivierungen gewonnenen Ergebnisse werden eingesetzt um eine Fed-Batch Prozessführung zu realisieren. Dazu wird ein Multibioreaktorsystem eingesetzt, mit dem vier Fed-Batch Prozesse parallel durchgeführt werden. Es werden drei verschiedene zellspezifische Wachstumsraten sowie ein exponentielles Zufütterungsprofil gewählt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bewerten zu können, wird in zwei Fed-Batch Prozessen die gleiche zellspezifische Wachstumsrate eingesetzt.

2. Theoretische Grundlagen

Für das bessere Verständnis der durchgeführten Arbeiten werden im folgenden Kapitel die theoretischen Grundlagen für die angewandten Prozessführungsstrategien, des Kultivierungsorganismus und des Zielprodukts sowie der eingesetzten analytischen Verfahren erläutert.

2.1. Prozessführungsstrategien

Die in dieser Arbeit angewandten Prozessführungsstrategien sind die kontinuierliche sowie die Fed-Batch Prozessführung.

Zunächst beginnen beide Kultivierungsprozesse mit einer Batch-Phase. In dieser durchlaufen die Mikroorganismen, nach der Inokulation des Bioreaktors, eine Lag-Phase in der sie sich an die veränderten Umgebungsbedingungen anpassen. Durch die Bildung von Enzymen und Proteinen, die für ein Wachstum unter den neuen Bedingungen notwendig sind, ist die interne biochemische Aktivität der Zellen auf einem maximalen Level [26]. Dadurch ruht das Wachstum der Zellen nahezu. Unter der Verwendung einer Vorkultur kann die Lag-Phase in der Hauptkultivierung vermieden werden bzw. stark verkürzt werden. Die Zellen passen sich dabei in einem kleinen Maßstab unter möglichst identischen Bedingungen zum Hauptprozess an diese an. Dadurch wird der Hauptprozess mit bereits angepassten Zellen angeimpft, die sich bereits im Wachstum befinden.

Im Anschluss an die Lag-Phase gehen die Mikroorganismen in die exponentielle Wachstumsphase über. Die Zellen wachsen mit ihrer maximalen zellspezifischen Wachstumsrate μ_{max} ,

$$\mu = \mu_{max}, \quad (2.1)$$

$\mu =$ zellspezifische Wachstumsrate $[h^{-1}]$

solange eine ausreichende Sauerstoffversorgung (im hier dargestellten mathematischen Modell nicht berücksichtigt) gewährleistet ist und das Substrat im Überschuss vorliegt ($c_S \gg K_S$).

Die zellspezifische Wachstumsrate wird mathematisch mit der Gleichung

$$\mu(t) = \mu_{\max} \frac{c_S(t)}{K_S + c_S(t)} \quad (2.2)$$

$c_S =$	Substratkonzentration	[gL ⁻¹]
$K_S =$	Sättigungskonstante des Substrats	[gL ⁻¹]

beschrieben. Diese substratabhängige Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen formulierte der französische Nobelpreisträger Jaques Lucien Monod 1949 in Analogie zur Enzymkinetik von Michaelis und Menten [26]. Damit trug Monod mit seinen Überlegungen maßgeblich zum Verständnis der Zellwachstumskinetik bei [7]. Monod setzt in seinem Modell die Bakterienzelle einem einzelnen Enzymmolekül gleich und vereinfachte dieses dahingehend, dass angenommen wird, das Zellwachstum die einzige Eigenschaft der Mikroorganismen ist und somit eine autokatalytische Reaktion vorliegt. Das Monod-Modell wird noch heute in Prozessführungsstrategien, zum Beispiel zur Bestimmung der kritischen Verdünnungsrate bei dem Betrieb eines Chemostaten, eingesetzt.

In der Batch-Phase lässt sich, unter Vernachlässigung der pH-Korrektur und Antischaummittelzugabe, die Zunahme der Zellkonzentration c_X ,

$$\frac{dc_X(t)}{dt} = \mu_{\max} c_X(t), \quad (2.3)$$

als eine Funktion der Zeit beschreiben. Aus dieser Gleichung folgt nach Trennung der Variablen, Integration und anschließendem Auflösen,

$$c_X(t) = c_{X,0} e^{\mu_{\max} \cdot t}, \quad (2.4)$$

$c_{X,0} =$	Anfangszellkonzentration	[gL ⁻¹]
$t =$	Zeit	[h]

eine Bestimmungsgleichung für die Zellkonzentration c_X . Durch Umstellen der Gleichung (2.4) nach t und der Annahme der Verdopplung der Zellkonzentration kann die Verdopplungszeit t_D ,

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}, \quad (2.5)$$

oder allgemeingültig für exponentielles Wachstum mit konstanter Wachstumsrate über

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.6)$$

berechnet werden.

Die Mikroorganismen weisen durch ihre hohe Teilungsaktivität bei μ_{max} eine schwächere Zellwand auf und sind sehr empfindlich gegenüber Veränderungen von Prozessparametern. Dies kann zu geringen Zellkonzentrationen und Produktausbeuten führen. Die schwächere Zellwand resultiert daraus, dass die Mikroorganismen unter anderem nicht schnell genug Peptidoglycan bilden können und die Vernetzung der Lipoproteine wesentlich geringer ist [8].

Liegt die primäre Kohlenstoffquelle im Überschuss vor, so wird diese von *Escherichia coli* (*E. coli*) auch über den anaeroben Stoffwechsel abgebaut. Dabei entsteht der Metabolit Acetat. Dieses Verhalten wird als Überflussmetabolismus bezeichnet und hat seinen Ursprung in der reduzierten Synthese der Tricarbonsäurezyklusenzyme α -Ketoglutaratdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase und Succinatdehydrogenase [29]. Dies führt zu einer verringerten Aktivität des Tricarbonsäurezyklus. Das Acetat wird von den Mikroorganismen nach Verbrauch der primären Kohlenstoffquelle, durch Umstellung des Stoffwechsels, als Kohlenstoffquelle genutzt.

Der Übergang von der Batch-Phase in die Zufütterungsphase wird durch den Verbrauch der primären Kohlenstoffquelle eingeleitet. Erkennbar ist dieser Zeitpunkt durch den plötzlichen Anstieg des pO_2 -Werts. Dieser wird durch das verminderte Wachstum der Mikroorganismen hervorgerufen. Bei Auftreten des pO_2 -Anstiegs wird die Zufütterungsphase durch die definierte Zuführung von sterilem Substrat eingeleitet. Die Substratzuführung sollte so gewählt werden, dass die primäre Kohlenstoffquelle bei ausreichender Sauerstoffversorgung nicht die Kapazität des aeroben Stoffwechsels der Mikroorganismen übersteigt. Dadurch wird die Bildung von Metaboliten wie Acetat verhindert [7]. Acetat kann einen negativen Einfluss auf das Produkt, dessen Bildung oder die Mikroorganismen selbst haben.

2.1.1. Kontinuierliche Prozessführung

Die kontinuierliche Prozessführung kann dazu eingesetzt werden, um das Kulturverhalten von Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dies wird dadurch ermöglicht, dass bei einem kontinuierlichen Prozess parallel Zellsuspension mit dem gleichen Volumenstrom F_R aus dem Bioreaktor herausgefördert ($F_{R,aus}$) wie neues Substrat hineingefördert ($F_{R,ein}$) wird,

$$F_{R,ein}(t) = F_{R,aus}(t) = F_R(t), \quad (2.7)$$

so dass sich ein konstantes Bioreaktorfüllvolumen V_L ergibt. Die Zuführung der Korrekturmedien wird dabei im dargestellten Modell vernachlässigt. Es liegt ein Fließgleichgewicht vor, das auch als pseudostationärer Zustand (engl. steady state) beschrieben wird [7]. Diese Prozessführung eines Bioreaktors wird als Chemostat bezeichnet.

Im Folgenden wird die Verdünnungsrate D ,

$$D(t) = \frac{F_R(t)}{V_L}, \quad (2.8)$$

eingeführt. Mit der ist es möglich den auf das Bioreaktorfüllvolumen V_L bezogenen Volumenstrom F_R zu beschreiben und somit anzugeben, wie oft das Bioreaktorfüllvolumen pro Zeiteinheit ausgetauscht wird.

Mit Hilfe der Biomassenbilanz für den Chemostaten,

$$\frac{dc_X(t)}{dt} V_L = \mu(t)c_X(t)V_L + F_R(t)c_{X,R} - F_R(t)c_X(t), \quad (2.9)$$

$$c_{X,R} = \text{Zellkonzentration im Feed} \quad [\text{gL}^{-1}]$$

ergibt sich nach Division der Gleichung (2.9) durch V_L und Einsetzen der Gleichung (2.8),

$$\frac{dc_X(t)}{dt} = \mu(t)c_X(t) + D(t)(c_{X,R} - c_X(t)), \quad (2.10)$$

die Biomassenbilanz in Abhängigkeit der Verdünnungsrate D .

Unter der Annahme das die Substratzuführung steril ist und damit $c_{X,R} = 0$ sowie der Einstellung des Fließgleichgewichts mit konstanter Zelldichte folgt,

$$\mu(t) = D(t), \quad (2.11)$$

dass die zellspezifische Wachstumsrate der Mikroorganismen über die Verdünnungsrate eingestellt wird. Dadurch ist die zellspezifische Wachstumsrate über den manuell einstellbaren Parameter F_R festlegbar.

Der Volumenstrom F_R kann jedoch nicht beliebig hoch gewählt werden. Das Überschreiten der Verdünnungsrate D über μ_{max} hinaus führt zum Auswaschen der Mikroorganismen. Je höher die Verdünnungsrate im Bereich von μ_{max} wird, desto geringer wird die Zelldichte (Abbildung 2.1) und die Substratkonzentration steigt. Dieses ist nur bis zu dem Zeitpunkt möglich, bei dem die Substratkonzentration im Bioreaktor gleich der Konzentration im Zulauf ($c_{S,R}$) ist. Tritt dies ein, so sind im Bioreaktor keine Mikroorganismen mehr enthalten, da kein Substrat mehr verbraucht wird. Die kritische Verdünnungsrate D_{Krit} lässt sich mit Hilfe der Monod-Kinetik aus Gleichung (2.2) und der Kernbeziehung des Chemostaten aus Gleichung (2.11),

$$D_{Krit} = \mu_{max} \frac{c_{S,R}}{K_S + c_{S,R}}, \quad (2.12)$$

beschreiben. D_{Krit} ist damit die maximal einstellbare Verdünnungsrate bei der sich im Bioreaktor noch Zellen befinden.

Für die Bestimmung der Zellkonzentration bei einer bestimmten zugeführten Substratkonzentration $c_{S,R}$, wird die Substratbilanz,

$$\frac{dc_S(t)}{dt} V_L = - \frac{\mu(t)c_X(t)V_L}{y_{X/S}} + F_R(t)c_{S,R} - F_R(t)c_S(t), \quad (2.13)$$

$$y_{X/S} = \text{Substratausbeutekoeffizient} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

herangezogen. Nach Division der Gleichung (2.13) durch V_L und Anwendung der Gleichung (2.8) sowie der Annahme, dass ein Fließgleichgewicht vorliegt, ergibt sich

$$0 = - \frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S}} + D(t)(c_{S,R} - c_S(t)) \quad (2.14)$$

und kann unter Verwendung der Kernbeziehung des Chemostaten (Gleichung (2.11)) zur Berechnung der Zellkonzentration,

$$c_X(t) = y_{X/S} (c_{S,R} - c_S(t)), \quad (2.15)$$

verwendet werden. Die Substratkonzentration,

$$c_S(t) = \frac{D(t)K_S}{\mu_{\max} - D(t)}, \quad (2.16)$$

wird durch das Einsetzen der Kernbeziehung des Chemostaten (Gleichung (2.11)) in die Monod-Gleichung (2.2) erhalten.

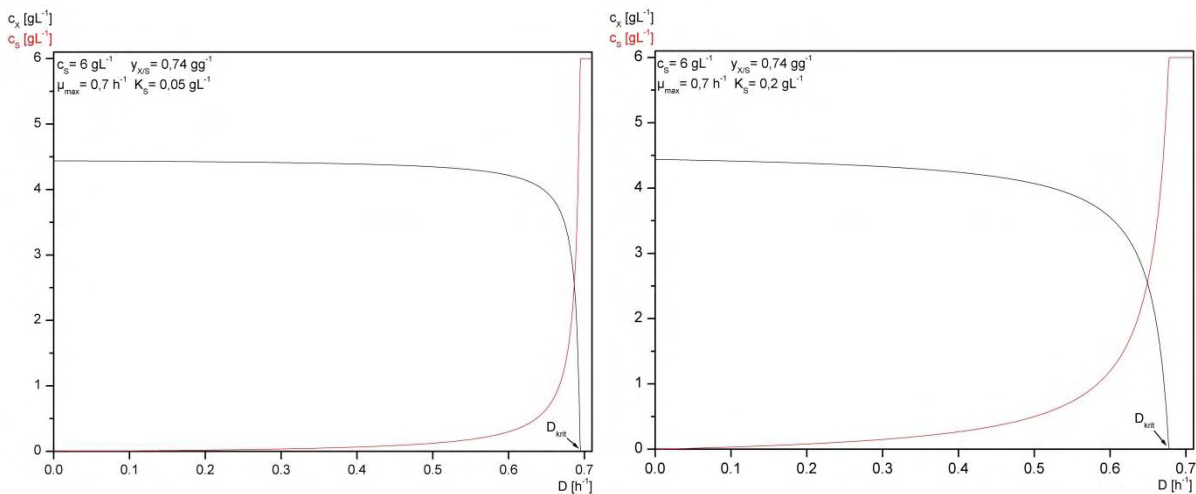


Abbildung 2.1: Darstellung zweier X/D-Diagramme mit unterschiedlichen Sättigungskonstanten K_S

Mit Hilfe der Gleichungen (2.15) und (2.16) kann der Verlauf der Zell- und Substratkonzentration in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsraten in einem X/D-Diagramm dargestellt werden. Die Verläufe für die Verwendung von Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle sowie zwei unterschiedlichen Sättigungskonstanten K_S sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Der Substratausbeutekoeffizient $y_{X/S}$ beträgt für *E. coli* laut Literatur 0,4 g Biomasse pro g Substrat [2]. Das in Abbildung 2.1 verwendete $y_{X/S}$ wurde aus den durchgeführten Versuchen bestimmt und beträgt $0,74 \text{ gg}^{-1}$. Die Substratkonzentration entspricht der Substratkonzentration die in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Die maximale zellspezifische Wachstumsrate entspricht μ_{\max} aus den durchgeführten Batch-Phasen der Versuche.

In Abbildung 2.1 ist zu sehen, dass die Zellkonzentrationen bis zu einer Verdünnungsrate von $0,4 \text{ h}^{-1}$ bei beiden Sättigungskonstanten nur einen minimalen Rückgang aufweisen. Angenommen wird in diesem Modell, dass das Wachstum (Anabolismus) die einzige Eigenschaft der Zellen ist. Nicht berücksichtigt wird der energieliefernde Katabolismus, welcher mit dem Anabolismus verbunden ist. Zusätzlich ist aus

Abbildung 2.1 erkennbar, dass bei Verdünnungsraten ab $0,5 \text{ h}^{-1}$ bis $0,6 \text{ h}^{-1}$, je nach Sättigungskonstante, das Auswaschen der Zellen aus dem Bioreaktor beginnt und D_{Krit} erreicht wird. Je größer die Sättigungskonstante ist, desto schneller wird D_{Krit} erreicht. Dies ist auch aus Gleichung (2.12) erkennbar, da der Wert des Nenners mit einer größeren Sättigungskonstanten wächst.

Wird der Erhaltungsstoffwechsel mit berücksichtigt, gilt die Darstellung in Abbildung 2.1 nicht mehr. In der Kernbeziehung des Chemostaten muss nun der Katabolismus mit berücksichtigt werden. Dieser wird durch die Addition des Produkts aus Zellertragskoeffizienten $y_{X/S,g}$ und der zellspezifischen Substratausbeute rate des Erhaltungsstoffwechsels $q_{S/X,m}$,

$$\mu(t) - y_{X/S,g}q_{S/X,m} = D(t), \quad (2.17)$$

zur Kernbeziehung hinzugefügt. Die Substratbilanz aus Gleichung (2.13) wird ebenfalls durch einen Term für den Erhaltungsstoffwechsel,

$$\frac{dc_S(t)}{dt} = -\frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S,g}} - q_{S/X,m}c_X(t) + D(t)(c_{S,R} - c_S(t)), \quad (2.18)$$

ergänzt. Nach Einstellung eines Fließgleichgewichts wird durch das Auflösen der Gleichung (2.18) nach c_X die Zellkonzentration,

$$c_X(t) = \frac{D(t)y_{X/S,g}(c_{S,R} - c_S(t))}{D(t) + q_{S/X,m}y_{X/S,g}}, \quad (2.19)$$

erhalten. Mit dem Monod-Modell folgt mit Gleichung (2.17) und Auflösen nach c_S ,

$$c_S(t) = \frac{K_S(D(t) + q_{S/X,m}y_{X/S,g})}{\mu_{\max} - D(t) - q_{S/X,m}y_{X/S,g}}, \quad (2.20)$$

die Bestimmungsgleichung für die Substratkonzentration.

Die Bestimmung der zellspezifischen Substratausbeute rate des Erhaltungsstoffwechsels $q_{S/X,m}$ und des Zellertragskoeffizienten $y_{X/S,g}$ wird mit Hilfe des Substratgesamtverbrauchs,

$$\frac{dc_S(t)}{dt} = -\frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S}(t)} = -\frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S,g}} - q_{S/X,m}c_X(t), \quad (2.21)$$

nach dem Ansatz von Pirt [14] durchgeführt. Durch Division von Gleichung (2.21) durch c_X und μ wird die lineare Funktion,

$$\frac{1}{y_{X/S}(t)} = \frac{1}{y_{X/S,g}} + q_{S/X,m} \frac{1}{\mu(t)}, \quad (2.22)$$

erhalten. Werden die Kehrwerte von $y_{X/S}$ über die Kehrwerte von μ aufgetragen, ergibt sich eine Gerade, dessen Steigung der zellspezifischen Substratausbeute rate des Erhaltungsstoffwechsels entspricht. Der Kehrwert des Ordinatenschnittpunkts der Geraden ergibt den Zellertragskoeffizienten $y_{X/S,g}$. Unter Verwendung der Gleichungen (2.19) und (2.20) ergibt sich der in Abbildung 2.2 dargestellte Verlauf der Zell- und Substratkonzentration bei unterschiedlichen Verdünnungsraten in einem X/D-Diagramm. Daraus ist zu erkennen, dass die Zellkonzentration lediglich in einem Bereich von $0,2 \text{ h}^{-1}$ bis $0,55 \text{ h}^{-1}$ als nahezu konstant angesehen werden kann. Sinkt die Verdünnungsrate unter $0,2 \text{ h}^{-1}$ oder steigt über $0,55 \text{ h}^{-1}$, nimmt die Zellkonzentration ab.

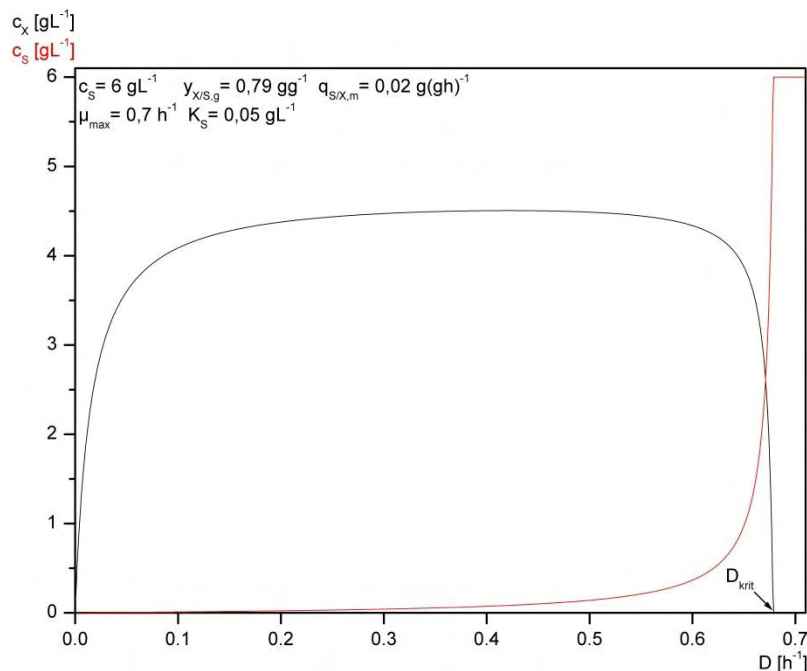


Abbildung 2.2: Darstellung des X/D-Diagramms unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels

2.1.2. Fed-Batch Prozessführung

Der Fed-Batch Prozess ist ein halbkontinuierliches Verfahren bei dem keine Zellsuspension abgeführt wird. In Folge dessen ist das Bioreaktorvolumen V_L aus Gleichung (2.8),

$$D(t) = \frac{F_R(t)}{V_L(t)}, \quad (2.23)$$

im Gegensatz zum kontinuierlichen Prozess, nicht mehr konstant.

Durch die definierte Zuführung des Substrats in den Bioreaktor ist es möglich eine gewünschte zellspezifische Wachstumsrate einzustellen und diese über die Zufütterungsphase konstant zu halten. Die zellspezifische Wachstumsrate ist dabei unter anderem von der Substratkonzentration im Feed $c_{S,R}$ und dem Substratausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$ abhängig.

Um den Volumenstrom berechnen zu können, muss die Substratbilanz,

$$\frac{d(c_S(t)V_L(t))}{dt} = -\frac{\mu(t)c_X(t)V_L(t)}{y_{X/S}} + F_R(t)(c_{S,R} - c_S(t)), \quad (2.24)$$

herangezogen werden. Wie bei der kontinuierlichen Prozessführung wird auch bei der Fed-Batch Prozessführung die Zuführung der Korrekturmedien im dargestellten Modell vernachlässigt. Durch die Anwendung der Produktregel auf Gleichung (2.24) und Division durch V_L ergibt sich die Differentialgleichung der Substratkonzentration,

$$\frac{dc_S(t)}{dt} = -\frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S}} + \frac{F_R(t)}{V_L(t)}(c_{S,R} - c_S(t)), \quad (2.25)$$

für den Fed-Batch Prozess. Unter der Annahme, dass das zugeführte Substrat sofort verbraucht wird ($c_S = 0$),

$$0 = -\frac{\mu(t)c_X(t)}{y_{X/S}} + \frac{F_R(t)}{V_L(t)}c_{S,R}, \quad (2.26)$$

vereinfacht sich Gleichung (2.25). Durch Umformen ergibt sich die Gleichung für den Volumenstrom $F_{R,B}$,

$$F_{R,B} = \frac{\mu}{y_{X/S} c_{S,R}} c_{X,B} V_{L,B}, \quad (2.27)$$

$$\begin{aligned} c_{X,B} &= \text{Zellkonzentration zu Beginn der Zufütterung} && [\text{gL}^{-1}] \\ V_{L,B} &= \text{Bioreaktorfüllvolumen zu Beginn der Zufütterung} && [\text{L}] \end{aligned}$$

für eine definierte zellspezifische Wachstumsrate zu Beginn der Substratzuführung. Bei der Zuführung des Substrats mit einem exponentiellen Zufütterungsprofil muss zusätzlich die Zunahme der Zelldichte berücksichtigt werden. Dadurch ergibt sich für den Volumenstrom zum Zeitpunkt t ,

$$F_R(t) = \frac{\mu}{y_{X/S} c_{S,R}} c_{X,B} V_{L,B} e^{\mu(t-t_B)}, \quad (2.28)$$

$$t_B = \text{Prozesszeit zu Beginn der Zufütterung} \quad [\text{h}]$$

eine exponentielle Funktion.

In der Industrie ist bei dem Einsatz einer kontinuierlichen oder Fed-Batch Prozessführung neben dem bestmöglichen Wachstum der Mikroorganismen die Produktivität von entscheidender Bedeutung. Die Ausbeute pro Zelle lässt sich mit dem zellspezifischen Produktgehalt $g_{P/X}$,

$$g_{P/X} = \frac{c_P}{c_X}, \quad (2.29)$$

$$c_P = \text{Plasmidkonzentration} \quad [\text{mgL}^{-1}]$$

beschreiben.

Beide eingesetzten Prozessführungsstrategien haben ihre Vor- und Nachteile. Eine kontinuierliche Kulturführung hat den Vorteil der Verwendung von kleineren Bioreaktorvolumina, da durch den kontinuierlichen Betrieb Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden können, die über dem einer Fed-Batch Kultivierung liegen. Des Weiteren fallen die jeweiligen Vorbereitungszeiten für die einzelnen Fed-Batch bzw. Batch Prozesse weg. Dadurch können Kosten eingespart werden. Außerdem ist die Belastung für die Materialien sowie die eingesetzten Sonden durch die einmalige Sterilisation geringer. Diese Tatsache leistet einen Beitrag zur Lebensdauer der Geräte und somit werden finanzielle Aufwendungen für Reparaturen oder Neuanschaffungen reduziert. Jedoch besteht bei einer kontinuierlichen Prozessführung die Gefahr des Auswaschens der Mikroorganismen aus dem Bioreaktor. Diese Gefahr besteht bei der Fed-Batch Pro-

zessführung nicht. Zusätzlich liegt das Potential für eine Kontamination eines kontinuierlichen Prozesses, durch die häufige Auffüllung der Feedvorlage, wesentlich höher als bei Batch oder Fed-Batch Prozessen. Neben der Gefahr von Kontaminationen muss die genetische Stabilität, die ein wichtiger Faktor in allen Kultivierungsprozessen für die Produktion von therapeutischen Produkten ist, gewährleistet und nachgewiesen werden. Bei einer kontinuierlichen Kultur kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Mikroorganismen während der langen Prozessdauer von mehreren Wochen keinen Mutationen unterliegen.

2.2. Kultivierungsorganismus *Escherichia coli*

Bei dem für die Kultivierungen eingesetzten Mikroorganismus handelt es sich um das *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterium. Dieses wurde 1885 von Theodor Escherich entdeckt und nach ihm benannt. *Escherichia coli* ist ein fakultativ anaerobes stäbchenförmiges, gram-negatives, unbewegliches oder peritrich begeißeltes und nicht sporenbildendes Bakterium der Gruppe der Enterobacteriaceae [26]. Es ist unter anderem im menschlichen sowie tierischen Darm angesiedelt und weist pathogene bis hin zu letale Stämme auf [28].

E. coli ist aus molekularbiologischer Sicht der am weitesten untersuchte Mikroorganismus weltweit und gilt daher auch als Modellorganismus für die Biotechnologie und Gentechnik. Das Genom von *E. coli* K12 wurde vollständig sequenziert und gilt als Stammvater für den Großteil der durch künstliche Mutationen erzeugten Derivate [9]. Eines dieser Derivate, der Stamm DH10B, wird in dieser Arbeit als Kultivierungs- und Produktionsorganismus für die Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt.

Mit dem Stamm DH10B ist es möglich, qualitativ hochwertige pDNA zu erzeugen und diese aufzureinigen [16]. Die Ursache dafür liegt an Mutationen an dem Gen *mcrA*, wodurch zellfremde DNA nicht abgebaut wird. Durch eine Mutation in den Genen *recA1* und *endA1* wird das Genom weniger anfällig für homologe Rekombinationen und die Stabilität während der Transformation wird gesteigert [9]. Diese Eigenschaften machen den Stamm DH10B zu einem geeigneten Kandidaten für die Untersuchung der pDNA und der Kulturalterung in einer kontinuierlichen Kultur.

2.3. Glycerin als Kohlenstoffquelle

Für die Kultivierungen wird Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle verwendet. Der Einsatz von Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle hat gegenüber Glucose den Vor-

teil, dass unter aeroben Bedingungen mit Glycerin mehr Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird als mit Glucose. Dies liegt daran, dass Glycerin durch Diffusion und durch den Glycerinfacilitator in der Mikroorganismenzellwand in die Zelle gelangt [23]. Unter Verbrauch von ATP wird das Glycerin in der Zelle von der Glycerinkinase zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert. Dieses Zwischenprodukt wird mit Hilfe der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert und es entsteht Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), welches über die Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt wird. Glucose hingegen gelangt, unter aeroben Bedingungen durch Verbrauch von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat, über das Phosphotransferasesystem in die Zelle [24]. Dabei werden bis zur Synthese des DHAP keine Reduktionsäquivalente gebildet. Bei der Oxidation von Glycerin-3-Phosphat durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase zu DHAP jedoch schon. Mit Hilfe der gebildeten Reduktionsäquivalente kann in der Atmungskette mehr ATP generiert werden. Durch die höhere ATP-Ausbeute steht den Mikroorganismen mehr Energie zur Verfügung. Die Produktivität von energieaufwendigen Prozessen, wie der Produktion von Proteinen oder pDNA, soll dadurch gesteigert werden. Es ist zu beachten, dass beim Einsatz von Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle das Zellwachstum und die Zellkonzentration geringer sind. Dies hat zur Folge, dass die Raum-Zeit-Ausbeute an Zellmasse für den Prozess schlechter wird.

2.4. Zielprodukt: Plasmid-DNA

Das Zielprodukt bei den Kultivierungen ist die pDNA der Mikroorganismen. Plasmide sind doppelsträngige DNA-Moleküle (engl. deoxyribonucleic acid), die eine ringförmige Struktur aufweisen. Aufgrund des Aufbaus aus Nukleotiden, bestehend aus Phosphorsäure, dem Zucker Desoxyribose und den heterozyklischen Nucleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, weist pDNA eine negative Ladung auf [13]. Plasmide können eine Länge von 2 bis 200 Kilobasenpaaren (kbp) aufweisen und sind überwiegend in Prokaryoten zu finden. Es gibt jedoch auch unter den Eukaryoten Arten, zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*, die Plasmide besitzen.

Plasmid-DNA ist kein Bestandteil des Hauptchromosoms und wird daher als extrachromosomale DNA bezeichnet. Sie besitzt die Eigenschaft der autonomen Vervielfältigung und kann deshalb in einer Zelle in mehreren Kopien vorkommen. Für die Zellerhaltung ist sie nicht essenziell, jedoch enthält sie oft Gene, die den Zellen zu einem Selektionsvorteil verhelfen. Dazu zählen Antibiotikaresistenzen, Bildung von

Toxinen die andere Bakterien abtöten und die Produktion von Proteinen für den Schwermetallabbau [28].

Das heute am häufigsten vorkommende Einsatzgebiet von pDNA liegt in der Gentechnik. Dort wird sie als Vektor eingesetzt, in den spezifische Gensequenzen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in die Multiple Cloning Site (MCS) transferiert werden (Abbildung 2.3). Anschließend werden die rekombinanten Plasmide in einen Expressionsorganismus transformiert. Ein häufig eingesetzter Expressionsorganismus ist *E. coli*.

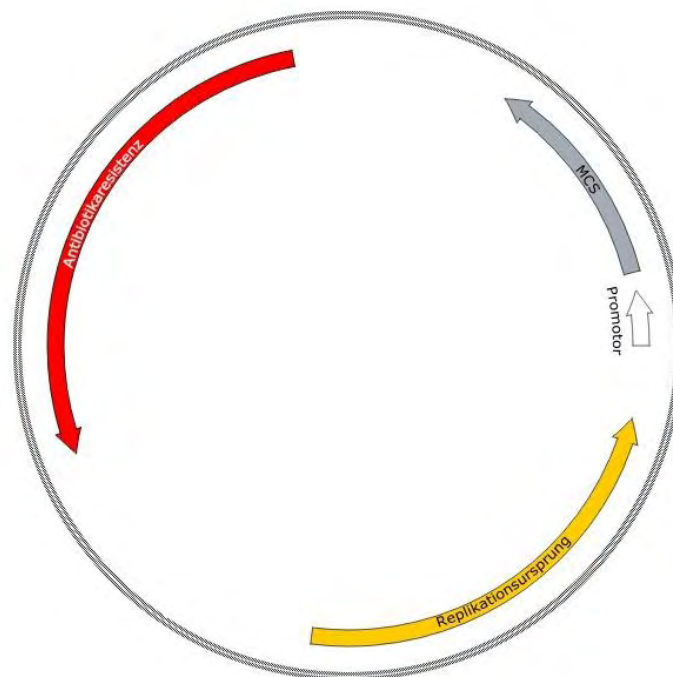


Abbildung 2.3: Grundaufbau eines gentechnisch genutzten Plasmids

Neben der MCS setzt sich ein Plasmid mindestens aus einem Replikationsursprung, einer Antibiotikaresistenz und einem ausgewählten Promotor für das in die MCS eingebrachte Gen zusammen. Durch den Replikationsursprung, auch origin genannt, wird festgelegt, ob es sich um ein *high-copy* Plasmid (ab 20 bis zu mehreren hundert Kopien pro Zelle) oder um ein *low-copy* Plasmid (bis zu 20 Kopien pro Zelle) handelt.

Mit Hilfe der Antibiotikaresistenz sind die Zellen in der Lage Proteine zu produzieren, die die Wirkung der eingesetzten Antibiotika neutralisieren. Dieses wird in der Gentechnik zur Selektion verwendet. Die zu kultivierenden Stämme enthalten Plasmide mit einer Antibiotikaresistenz, wodurch sichergestellt wird, dass beim Einsatz eines Selektivmediums nur die Zellen überleben, die das gewünschte Plasmid enthalten.

Am 5'-Ende des eingebauten Gens befindet sich der Promoter und reguliert die Transkription. Der Promotor gibt vor, in welchen Zellen eine Transkription des eingebrachten Gens vom Plasmid möglich ist und wie häufig die Transkription stattfindet [22]. Dies hat eine große Bedeutung für den gezielten Einsatz therapeutischer Anwendungen der pDNA.

Der Einsatz von pDNA als Pharmazeutikum hat gegenüber pharmazeutischen Produkten, die auf Proteinen oder RNA basieren, viele potenzielle Vorteile [15]. Plasmid-DNA weist eine hohe Stabilität bei Raumtemperatur auf, wodurch die Fertigung, Lagerung und der Transport einfacher ist. Des Weiteren ist die Realisierung, aufgrund einer weniger komplexen Aufreinigung, kürzerer Produktionszeiten möglich. Basierend auf der einfacheren Aufreinigung sind die Verluste geringer und das Gesamtprodukt wird kostengünstiger.

Plasmid-DNA kommt in unterschiedlichen Formen, den sogenannten Konformationen, in der Natur vor. Die am häufigsten vorkommende Konformation der pDNA in Bakterienzellen ist die covalently closed circular (ccc) Konformation. Diese wird aus der entspannten Konformation durch die DNA-Gyrase hergestellt. Neben der DNA-Gyrase entsteht durch die bereits um sich selbst gewundene DNA-Doppelhelix des geschlossenen Plasmids eine Torsionsspannung, die die ccc-pDNA Bildung begünstigt (Abbildung 2.4).

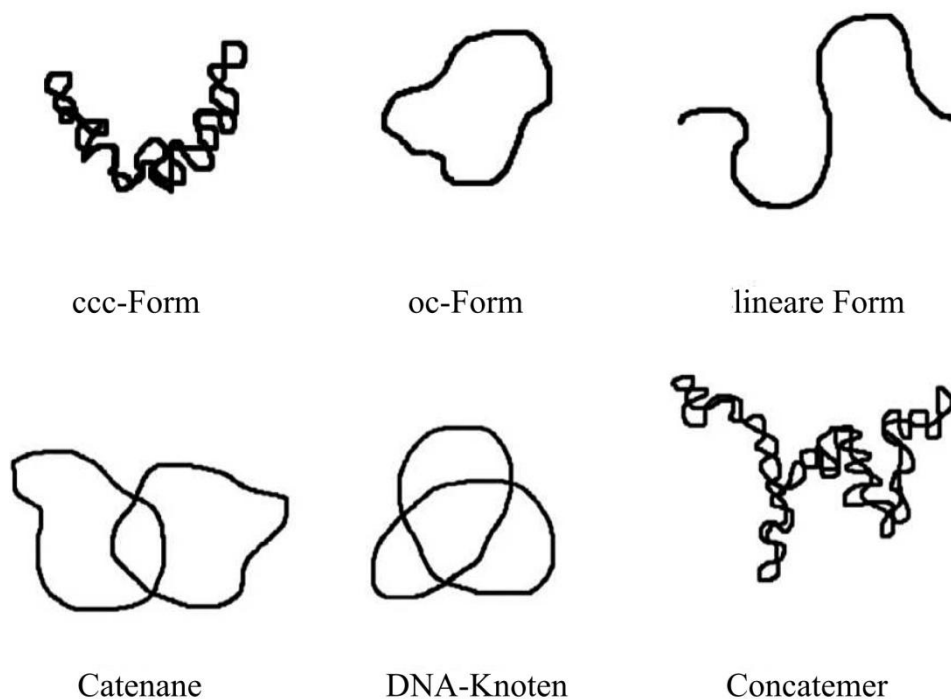


Abbildung 2.4: Übersicht über die Plasmidkonformationen [27]

Tritt ein Einzelstrangbruch durch Nukleasen oder mechanische Einwirkungen in einem der beiden DNA-Stränge auf, nimmt die Torsionsspannung ab und es bildet sich die entspannte open circular (oc) Konformation der pDNA [5]. Liegt allerdings ein Doppelstrangbruch vor, so wird die Kreisstruktur des Plasmids aufgehoben und es liegt linear (lin) vor.

Neben den monomeren Konformationen treten auch multimere Konformationen auf. Multimere Konformationen sind durch eine fehlerhafte Replikation möglich, bei der mehrere identische DNA-Abschnitte zusammengefügt werden oder es zu einer homologen Replikation kommt. Diese Multimere werden als Concatemere bezeichnet. Des Weiteren werden Plasmide, die wie Kettenglieder einer Rundstahlkette ineinander greifen, als Catenane bezeichnet. DNA-Knoten entstehen durch einen Doppelstrangbruch, bei dem keine vollständige Entwindung des DNA-Moleküls stattfindet. Durch die Ligation des Strangbruchs entsteht ein stabiles knotenförmiges DNA-Molekül [11].

2.5. Analytische Verfahren

Für die Analyse der in den Kultivierungen der Mikroorganismen gebildeten pDNA sowie für die Untersuchung der Metabolit- und Substratkonzentration wird das Verfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der Agarose-Gelelektrophorese (AGE) verwendet. Für die pDNA-Analytik wird eine Anionenaustauschersäule eingesetzt. Die Metabolit- und Substratkonzentrationsbestimmung wird mit einer Ligandenaustauschersäule realisiert. Die Grundlagen der verwendeten Methoden sind im Folgenden kurz beschrieben.

