



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

**Fakultät Life Sciences
Studiendepartment Biotechnologie**

Entwicklung einer Versuchsvorschrift für die Batchkultivierung von *Escherichia coli* BL21 in Laborbioreaktoren mit einer durch Lactose induzierten β -Galactosidase-Produktion

Katja Dammann

29. Januar 2015

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Lohbrügger Kirchstraße 65
21033 Hamburg

Verfasserin: Katja Dammann
Abgabedatum: 29.01.2015

1. Prüfer: Prof. Dr. Ernst Sanders
2. Prüfer: B. Sc. Sönke Rosemann

| | | |
|---------|--|-----|
| I. | Abbildungsverzeichnis..... | I |
| II. | Tabellenverzeichnis | III |
| III. | Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| IV. | Variablenverzeichnis..... | VI |
| 1. | Einleitung und Zielsetzung..... | 1 |
| 2. | Theoretische Grundlagen..... | 2 |
| 2.1. | <i>Escherichia coli</i> BL21 | 2 |
| 2.2. | β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)..... | 3 |
| 2.3. | <i>lac</i> -Operon | 4 |
| 2.4. | PTS-vermittelte Katabolitrepression | 6 |
| 2.5. | Induktion des <i>lac</i> -Operons..... | 7 |
| 2.6. | Glycerin-Transport und Regulierung des <i>glp</i> -Regulons..... | 8 |
| 3. | Entwurf des Praktikums | 9 |
| 3.1. | Ablauf des Praktikums..... | 9 |
| 3.2. | Berechnungen zur Kultivierung..... | 9 |
| 3.2.1. | Berechnungen zur Vorkultur | 9 |
| 3.2.2. | Berechnung der Glycerin-Konzentration für die Hauptkultur | 10 |
| 4. | Materialien und Methoden..... | 12 |
| 4.1. | Chemikalien..... | 12 |
| 4.2. | Geräte..... | 13 |
| 4.3. | Medium..... | 13 |
| 4.4. | Kultivierung im Bioreaktor | 14 |
| 4.4.1. | Kultivierungsverlauf..... | 14 |
| 4.4.2. | Vorbereitung des Reaktors | 15 |
| 4.4.3. | Bestimmung des k_{La} durch die dynamische Methode..... | 15 |
| 4.5. | Induktion..... | 15 |
| 4.6. | Bestimmung der Biotrockenmasse nach SOP-Nr. 320001-02 | 16 |
| 4.7. | Bestimmung der Biofeuchtmasse | 16 |
| 4.8. | Messung der optischen Dichte nach SOP-Nr. 320101-04..... | 16 |
| 4.9. | Produktanalytik..... | 17 |
| 4.9.1. | Probenvorbereitung | 17 |
| 4.9.2. | β -Galactosidase-Assay | 17 |
| 4.10. | Substrat-Analytik | 19 |
| 4.10.1. | Bestimmung der Glycerin-Konzentration | 19 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.10.2. | Bestimmung der Lactose- und Glucose-Konzentration | 19 |
| 4.10.3. | Bestimmung der Galactose-Konzentration | 20 |
| 5. | Ergebnisse und Diskussion..... | 22 |
| 5.1. | Untersuchung der Induktionsbedingungen | 22 |
| 5.1.1. | Konzentrationseinfluss der Lactose auf den β -Galactosidase-Verlauf..... | 22 |
| 5.1.2. | Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die β -Galactosidase-Expression..... | 24 |
| 5.1.3. | Vergleich der β -Galactosidase-Aktivität mit Literaturwerten..... | 27 |
| 5.2. | Kultivierung nach Praktikumsanleitung | 29 |
| 5.2.1. | Kultivierungsverlauf..... | 29 |
| 5.2.2. | Auswertung nach Praktikumsskript | 32 |
| 5.2.2.1. | Bestimmung von $f_{X/OD}$ | 33 |
| 5.2.2.2. | Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten μ | 34 |
| 5.2.2.3. | Verlauf der Sauerstoffaufnahme <i>OUR</i> | 35 |
| 5.2.2.4. | Bestimmung von <i>OUR</i> durch die dynamische Methode..... | 36 |
| 5.2.2.5. | Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La} | 37 |
| 6. | Zusammenfassung | 38 |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | 40 |
| 8. | Anhang | 44 |
| 8.1. | Ergebnisse zusätzlich durchgeführter Untersuchungen..... | 44 |
| 8.1.1. | Kultivierung zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate bei 37 °C | 44 |
| 8.1.2. | Untersuchungen zum Aufschluss mit Toluol | 44 |
| 8.1.3. | Temperatureinfluss auf das β -Galactosidase-Assay..... | 45 |
| 8.1.4. | Aktivitätsverhältnisse verschiedener Aufschluss- und Assay-Bedingungen | 46 |
| 8.1.5. | Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die β -Galactosidase-Ausbeute | 46 |
| 8.2. | Ergebnistabellen und Darstellungen | 47 |
| 8.2.1. | Versuch 1..... | 47 |
| 8.2.2. | Versuch 2..... | 50 |
| 8.2.3. | Versuch 3..... | 53 |
| 8.2.4. | Kultivierung nach Praktikumsanleitung..... | 54 |
| 8.3. | Standardarbeitsanweisungen (SOP) | 57 |
| 8.3.1. | Bestimmung der optischen Dichte SOP-Nr. 320101-04 | 57 |
| 8.3.2. | Bestimmung der Biotrockenmasse SOP-Nr. 320001-02..... | 61 |

I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2-1: Struktur der β -Galactosidase. Farblich unterschieden sind die einzelnen Domänen eines Monomers: Blau - Domäne 1, Grün - Domäne 2, Gelb - Domäne 3, Hellblau – Domäne 4, Rot – Domäne 5. Kugeln stellen Ionen dar: Grün - Na^+ , Blau – Mg^{2+} . 3
- Abb. 2-2: Schematischer Aufbau des *lac*-Operons. P – Promotor der *lacZYA*-Gene, P_1 - Promotor des *lac*-Repressors, O – Bindungsmöglichkeiten für den *lac*-Repressor (Operator), I – Gen für den *lac*-Repressor, Z – Gen für β -Galactosidase, Y - Gen für Galactosid-Permease, A – Gen für Thiogalactosid-Transacetylase 4
- Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Lactose-Aufnahme in die Zelle und anschließende Spaltung durch β -Galactosidase in Glucose und Galactose sowie Umwandlung zum Lactose-Isomer Allolactose 5
- Abb. 2-4: Reaktionskette des PTS beim Transport von Glucose in die Zelle. Dabei wird ein Phosphatrest von PEP über mehrere Reaktionsschritte auf die Glucose übertragen und diese so der Glykolyse zugeführt. 6
- Abb. 4-1: Theoretische Verläufe der Sauerstoffkonzentration, Temperatur, Zellmasse, Rührerdrehzahl, pH-Wert, Biomasse, β -Galactosidase-Aktivität und Begasung der Batchfermentation. Vor Induktion wird die dynamische Methode zur Bestimmung des k_{LA} -Wertes angewendet. 14
- Abb. 5-1: Aufgetragen sind die Mittelwerte der spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten ab dem Zeitpunkt der Induktion mit aufgeführten Lactose-Konzentrationen (schwarze Kurve). Die gestrichelten Linien zeigen die Abnahme nach Aufbrauchen der Lactose. Die Abnahme für 20 mM ist hypothetisch. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis und das Assay wurde mit der Methode wie bei Kreuzmann durchgeführt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Ergebnissen dieser Arbeit um den Faktor 3 angepasst. 23
- Abb. 5-2: Verlauf der spezifischen Aktivität von β -Galactosidase nach Induktion mit Lactose in der stationären Phase (Versuch 2) und bei Induktion in der exponentiellen Phase (Versuch 1). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen ab dem Zeitpunkt der Induktion. Da der Aufschluss auf Eis anstatt bei 37 °C erfolgte und das Assay wie bei Kreuzmann ohne β -Mercaptoethanol durchgeführt wurde, sind die Werte um den Faktor 3 korrigiert, sodass sie mit anderen Werten dieser Arbeit vergleichbar sind. 25
- Abb. 5-3: Verlauf der spezifischen Aktivität von β -Galactosidase nach Induktion mit Lactose ($c_{\text{lac}} = 1,5 \text{ g l}^{-1}$) in der stationären Phase und bei Induktion in der exponentiellen Phase ab dem Zeitpunkt der Induktion. 27
- Abb. 5-4: Verläufe zur Kultivierung im BIOSTAT BPlus und B bei 37 °C. Die gemittelten Werte der Glycerin-Konzentrationen aus zwei unabhängigen Messungen sind in Diagramm A abgebildet. Die gestrichelte Linie gibt den erwarteten Verlauf wieder. Ebenfalls aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte (Diagramm A) und der Lactose- und Galactose-Konzentration sowie die β -Galactosidase-Aktivität in Diagramm B. In Diagramm C sind die Sauerstoffverläufe

- und die Änderung der Rührerdrehzahl abgebildet, die von dem MFCS aufgezeichnet wurden. Die schwarze, gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion. 31
- Abb. 5-5: Grafische Ermittlung des Umrechnungsfaktors von optischer Dichte auf Biotrockenmasse-Konzentration. Aufgetragen sind sowohl die Werte der Kultivierung im Reaktor BPlus als auch im B, durch die eine lineare Ausgleichsgerade gelegt wurde. 32
- Abb. 5-6: Grafische Ermittlung des Umrechnungsfaktors der optischen Dichte auf Biofeuchtmasse-Konzentration. Dafür wurden die Werte der Kultivierungen im Reaktor BPlus und B aufgetragen und durch eine lineare Ausgleichsgerade die Steigung bestimmt. Die ausgegrauten Punkte wurden als Ausreißer bewertet. 33
- Abb. 5-7: Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate der Kultivierungen in den Reaktoren BPlus und B. Die Mittelwerte der Biotrockenmasse-Konzentrationen, berechnet aus der optischen Dichte, wurden logarithmisch aufgetragen und eine lineare Ausgleichsgerade durch die Werte gelegt. 33
- Abb. 5-8: Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme und des Anteils an Sauerstoff in der Abluft. Verwendet wurden die Daten aus der Kultivierung im Reaktor BPlus. 34
- Abb. 5-9: Grafische Ermittlung des *OUR* für die Kultivierung im Bioreaktor BPlus durch die dynamische Methode. 35
- Abb. 5-10: Grafische Ermittlung des *OUR* für die Kultivierung im Bioreaktor B durch die dynamische Methode. 36
- Abb. 5-11: Bestimmung des k_{La} mit der dynamischen Methode aus der Kultivierung im Reaktor BPlus. Aufgetragen sind die Werte nach Einschalten der Zuluft. 37
- Abb. 8-1: Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate bei 37 °C von *E. coli* BL21 in den Bioreaktoren BPlus und B mit $c_{gly} = 9 \text{ g l}^{-1}$ und $c_{lac} = 5 \text{ g l}^{-1}$ zur Induktion. Angeimpft wurde mit einer Schüttelkultur, die über Nacht bei 37 °C auf $\Delta OD = 9$ gewachsen ist. Prozesseinstellungen s. Tab. 4-4 44
- Abb. 8-2: Vergleich der Aufschlussmethode durch Toluol durchgeführt mit Phosphat- und Z-Puffer bei 0 °C und bei 37 °C. Die Zellproben wurden nach Induktion mit Lactose zu identischen Zeitpunkten genommen. Das β -Galactosidase-Assay wurde zusätzlich bei Raumtemperatur durchgeführt. 45
- Abb. 8-3: Wachstumsverlauf von Versuch 1. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen. Zudem wurden die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt der Kolben mit 5 mM, 10 mM und 20 mM Lactose-Konzentration und die gepunktete Linie den für die Kolben mit 1 mM. 47
- Abb. 8-4: Wachstumsverlauf von Versuch 2. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen. Zudem wurden die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt mit beschriebenen Lactose-Konzentrationen in der stationären Phase. 51
- Abb. 8-5: Wachstumsverlauf von Versuch 2. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen. Zudem wurden

| | |
|---|----|
| die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt mit einer Lactose-Konzentration von jeweils $1,5 \text{ g l}^{-1}$ in der stationären bzw. exponentiellen Phase. | 53 |
| Abb. 8-6: Bestimmung des k_{LA} mit der dynamischen Methode aus der Kultivierung in Reaktor B. Aufgetragen sind die Werte nach Einschalten der Zuluft. | 56 |

II. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 2-1: Erläuterungen zum Genotyp von <i>E. coli</i> BL21 [Casali 2003] | 2 |
| Tab. 3-1: Daten für die Berechnungen zur Vorkultur | 9 |
| Tab. 3-2: Werte zur Berechnung der Glycerin-Konzentration in der Hauptkultur | 10 |
| Tab. 4-1: Verwendete Chemikalien | 12 |
| Tab. 4-2: Verwendete Geräte | 13 |
| Tab. 4-3: Korz low trace Medium | 13 |
| Tab. 4-4: Gewählte Einstellungen der Betriebsparameter bei Kultivierungen | 14 |
| Tab. 4-5: Z-Puffer | 17 |
| Tab. 4-6: Ablauf- und Pipettierschema des β -Galactosidase-Assays wie bei Kreuzmann | 18 |
| Tab. 4-7: Ablauf- und Pipettierschema des β -Galactosidase-Assays nach Invitrogen | 18 |
| Tab. 4-8: Ablauf- und Pipettierschema des Glycerin-Assays | 19 |
| Tab. 4-9: Ablauf- und Pipettierschema des Lactose- und Glucose-Assays | 20 |
| Tab. 4-10: Ablauf- und Pipettierschema des Galactose-Assays | 21 |
| Tab. 5-1: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 1 eingesetzt wurden. | 22 |
| Tab. 5-2: Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 2 eingesetzt wurden. Aus einer Stock-Lösung mit $m_{\text{real}} = 36,0 \text{ g}$ auf 100 ml wurden die Induktionslösungen durch entsprechende Verdünnungen angesetzt. Die Lactose der Stock-Lösung war teilweise am Flaschenrand auskristallisiert, wodurch die Konzentrationen leicht verfälscht sind. | 25 |
| Tab. 5-3: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 3 eingesetzt wurden. | 26 |
| Tab. 5-4: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina bezüglich Lactose-Monohydrat sowie die eingesetzte Glycerin-Konzentration für die Kultivierungen in Bioreaktoren. | 29 |
| Tab. 8-1: Bestimmung des Temperatur- sowie Puffereinflusses auf den Aufschluss durch Toluol. Dafür wurden vier induzierte Proben zu gleichen Zeitpunkten genommen und diese unter unterschiedlichen Bedingungen aufgeschlossen. Das Assay zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität wurde sowohl bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ als auch bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Der Einfluss der Puffer wurde als Faktor aus den Aktivitäten jeweils gleicher Aufschluss- und Assay-Temperaturen bestimmt. Der Faktor für den Einfluss der Temperatur wurde aus den Aktivitäten gleicher Assay-Temperaturen und gleicher Puffer bestimmt. Für die Aktivität wurden Mittelwerte aus der Doppelbestimmung | |

- gebildet. Der ausgegraute Wert wurde einmal bestimmt. Fett dargestellte Werte sind Mittelwerte entsprechender Spalte. 46
- Tab. 8-2: Einfluss von β -Mercaptoethanol (BME) auf das β -Galactosidase-Assay. Dazu wurde eine aufgeschlossene Probe sechsmal jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Aus den Mittelwerten der Extinktion wurde die spezifische Aktivität berechnet und ein Quotient aus der Aktivität mit und ohne BME (\emptyset BME) gebildet. 47
- Tab. 8-3: Daten zur optischen Dichte aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte aus den Kolben mit gleicher Induktor-Konzentration und entsprechender Standardabweichung. Grau markierte Zellen kennzeichnen den Zeitpunkt der Induktion. 48
- Tab. 8-4: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Kolben mit 1 mM und 5 mM Lactose-Konzentration sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die bei Kreuzmann verwendete Methode und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Aktivitäten dieser Arbeit zu schaffen, wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 3 korrigiert. 49
- Tab. 8-5: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Kolben mit 10 mM und 20 mM Lactose-Konzentration sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die bei Kreuzmann verwendete Methode und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Aktivitäten dieser Arbeit zu schaffen, wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 3 korrigiert. 49
- Tab. 8-6: Daten zur optischen Dichte aus Versuch 2 mit Induktion in der stationären Phase. Aufgelistet sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmung der Schüttelkulturen gleicher Induktor-Konzentration. Die grau unterlegten Zeilen markieren den Zeitpunkt der Induktion. 50
- Tab. 8-7: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase sowie deren Standardabweichung aus den Kolben mit jeweils gleicher Lactose-Konzentrationen zu Versuch 2. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Daten. Zur Bestimmung wurde die Methode wie bei Kreuzmann und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt, so dass die Aktivität zur Vergleichbarkeit um den Faktor 3 korrigiert wurde. 52
- Tab. 8-8: Daten zur optischen Dichte von Versuch 3. Aufgelistet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmung. 53
- Tab. 8-9: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase für Versuch 3. Aufgelistet sind jeweils die Volumina des verwendeten Probevolumens zur Aktivität-Bestimmung, die Mittelwerte der Daten sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Induziert wurde mit einer Lactose-Konzentration von 1,5 g l⁻¹ in der stationären bzw. exponentiellen Phase. 54
- Tab. 8-10: Daten der Kultivierung zu Abb. 5-4. Aufgelistet sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte, der Substrat-Konzentrationen und der spezifischen Aktivitäten der β -Galactosidase der Kultivierungen in den Reaktoren BPlus und B. 54

Tab. 8-11: In Abb. 5-8 verwendete Daten der Kultivierung im Reaktor BPlus. 55

Tab. 8-12: Ermittelte Daten bezüglich des Sauerstoffs zur Kultivierung in Reaktor B. 55

III. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bezeichnung |
|------------------------|---|
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BME | β-Mercaptoethanol |
| B | Bioreaktor BIOSTAT B von Sartorius Stedim Biotech |
| BPlus | Bioreaktor BIOSTAT BPlus von Sartorius Stedim Biotech |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CRP | cAMP-Rezeptor-Protein |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiotreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIIA ^{Glc} | Glucosespezifisches Enzym IIA |
| EIIA ^{Glc} -P | Phosphoryliertes EIIA ^{Glc} |
| MFCS | Multi-Fermenter-Control-System/win 3 (Sartorius Stedim Biotech) |
| Glu537 | Glutaminsäure an der 537ten Position im Protein |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| O | Operator |
| ONP | o-Nitrophenol |
| ONPG | o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PTS | Phosphotransferasesystem |
| RT | Raumtemperatur (21 - 22) °C |

IV. Variablenverzeichnis

| Variable | Bedeutung | Wert | Einheit |
|------------------------|---|------|--------------------------------|
| a | Spezifische Aktivität bezogen auf das Volumen | - | $U\ l^{-1}$ |
| a_{Miller} | Spezifische Aktivität berechnet nach Miller [1972] | - | U_{Miller} |
| α | Spezifische Aktivität bezogen auf die Biomasse | - | $U\ g^{-1}$ |
| α_{cor} | Spezifische Aktivität bezogen auf die Biomasse korrigiert um den Faktor 3 | - | $U\ g^{-1}$ |
| c | Konzentration einer Komponente | - | $g\ l^{-1}$ bzw. $mol\ l^{-1}$ |
| c_{gal} | Galactose-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_{glc} | Glucose-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_{gly} | Glycerin-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{\text{gly},0}$ | Glycerin-Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0\ h$ | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_{lac} | Lactose-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ bzw. $mol\ l^{-1}$ |
| $c_{\text{lac,ind}}$ | Lactose-Konzentration zum Zeitpunkt der Induktion | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{\text{lac,stock}}$ | Lactose-Konzentration der zur Induktion verwendeten Lösung | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_{O_2} | Konzentration an gelösten Sauerstoff | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{O_2,\text{max}}$ | Maximale gelöste Sauerstoff-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_{stock} | Konzentration einer Stock-Lösung | - | $g\ l^{-1}$ |
| c_X | Biotrockenmasse-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{X,0}$ | Biotrockenmasse-Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0\ h$ | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{X,\text{end}}$ | Biotrockenmasse-Konzentration am Ende der Kultivierung | - | $g\ l^{-1}$ |
| $c_{X,\text{wet}}$ | Biofeuchtmasse-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| d | Schichtdicke der Küvette | 1 | cm |

| Variable | Bedeutung | Wert | Einheit |
|------------------------------|--|------|------------------------------------|
| ϵ_{ONP} | Extinktionskoeffizient von ONP bei 37 °C und 420 nm Wellenlänge in der Assay-Umgebung | 4500 | $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
| ϵ_{NADH} | Extinktionskoeffizient von NADH bei 25 °C und 340 nm in Assay-Umgebung | 6300 | $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
| ΔE_{glc} | Extinktionsdifferenz der Glucose-Messung | - | - |
| $\Delta E_{\text{glc, std}}$ | Extinktionsdifferenz des Glucose-Standards | - | - |
| ΔE_{blank} | Extinktionsdifferenz der Blank-Messwerte | - | - |
| ΔE_{lac} | Extinktionsdifferenz der Lactose-Messung | - | - |
| E | Extinktion einer Probe | - | - |
| E_1 | Erster Extinktionswert innerhalb einer Bestimmung | - | - |
| E_2 | Zweiter Extinktionswert innerhalb einer Bestimmung | - | - |
| E_{blank} | Extinktion des Blindwertes | - | - |
| $E_{1, \text{blank}}$ | Erster Extinktionswert des Blanks innerhalb einer Bestimmung | - | - |
| $E_{2, \text{blank}}$ | Zweiter Extinktionswert des Blanks innerhalb einer Bestimmung | - | - |
| f | Verdünnungsfaktor | - | - |
| $F_{\text{air, in}}$ | Begasungsrate | 1 | l min^{-1} |
| $F_{\text{G, in, STP}}$ | Begasungsrate unter Normalbedingungen | 0,89 | l min^{-1} |
| f_{BME} | Quotient aus β -Galactosidase-Aktivitäten aus dem Assay mit und ohne β -Mercaptoethanol | - | - |
| f_{buffer} | Quotient aus β -Galactosidase-Aktivitäten gemessen nach einem Aufschluss mit Z- und Phosphatpuffer | - | - |
| $f_{\text{g, assay}}$ | Quotient aus β -Galactosidase-Aktivitäten aus dem Assay bei 37 °C und RT (22 °C) | - | - |
| $f_{\text{g, lysis}}$ | Quotient aus β -Galactosidase-Aktivitäten gemessen nach einem Aufschluss bei 37 °C und 0 °C | - | - |
| $f_{\text{X/OD}}$ | Umrechnungsfaktor von optischer Dichte auf die Biotrockenmasse-Konzentration | - | g l^{-1} |

| Variable | Bedeutung | Wert | Einheit |
|-------------------|---|---------|---------------------------------|
| $f_{X,wet/OD}$ | Umrechnungsfaktor von optischer Dichte auf die Biofeuchtmasse-Konzentration | - | g l^{-1} |
| H_{O_2} | Henry-Koeffizient | 2954612 | Pa l g^{-1} |
| $k_L a$ | Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient | - | h^{-1} |
| M_{gal} | Molare Masse von Galactose | 180,16 | g mol^{-1} |
| M_{glc} | Molare Masse von Glucose | 180,16 | g mol^{-1} |
| $m_{glc,std}$ | Masse des Glucose-Standards | 20 | μg |
| M_{glc} | Molare Masse von Glycerin | 92,10 | g mol^{-1} |
| M_{lac} | Molare Masse von Lactose | 342,30 | g mol^{-1} |
| M_{O_2} | Molare Masse von Sauerstoff | 32,00 | g mol^{-1} |
| m | Theoretische Masse | - | g |
| m_{filled} | Masse eines Mikroreaktionsgefäßes befüllt mit Biotrocken- oder -feuchtmasse | - | g |
| m_{real} | Eingewogene Masse | - | g |
| m_{tube} | Masse eines Mikroreaktionsgefäßes | - | g |
| N_{St} | Rührerdrehzahl | - | min^{-1} |
| ΔOD_{end} | Optische Dichte am Ende der Kultivierung | - | - |
| ΔOD_{ino} | Optische Dichte des Inokulums | - | - |
| OD | Optische Dichte einer Probe | - | - |
| OD_{med} | Optische Dichte des Mediums | - | - |
| OTR | Sauerstoffeintragsrate (o xxygen t ransfer r ate) | - | $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| OUR | Sauerstoffaufnahme rate (o xxygen u ptake r ate) | - | $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| p | Druck im Bioreaktor | 102000 | Pa |
| p_{H_2O} | Partialdruck von Wasser bei 37 °C | 6284 | Pa |
| p_{O_2} | Sauerstoffpartialdruck | - | Pa |
| $p_{O_2,cal}$ | Sauerstoffpartialdruck zum Zeitpunkt der pO ₂ -Sonden-Kalibrierung | - | Pa |
| $pO_2\%$ | Prozentualer Anteil des Sauerstoffpartialdrucks im Medium | - | % |
| s_α | Standardabweichung der spezifischen Aktivität | - | U g^{-1} |