2.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus unterschiedlich verknüpften Galactoseeinheiten besteht und aus roten Meeresalgen stammt. Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt bei einer AGE nach der räumlichen Größe der Nukleinsäuren. Dazu wird mit Hilfe von Gleichstrom ein elektrisches Feld erzeugt, indem die durch das Phosphatrückgrat negativ geladenen Nukleinsäuren vom Minus-Pol zum Plus-Pol wandern [16]. Die Auftrennungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Größe des DNA-Moleküls und abhängig von der Agarosekonzentration. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner werden die Poren des Gels. Aufgrund dessen bewegen sich größere Moleküle in ei-

nem höher konzentrierten Gel langsamer. Des Weiteren hat auch die Form des DNA-Moleküls einen großen Einfluss auf die Auftrennungsgeschwindigkeit. Daher wird die ccc-Konformation eines Plasmids durch ihre Kompaktheit schneller durch das Agarosegel wandern als die entspannte oc-Konformation.

Zur Analyse der aufgetrennten Nukleinsäuren wird ein Größenstandard sowie Standards für die ccc-, oc- und lin-Konformation benötigt, damit eine Zuordnung der einzelnen Banden möglich ist. Sichtbar wird die DNA mit Hilfe von Ethidiumbromid und einer UV-Lampe. Ethidiumbromid hat die Eigenschaften in DNA-Stränge zu interkalieren und lässt sich durch die Bestrahlung mit UV-Licht detektieren. Bei Ethidiumbromid besteht jedoch der Nachteil, dass dieses stark mutagen wirkt.

2.5.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC basiert auf den Wechselwirkungen der Analyten mit der eingesetzten stationären sowie der mobilen Phase. Die ersten kommerziellen Geräte kamen im Jahr 1970 auf den Markt und ermöglichten eine Miniaturisierung der Säulendimensionen, der Teilchengrößen und der Analysezeiten im Vergleich zur herkömmlichen Säulenchromatographie [12].

Die wichtigste Komponente eines HPLC-Systems ist die eingesetzte Säule. Diese enthält die stationäre Phase und gibt damit den Rahmen der Trennmöglichkeiten vor, der unter anderem durch die Veränderung der Eigenschaften des Fließmittels ausgeschöpft werden kann. Das Fließmittel wird mit Hilfe eines Hochdruckpumpensystems zum Injektor gefördert. Dort wird auch die zu analysierende Probe in das System eingebracht.

Die stationäre Phase setzt sich aus kleinen Teilchen zusammen, die eine poröse Struktur aufweisen, jedoch gleichzeitig fest sind und an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen besitzen. Oft verwendete stationäre Phasen sind Silikagele oder Polymere. Die mobile Phase ist eine Flüssigkeit, die durch ihre Eigenschaften, wie Salzkonzentration oder pH-Wert, die Wechselwirkungen der Analyten beeinflusst.

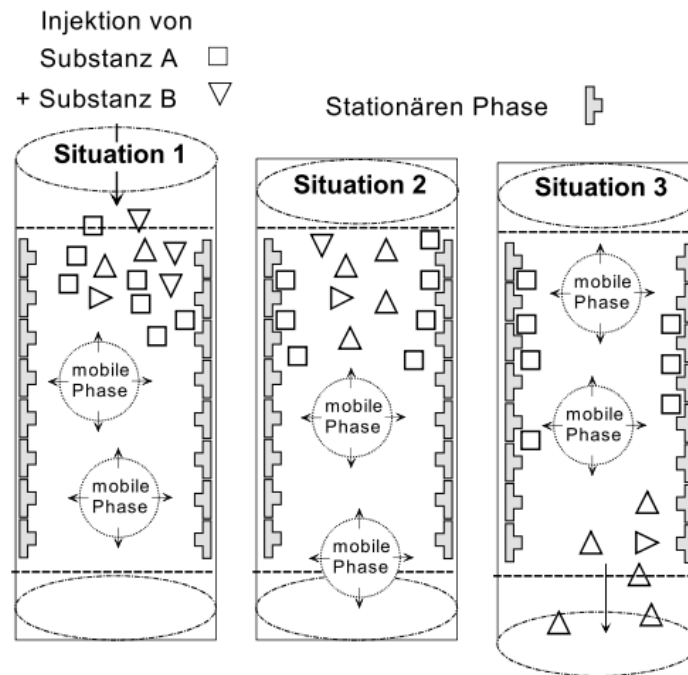


Abbildung 2.5: Trennschema einer Säulenflüssigkeitschromatographie [12]

Die Trennung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen der Analyten Substanz A und Substanz B mit den funktionellen Gruppen der stationären Phase, dargestellt in Abbildung 2.5. Das Trennschema zeigt eine stärkere Wechselwirkung der Substanz A mit den funktionellen Gruppen als die Substanz B. Dadurch befindet sich die Substanz B, wie in der Situation 2 zu sehen, überwiegend in der mobilen Phase. Sie verlässt die Säule dadurch schneller als Substanz A. Der zeitliche Unterschied des Verlassens der Säule wird als Retention bezeichnet. Diese wird graphisch von einem Computer in einem Chromatogramm abgebildet, der die Informationen von den Detektoren des HPLC-Systems als elektrisches Signal erhält und in ein digitales umwandelt. In solch einem Chromatogramm wird die Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen.

Für die Analyse der Metabolit- und Substratkonzentration aus den Kultivierungen sowie der pDNA werden zwei unterschiedliche Trennverfahren eingesetzt. Die Quantifizierung des Metaboliten Acetat sowie der primären Kohlenstoffquelle Glycerin wird in dieser Arbeit mit einem Ligandenaustauscher realisiert. Dieser kann ebenfalls als Ionenaustauscher für organische Säuren fungieren. Mit Hilfe von Ligandenaustauschern ist es möglich hydrophile Analyten, zum Beispiel Alditole, zu trennen. Die eingesetzte Säule wird von *Agilent Technologies* hergestellt und trägt die Bezeichnung Hi-Plex H. Ihre stationäre Phase besitzt als Grundgerüst ein sulfoniertes Divinylbenzol-Polymer (DVB) (Abbildung 2.6).

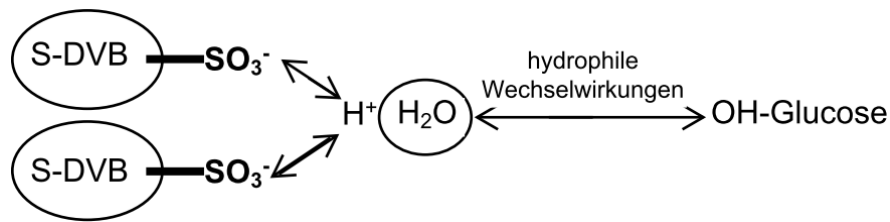


Abbildung 2.6: Trennmechanismus eines Ligandenaustauschers mit einem sulfonierten DVB-Polymer als stationärer Phase

Das DVB-Polymer besteht aus Polystyrol das mit Divinylbenzol polymerisiert wird. Als Gegenion für den Ligandenaustauscher werden Protonen an die negativ geladenen SO_3^- -Gruppen angelagert [1]. Der Trennmechanismus beruht auf hydrophilen Wechselwirkungen zwischen Liganden und Gegenion. Das Gegenion wird im Ruhezustand von Wassermolekülen umringt. Die Wassermoleküle werden von den Alditolmolekülen verdrängt. Diese lagern sich mit Hilfe ihrer alkoholischen OH-Gruppen über hydrophile Wechselwirkungen an das Proton an, bis sie von Wassermolekülen wieder verdrängt werden. Wird als Elutionsmittel eine schwache Säure verwendet, so kann die ausgewählte Säule auch als Ionenaustauscher für organische Säuren dienen.

Die pDNA wird, neben der AGE, mit einem convective interaction media (CIM) Modul von *BIA Separations* analysiert. Es handelt sich um eine monolithische Säule mit einer kontinuierlichen stationäre Phase, die sich aus einem auf Methacrylat basierenden Polymer zusammensetzt. Als funktionelle Gruppen befinden sich Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE) an der stationären Phase. Die DEAE-Gruppen geben dem CIM-Modul die Eigenschaften eines Anionenaustauschers [3].

Monolithische Säulen können Porengrößen bis in den unteren einstelligen μ -Bereich aufweisen. Dadurch besitzen sie den Vorteil gegenüber herkömmlichen Chromatographiematerialien, dass selbst große Biomoleküle durch die Poren gelangen können, ohne einem starken diffusionskontrollierten Massentransfer zu unterliegen. Dies führt zu schnelleren Trennzeiten und einer hohen Auflösung sowie Effizienz der chromatographischen Trennung. Des Weiteren ermöglichen die großen Poren hohe Flussraten ohne einen hohen Rückdruck zu erhalten. Ein weiterer Vorteil der großen Poren ist, dass die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen für die Biomoleküle hoch ist, wodurch sich die Kapazität der Säule erhöht. Die gebundenen Analyten können durch eine Erhöhung der Salzkonzentration oder Veränderung des pH-Werts in der mobilen Phase eluiert werden.

Als Detektoren werden häufig UV/VIS-Spektralphotometer sowie Differentialrefraktometer eingesetzt. Das Detektionsprinzip vom UV/VIS-Spektralphotometer beruht auf der Absorption der eingestrahlten UV/VIS-Strahlung durch die einzelnen Substanzen in der Durchflusszelle. Die Absorption ist von der Weglänge des Lichtstrahls durch die Küvette sowie von den Absorptionseigenschaften der Substanz abhängig. Der abgeschwächte Lichtstrahl trifft anschließend auf eine Photomesszelle. Diese erzeugt ein elektrisches Signal, das an einen Computer weitergeleitet wird. Das so erzeugte Chromatogramm kann anschließend mittels einer Software ausgewertet und die entsprechenden Analyten quantifiziert werden.

Alternativ zu einem UV/VIS-Spektralphotometer wird häufig ein Diodenarray-Detektor (DAD) eingesetzt. Dieser misst ebenfalls die Lichtabsorption des Analyten. Das elektrische Messsignal wird allerdings durch ein Diodenarray erzeugt und nicht durch eine Photomesszelle. Des Weiteren wird der Lichtstrahl vor dem Diodenarray durch einen Polychromator in eine Vielzahl von Wellenlängen räumlich aufgetrennt. Dadurch wird es möglich, mehrere Wellenlängen gleichzeitig zu erfassen.

Das Differentialrefraktometer (RI-Detektor) misst die Brechungsindexabweichungen der Analyten gegen das Fließmittel [17]. Es ist ein universeller Detektor der alle Substanzen, die eine Brechungsindexänderung verursachen, detektiert. Allerdings ist dieser nur unter isokratischen Bedingungen einsetzbar, da die Fließmittelzusammensetzung die Brechungsindexänderung beeinflusst.

Der Aufbau eines Differentialrefraktometers setzt sich grundsätzlich aus einer optischen Messzelle und einer Photomesszelle zusammen. Die optische Messzelle unterteilt sich in eine Messzelle und eine Referenzzelle. Bei der Messung wird ein Lichtstrahl zunächst durch die Referenzzelle geleitet, gefolgt von der Messzelle und von einem Spiegel reflektiert. Durch die Reflektion gelangt der Lichtstrahl erneut über die Messzelle durch die Referenzzelle und über eine verstellbare Glasplatte in die Photomesszelle. Die Glasplatte wird so eingestellt, dass bei reinem Fließmittel die maximale Intensität in der Photomesszelle erreicht wird. Durch die Zugabe eines Analyten in die Messzelle verändert sich der Brechungsindex in dieser im Vergleich zur Referenzzelle und es wird nicht mehr die maximale Intensität in der Photomesszelle erreicht. Dieses bewirkt eine Veränderung des Stromflusses in der Photomesszelle. Die Veränderung des Stromflusses wird als elektrisches Signal, wie bei dem UV/VIS-Spektralphotometer, an einen Computer zur Aufzeichnung weitergeleitet.

3. Material und Methoden

Nach der Einführung in die theoretischen Hintergründe dieser Arbeit werden die verwendeten Methoden in diesem Kapitel näher beschrieben. In Abbildung 3.1 sind die durchgeführten Arbeiten in den Bereich Upstream Processing (USP), mit den Prozessschritten der Vorkultur und den Prozessführungsstrategien, sowie in den Bereich Analytik, mit den durchgeführten Probenvorbereitungen und den darauf folgenden Analytikmethoden, gegliedert.

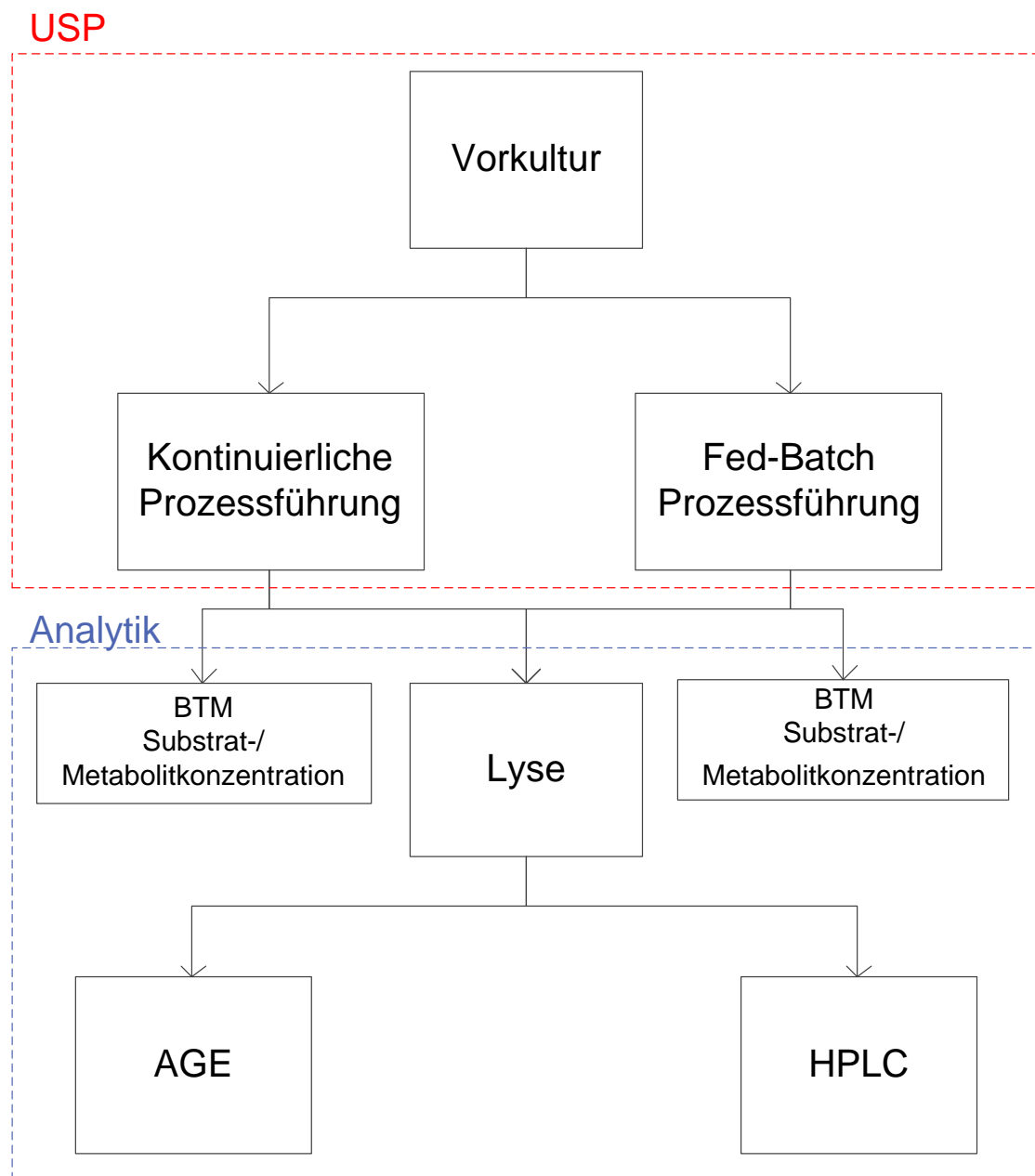


Abbildung 3.1: Übersicht der einzelnen Prozessschritte sowie der prozessbegleitenden Analytik inklusive Probenvorbereitung

3.1. Durchführung der Vorkultur

Am Beginn der Prozesskette steht die Vorkultur. Die Kultivierung wird in einem ein Liter Glasschikanenkolben der Firma *Duran* durchgeführt. Das Kultivierungsvolumen beträgt 150 mL (Vorkulturmedium siehe Tabelle 3.1). Das Medium wird für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Das Kanamycin wird sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren dem abgekühlten Medium unter der Sterilwerkbank zugesetzt, um eine Zerstörung durch zu hohe Temperaturen beim Autoklavieren zu vermeiden.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Vorkulturmediums

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration [gL ⁻¹]
Erbsenpepton	OXOID	VG0100	13,5
Glycerin	Merck	1.04093	6,00
Hefeextrakt	OXOID	LP0021	7,00
Kanamycin	AppliChem	A4789,0010	0,05
K ₂ HPO ₄	Merck	1.05101	1,75
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04871	1,50
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck	1.05882	0,25
NaCl	Merck	1.16224	2,50

Die 150 mL des Vorkulturmediums werden eine Stunde vor dem Start der Vorkultur im Schüttelinkubator (*New Brunswick Scientific*, Innova 4230) auf die Kultivierungstemperatur von 36°C bei 200 rpm temperiert. Die Vorkultur wird im Verhältnis 1:1.000 mit 150 µL Zellsuspension aus einer Research Cell Bank (RCB), die bei -80°C gelagert wird, angeimpft. Die RCB weist eine OD₆₀₀ von ~2,5 auf. Die Animpfung sowie alle weiteren Arbeiten im Prozess die eine aseptische Umgebung benötigen, werden unter der Sterilwerkbank von *Heraeus* (HeraSafe HSP12) durchgeführt. Alle Materialien, Geräte und Medien die steril sein müssen, werden mit den Autoklaven VX-150 oder 2540 EL von *Systec* autoklaviert. Die Vorkultur wird für 15 Stunden inkubiert und hat am Ende der Kultivierung eine OD₆₀₀ von ~16,5.

3.2. Realisierung der kontinuierlichen Prozessführung

3.2.1. Aufbau des Bioreaktorsystems

Die kontinuierliche Prozessführung wird mit einem Bioreaktorsystem Biostat B von *B. Braun Biotech* realisiert. In Abbildung 3.2 ist das Kultivierungssystem im laufenden Prozess abgebildet. Das Kernelement des Aufbaus bildet das Kulturgefäß des Typs Biostat B2 mit der Biostat B Micro-DCU.

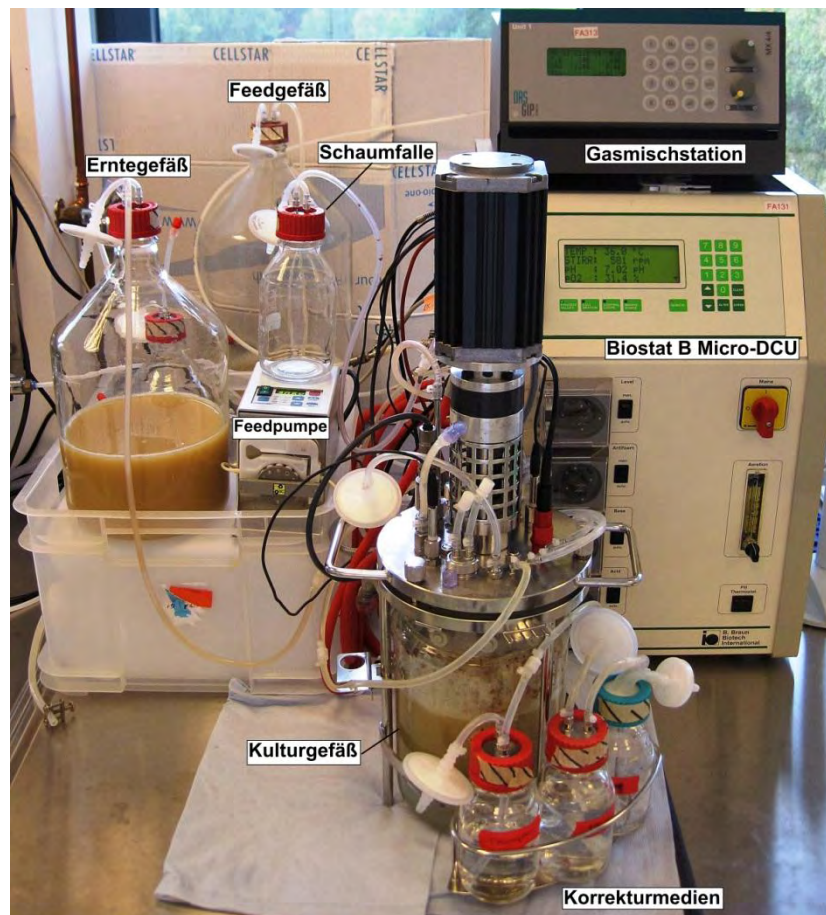


Abbildung 3.2: Aufbau des Kultivierungssystems für die kontinuierliche Prozessführung

Bei dem Kulturgefäß handelt es sich um einen Bioreaktor aus Borosilikatglas mit einem Doppelmantel und einer Edelstahldeckelplatte. An der Edelstahldeckelplatte ist ein Schikanenkorb montiert, der für eine bessere Durchmischung während der Kultivierung sorgt. Das Totalvolumen des Bioreaktors beträgt drei Liter und hat ein Arbeitsvolumen von zwei Liter. In Tabelle 3.2 ist das Equipment für die kontinuierliche Prozessführung aufgelistet.

Tabelle 3.2: Equipment für die kontinuierliche Prozessführung

Equipment	Hersteller	Bezeichnung/ Version
Biostat B Kulturgefäß B2	B. Braun Biotech	884036/9
Biostat B Micro-DCU	B. Braun Biotech	8840326
Feedpumpe	Ismatec	ISM5960
Gasmischstation	DASGIP	MX 4/1
Kryostat	Julabo	F25-HE
Magnetrühr Tisch	Heidolph	MR3000
MFCS/win	Sartorius Stedim Systems	3.0
pH-Sonde	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8S/200
pO ₂ -Sonde	Mettler Toledo	2403004

In Abbildung 3.3 ist das R&I-Fließschema des Versuchsaufbaus nach DIN EN ISO 10628 dargestellt.

Der blaue Systemabschnitt im R&I-Fließschema bildet die Zuluft-, Sauerstoff- und Stickstoffversorgung des Bioreaktors. Die Begasung wird über den Durchfluss über eine Gasmischstation geregelt und angezeigt. Vor der Gasmischstation befindet sich für jedes zugeführte Gas ein Partikelfilter sowie eine Druckanzeige mit einer Regulierungsmöglichkeit. Zwischen Gasmischstation und Bioreaktor wird ein Luftfilter verbaut, der eine Porengröße von 0,2 μm aufweist und die Sterilbarriere darstellt.

Über das grün markierte System wird die Abluft abgeführt. Der Abluftkühler wird von dem Kryostaten gekühlt. Die eingesetzte Schaumfalle soll verhindern, dass der Abluftfilter durch Feuchtigkeit verblockt. Die Abluftstrecke hinter dem Abluftkühler wird mit einer Luer-Lock-Kupplung versehen, um den Schlauch im Falle einer Verstopfung austauschen zu können.

Im rotgefärbten Systemabschnitt wird das eingesetzte Heiz- und Kühlsystem dargestellt. Der Kühlwasservorlauf kommt aus dem eingesetzten Kryostaten, der Kühlwasserrücklauf führt dorthin zurück. Bei Bedarf kann die Temperierflüssigkeit über eine elektrische Heizung, die in der Micro-DCU verbaut ist, erwärmt werden.

Die Schläuche der Korrekturmedien besitzen ebenfalls alle eine Luer-Lock-Kupplung. Dadurch wird gewährleistet, dass bei Verbrauch eines Mediums die Korrekturmedienfflasche ausgetauscht werden kann. Bei dem Schlauch für die Substratzuführung sind zwei Luer-Lock-Kupplungen verbaut, so dass bei zu hoher Abnutzung des Pumpenschlauchs dieser austauschbar ist.

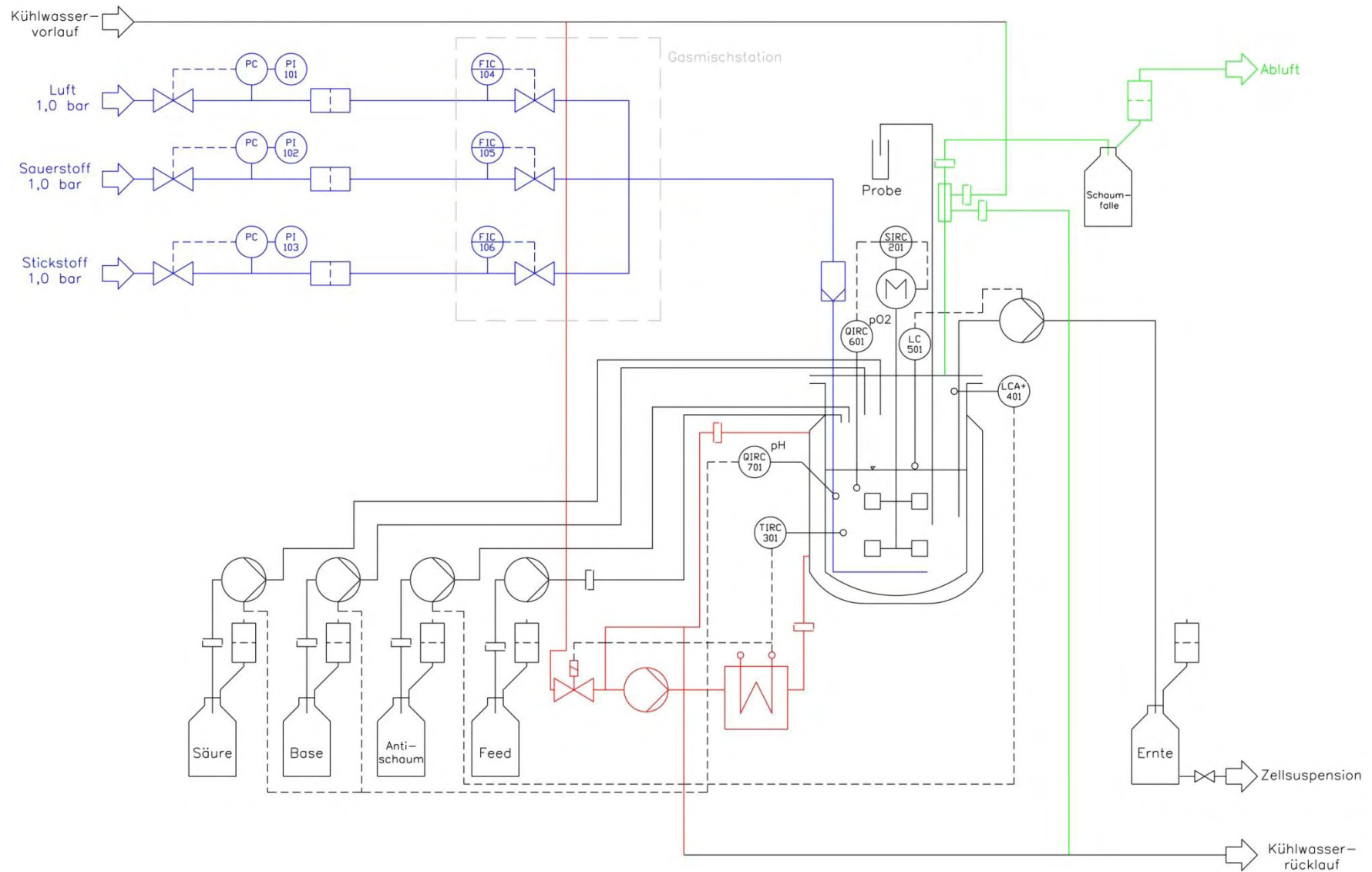


Abbildung 3.3: R&I-Fließschema des Versuchsaufbaus für die kontinuierliche Kultivierung nach DIN EN ISO 10628

3.2.2. Zentrale Steuereinheit und Instrumentierung

Die Micro-DCU ist die zentrale Steuereinheit des Bioreaktorsystems. Sie regelt den relativen Sauerstoffpartialdruck über die Rührerdrehzahl mit Hilfe des Messsignals der eingebauten pO_2 -Elektrode sowie den pH-Wert über Säure-/Laugenzugabe mit Hilfe der pH-Elektrode. Die pH-Regelung setzt ein, sobald eine pH-Abweichung von 0,06 vom eingestellten Sollwert vorliegt. Die Regelung wird mittels Korrekturmedien realisiert (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Verwendete Korrekturmedien

Korrekturmedium	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration
Ammoniak	Merck	1.05422	25%
Desmophen (Antischaummittel)	RheinChem	0009279114	100%
Phosphorsäure	Merck	1.00563	2 M

Neben der Regelung des pO_2 - und pH-Werts durch die Micro-DCU, wird die Temperatur mit Hilfe eines Pt-100 Elements gemessen und ebenfalls durch die Micro-DCU reguliert. Ein Kryostat mit einem Sollwert von 5°C wird als Kühlsystem eingesetzt. Zum Heizen besitzt die Micro-DCU eine interne elektrische Heizung.

Zusätzlich werden eine Antischaumsonde und eine Levelsonde eingesetzt. Die Levelsonde wird für den kontinuierlichen Austrag von Zellsuspension verwendet. Dazu wird diese in der maximalen Einbautiefe von 122 mm fixiert. Eine Einbautiefe von 122 mm bietet sich an, da diese bei jeder Kultivierung leicht wiedereinstellbar ist. Die Antischaumsonde wird ebenfalls mit der maximalen Einbautiefe, hier bei 50 mm, eingesetzt. Sobald länger als 15 Sekunden ein geschlossener Stromkreis vorliegt, setzt die Antischaumregelung ein. Bei der Levelsonde beträgt die Zeit bis zum Einschalten der Erntepumpe fünf Sekunden. Der Füllstand sowie die Schaumhöhe werden über die Micro-DCU geregelt.

3.2.3. Vorbereitungen für die Kultivierung

Als vorbereitende Maßnahmen für die Kultivierung müssen die Feedpumpe sowie die pH- und pO_2 -Elektrode kalibriert werden. Zusätzlich wurde eine Bestimmung des Arbeitsvolumens bei unterschiedlichen Drehzahlen durchgeführt.

Aufgrund der manuellen Steuerung der Feedpumpe ist eine Kalibrierung des Feedschlauchs (Tabelle 3.4) notwendig, um am Anfang des Prozesses die gewünschte Verdünnungsrate einstellen zu können. Die Kalibrierung wird mit dem Feedmedium

Tabelle 3.4: Material für die kontinuierliche Prozessführung

Material	Hersteller	Artikelnummer
0,2 µm Luftfilter	Sartorius Stedim Biotech	17805
Feedschlauch	Ismatec	070539MX11i
Luer-Lock Female	Roth	CT60.1
Luer-Lock Male	Roth	CT64.1
pH-Kalibrierlösungen	Mettler Toledo	51302069 & 51302047
Schläuche am Bioreaktor	Wöhleke	920032-01660

des Prozesses durchgeführt. Dieses befindet sich in einer zehn Liter Glasflasche, die einen Luer-Lock-Anschluss zum Wiederauffüllen besitzt. Das Feedmedium in dem zehn Liter Vorlagengefäß wird unter Einsatz eines Magnetrührers kontinuierlich gerührt, damit sich keine Medienbestandteile absetzen.

Es werden drei verschiedene Pumpraten für die Kalibrierung eingestellt und für einen definierten Zeitraum das Volumen gemessen. Anschließend wird die eingestellte Pumprate über den gemessenen Volumenstrom aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Mit der daraus resultierenden Geradengleichung ist es möglich, die erforderliche Pumprate für den gewünschten Volumenstrom zu ermitteln und einzustellen. Des Weiteren wird aus der Kalibrierung ersichtlich, dass die Pumpe mit dem Feedschlauch ein lineares Verhalten aufweist. Dieses ist für den laufenden Prozess wichtig, da der Feedschlauch mit der Zeit abnutzt. Dies hat zur Folge, dass der Volumenstrom bei gleichbleibender Pumprate geringer wird. Durch das lineare Verhalten kann die Pumprate durch den aufgefangenen sowie ausgemessenen Austrag an Zellsuspension aus dem Bioreaktor über eine lineare Extrapolation nachreguliert werden.

Für die Bestimmung der Verdünnungsrate wird neben dem Volumenstrom aus dem Bioreaktor heraus das aktuelle Arbeitsvolumen des Bioreaktors benötigt. Durch die unterschiedlichen Rührerdrehzahlen, die durch die pO_2 -Regelung bedingt sind, verändert sich das Arbeitsvolumen stetig. Deshalb wird das Arbeitsvolumen bei unterschiedlichen Drehzahlen gemessen (Tabelle 3.5), um eine exakte Berechnung der aktuellen Verdünnungsrate zu ermöglichen.

Tabelle 3.5: Abhängigkeit des Arbeitsvolumens des Bioreaktors von der Drehzahl

Drehzahl	Arbeitsvolumen
400	1405
450	1391
500	1377
550	1367
600	1355
700	1338
800	1323

Im Anschluss erfolgt die Kalibrierung der pH-Elektrode unter Einsatz von Fertiggalibrierlösungen. Diese haben einen pH-Wert von 4 und 7. Die Messung mit pH-Sonden beruht auf spezifischen Spannungswerten zu jedem pH-Wert. Durch die Festlegung von zwei Spannungswerten zu den pH-Werten 4 und 7 bei der Kalibrierung, wird eine Kalibriergerade erhalten. Mit Hilfe dieser Geraden kann jedem gemessenen Spannungswert ein pH-Wert zugeordnet werden. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Werts muss bei der Kalibrierung ein Thermometer eingesetzt werden, damit der Temperatureinfluss kompensiert werden kann.

Im Anschluss an die Kalibrierung der pH-Elektrode wird diese, ebenso eine polarisierte pO_2 -Elektrode, in den Bioreaktor eingebaut. Nach der vollständigen Montage des Bioreaktors wird dieser mit dem Batchmedium autoklaviert.

Nach der Sterilisation des Bioreaktors erfolgt die Kalibrierung der pO_2 -Elektrode. Dazu werden die Prozessparameter aus Tabelle 3.6 an der Micro-DCU eingestellt.

Tabelle 3.6: Prozessparameter für den Kultivierungsstart

Prozessparameter	Sollwert
Begasung	$2,5 \text{ NL}(\text{min})^{-1}$
Rührerdrehzahl	300 rpm
Temperatur	36°C

Für die Kalibrierung des Nullpunktes wird der Bioreaktor mit Stickstoff begast. Nach der Einstellung eines konstanten Werts wird dieser als 0% pO_2 definiert. Anschließend erfolgt die Begasung des Bioreaktors mit Luft und der sich einstellende Endwert wird als 100% Wert festgelegt. Die beschriebene pH- und pO_2 -Kalibrierung werden über feste Routinen der Micro-DCU realisiert.

Am Ende der Vorbereitungen wird ein über Nacht laufender Sterillauf durchgeführt. Der Sterillauf zeigt durch den Verlauf des pH-Werts an, ob eine Kontamination vor-

liegt. Ist dies der Fall, so würde es zu einer Veränderung des pH-Werts durch Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen kommen. Dies liegt daran, dass beim Sterillauf die pH- und die pO_2 -Regelung deaktiviert sind.

Nach bestandem Sterillauf wird die pH- und die Antischaumregelung eingeschaltet. Die Batch-Phase der kontinuierlichen Kultivierung startet durch das Animpfen des Bioreaktors mit 100 mL der Vorkultur. Mit den 1300 mL Batchmedium ergibt sich ein Arbeitsvolumen von 1400 mL. Die pO_2 -Regelung wird aktiviert, sobald der relative Sauerstoffpartialdruck unter 30% sinkt. Nach ungefähr vier Stunden startet die kontinuierliche Phase durch die Zufütterung des Feedmediums. Diese Phase wird eingeleitet durch einen plötzlichen pO_2 -Anstieg. Dieser ist in Abbildung 3.4 mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

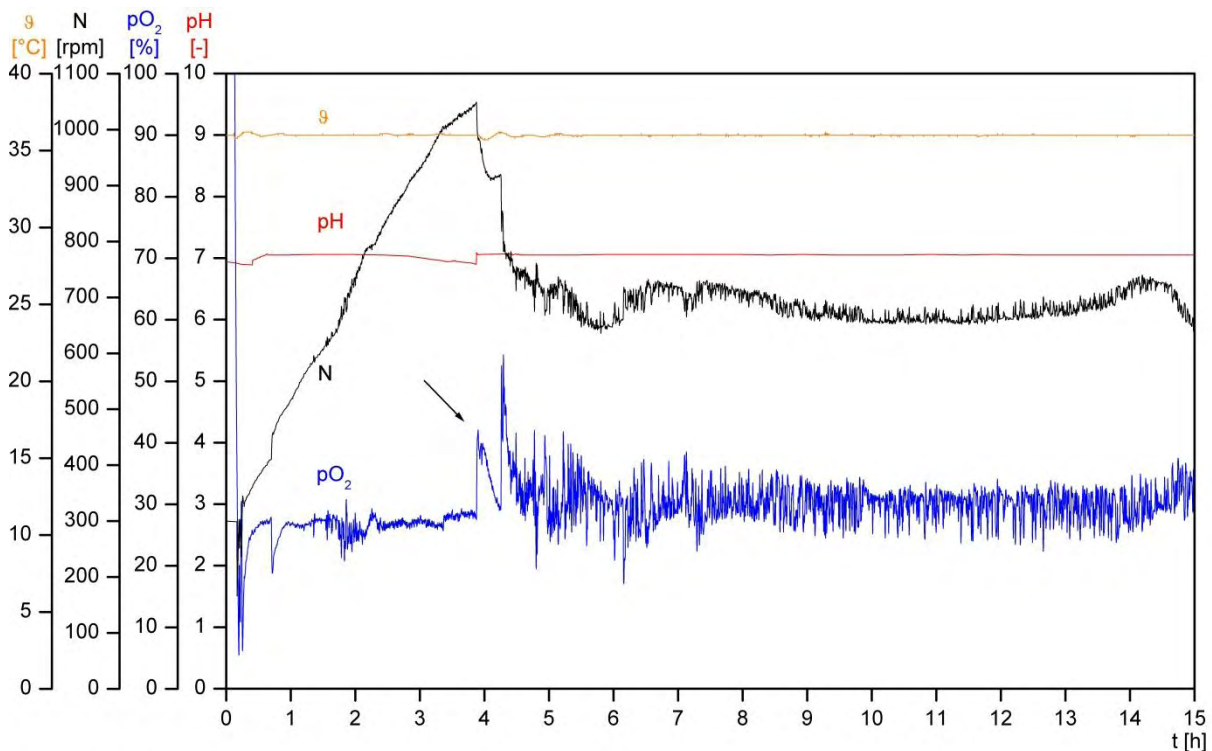


Abbildung 3.4: On-line Messdaten der ersten kontinuierlichen Kultivierung bis zu 15 Stunden Prozesszeit

3.2.4. Eingesetzte Medien

Das bei der kontinuierlichen Kultivierung eingesetzte Feed- und Batchmedium besitzt die gleiche Zusammensetzung. Als primäre Kohlenstoffquelle wird Glycerin in einer Konzentration von $6,0 \text{ gL}^{-1}$ verwendet. Das Antibiotikum Kanamycin wird als Selektionsfaktor, in einer Konzentration von $0,05 \text{ gL}^{-1}$, eingesetzt. Der einzige Unterschied

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Batchkultur- und Feedmediums

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration [gL ⁻¹]
Desmophen*	RheinChem	0009279114	0,10
Erbsenpepton	OXOID	VG0100	13,5
Glycerin	Merck	1.04093	6,00
Hefeextrakt	OXOID	LP0021	5,00
K ₂ HPO ₄	Merck	1.05101	1,75
Kanamycin	AppliChem	A4789,0010	0,05
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04871	1,50
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck	1.05882	0,25
NaCl	Merck	1.16224	2,50

*Nur im Batch-Medium eingesetzt

zwischen dem Feed- und dem Batchmedium besteht darin, dass dem Batchmedium das Antischaummittel Desmophen in einer Konzentration von 0,10 gL⁻¹ zugesetzt wird. Die genaue Zusammensetzung der eingesetzten Medien ist Tabelle 3.7 zu entnehmen.