| Variable | Bedeutung | Wert | Einheit |
|------------------|---|--------|---------------|
| $s_{\alpha,cor}$ | Standardabweichung der korrigierten spezifischen Aktivität | - | $U\ g^{-1}$ |
| s_{gal} | Standardabweichung der Galactose-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| s_{gly} | Standardabweichung der Glycerin-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| s_{lac} | Standardabweichung der Lactose-Konzentration | - | $g\ l^{-1}$ |
| s_{lnOD} | Standardabweichung der logarithmierten optischen Dichte | - | - |
| s_{OD} | Standardabweichung der optischen Dichte | - | - |
| $pO_2\%_{stat}$ | Prozentualer Anteil des Sauerstoffpartialdrucks im Medium im stationären Zustand bei der $k_L a$ -Bestimmung (dynamische Methode) | - | % |
| t | Zeitdauer | - | h |
| t_{end} | Zeitpunkt am Ende der Kultivierung | - | h |
| t_{inc} | Zeitdauer der Inkubation | - | h |
| t_{ind} | Zeitpunkt der Induktion | - | h |
| t_{off} | Zeitpunkt der Begasungsunterbrechung (dynamische Methode) | - | h |
| t_{on} | Zeitpunkt der erneuten Begasung (dynamische Methode) | - | h |
| μ | Spezifische Wachstumsrate | - | h^{-1} |
| μ_{max} | Maximale spezifische Wachstumsrate | - | h^{-1} |
| V_L | Volumen der Flüssigkeit im Bioreaktor | 1 | l |
| $V_{L,ind}$ | Volumen der zur Induktion verwendeten Lactose-Lösung | - | ml |
| $V_{L,ino}$ | Volumen des Inokulums | - | ml |
| $V_{L,lac}$ | Volumen der angesetzten Lactose-Lösung | - | ml |
| $V_{L,pc}$ | Volumen der Vorkultur in einem Schüttelkolben | 100 | ml |
| $V_{L,stock}$ | Volumen der eingesetzten Stock-Lösung | - | ml |
| V_m | Molvolumen idealer Gase | 22,464 | $l\ mol^{-1}$ |
| V_s | Volumen der in Assays eingesetzten Probe | - | ml |
| V_{res} | Volumen des Puffers zum Resuspendieren des Zellpellets | - | ml |

| Variable | Bedeutung | Wert | Einheit |
|-----------------------------|--|-----------------------------------|-------------------|
| V_{susp} | Suspensions-Volumen der aus der Kultur entnommenen Probe | - | ml |
| V_t | Volumen des Testansatzes (Assay) | - | ml |
| ϑ | Temperatur | - | °C |
| ϑ_{assay} | Assay-Temperatur | - | °C |
| $x_{\text{O}_2,\text{air}}$ | Sauerstoffanteil in der Luft | 0,2095 | - |
| $x_{\text{O}_2,\text{out}}$ | Sauerstoffanteil in der Abluft | - | - |
| $y_{\text{X}/\text{gly}}$ | Glycerin-Ausbeutekoeffizient | 0,45 | g g^{-1} |
| $y_{\text{X}/\text{lac}}$ | Lactose-Ausbeutekoeffizient | 0,2 | g g^{-1} |
| y_{X/O_2} | Sauerstoff-Ausbeutekoeffizient | 1,06 [Shiloach & Fass 2005] | g g^{-1} |

1. Einleitung und Zielsetzung

Das Gebiet der Biotechnologie hat sich mit rund 570 Firmen und einem jährlichen Umsatz von ca. 2,8 Milliarden Euro (Stand 2014) zu einer bedeutenden Branche in Deutschland entwickelt [Biotechnologie.de 2015]. Sowohl in der roten (medizinischen) als auch in der weißen (industriellen) Biotechnologie ist die Herstellung von Produkten, wie z. B. Antibiotika oder Enzyme durch Mikroorganismen in Kultivierungen mittels Bioreaktoren, ein fester Bestandteil der Arbeitsverfahren geworden. Je nach Eigenschaften und Wachstumsbedingungen des zu kultivierenden Organismus können eine Reihe von Reaktortypen eingesetzt werden. Das Bakterium *Escherichia coli* wird durch seine Vorteile, wie z. B. das Wachstum zu hohen Zelldichten in Submerskulturen, sein vollständig sequenziertes Genom und die Möglichkeit der einfachen, genetischen Manipulation, regelmäßig als Expressionssystem verwendet. Mittlerweile existieren daher eine Vielzahl an Plasmiden und *E. coli*-Mutanten, die für unterschiedliche Zielprodukte und Forschungszwecke designt wurden und kommerziell erwerbbar sind. Bei Kultivierungen, die auf eine Überexpression von Zielproteinen hinzielen, wird in der Regel erst bei einer bestimmten Zelldichte nach einer Wachstumsphase induziert, da die Expression oftmals mit zellulärem Stress oder wachstumshemmenden Nebenprodukten verbunden ist und dadurch zu einem Absinken der Wachstumsrate führt [Dong et al. 1995]. Eine Induktion kann z. B. durch Temperaturänderung (thermisch) oder durch Zugabe eines Induktors (chemisch) eingeleitet werden. Für die chemische Induktion wird am häufigsten das *lac*-Operon verwendet, bei dem die Induktion über die Zugabe von Lactose oder seines künstlich synthetisierten Analogons Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) erfolgt. Aufgrund der häufigen Anwendung von Kultivierungen mit Induktionen in Industrie und Forschung sollte Schülern für eine umfassende Ausbildung im Bereich der Biotechnologie an Berufs- und Hochschulen sowie Universitäten sowohl der theoretische als auch der praktische Umgang mit Laborbioreaktoren gelehrt werden. Um einen Überblick über einen typischen Kultivierungsverlauf einer Batchfermentation und dessen Arbeits- und Zeitaufwand sowie die Grundtechniken im Labor zu vermitteln, wird im Rahmen dieser Bachelorarbeit eine Praktikumsanleitung für eine satzweise Kultivierung mit *E. coli* BL21 erarbeitet. Die Kultivierung wird aufgeteilt in eine Wachstums- und Produktionsphase, die durch Induktion des *lac*-Operons zur Produktbildung von β -Galactosidase eingeleitet wird. Eine anschließende Auswertung der Ergebnisse soll das Verfassen wissenschaftlicher Texte verbessern.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. *Escherichia coli* BL21

Das stäbchenförmige und gramnegative Enterobakterium *Escherichia coli* ist eines der am häufigsten verwendeten und am besten erforschten Mikroorganismen. Seitdem das Bakterium erstmals von Herrn Escherich 1885 aus dem menschlichen Darm isoliert und definiert wurde, wurden zahlreiche weitere *E. coli*-Stämme, u.a. *E. coli* B (1918), entdeckt und genetischen Modifikationen unterzogen [Daegelen et al. 2009]. *E. coli* BL21 besitzt den nachfolgenden und in Tab. 2-1 erläuterten Genotyp:

*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*¹

Tab. 2-1: Erläuterungen zum Genotyp von *E. coli* BL21 [Casali 2003]

| Mutation | Beschreibung | Bedeutung/Signifikanz |
|--------------|--|--|
| <i>fhuA2</i> | - | Resistent gegen Phage T1 ¹ |
| <i>lon</i> | Inaktivierung der Lon-Protease | Erhöhte Ausbeute an rekombinanten Proteinen |
| <i>ompT</i> | Inaktivierung der Outer-Membrane-Protease | Erhöhte Ausbeute an rekombinanten Proteinen |
| <i>gal</i> | Mutation in den Genen zum Galactose-Metabolismus | Verhindert Verstoffwechslung von Galactose |
| <i>dcm</i> | Verhindert die Methylierung von Cytosin | Ermöglicht die Spaltung der DNA an der CC(A/T)GG-Sequenz durch einige Restriktionsenzyme |
| <i>ΔhsdS</i> | Inaktivierung der Eco-Site Erkennung | Verhindert Eco-Restriktion und Aktivierung durch Methylierung |

Durch das genetisch unveränderte *lac*-Operon kann *E. coli* BL21 ohne Rekombination bei Zugabe von Lactose β-Galactosidase exprimieren. Ebenfalls kann durch den gestörten Galactose-Metabolismus aus Lactose nur der Glucose-, jedoch nicht der Galactose-Anteil, zur Erzeugung von Biomasse verwendet werden.

¹ <https://www.neb.com/products/c2530-bl21-competent-e-coli> (Stand 21. Januar 2015)

2.2. β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)

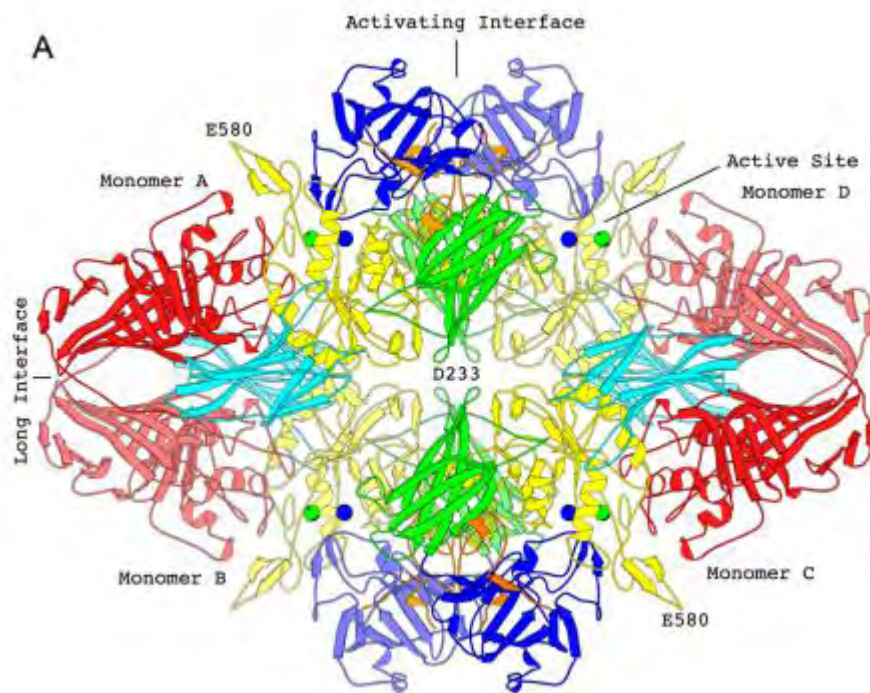


Abb. 2-1: Struktur der β -Galactosidase. Farblich unterschieden sind die einzelnen Domänen eines Monomers: Blau - Domäne 1, Grün - Domäne 2, Gelb - Domäne 3, Hellblau - Domäne 4, Rot - Domäne 5. Kugeln stellen Ionen dar: Grün - Na^+ , Blau - Mg^{2+} .

Juers, D.H., Matthews, B.W., Huber, R.E., 2012. *LacZ* β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* 12: 1792-1802.

Das Enzym β -Galactosidase gehört zu der Gruppe der Hydrolasen und spaltet β -Galactoside – Galactose enthaltende Glycoside. Dieses wird in *E. coli* durch das *lacZ*-Gen im *lac*-Operon codiert und ermöglicht der Zelle den Abbau der an sich nicht-metabolisierbaren Lactose. Dafür werden drei enzymatische Reaktionen katalysiert: Die Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose, Überführung von Lactose in sein Isomer Allolactose und Spaltung von Allo-lactose in Glucose und Galactose [Juers et al. 2000]. Das Enzym weist ein Molekulargewicht von 464992 Da auf [Fowler & Zabin 1970] und ist ein Homotetramer mit je einem aktiven Zentrum pro Untereinheit. Jedes Monomer, aufgebaut aus 1023 Aminosäuren, formt fünf Domänen, von denen das aktive Zentrum in der dritten Domäne, einem TIM-Barrel, am C-terminalen Ende lokalisiert ist (s. Abb. 2-1) [zusammengefasst von Juers et al. 2012]. Am Glu537 jedes Monomers befindet sich das katalytische Nukleophil, welches eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingeht [Gebler et al. 1992]. Für eine vollständige Aktivität werden Mg^{2+} - [Juers et al. 2000] sowie Na^+ - und K^+ -Ionen benötigt. Optimale Bedingungen liegen in einer reduktiven Umgebung [Juers et al. 2012] bei einem pH-Wert von 7 vor [Fowler & Zabin 1970]. In der Molekularbiologie wird β -Galactosidase oftmals als Reporterprotein verwendet,

da dieses durch die Umsetzung des Substrates ONPG mittels photometrischer Messung quantitativ bestimmt werden kann. Zudem wird β -Galactosidase in der Milchindustrie eingesetzt, um z. B. lactosefreie Milch zu erzeugen.

2.3. *lac*-Operon

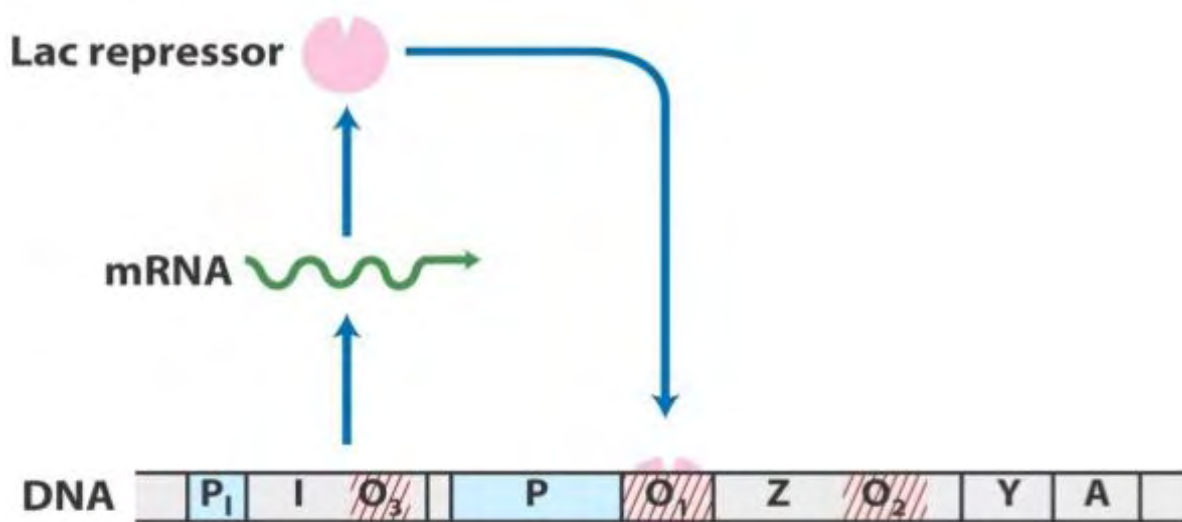


Abb. 2-2: Schematischer Aufbau des *lac*-Operons. P – Promotor der *lacZYA*-Gene, P_1 – Promotor des *lac*-Repressors, O – Bindungsmöglichkeiten für den *lac*-Repressor (Operator), *I* – Gen für den *lac*-Repressor, *Z* – Gen für β -Galactosidase, *Y* – Gen für Galactosid-Permease, *A* – Gen für Thiogalactosid-Transacetylase
Nelson, D., Cox, M., 2001. Lehninger Biochemie, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Auflage 3, 1176.