Die Medien werden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Durch das Autoklavieren fallen Medienbestandteile aus. Diese lassen sich durch langsames Abkühlen, unter kontinuierlichem Rühren, auf einem Magnetrühr Tisch wieder lösen. Das sterilfiltrierte Kanamycin wird nach dem Abkühlen des Mediums hinzugefügt.

3.2.5. Off-line und on-line Messgrößen

Die Aufzeichnung der on-line Messgrößen, aufgelistet in Tabelle 3.8, wird mit Hilfe der Software MFCS/win der Firma *Sartorius Stedim Systems* durchgeführt.

Tabelle 3.8: On-line Messgrößen der kontinuierlichen Prozessführung

Art der Messung	Messgröße	Sollwert
On-line	pH	7,0
	pO ₂	30%
	Rührerdrehzahl (Startwert)	300 rpm
	Temperatur	36°C

In Tabelle 3.9 sind die off-line Messgrößen aufgelistet. Dazu zählt die Biotrockenmasse, die gravimetrisch bestimmt wird. Zusätzlich wird bei jeder Probe die optische Dichte OD₆₀₀ mit Hilfe eines UV/VIS-Spektralphotometers (Ultrospec 3300pro) der Firma *Amersham Biosciences* ermittelt. Die Messungen der Biotrockenmasse und der optischen Dichte werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Es werden für die Bestimmung der Biotrockenmasse, der optischen Dichte sowie der pDNA-, Glyce-

rin- und Acetatkonzentration in regelmäßigen Abständen Probenvolumina von ~4 mL aus dem Bioreaktor gezogen. Der Austrag an Zellsuspension und der Verbrauch der Korrekturmedien werden über eine Volumenbestimmung mittels eines Messzylinders ermittelt. Nach der Kultivierung wird die Bestimmung der Acetat-, Glycerin- und pDNA-Konzentration mittels HPLC durchgeführt.

Tabelle 3.9: Off-line Messgrößen der kontinuierlichen Prozessführung

Art der Messung	Messgröße
Off-line	Acetat- und Glycerinkonzentration
	Austrag an Zellsuspension
	Biotrockenmasse
	Korrekturmedien
	Optische Dichte
	pDNA-Konzentration

3.3. Ausführung der Fed-Batch Prozessführung

3.3.1. Aufbau des Multibioreaktorsystems

Die Fed-Batch Prozesse werden mit einem parallelen Multibioreaktorsystem durchgeführt. Dieses wird von der Firma *DASGIP* entwickelt und setzt sich aus vier Bioreaktoren (Abbildung 3.5) mit einem maximalen Arbeitsvolumen von je eineinhalb Liter zusammen. Das Totalvolumen der verwendeten Kessel beträgt zwei Liter.

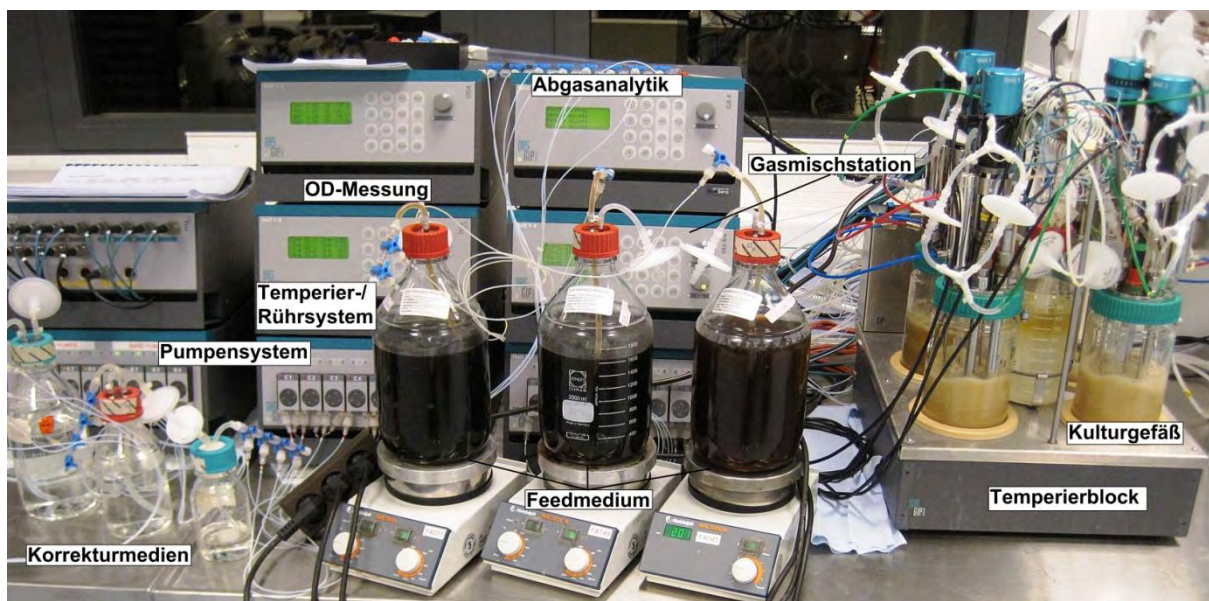


Abbildung 3.5: Aufbau des Multibioreaktorsystems

Tabelle 3.10: Komponenten des Fed-Batch Systems

Komponente	Hersteller	Bezeichnung/ Version
Abgasanalytik	DASGIP	GA4
Begasungssystem	DASGIP	MX 4/4
Bioreaktor	DASGIP	SR1000ODLS
DASGIP Control	DASGIP	4.5
Heiz-/ Rührsystem	DASGIP	TC4(SC4)
Kryostat	Julabo	F25-HE
Magnetrühr Tisch	Heidolph	MR3000 D/ MR3001 K
pH-/ pO ₂ -Regelung	DASGIP	pH4pO4
pH-Sonde	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8S/200
pO ₂ -Sonde	Mettler Toledo	P52201013
Pumpensystem	DASGIP	MP 8
Temperierblock	DASGIP	78201118

Die einzelnen Komponenten des Multibioreaktorsystems sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

Der einzelne Bioreaktor setzt sich aus einem Glaskessel mit einer Edelstahldeckelplatte zusammen. In die Deckelplatte sind die pH-Sonde, pO₂-Sonde, die Begasungseinrichtung sowie eine OD-Sonde verbaut. Die Einbauteile haben neben ihren Hauptfunktionen auch eine wichtige Nebenfunktion. Sie dienen während des Prozesses als Schikanen. Zusätzlich sind ein Probenahmerohr sowie eine Antischaumsonde verbaut. Die Antischaumsonde besitzt eine Einbautiefe von 20 mm.

Der Begasungseinrichtung ist ein 0,2 µm Luftfilter (Tabelle 3.11) vorgeschaltet, so dass die zugeführte Luft steril in den Bioreaktor gelangt. Des Weiteren sind in die Abluftstrecke hinter dem Abluftkühler zwei 0,2 µm Luftfilter verbaut, damit die austretende Luft aus dem Bioreaktor keine Mikroorganismen hinausfordern kann. Zusätzlich dienen die Abluftfilter als Sterilbarriere. Aufgrund der fehlenden Schaumfalle wird mit zwei verbauten 0,2 µm Luftfiltern beabsichtigt, dass bei einer Blockierung einer der beiden Luftfilter der Zweite noch funktionstüchtig ist.

Tabelle 3.11: Material für das Fed-Batch System

Material	Hersteller	Artikelnummer
0,2 µm Luftfilter	Sartorius Stedim Biotech	17805
Luer-Lock Female	Roth	CT60.1
Luer-Lock Male	Roth	CT64.1
pH-Kalibrierlösungen	Mettler Toledo	51302069 & 51302047
Pumpenschläuche	DASGIP	78510245
Schläuche (Medien)	Wöhleke	920016-01660
Schläuche (Zu-/ Abluft)	Wöhleke	920032-01660

Das R&I Fließschema für einen Bioreaktor des Multibioreaktorsystems mit den unterschiedlichen Systemabschnitten ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Der blaue Systemabschnitt bildet die Zuluft-, Sauerstoff- und Stickstoffversorgung der Bioreaktoren. Im grünen Abschnitt ist das Abluftsystem mit den zwei eingesetzten 0,2 µm Luftfiltern dargestellt. Der Temperierkreislauf wird im roten Systemabschnitt des R&I Fließschemas aufgezeigt. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Prozessführung werden im Multibioreaktorsystem die Bioreaktoren nicht über einen Doppelmantel temperiert, sondern mittels Temperierblock. Die Solltemperatur des Kryostaten wird für den Fed-Batch Prozess von 5°C auf 15°C erhöht. Dies wird gemacht, da die Heizleistung des Temperierblocks geringer ist als die Kühlleistung des Kryostaten und es dadurch bei einer Solltemperatur des Kryostaten von 5°C zu Schwingungen der Kultivierungstemperatur kommt.

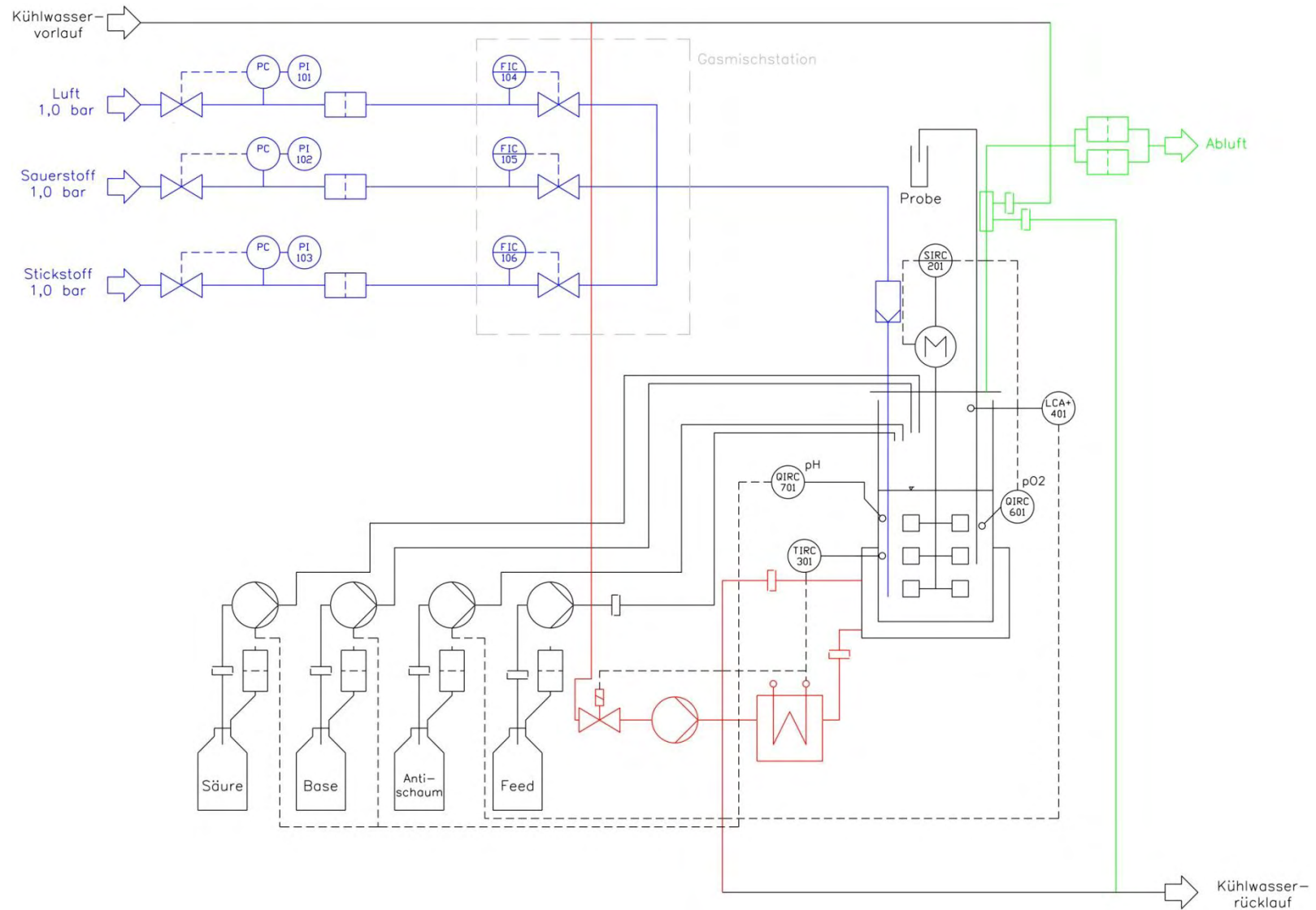


Abbildung 3.6: R&I-Fließschema des Versuchsaufbaus eines Bioreaktors für die Fed-Batch Kultivierung nach DIN EN ISO 10628

3.3.2. Vorbereitende Maßnahmen

Vor der Kultivierung müssen die Schläuche des Pumpensystems gereinigt und sterilisiert werden. Dazu werden die Schläuche mit Hilfe der Prozessleitsoftware DASGIP Control einer cleaning in place (CIP) Prozedur unterzogen. In dieser werden die Schläuche mit 70%igen Ethanol sowie 2 M NaOH gereinigt und sterilisiert. Anschließend werden die Schläuche mit sterilem Reinstwasser gespült (Tabelle 3.12). Im Anschluss findet die Befüllung der Schläuche mit den Korrekturmedien (Tabelle 3.3) und den Feedmedien (Tabelle 3.13) statt.

Tabelle 3.12: Eingesetzte CIP-Lösungen im Fed-Batch Prozess

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration
Ethanol	Merck	1.00986	70%
NaOH	Merck	1.06482	2 M
Reinstwasser	-	-	-

Die Kalibrierung der Feedpumpen erfolgt ebenfalls über die Prozessleitsoftware DASGIP Control. Dazu wird für jede Pumpe das Leergewicht eines 15 mL Zentrifugenröhrchens bestimmt sowie die Dichte der beiden Feedmedien ermittelt. In die Zentrifugenröhrchen wird eine Stunde lang Medium gefördert und anschließend die Gewichte der Zentrifugenröhrchen bestimmt. Durch die Eingabe der Daten in die Software werden die Feedpumpen durch die Software automatisch kalibriert.

Die Kalibrierung der pH- und pO₂-Sonden erfolgt mit Hilfe von DASGIP Control nach dem Prinzip das bei der kontinuierlichen Prozessführung beschrieben ist. Abschließend findet ebenfalls ein Sterillauf über Nacht statt. Während des Sterillaufs wird die Vorkultur, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, inkubiert. Die Volumina sind um den Faktor zwei kleiner. Es wird für jeden Bioreaktor eine eigene Vorkultur inkubiert. Aus diesen wird 50 mL Inokulum zum Animpfen entnommen. Die OD₆₀₀ des Inokulums liegt nach 15 Stunden Inkubation bei ~18.

3.3.3. Eingesetzte Medien

Das Batch-Medium ist identisch zu dem Batch-Medium der kontinuierlichen Kultivierung (Tabelle 3.7). Die Feedmedien unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung im Vergleich mit der kontinuierlichen Kultivierung geringfügig. Die Konzentrationen sind für den Fed-Batch Prozess höher angesetzt und das Phosphatpuffersystem wird herausgelassen.

Es werden drei unterschiedliche zellspezifische Wachstumsraten in den Fed-Batch Prozessen eingestellt. Für die Kultivierungen mit einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ und $0,23 \text{ h}^{-1}$ wird das gleiche Feedmedium eingesetzt. Für die Realisierung der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ wird ein separates Feedmedium eingesetzt. Bei dem separaten Feedmedium sind die Konzentrationen der Medienkomponenten geringer. Ohne die Einstellung der niedrigen Konzentrationen würden zu Beginn der Zufütterungsphase pro Stunde lediglich $\sim 2 \text{ mL}$ in den Bioreaktor gefördert. Dies würde dazu führen, dass zwischen den Medieneinträgen in den Bioreaktor zu große Zeitabstände liegen, in denen die Mikroorganismen das Substrat verbrauchen und kein neues nachgefördert wird. Die Zusammensetzung der Feedmedien ist Tabelle 3.13 zu entnehmen.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Feedmedien der Fed-Batch Prozesse

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration ($\mu=0,10 / 0,23 \text{ h}^{-1}$) [gL^{-1}]	Konzentration ($\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$) [gL^{-1}]
Erbсенpepton	OXOID	VG0100	100	37,5
Glycerin	Merck	1.04093	400	150
Hefeextrakt	OXOID	LP0021	40,0	15,0
Kanamycin	AppliChem	A4789,0010	0,05	0,05
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck	1.05882	1,50	0,56
NaCl	Merck	1.16224	15,0	5,63

Autoklaviert werden die Medien bei 121°C für 20 Minuten. Das Batch-Medium wird vor dem Autoklavieren in den Bioreaktor gefüllt. Wie bei der kontinuierlichen Kultivierung fallen beim Autoklaviervorgang Medienbestandteile aus. Diese können beim Batch-Medium wieder in Lösung gebracht werden. Bei den hochkonzentrierten Feedmedien gelingt dies nicht zu 100%. Deswegen werden die Feedmedien während der Kultivierung gerührt, so dass sich die ausgefallenen Bestandteile gleichmäßig verteilen. Je Bioreaktor beträgt das Anfangsvolumen 600 mL , wovon 50 mL Inokulum aus der Vorkultur stammt.

3.3.4. Prozessparameter und Messgrößen

Für die Fed-Batch Prozesse liegt die Anfangsrührerdrehzahl bei 300 rpm . Zusätzlich ist eine Sauerstoffanreicherung der Begasung, für die Realisierung hoher Wachstumsraten, möglich. Weitere Prozessparameter sind Tabelle 3.14 zu entnehmen.

Tabelle 3.14: Prozessparameter für den Fed-Batch Prozess

Prozessparameter	Sollwert
Begasung	1,5 vvm
pH	7,0
pO ₂	30%
Rührerdrehzahl (Startwert)	300 rpm
Temperatur	36°C

Die on-line und off-line Messgrößen bei den Fed-Batch Prozessen sind in Tabelle 3.15 aufgelistet. Die Prozessleitsoftware DASGIP Control zeichnet die on-line Messgrößen auf. Bei den aufgelisteten off-line Messgrößen wird wie in Kapitel 3.2.5 verfahren.

Tabelle 3.15: On-line und off-line Messgrößen bei den Fed-Batch Prozessen

Art der Messung	Messgröße
On-line	pH
	pO ₂
	Rührerdrehzahl
	Temperatur
Off-line	Acetat- und Glycerinkonzentration
	Biotrockenmasse
	Korrekturmedien
	Optische Dichte
	pDNA-Konzentration

3.4. Messung der optischen Dichte

Mit Hilfe der prozessbegleitenden Messung der optischen Dichte ergibt sich, zusätzlich zu den on-line Messungen, eine weitere Überwachungsmöglichkeit des laufenden Prozesses. Sie stellt eine indirekte Methode zur Bestimmung des Bakterienwachstums dar. Die Messungen werden mit dem Photometer Ultrospec 3300pro von *Amersham Biosciences* durchgeführt. Verwendet werden Küvetten (Art.-Nr. 67.742) von der Firma *Sarstedt* mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Volumen von 1,6 mL.

Die optische Dichte wird über die Extinktion der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Messung muss im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes zwischen 0,1 und 0,6 erfolgen. Bei einer Extinktion über 0,6 muss die zu messende Suspension entsprechend verdünnt werden. Die Verdünnung erfolgt in maximalen Verdünnungsschritten von 1:10. Als Verdünnungslösung wird

physiologische Kochsalzlösung verwendet, mit der ebenfalls der Leerwert bestimmt wird.

Bei jeder Kultivierungsprobe wird eine Doppelbestimmung vorgenommen. Das Probenvolumen beträgt 1 mL. Die optische Dichte der Probe (OD_{Probe}) ergibt sich aus dem Verdünnungsfaktor F multipliziert mit der Differenz der gemessenen optischen Dichte der (verdünnten) Probe (OD_{Mess}) und der optischen Dichte des Leerwerts (OD_{Leer}):

$$OD_{Probe} = F \times (OD_{Mess} - OD_{Leer}) \quad (3.1)$$

Aus den berechneten Werten aus Gleichung (3.1) wird das arithmetische Mittel für die Proben gebildet.

3.5. Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Zellkonzentration wird mit einer einfach zu realisierenden offline Messung der Biotrockenmasse durchgeführt. Dazu wird die Biotrockenmasse gravimetrisch mit einer Feinwaage von *Mettler Toledo* bestimmt (Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Geräte zur Bestimmung der Biotrockenmasse

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Feinwaage	Mettler Toledo	AT261 DeltaRange
Tischzentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Fresco 21
Trockenschrank	Memmert	Modell 500

Als vorbereitende Maßnahme müssen 1,5 mL Reaktionsgefäße für 20 Stunden bei 80°C in einem Trockenschrank getrocknet werden. Dies ist notwendig, damit die Trockenmasse der leeren Reaktionsgefäße ausgewogen werden kann. Wie bei der optischen Dichte wird auch bei der Ermittlung der Biotrockenmasse eine Doppelbestimmung durchgeführt. Bei jeder Probenahme werden zweimal 1 mL Zellsuspension in zwei ausgewogene Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss kommen die Reaktionsgefäße für zehn Minuten in eine Tischzentrifuge bei $g_{max} = 15.900$ und 4°C. Der Überstand wird in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Dieser wird für die Glycerin- und Acetatbestimmung verwendet.

Die abzentrifugierten Zellpellets in den Reaktionsgefäßen werden ebenfalls 20 Stunden bei 80°C bis zur Massenkonstanz getrocknet. Anschließend erfolgt die Bestim-

mung der Trockenmasse durch das Auswiegen der Reaktionsgefäße. Die Zellkonzentration c_X ,

$$c_X = \frac{m_{RG1+P1} - m_{RG1} + m_{RG2+P2} - m_{RG2}}{2 \cdot V_P}, \quad (3.2)$$

wird aus der Differenz der ausgewogenen Pellettrockenmasse mit Reaktionsgefäß (m_{RGx+Px}), der Trockenmasse des leeren Reaktionsgefäßes (m_{RGx}) sowie des eingesetzten Probenvolumens V_P von 1 mL als arithmetisches Mittel berechnet.

3.6. Probenvorbereitung für die HPLC- und AGE-Analytik

Für die Analyse der pDNA ist es notwendig diese zunächst aus den Mikroorganismen zu isolieren. Dazu werden während der Kultivierung bei jeder Probenahme zwei 0,5 mL Pellets durch zehn Minuten zentrifugieren mit $g_{\max} = 15.900$ bei 4°C präpariert. Diese werden bei -20°C gelagert. Für die Isolierung der pDNA wird das QIAprep Spin Miniprepkit (Art.-Nr. 27106) von *Qiagen* eingesetzt. Das Kit basiert auf einer alkalischen Lyse nach dem Prinzip von Birnboim und Doly [4]. Die einzelnen Prozessschritte der Lyse und der anschließenden Probenvorbereitung für die Analytik sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Komponenten des Miniprepkits sind in Tabelle 3.17 aufgelistet.

Tabelle 3.17: Komponenten des *Qiagen* Miniprepkits

Komponente	Verwendungszweck
Aufreinigungssäulen	Bindung der pDNA
EB-Puffer	Elutionspuffer
N3-Puffer	Neutralisationspuffer
P1-Puffer	Resuspensionspuffer
P2-Puffer	Lysepuffer
PE-Puffer	Waschpuffer
RNase-Lösung	Degradation bakterieller RNA

Vor der Lyse der Mikroorganismen wird das Zellpellet mit P1-Puffer (enthält EDTA) so resuspendiert, dass eine OD_{600} von 10 eingestellt wird (Abbildung 3.7). Dadurch sind die Ergebnisse bei den später folgenden AGE-Analysen besser vergleichbar. Vor Verwendung des P1-Puffers wird diesem die RNase-Lösung im Verhältnis von 1:1.000 hinzugefügt. Mit der RNase-Lösung soll eine Degradation der bakteriellen RNA erreicht werden. Die Lyse erfolgt für vier Minuten bei leichtem invertieren des Reaktionsgefäßes. Der Lysepuffer setzt sich unter anderem aus Natriumlaurylsulfat

Durch die Zugabe des Neutralisationspuffers N3 wird die Lyse gestoppt. Dieser enthält Guanidinhydrochlorid, Kaliumacetat und Eisessig. Nach der Zugabe des Neutralisationspuffers wird das Reaktionsgefäß wie bei der Lyse leicht invertiert. Durch das Kaliumacetat und den Eisessig ist die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage vollständig zu renaturieren. Es entsteht Kaliumdodecylsulfat, das mit den denaturierten Proteinen, der denaturierten chromosomalen DNA und den Zellbruchstücken unlösliche Komplexe bildet. Die pDNA bleibt aufgrund der räumlichen Nähe der komplementären DNA-Stränge und ihrer kurzen Sequenz in Lösung, da sie schnell renaturieren kann. Das Guanidinhydrochlorid sorgt dafür, dass die pDNA in Hochsalzbedingungen bei saurem pH-Wert, aufgrund des Eisessigs, vorliegt.

Nach dem Lysestopp werden die ausgefallenen Bestandteile abzentrifugiert und der pDNA enthaltene Überstand wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Untersuchung der pDNA mittels HPLC wird ein Teil des Lysats 1:3 mit Equilibrierungspuffer (Tabelle 3.23) verdünnt. Dadurch wird das Material der monolithischen Säule weniger stark beansprucht.

Aufgrund des sauren Milieus, in dem die pDNA nach der Lyse vorliegt, ist eine Umpufferung für die Agarose-Gelelektrophorese notwendig. Ohne die Umpufferung kann es sonst zu schmierigen Banden bei der Auftrennung kommen. Dazu wird ein Teil des Lysats auf eine Aufreinigungssäule gegeben. Die stationären Phasen der verwendeten Säulen basieren auf Silikagel. Dieses erlaubt eine schnelle Präparation der pDNA durch die Bindung an die Silanolgruppen, aufgrund des vorliegenden pH-Werts, unter Hochsalzbedingungen. Nach der pDNA-Bindung erfolgt ein Waschschritt mit dem PE-Puffer (enthält Ethanol) um unerwünschte Zellbestandteile zu entfernen. Die Säule wird anschließend in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert und der Elutionspuffer auf die Säulenmitte gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation des Elutionspuffers bei Raumtemperatur wird die pDNA von der Säule eluiert.

Für die Analyse der pDNA ist zusätzlich ein pDNA-Standard notwendig. Dazu wird aufgereinigtes Material aus früheren Versuchen verwendet. Durch einen Restriktionsverdau werden die *oc*-Konformation sowie die lineare Konformation der pDNA hergestellt. Die dafür benötigten Restriktionsenzyme sowie die Plasmidsequenz sind bekannt.

Tabelle 3.18: Puffer und Restriktionsenzyme für die Restriktion der pDNA

Puffer/ Restriktionsenzym	Hersteller	Artikelnummer
10x Fast Digest Puffer	Thermo Scientific	B64
Fast Digest BamHI	Thermo Scientific	FD0054
Nb.MVA1269I	Thermo Scientific	ER2051
Reaktionspuffer 0	Thermo Scientific	B05

Für die oc-Konformation wird zu 1 μL Ausgangsmaterial ($\sim 1 \mu\text{g}$ pDNA) 16 μL Reinstwasser sowie 2 μL Reaktionspuffer 0 und 1 μL des Restriktionsenzym Nb.Mva1269I (Tabelle 3.18) hinzugefügt. Die Restriktion findet für eine Stunde bei 37°C in dem Tisch-Thermostat ThermoStat plus der Firma *Eppendorf* statt. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 80°C für fünf Minuten.

Die lineare Konformation wird mit dem Restriktionsenzym Fast Digest BamHI hergestellt. Es wird zu 1 μL Ausgangsmaterial ($\sim 1 \mu\text{g}$ pDNA) 16 μL Reinstwasser sowie 2 μL 10x Fast Digest Puffer und 1 μL des Restriktionsenzym hinzugefügt. Die Restriktion findet für 15 Minuten bei 37°C statt. Anschließend wird das Enzym ebenfalls bei 80°C für fünf Minuten inaktiviert.

3.7. pDNA-Analytik

3.7.1. Konzentrationsbestimmung mittels HPLC

Die Konzentrationsbestimmung der pDNA wird mittels HPLC durchgeführt. Die 1:3 Verdünnungen der Lysate werden dazu in 0,2 mL HPLC-Mikroeinsätze (Tabelle 3.19) für 1,8 mL HPLC-Vials überführt und in diese gestellt. Die 1,8 mL HPLC-Vials werden in den auf 8°C gekühlten Autosampler der HPLC-Anlage platziert.

Tabelle 3.19: Software und Materialien zur Analyse der pDNA

Software/ Material	Hersteller	Artikelnummer/ Version
0,2 mL HPLC-Mikroeinsatz	Chromatographie Service	300406
1,8 mL HPLC-Vial	Chromatographie Service	300101
LabSolutions	Shimadzu	1.24SP1

Für die Analyse wird eine monolithische Säule von *BIA Separations* verwendet. Diese besitzt durch die gebundenen DEAE-Gruppen die Eigenschaft eines Anionenaustauschers. Das Säulenvolumen beträgt 0,32 mL und die Poren weisen eine Größe von 600 bis 750 nm auf. Die einzelnen Komponenten des HPLC-Systems sind Tabelle 3.20 zu entnehmen.

Tabelle 3.20: Komponenten der HPLC-Anlage für die pDNA-Messung

Komponente	Hersteller	Bezeichnung
Autosampler	Shimadzu	SIL-10ADVP
Diodenarray-Detektor	Shimadzu	SPD-1120A
Liquid Chromatograph	Shimadzu	LC-10AT
Säule	BIA Separations	150.0001
Säulenofen	Shimadzu	CTO-10A
Solvent Degasser	ERC	ERC-3315α
System Controller	Shimadzu	SCL-10AVP

Pro Messung werden 40 μL Probe injiziert. Als Equilibrierungspuffer dient ein 200 mM TRIS-Puffer (Tabelle 3.23) mit einem pH-Wert von 8. Der eingesetzte Elutionspuffer ist ein 200 mM TRIS-Puffer mit 1 M NaCl und pH 8. Die Steigung des Gradienten zur Elution der gebunden pDNA beträgt 0,77 Prozent Elutionspuffer pro Minute. In Tabelle 3.21 ist der detaillierte Verlauf der Elutionspufferkonzentration während der Analyse der pDNA mit der HPLC dargestellt.

Tabelle 3.21: Verlauf der Elutionspufferkonzentration

Zeit [min]	Elutionspufferkonzentration [%]
0 - 1	0
1 - 14	60 \rightarrow 70
14 - 17	100
17 - 20	0

Die pDNA eluiert während der Steigerung der Elutionspufferkonzentration von 60 auf 70% von der Säule. Die anschließende Stufe auf 100% dient zum Spülen der Säule. Abschließend wird eine Equilibrierung der Säule durchgeführt. Die Messung einer Probe dauert 20 Minuten und die Flussrate beträgt $1 \text{ mL}(\text{min})^{-1}$. Detektiert wird mit einem Diodenarray-Detektor von *Shimadzu* bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ausgewertet werden die erhaltenen Chromatogramme mit der Software LabSolutions (Tabelle 3.19).

Tabelle 3.22: Methodenüberblick für die HPLC-Analytik der pDNA

Methode	Methodendauer [min]	Injektionsvolumen [μL]	Injektionsmedium
Probenmessung	20	40	Probe
CIP	5	100	CIP-Puffer
Kontrollmessung	20	100	Equilibrierungspuffer

Nach sieben Probenmessungen werden zwei Läufe mit einem CIP-Puffer durchgeführt um die Säule von RNA-Bestandteilen und anderen Verunreinigungen zu säubern (Tabelle 3.22). Nach dem Spülen der Säule wird ein normales Messprogramm mit Equilibrierungspuffer als Probe gefahren. Durch das erhaltene Chromatogramm kann sichergestellt werden, dass keine Rückstände mehr von der Säule eluieren. Alle Methoden werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 3.23: HPLC-Puffer für die pDNA-Analytik

Puffer	Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	Konzentration [M]
CIP-Puffer	NaCl	Merck	1.16224	2
	NaOH	Merck	1.06482	1
Elutionspuffer pH 8	NaCl	Merck	1.16224	1
	TRIS	Merck	1.08382	0,2
Equilibrierungspuffer pH 8	TRIS	Merck	1.08382	0,2

Für die Bestimmung der pDNA-Konzentration wird eine Kalibrierung durchgeführt. Dazu werden 40 μL von drei verschiedenen Konzentrationen des Standards vermessen. Die erhaltenen Peakflächen werden anschließend gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und eine lineare Regression für die Bestimmung der Standardgeraden durchgeführt (Abbildung 3.8).

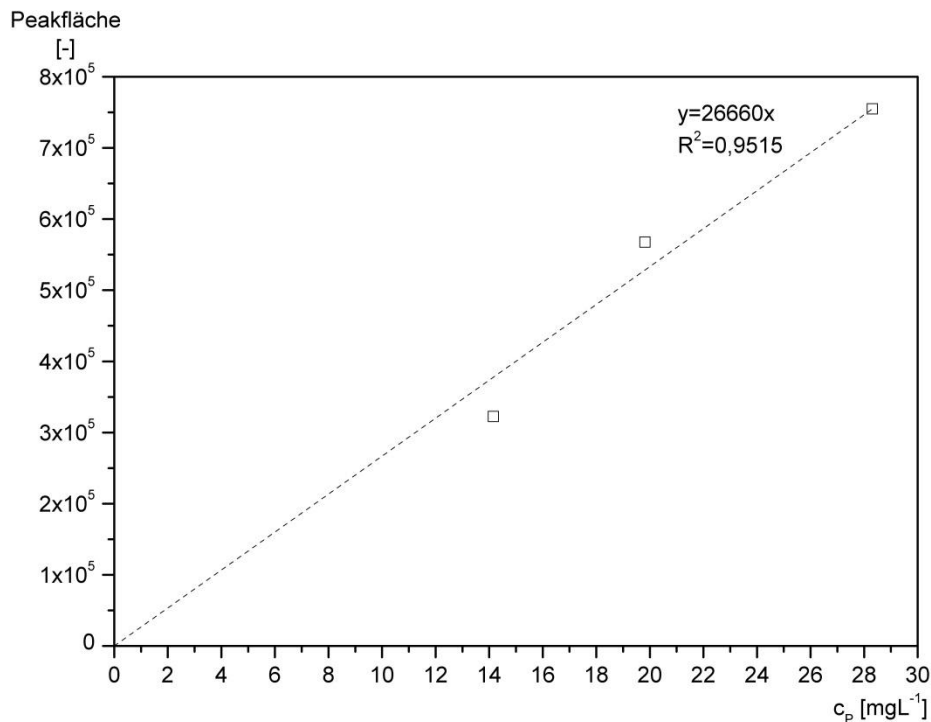


Abbildung 3.8: pDNA-Standardgerade

Die Konzentrationen der verdünnten Proben c_{Analyt} ,

$$c_{Analyt} = \frac{A}{m_{Std}}, \quad (3.3)$$

lassen sich dann aus der Steigung der Kalibriergeraden m_{Std} und der zugehörigen Peakfläche A berechnen. Die Berechnung der tatsächlichen Konzentrationen der Proben erfolgt unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungsschritte. Die pDNA-Konzentration c_P ,

$$c_P = F_{pDNA} \cdot c_{Analyt}, \quad (3.4)$$

ergibt sich damit aus dem Produkt der gemessenen Konzentration und des Gesamtverdünnungsfaktors F_{pDNA} .

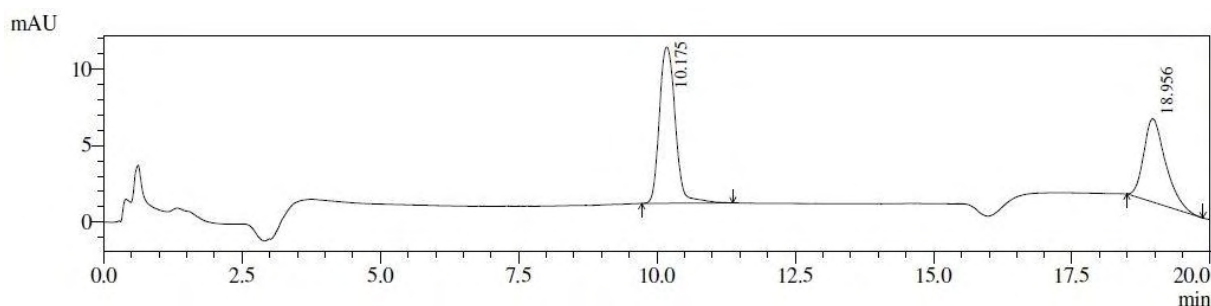


Abbildung 3.9: Chromatogramm des pDNA-Standards

In Abbildung 3.9 ist beispielhaft das Chromatogramm eines gemessenen pDNA-Standards abgebildet. Die Retentionszeit der pDNA beträgt 10,18 Minuten.

3.7.2. Analyse der Konformationsverteilung mittels AGE

Neben dem quantitativen Vergleich soll mittels Agarose-Gelelektrophorese ein Vergleich der Ausbeute bezüglich der erhaltenen pDNA-Konformationen stattfinden. Dazu werden die umgepufferten Proben mit 1%igen ethidiumbromidhaltigen Fertigagarosegelen von *BIO-RAD* aufgetrennt. In Tabelle 3.24 sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 3.24: Geräte zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Elektrophoresekammer	BIO-RAD	Mini-Sub Cell GT
Elektrophoresekammer	BIO-RAD	Mini-Sub Cell GT Mini
Spannungsquelle	BIO-RAD	Power Pac 300

Für die AGE müssen die Proben zunächst mit einem 6x Loading Dye Puffer (Tabelle 3.25) versetzt werden. Dadurch ist die Dichte der Probenlösung höher als die Dichte des TAE-Laufpuffers und die Probenlösung sinkt in die Geltaschen. Ein Probenansatz setzt sich aus 3 μL des 6x Loading Dye sowie $x \mu\text{L}$ der Probe zusammen und wird mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 16 μL aufgefüllt.

Tabelle 3.25: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese

Material	Hersteller	Artikelnummer
20-well Agarosegel	BIO-RAD	161-3044
6x Loading Dye	Thermo Scientific	R0611
8-well Agarosegel	BIO-RAD	161-3016
GeneRuler 1 kb plus	Thermo Scientific	SM1331
TAE-Puffer	Roth	CL86.1

Für die Zuordnung der aufgetrennten Banden wird zusätzlich ein Größenmarker sowie die Standards der ccc-, der oc- und der lin-Konformation aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für eine Stunde bei 90 Volt. Nach der Elektrophorese werden die Gele mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS und der Software Image Lab von *BIO-RAD* ausgewertet.

3.8. Bestimmung der Substrat- und Metabolitkonzentration

Die Ligandenaustauschersäule Hi-Plex H von *Agilent Technologies* wird für die Bestimmung der Glycerin- und Acetatkonzentration in den Fermentationsüberständen eingesetzt. Die weiteren Komponenten des verwendeten HPLC-Systems sind in Tabelle 3.26 aufgelistet.

Tabelle 3.26: HPLC-System für die Bestimmung der Metabolit- und Substratkonzentration

Komponente	Hersteller	Bezeichnung
Autosampler	Merck	AS4000 A
Pumpe	Merck	L6200 A
RI-Detektor	Erma Tokyo	ER-7512
Säulenofen	MISTRAL	Spark Holland
Solvent Degasser	Merck	L-7612
System Controller	Merck	D-6000
UV/ VIS- Detektor	Merck	L-4250

Die Messung erfolgt bei einer Säulentemperatur von 35°C. Als Puffer dient 0,001 M Schwefelsäure und die Flussrate beträgt $0,5 \text{ mL}(\text{min})^{-1}$. Die Filtration der Fermentationsüberstände erfolgt mit Hilfe eines 0,2 μm Spritzenvorsatzfilters (Tabelle 3.27) und wird nach der Filtration direkt in konische 1 mL HPLC-Vials überführt. Für die Mes-

Tabelle 3.27: Material und Puffer für die Bestimmung der Metabolit- und Substratkonzentration

Material/ Puffer	Hersteller	Artikelnummer
0,001 M Schwefelsäure	Merck	1.00713
0,2 μm Spritzenvorsatzfilter	Pall	PN4602
3 mL Luer-Lock Spritze	B. Braun	6706362
Konisches 1 mL HPLC-Vial	Chromatographie Service	301040

sung sind 100 μL Probe notwendig. Davon werden 10 μL für die Messung injiziert. Eine Messung dauert 30 Minuten und wird unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Die Detektion erfolgt mit einem RI-Detektor von *Erma Tokyo*.

Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgt mit dem HPLC System Manager von *Merck*. Für die Bestimmung der Glycerin- und Acetatkonzentration wird vor der Probenmessung jeweils eine Kalibrierung mit drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die gemessenen Peakflächen werden über die dazugehörigen Konzentrationen aufgetragen, so dass sich eine Standardgerade ergibt (Abbildung 3.10).

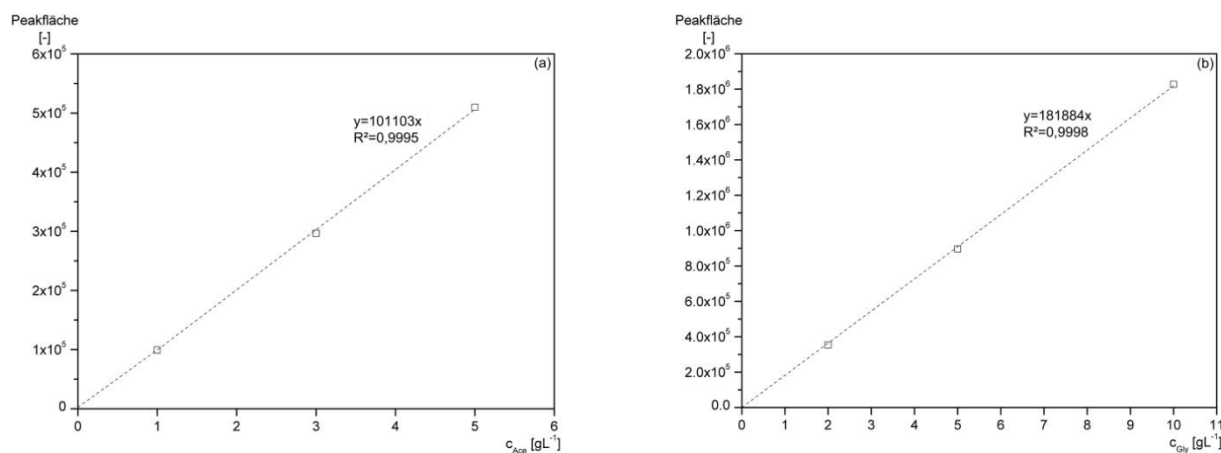


Abbildung 3.10: Acetatstandardgerade (a) und Glycerinstandardgerade (b)

Die Berechnung der Glycerinkonzentration c_{Gly} und der Acetatkonzentration c_{Ace} der Proben erfolgt wie bei der pDNA-Analytik (Gleichung (3.3)) über die Steigung der Kalibriergeraden.

4. Auswertung und Diskussion der durchgeführten Arbeiten

Nachfolgend werden die Ergebnisse der kontinuierlichen Prozesse sowie der parallel durchgeführten Fed-Batch Prozesse ausgewertet und diskutiert.

4.1. Erster kontinuierlicher Prozess

Im ersten kontinuierlichen Prozess wird die Kulturalterung untersucht, indem die zellspezifische Wachstumsrate über mehrere Verdopplungszyklen der Mikroorganismen konstant gehalten wurde. Gleichzeitig wird die Aussage aus der Bachelorarbeit *Untersuchung von Prozessparametern zur Optimierung der pDNA-Ausbeute in kontinuierlicher Kultur am Konzept des Chemostaten* [20] überprüft, dass mit sinkender zellspezifischer Wachstumsrate der Mikroorganismen die pDNA-Ausbeute gesteigert werden kann. Des Weiteren wird, mit Blick auf einen Fed-Batch Prozess, die Plasmidproduktion in den ersten 24 Stunden der Zufütterung analysiert.

Die für den kontinuierlichen Prozess eingestellten Prozessparameter sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Prozessparameter des ersten kontinuierlichen Prozesses

Prozessparameter	Sollwert
Begasung	2,5 NL(min) ⁻¹
pH	7,0
pO ₂	30%
Rührerdrehzahl (Startwert)	300 rpm
Temperatur	36°C

Der erste kontinuierliche Prozess setzt sich aus elf Prozessphasen, aufgelistet in Tabelle 4.2, zusammen. Es wurden zellspezifische Wachstumsraten in einem Bereich von 0,049 h⁻¹ bis 0,230 h⁻¹ eingestellt. Als Ausgangswachstumsrate nach der Batch-Phase wurde eine zellspezifische Wachstumsrate von 0,101 h⁻¹ gewählt. Dadurch ist es möglich den kontinuierlichen Prozess mit den mit Glucose als primäre Kohlenstoffquelle durchgeführten Prozessen aus [20] zu vergleichen. In den Phasen drei, vier und neun wurde die Pumprate, aufgrund des Feedschlauchverschleißes, jeweils einmal nachjustiert. Zusätzlich war eine Sauerstoffzumischung in die Begasung bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von 0,230 h⁻¹ notwendig, um den Sollwert von 30% halten zu können.

Tabelle 4.2: Prozessphasen des ersten kontinuierlichen Prozesses

Phase	Prozesszeit [h]	Proben	μ [h^{-1}]	Bemerkung
1	0 – 3,7	0 – 2	max	Batch-Phase
2	3,7 – 28,6	3 – 8	0,101	Start kontinuierliche Phase
3	28,6 – 79,2	9 – 21	0,120	Blockierung des Feedschlauchs
4	79,2 – 170	22 – 34	0,230	Sauerstoffzumischung
5	170 – 198	35 – 41	0,104	
6	198 – 201	42 – 44	0,068	
7	201 – 218	45 – 48	0,103	
8	218 – 242	49 – 55	0,049	
9	242 – 360	56 – 71	0,103	
10	360 – 384	72 – 78	0,044	
11	384 – 388	79 – 81	0,102	

4.1.1. Analyse des Plasmidkonzentrationsanstiegs zu Beginn der Zufütterung

Für die Produktion von pDNA für pharmazeutische Anwendungen ist der Anstieg der Plasmidkonzentration in den ersten 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Zufütterung von Bedeutung. Dies liegt daran, dass die Fed-Batch Prozessführung oftmals die für die Produktion angewandte Prozessführungsstrategie ist [15]. Für eine Bewertung des Anstiegs wurde die zellspezifische Wachstumsrate für den Zeitraum von 24,9 Stunden konstant gehalten. Zusätzlich wird das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen anhand der Zellkonzentration analysiert.

Tabelle 4.3: Prozessdaten der ersten und zweiten Prozessphase des ersten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	c_X	c_P	$g_{P/X}$	c_{Gly}	c_{Ace}
[-]	[h]	[h^{-1}]	[-]	[gL^{-1}]	[mgL^{-1}]	[mgg^{-1}]	[gL^{-1}]	[gL^{-1}]
0	0,0	max	1,5	0,5	-	-	5,08	0,00
1	2,0	max	7,5	2,5	-	-	3,93	0,11
2	3,7	0,101	18,7	6,7	12,8	1,9	n.n.	0,12
3	5,7	0,101	18,8	8,4	23,1	2,7	n.n.	n.n.
4	7,7	0,101	19,8	9,1	25,7	2,8	n.n.	n.n.
5	8,9	0,101	21,5	8,6	31,9	3,7	n.n.	n.n.
6	24,6	0,101	22,3	7,2	75,5	10,5	n.n.	n.n.
7	26,6	0,101	22,3	7,1	75,8	10,8	n.n.	n.n.
8	28,6	0,101	20,9	6,8	81,2	11,9	n.n.	n.n.

Beim Übergang von der 3,7 Stunden andauernden Batch-Phase in die kontinuierliche Phase liegt eine Plasmidkonzentration von $12,8 \text{ mgL}^{-1}$ vor (Tabelle 4.3). Diese verdoppelt sich innerhalb von vier Stunden nach der Einstellung der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,101 \text{ h}^{-1}$. In der zweiten Phase steigt die Plasmidkonzentration kontinuierlich an. 24,9 Stunden nach dem Ende der Batch-Phase beträgt diese

81,2 mgL⁻¹. Das entspricht mehr als dem sechsfachen des Anfangswerts am Ende der Batch-Phase. Dies ist der gewünschte starke Anstieg der Plasmidkonzentration innerhalb von 24 bis 30 Stunden. Mit diesem Anstieg wäre es möglich Charakterisierungsversuche für die Fed-Batch Prozessführung zu planen mit denen innerhalb von 30 Stunden Prozesszeit eine möglichst hohe Plasmidausbeute erzielt werden kann. Vorher ist es notwendig den Anstieg der Plasmidkonzentration zu reproduzieren, um das Verhalten beurteilen zu können. Die Reproduzierbarkeit wird in einer zweiten kontinuierlichen Kultivierung überprüft (siehe Kapitel 4.2.1).

Die Zellkonzentration steigt nach der Batch-Phase zunächst für vier Stunden von 6,7 gL⁻¹ auf 9,1 gL⁻¹ und sinkt anschließend innerhalb von 21 Stunden um 25,3% auf 6,8 gL⁻¹. Der Verlauf der Zellkonzentration ist vermutlich auf die Gleichgewichtseinstellung nach dem Start der Zufütterung zurückzuführen. Die Zellkonzentration liegt damit höher als die theoretisch berechnete Zellkonzentration von 4,1 gL⁻¹ ($K_S = 0,05 \text{ gL}^{-1}$). Eine mögliche Ursache für die höhere Zellkonzentration könnte sein, dass ein Kompletmedium verwendet wurde und nicht bekannt ist in welchen Mengen die Medienkomponenten, zum Beispiel das Erbsenpepton, Kohlenstoffquellen enthalten.

4.1.2. Untersuchung der Kulturalterung

Nach der Batch-Phase wurde für die Untersuchung der Kulturalterung die eingestellte zellspezifische Wachstumsrate von 0,101 h⁻¹ für einen Zeitraum von 24,9 Stunden konstant gehalten. In dieser Phase steigt die Plasmidkonzentration stark an. Es ist im Verlauf der zweiten Prozessphase noch kein Effekt der Kulturalterung zu erkennen.

Tabelle 4.4: Prozessdaten der dritten Prozessphase des ersten Prozesses

Probe [-]	Kulturzeit [h]	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]	C _X [gL ⁻¹]	C _P [mgL ⁻¹]	g _{P/X} [mgg ⁻¹]	C _{Gly} [gL ⁻¹]	C _{Ace} [gL ⁻¹]
9	30,6	0,120	19,8	6,3	67,0	10,5	n.n.	n.n.
10	32,6	0,120	17,8	6,1	55,6	9,0	n.n.	n.n.
11	48,4	0,120	18,5	6,5	26,4	4,0	n.n.	n.n.
12	50,4	0,120	17,8	7,0	25,4	3,6	n.n.	n.n.
13	52,4	0,120	18,6	6,9	23,4	3,4	n.n.	n.n.
14	54,4	0,120	18,7	6,9	24,9	3,6	n.n.	n.n.
15	56,4	0,120	19,8	7,1	21,9	3,1	n.n.	n.n.
16	72,1	0,120	15,3	5,6	20,7	3,7	n.n.	n.n.
17	73,8	0,120	13,5	4,9	19,8	4,0	n.n.	0,02
18	74,9	0,120	14,1	5,4	13,7	2,5	n.n.	n.n.
19	76,4	0,120	14,9	5,7	16,2	2,9	n.n.	n.n.
20	77,6	0,120	15,4	6,0	17,4	2,9	n.n.	n.n.
21	79,2	0,120	16,6	6,6	16,7	2,5	n.n.	n.n.

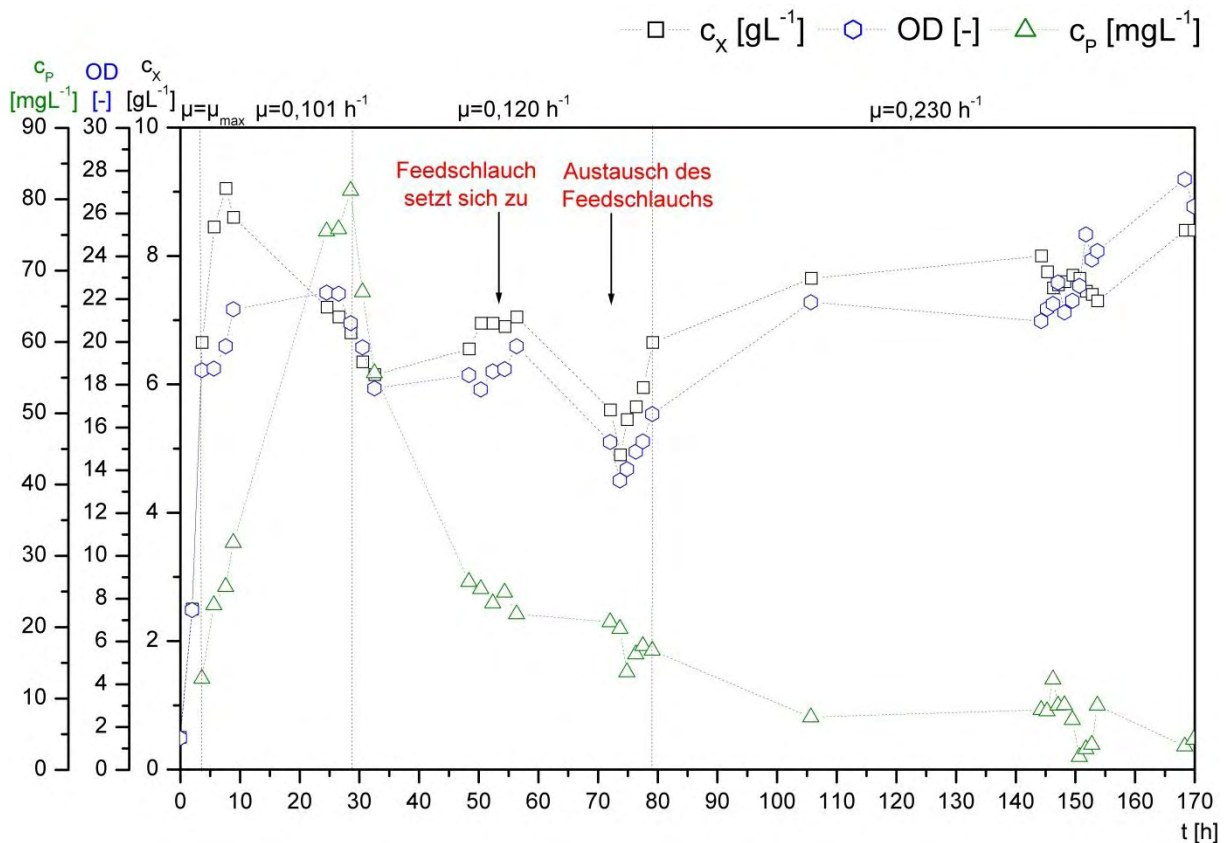


Abbildung 4.1: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD_{600} bis 170 Stunden des ersten kontinuierlichen Prozesses

In der dritten Prozessphase wurde eine geringfügige Veränderung der zellspezifischen Wachstumsrate auf $0,120 \text{ h}^{-1}$ vorgenommen. Dies führt zu einem unmittelbaren und starken Absinken der Plasmidkonzentration (Abbildung 4.1). Innerhalb der ersten vier Stunden nach der Umstellung verringert sich die Plasmidkonzentration um 30,5% von $81,2 \text{ mgL}^{-1}$ auf $55,6 \text{ mgL}^{-1}$ (Tabelle 4.4). Dieses Verhalten, dass bei einer Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate die Plasmidkonzentration abnimmt, wurde bereits bei den durchgeführten Versuchen mit Glucose [20] beobachtet. Eine Ursache für dieses Verhalten der Mikroorganismen könnte sein, dass diese auf eine Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate im laufenden Prozess mit einer Stressreaktion reagieren. Diese könnte durch den beschleunigten Stoffwechsel hervorgerufen werden.

Nach der starken Abnahme der Plasmidkonzentration innerhalb der ersten vier Stunden weist die folgende Abnahme die Form einer Abklingfunktion auf. Dieser Verlauf wird durch die fortgeschrittene Kulturalterung hervorgerufen. Die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate und dem daraus folgenden höheren Stoffwechsel wird zusätzlich einen Einfluss auf die Kulturalterung haben. Ob die Abnahme tatsächlich

durch die Kulturalterung hervorgerufen wurde oder durch die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate, muss in einer weiteren Kultivierung überprüft werden. Für die Überprüfung muss die zellspezifische Wachstumsrate über den gesamten Zeitraum konstant bleiben (siehe Kapitel 4.2.2).

Die Abnahme der Plasmidkonzentration stagniert nach 52 Stunden Prozesszeit kurzzeitig. Anschließend sinkt die Plasmidkonzentration wieder. Eine mögliche Ursache für die weitere Abnahme ist, dass sich nach circa 55 Stunden Prozesslaufzeit der Feedschlauch zugesetzt hat. Dies ist eingetreten, obwohl das Feedmedium permanent gerührt wurde.

Zusätzlich zur Plasmidkonzentration nimmt die Zellkonzentration in der ersten vier Stunden nach der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate auf $0,120 \text{ h}^{-1}$ um 10,3% von $6,8 \text{ gL}^{-1}$ auf $6,1 \text{ gL}^{-1}$ ab. Zum Zeitpunkt der Blockierung des Feedschlauchs beträgt die Zellkonzentration wieder $\sim 7 \text{ gL}^{-1}$. Nach dem theoretisch berechneten Verlauf des X/D-Diagramms (Abbildung 2.2) hätte die Zellkonzentration steigen müssen. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

4.1.3. Einfluss des blockierten Feedschlauchs auf die Kulturalterung

Welchen Einfluss die Blockierung des Feedschlauchs auf die Kulturalterung hatte, wird im Folgenden analysiert. Dazu werden die aufgezeichneten on-line Messgrößen der ersten 130 Stunden des Prozesses sowie die Verläufe der Zell-, Plasmid- und Acetatkonzentration verwendet.

Die Blockierung des Feedschlauchs erfolgte über Nacht, so dass diese nicht über die Messung des Austrags der Zellsuspension bemerkt werden konnte. Vor Verlassen des Labors wurde die Feedvorlage mit frischem Medium aufgefüllt. Wegen dem geringfügigen Ausfällen von unbekanntem Medienbestandteilen nach dem Autoklavieren, wurde die Feedvorlage kontinuierlich gerührt. Trotz des Rührens muss sich in der 16 stündigen Abwesenheit über Nacht der Feedschlauch langsam zugesetzt haben. Diese Vermutung kann mit dem Verlauf der Rührerdrehzahl (N) in Abbildung 4.2 belegt werden. Diese hat ab einer Prozesszeit von circa 55 Stunden über einen Zeitraum von 13 Stunden langsam abgenommen.

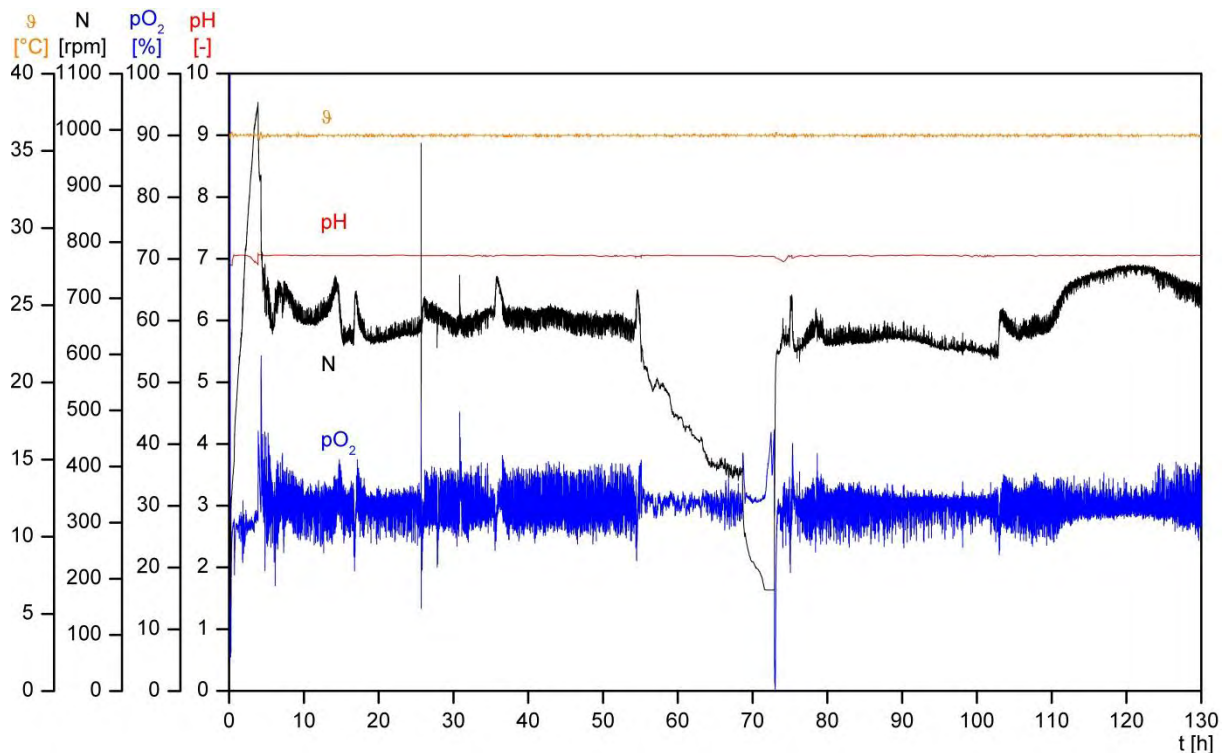


Abbildung 4.2: On-line Messdaten der ersten 130 Stunden Prozesszeit des ersten Prozesses

Für eine Dauer von circa drei Stunden vor dem Austausch des blockierten Feed-schlauchs blieb die Rührerdrehzahl konstant. Zum Zeitpunkt des Bemerkens der Blockierung erschien der Feedschlauch vollständig verstopft. Daher wird davon ausgegangen, dass in dieser Zeit kein Medium in den Bioreaktor gefördert wurde.

Die Abnahme der Rührerdrehzahl spricht für einen geringeren Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen. Ist der Sauerstoffbedarf geringer, liegt ein verringerter aerober Stoffwechsel vor. Dies wurde durch das stetig weniger zugeführte Substrat hervorgerufen. Damit kann das langsame Zusetzen des Feedschlauchs für die weitere Abnahme der Plasmidkonzentration verantwortlich sein. Dies widerspricht der Behauptung, dass mit einer niedrigeren zellspezifischen Wachstumsrate die Plasmidkonzentration gesteigert werden kann. Die Behauptung wurde jedoch für eine stabile zellspezifische Wachstumsrate formuliert und nicht für eine stetig sinkende. Die stetige Abnahme wird wiederum einen Effekt, aufgrund der ständigen Neuanpassung an die Wachstumsbedingungen, auf die Mikroorganismen haben.

Tabelle 4.5: Prozessdaten der dritten Prozessphase nach Austausch des Feedschlauchs des ersten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	c _X	c _P	g _{P/X}	c _{Gly}	c _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[g _L ⁻¹]	[g _L ⁻¹]
16	72,1	0,120	15,3	5,6	20,7	3,7	n.n.	n.n.
17	73,8	0,120	13,5	4,9	19,8	4,0	n.n.	0,02
18	74,9	0,120	14,1	5,4	13,7	2,5	n.n.	n.n.
19	76,4	0,120	14,9	5,7	16,2	2,9	n.n.	n.n.
20	77,6	0,120	15,4	6,0	17,4	2,9	n.n.	n.n.
21	79,2	0,120	16,6	6,6	16,7	2,5	n.n.	n.n.

Beim Austausch des Feedschlauchs beträgt die Plasmidkonzentration 20,7 mgL⁻¹ (Tabelle 4.5). Im Anschluss fällt die Plasmidkonzentration auf 13,7 mgL⁻¹. Dies entspricht annähernd den 12,8 mgL⁻¹ am Ende der Batch-Phase. Dieser Abfall wird unter anderem durch den Wiedereintrag an Substrat in den Bioreaktor verursacht worden sein, da dadurch die zellspezifische Wachstumsrate wieder steigt. Durch die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate von 0,101 h⁻¹ auf 0,120 h⁻¹ konnte bestätigt werden, dass die Plasmidkonzentration bei Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate abnimmt.

Im weiteren Verlauf des Prozesses wurde die zellspezifische Wachstumsrate auf 0,230 h⁻¹ erhöht. Zum Zeitpunkt des Wechsels in die vierte Prozessphase beträgt die Plasmidkonzentration 16,7 mgL⁻¹. Nach der Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate sinkt die Plasmidkonzentration auf 7,4 mgL⁻¹ (Tabelle 4.6). In den ersten 44 Stunden bei einem μ von 0,230 h⁻¹ bleibt diese in einem Bereich von 7 mgL⁻¹ bis 13 mgL⁻¹. Anschließend fällt die Plasmidkonzentration dauerhaft, mit Ausnahme eines Ausreißers nach 154 Stunden Prozesszeit, unter 5 mgL⁻¹.

Die weitere Abnahme der Plasmidkonzentration deutet darauf hin, dass die Kulturalterung soweit fortgeschritten ist, dass die Mikroorganismen nur noch eine geringe Plasmidproduktivität haben. Die Kulturalterung wird zusätzlich durch die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate beschleunigt worden sein. Des Weiteren wurden die Mikroorganismen durch den blockierten Feedschlauch einer Stresssituation ausgesetzt die mit dazu geführt haben wird, dass die Plasmidkonzentration nach 151 Stunden Prozesslaufzeit so niedrig ist, dass diese nur noch im Schwankungsbereich der Messmethode (4 mgL⁻¹) liegt.

Tabelle 4.6: Prozessdaten der vierten Prozessphase des ersten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]
22	106	0,230	21,9	7,7	7,4	1,0
23	144	0,230	21,0	8,0	8,4	1,1
24	145	0,230	21,6	7,8	8,2	1,1
25	146	0,230	21,8	7,5	12,7	1,7
26	147	0,230	22,8	7,6	9,1	1,2
27	148	0,230	21,4	7,6	9,1	1,2
28	150	0,230	21,9	7,7	7,0	0,9
29	151	0,230	22,6	7,6	1,8	0,2
30	152	0,230	25,0	7,4	2,9	0,4
31	153	0,230	23,9	7,4	3,5	0,5
32	154	0,230	24,3	7,3	9,0	1,2
33	168	0,230	27,6	8,4	3,3	0,4
34	170	0,230	26,3	8,4	4,3	0,5
35	171	0,104	25,3	8,3	2,4	0,3

Die Zellkonzentration liegt mit 5,6 gL⁻¹ nach dem Austausch des Feedschlauchs 1,5 gL⁻¹ niedriger als zu Beginn der Blockierung. Aufgrund der geringeren Zellkonzentration nach dem Austausch des Feedschlauchs als am Ende der Batch-Phase liegt das Substrat nach Wiederaufführung kurzzeitig im Überschuss vor. Dies hat zur Folge, dass die Mikroorganismen nicht mit der eingestellten zellspezifischen Wachstumsrate wachsen, sondern mit einer höheren. Ein Indiz dafür, dass das Substrat im Überschuss vorlag, ist der Anstieg der Acetatkonzentration auf 0,02 gL⁻¹. Acetat wird gebildet, wenn die Kapazität des aeroben Stoffwechsels überschritten wird und die Mikroorganismen die primäre Kohlenstoffquelle zusätzlich über den anaeroben Stoffwechsel abbauen [29]. Eine eindeutige Aussage bei einer solch niedrigen Acetatkonzentration ist jedoch nicht möglich, da ein so niedriger Standard für die Kalibriergerade nicht eingesetzt wurde.

Zum Zeitpunkt des Wechsels in die vierte Prozessphase ist die Zellkonzentration auf einen Wert von 6,6 gL⁻¹ angestiegen (Tabelle 4.5). Dies entspricht annähernd dem Wert nach der Batch-Phase. Durch die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate steigt die Zellkonzentration auf 8,4 gL⁻¹ (Tabelle 4.6). Dies entspricht den Erwartungen aufgrund des in Abbildung 2.2 aufgestellten Modells.

4.1.4. Steigerung der Plasmidkonzentration durch Verringerung von μ

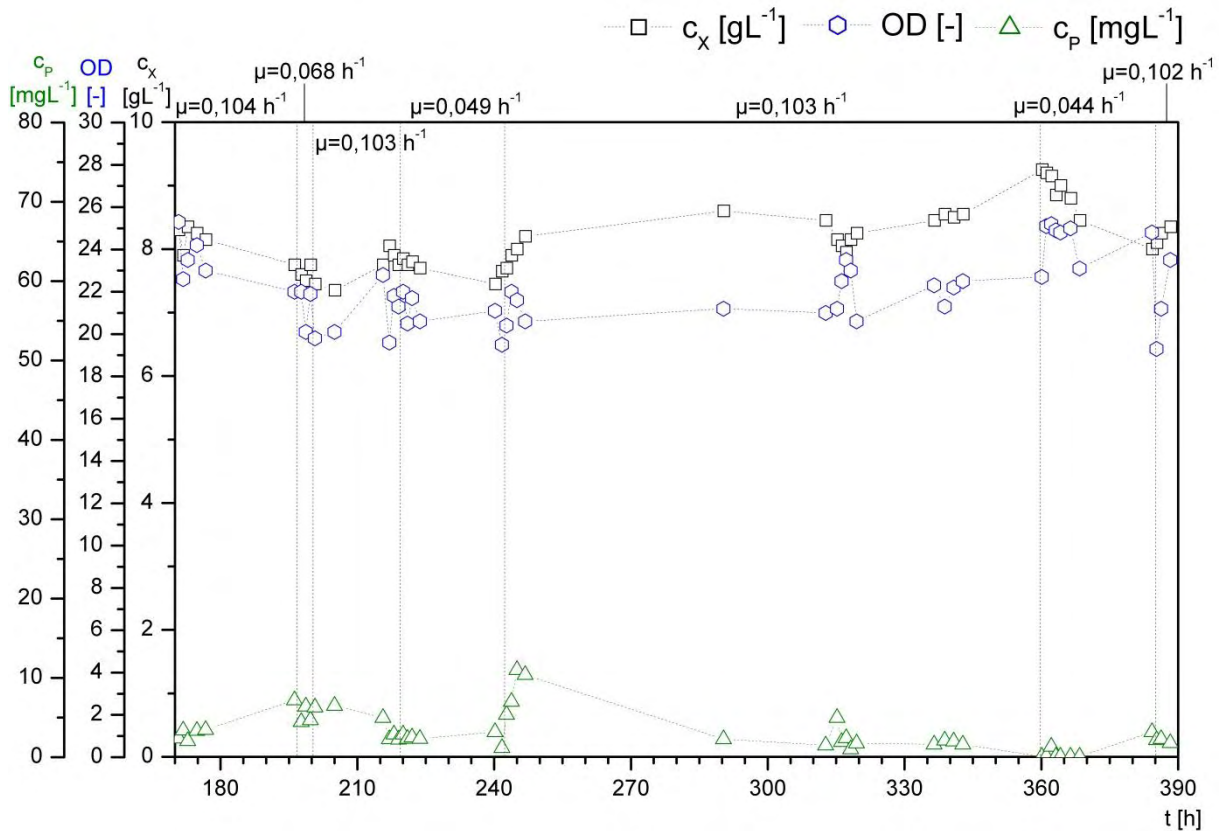


Abbildung 4.3: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD_{600} ab 170 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses

In vorangegangenen Versuchen [20] wurde beobachtet, dass mit einer Reduktion der zellspezifischen Wachstumsrate eine Steigerung der Plasmidkonzentration erzielt werden konnte. Um dies zu überprüfen, wurde die zellspezifische Wachstumsrate nach der vierten Prozessphase von $0,230 \text{ h}^{-1}$ auf $0,104 \text{ h}^{-1}$ reduziert (Abbildung 4.3). Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Plasmidkonzentration $2,4 \text{ mgL}^{-1}$.

Die Veränderungen der Plasmidkonzentration innerhalb der ersten 63 Stunden nach der Reduzierung der zellspezifischen Wachstumsrate liegen im Schwankungsbereich der Messmethode (4 mgL^{-1}) und werden daher nicht diskutiert. Durch die Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate ist erst 63 Stunden nach dem Wechsel von der höheren zellspezifischen Wachstumsrate von $0,230 \text{ h}^{-1}$ auf eine niedrigere ein nennenswerter Anstieg der Plasmidkonzentration auszumachen. Dieser liegt am Anfang der neunten Prozessphase. Innerhalb von drei Stunden steigt die Plasmidkonzentration von $1,2 \text{ mgL}^{-1}$ auf $11,0 \text{ mgL}^{-1}$ an (Tabelle 4.7). Anschließend fällt diese jedoch wieder unter 4 mgL^{-1} .

Bei dem kurzzeitigen Anstieg der Plasmidkonzentration wird beobachtet, dass mit einer Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate beim Wechsel von der achten in die neunte Prozessphase eine Erhöhung der Plasmidkonzentration einhergeht. Dies widerspricht der untersuchten Behauptung. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Mikroorganismen sich nach 68 Stunden bei einer niedrigeren Wachstumsrate von der Kulturalterung und der Stresssituation geringfügig erholt haben. Ob die Plasmidkonzentration durch eine Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate erhöht werden kann, konnte aufgrund der fortgeschrittenen Kulturalterung nicht eindeutig geklärt werden. Daher muss dieser Versuchsabschnitt in einer weiteren Kultivierung erneut untersucht werden, bevor eine Aussage formuliert werden kann.

Tabelle 4.7: Prozessdaten vom Ende der achten und anteilig der neunten Prozessphase

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]
55	242	0,049	19,5	7,6	1,2	0,2
56	243	0,103	20,4	7,7	5,4	0,7
57	244	0,103	22,0	7,9	7,0	0,9
58	245	0,103	21,6	8,0	11,0	1,4
59	247	0,103	20,6	8,2	10,4	1,3
60	290	0,103	21,2	8,6	2,3	0,3
61	313	0,103	21,0	8,4	1,5	0,2
62	315	0,103	21,2	8,2	5,0	0,6
63	316	0,103	22,5	8,1	1,9	0,2
64	317	0,103	23,5	8,0	2,4	0,3
65	318	0,103	23,0	8,1	1,0	0,1

4.1.5. Vergleich der Kultivierungen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

In Kapitel 2.3 wird beschrieben, dass mit dem Einsatz von Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle die Mikroorganismen mehr ATP generieren als mit Glucose. Dadurch sollten die Mikroorganismen mehr energieintensive Produkte synthetisieren können. Um dies zu untersuchen, wurde nach der Batch-Phase eine zellspezifische Wachstumsrate von 0,101 h⁻¹ gewählt. Diese wurde auch bei durchgeführten Versuchen mit Glucose als primäre Kohlenstoffquelle und der gleichen Stamm-Plasmid-Kombination nach der Batch-Phase eingestellt [20]. Für den Vergleich der beiden Kohlenstoffquellen wird der zellspezifische Plasmidgehalt und die Plasmidkonzentration verwendet. Der zellspezifische Plasmidgehalt gibt Aufschluss über die individuelle Produktionsleistung der Mikroorganismen.