Der Metabolismus des Disaccharids Lactose erfolgt bei *E. coli* indirekt über Spaltung in die beiden metabolisierbaren Einfachzucker Glucose und Galactose (s. Abb. 2-3). Die Hydrolyse wird durch das Enzym β -Galactosidase katalysiert, welches von auf dem *lac*-Operon liegenden *lacZ*-Gen codiert wird. Bei der Transkription über den *lac*-Promotor werden zudem die hintereinander gekoppelten Gene *lacY* und *lacA* abgelesen (s. Abb. 2-2), welche für die Galactosid-Permease und Thiogalactosid-Transacetylase codieren [Nelson & Cox 2001]. Galactosid-Permease sorgt für den Transport der Lactose in die Zelle, in welcher das Disaccharid anschließend durch die β -Galactosidase zu Allolactose umgewandelt oder gespalten und metabolisiert wird (s. Abb. 2-3). Die vermutete Funktion der Thiogalactosid-Transacetylase besteht darin, Substanzen, die zusätzlich über die Galactosid-Permease in die Zelle gelangt sind und toxisch auf diese wirken können, herauszuschleusen [Andrew & Lin 1967; Roderick 2005]. Die drei Gene werden jeweils über eigene Ribosom-Bindungsstellen exprimiert und sind damit voneinander unabhängig [Nelson & Cox 2001]. Um Energie und Ressourcen optimal auszunutzen, wird eine Expression über zwei Regulationsmechanismen erst bei tatsächlichem Bedarf eingeleitet. Die negative Regulation erfolgt durch den *lac*-Repressor, dessen Genabschnitt – *lacI* – abseits des *lac*-Promotors liegt und über einen eigenen Promotor

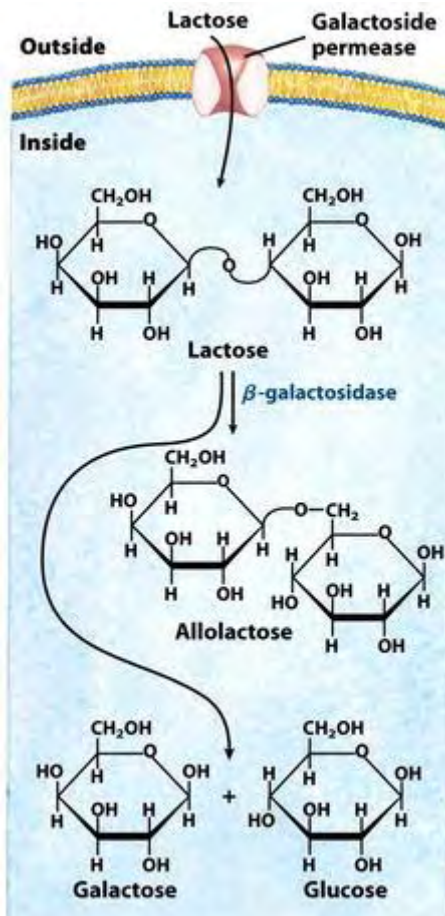


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Lactose-Aufnahme in die Zelle und anschließende Spaltung durch β -Galactosidase in Glucose und Galactose sowie Umwandlung zum Lactose-Isomer Allolactose

Nelson, D., Cox, M., 2001.

Lehninger Biochemie,

Springer Verlag Berlin Heidelberg,

Auflage 3, 1175.

lactoseunabhängig exprimiert wird. Er besteht aus einem Tetramer identischer Untereinheiten [Müller-Hill 1975] und kann an drei Stellen an der DNA binden und reprimieren. Die stärkste Repression erfolgt sterisch bei Bindung an den *lac*-Operator (O_1), wodurch die Bindung der RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription der *lacZYA*-Gene erschwert wird [Nelson & Cox 2001]. Darüber hinaus sind zwei weitere sekundäre Bindungsstellen im *lacZ*-Gen (O_2) und im *lacI*-Gen (O_3) lokalisiert (s. Abb. 2-2). Bei zusätzlicher Bindung an jeweils eine der sekundären Bindungsstellen bildet die DNA eine Schleife zwischen den beiden Abschnitten aus [Nelson & Cox 2001]. Insgesamt wird eine Reduktion der Transkription um den Faktor 1000 ausgelöst. Trotz der Repressionsmechanismen besteht fortwährend ein Grundniveau an Enzymen in der Zelle, welches den erstmaligen Transport und die Umwandlung von Lactose zu Allolactose ermöglicht. Allolactose bindet an den Repressor, wodurch dieser eine Konformationsänderung erfährt, sich von der DNA löst und die Transkription der *lac*-Gene ermöglicht [Nelson & Cox 2001]. Die positive Regulation erfolgt durch Katabolitrepression. Stehen der Zelle metabolisch bevorzugte Primärzucker – bei *E. coli* ist der Abbau von Glucose energetisch

günstiger als von Lactose - in ausreichender Menge zur Verfügung, wird der Metabolismus von Sekundärzuckern unterdrückt. Beim Metabolismus der Glucose und dem Transport eines Primärzuckers durch das PTS-System in die Zelle sinkt die cAMP-Konzentration und dadurch auch der CRP-Spiegel (s. auch 2.4. – „PTS vermittelte Katabolitrepression“). Der Komplex aus CRP und cAMP unterstützt nach Anlagerung an die DNA-Sequenz in der Nähe des *lac*-Promotors die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA [Eron & Block 1971]. Die Transkription der *lacZYA*-Gene wird so um den Faktor 50 verstärkt [Nelson & Cox 2001]. Die Expression der katabolen Enzyme zum Lactose-Abbau wird folglich erst eingeleitet, wenn der *lac*-Repressor durch den Induktor seine Bindungsfähigkeit verliert und zusätzlich eine hohe cAMP-CRP-Konzentration in der Zelle, z. B. durch Wachstum auf einem Nicht-PTS-Substrat wie Glycerin, vorliegt.

2.4. PTS-vermittelte Katabolitrepession

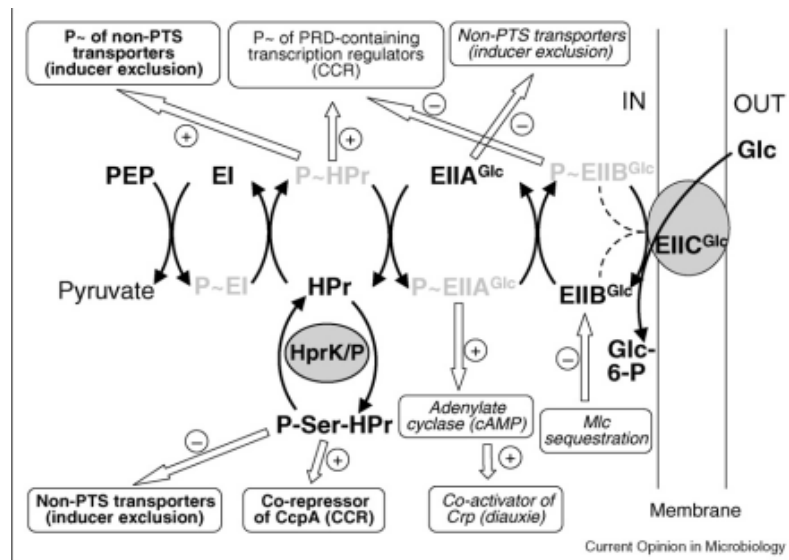


Abb. 2-4: Reaktionskette des PTS beim Transport von Glucose in die Zelle. Dabei wird ein Phosphatrest von PEP über mehrere Reaktionsschritte auf die Glucose übertragen und diese so der Glykolyse zugeführt.

Deutscher, J., 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 11, 87–93.

Die Genregulation, die zu der Eigenschaft führt, ausschließlich präferierte Zucker in einem Zuckergemisch zu metabolisieren, wird als Katabolitrepession bezeichnet und in Enterobakterien über das Phosphotransferasesystem gesteuert [Deutscher et al. 2006]. Dabei wird Glucose (primärer Zucker) mittels Gruppentranslokation in die Zelle überführt und zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt, wodurch diese metabolisiert werden kann und ein erneuter Austritt aus der Zelle vermieden wird [zusammengefasst von Postma et al. 1993]. Der Phosphatrest wird von PEP über mehrere Zwischenschritte auf die Glucose übertragen (s. Abb. 2-4). In dem Review von Postma et al. [1993] ist beschrieben, dass nach Neslon et al. [1984], das Enzym IIA^{Glc}-P im dephosphorylierten Zustand mit den Transportern sekundärer Zucker wie Lactose agiert und diese deaktiviert. Zudem wurde durch Inada et al. [1996] bestätigt, dass durch die sogenannte „Inducer Exclusion“, den Ausschluss von sekundären Zuckern, die Induktion der entsprechenden katabolen Enzyme bei Wachstum auf Glucose unterdrückt wird. Als weiterer Effekt wird durch dephosphoryliertes EIIA^{Glc} die Komplexbildung aus cAMP und CRP durch Absenken des cAMP-Spiegels verhindert. Die Adenylatcyclase wird durch Interaktion mit EIIA^{Glc}-P und vermutlich einem bis heute nicht identifizierten, zusätzlichen Faktor stimuliert und überführt ATP in cAMP [Park et al. 2006]. Dieses bindet und aktiviert CRP und unterstützt die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor (s. auch 2.3 „*lac*-Operon“.). Die Dephosphorylierung von EIIA^{Glc} wird nicht nur durch PTS-Substrate ausgelöst, sondern auch durch Substrate, die das Verhältnis von PEP zu Pyruvat ändern. Steigt der Anteil an Pyruvat durch Verstoffwechslung des Substrats in der Glykolyse, sinkt

der Anteil an phosphoryliertem EIIA^{Glc} stark ab [Hogema et al. 1998]. Bei Verwendung von Substraten, die nicht durch Glykolyse metabolisiert und durch das PTS-System transportiert werden, können folglich höhere Ausbeuten von Proteinen erzielt werden [Chan et al. 2002].

2.5. Induktion des *lac*-Operons

Eine Induktion des *lac*-Operons kann sowohl durch Allolactose – durch die Zugabe von Lactose - als auch durch dessen Analogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) erfolgen. Die Wahl des Induktors ist prozessabhängig, da sowohl Lactose als auch IPTG Vor- und Nachteile aufweisen. IPTG wird künstlich synthetisiert und lässt sich von Zellen nicht verstoffwechseln, wodurch die Induktor-Konzentration im Gegensatz zu der Verwendung von Lactose während der Kultivierung konstant bleibt. Zudem kann es durch Diffusion in die Zelle gelangen, ist dadurch unabhängig von der Galactosid-Permease und kann auch als Induktor bei Wachstum auf Glucose verwendet werden [Neubauer et al. 1991]. Nachteilig sind die hohen Kosten, die sich besonders bei Induktionen von hohen Zelldichten einstellen. Lactose ist die kostengünstigere Alternative, konkurriert jedoch nach Jobe & Bourgeois [1972] mit Allolactose um die vier Bindungsstellen des *lac*-Repressors und stabilisiert bei Bindung den Komplex aus Repressor und Operator. Zudem liegt der Anteil an dephosphoryliertem EIIA^{Glc} in der Zelle durch Lactose, obwohl diese PTS-unabhängig in die Zelle transportiert wird, bei 58 % im Vergleich zu < 20 % bei Glycerin und 97 % durch Glucose [Hogema et al. 1998]. Dementsprechend wird die Expression der *lac*-Gene durch „Inducer Exclusion“ und den gesenkten cAMP-Spiegel verringert [Inada et al. 1996]. Ausgelöst wird dies durch das Verhältnis aus PEP und Pyruvat, das sich durch die Verstoffwechslung der Glucose (Glykolyse) nach Spaltung der Lactose ändert [Bettenbrock et al. 2005; Hogema et al. 1998]. Bei Jobe & Bourgeois [1972] konnte durch Verwendung von nicht-verstoffwechselbarem IPTG als Induktor eine um 59 % größere Ausbeute erreicht werden. In der Literatur lassen sich dazu widersprüchliche Ergebnisse finden, bei denen die Induktion mit Lactose zu ähnlichen Ausbeuten wie bei Induktion mit IPTG erreicht wurden [Gombert & Kilikian 1998; Neubauer et al. 1991; Viitanen et al. 2003]. Es ist daher in Frage zu stellen, inwieweit sich die Repression durch Lactose tatsächlich auf die β -Galactosidase-Expression auswirkt oder ob die eigentlichen Unterschiede durch den Abbau der Lactose und das Absinken der Induktorkonzentration entstehen.