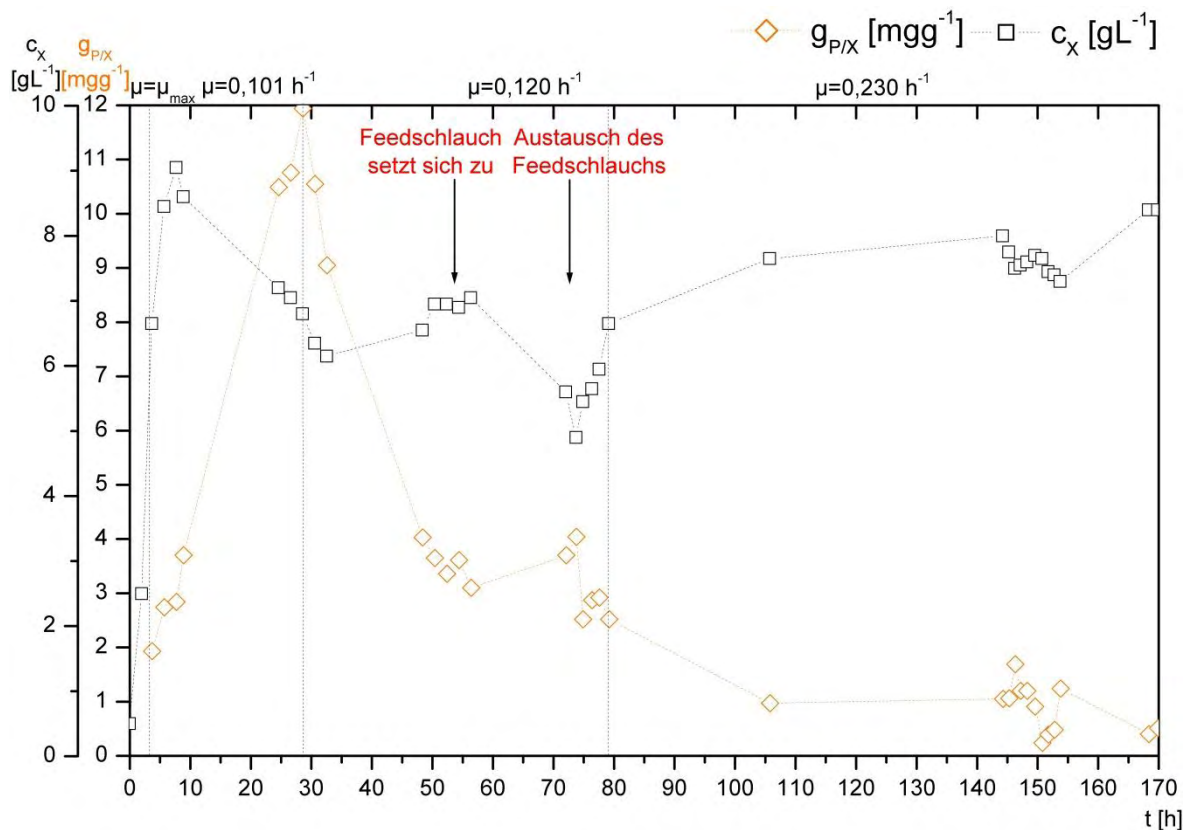


Abbildung 4.4: Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts sowie der Zellkonzentration bis 170 Stunden des ersten Prozesses

Der zellspezifische Plasmidgehalt steigt, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, nach der Batch-Phase innerhalb von 24,9 Stunden auf einen Wert von $11,9 \text{ mgg}^{-1}$ an. Neben diesem Anstieg, ist der Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts auch im weiteren Verlauf der Kultivierung wie der von der Plasmidkonzentration. Dies liegt daran, dass in einer Prozessphase ein Fließgleichgewicht vorliegt und dadurch die Zellkonzentration konstant ist. Dies hat zur Folge, dass die Plasmidkonzentration die einzige Variable bei der Berechnung des zellspezifischen Plasmidgehalts ist.

Der maximal erreichte zellspezifische Plasmidgehalt mit Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle beträgt $11,9 \text{ mgg}^{-1}$ und wird nach 28,6 Stunden Prozesszeit erreicht (Tabelle 4.8). Der zellspezifische Plasmidgehalt liegt damit $3,5 \text{ mgg}^{-1}$ höher als der maximal erreichte zellspezifische Plasmidgehalt mit Glucose [20], bei gleicher zellspezifischer Wachstumsrate und einer 2,3 Stunden längeren Prozessdauer. Zusätzlich beträgt die eingesetzte Menge der Kohlenstoffquelle 30% der eingesetzten Menge bei den Versuchen mit Glucose. Dadurch wird der in Kapitel 2.3 beschriebene Grundgedanke, dass die Plasmidausbeute durch den Einsatz von Glycerin aufgrund einer höheren ATP-Ausbeute gesteigert werden kann, für diesen Versuch bestätigt.

Tabelle 4.8: Maximale zellspezifische Plasmidgehälder der kontinuierlichen Prozesse mit Glycerin und Glucose als primäre Kohlenstoffquelle

primäre Kohlenstoffquelle		Prozesszeit	μ	C_X	C_P	$g_{P/X}$
[gL ⁻¹]		[h]	[h ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]
Glycerin	6,0	28,6	0,101	6,8	81,2	11,9
Glucose [20]	20,0	26,3	0,108	9,7	81,7	8,4

Aufgrund der geringeren Zellkonzentration beim Einsatz von Glycerin und der geringeren Menge an Kohlenstoffquelle wurde davon ausgegangen, dass die Plasmidkonzentration nennenswert niedriger ausfallen würde als bei den durchgeführten Experimenten [20] mit Glucose. Die maximal erreichte Plasmidkonzentration mit Glucose liegt bei 81,7 mgL⁻¹ und damit nur geringfügig höher als die 81,2 mgL⁻¹ beim Einsatz von Glycerin. Dies bedeutet, dass der höhere zellspezifische Plasmidgehalt die um 2,9 gL⁻¹ geringere Zellkonzentration ausgleicht.

4.1.6. Analyse der pDNA-Konformationsverteilung

Der ccc-Anteil der pDNA in pharmazeutischen Anwendungen muss mindestens 95% betragen [30]. Daher ist die Konformationsverteilung, neben der erzielten Plasmidkonzentration, von entscheidender Bedeutung. Die Analyse der Verteilung der Plasmidkonformationen wurde für ausgewählte Proben mit der Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Durchführung der AGE ist in Kapitel 3.7.2 detailliert beschrieben.

Abbildung 4.5 zeigt die Auftrennung der aufgetragenen Proben. Die Kultivierungsproben aus den unterschiedlichen Prozessphasen wurden in den Spuren 3 bis 19 auf

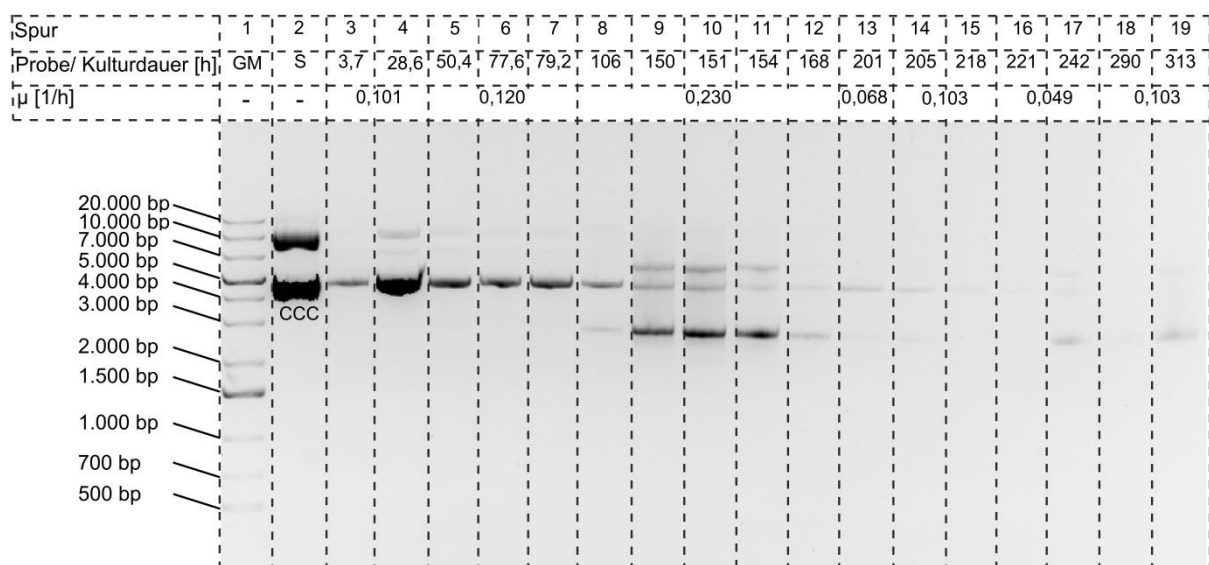


Abbildung 4.5: 1%iges Agarosegel mit ausgewählten Proben aus dem ersten kontinuierlichen Prozess (GM: Größenmarker; S: Standard)

das Agarosegel aufgetragen. Wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, sind die Proben auf eine OD_{600} von 10 normiert. In der ersten Spur des Agarosegels wurde ein Größenmarker und in der zweiten Spur ein ccc-Konformationsstandard aufgetragen. Neben der intensiven ccc-Bande ist eine weitere intensive Bande zu erkennen. Die ccc-Konformation ist die räumlich kompakteste Plasmidkonformation und läuft im Gel am weitesten. Dadurch kann die untere Bande als ccc-Konformation identifiziert werden. Aufgrund der Intensität der oberen Bande wird eine grobe Behandlung des Standards und der daraus resultierenden Zerstörung der ccc-Konformation für unwahrscheinlich gehalten. Dies kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die obere Bande läuft bei ~ 8 kbp und damit doppelt so kurz wie die ccc-Konformation. Eine Vermutung ist, dass es sich um ein ccc-Dimer handelt. Dies wird in Kapitel 4.2.6 näher untersucht.

Der Verlauf der Bandenintensität der Kultivierungsproben deckt sich mit den quantitativen Ergebnissen der HPLC-Analysen. Die starke Zunahme der Plasmidkonzentration während der zweiten Prozessphase, mit einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,101 \text{ h}^{-1}$ (Spur 3 bis 4), wird durch die Intensitätszunahme der ccc-Bande deutlich. Zusätzlich zu der dominanten ccc-Bande, die 94% der Gesamtplasmid-DNA ausmacht (Tabelle 4.9), werden in der vierten Spur zwei weitere Banden sichtbar. Die obere Bande bei ~ 10 kbp ist der oc-Konformation des Plasmids zuzuordnen und die zweite Bande der linearen Konformation (siehe auch Abbildung 4.6). Damit liegt der erreichte ccc-Anteil ohne Aufreinigung bereits fast bei den geforderten 95%.

Tabelle 4.9: Prozentuale Konformationsverteilung der Plasmide des ersten Prozesses

Kulturdauer [h]	3,7	28,6	50,4	77,6	79,2	106	150	151	154
ccc [%]	93	94	92	96	97	81	18	13	6
oc [%]	7	5	5	2	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
lin [%]	n.n.	1	3	2	1	n.n.	18	17	12
css [%]	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	19	64	70	82

Nach der Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate auf $0,120 \text{ h}^{-1}$ nimmt die Intensität der pDNA-Banden ab (Spur 5). Der ccc-Anteil sinkt auf 92%. Durch die geringere Plasmidkonzentration in der Probenlösung ist fast nur noch die ccc-Konformation im Agarosegel sichtbar. Der Rückgang der Bandenintensität ab der fünften Spur deckt sich mit dem beobachteten Absinken der Plasmidkonzentration in Abbildung 4.1.

Ab einer Kulturdauer von 168 Stunden (Spur 12) ist die Bandenintensität sehr gering. Daher wurde die qualitative Auswertung hier nicht mehr fortgeführt. Die Plasmidkonzentrationen liegen ab diesem Zeitpunkt unter 5 mgL^{-1} (HPLC-Analytik). Aufgrund der geringen Plasmidkonzentration und den Verdünnungsschritten in der alkalischen Lyse sowie der Umpufferung, liegt die aufgetragene Plasmidmenge an bzw. unter der Detektionsgrenze von Ethidiumbromid. Diese beträgt circa 20 ng.

Ab Spur 8 treten Banden unterhalb der ccc-Konformation auf. Dies ist ungewöhnlich, da die ccc-Konformation die räumlich kompakteste Konformation eines bakteriellen Plasmids ist. Es wird vermutet, dass es sich um circular single stranded (css) DNA handelt. Die css-DNA hat in der Kultivierungsprobe bei einer Kulturdauer von 106 Stunden einen Anteil von 19%. Bei einer Kulturdauer von 154 Stunden beträgt dieser 70%. Die css-DNA wird gewöhnlich nur von Viren und Phagen synthetisiert. Eine Kontamination mit diesen wird jedoch ausgeschlossen. Die Banden sind beim Wechsel der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,120 \text{ h}^{-1}$ auf $0,230 \text{ h}^{-1}$ erstmalig sichtbar.

Bei der alkalischen Lyse sind Probleme mit dem Neutralisationspuffer aufgetreten, wodurch das Zellmaterial 30 Stunden bei 6°C im P1-Puffer gelagert werden musste. Dieser enthält EDTA, welches die Eigenschaft hat, selbst in geringen Konzentrationen die Zellwände von gram-negativen Bakterien zu perforieren. Das EDTA entzieht der Zellwand die Kalziumionen und bildet mit diesen Chelatkomplexe [19]. Die Kalziumionen sind jedoch essenziell für die Stabilität der Lipopolysaccharidschicht der Zellwand. Bei den vorherigen Kultivierungsproben ist keine css-DNA sichtbar, obwohl diese gleich behandelt wurden. Daher wird vermutet, dass aufgrund der dünneren Zellwand bei der erhöhten zellspezifischen Wachstumsrate die durchgeführte alkalische Lyse zu stark war. Der Effekt einer dünneren Zellwand wurde für eine zellspezifische Wachstumsrate von $0,8 \text{ h}^{-1}$ nachgewiesen [8]. Diese liegt höher als die im Prozess eingestellte zellspezifische Wachstumsrate. Da die css-DNA beim Wechsel auf das höhere μ auftritt, kann die Kulturalterung und die Stresssituation durch den verstopften Feedschlauch den Effekt der dünneren Zellwand verstärkt haben. Ob die alkalische Lyse wegen der Lagerung von 30 Stunden im Resuspensionspuffer zu stark war und die Zellwandstärke mit als Ursache genannt werden kann, wird im folgenden Kapitel überprüft.

4.1.7. Nachweis der circular single stranded DNA

Bei der Analyse der pDNA-Konformationsverteilung wurden Banden beobachtet, die im Agarosegel weitergelaufen sind als die ccc-Banden. Vermutet wird, dass es sich bei diesen Banden um css-DNA handelt. Es ist möglich, dass aufgrund einer zu starken alkalischen Lyse die DNA-Doppelstränge der Plasmide dauerhaft denaturiert vorliegen [21]. Eine mögliche Ursache für eine zu stark durchgeführte alkalische Lyse könnten, wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, aufgetretene Probleme mit dem Neutralisationspuffer gewesen sein. Dadurch befand sich das Zellmaterial 30 Stunden im Resuspensionspuffer P1. Der P1-Puffer enthält EDTA, welches eine lytische Wirkung auf die Zellwände gram-negativer Bakterien hat. Die Proben wurden 30 Stunden bei 6°C gelagert und für die Weiterverarbeitung mit Hilfe eines Vortexers nach der Lagerung durchmischt. Es ist möglich, dass die geschwächten Zellwände, wenn diese nicht schon in den 30 Stunden lysiert waren, durch die mechanischen Kräfte zerreißen. Durch diese unbeabsichtigte Behandlung mit EDTA könnte die alkalische Lyse direkt auf die pDNA eingewirkt und so die circular single stranded DNA generiert haben.

Um dies zu überprüfen, gilt es zu zeigen, dass es sich tatsächlich um css-DNA handelt und ob das Auftreten reproduziert werden kann. Zusätzlich wird untersucht, ob die Denaturierung der DNA-Doppelstränge permanent ist.

Für den Nachweis, dass die css-DNA grundsätzlich durch eine zu starke alkalische Lyse generiert werden kann, wurde die alkalische Lyse direkt mit aufgereinigter pDNA durchgeführt. Dadurch wirkt die Lyse stärker auf die pDNA, da keine Zellwand zum Schutz der pDNA vorhanden ist.

Der Nachweis wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Zunächst wurden in den Spuren 4 und 5 (Abbildung 4.6) zwei verschiedene unbehandelte Kultivierungsproben aufgetragen. Diese waren nach Abbildung 4.5 frei von css-DNA. Von diesen beiden Proben wurde jeweils 300 µL Material abgenommen. Diese wurden der direkten alkalischen Lyse ausgesetzt, umgepuffert und in den Spuren 7 und 8 aufgetragen. In der sechsten Spur wurde eine unbehandelte Probe aufgetragen, die den gleichen Verdünnungsschritten unterzogen wurde wie die behandelten Proben. Mit dieser Probe soll die Bandenintensität der durch die alkalische Lyse und der Umpufferung verdünnten Proben besser vergleichbar sein.

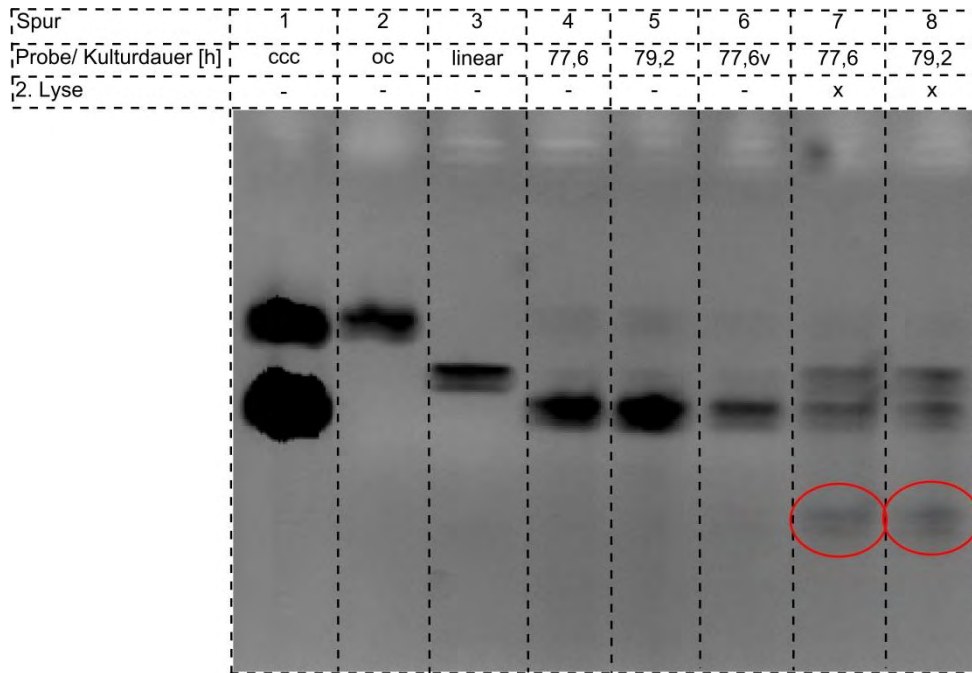


Abbildung 4.6: Beweis der css-DNA auf einem 1%igen Agarosegel

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, liegt in den beiden behandelten Proben css-DNA vor (rot markiert). Die Bandenintensität ist im Vergleich zu der Bandenintensität in Abbildung 4.5 deutlich schwächer. Dies könnte bedeuten, dass die Lagerung im Re-suspensionspuffer nicht nur auf die Lyse der Zellwand einen wesentlichen Einfluss hat, sondern auch auf die pDNA. Dies müsste in einem weiteren Versuch nachgewiesen werden. Dieser war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die css-DNA tritt bei den drei unbehandelten Proben nicht auf. Zusätzlich ist ein hoher Anteil an linearer pDNA entstanden. Damit wurde nachgewiesen, dass die css-DNA durch eine zu starke Lyse generiert werden kann.

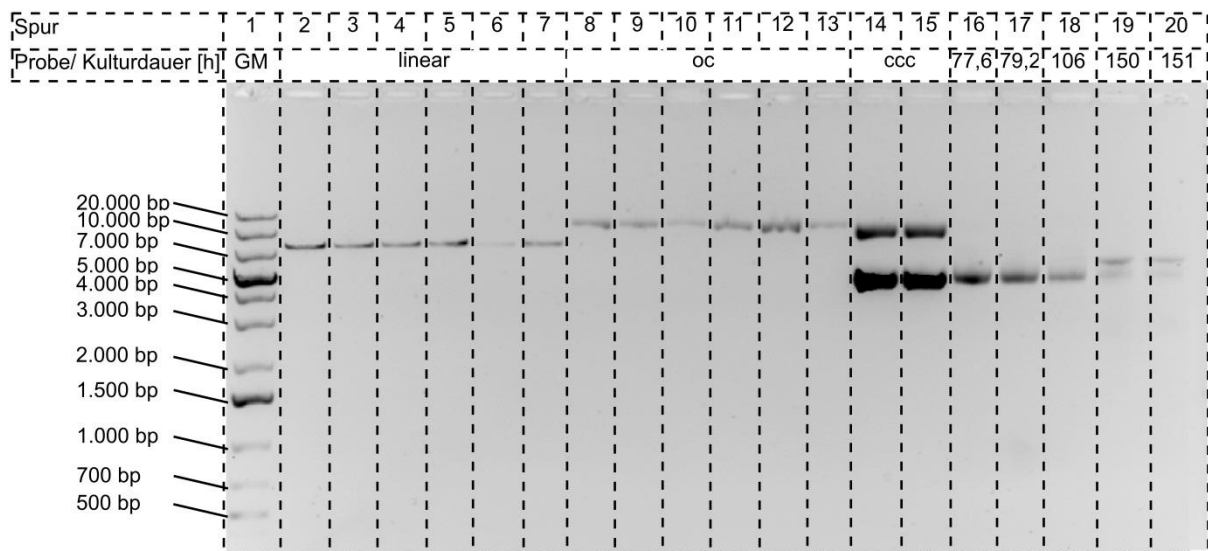


Abbildung 4.7: Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Auftretens der css-DNA (GM: Größenmarker)

Die Reproduzierbarkeit des Auftretens der css-DNA wurde mit frischen Zellpellets durchgeführt. Diese wurden bei der Resuspension auf eine OD_{600} von 10 normiert. Die alkalischen Lyse wurde wie in Abbildung 3.7 durchgeführt.

Zusätzlich zu den Kultivierungsproben wurden neue Standards für die lineare (Spur 2 bis 7) sowie für die oc-Konformation (Spur 8 bis 13) hergestellt und überprüft. In den Spuren 14 und 15 in Abbildung 4.7 wurde der ccc-Standard aufgetragen.

In allen aufgetragenen Kultivierungsproben (Spur 16 bis 20) ist keine css-DNA sichtbar. Ab Spur 18 hätten für eine erfolgreiche Reproduzierbarkeit des Lyseergebnisses aus Abbildung 4.5 css-DNA auftreten müssen. Dies spricht dafür, dass die in Abbildung 3.7 dargestellte alkalische Lyse nicht zu stark ist. Das bedeutet, dass die css-DNA aufgrund der Lagerung in dem EDTA-haltigen P1-Puffer sowie der dünneren Zellwand der Mikroorganismen entstanden ist.

Für den Nachweis der permanenten Trennung der DNA-Doppelstränge wurde mit den Proben aus Abbildung 4.5 gearbeitet. Es wurde eine Probe, bei der keine css-DNA aufgetreten war, sowie Proben, bei denen diese aufgetreten war, verwendet. Die Kultivierungsproben wurden für die Überprüfung weitere 24 Stunden bei 6°C gelagert und erneut in einem 1%igen Agarosegel, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, aufgetrennt.

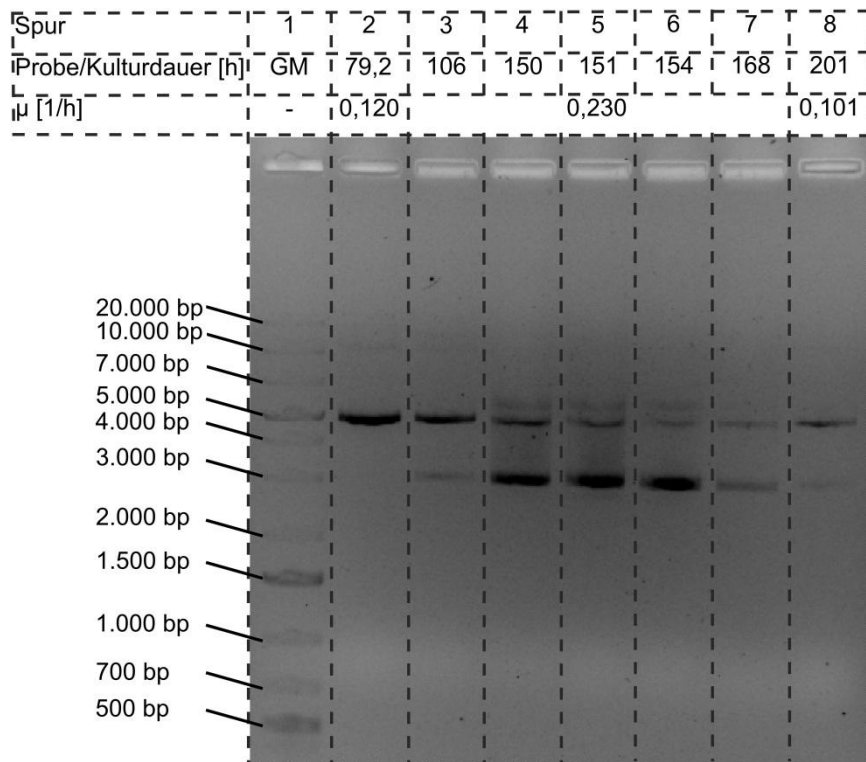


Abbildung 4.8: Nachweis der permanent vorliegenden css-DNA mit einem 1%igen Agarosegel (GM: Größenmarker)

In Abbildung 4.8 ist in den Spuren 3 bis 8 zu erkennen, dass die css-Banden nach 24 Stunden Lagerung noch in der gleichen Intensität vorliegen wie in Abbildung 4.5. In der zweiten Spur wurde die Kultivierungsprobe aufgetragen, bei der keine css-DNA in Abbildung 4.5 zu sehen ist. In dieser Kultivierungsprobe hat sich nach 24 Stunden Lagerung keine css-DNA gebildet. Dadurch ist der Nachweis erbracht, dass die Denaturierung der DNA-Doppelstränge permanent ist.

4.2. Zweiter kontinuierlicher Prozess

Im zweiten kontinuierlichen Prozess wird die Reproduzierbarkeit des Anstiegs der Plasmidkonzentration nach der Batch-Phase untersucht. Des Weiteren wird die Kulturalterung nochmals analysiert, da diese aufgrund des blockierten Feedschlauchs und der damit herbeigeführten Stresssituation für die Mikroorganismen im ersten kontinuierlichen Prozess nicht optimal bewertet werden konnte.

Um ein erneutes Blockieren des Feedschlauchs zu verhindern, wurde das Feedmedium nach dem Autoklavieren unter kontinuierlichem Rühren langsam abgekühlt. Dies hat zur Folge, dass nach circa 20 Stunden die ausgefallenen Medienbestandteile wieder komplett in Lösung gebracht werden können.

Tabelle 4.10: Prozessparameter des zweiten kontinuierlichen Prozesses

Prozessparameter	Sollwert
Begasung	2,5 NL(min) ⁻¹
pH	7,0
pO ₂	30%
Rührerdrehzahl (Startwert)	300 rpm
Temperatur	36°C

Damit die Daten aus den beiden kontinuierlichen Prozessen miteinander verglichen werden können, wurden die Prozessparameter (Tabelle 4.10) aus dem ersten kontinuierlichen Prozess beibehalten.

Für eine bessere Bewertung der Kulturalterung wurden im Laufe des zweiten kontinuierlichen Prozesses lediglich drei Veränderungen an der zellspezifischen Wachstumsrate vorgenommen. Dadurch ergeben sich insgesamt vier Prozessphasen die in Tabelle 4.11 aufgelistet sind. Zusätzlich wurde die gleiche zellspezifische Wachstumsrate zu Beginn der Zufütterung wie im ersten Prozess gewählt, um die Reproduzierbarkeit des Anstiegs der Plasmidkonzentration zu untersuchen. Im Verlauf der zweiten und dritten Phase musste die Pumprate jeweils einmal nachjustiert werden.

Tabelle 4.11: Aufteilung der Phasen des zweiten Prozesses

Phase	Prozesszeit [h]	Proben	μ [h ⁻¹]	Bemerkung
1	0 - 3,9	0 - 2	max	Batch-Phase
2	3,9 - 145	3 - 22	0,101	Ausfall der on-line Aufzeichnung für 3,5 h
3	145 - 219	23 - 41	0,052	
4	219 - 243	42 - 47	0,101	

4.2.1. Reproduzierbarkeit des Anstiegs der Plasmidkonzentration

Für den Vergleich des Anstiegs der Plasmidkonzentration nach der Batch-Phase mit dem Anstieg der Plasmidkonzentration in dem ersten kontinuierlichen Prozess wurde nach der knapp vierstündigen Batch-Phase eine zellspezifische Wachstumsrate von 0,101 h⁻¹ eingestellt und konstant gehalten. Zusätzlich wird das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen anhand der Zellkonzentration verglichen.

Am Ende der Batch-Phase liegt eine Plasmidkonzentration von 12,9 mgL⁻¹ vor. Damit ist diese mit den 12,8 mgL⁻¹ aus dem ersten kontinuierlichen Prozess annähernd gleich und es liegt der gleiche Ausgangswert vor. Die Batch-Phase aus dem ersten Prozess konnte damit im zweiten Prozess reproduziert werden.

Tabelle 4.12: Prozessdaten der ersten und anteilig der zweiten Phase des zweiten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	max	1,4	0,2	-	-	5,98	0,10
1	2,0	max	6,2	1,6	2,4	1,5	4,97	0,93
2	3,9	0,101	19,3	6,0	12,9	2,2	n.n.	1,38
3	4,9	0,101	20,5	6,3	21,6	3,5	n.n.	n.n.
4	5,9	0,101	19,4	5,4	20,5	3,8	n.n.	n.n.
5	6,9	0,101	19,3	5,7	24,2	4,2	n.n.	n.n.
6	7,9	0,101	18,9	5,1	25,8	5,0	n.n.	n.n.
7	8,9	0,101	19,0	5,3	24,0	4,5	n.n.	n.n.
8	25,0	0,101	13,0	3,8	71,8	18,9	n.n.	n.n.

Wie der Tabelle 4.12 zu entnehmen ist, verdoppelt sich die Plasmidkonzentration innerhalb der ersten vier Stunden nach dem Feedstart. Dieses Verhalten ist identisch mit dem Verhalten nach dem Feedstart aus dem ersten Prozess und spricht dafür, dass dies reproduziert werden kann.

Nach 21 Stunden Zufütterung erreicht die Plasmidkonzentration ihren Maximalwert von 71,8 mgL⁻¹. Damit liegt die maximale Plasmidkonzentration 9,4 mgL⁻¹ niedriger als im ersten Versuch. Wird die Abweichung prozentual betrachtet, so beträgt diese 11,6%.

Die Zellkonzentration liegt am Ende der Batch-Phase mit 6,0 gL⁻¹ um 0,7 gL⁻¹ niedriger als die 6,7 gL⁻¹ des ersten Prozesses. Damit weist die Zellkonzentration eine Abweichung von 10,4% auf, obwohl die OD₆₀₀-Werte annähernd gleich sind. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Abweichung ihren Ursprung bei der Bestimmung der Biotrockenmasse hat. Dies kann durch die Abnahme von Zellmaterial bei der Überstandsabnahme während der Präparation der Zellpellets verursacht worden sein. Des Weiteren kann eine ungenaue Messung bei der gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse eine mögliche Ursache sein.

Die Zellkonzentration nimmt in den ersten 21 Stunden nach der Batch-Phase signifikant ab. Von den 6,0 gL⁻¹ am Ende der Batch-Phase sinkt diese auf 3,8 gL⁻¹ ab. Dies ist ein Rückgang von 36,1% und entspricht, mit einer Abweichung von 0,3 gL⁻¹, den theoretisch berechneten 4,1 gL⁻¹ (mit K_S= 0,05 gL⁻¹). Eine solch starke Abnahme der Zellkonzentration konnte nach dem Feedstart im ersten kontinuierlichen Prozess nicht beobachtet werden, jedoch das Verhalten mit einem kurzzeitigen Anstieg der Zellkonzentration und dem folgenden Abfall.

Trotz der um 44,1% geringeren Zellkonzentration im zweiten Prozess im Vergleich zum ersten Prozess zum Zeitpunkt der maximalen Plasmidkonzentration, kann sowohl die Verdopplung innerhalb der ersten vier Stunden nach der Batch-Phase reproduziert werden, als auch der Anstieg bis zur maximalen Plasmidkonzentration. Die Ursache für den Unterschied bei der Zellkonzentration bei den beiden Prozessen konnte innerhalb dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Als Abweichung ist zu erwähnen, dass die maximale Plasmidkonzentration im zweiten Prozess bereits nach 21 Stunden Zufütterung erreicht wird. Dies ist vier Stunden früher als im ersten kontinuierlichen Prozess. Mit Blick auf einen möglichen Fed-Batch Prozess liegt die maximale Plasmidkonzentration somit in einem Zeitrahmen von 21 bis 25 Stunden Zufütterung. Wird der Zeitbedarf für die vierstündige Batch-Phase hinzugefügt, kann für einen Fed-Batch Prozess mit einer Prozesszeit von 25 bis 29 Stunden geplant werden.

4.2.2. Analyse der Kulturalterung

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass der Anstieg der Plasmidkonzentration innerhalb der ersten 25 Stunden nach Beginn der Zufütterung reproduziert werden kann, wird im Folgenden die Kulturalterung analysiert. Dazu wurde die zellspezifische Wachstumsrate über einen Zeitraum von 141,1 Stunden konstant gehalten. In Tabelle 4.13 sind die Prozessdaten der zweiten Prozessphase nach dem Erreichen der maximalen Plasmidkonzentration aufgelistet.

Tabelle 4.13: Prozessdaten ab der maximalen Plasmidkonzentration der zweiten Prozessphase des zweiten Prozesses

Probe [-]	Kulturzeit [h]	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]	c _X [gL ⁻¹]	c _P [mgL ⁻¹]	g _{P/X} [mgg ⁻¹]
9	27,0	0,101	12,9	3,9	64,3	16,7
10	29,0	0,101	12,5	3,7	64,4	17,7
11	31,0	0,101	12,3	3,7	60,4	16,3
12	33,0	0,101	12,1	3,6	58,4	16,0
13	48,8	0,101	11,2	3,3	24,6	7,6
14	50,8	0,101	11,4	3,2	26,1	8,2
15	52,8	0,101	11,1	2,9	25,1	8,5
16	54,8	0,101	11,1	3,2	21,8	6,7
17	56,8	0,101	11,1	3,3	25,9	7,9
18	73,8	0,101	11,4	4,0	19,4	4,8
19	75,8	0,101	11,0	3,6	15,0	4,2
20	77,0	0,101	11,0	3,7	17,1	4,6
21	104	0,101	11,7	4,0	12,8	3,2
22	145	0,101	13,9	3,7	13,5	3,6

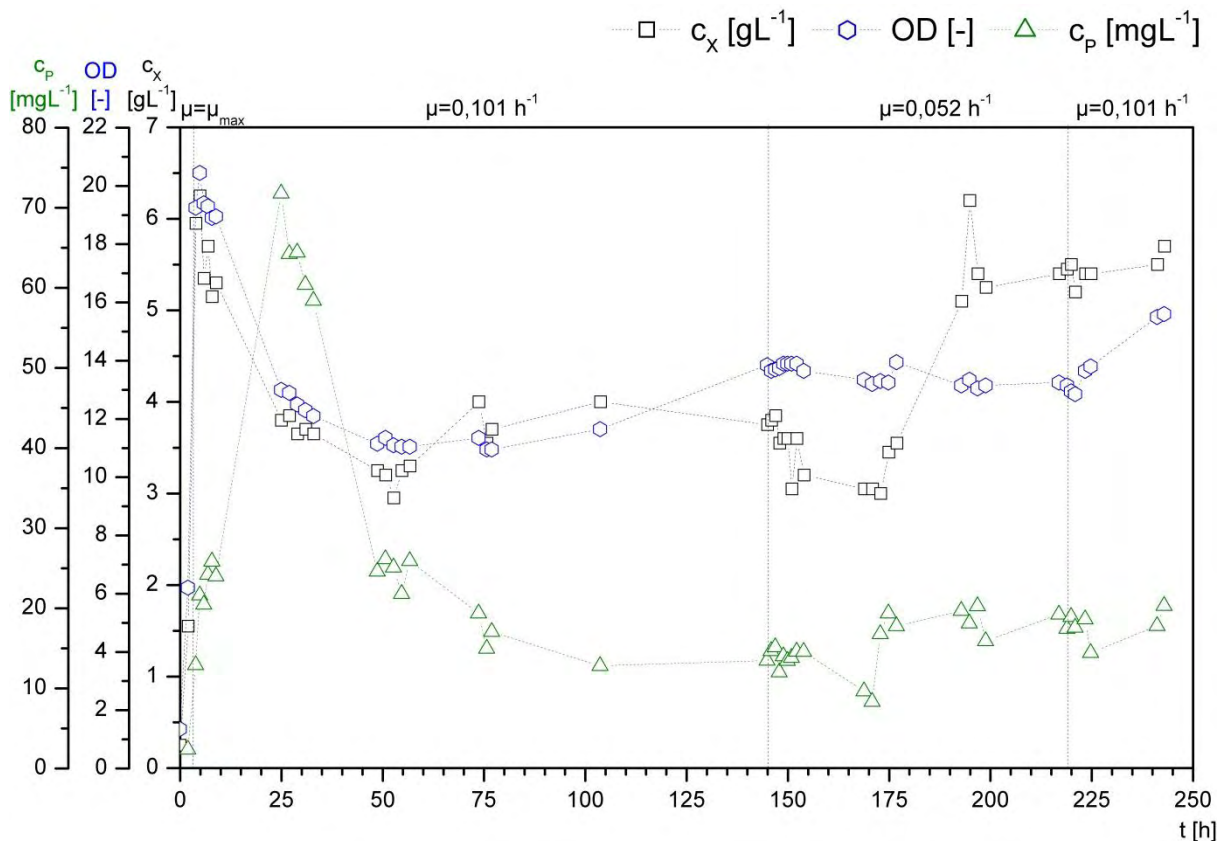


Abbildung 4.9: Verlauf der Plasmid- und Zellkonzentration sowie der OD_{600} des zweiten kontinuierlichen Prozesses

Nach dem Erreichen der maximalen Plasmidkonzentration nimmt diese über einen Zeitraum von 79 Stunden, was $\sim 11,5$ Verdopplungszyklen entspricht, in Form einer Abklingfunktion auf $12,8 \text{ mgL}^{-1}$ ab (Abbildung 4.9). Damit dauert die Abnahme 27 Stunden länger als bei dem ersten Prozess. Da beim ersten Prozess die zellspezifische Wachstumsrate jedoch beim Maximalwert der Plasmidkonzentration erhöht wurde, ist davon auszugehen, dass das höhere μ die Kulturalterung beschleunigt hat. Des Weiteren setzte sich im zweiten kontinuierlichen Prozess der Feedschlauch nicht zu. Damit kann der Schluss gefasst werden, dass bereits nach 21 Stunden Zufütterung die Alterung der Mikroorganismen bei einem μ von $0,101 \text{ h}^{-1}$ soweit fortgeschritten ist, dass die pDNA-Produktivität wesentlich zurückgeht. Für einen Produktionsprozess im Fed-Batch bedeutet dies, dass die Mikroorganismen nach ungefähr 21 Stunden ihre maximale Produktionsdauer mit maximaler Ausbeute erreicht haben.

Die Zellkonzentration liegt nach 31 Stunden Prozesszeit bei $3,7 \text{ gL}^{-1}$ und bleibt im weiteren Verlauf der zweiten Phase, bis zu einer Prozesszeit von 145 Stunden, in diesem Bereich. Lediglich nach 52,8 Stunden Prozesszeit liegt ein Ausreißer mit $2,9 \text{ gL}^{-1}$ vor. Aufgrund der Tatsache, dass der OD_{600} -Wert zu diesem Zeitpunkt kon-

stant bleibt, wird von einer Messungsungenauigkeit bei der Bestimmung der Biotrockenmasse ausgegangen. Am Ende der zweiten Phase liegt wieder eine Zellkonzentration von $3,7 \text{ gL}^{-1}$ vor. Daher wird die Abnahme der Zellkonzentration der Gleichgewichtseinstellung nach Beginn der Zufütterung zugeordnet.

Das Verhalten der Gleichgewichtseinstellung sowie der Abnahme der Plasmidkonzentration in Form einer Abklingfunktion wurde schon im ersten kontinuierlichen Prozess beobachtet. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Zellkonzentration in der zweiten kontinuierlichen Kultivierung in dieser Phase bis zu 3 gL^{-1} niedriger ist als in dem ersten Prozess. Dies tritt auf, obwohl in beiden Prozessen die gleichen Medien und Prozessparameter eingesetzt wurden. Eine mögliche Ursache liegt in der Behandlung des Feedmediums. Dieses wurde im zweiten kontinuierlichen Prozess nach dem Autoklavieren langsam und unter kontinuierlichem Rühren abgekühlt. Dadurch gingen alle ausgefallenen Medienbestandteile wieder komplett in Lösung. Dies war im ersten Prozess nicht der Fall.

Im Laufe der zweiten Prozessphase kam es zu einem Ausfall des Computers, der die on-line Messdaten aufgezeichnet hat. Dadurch liegt eine dreistündige Aufzeichnungslücke, ab einer Prozesszeit von 22 Stunden, vor (Abbildung 4.10).

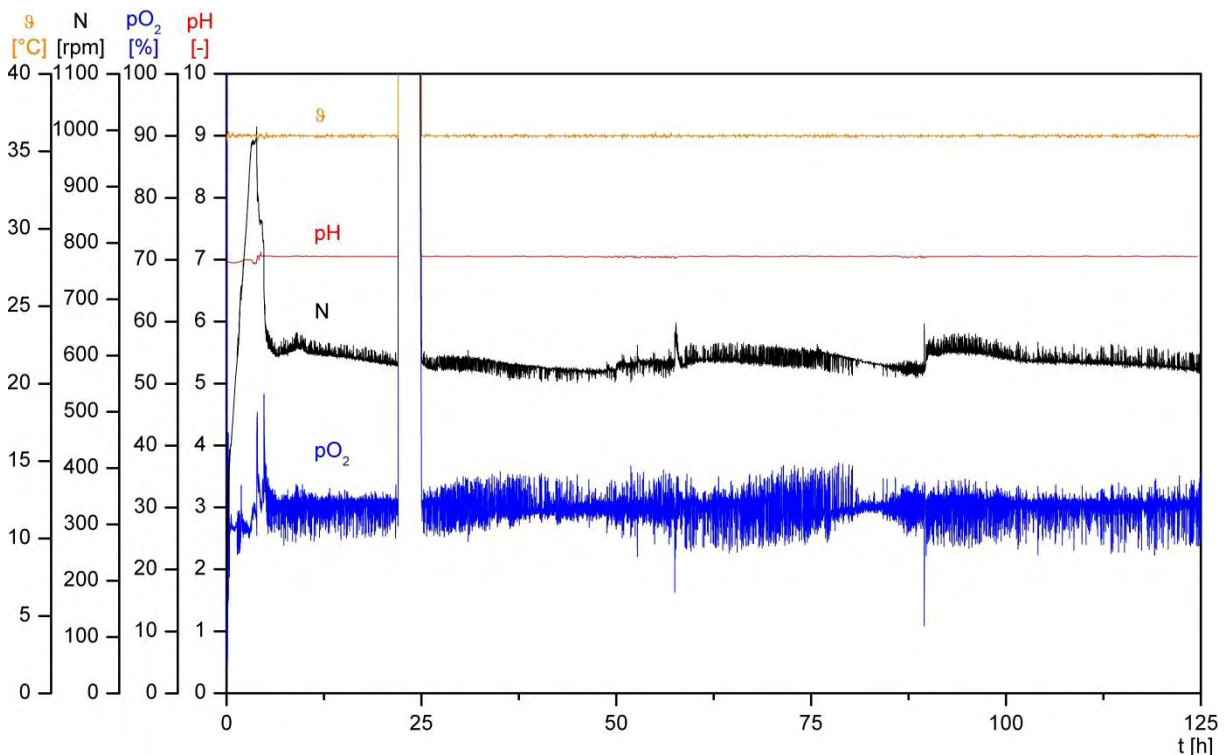


Abbildung 4.10: Verlauf der on-line Messdaten der ersten 125 Stunden des zweiten kontinuierlichen Prozesses

Die on-line Messgrößen am Anfang und am Ende der Aufzeichnungslücke weisen den gleichen Verlauf auf. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass während der drei Stunden keine Abweichungen bei den on-line Messgrößen vorlagen. Die Prozessleitsoftware MFCS/win wurde lediglich zur Aufzeichnung der on-line Messgrößen eingesetzt. Daher war lediglich die Aufzeichnung von dem Ausfall betroffen und keine Regelkreise.

4.2.3. Plasmidkonzentrationssteigerung durch eine Reduktion von μ

Für die Bestätigung des Anstiegs der Plasmidkonzentration durch eine Reduktion der zellspezifischen Wachstumsrate wurde in der dritten Prozessphase die zellspezifische Wachstumsrate von $0,101 \text{ h}^{-1}$ auf $0,052 \text{ h}^{-1}$ reduziert.

Beim Wechsel von der zweiten in die dritte Prozessphase beträgt die Plasmidkonzentration $13,5 \text{ mgL}^{-1}$ (Tabelle 4.13). Ausgehend von dieser Plasmidkonzentration liegen die Plasmidkonzentrationsänderungen in der dritten Prozessphase alle im Schwankungsbereich der Messmethode von 4 mgL^{-1} oder nur knapp außerhalb des Schwankungsbereichs (Tabelle 4.14). Dadurch kann keine Aussage darüber getätigt werden, ob durch eine Reduzierung der zellspezifischen Wachstumsrate eine Erhö-

Tabelle 4.14: Prozessdaten der dritten Prozessphase des zweiten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]
23	146	0,052	13,7	3,8	14,7	3,9
24	147	0,052	13,7	3,8	15,2	3,9
25	148	0,052	13,8	3,5	12,0	3,4
26	149	0,052	13,9	3,6	14,0	3,9
27	150	0,052	13,9	3,6	13,5	3,7
28	151	0,052	13,9	3,1	13,8	4,5
29	152	0,052	13,9	3,6	14,6	4,1
30	154	0,052	13,7	3,2	14,6	4,6
31	169	0,052	13,4	3,1	9,7	3,2
32	171	0,052	13,2	3,1	8,3	2,7
33	173	0,052	13,3	3,0	16,8	5,6
34	175	0,052	13,3	3,5	19,4	5,6
35	177	0,052	14,0	3,6	17,8	5,0
36	193	0,052	13,2	5,1	19,7	3,9
37	195	0,052	13,4	6,2	18,1	2,9
38	197	0,052	13,1	5,4	20,3	3,8
39	199	0,052	13,2	5,2	15,9	3,0
40	217	0,052	13,3	5,4	19,2	3,6
41	219	0,052	13,2	5,5	17,5	3,2

hung der Plasmidkonzentration erzielt werden kann.

Die Zellkonzentration liegt zum Zeitpunkt des Wechsels der Prozessphase bei $3,7 \text{ gL}^{-1}$ und sinkt in den ersten beiden Verdopplungszyklen um $0,7 \text{ gL}^{-1}$ auf $3,0 \text{ gL}^{-1}$ ab (Tabelle 4.14). Dies entspricht einem Rückgang von 18,9% und einer Abweichung von 16,7% vom berechneten Wert von $3,6 \text{ gL}^{-1}$ (mit $K_S = 0,05 \text{ gL}^{-1}$). Im Anschluss an die ersten beiden Verdopplungszyklen steigt die Zellkonzentration um 83,3% auf $5,5 \text{ gL}^{-1}$.

Die Steigerung der Zellkonzentration innerhalb einer Prozessphase widerspricht dem Konzept des Chemostaten. Die Zellkonzentration sollte bei einer konstanten zellspezifischen Wachstumsrate ebenfalls konstant sein. Ob ein Zusammenhang mit der Feednachfüllung dreieinhalb Stunden zuvor besteht, kann nicht bestätigt werden. Das Einwaageprotokoll für das nachgefüllte Feedmedium ist korrekt und die Feedvorlage wurde kontinuierlich gerührt, so dass diese durchmischt war. Eine mögliche Ursache könnte eine Erholung der Mikroorganismen von der Kulturalterung sein. Jedoch wirkt sich die Erholung von der Kulturalterung nicht auf die Plasmidkonzentration aus.

4.2.4. Vergleich der letzten Prozessphase mit der ersten Zufütterungsphase

Um das Prozessende mit der ersten Fed-Batch Phase zu vergleichen wurde im Anschluss an die dritte Prozessphase mit einem μ von $0,052 \text{ h}^{-1}$ die zellspezifische Wachstumsrate wieder auf den Ausgangswert von $0,101 \text{ h}^{-1}$ zurückgesetzt. Die abschließende vierte Phase dauerte 24 Stunden an (Tabelle 4.15).

Durch die Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate sank die Plasmidkonzentration nicht, sondern wies am Ende der Phase einen tendenziellen Anstieg auf. Der tendenzielle Anstieg der Plasmidkonzentration liegt allerdings noch im Schwankungsbereich der Messmethode (4 mgL^{-1}). Der Maximalwert der Plasmidkonzentration von $71,8 \text{ mgL}^{-1}$ bei einem μ von $0,101 \text{ h}^{-1}$ wird deutlich nicht mehr erreicht. Dies ist mit der Kulturalterung, die bereits für eine Verringerung der Plasmidkonzentration nach 21 Stunden Zufütterung sorgt, zu begründen.

Die Zellkonzentration sollte nach dem in Abbildung 2.2 dargestellten Verlauf steigen. Nachdem diese am Ende der dritten Phase deutlich gestiegen ist, was dem in Abbildung 2.2 dargestellten Modell widerspricht, ist erst am Ende der vierten Phase ein tendenzieller Anstieg auszumachen.

Tabelle 4.15: Prozessdaten der vierten Phase des zweiten Prozesses

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	c _X	c _P	g _{P/X}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]
42	220	0,101	12,95	5,5	18,9	3,4
43	221	0,101	12,85	5,2	17,6	3,4
44	224	0,101	13,65	5,4	18,6	3,4
45	225	0,101	13,80	5,4	14,4	2,7
46	241	0,101	15,50	5,5	17,8	3,2
47	243	0,101	15,60	5,7	20,3	3,6

4.2.5. Vergleich des zellspezifischen Plasmidgehalts

Mit dem zellspezifischen Plasmidgehalt wird ein Vergleich der beiden durchgeführten Prozesse durchgeführt. Des Weiteren wird mit dem zellspezifischen Plasmidgehalt überprüft, ob mit Glycerin ein höherer maximaler zellspezifischer Plasmidgehalt erzielt wird als mit Glucose.

Der in Abbildung 4.11 dargestellte Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts ist vergleichbar mit dem des ersten kontinuierlichen Prozesses. Nach der Batch-Phase ist zunächst ein starker Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts auszumachen,

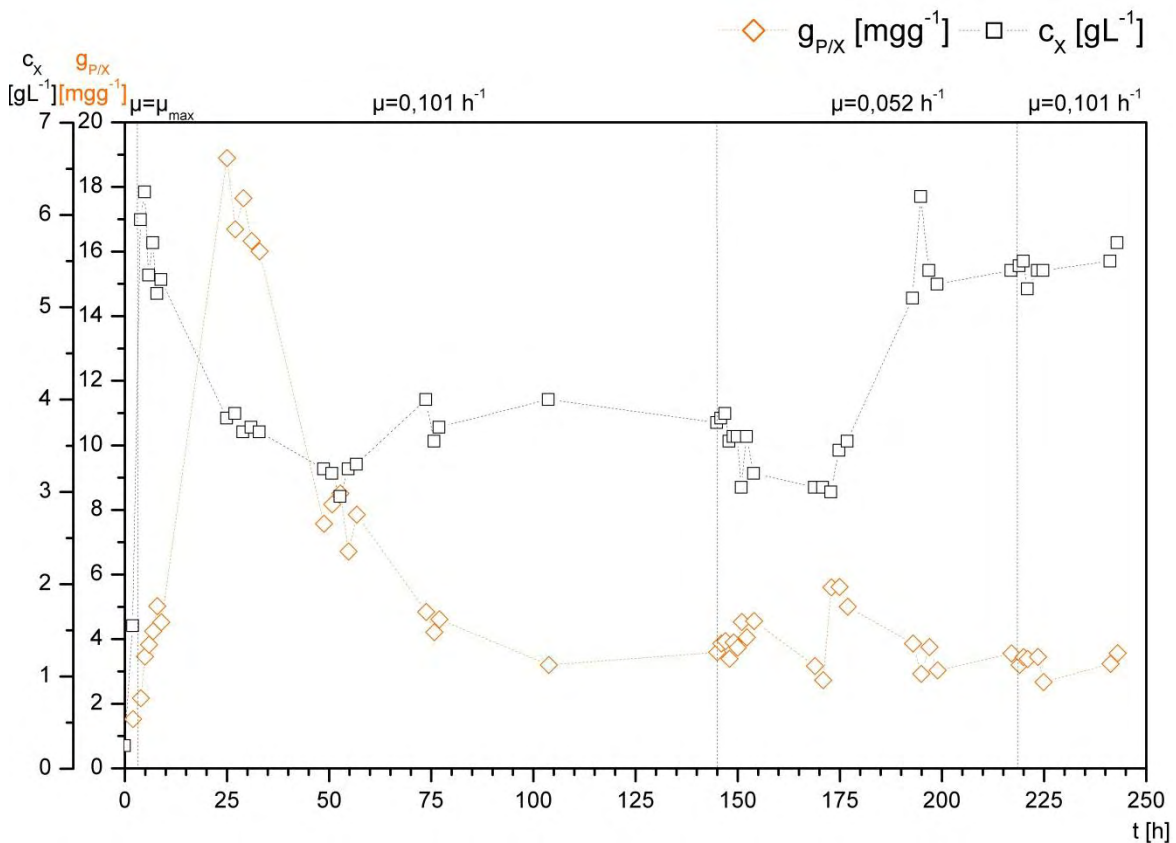


Abbildung 4.11: Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts und der Zellkonzentration des zweiten kontinuierlichen Prozesses

Tabelle 4.16: Maximaler zellspezifischer Plasmidgehalt beider Prozesse mit Glycerin und der Kultivierung mit Glucose als primäre Kohlenstoffquelle

primäre Kohlenstoffquelle [gL ⁻¹]		Prozesszeit [h]	μ [h ⁻¹]	c_X [gL ⁻¹]	c_P [mgL ⁻¹]	$g_{P/X}$ [mgg ⁻¹]
Glycerin (Prozess 1)	6	28,6	0,101	6,8	81,2	11,9
Glycerin (Prozess 2)	6	25,0	0,101	3,8	71,8	18,9
Glucose [20]	20	26,3	0,108	9,7	81,7	8,4

der einen Maximalwert von 18,9 mgg⁻¹ aufweist (Tabelle 4.16). Damit liegt der Maximalwert des zweiten Prozesses um 37,0% höher als der Maximalwert des ersten Prozesses. Dies liegt daran, dass die Zellkonzentration im zweiten Prozess mit 3,8 gL⁻¹ 3,0 gL⁻¹ geringer ist.

Anders als im ersten Prozess liegt der zellspezifische Plasmidgehalt, nach dem Abfall in Form einer Abklingfunktion, mit einem durchschnittlichen Wert von 4 mgg⁻¹ fast achtmal höher. Der Abfall wird durch die Kulturalterung hervorgerufen. Dass der zellspezifische Plasmidgehalt im zweiten Prozess nach dem Abfall durch die Kulturalterung achtmal höher ist, wird an der durch den blockierten Feedschlauch hervorgerufenen Stresssituation für die Mikroorganismen liegen. Zusätzlich kommt hinzu, dass die Zellkonzentration im ersten Prozess wesentlich höher ist als im zweiten Prozess.

Im Vergleich zum maximalen zellspezifischen Plasmidgehalt bei der Kultivierung mit Glucose [20] liegt der im zweiten Prozess erreichte Gehalt 55,6% höher, bei gleicher Kultivierungszeit. Dies liegt unter anderem an der wesentlich geringeren Zellkonzentration. Dadurch wird der in Kapitel 2.3 beschriebene Grundgedanke, dass die zellspezifische Plasmidausbeute durch den Einsatz von Glycerin aufgrund einer höheren ATP-Ausbeute gesteigert werden kann, auch in diesem Versuch nochmals bestätigt.

4.2.6. Verteilung der pDNA-Konformationen

Für die Betrachtung der Verteilung der pDNA-Konformationen wurden die ausgewählten Proben der zweiten kontinuierlichen Kultivierung mit Hilfe eines 1%igen Agarsegels aufgetrennt. Die Verteilung der pDNA-Konformationen ist wichtig, da für pharmazeutische Anwendungen die pDNA einen ccc-Anteil von 95% aufweisen muss [30]. Die Auftrennung erfolgte bei 90 Volt für 90 Minuten. Durch die Verlängerung der Laufzeit um 50% wurde versucht, die im ccc-Standard auf der Höhe der oc-Bande mitlaufende Bande von dieser aufzutrennen.

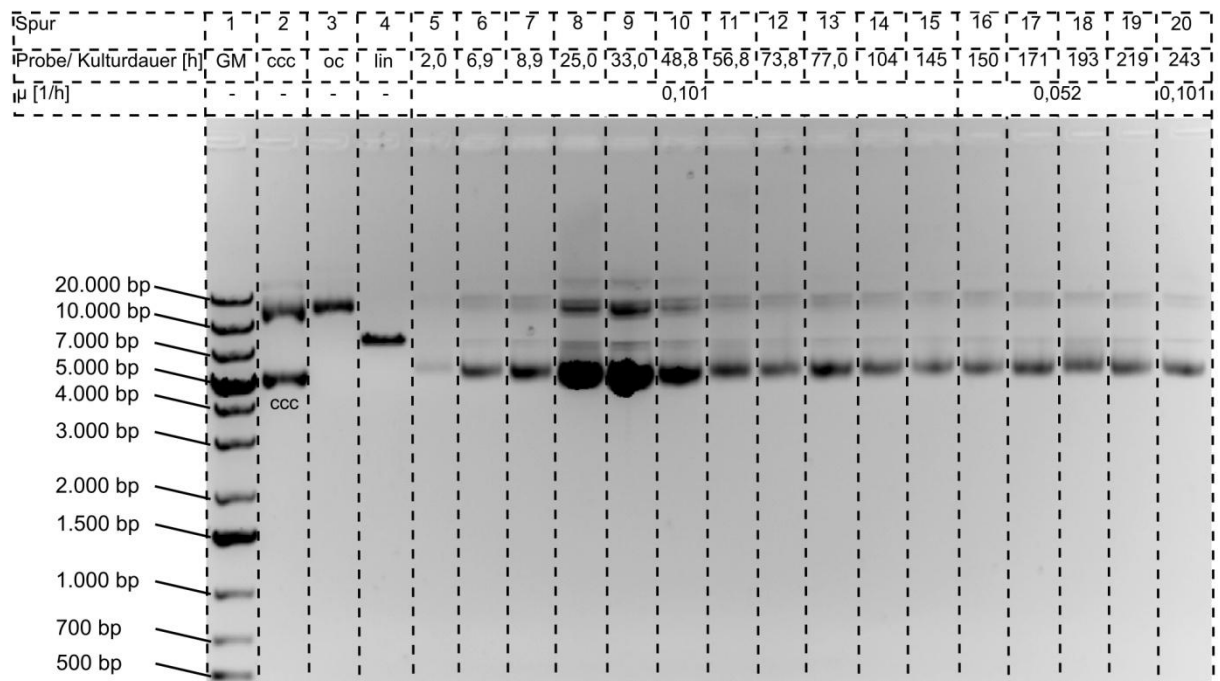


Abbildung 4.12: Ausgewählte Proben aus dem zweiten Prozess (GM: Größenmarker)

In der zweiten Spur des in Abbildung 4.12 dargestellten Agarosegels ist zu sehen, dass die Bande über der eigentlichen ccc-Bande geringfügig weiter läuft als die oc-Standardbande in der dritten Spur des Gels. Dies spricht dafür, dass es sich bei dieser Bande hauptsächlich nicht um die oc-Konformation des Plasmids handelt, sondern um eine multimere Konformation. Da diese wieder bei der doppelten Größe des Größenmarkes läuft als die ccc-Bande, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um das ccc-Dimer handelt. Für den ccc-Konformationsstandard wurde Material verwendet, welches über eine hydrophobe Interaktionschromatographie aufgereinigt wurde. Das bedeutet, dass mit dieser Methode das ccc-Dimer nicht vom ccc-Monomer getrennt werden konnte.

Durch die verlängerte Laufzeit werden nicht nur die beiden Banden in den Standards voneinander getrennt, sondern auch in den Proben selbst ist das ccc-Dimer nun zu beobachten. Am deutlichsten wird dies in der zehnten Spur des Agarosegels. Auch in den Spuren davor und dahinter ist dies zu sehen. Dadurch wird deutlich, dass bei der Synthese von Plasmiden die Bildung von dem ccc-Dimer einen geringen Prozentsatz der Gesamtplasmid-DNA ausmacht.

Bemerkenswert ist, dass in den Spuren 8, 9 und 10 über den oc-Banden noch eine weitere Bande auszumachen ist. Diese ist auch im ccc-Standard über der vermutlichen ccc-Dimerbande schwach zu erkennen. Die Banden der Standards weisen ge-

ringfügig andere Laufweiten auf als die Banden in den Proben. Dieser Effekt wird auf den unterschiedlichen pH-Wert der Puffer für die Proben und der Standards zurückzuführen sein. Ob es sich bei der über der oc-Bande aufgetretenen Bande um das ccc-Trimer oder eine andere Konformation handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Der Anteil an ccc-pDNA überwiegt in allen aufgetragenen Proben. Dieser liegt für die Spuren 7 bis 10 zwischen 80 bis 85% und der oc-Anteil bei 13%. Der ccc-Anteil steigt mit zunehmender Kultivierungsdauer auf bis zu 92% an (Spur 20). Dies entspricht ohne Aufreinigung fast der geforderten Reinheit von 95% für pharmazeutische Anwendungen [30]. Eine mögliche Ursache für die Steigerung der Reinheit mit zunehmender Kulturdauer in den Proben ist unter anderem die Auftragsmenge der pDNA. Das Auftragsvolumen war bei allen Proben identisch. Dies wird dazu geführt haben, dass die ccc-Banden in den Spuren 8 bis 10 überladen sind, da die Plasmidkonzentration in diesen Proben hoch war. Für eine exakte Auswertung der Verteilung der pDNA-Konformationen ist es notwendig, dass eine Methode für die HPLC zur Verfügung steht, mit der diese aufzutrennen sind.

4.3. Fed-Batch Prozesse

Die zwei kontinuierlichen Prozesse haben gezeigt, dass die Kulturalterung bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ nach 21 bis 25 Stunden soweit fortgeschritten ist, dass die Plasmidproduktion erheblich abnimmt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit einer Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate eine unmittelbare Abnahme der Plasmidkonzentration einhergeht. Andersherum konnte eine Steigerung der Plasmidkonzentration mit einer Reduktion der zellspezifischen Wachstumsrate nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zusätzlich wird durch den Einsatz von Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle ein höherer zellspezifischer Plasmidgehalt erzielt als mit Glucose. Mit diesen Erkenntnissen wurden vier Fed-Batch Prozesse mit drei verschiedenen zellspezifischen Wachstumsraten durchgeführt, so dass die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen unter Produktionsbedingungen getestet werden konnten.

Wie bei den kontinuierlichen Prozessen war die zellspezifische Wachstumsrate der einzige variable Parameter der durchgeführten Prozesse im Multibioreaktorsystem.

Es wurden zwei Prozesse (D1 und D2) mit der in den kontinuierlichen Prozessen als Ausgangsbasis dienenden zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ gewählt. Dadurch ist eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Fed-Batch Prozessen möglich. Neben der zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ wurde zusätzlich ein μ von $0,23 \text{ h}^{-1}$ (D3) und $0,05 \text{ h}^{-1}$ (D4) gewählt. Bei D3 wurde die zellspezifische Wachstumsrate nach sechs Stunden Zufütterung auf $0,10 \text{ h}^{-1}$ reduziert.

Die Fed-Batch Prozesse D1, D2 und D4 setzen sich jeweils aus zwei Prozessphasen zusammen. Dies sind die Batch- und die Fed-Batch Phase mit dem eingestellten μ . Bei D3 sind aufgrund der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate drei Prozessphasen vorhanden.

Die Fed-Batch Phase war bei allen Prozessen auf 20 Stunden begrenzt. Um den $p\text{O}_2$ -Sollwert bei D3 bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,23 \text{ h}^{-1}$ realisieren zu können, wird der Begasung Sauerstoff zugemischt. Die Prozessparameter der Fed-Batch Prozesse sind in Tabelle 4.17 aufgelistet.

Tabelle 4.17: Prozessparameter für die Fed-Batch Prozesse

Prozessparameter	Sollwert
Begasung	1,5 vvm
pH	7,0
$p\text{O}_2$	30%
Rührerdrehzahl (Startwert)	300 rpm
Temperatur	36°C

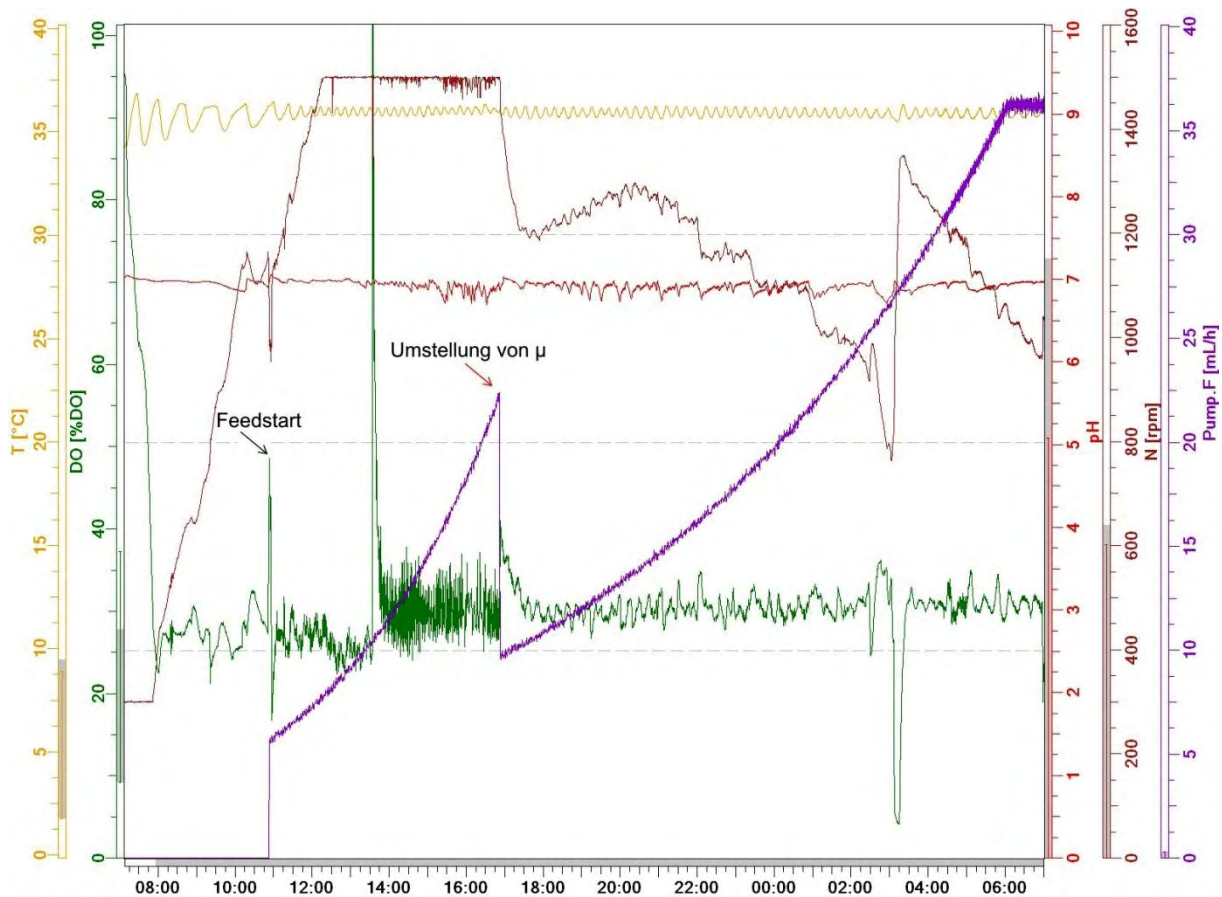


Abbildung 4.13: Verlauf der on-line Messgrößen von D3 mit Kennzeichnung des Feedstarts sowie der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate

Wie bei den kontinuierlichen Prozessen startet die Zufütterungsphase beim plötzlichen Anstieg des pO_2 -Werts. Dies ist in Abbildung 4.13 anhand der on-line Messdaten des Fed-Batch Prozesses D3 mit einem schwarzen Pfeil (Feedstart) gekennzeichnet. Zusätzlich ist der Umstellungszeitpunkt der zellspezifischen Wachstumsrate mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Des Weiteren ist deutlich das exponentielle Zufütterungsprofil anhand des Verlaufs der Pumprate der Feedpumpe (lila) zu erkennen.

Im Folgenden wird der Verlauf der Plasmidkonzentration sowie die Kulturalterung der Fed-Batch Prozesse analysiert. Dies soll Aufschluss darüber geben, bei welcher zellspezifischer Wachstumsrate die höchste Plasmidkonzentration erzielt werden kann. Zusätzlich werden die Fed-Batch Prozesse mit Hilfe des zellspezifischen Plasmidgehalts verglichen. Dadurch wird überprüft, bei welcher zellspezifischer Wachstumsrate die Plasmidsynthese der einzelnen Zelle am höchsten ist. Des Weiteren wird die Konformationsverteilung der pDNA analysiert. Diese muss für pharmazeutische Anwendungen einen ccc-Anteil der pDNA von 95% aufweisen [30].

4.3.1. Analyse der Fed-Batch Prozesse

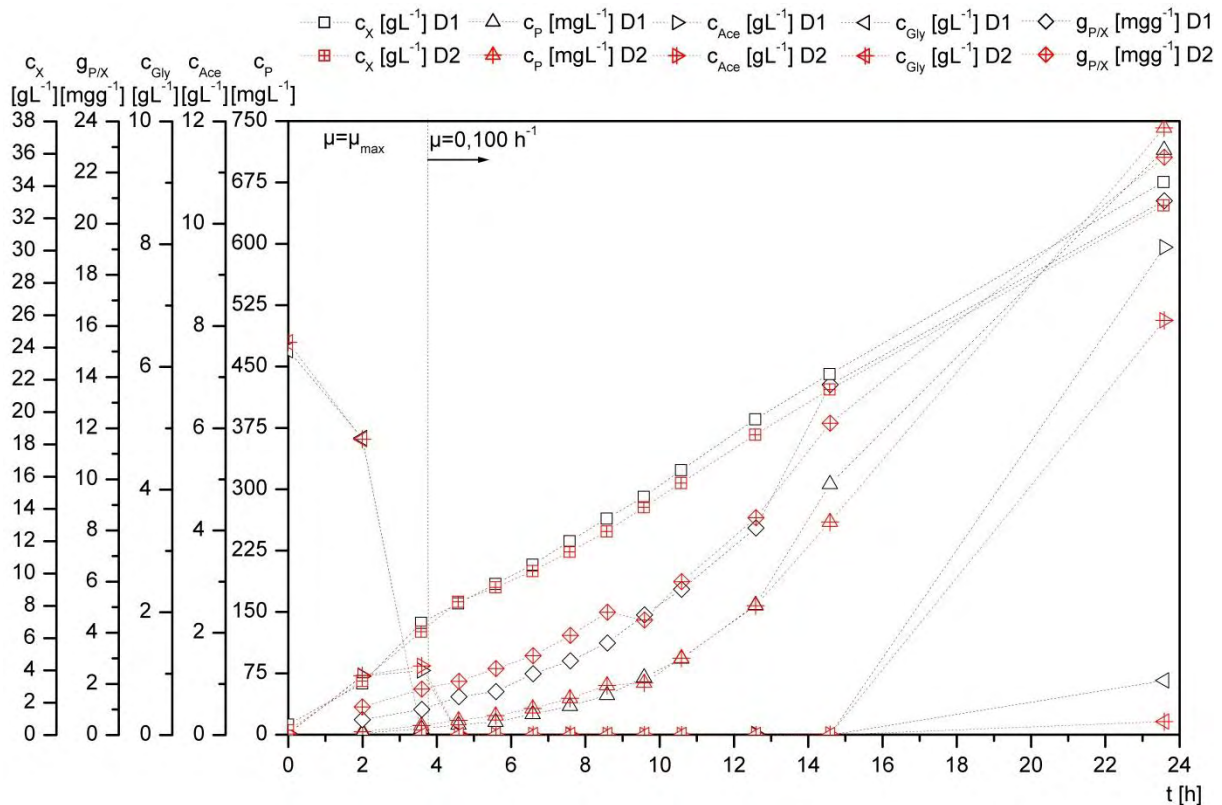


Abbildung 4.14: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat- und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D1 und D2

Zunächst werden die Verläufe der Plasmidkonzentration sowie die Kulturalterung der Prozesse D1 und D2 analysiert. Mit Hilfe des zellspezifischen Plasmidgehalts werden die beiden Prozesse verglichen. Bei beiden Prozessen wurde eine zellspezifische Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Dadurch sollte eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Prozesse ermöglicht werden.

Am Ende der 3,6 stündigen Batch-Phase weist D1 eine Plasmidkonzentration von $7,2 \text{ mgL}^{-1}$ auf (Tabelle 4.18). Innerhalb der ersten sechs Stunden nach Beginn der Fed-Batch Phase steigt diese auf $69,9 \text{ mgL}^{-1}$ und beträgt am Ende der 20 stündigen Fed-Batch Phase 715 mgL^{-1} (Abbildung 4.14). Der Verlauf der Plasmidkonzentration weist einen exponentiellen Anstieg auf.

Der zellspezifische Plasmidgehalt beträgt am Ende der 3,6 stündigen Batch-Phase bei D1 $1,0 \text{ mgg}^{-1}$ (Tabelle 4.18). Dieser steigt innerhalb der ersten sechs Stunden nach Feedstart auf $4,7 \text{ mgg}^{-1}$ an und liegt am Prozessende bei $20,9 \text{ mgg}^{-1}$.

Tabelle 4.18: Zell- und Plasmidkonzentration sowie zellspezifische Plasmidgehalt von D1 und D2

Probe	Kulturzeit	D1			D2		
		C_X	C_P	$g_{P/X}$	C_X	C_P	$g_{P/X}$
[-]	[h]	[gL^{-1}]	[mgL^{-1}]	[mgg^{-1}]	[gL^{-1}]	[mgL^{-1}]	[mgg^{-1}]
0	0	0,6	-	-	0,3	-	-
1	2,0	3,2	1,8	0,6	3,4	3,6	1,1
2	3,6	6,9	7,2	1,0	6,4	11,3	1,8
3	4,6	8,1	12,2	1,5	8,3	17,5	2,1
4	5,6	9,3	15,5	1,7	9,1	23,4	2,6
5	6,6	10,6	25,1	2,4	10,2	31,9	3,1
6	7,6	12,0	35,0	2,9	11,3	44,6	3,9
7	8,6	13,4	48,3	3,6	12,6	60,3	4,8
8	9,6	14,7	69,9	4,7	14,1	63,3	4,5
9	10,6	16,4	92,9	5,7	15,6	93,6	6,0
10	12,6	19,6	159	8,1	18,6	158	8,5
11	14,6	22,4	306	13,7	21,4	260	12,2
12	23,6	34,3	715	20,9	32,8	742	22,6

Die Plasmidkonzentration bei D2 beträgt beim Feedstart $11,3 \text{ mgL}^{-1}$. Wie bei D1 steigt diese in den ersten sechs Stunden nach dem Feedstart auf über 60 mgL^{-1} und erreicht am Ende des Prozesses eine Konzentration von 742 mgL^{-1} . Der Verlauf der Plasmidkonzentration weist wie bei D1 einen exponentiellen Anstieg auf.

Bei D2 steigt der zellspezifische Plasmidgehalt innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Batch-Phase von $1,8 \text{ mgg}^{-1}$ auf $4,5 \text{ mgg}^{-1}$ und beträgt am Prozessende $22,6 \text{ mgg}^{-1}$.

D2 weist am Ende der Prozesse eine 3,6% höhere Plasmidkonzentration auf als D1. Es werden bei beiden Prozessen Plasmidkonzentrationen von über 700 mgL^{-1} erreicht. Der zellspezifische Plasmidgehalt ist bei beiden Prozessen bei über 20 mgg^{-1} und liegt bei D2 7,5% höher als bei D1. Der Unterschied bei dem zellspezifischen Plasmidgehalt entsteht durch die 4,4% höhere Zellkonzentration bei D1 und der höheren Plasmidkonzentration bei D2. Neben der Plasmidkonzentration und dem zellspezifischen Plasmidgehalt weisen die Mikroorganismen auch einen gleichen Verlauf bei der Zellkonzentration auf. Damit sind die Fed-Batch Prozesse mit der durchgeführten Prozessstrategie reproduzierbar.

Die Kulturalterung ist bei D1 und D2 anhand der Plasmidkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts nur schwach auszumachen. Nach 15 Stunden Prozesszeit liegt ein leicht geringerer Anstieg des zellspezifischen Plasmidgehalts und

Tabelle 4.19: Acetat- und Glycerinkonzentration von D1 und D2

Probe	Kulturzeit [h]	D1		D2	
		C _{Gly} [gL ⁻¹]	C _{Ace} [gL ⁻¹]	C _{Gly} [gL ⁻¹]	C _{Ace} [gL ⁻¹]
0	0	6,27	0,03	6,40	0,02
1	2,0	4,84	1,15	4,82	1,15
2	3,6	n.n.	1,25	n.n.	1,35
3	4,6	n.n.	n.n.	n.n.	0,02
4	5,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	6,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6	7,6	n.n.	n.n.	n.n.	0,01
7	8,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
8	9,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9	10,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10	12,6	n.n.	0,02	n.n.	n.n.
11	14,6	n.n.	0,01	n.n.	0,01
12	23,6	0,89	9,48	0,22	8,06

der Plasmidkonzentration vor. Am Prozessende beträgt die Acetatkonzentration bei D1 9,48 gL⁻¹ und bei D2 8,06 gL⁻¹ (Tabelle 4.19). Dies deutet darauf hin, dass die Kulturalterung bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von 0,10 h⁻¹ nach 20 Stunden Zufütterung im Fed-Batch Prozess soweit fortgeschritten ist, dass die Kapazität des aeroben Stoffwechsels der Mikroorganismen zurückgeht. Dies führt dazu, dass das überschüssige Glycerin über den anaeroben Stoffwechsel unter anderem zu Acetat umgewandelt wird. Die Glycerinkonzentration beträgt am Prozessende bei D1 0,89 gL⁻¹ und bei D2 0,22 gL⁻¹. Dadurch lässt sich den Prozessen eine Kulturalterung zuordnen, die bereits eine bzw. knapp fünf Stunde vorher eintritt als bei den kontinuierlichen Prozessen.