2.6. Glycerin-Transport und Regulierung des *glp*-Regulons

Glycerin kann als kleines und unpolares Molekül durch Diffusion oder unterstützte Diffusion mittels Glycerin-Facilitator und der Glycerin-Kinase [Sanno et al. 1968] die Zellmembran passieren. Der Glycerin-Facilitator bildet eine Art Kanal, durch den das Glycerin diffundiert [Heller et al. 1980] und bei Eintritt in die Zelle durch die Glycerin-Kinase ATP abhängig zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert wird [Cozzarelli et al. 1968]. Analog zum *lac*-Operon wird die Expression des *glp*-Regulons durch negative und positive Regulierung gesteuert. Die negative Repression erfolgt durch den *glp*-Repressor, welcher durch Glycerin-3-Phosphat inaktiviert wird [Lin 1976]. Durch den cAMP-CRP-Komplex wird die Expression positiv reguliert [Weissenborn et al. 1992] und unterliegt dadurch ebenfalls der Katabolitrepression durch das Phosphotransferase-System [Zwaig et al. 1970]. Um die Induktionswirkung von Lactose nicht zu beeinträchtigen, bietet sich der Einsatz von Glycerin anstatt von Glucose als Kohlenstoffquelle an.

3. Entwurf des Praktikums

3.1. Ablauf des Praktikums

Bei einer Batchfermentation mit anschließender Analytik wird eine Zeitdauer von drei Tagen für ein Praktikum benötigt. Der erste Tag wird genutzt, um das Medium für die Haupt- und Vorkulturen anzusetzen, den Bioreaktor zusammenzubauen und zusammen mit den Schüttelkolben zu sterilisieren. Am Nachmittag wird der Bioreaktor so weit wie möglich betriebsfertig gemacht und anschließend die Schüttelkulturen angeimpft. Der zweite Tag wird für die Kultivierung sowie anschließende Reinigung genutzt und am letzten Tag wird die Analyse der β -Galactosidase und der Biotrockenmasse durchgeführt. Zeitlich beginnt das Praktikum um 9 Uhr morgens und endet spätestens um 17 Uhr. Unter Einbezug der Zeit, die zur Vorbereitung und Animpfen sowie zur Reinigung des Reaktors benötigt wird, ergibt sich für die Kultivierung ein Zeitfenster von ca. vier Stunden. Gestartet wird mit einer optischen Dichte von ca. 1, wofür zwei Schüttelkulturen mit einem Volumen von jeweils 100 ml bei einer optischen Dichte von ca. 5 das Medium des Reaktors beim Animpfen auf 1 l komplettieren. Die Fermentation im Bioreaktor wird bei 37 °C stattfinden, um für die Bestimmung der Biotrockenmasse-Konzentration ausreichend Zellen zu erzeugen. Die Schüttelkulturen sollen bei niedrigerer Temperatur von 30 °C langsamer wachsen, da die gewünschte optische Dichte ansonsten zu schnell erreicht wäre. Die Induktion wird mit einer Lactose-Konzentration erfolgen, mit der die Zu- sowie Abnahme der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase nach Verbrauch des Induktors bestimmt werden kann. Während der Kultivierung werden regelmäßig die optische Dichte sowie die Biofeuchtmasse gemessen und zusätzlich Proben für die Bestimmung der Biotrockenmasse und der Aktivität von β -Galactosidase genommen. Zusätzlich wird der unregelmäßige pO_2 überwacht und bei Bedarf die Rührerdrehzahl hochgesetzt.

3.2. Berechnungen zur Kultivierung

3.2.1. Berechnungen zur Vorkultur

Tab. 3-1: Daten für die Berechnungen zur Vorkultur

| Variable | Wert | Einheit | Kommentar |
|---------------------------|------|-------------------|--------------------------------------|
| $f_{X/OD}$ | 0,4 | g l ⁻¹ | Arbeitsgruppen interner Standardwert |
| $\mu_{max}(30\text{ °C})$ | 0,39 | h ⁻¹ | - |

Die Berechnung der Glycerin-Konzentration für das Wachstum einer Vorkultur über 18 h auf eine optische Dichte von 5 folgt aus:

$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad (3-1)$$

und

$$y_{X/\text{gly}} = \frac{c_X(t) - c_{X,0}}{c_{\text{gly},0} - c_{\text{gly}}(t)} \quad (3-2)$$

$$c_{\text{gly},0} = \frac{c_X(t)}{y_{X/\text{gly}}} \cdot (1 - e^{-\mu_{\max} \cdot t}) + c_{\text{gly}}(t) \quad (3-3)$$

mit $c_X(t_{\text{end}}) = c_{X,\text{end}} = f_{X/\text{OD}} \cdot \Delta OD_{\text{end}}$ und $c_{\text{gly}}(t_{\text{end}}) = 0$ h

$$c_{\text{gly},0} = \frac{f_{X/\text{OD}} \cdot \Delta OD_{\text{end}}}{y_{X/\text{gly}}} \cdot (1 - e^{-\mu_{\max} \cdot t_{\text{end}}}) \quad (3-4)$$

$$c_{\text{gly},0} = 4,44 \text{ g l}^{-1}$$

Die optische Dichte zu Beginn der Vorkultur folgt damit aus 3-1 und wird zur Berechnung des Animpfvolumens mit einer Kryokultur $\Delta OD_{\text{ino}} = 2$ verwendet.

$$\Delta OD_0 = \Delta OD_{\text{end}} \cdot e^{-\mu_{\max} \cdot t_{\text{end}}} \quad (3-5)$$

$$V_{\text{ino}} = \frac{V_{L,\text{pc}} \cdot \Delta OD_0}{\Delta OD_{\text{ino}}} \quad (3-6)$$

$$V_{\text{ino}} = 0,223 \text{ ml}$$

3.2.2. Berechnung der Glycerin-Konzentration für die Hauptkultur

Tab. 3-2: Werte zur Berechnung der Glycerin-Konzentration in der Hauptkultur

| Variable | Wert | Einheit | Kommentar |
|--------------------------------|------|-------------------|-------------|
| c_{lac} | 5 | g l^{-1} | - |
| $\mu_{\max}(37^\circ\text{C})$ | 0,6 | h^{-1} | s. Abb. 8-6 |

Die Berechnung der Glycerin-Konzentration für die Hauptkultur unter Einbezug der Lactose-Konzentration $c_{\text{lac}} = 5 \text{ g l}^{-1}$ und mit der vereinfachten Annahme eines konstanten, exponentiellen Wachstums über vier Stunden mit $\Delta OD_0 = 1$, folgt durch

$$c_{X,\text{end}} = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\text{max}} \cdot t_{\text{end}}} \quad (3-7)$$

$$c_X = c_{X,\text{end}} - y_{X/\text{lac}} \cdot c_{\text{lac}} \quad (3-8)$$

und Gleichung 3-2 mit $c_{X,0} = f_{X/\text{OD}} \cdot \Delta\text{OD}_0$ und $c_{\text{gly}}(t_{\text{end}}) = 0$:

$$c_{\text{gly},0} = \frac{c_{X,0} \cdot (e^{\mu_{\text{max}} \cdot t_{\text{end}}} - 1) - y_{X/\text{lac}} \cdot c_{\text{lac}}}{y_{X/\text{gly}}} \quad (3-9)$$

$$c_{\text{gly},0} = 6,7 \text{ g l}^{-1}$$

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien

Tab. 4-1: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller | Art. Nr. | Verwendung |
|--|---------------|----------|------------------------------|
| 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid | Roth | CN22.1 | β -Galactosidase-Assay |
| Di-Ammoniumhydrogenphosphat | Roth | P736 | Korz low trace Medium |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Roth | 4984.1 | β -Galactosidase-Assay |
| EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex III) | Roth | 8043.1 | Korz low trace Medium |
| Eisen(III)-citrat-Hydrat | Merck | 103.862 | Korz low trace Medium |
| Glycerol 98% | Roth | 7530 | Korz low trace Medium |
| Kaliumchlorid | Roth | 6781.1 | β -Galactosidase-Assay |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth | 3904 | Korz low trace Medium |
| Lactose-Monohydrat | Roth | 8921.1 | Induktionslösung |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Roth | P8283 | Korz low trace Medium |
| Natriumcarbonat | Roth | A135.2 | β -Galactosidase-Assay |
| Natriumchlorid | Roth | 3957.1 | Messung der optischen Dichte |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Roth | T879.2 | β -Galactosidase-Assay |
| Natriumhydroxid | Roth | 6771 | pH-Regelung |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | M-7154 | β -Galactosidase-Assay |
| Toluol | Roth | 7115.1 | Zellyse |

4.2. Geräte

Tab. 4-2: Verwendete Geräte

| Geräte | Hersteller | Gerätename |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Bioreaktor | Sartorius Stedim Biotech | BIOSTAT B, BIOSTAT BPlus |
| Heizschrank | Thermo Scientific Heraeus Instruments | Vacuotherm |
| Kulturgefäß | Sartorius Stedim Biotech | UniVessel 2 l, doppelwandig |
| pH-Elektrode | Mettler Toledo | 405-DPAS-SC-K8S/200 |
| pH-Meter | Knick | Calimatic 766 |
| Photometer | Pharmacia Biotech | Ultrospec 3000 |
| pO ₂ -Sonde | Mettler Toledo | InPro6800/12/220, |
| Schüttelinkubatoren | GFL/New Brunswick Scientific | 3033/Innova 4200 |
| Sicherheitswerkbank | Heraeus Instruments | Herasafe |
| Thermomixer | Eppendorf | Thermomixer comfort |
| Waagen | Sartorius Stedim Biotech | BP 2215, BP 8100 |
| Zentrifuge | Heraeus Instruments | Biofuge pico |

4.3. Medium

Tab. 4-3: Korz low trace Medium

| Komponente | Summenformel | M in g mol ⁻¹ | c |
|--|--|--------------------------|-----------------------|
| Glycerin 98 % | C ₃ H ₈ O ₃ | 92,09 | variiert |
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH ₂ PO ₄ | 136,09 | 10 g l ⁻¹ |
| Di-Ammoniumhydrogenphosphat | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 132,06 | 4 g l ⁻¹ |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 246,28 | 0,3 g l ⁻¹ |
| EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrierkomplex III) | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2 H ₂ O | 372,24 | 0,1 g l ⁻¹ |
| Eisen(III)-citrat-Hydrat | C ₆ H ₅ FeO ₇ · H ₂ O | 219,51 | 20 mg l ⁻¹ |
| Natronlauge (1 M/4 M) | NaOH | 40,00 | - |

Die eingesetzten Glycerin-Konzentrationen sind in den Ergebnisteilen der einzelnen Versuche aufgeführt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,6 eingestellt. Die Magnesiumsulfat-Lösung wurde separat autoklaviert und anschließend unter der Sicherheitswerkbank hinzugefügt.

4.4. Kultivierung im Bioreaktor

4.4.1. Kultivierungsverlauf

Die Batchkultivierung mit Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde mit Inokulum aus zwei Schüttelkulturen gestartet und eine Induktion nach zwei Stunden Fermentationszeit durch Zugabe von 5 g l^{-1} Lactose-Monohydrat eingeleitet. Die Einstellungen der Betriebsparameter sind in Tabelle 4-4 aufgelistet. Die Probenahme erfolgte halbstündig. Die theoretischen Verläufe der Prozessgrößen und der Produkt-Konzentrationen sind in Abbildung 4-1 dargestellt. Die Kultivierung wurde bei Übergang in die stationäre Phase und einem steilem Anstieg des $pO_2\%$ beendet.