Nach dem die Reproduzierbarkeit der Fed-Batch Prozesse mit einer zellspezifischen Wachstumsrate von 0,10 h⁻¹ belegt wurde, wird der Verlauf der Plasmidkonzentration und des zellspezifischen Plasmidgehalts sowie die Kulturalterung von D3 analysiert. In diesem Prozess wurde beim Feedstart eine zellspezifische Wachstumsrate von 0,23 h⁻¹ gewählt. Aufgrund des maximalen Arbeitsvolumens der eingesetzten Bioreaktoren von eineinhalb Liter, wurde die zellspezifische Wachstumsrate nach sechs Stunden Zufütterung auf 0,10 h⁻¹ reduziert. Die Reduzierung wurde durchgeführt, damit der Bioreaktor in der Nacht nicht überläuft. Des Weiteren würde mit dem verwendeten Feed die maximale Förderleistung der Feedpumpe bereits deutlich vor dem Prozessende erreicht werden. Dadurch wäre das exponentielle Zufütterungsprofil nicht mehr realisierbar.

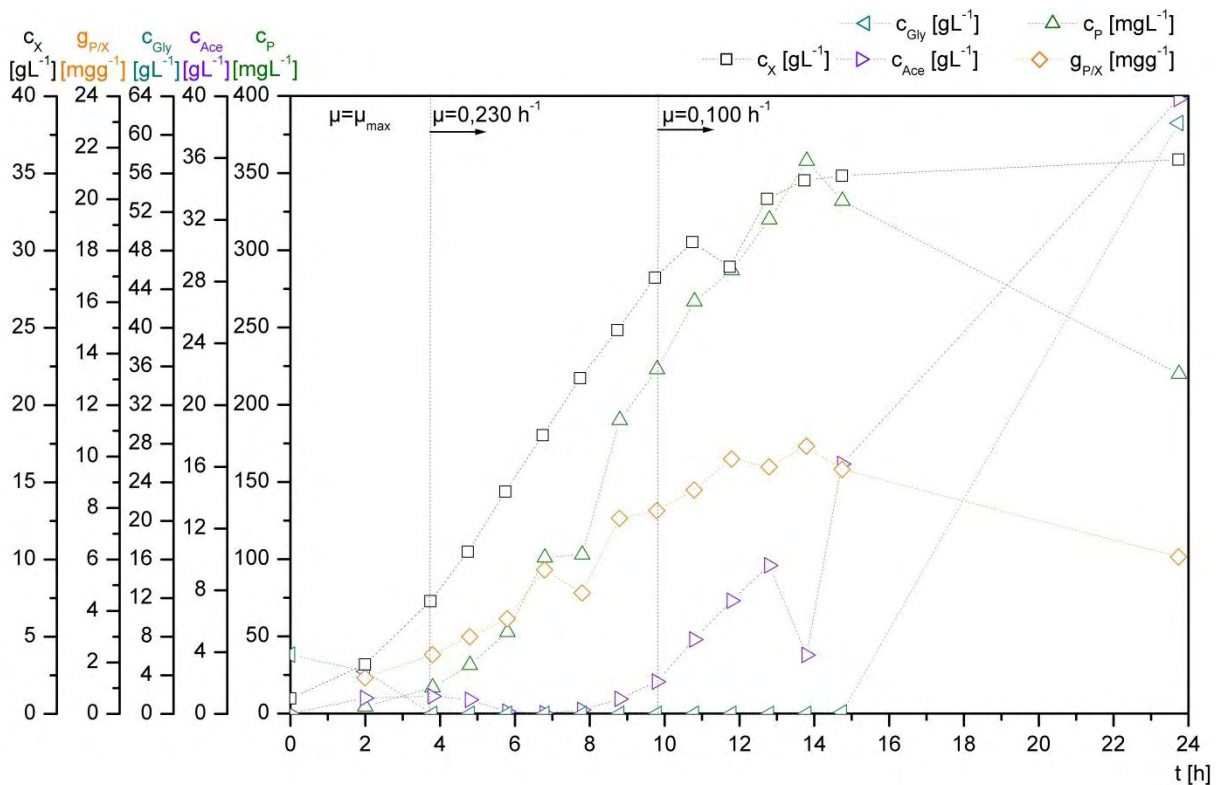


Abbildung 4.15: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat-, und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D3

Die Plasmidkonzentration liegt am Ende der Batch-Phase bei $7,3 \text{ mgL}^{-1}$ und weist bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,23 \text{ h}^{-1}$ einen steilen exponentiellen Anstieg auf (Abbildung 4.15). Nach sechs Stunden Zufütterung beträgt die Plasmidkonzentration 223 mgL^{-1} (Tabelle 4.20). Im Anschluss an die Reduzierung der zellspezifischen Wachstumsrate auf $0,10 \text{ h}^{-1}$ steigt die Plasmidkonzentration für weitere vier Stunden an und erreicht eine Maximalkonzentration von 358 mgL^{-1} . Anschließend sinkt die Plasmidkonzentration bis zum Prozessende auf 220 mgL^{-1} .

Der zellspezifische Plasmidgehalt beträgt bei D3 $2,3 \text{ mgg}^{-1}$ beim Feedstart. Zum Zeitpunkt der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate nach sechs Stunden Zufütterung liegt der zellspezifische Plasmidgehalt bei $7,9 \text{ mgg}^{-1}$. In den ersten vier Stunden nach der Umstellung steigt dieser auf $10,4 \text{ mgg}^{-1}$ an und sinkt anschließend bis zum Prozessende auf $6,1 \text{ mgg}^{-1}$.

Die Abnahme der Plasmidkonzentration nach 14 Stunden Prozesszeit kann mit der zunehmenden Alterung der Mikroorganismen begründet werden. Zum Umstellungszeitpunkt der zellspezifischen Wachstumsrate liegt bereits eine Acetatkonzentration von $2,08 \text{ gL}^{-1}$ vor. Acetat wird von den Mikroorganismen gebildet, sobald die Kapazität des aeroben Stoffwechsels überschritten wird und die primäre Kohlenstoffquelle

Tabelle 4.20: Prozessdaten des Fed-Batch Prozesses D3

Probe	Kulturzeit	μ	C_X	C_P	$g_{P/X}$	C_{Gly}	C_{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	0,23	1,0	-	-	6,14	0,02
1	2,0	0,23	3,2	4,5	1,4	4,40	1,01
2	3,8	0,23	7,3	16,9	2,3	n.n.	1,14
3	4,8	0,23	10,5	31,4	3,0	n.n.	0,91
4	5,8	0,23	14,4	52,7	3,7	n.n.	0,14
5	6,8	0,23	18,1	101	5,6	n.n.	0,03
6	7,8	0,23	21,8	103	4,7	n.n.	0,25
7	8,8	0,23	24,8	190	7,6	n.n.	0,96
8	9,8	0,23	28,3	223	7,9	n.n.	2,08
9	10,8	0,1	30,6	267	8,7	n.n.	4,79
10	11,8	0,1	28,9	287	9,9	n.n.	7,29
11	12,8	0,1	33,3	320	9,6	n.n.	9,56
12	13,8	0,1	34,6	358	10,4	n.n.	3,78
13	14,8	0,1	34,8	332	9,5	0,14	16,08
14	23,8	0,1	35,9	220	6,1	61,22	39,58

zusätzlich über den anaeroben Stoffwechsel abgebaut wird [29]. Dass die Kulturalterung bereits nach sechs Stunden soweit fortgeschritten ist, dass über 2 gL⁻¹ Acetat vorliegt, wird durch die höhere zellspezifische Wachstumsrate verursacht. Zum Zeitpunkt der Abnahme der Plasmidkonzentration beträgt die Acetatkonzentration 16,08 gL⁻¹. Zusätzlich zu der Kulturalterung kommt hinzu, dass das Acetat, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, einen negativen Einfluss auf die Produktbildung und das Wachstum der Mikroorganismen hat. Dies wird durch den geringen Anstieg der Zellkonzentration in den letzten elf Stunden des Prozesses deutlich.

Der Verlauf des zellspezifischen Plasmidgehalts weist bereits vor der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate einen geringeren Anstieg auf. Dadurch wird deutlich, dass die Kulturalterung bereits vor der Umstellung des μ für eine Verringerung der Plasmidsynthese sorgt. Nach der Umstellung wird der Anstieg für zwei Stunden nochmals steiler, bevor der zellspezifische Plasmidgehalt vier Stunden nach der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate sinkt. Das bedeutet, dass durch die Verringerung der zellspezifischen Wachstumsrate eine kurzzeitige und geringe Steigerung der Plasmidsynthese erzielt werden konnte.

Durch die Reduzierung der zellspezifischen Wachstumsrate wird der Stoffwechsel der Mikroorganismen verlangsamt. Ob die Veränderung der Stoffwechselgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Kulturalterung hat, muss in einem weiteren Versuch untersucht werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Ein Ansatz für einen weiteren Fed-Batch Prozess wäre die zellspezifische Wachstumsrate von $0,23 \text{ h}^{-1}$ länger beizubehalten. Dies wäre mit dem verwendeten Feedmedium jedoch nur für weitere eineinhalb Stunden möglich. Dann würde die maximale Förderleistung der Pumpe erreicht. Um dies zu vermeiden, müsste die Glycerinkonzentration von 400 gL^{-1} auf 650 gL^{-1} erhöht werden. Dadurch wäre eine Substratzuführung über zehn Stunden mit einer Verdünnungsrate von $0,230 \text{ h}^{-1}$ möglich. Ein noch höher konzentriertes Feedmedium würde eine noch längere Substratzuführung erlauben, jedoch wäre die Förderrate zu Beginn zu niedrig. Für noch längere Zufütterungsphasen bestünde die Option der Verwendung von zwei unterschiedlich konzentrierten Feedmedien. Mit dem ersten Feedmedium wird der Prozess solange betrieben, bis die Förderrate für das sehr hoch konzentrierte Feedmedium nicht mehr zu gering ist. Allerdings ist durch den Einsatz einer zweiten Pumpe der apparative Aufwand geringfügig höher. Des Weiteren muss die Zellkonzentration beachtet werden. Wenn diese zu hoch ist, kann auch mit der Begasung von reinem Sauerstoff kein ausreichender Sauerstofftransport gewährleistet werden.

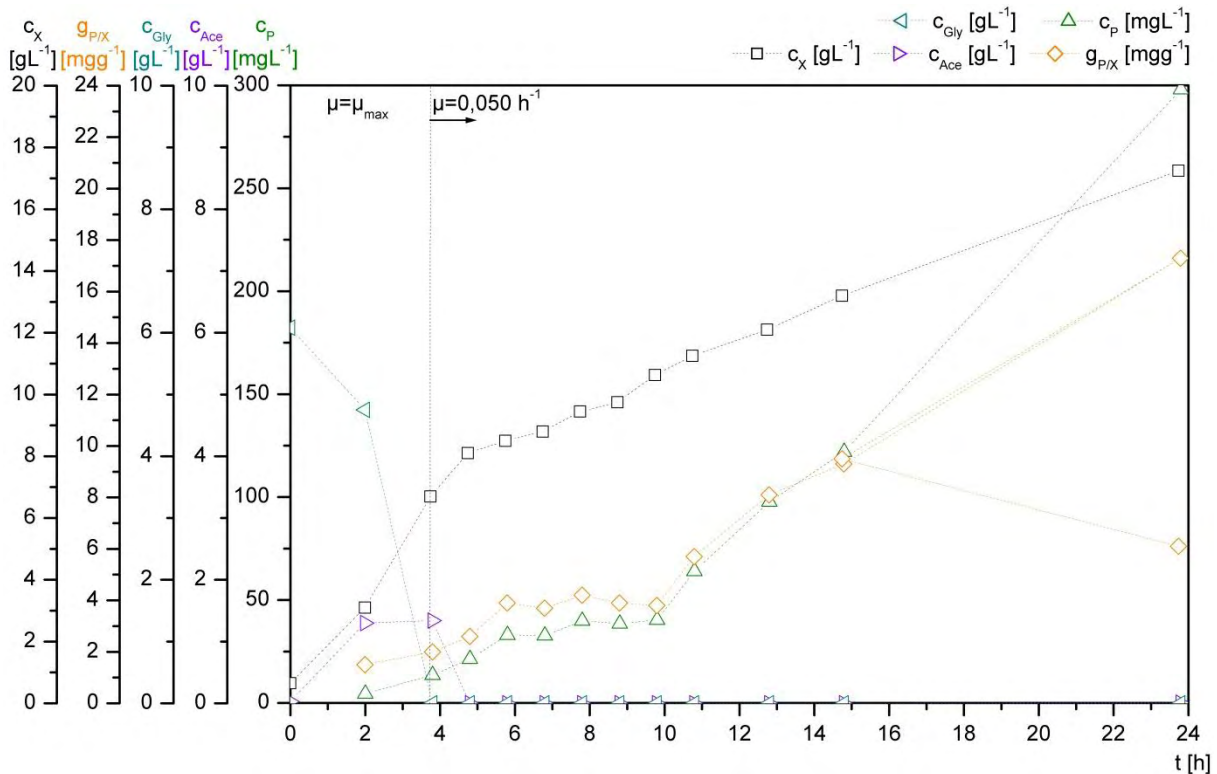


Abbildung 4.16: Verlauf der Zell-, Plasmid-, Acetat-, und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts von D4

Im vierten Fed-Batch Prozess wurde eine zellspezifische Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Damit ist diese die niedrigste in den vier Fed-Batch Prozessen. Wie die anderen Fed-Batch Prozesse wird der Verlauf der Plasmidkonzentration und des zellspezifischen Plasmidgehalts sowie die Kulturalterung von D4 analysiert.

Am Ende der Batch-Phase beträgt die Plasmidkonzentration $13,6 \text{ mgL}^{-1}$ (Tabelle 4.21). In den ersten sechs Stunden der Fed-Batch Phase liegt ein flacher Anstieg der Plasmidkonzentration vor, so dass diese um das Dreifache auf $40,3 \text{ mgL}^{-1}$ steigt (Abbildung 4.16). Im Anschluss ist der Anstieg der Plasmidkonzentration wesentlich stärker. Der Verlauf der Plasmidkonzentration weist eine nahezu exponentielle Form auf. Am Prozessende beträgt die Plasmidkonzentration 298 mgL^{-1} .

Der zellspezifische Plasmidgehalt bei D4 beträgt beim Feedstart $2,0 \text{ mgg}^{-1}$. Nach sechs Stunden Zufütterung beträgt dieser $3,8 \text{ mgg}^{-1}$ und liegt am Prozessende bei $17,3 \text{ mgg}^{-1}$.

Tabelle 4.21: Prozessdaten des Fed-Batch Prozesses D4

Probe	Kulturzeit	C_X	C_P	$g_{P/X}$	C_{Gly}	C_{Ace}
[-]	[h]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	0,7	-	-	6,08	0,03
1	2,0	3,1	4,5	1,5	4,75	1,30
2	3,8	6,7	13,6	2,0	n.n.	1,33
3	4,8	8,1	21,3	2,6	n.n.	n.n.
4	5,8	8,5	33,0	3,9	n.n.	n.n.
5	6,8	8,8	32,7	3,7	n.n.	n.n.
6	7,8	9,5	39,9	4,2	n.n.	n.n.
7	8,8	9,8	38,5	3,9	n.n.	n.n.
8	9,8	10,6	40,3	3,8	n.n.	n.n.
9	10,8	11,3	64,0	5,7	n.n.	n.n.
10	12,8	12,1	97,7	8,1	n.n.	n.n.
11	14,8	13,2	122	9,3	n.n.	n.n.
12	23,8	17,2	298	17,3	n.n.	0,01

Anhand der Plasmidkonzentration und des zellspezifischen Plasmidgehalts ist keine Kulturalterung im Prozess zu erkennen. Die Acetatkonzentration (Tabelle 4.21) beträgt am Prozessende 0,01 gL⁻¹. Dies bedeutet, dass die Alterung der Mikroorganismen noch nicht weit fortgeschritten ist. Damit kann mit einer zellspezifischen Wachstumsrate von 0,05 h⁻¹ eine längere Prozesszeit gewählt werden.

Bei der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate nach sechs Stunden Zufütterung wird damit bei D3 mit 223 mgL⁻¹ die höchste Plasmidkonzentration erreicht sowie ein doppelt so hoher Anstieg der Plasmidkonzentration beobachtet wie bei dem besten (D1) der drei anderen Kultivierungen. Jedoch ist bei D3 bereits zu diesem Zeitpunkt ein Einfluss der Kulturalterung auf die Plasmidsynthese nachzuweisen. Bei den anderen drei Prozessen ist dies nicht der Fall.

Wie bei der Plasmidkonzentration weist D3 auch den höchsten zellspezifischen Plasmidgehalt zum Zeitpunkt der Umstellung der zellspezifischen Wachstumsrate mit 7,9 mgg⁻¹ auf. Damit beträgt der Unterschied zu den Prozessen mit einem μ von 0,10 h⁻¹ mit 4,5 mgg⁻¹ mehr als 75%. Im Vergleich zu D4 mit 3,8 mgg⁻¹ ist der zellspezifische Plasmidgehalt bei D3 108% höher. Damit wird deutlich, dass nach knapp sechs Stunden Zufütterung die einzelne Bakterienzelle bei einem μ von 0,23 h⁻¹ wesentlich mehr Plasmide synthetisiert als mit einem μ von 0,10 h⁻¹ und 0,05 h⁻¹. Mit der niedrigsten zellspezifischen Wachstumsrate beim Umstellungszeitpunkt wird damit die geringste Ausbeute erzielt. Diese ist jedoch lediglich 16% niedriger als die Ausbeute der Prozesse mit einem μ von 0,10 h⁻¹.

Am Prozessende weisen die Bioreaktoren mit einem μ von $0,10 \text{ h}^{-1}$ mit über 700 mgL^{-1} deutlich die höchste Plasmidkonzentration auf (Abbildung 4.17). Die zweithöchste Plasmidkonzentration wird bei D4 mit 298 mgL^{-1} erzielt. Bei D4 wäre eine längere Prozesszeit möglich, da die Kulturalterung noch nicht weit fortgeschritten ist. Diese ist bei den Prozessen mit einem μ von $0,10 \text{ h}^{-1}$ wesentlich weiter fortgeschritten. Bei D3 ist die Kulturalterung soweit fortgeschritten, dass die Plasmidsynthese soweit zurückgegangen ist, dass die Plasmidkonzentration geringer wird und am Prozessende 220 mgL^{-1} beträgt. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Fed-Batch Prozesse bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ reproduzierbar sind.

Der zellspezifische Plasmidgehalt ist am Prozessende mit über 20 mgg^{-1} bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ am höchsten (Abbildung 4.17). Die Differenz zu den $17,3 \text{ mgg}^{-1}$ bei einem μ von $0,05 \text{ h}^{-1}$ beträgt $23,5\%$. Dadurch wird deutlich, dass der Grund für die hohe Differenz von mehr als 140% bei der Plasmidkonzentration hauptsächlich durch eine um den Faktor zwei geringere Zellkonzentration hervorgerufen wird. Bei D3 liegt der zellspezifische Plasmidgehalt am Prozessende mit $6,1 \text{ mgg}^{-1}$ um $70,8\%$ niedriger als bei einem μ von $0,10 \text{ h}^{-1}$. Der Grund dafür, dass bei D3 am Prozessende deutlich weniger pDNA erzielt wird, ist die Kulturalterung.

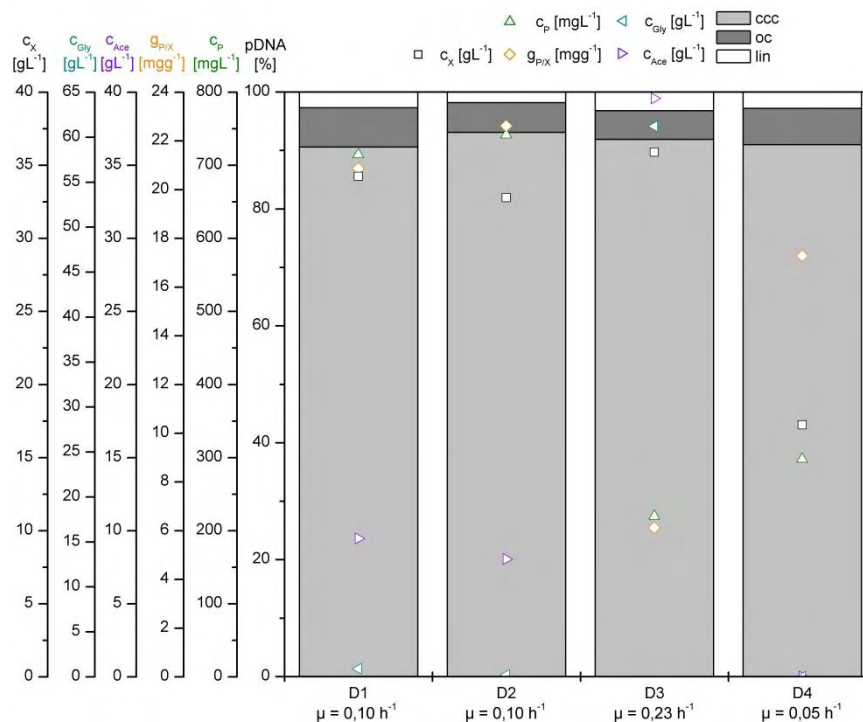


Abbildung 4.17: Darstellung der pDNA-Konformationsverteilung, der Zell-, Plasmid-, Acetat- und Glycerinkonzentration sowie des zellspezifischen Plasmidgehalts am Ende der Fed-Batch Prozesse

In Abbildung 4.17 ist neben den Zell-, Plasmid-, Acetat- und Glycerinkonzentrationen sowie den zellspezifischen Plasmidgehalten am Prozessende die Verteilung der Plasmidkonformationen dargestellt. Die Verteilung der pDNA-Konformationen ist wichtig, da der ccc-Anteil der pDNA für pharmazeutische Anwendungen bei mindestens 95% liegen muss [30]. Die Auftrennung der pDNA-Konformationen wurde mit einem 1%igen Agarosegel für 90 Minuten bei 90 Volt durchgeführt.

Die Ausbeuten an ccc-pDNA sowie oc- und lin-pDNA sind in allen vier Fed-Batch Prozessen vergleichbar. Mit 91% bei D1, 93% bei D2 sowie 92% und 91% für D3 und D4 liegt der ccc-Anteil bei allen Prozessen über 90%. Damit wird die Bedingung, dass für eine pharmazeutische Anwendung eine Reinheit von 95% [30] benötigt wird, allein durch die Produktion der pDNA durch die Mikroorganismen annähernd erfüllt. Mit diesem Ergebnis wird deutlich, dass die zellspezifische Wachstumsrate in dem Bereich von $0,05 \text{ h}^{-1}$ bis $0,23 \text{ h}^{-1}$ keinen erkennbaren Einfluss auf den ccc-Anteil der pDNA hat.

Die Bestimmung der Konformationsverteilung wurde mit Hilfe der Auftrennung in einem Agarosegel und der Analyse der Bandenintensität durchgeführt und kann daher nicht als exakt angesehen werden. Für eine exakte Bestimmung ist es notwendig, dass mit der HPLC-Analytik nicht nur der Gesamtplasmidgehalt bestimmt werden kann, sondern auch die Konformationen getrennt werden können. Solch eine Methode stand während der durchgeführten Arbeiten in der Prozessentwicklung noch nicht zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Der Themenschwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse der Plasmid-DNA Bildung in Kultivierungen rekombinanter *Escherichia coli* in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessführungsstrategien. Als Prozessführungsstrategien wurden zwei kontinuierliche Prozesse mit dem Prinzip des Chemostaten und vier Fed-Batch Prozesse durchgeführt.

Die kontinuierlichen Prozesse hatten eine Kultivierungsdauer von 388 bzw. 243 Stunden. Untersucht wurde das Verhalten der Plasmid-DNA Bildung bei unterschiedlichen zellspezifischen Wachstumsraten mit Blick auf die Kulturalterung und der Verteilung der pDNA-Konformationen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,101 \text{ h}^{-1}$ die Plasmidkonzentration, nach einer vierstündigen Batch-Phase, in den ersten 21 bis 25 Stunden einen steilen Anstieg aufweist und ihren Maximalwert erreicht. Aufgrund der Alterung der Mikroorganismen nimmt im weiteren Verlauf der Kultivierung die Plasmidkonzentration in einer Abklingfunktion über 75 Stunden ab. Des Weiteren wurde bestätigt, dass eine Erhöhung der zellspezifischen Wachstumsrate im Chemostaten einen negativen Einfluss auf die Plasmidkonzentration hat und die Kulturalterung beschleunigt. Neben den Erkenntnissen zur Kulturalterung wurde zusätzlich gezeigt, dass bei den durchgeführten Versuchen mit Glycerin als primäre Kohlenstoffquelle ein um 55,6% höherer zellspezifischer Plasmidgehalt erreicht werden konnte, obwohl die eingesetzte Menge der Kohlenstoffquelle 30% der eingesetzten Menge bei bereits durchgeführten Versuchen mit Glucose betrug. Zusätzlich wird bei der pDNA ein ccc-Anteil von über 90% erhalten. Dadurch wird die Bedingung von 95% ccc-Anteil bei der pDNA für pharmazeutische Anwendungen ohne Aufreinigung fast erfüllt.

Mit den Erkenntnissen aus den zwei durchgeführten kontinuierlichen Prozessen wurden vier Fed-Batch Prozesse mit einem Multibioreaktorsystem durchgeführt. Die Fed-Batch Prozesse unterschieden sich darin, dass verschiedene zellspezifische Wachstumsraten festgelegt wurden. Zwei der Bioreaktoren wiesen eine zellspezifische Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ auf und die anderen beiden Bioreaktoren eine zellspezifische Wachstumsrate von $0,23 \text{ h}^{-1}$ sowie $0,05 \text{ h}^{-1}$.

Bei den Fed-Batch Prozessen konnte anhand des Verlaufs der Acetatkonzentration bestätigt werden, dass bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ nach 20 Stunden Substratzuführung die Kulturalterung soweit fortgeschritten ist, dass die aerobe Stoffwechselkapazität der Zelle nachlässt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass bei einer höheren zellspezifischen Wachstumsrate die Kulturalterung schneller voranschreitet, als bei einer geringeren.

Die höchsten Plasmidkonzentrationen wurden mit über 700 mgL^{-1} nach 20 Stunden Substratzuführung bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Aufgrund der Tatsache, dass bei beiden Bioreaktoren mit dieser Wachstumsrate vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden, ist dies ein Nachweis für die Reproduzierbarkeit der Versuche. Ebenfalls wurde bei einer zellspezifischen Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ mit über 20 mgg^{-1} der höchste zellspezifische Plasmidgehalt nach 20 Stunden Substratzuführung erreicht. Der ccc-Anteil bei der pDNA liegt unabhängig von der zellspezifischen Wachstumsrate wie bei den kontinuierlichen Prozessen über 90%. Dadurch wird auch bei den Fed-Batch Prozessen die Bedingung von mindestens 95% ccc-Anteil bei der pDNA für pharmazeutische Anwendungen ohne Aufreinigung fast erfüllt.

6. Ausblick

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei niedrigeren Wachstumsraten höhere Plasmidkonzentrationen erreicht werden können. Jedoch ist dies, wie festgestellt wurde, abhängig von der Prozesslaufzeit. Mit Blick auf einen Produktionsprozess muss daher geklärt werden, bei welcher zellspezifischen Wachstumsrate und Prozessdauer die Plasmid-DNA am wirtschaftlichsten produziert werden kann.

Des Weiteren ist die Wahl des Mediums ein weiterer Ansatzpunkt der untersucht werden muss. So ist zu überprüfen, ob mit einem Mineralmedium höhere Plasmidkonzentrationen erreicht werden können, als mit einem Kompletmedium. Dazu muss untersucht werden, welche Bestandteile das Mineralmedium für die Mikroorganismen aufweisen muss. Dazu kann in Multititerplatten ein Medienscreening durchgeführt werden. Dabei können die Konzentrationen der Medienkomponenten variiert sowie unterschiedliche Spurenelemente und Aminosäurekombinationen überprüft werden.

Die Stamm-Vektor-Kombination ist neben den Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen ein weiterer Ansatzpunkt für die Steigerung der Plasmidausbeute der untersucht werden kann. Dazu sollte untersucht werden, welche Stämme die höchste Plasmidausbeute mit einem hohen ccc-Anteil liefern. Zusätzlich muss untersucht werden, welche Vektorgröße und Vektorzusammensetzung die Plasmidausbeute und den ccc-Anteil steigern kann. Dazu können zum Beispiel unterschiedliche Replikationsursprünge untersucht werden.

Im Hinblick auf die hohen Qualitätsanforderungen für pharmazeutische Anwendungen auf Basis von Plasmid-DNA ist eine exakte und robuste Analytik essenziell. Daher ist es für die Zukunft wichtig, dass eine Analytikmethode zur Verfügung steht, die es ermöglicht alle vorliegenden Konformationen der Plasmid-DNA zu trennen und somit die gewünschte ccc-Konformation zielgerichtet aufzureinigen zu können. Dies kann durch den Einsatz eines flacheren Gradienten der Salzkonzentration probiert werden sowie durch unterschiedliche pH-Werte der HPLC-Puffer. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass mit unterschiedlichen Temperaturen der Trennungsgrad beeinflusst werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Agilent Technologies:** *Agilent Hi-Plex Ligand-Exchange HPLC Columns*. (2008).
- [2] **Antranikian, G.:** *Angewandte Mikrobiologie*. (2006), Springer Verlag, S. 242.
- [3] **BIA Separations:** *Product Specific Information Sheet - CIMac™ Analytical Column for Ion Exchange Chromatography*. (2012).
- [4] **Birnboim, H.C. & Doly, J.:** *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Research* Vol. 7 (1979), S. 1513-1523.
- [5] **Borja, G. M., et al.:** *Engineering Escherichia coli to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode*. *Microbial Cell Factories* Vol. 11 (2012).
- [6] **Carnes, A. E., Hodgson, C. P. & Williams J. A.:** *Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* Vol. 45 (2006), S. 155-166.
- [7] **Chmiel, H.:** *Bioprozesstechnik*. (2011), Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, S. 99-133.
- [8] **Driehuis, F. & Wouters, J. T. M.:** *Effect of Growth Rate and Cell Shape on the Peptidoglycan Composition in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* Vol. 169 (1987), S. 97-101.
- [9] **Durfee, T., et al.:** *The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B – Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse*. *Journal of Bacteriology* Vol. 190 (2008), S. 2597-2606.
- [10] **EMA.:** *Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products*. *Official Journal of the European Union* Vol. 410/01 rev.3 (2011).
- [11] **Friehs, K. H.:** *Maßnahmen zur Verbesserung der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS*. *Habilitationsschrift* (1999), Universität Bielefeld.
- [12] **Gey, M. H.:** *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. (2008), Springer Verlag, 2. Auflage, S. 91-171.
- [13] **Graw, J.:** *Genetik*. (2010), Springer Verlag, 5. Auflage, S. 96-109.

- [14] **Grote, K.H. & Feldhusen, J.:** *Dubbel-Taschenbuch für den Maschinenbau.* (2011), Springer Verlag, 23. Auflage, S. 49-52.
- [15] **Han, Y., Liu, S., Ho, J., Danquah, M. K. & Forde, G. M.:** *Using DNA as a drug – Bioprocessing and delivery strategies.* Chemical Engineering Research and Design Vol. 87 (2009), S. 343-348.
- [16] **Jansohn, M. & Rothhämel, S.:** *Gentechnische Methoden.* (2012), Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage.
- [17] **Jepert, G. J.:** *Flüssigchromatographie – HPLC-Theorie und Praxis.* (1997), Springer-Vieweg Verlag, S. 145f.
- [18] **Lara, A. R., Ramirez, O. T. & Wunderlich, M.:** *Plasmid DNA production for therapeutic applications.* Recombinant Gene Expression Methods in Molecular Biology Vol. 824 (2012), S. 271-303.
- [19] **Leive, L.:** *Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E. coli.* Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 21 (1965). S. 290-296.
- [20] **Lemke, R.:** *Untersuchung von Prozessparametern zur Optimierung der pDNA-Ausbeute in kontinuierlicher Kultur am Konzept des Chemostaten,* unv. BA., Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg 2013.
- [21] **Levy, M. S., Lotfian, P., O’Kennedy, R., Lo-Yim, M. Y. & Shamlou, P. A.:** *Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using fluorescence-based method.* Nucleic Acids Research Vol. 28 (2000).
- [22] **Meyer, J. & Mies, R.:** *Zell- und Molekularbiologie in der Inneren Medizin – Grundlagen und klinische Relevanz.* (2006), Georg Thieme Verlag, S. 59-61.
- [23] **Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S. & Gonzalez, R.:** *Fermentative Utilization of Glycerol by Escherichia coli and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals.* Applied and Environment Microbiology Vol. 74 (2008), S. 1124-1135.
- [24] **Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R.:** *Phosphoenolpyruvate – carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.* Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 57 (1993), S. 543-594.
- [25] **Scheper, T., Stockar, U. & Wielen, L. A. M.:** *Process Integration in Biochemical Engineering.* Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology Vol. 80 (2003), S. IX-XV.

-
- [26] **Schlegel, H. G.:** *Allgemeine Mikrobiologie.* (2006), Georg Thieme Verlag, 8. Auflage.
- [27] **Streitner, N.:** *Extraktion pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA und Integration in einen skalierbaren Aufarbeitungsprozess,* unv. Diss., Universität Bielefeld 2008.
- [28] **Suerbaum, S., et al.:** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* (2012), Springer Verlag, 7. Auflage, S.173-175, 230.
- [29] **Veit, A.:** *Untersuchungen zum Überflussmetabolismus in Escherichia coli.* Diss., Universität Düsseldorf 2005.
- [30] **Voß, C.:** *Aufarbeitung von Plasmid-DNA für Gentherapie und genetische Impfung.* Chemie Ingenieur Technik No. 6 (2008), S. 795-802.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Janis Brockhaus, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, November 2013

9. Anhang

Übersicht der Messdaten des ersten kontinuierlichen Prozesses

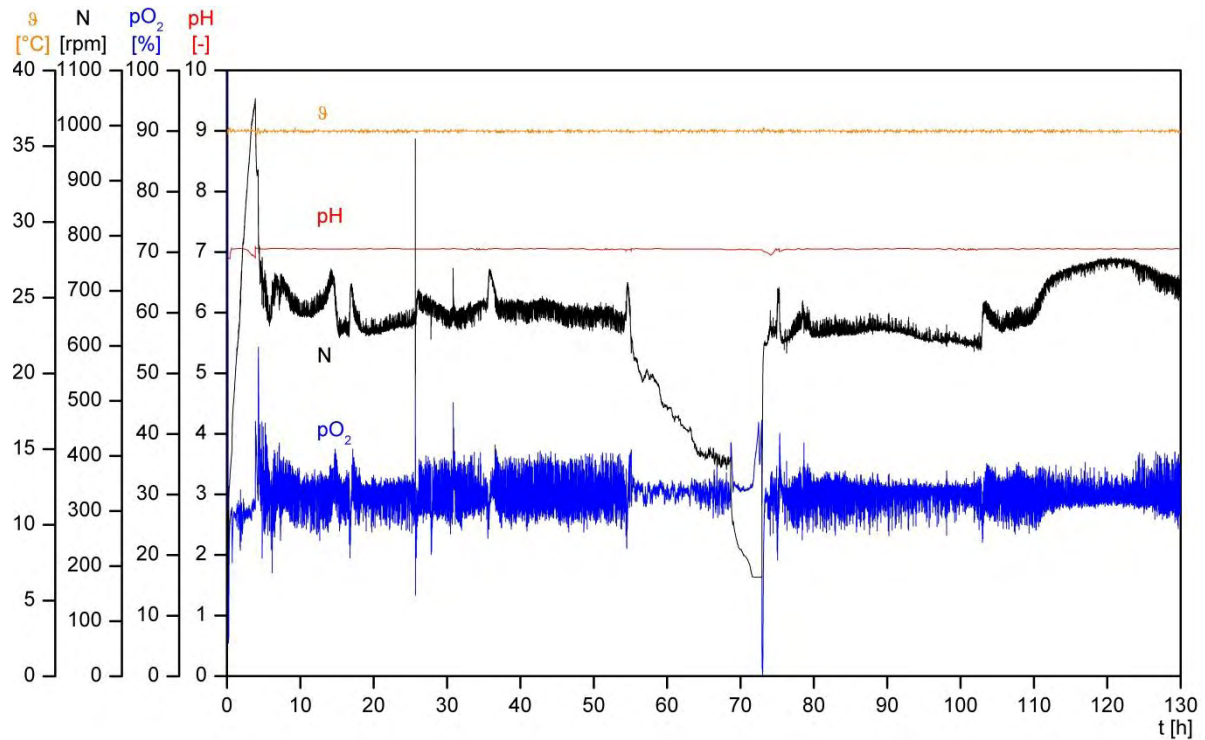


Abbildung 9.1: On-line Messgrößen bis 130 Stunden Prozesszeit des ersten Prozesses

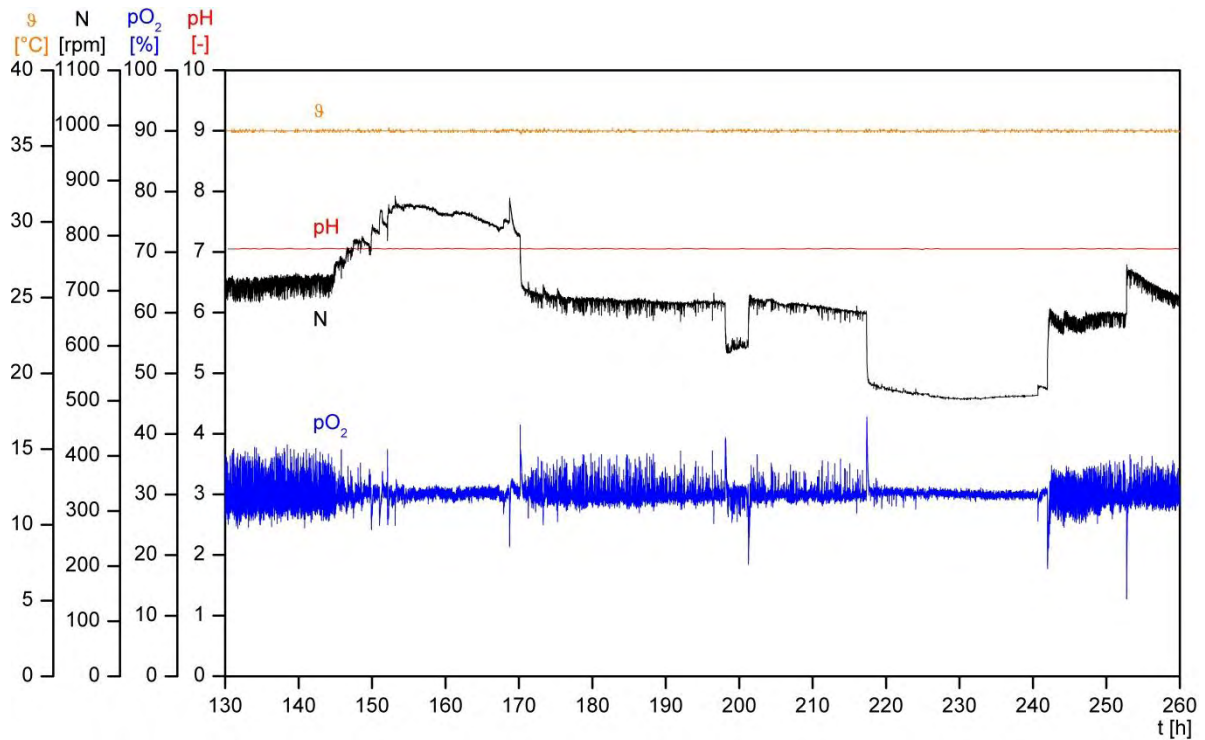


Abbildung 9.2: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 130 und 260 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses

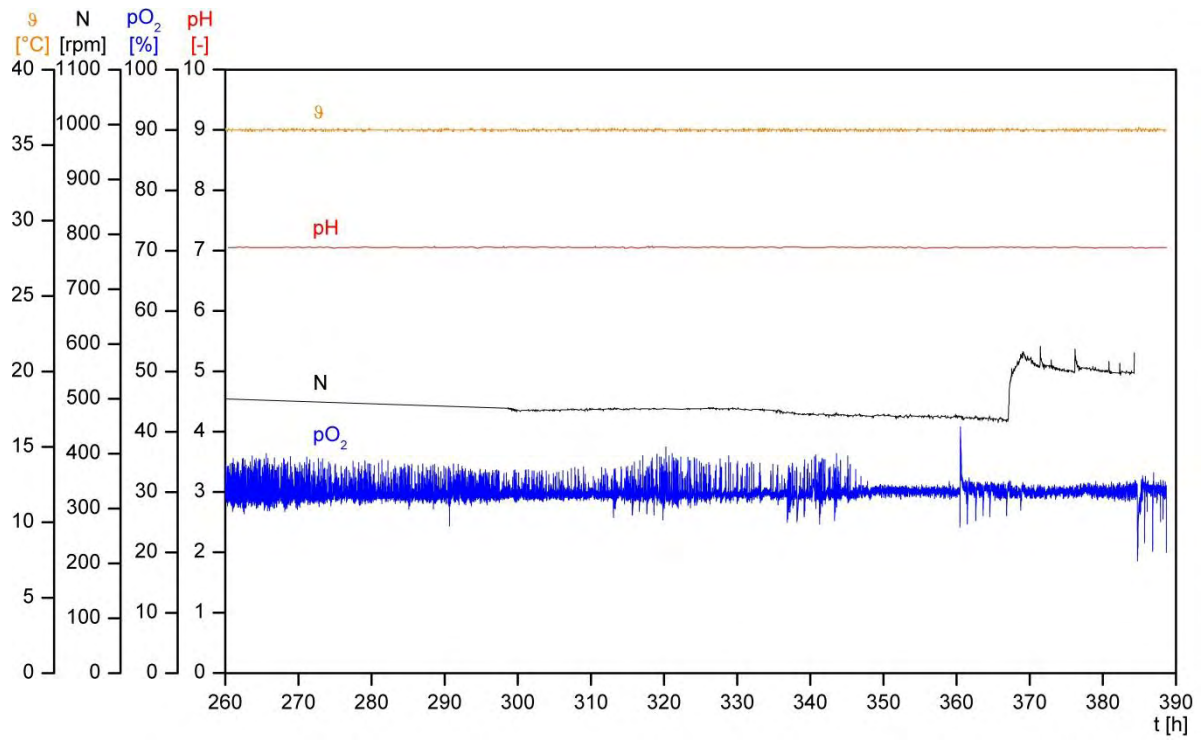


Abbildung 9.3: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 260 und 390 Stunden Prozesszeit des ersten kontinuierlichen Prozesses

Tabelle 9.1: Übersicht der off-line Parameter des ersten kontinuierlichen Prozesses bis Probe 40

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0,0	max	1,5	0,5	-	-	5,08	0,00
1	2,0	max	7,5	2,5	-	-	3,93	0,11
2	3,7	0,101	18,7	6,7	12,8	1,9	n.n.	0,12
3	5,7	0,101	18,8	8,4	23,1	2,7	n.n.	n.n.
4	7,7	0,101	19,8	9,1	25,7	2,8	n.n.	n.n.
5	8,9	0,101	21,5	8,6	31,9	3,7	n.n.	n.n.
6	24,6	0,101	22,3	7,2	75,5	10,5	n.n.	n.n.
7	26,6	0,101	22,3	7,1	75,8	10,8	n.n.	n.n.
8	28,6	0,101	20,9	6,8	81,2	11,9	n.n.	n.n.
9	30,6	0,120	19,8	6,3	67,0	10,5	n.n.	n.n.
10	32,6	0,120	17,8	6,1	55,6	9,0	n.n.	n.n.
11	48,4	0,120	18,5	6,5	26,4	4,0	n.n.	n.n.
12	50,4	0,120	17,8	7,0	25,4	3,6	n.n.	n.n.
13	52,4	0,120	18,6	6,9	23,4	3,4	n.n.	n.n.
14	54,4	0,120	18,7	6,9	24,9	3,6	n.n.	n.n.
15	56,4	0,120	19,8	7,1	21,9	3,1	n.n.	n.n.
16	72,1	0,120	15,3	5,6	20,7	3,7	n.n.	n.n.
17	73,8	0,120	13,5	4,9	19,8	4,0	n.n.	0,02
18	74,9	0,120	14,1	5,4	13,7	2,5	n.n.	n.n.
19	76,4	0,120	14,9	5,7	16,2	2,9	n.n.	n.n.
20	77,6	0,120	15,4	6,0	17,4	2,9	n.n.	n.n.
21	79,2	0,120	16,6	6,6	16,7	2,5	n.n.	n.n.
22	106	0,230	21,9	7,7	7,4	1,0	n.n.	n.n.
23	144	0,230	21,0	8,0	8,4	1,1	n.n.	n.n.
24	145	0,230	21,6	7,8	8,2	1,1	n.n.	n.n.
25	146	0,230	21,8	7,5	12,7	1,7	n.n.	n.n.
26	147	0,230	22,8	7,6	9,1	1,2	n.n.	n.n.
27	148	0,230	21,4	7,6	9,1	1,2	n.n.	n.n.
28	150	0,230	21,9	7,7	7,0	0,9	n.n.	n.n.
29	151	0,230	22,6	7,6	1,8	0,2	n.n.	n.n.
30	152	0,230	25,0	7,4	2,9	0,4	n.n.	n.n.
31	153	0,230	23,9	7,4	3,5	0,5	n.n.	n.n.
32	154	0,230	24,3	7,3	9,0	1,2	n.n.	n.n.
33	168	0,230	27,6	8,4	3,3	0,4	n.n.	n.n.
34	170	0,230	26,3	8,4	4,3	0,5	n.n.	n.n.
35	171	0,104	25,3	8,3	2,4	0,3	n.n.	n.n.
36	172	0,104	22,6	7,9	3,4	0,4	n.n.	n.n.
37	173	0,104	23,5	8,3	2,0	0,2	n.n.	n.n.
38	175	0,104	24,2	8,2	3,3	0,4	n.n.	n.n.
39	177	0,104	23,0	8,1	3,5	0,4	n.n.	n.n.
40	196	0,104	22,0	7,8	7,2	0,9	n.n.	n.n.
41	198	0,104	22,0	7,6	4,5	0,6	n.n.	n.n.

Tabelle 9.2: Übersicht der off-line Parameter des ersten kontinuierlichen Prozesses ab Probe 41

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
42	199	0,068	20,1	7,5	6,4	0,9	n.n.	n.n.
43	200	0,068	21,9	7,7	4,7	0,6	n.n.	n.n.
44	201	0,068	19,8	7,4	6,3	0,8	n.n.	n.n.
45	205	0,103	20,1	7,3	6,5	0,9	n.n.	n.n.
46	216	0,103	22,8	7,8	5,0	0,6	n.n.	n.n.
47	217	0,103	19,6	8,1	2,3	0,3	n.n.	n.n.
48	218	0,103	21,8	7,9	2,9	0,4	n.n.	n.n.
49	219	0,049	21,3	7,7	2,2	0,3	n.n.	n.n.
50	220	0,049	22,0	7,8	2,9	0,4	n.n.	n.n.
51	221	0,049	20,5	7,7	2,3	0,3	n.n.	n.n.
52	222	0,049	21,7	7,8	2,5	0,3	n.n.	n.n.
53	224	0,049	20,6	7,7	2,3	0,3	n.n.	n.n.
54	240	0,049	21,1	7,5	3,2	0,4	n.n.	n.n.
55	242	0,049	19,5	7,6	1,2	0,2	n.n.	n.n.
56	243	0,103	20,4	7,7	5,4	0,7	n.n.	n.n.
57	244	0,103	22,0	7,9	7,0	0,9	n.n.	n.n.
58	245	0,103	21,6	8,0	11,0	1,4	n.n.	n.n.
59	247	0,103	20,6	8,2	10,4	1,3	n.n.	n.n.
60	290	0,103	21,2	8,6	2,3	0,3	n.n.	n.n.
61	313	0,103	21,0	8,4	1,5	0,2	n.n.	n.n.
62	315	0,103	21,2	8,2	5,0	0,6	n.n.	n.n.
63	316	0,103	22,5	8,1	1,9	0,2	n.n.	n.n.
64	317	0,103	23,5	8,0	2,4	0,3	n.n.	n.n.
65	318	0,103	23,0	8,1	1,0	0,1	n.n.	n.n.
66	320	0,103	20,6	8,3	1,7	0,2	n.n.	n.n.
67	337	0,103	22,3	8,4	1,6	0,2	n.n.	n.n.
68	339	0,103	21,3	8,5	2,1	0,2	n.n.	n.n.
69	341	0,103	22,2	8,5	2,0	0,2	n.n.	n.n.
70	343	0,103	22,5	8,6	1,6	0,2	n.n.	n.n.
71	360	0,103	22,7	9,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
72	361	0,044	25,1	9,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
73	362	0,044	25,2	9,1	1,3	0,1	n.n.	n.n.
74	363	0,044	24,9	8,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
75	364	0,044	24,8	9,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
76	367	0,044	25,0	8,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
77	369	0,044	23,1	8,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
78	384	0,044	24,8	8,0	3,2	0,4	n.n.	n.n.
79	385	0,102	19,3	8,1	2,2	0,3	n.n.	n.n.
80	386	0,102	21,2	8,2	2,3	0,3	n.n.	n.n.
81	388	0,102	23,5	8,3	1,8	0,2	n.n.	n.n.

Übersicht der Messdaten des zweiten kontinuierlichen Prozesses

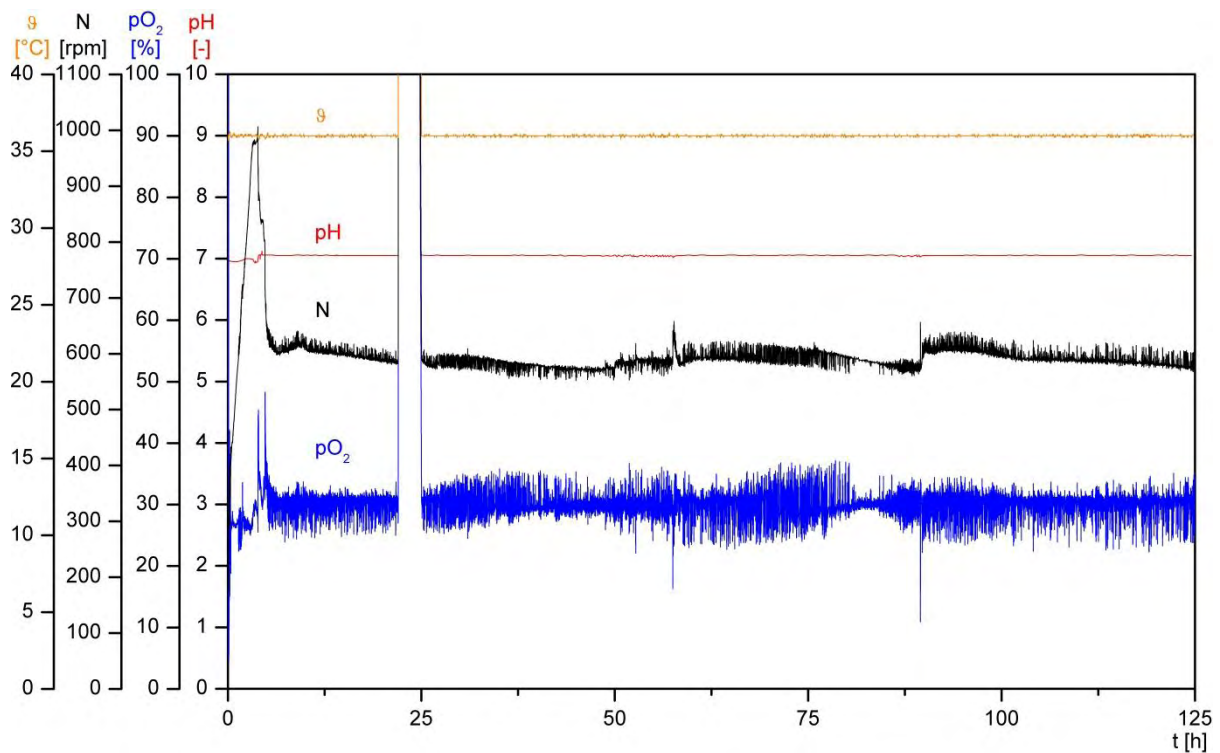


Abbildung 9.4: Verlauf der on-line Messgrößen der ersten 125 Stunden Prozesszeit der zweiten kontinuierlichen Kultivierung

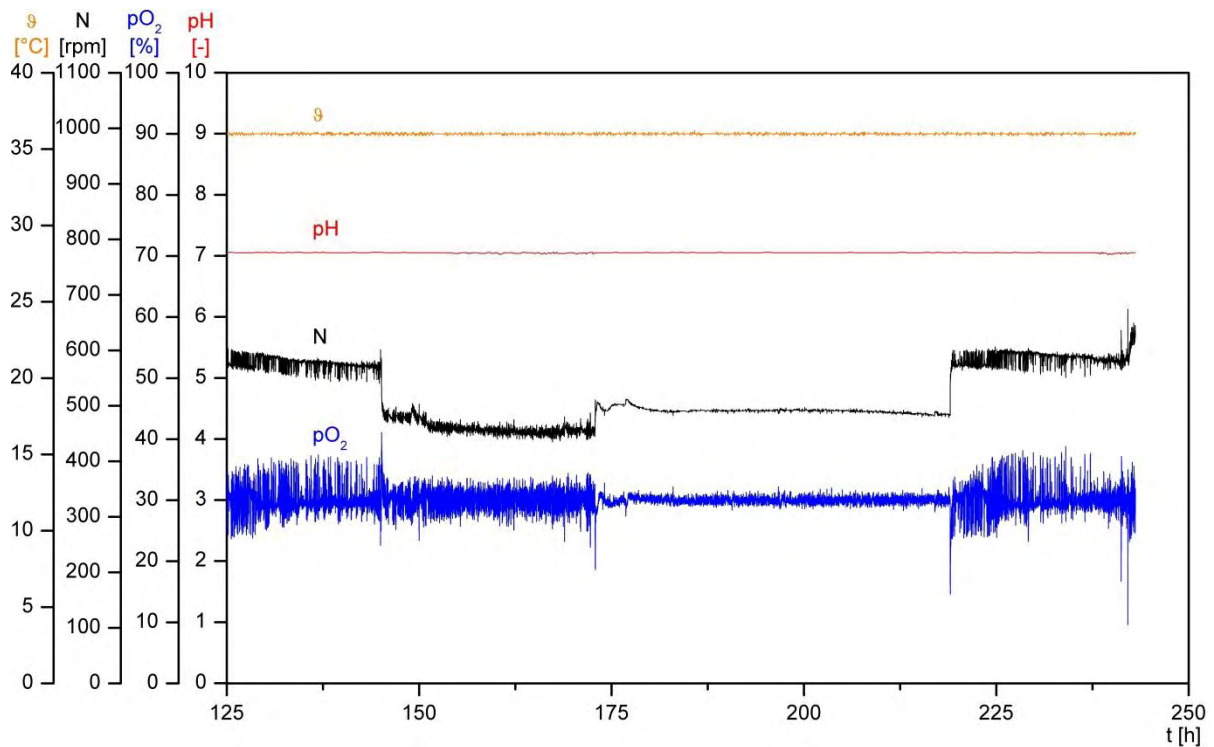


Abbildung 9.5: Verlauf der on-line Messgrößen in der Zeit zwischen 125 und 250 Stunden Prozesszeit der zweiten kontinuierlichen Kultivierung

Tabelle 9.3: Übersicht der off-line Parameter der zweiten kontinuierlichen Kultivierung bis Probe 37

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	max	1,4	0,2	-	-	5,98	0,10
1	2,0	max	6,2	1,6	2,4	1,5	4,97	0,93
2	3,9	0,101	19,3	6,0	12,9	2,2	n.n.	1,38
3	4,9	0,101	20,5	6,3	21,6	3,5	n.n.	n.n.
4	5,9	0,101	19,4	5,4	20,5	3,8	n.n.	n.n.
5	6,9	0,101	19,3	5,7	24,2	4,2	n.n.	n.n.
6	7,9	0,101	18,9	5,1	25,8	5,0	n.n.	n.n.
7	8,9	0,101	19,0	5,3	24,0	4,5	n.n.	n.n.
8	25,0	0,101	13,0	3,8	71,8	18,9	n.n.	n.n.
9	27,0	0,101	12,9	3,9	64,3	16,7	n.n.	n.n.
10	29,0	0,101	12,5	3,7	64,4	17,7	n.n.	n.n.
11	31,0	0,101	12,3	3,7	60,4	16,3	n.n.	n.n.
12	33,0	0,101	12,1	3,6	58,4	16,0	n.n.	n.n.
13	48,8	0,101	11,2	3,3	24,6	7,6	n.n.	n.n.
14	50,8	0,101	11,4	3,2	26,1	8,2	n.n.	n.n.
15	52,8	0,101	11,1	2,9	25,1	8,5	n.n.	n.n.
16	54,8	0,101	11,1	3,2	21,8	6,7	n.n.	n.n.
17	56,8	0,101	11,1	3,3	25,9	7,9	n.n.	n.n.
18	73,8	0,101	11,4	4,0	19,4	4,8	n.n.	n.n.
19	75,8	0,101	11,0	3,6	15,0	4,2	n.n.	n.n.
20	77,0	0,101	11,0	3,7	17,1	4,6	n.n.	n.n.
21	104	0,101	11,7	4,0	12,8	3,2	n.n.	n.n.
22	145	0,101	13,9	3,7	13,5	3,6	n.n.	n.n.
23	146	0,052	13,7	3,8	14,7	3,9	n.n.	n.n.
24	147	0,052	13,7	3,8	15,2	3,9	n.n.	n.n.
25	148	0,052	13,8	3,5	12,0	3,4	n.n.	n.n.
26	149	0,052	13,9	3,6	14,0	3,9	n.n.	n.n.
27	150	0,052	13,9	3,6	13,5	3,7	n.n.	n.n.
28	151	0,052	13,9	3,1	13,8	4,5	n.n.	n.n.
29	152	0,052	13,9	3,6	14,6	4,1	n.n.	n.n.
30	154	0,052	13,7	3,2	14,6	4,6	n.n.	n.n.
31	169	0,052	13,4	3,1	9,7	3,2	n.n.	n.n.
32	171	0,052	13,2	3,1	8,3	2,7	n.n.	n.n.
33	173	0,052	13,3	3,0	16,8	5,6	n.n.	n.n.
34	175	0,052	13,3	3,5	19,4	5,6	n.n.	n.n.
35	177	0,052	14,0	3,6	17,8	5,0	n.n.	n.n.
36	193	0,052	13,2	5,1	19,7	3,9	n.n.	n.n.
37	195	0,052	13,4	6,2	18,1	2,9	n.n.	n.n.

Tabelle 9.4: Übersicht der off-line Parameter der zweiten kontinuierlichen Kultivierung ab Probe 38

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
38	197	0,052	13,1	5,4	20,3	3,8	n.n.	n.n.
39	199	0,052	13,2	5,2	15,9	3,0	n.n.	n.n.
40	217	0,052	13,3	5,4	19,2	3,6	n.n.	n.n.
41	219	0,052	13,2	5,5	17,5	3,2	n.n.	n.n.
42	220	0,101	13,0	5,5	18,9	3,4	n.n.	n.n.
43	221	0,101	12,9	5,2	17,6	3,4	n.n.	n.n.
44	224	0,101	13,7	5,4	18,6	3,4	n.n.	n.n.
45	225	0,101	13,8	5,4	14,4	2,7	n.n.	n.n.
46	241	0,101	15,5	5,5	17,8	3,2	n.n.	n.n.
47	243	0,101	15,6	5,7	20,3	3,6	n.n.	n.n.

Übersicht der Messdaten des ersten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$

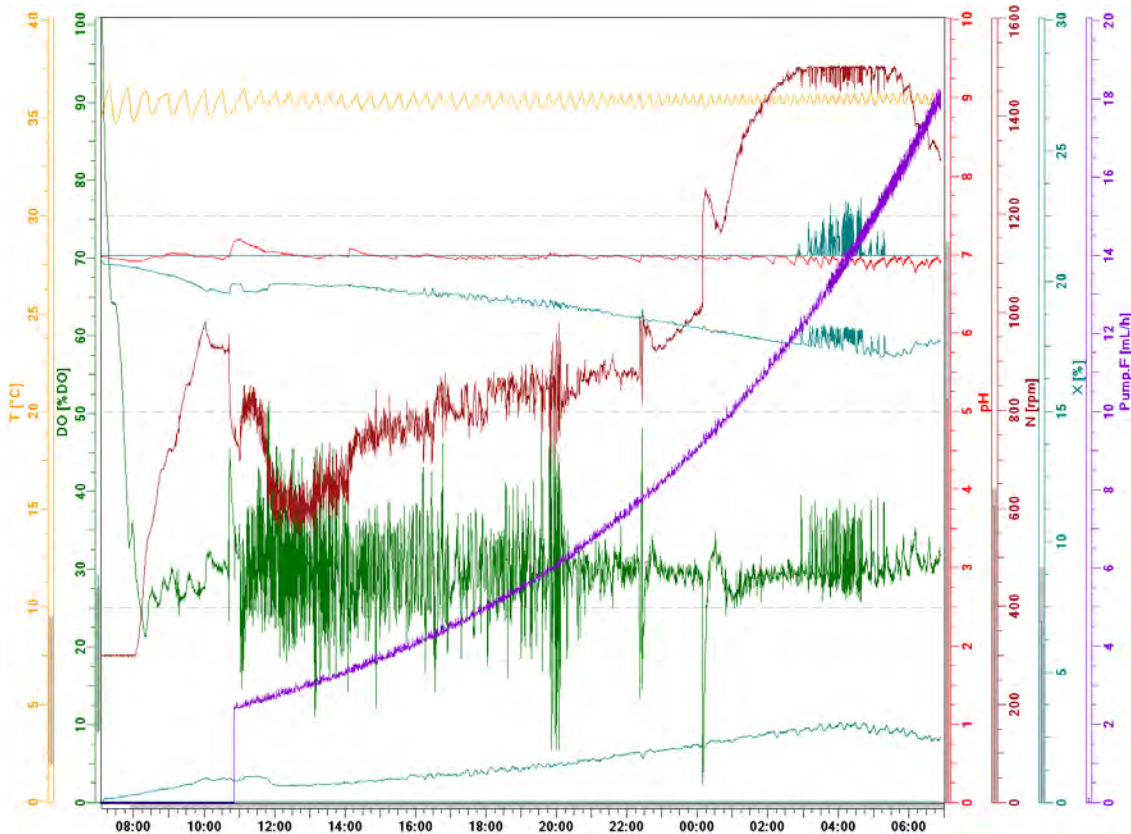


Abbildung 9.6: Verlauf der on-line Messgrößen des ersten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$

Tabelle 9.5: Übersicht der off-line Parameter des ersten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	0,100	1,7	0,6	-	-	6,27	0,03
1	2,0	0,100	8,3	3,2	1,8	0,6	4,84	1,15
2	3,6	0,100	19,8	6,9	7,2	1,0	n.n.	1,25
3	4,6	0,100	23,0	8,1	12,2	1,5	n.n.	n.n.
4	5,6	0,100	25,6	9,3	15,5	1,7	n.n.	n.n.
5	6,6	0,100	28,6	10,6	25,1	2,4	n.n.	n.n.
6	7,6	0,100	31,9	12,0	35,0	2,9	n.n.	n.n.
7	8,6	0,100	35,1	13,4	48,3	3,6	n.n.	n.n.
8	9,6	0,100	38,3	14,7	69,9	4,7	n.n.	n.n.
9	10,6	0,100	40,4	16,4	92,9	5,7	n.n.	n.n.
10	12,6	0,100	50,3	19,6	159	8,1	n.n.	0,02
11	14,6	0,100	53,6	22,4	306	13,7	n.n.	0,01
12	23,6	0,100	78,4	34,3	715	20,9	0,89	9,48

Übersicht der Messdaten des zweiten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$

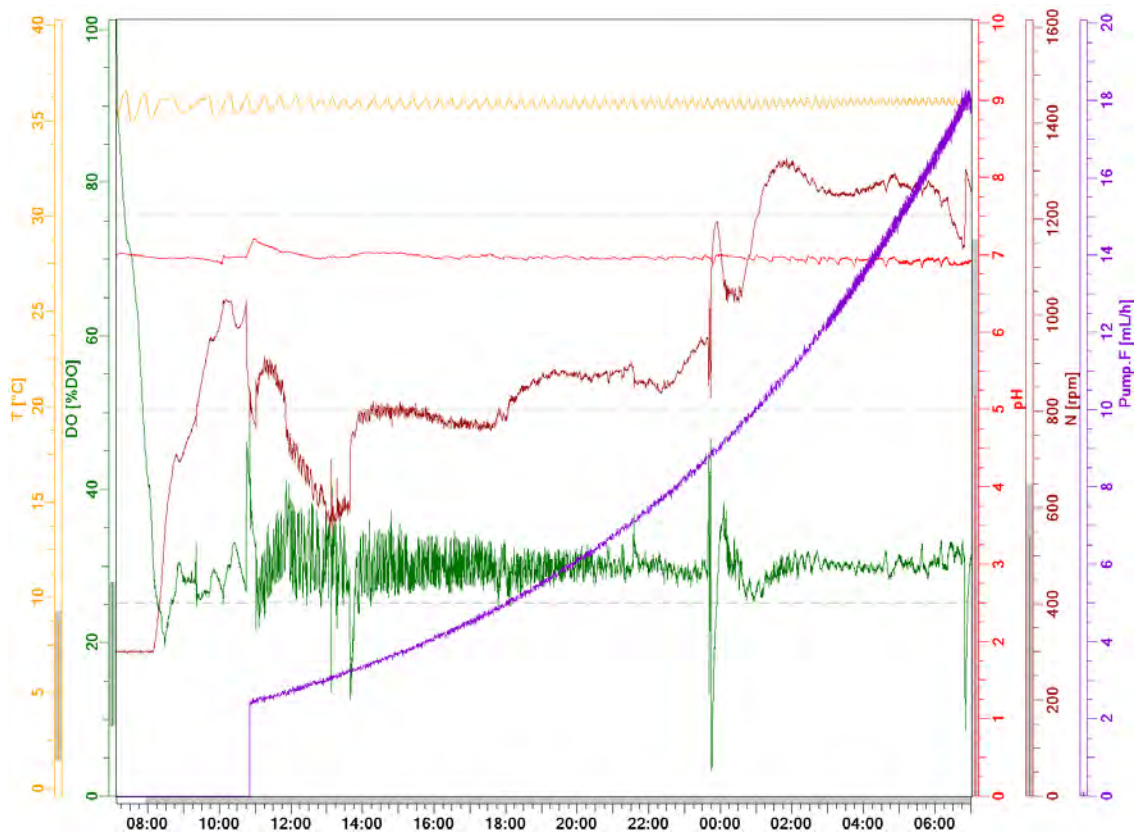


Abbildung 9.7: Verlauf der on-line Messgrößen des zweiten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$

Tabelle 9.6: Übersicht der off-line Parameter der zweiten Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$

Probe	Kulturzeit	μ	OD_{600}	C_X	C_P	$g_{P/X}$	C_{Gly}	C_{Ace}
[-]	[h]	[h^{-1}]	[-]	[gL^{-1}]	[mgL^{-1}]	[mgg^{-1}]	[gL^{-1}]	[gL^{-1}]
0	0	0,100	1,7	0,3	-	-	6,40	0,02
1	2,0	0,100	8,0	3,4	3,6	1,1	4,82	1,15
2	3,6	0,100	19,3	6,4	11,3	1,8	n.n.	1,35
3	4,6	0,100	22,7	8,3	17,5	2,1	n.n.	0,02
4	5,6	0,100	25,7	9,1	23,4	2,6	n.n.	n.n.
5	6,6	0,100	27,6	10,2	31,9	3,1	n.n.	n.n.
6	7,6	0,100	30,8	11,3	44,6	3,9	n.n.	0,01
7	8,6	0,100	33,9	12,6	60,3	4,8	n.n.	n.n.
8	9,6	0,100	36,9	14,1	63,3	4,5	n.n.	n.n.
9	10,6	0,100	41,4	15,6	93,6	6,0	n.n.	n.n.
10	12,6	0,100	49,0	18,6	158	8,5	n.n.	n.n.
11	14,6	0,100	52,6	21,4	260	12,2	n.n.	0,01
12	23,6	0,100	81,0	32,8	742	22,6	0,22	8,06

Übersicht der Messdaten des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$

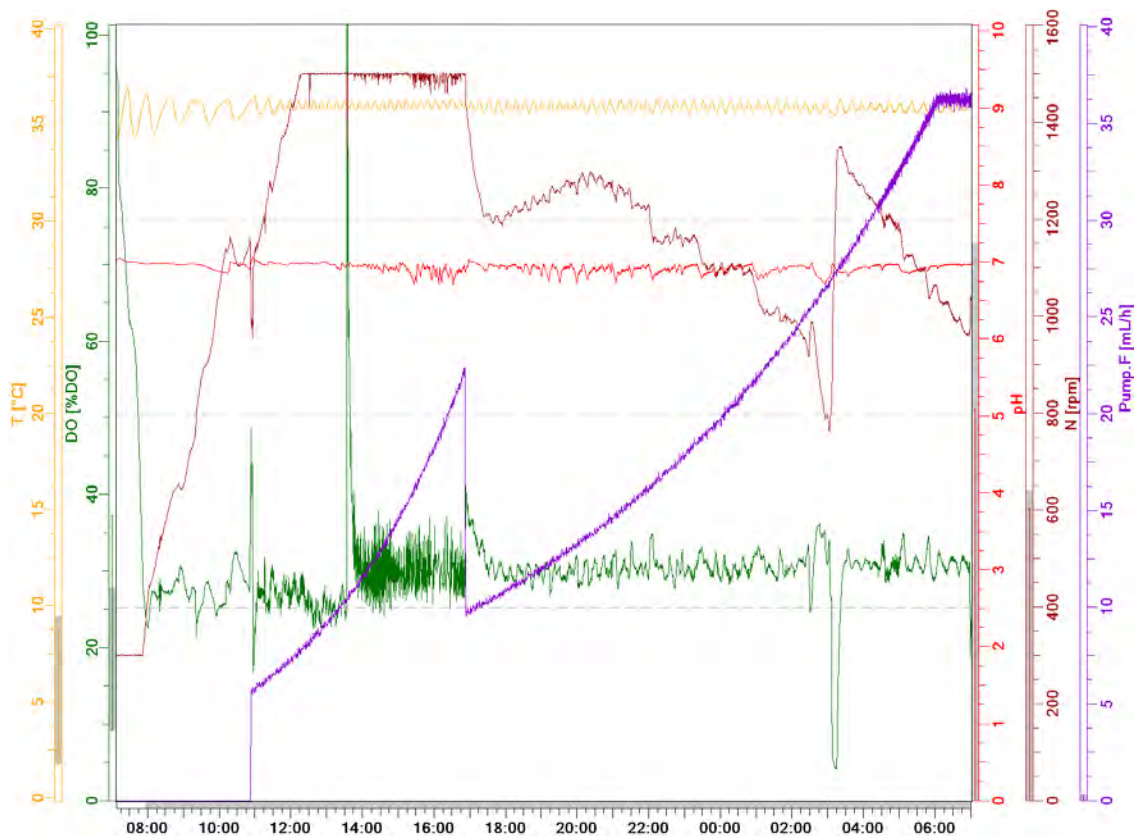


Abbildung 9.8: Verlauf der on-line Messgrößen des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$

Tabelle 9.7: Übersicht der off-line Parameter des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	0,230	1,9	1,0	-	-	6,14	0,02
1	2,0	0,230	8,2	3,2	4,5	1,4	4,40	1,01
2	3,8	0,230	20,7	7,3	16,9	2,3	n.n.	1,14
3	4,8	0,230	29,1	10,5	31,4	3,0	n.n.	0,91
4	5,8	0,230	39,3	14,4	52,7	3,7	n.n.	0,14
5	6,8	0,230	48,4	18,1	101	5,6	n.n.	0,03
6	7,8	0,230	60,7	21,8	103	4,7	n.n.	0,25
7	8,8	0,230	65,5	24,8	190	7,6	n.n.	0,96
8	9,8	0,230	72,0	28,3	223	7,9	n.n.	2,08
9	10,8	0,100	77,0	30,6	267	8,7	n.n.	4,79
10	11,8	0,100	81,0	28,9	287	9,9	n.n.	7,29
11	12,8	0,100	84,3	33,3	320	9,6	n.n.	9,56
12	13,8	0,100	87,0	34,6	358	10,4	n.n.	3,78
13	14,8	0,100	89,3	34,8	332	9,5	0,14	16,08
14	23,8	0,100	60,0	35,9	220	6,1	61,22	39,58

Übersicht der Messdaten des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$

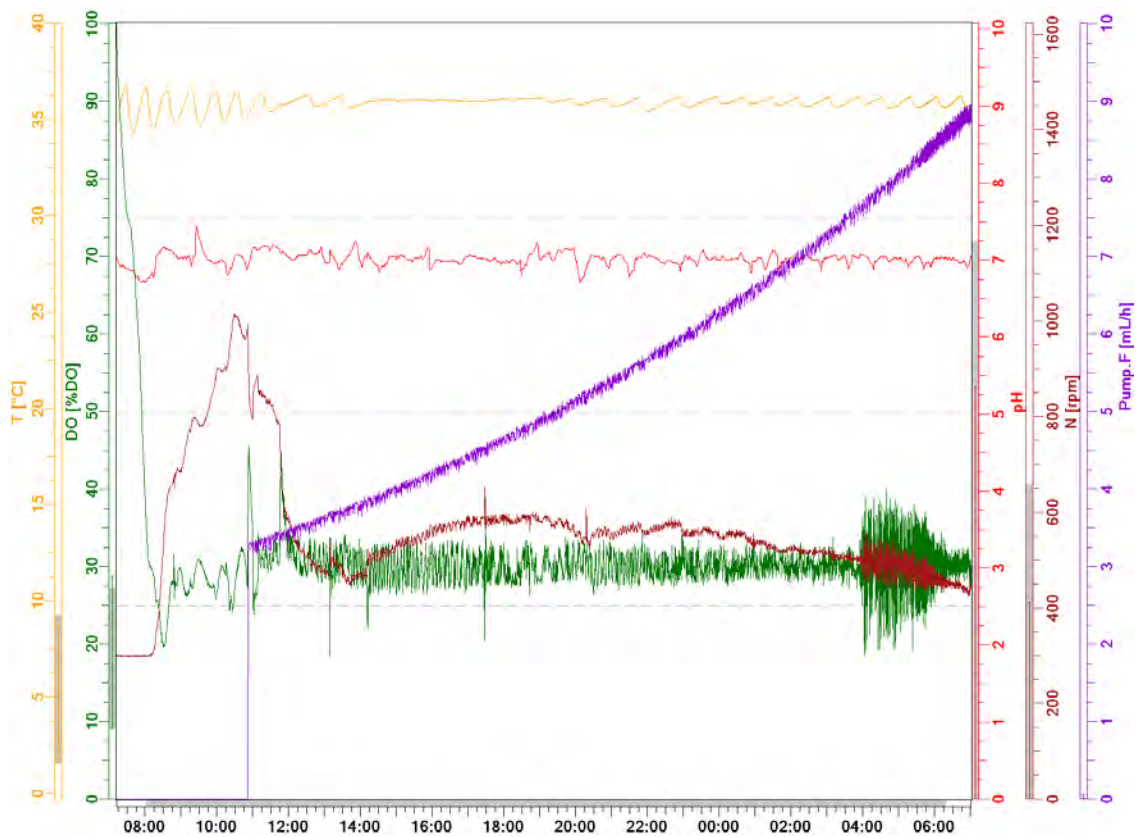


Abbildung 9.9: Verlauf der on-line Messgrößen des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$

Tabelle 9.8: Übersicht der off-line Parameter des Fed-Batch Prozesses mit $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$

Probe	Kulturzeit	μ	OD ₆₀₀	C _X	C _P	g _{P/X}	C _{Gly}	C _{Ace}
[-]	[h]	[h ⁻¹]	[-]	[gL ⁻¹]	[mgL ⁻¹]	[mgg ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
0	0	0,050	1,8	0,7	-	-	6,08	0,03
1	2,0	0,050	7,9	3,1	4,5	1,5	4,75	1,30
2	3,8	0,050	18,8	6,7	13,6	2,0	n.n.	1,33
3	4,8	0,050	22,4	8,1	21,3	2,6	n.n.	n.n.
4	5,8	0,050	23,5	8,5	33,0	3,9	n.n.	n.n.
5	6,8	0,050	24,7	8,8	32,7	3,7	n.n.	n.n.
6	7,8	0,050	26,0	9,5	39,9	4,2	n.n.	n.n.
7	8,8	0,050	27,3	9,8	38,5	3,9	n.n.	n.n.
8	9,8	0,050	28,8	10,6	40,3	3,8	n.n.	n.n.
9	10,8	0,050	30,9	11,3	64,0	5,7	n.n.	n.n.
10	12,8	0,050	33,6	12,1	97,7	8,1	n.n.	n.n.
11	14,8	0,050	34,9	13,2	122	9,3	n.n.	n.n.
12	23,8	0,050	44,3	17,2	298	17,3	n.n.	0,01