Tab. 4-4: Gewählte Einstellungen der Betriebsparameter bei Kultivierungen

| Betriebsparameter | Einstellung/Wert | Einheit | Regelung |
|---------------------|------------------|---------------------|---|
| ϑ | 37 | °C | automatisch |
| $pO_2\%$ | > 15 | % | manuell |
| pH | 6,6 | - | automatisch |
| $F_{\text{air,in}}$ | 1 | l min^{-1} | - |
| N_{St} | 600 | min^{-1} | manuell, $\Delta N_{\text{St}} = (50 - 100) \text{ min}^{-1}$ |

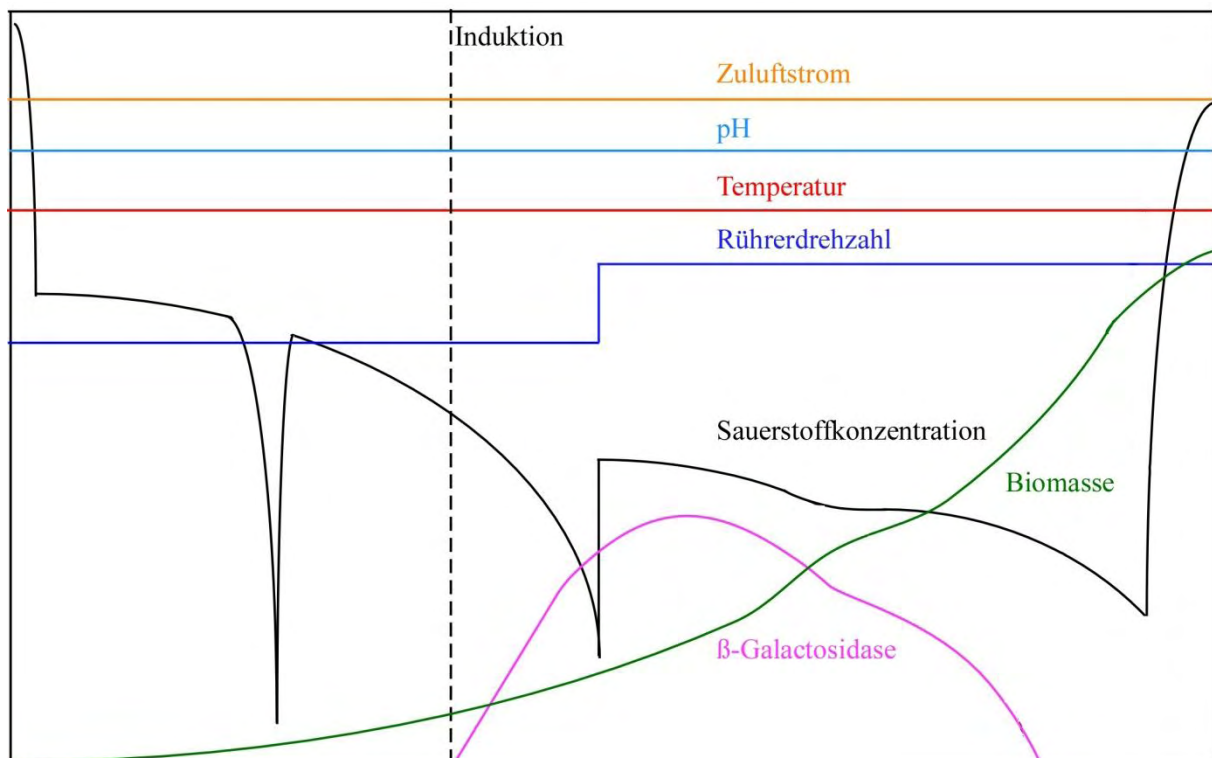


Abb. 4-1: Theoretische Verläufe der Sauerstoffkonzentration, Temperatur, Zellmasse, Rührerdrehzahl, pH-Wert, Biomasse, β -Galactosidase-Aktivität und Begasung der Batchfermentation. Vor Induktion wird die dynamische Methode zur Bestimmung des k_{La} -Wertes angewendet.

Bis zum Induktionszeitpunkt soll der k_{La} -Wert durch die dynamische Methode bestimmt werden. Die Induktion wird zwei Stunden nach Kultivierungsbeginn eingeleitet. Durch die Spal-

tung der Lactose erfolgt eine Umstellung der Kohlenstoffquelle von Glycerin auf Glucose. Dies wirkt sich nicht auf den Biomassezuwachs und den $pO_2\%$ aus, da die katabolen Enzyme des Glucose-Stoffwechsels konstitutiv exprimiert werden. Erst bei vollständiger Verstoffwechslung der Glucose erfolgt ein sichtbarer Einbruch im Wachstum und im $pO_2\%$ bis die Enzyme zur Verstoffwechslung des Glycerins in ausreichender Menge exprimiert sind und das Wachstum erneut einsetzt. Die Kultivierung endet, sobald das Glycerin verbraucht ist und der Übergang in die stationäre Phase mit einem steilem Anstieg des $pO_2\%$ erfolgt.

4.4.2. Vorbereitung des Reaktors

Verwendet wurden der BIOSTAT B und BIOSTAT BPlus mit 2 l UniVessel von Sartorius Stedim Biotech mit 2 l Arbeitsvolumen. Zur Messung der Prozessgrößen pH-Wert, $pO_2\%$ und Temperatur wurden entsprechende Sonden montiert. Im BIOSTAT BPlus wurde zusätzlich eine Trübungssonde verbaut. Die Messdatenerfassung erfolgte über das Multi-Fermenter-Control-System MFSC/win 3.0 (Sartorius Stedim Biotech).

Die Reaktoren wurden gemäß Handbuch zusammengebaut, mit Medium befüllt und nach Kalibrierung der pH-Elektrode für 15 Minuten bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach Komplementierung des Mediums und Versorgung mit Druckluft und Kühlwasser wurde die Trübungssonde (Nutz nach außen zeigend) ohne Begasung und Rührerstillstand kalibriert und die pH-Sonden durch externe pH-Messung rekaliert. Die Nullpunktkalibrierung der pO_2 -Sonde erfolgte mit 1 l min^{-1} Stickstoffbegasung bei 1000 min^{-1} . Die Steilheit wurde mit Druckluft und gleicher Parametrierung ermittelt.

4.4.3. Bestimmung des k_{La} durch die dynamische Methode

Die Begasung wurde in der ersten exponentiellen Phase abgeschaltet und nach Absinken des $pO_2\%$ auf ca. 5 % wieder eingeschaltet. Die zur Auswertung benötigten Daten des $pO_2\%$ wurden durch das MFCS aufgezeichnet.

4.5. Induktion

Die Initiation zur β -Galactosidase-Expression erfolgte mit Lactose-Monohydrat. Die Volumenänderung durch Probenahmen vor Induktion wurden vernachlässigt, wodurch sich die tatsächliche Lactose-Konzentrationen leicht erhöhen. Zudem ergeben sich bei Versuch 2 und 3 sowie in der Kultivierung durch Vernachlässigung des Monohydrats um 5 % geringere Lactose-Konzentrationen als angegeben. Die eingesetzten Konzentrationen sind im Ergebnisteil des jeweiligen Versuchs aufgeführt.

4.6. Bestimmung der Biotrockenmasse nach SOP-Nr. 320001-02

Die Ermittlung der Biotrockenmasse-Konzentrationen erfolgte in Doppelbestimmung, aus denen die Mittelwerte gebildet wurden. Dazu wurde jeweils 1 ml Probe in ein getrocknetes und ausgewogenes Mikroreaktionsgefäß überführt und der Überstand nach Zentrifugation für 3 min bei 13.000 min^{-1} dekantiert. Die geöffneten Mikroreaktionsgefäße wurden für 24 h bei $105 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet, im Exsikkator mit Unterdruck abgekühlt und anschließend gewogen. Durch Gleichung 4-1 wurde die Biotrockenmasse-Konzentration berechnet und anschließend gemittelt.

$$c_X = \frac{m_{\text{filled}} - m_{\text{tube}}}{V_{\text{susp}}} \quad (4-1)$$

4.7. Bestimmung der Biofeuchtmasse

Während der Fermentation im Bioreaktor wurde die Biofeuchtmasse in Doppelbestimmung ermittelt. Dafür wurde jeweils 1 ml Bakteriensuspension in ein ausgewogenes Mikroreaktionsgefäß überführt und der Überstand nach 3 min Zentrifugation bei 13.000 min^{-1} dekantiert. Das Mikroreaktionsgefäß wurde erneut gewogen und die Biofeuchtmasse-Konzentrationen ermittelt und gemittelt.

$$c_{X, \text{wet}} = \frac{m_{\text{filled}} - m_{\text{tube}}}{V_{\text{susp}}} \quad (4-2)$$

4.8. Messung der optischen Dichte nach SOP-Nr. 320101-04

Die optische Dichte wurde in Einweg-Küvetten aus Polystyrol photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Luft bestimmt. Vor Fermentationsbeginn wurde das Medium bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen vermessen und in die Berechnungen einbezogen. Um im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes zu arbeiten, wurde die Probe ab einem Messwert $> 0,6$ mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und der Verdünnungsfaktor in die Berechnung aufgenommen.

$$\Delta OD = f \cdot (OD - OD_{\text{Med}}) \quad (4-3)$$

4.9. Produktanalytik

Tab. 4-5: Z-Puffer

| Komponente | Summenformel | M in g mol ⁻¹ | c in g l ⁻¹ | c in mol l ⁻¹ |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O | 177,99 | 5,34 | 0,03 |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O | 156,01 | 10,92 | 0,07 |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 246,28 | 2,46 | 0,01 |
| Kaliumchlorid | KCl | 74,55 | 0,07 | 0,001 |
| β-Mercaptoethanol | C ₂ H ₆ OS | 78,13 | 3,91 | 0,05 |

Das β-Mercaptoethanol wurde kurz vor Analysenbeginn hinzugefügt.

4.9.1. Probenvorbereitung

In einer frühen Phase der Literaturrecherche wurde der Zellaufschluss durch Toluol festgelegt und in allen Versuchen durchgeführt. Bei intensiverer literarischer Nachforschung erwies sich diese Methode jedoch als ungeeignet. Für genauere Informationen siehe 5.1.3. „Vergleich der β-Galactosidase-Aktivität mit Literaturwerten“.

Zur Bestimmung wurde 1 ml Bakteriensuspension genommen, welche bei 13.000 min⁻¹ für 3 min zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes bei -20 °C eingefroren wurden. Am Tag der Analyse wurden die Pellets in 1 ml Z-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) gewaschen, bei 13.000 min⁻¹ für 3 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl Z-Puffer resuspendiert, 5 µl Toluol dazu pipettiert und die Suspension nach ca. 5 s Vortexen für 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation in eine neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

4.9.2. β-Galactosidase-Assay

Die Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte photometrisch über den Umsatz von o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG), welches bei der enzymatischen Reaktion durch β-Galactosidase in Galactose und den gelben Farbstoff o-Nitrophenol gespalten wird, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm bei 37 °C gemessen werden kann. Mittels Extinktionskoeffizienten kann die Extinktion in die spezifische Aktivität umgerechnet werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Methode wie bei Kreuzmann [2003] mit Z-Puffer ohne β-Mercaptoethanol angewendet. Das Pipettierschema ist in Tab. 4-6 dargestellt. Verdünnungen wurden bei Bedarf mit 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH = 7,0) hergestellt.

Die zweite Methode ist an die Assay-Vorschrift von Invitrogen [2015] angelehnt. Verdünnungen und das Assay wurden mit Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol nach dem Pipettierschema Tab. 4-7 durchgeführt.

Tab. 4-6: Ablauf- und Pipettierschema des β -Galactosidase-Assays wie bei Kreuzmann

| Komponente | Blank | Probe |
|---|-------------|-------------|
| Z-Puffer \emptyset BME (s. Tab. 4-5) | 400 μ l | 400 μ l |
| Probe | - | 500 μ l |
| 3 min Inkubation bei 37 °C | | |
| ONPG-Lösung (4 g l ⁻¹) | - | 100 μ l |
| Mischen, Zugabe der Stopp-Lösung nach exakt 10 min Inkubation bei 37 °C | | |
| Na ₂ CO ₃ -Lösung (1 M) | - | 500 μ l |
| VE-H ₂ O | 500 μ l | - |
| Messung der Extinktion (<i>E</i>) bei 420 nm und 37 °C | | |

Tab. 4-7: Ablauf- und Pipettierschema des β -Galactosidase-Assays nach Invitrogen

| Komponente | Blank | Probe |
|---|-------------|-------------|
| Z-Puffer (s. Tab 4-5) | 730 μ l | 200 μ l |
| Probe | - | 30 μ l |
| 3 min Inkubation bei 37 °C | | |
| ONPG-Lösung (4 g l ⁻¹) | 70 μ l | 70 μ l |
| Mischen, Zugabe der Stopp-Lösung nach exakt 30 min Inkubation bei 37 °C | | |
| Na ₂ CO ₃ -Lösung (1 M) | - | 500 μ l |
| Messung der Extinktion (<i>E</i>) bei 420 nm und 37 °C | | |

Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte durch nachfolgende Gleichungen.

$$\Delta E = (E - E_{\text{blank}}) \cdot f \quad (4-4)$$

$$a = \frac{\Delta E \cdot V_t}{\varepsilon_{\text{ONP}} \cdot d \cdot t_{\text{inc}} \cdot V_s} \cdot \frac{V_{\text{susp}}}{V_{\text{res}}} \quad (4-5)$$

$$\alpha(t) = \frac{a(t)}{c_{\text{X,OD}}(t)} \quad (4-6)$$

4.10. Substrat-Analytik

4.10.1. Bestimmung der Glycerin-Konzentration

Das Assay „Glycerol“ (K-GCROL) von Megazyme wurde zur Bestimmung verwendet und der Makroansatz in Küvetten nach folgendem Schema durchgeführt.

Tab. 4-8: Ablauf- und Pipettierschema des Glycerin-Assays

| Komponente | Blank | Probe |
|---|--------|--------|
| VE-Wasser | 525 µl | 500 µl |
| Probe | - | 25 µl |
| Lösung 2 (NADH/ATP/PEP/Puffer) | 50 µl | 50 µl |
| Suspension 3 (Pyruvatkinase/L-Lactatdehydrogenase) | 5 µl | 5 µl |
| Bei RT inkubieren bis der Extinktions-Wert (E_1) bei 340 nm stabil ist (Endreaktion) | | |
| Suspension 4 (Glycerinkinase) | 5 µl | 5 µl |
| Bei Raumtemperatur inkubieren bis der Extinktionswert (E_2) über 2 Minuten stabil ist | | |

Die Glycerin-Konzentration lässt sich über folgende Gleichungen berechnen:

$$\Delta E = ((E_1 - E_2) - (E_{1,\text{blank}} - E_{2,\text{blank}})) \cdot f = (\Delta E - \Delta E_{\text{blank}}) \cdot f \quad (4-7)$$

$$c_{\text{gly}} = \frac{V_t \cdot M_{\text{gly}}}{\varepsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot V_s} \cdot \Delta E \quad (4-8)$$

4.10.2. Bestimmung der Lactose- und Glucose-Konzentration

Verwendet wurde das „Lactose/Sucrose/D-Glucose Assay Kit“ (K-LACSU) von Megazyme. Die Messung der Glucose- und Lactose-Konzentration wurde simultan durchgeführt. Die Proben wurden bei Verlassen des Messbereich $[(0,02-0,5) \text{ g l}^{-1}]$ entsprechend verdünnt.

Gearbeitet wurde nach folgendem Schema:

Tab. 4-9: Ablauf- und Pipettierschema des Lactose- und Glucose-Assays

| Komponente | Probe (Lactose) | Probe (Glucose) | Blank | Standard |
|--|--------------------|--------------------|-------|----------|
| Probe | 40 µl | 40 µl | - | - |
| Suspension 2 β-Galactosidase | 40 µl | - | - | - |
| 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH-Wert = 4,5) | - | 40 µl | - | - |
| VE-Wasser | - | - | 80 µl | 60 µl |
| Lösung 5 D-Glucose-Standard ($c_{\text{glc, std}} = 1 \text{ g l}^{-1}$) | - | - | - | 20 µl |
| Für 20 min bei 50 °C inkubieren | | | | |
| Lösung 4 Glucose-Oxidase/Peroxidase | 500 µl | | | |
| Für 20 min bei 50 °C inkubieren und bei 510 nm bei RT die Extinktion bestimmen (E) | | | | |

Über die Gleichungen 4-9 bis 4-11 können Glucose- und Lactose-Konzentrationen berechnet werden.

$$\Delta E = (E - E_{\text{blank}}) \cdot f \quad (4-9)$$

$$c_{\text{lac}} = \frac{\Delta E_{\text{lac}} - \Delta E_{\text{glc}}}{V_s} \cdot \frac{m_{\text{glc, std}}}{\Delta E_{\text{glc, std}}} \cdot \frac{M_{\text{lac}}}{M_{\text{glc}}} \quad (4-10)$$

$$c_{\text{glc}} = \frac{\Delta E_{\text{glc}}}{V_s} \cdot \frac{m_{\text{glc, std}}}{\Delta E_{\text{glc, std}}} \quad (4-11)$$

4.10.3. Bestimmung der Galactose-Konzentration

Galactose wurde mit dem Assay „L-Arabinose & D-Galactose (Rapid)“ K-ARGA von Megazyme bestimmt und nach folgendem Schema im Makroansatz durchgeführt:

Tab. 4-10: Ablauf- und Pipettierschema des Galactose-Assays

| Komponente | Blank | Probe |
|--|--------|--------|
| VE-Wasser | 525 µl | 500 µl |
| Probe | - | 25 µl |
| Lösung 1 Puffer | 50 µl | 50 µl |
| Lösung 2 NAD ⁺ | 25 µl | 25 µl |
| Mischen und nach ca. 3 Minuten die Extinktion bei 340 nm und 25 °C ablesen (E_1) | | |
| Suspension 3 β-Galactose Dehydrogenase/Galactose Mutarotase | 5 µl | 5 µl |
| Bei RT inkubieren bis der Extinktionswert (E_2) über 1 Minute lang stabil ist | | |

Durch die Gleichung 4-7 und 4-12 kann die Galactose-Konzentration berechnet werden.

$$c_{\text{gal}} = \frac{V_t \cdot M_{\text{gal}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot V_s} \cdot \Delta E \quad (4-12)$$

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Untersuchung der Induktionsbedingungen

Da im Praktikum auf die Verwendung von rekombinanten Organismen verzichtet wird, wird das im Genom vorhandene *lac*-Operon in *E. coli* BL21 induziert. Aus Kostengründen wird auf die Induktion durch IPTG verzichtet, so dass die nachfolgenden Versuche daraufhin zielen, Induktionsbedingungen zu bestimmen, die zu hohen β -Galactosidase-Aktivitäten durch Lactose führen.

5.1.1. Konzentrationseinfluss der Lactose auf den β -Galactosidase-Verlauf

In folgendem Versuch wurde untersucht, ob eine Proportionalität zwischen der Induktor-Konzentration und dem Verlauf der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität besteht und ob durch höhere Lactose-Konzentrationen höhere Ausbeuten an β -Galactosidase erzeugt werden können. Dafür wurden in Versuch 1 mehreren Schüttelkolben in der exponentiellen Phase bei einem $\Delta OD \approx 1,5$ mit in Tab. 5-1 aufgelisteten Lactose-Konzentrationen induziert.

Tab. 5-1: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 1 eingesetzt wurden.

| $c_{lac,stock}$ in mM | $V_{L,ind}$ in ml | c_{lac} in mmol l ⁻¹ | $V_{L,lac}$ in ml | m in g | m_{real} in g | c_{gly} in g l ⁻¹ |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|----------|-----------------|--------------------------------|
| 11 | 10 | 1 | 50 | 0,198 | 0,1992 | 5 |
| 55 | 10 | 5 | 20 | 0,396 | 0,3983 | 5 |
| 110 | 10 | 10 | 50 | 1,98 | 1,9698 | 5 |
| 220 | 10 | 20 | 50 | 3,969 | 3,9642 | 5 |

Der Zellaufschluss fand anders als in den Methoden beschrieben auf Eis statt und zur Messung der Aktivität wurde die Methode wie bei Kreuzmann ohne Mercaptoethanol angewendet. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen β -Galactosidase-Aktivitäten dieser Arbeit wurden die Faktoren aus den verschiedenen angewendeten Aufschluss- und Assay-Methoden ermittelt (s. 8.1.4 „Aktivitätsverhältnisse verschiedener Aufschluss- und Assay-Bedingungen“ und 8.1.5 „Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die β -Galactosidase-Ausbeute“) und die Werte entsprechend angepasst. Die Verläufe der β -Galactosidase-Aktivitäten sind in Abb. 5-1 grafisch dargestellt. Die Werte wurden dafür bei ähnlichem Verlauf gemittelt und die Unterschiede der einzelnen Kurven hervorgehoben. Der gestrichelte Verlauf der β -Galactosidase-Aktivität bei einer Induktor-Konzentration von 20 mM ist theoretisch und basiert nicht auf Messwerte.

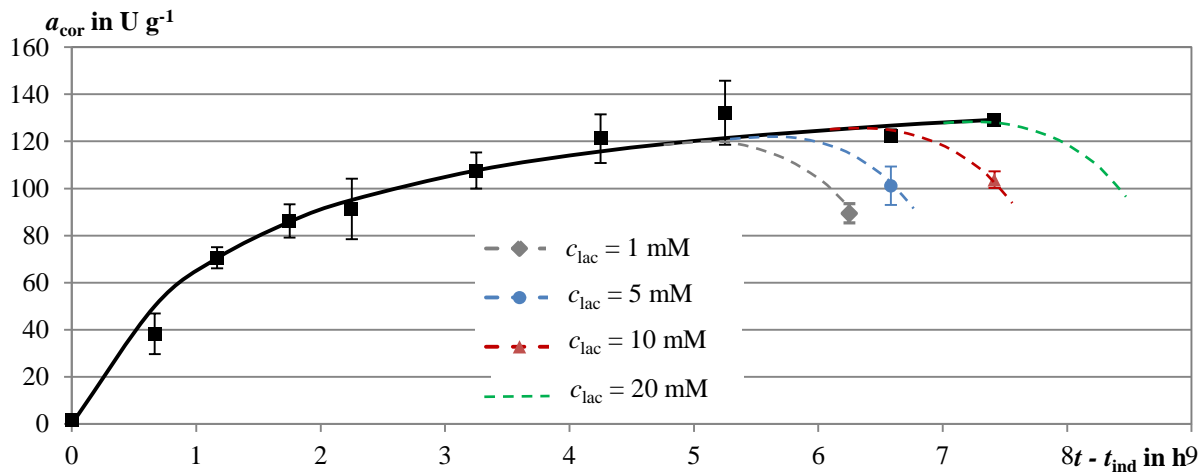


Abb. 5-1: Aufgetragen sind die Mittelwerte der spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten ab dem Zeitpunkt der Induktion mit aufgeführten Lactose-Konzentrationen (schwarze Kurve). Die gestrichelten Linien zeigen die Abnahme nach Aufbrauchen der Lactose. Die Abnahme für 20 mM ist hypothetisch. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis und das Assay wurde mit der Methode wie bei Kreuzmann durchgeführt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Ergebnissen dieser Arbeit um den Faktor 3 angepasst.

In Abb. 5-1 ist zu erkennen, dass die Induktionen mit aufgeführten Lactose-Konzentrationen zu ähnlichen Sättigungsfunktionen in der β -Galactosidase-Aktivität führen und der Endwerte aller Kurven bei ca. 120 U g^{-1} liegen. Generell weisen die Ergebnisse hohe Fehler auf, da die Proben im Assay nicht mehrfach bestimmt wurden und nur die Ergebnisse des doppelten Kulturansatzes einer Induktor-Konzentration gemittelt wurden. Die eingesetzten Lactose-Konzentrationen scheinen weder einen signifikanten Einfluss auf die Bildungsgeschwindigkeit noch auf die maximale β -Galactosidase-Aktivität zu besitzen. Bereits bei einer Lactose-Konzentration von 1 mM scheint mindestens eines der beiden Enzyme, die für den Transport in die Zelle (Galactosid-Permease) und die Umwandlung der Lactose in den eigentlichen Induktor Allolactose katalysieren (β -Galactosidase), mit Substrat gesättigt zu sein, wodurch das Enzym mit Maximalgeschwindigkeit umgesetzt und eine Erhöhung der Lactose-Konzentration den Substratumsatz und damit die Expressionsrate nicht erhöhen kann. Auch in der Arbeit von Zwaig et al. [1970] lässt sich durch Erhöhung der IPTG-Konzentration von 0,5 mM auf 5 mM keine Änderung in der β -Galactosidase-Aktivität feststellen. Zudem wurden die Ergebnisse in Versuch 2 (näher beschrieben in 5.1.2 „Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die β -Galactosidase-Expression“) bestätigt, in dem die Erhöhung der Lactose-Konzentrationen (3 g l^{-1} , 5 g l^{-1} und 10 g l^{-1}) in zueinander ähnliche Kurvenverläufe resultierten. Kontraintuitiv erscheint, dass auch bei 1 mM Lactose-Konzentration die Induktion über fünf Stunden erfolgt. Im Vergleich dazu nimmt die β -Galactosidase-Konzentration während der Kultivierung (s. Abb. 5-4 Diagramm B) bereits zwei Stunden nach Induktion signifikant ab. Ein Unterschied zwischen den beiden Kultivierungen liegt in der Kultivierungstemperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Bioreaktor und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttel-

versuch. Bei höheren Temperaturen ist die Aktivität der *lac*-Enzyme gesteigert, wodurch die Lactose schneller verstoffwechselt wird und sich der Zeitraum der Induktionswirkung verkürzt. Unwahrscheinlich erscheint jedoch, dass die Lactose allein durch die Temperaturdifferenz besonders bei 1 mM (ca. 0,34 g l⁻¹) im Gegensatz zu 5 g l⁻¹ in der Kultivierung im Reaktor derartig langsam verstoffwechselt wird. Da in den Schüttelversuchen keine Substrat-Analytik durchgeführt wurde, kann keine Aussage über den Lactose-Verlauf getroffen werden.

Da die Lactose-Konzentrationen zwischen 1 mM (0,34 g l⁻¹) und 10 g l⁻¹ keine signifikanten Einflüsse auf die Ausbeute oder den Verlauf der β -Galactosidase-Aktivität aufweisen und durch Erhöhen der Lactose-Konzentration lediglich das Wachstum und die Induktionsdauer verlängert werden, sollte im Praktikumsversuch eine Lactose-Konzentration gewählt werden, bei der sowohl die Zu- als auch die Abnahme der β -Galactosidase-Aktivität innerhalb des Versuches beobachtet werden kann. Weiterhin sollte die Kultivierungsdauer durch die zusätzliche Kohlenstoffquelle nicht zu stark verlängert werden.

5.1.2. Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die β -Galactosidase-Expression

Für das Praktikum ebenfalls von Interesse ist, ob und inwiefern sich die β -Galactosidase-Expression verändert, wenn anstelle eines Glycerin-Lactose-Gemisches ausschließlich Lactose als Kohlenstoffquelle verwendet wird. In Versuch 2 wurden dazu die β -Galactosidase-Verläufe bei Wachstum auf Lactose untersucht und anschließend mit den Ergebnissen aus Versuch 1, bei dem ein Lactose-Glycerin-Gemisch verwendet wurde, verglichen. Da im Praktikum die Induktion erst nach einer Wachstumsphase eingeleitet werden soll, wurde in Schüttelkolben bei 30 °C die Induktion nach Verbrauch des Glycerins bei Übergang in die stationäre Phase bei $\Delta OD \approx 2$ durch in Tab. 5-2 aufgeführte Lactose-Konzentrationen eingeleitet. Die ermittelten Aktivitäten wurden um den Faktor 3 erhöht, da der Aufschluss bei 0 °C und das Assay nach der von Kreuzmann durchgeführten Methode ausgeführt wurde.

Tab. 5-2: Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 2 eingesetzt wurden. Aus einer Stock-Lösung mit $m_{\text{real}} = 36,0$ g auf 100 ml wurden die Induktionslösungen durch entsprechende Verdünnungen angesetzt. Die Lactose der Stock-Lösung war teilweise am Flaschenrand auskristallisiert, wodurch die Konzentrationen leicht verfälscht sind.

| c_{stock} in g l^{-1} | $c_{\text{lac,stock}}$ in g l^{-1} | $V_{\text{L,ind}}$ in ml | c_{lac} in g l^{-1} | $V_{\text{L,stock}}$ in ml | $V_{\text{L,lac}}$ in ml | c_{gly} in g l^{-1} |
|---|---|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 360 | 33 | 10 | 3 | 1,83 | 20 | 1,8 |
| 360 | 55 | 10 | 5 | 3,05 | 20 | 1,8 |
| 360 | 110 | 10 | 10 | 6,1 | 20 | 1,8 |

In Abb. 5-2 wurden die Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten der unterschiedlichen Induktor-Konzentrationen bei Induktion in der stationären und exponentiellen Phase aufgetragen.

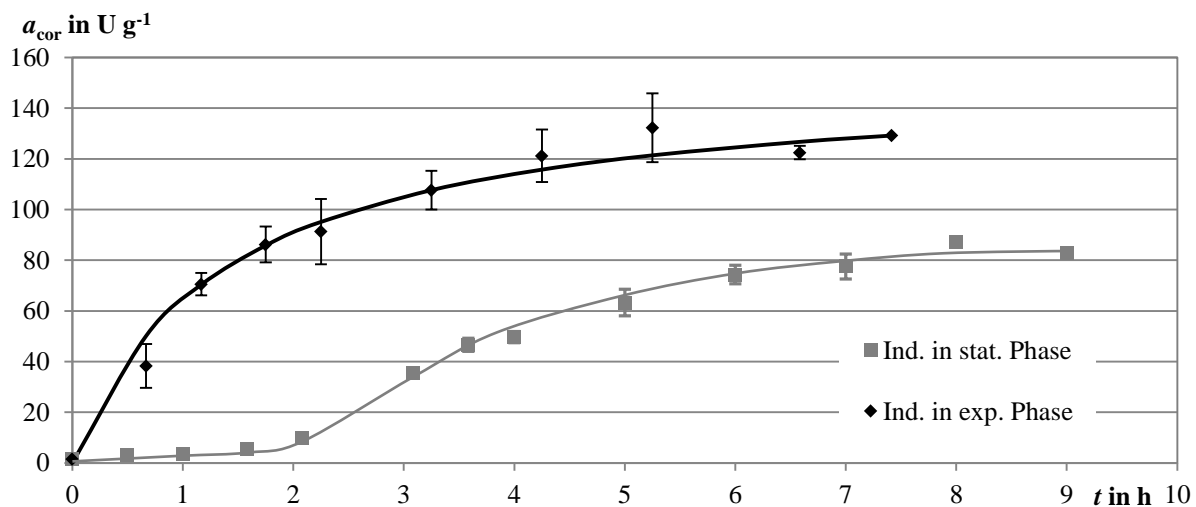


Abb. 5-2: Verlauf der spezifischen Aktivität von β -Galactosidase nach Induktion mit Lactose in der stationären Phase (Versuch 2) und bei Induktion in der exponentiellen Phase (Versuch 1). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen ab dem Zeitpunkt der Induktion. Da der Aufschluss auf Eis anstatt bei 37°C erfolgte und das Assay wie bei Kreuzmann ohne β -Mercaptoethanol durchgeführt wurde, sind die Werte um den Faktor 3 korrigiert, sodass sie mit anderen Werten dieser Arbeit vergleichbar sind.

In Abb. 5-2 sind deutliche Unterschiede zwischen den gemessenen Aktivitäten der beiden Versuche zu erkennen. Beim Wachstum ohne zusätzliches Glycerin steigt die β -Galactosidase-Aktivität erst nach einer Lag-Phase von zwei Stunden auf einen Endwert von ca. 80 U g^{-1} , während die Expression bei Anwesenheit von Glycerin ohne erkennbare Lag-Phase beginnt und um 38 % höhere maximale Werte von ca. 130 U g^{-1} erreicht werden. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Law et al. [2002], bei denen leicht höhere maximale β -Galactosidase-Werte bei Wachstum auf Lactose als bei Wachstum auf einem Glycerin-Lactose-Gemisch erreicht worden sind. Der signifikante Unterschied zwischen Versuch 1 und Versuch 2 sowie zu den Versuchen von Law et al. [2002] liegt in den Zeitpunkten der Induktion. In Versuch 1 sowie bei Law et al. [2002] wurde die Induktion während der Wachstumsphase eingeleitet, während sich die Zellen in Versuch 2 bereits in der stationären Phase befanden. Bei Eintritt in die stationäre Phase sinkt der ATP- und damit auch

der cAMP-Gehalt in der Zelle [Chapman et al. 1971], während die cAMP-Konzentration bei Wachstum auf Glycerin in der exponentiellen Phase hoch ist [Bettenbrock et al. 2005]. Die Aktivierung durch den cAMP-CRP-Komplex ist bei verminderter cAMP-Verfügbarkeit bei Zellen in der stationären Phase im Vergleich zu Zellen mit einer höheren cAMP-Konzentration in der exponentiellen Phase folglich geringer, woraus wiederum eine verlangsamte Zunahme der β -Galactosidase-Konzentration und der Induktormoleküle zur Deaktivierung des *lac*-Repressors resultieren. Die schlagartige Zunahme der β -Galactosidase nach zwei Stunden lässt vermuten, dass die Induktion ab einer bestimmten Konzentration an Allolactose oder cAMP-CRP-Komplex zu einer maximalen Expressionsrate unter gegebenen Bedingungen führt. Auch der Unterschied in der maximalen β -Galactosidase-Konzentration lässt sich durch die erniedrigte cAMP-Konzentration bei Induktion der Zellen in der stationären Phase erklären. Da in allen Kulturen mit einer Lactose-Konzentration induziert wurde, die keinen Einfluss auf Ausbeute und Expressionsgeschwindigkeit besitzt (s. 5.1.1 „Konzentrations Einfluss der Lactose auf den β -Galactosidase-Verlauf“), wird die Zunahme des cAMPs durch die Lactose in beiden Versuchsdurchführungen in einem ähnlichem Maß erfolgen. In den Zellen, die in der exponentiellen Phase induziert wurden, kann folglich eine höhere Endkonzentration an cAMP erreicht werden und die Transkription der *lac*-Gene dadurch vermehrt stattfinden. Nach diesen Überlegungen müsste ein Wachstum auf Lactose als alleinige Kohlenstoffquelle und bei Überführung der Zellen aus der exponentiellen Phase auf ein Medium mit Lactose zu Ausbeuten ähnlich zu Versuch 1 führen. Die These unterstützen die Ergebnisse von Law et al. [2002].

Da der Übergang in die stationäre Phase in Versuch 2 nicht verfolgt wurde, wurde Versuch 3 durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die unterschiedlichen Ergebnisse aus einer vermeidlich bereits eingesetzten Zellyse entstanden sind. Dafür wurden in zwei Kolben der Übergang in die stationäre Phase verfolgt und parallel zwei Kontrollkolben in der exponentiellen Phase jeweils bei $\Delta OD \approx 2$ mit Lactose induziert.

Tab. 5-3: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina des Induktors Lactose-Monohydrat sowie die Glycerin-Konzentrationen, die in Versuch 3 eingesetzt wurden.

| $c_{lac,stock}$ in $g\ l^{-1}$ | $V_{L,ind}$ in ml | c_{lac} in $g\ l^{-1}$ | $V_{L,lac}$ in ml | m in g | m_{real} in g | c_{gly} in $g\ l^{-1}$ | Beschreibung |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|
| 151 | 1 | 1,5 | 20 | 3,03 | 3,0243 | 1,8 | Ind. in stat. Phase |
| 151 | 1 | 1,5 | 20 | 3,03 | 3,0243 | 3 | Ind. in exp. Phase |

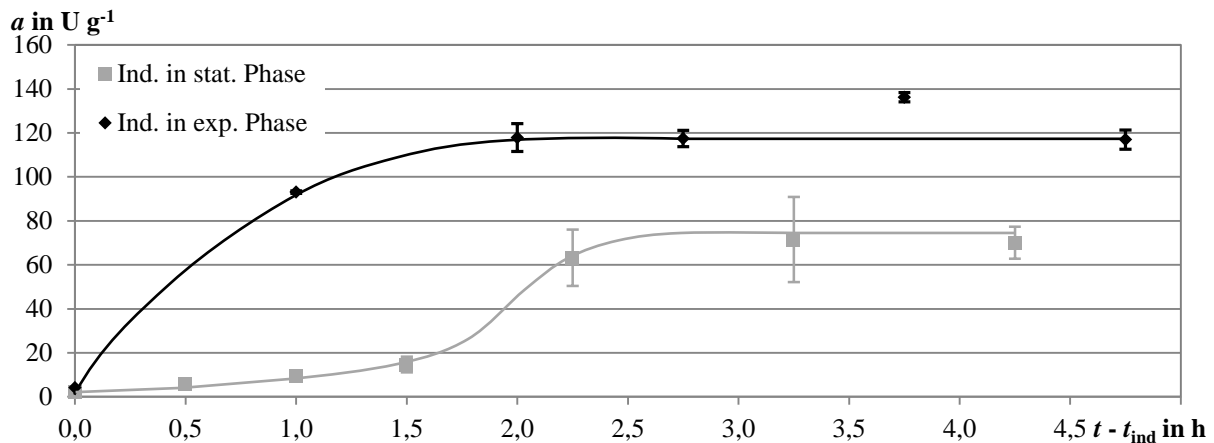


Abb. 5-3: Verlauf der spezifischen Aktivität von β -Galactosidase nach Induktion mit Lactose ($c_{\text{lac}} = 1,5 \text{ g l}^{-1}$) in der stationären Phase (ohne Glycerin) und bei Induktion in der exponentiellen Phase (mit Glycerin) ab dem Zeitpunkt der Induktion.

Auch in Abb. 5-3 sind die Verläufe ähnlich wie in vorangegangenen Experimenten (s. Abb. 5 2), jedoch ist die Lag-Phase auf 1,5 h verkürzt und die Endwerte in beiden Kulturen bereits nach zwei anstatt vier Stunden erreicht. Aufgrund der hohen Fehlerabweichungen in Versuch 1 ist anzunehmen, dass der Endwert auch innerhalb der ersten Versuchsdurchführung bereits nach zwei Stunden erreicht wurde. Die kürzere Zeit zum Erreichen des Endwerts bei Wachstum auf Lactose könnte durch einen höheren Restanteil an cAMP in der Zelle entstanden sein, da die Induktion direkt nach Übergang in die stationäre Phase eingeleitet wurde. Die Dauer, in der sich die Zellen in der stationären Phase befunden haben, ist für Versuch 2 hingegen nicht bekannt.

Eine Induktion mit Lactose in der stationären Phase bietet sich in diesem Praktikum durch die auftretende Lag-Phase und die damit verbundene Zeitverzögerung nicht an. Zudem führt die Induktion in der exponentiellen Phase zu ca. 40 % niedrigeren maximalen β -Galactosidase-Aktivitäten.

5.1.3. Vergleich der β -Galactosidase-Aktivität mit Literaturwerten

In der Literatur werden verschiedene Angaben zu β -Galactosidase-Ausbeuten durch ein induziertes, genomisches *lac*-Operon gegeben. Da die Angaben oftmals in Miller Units ausgedrückt sind, wurden die ermittelten Werte mit Gleichung 5-1 umgerechnet. Beachtet werden sollte, dass Miller Units für einen Umsatz bei 28 °C definiert sind und die Extinktion nicht auf das Gesamtvolumen des Testansatzes bezogen wird [Miller 1972]. Da das Assay hier bei 37 °C mit einem geringeren Testvolumen als nach Miller durchgeführt wurde, werden im Vergleich höhere Unit-Werte erreicht.

$$a_{\text{Miller}} = \frac{1000 \cdot \Delta E}{t_{\text{inc}} \cdot \Delta OD \cdot V_s} \cdot \frac{V_{\text{susp}}}{V_{\text{res}}} \quad (5-1)$$

$$= 300,65 U_{\text{Miller}}$$

mit $\Delta E = 0,61$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $\Delta OD = 6,6$; $V_s = 0,001 \text{ ml}$; $V_{\text{susp}} = 1 \text{ ml}$; $V_{\text{res}} = 1 \text{ ml}$

Nach Miller [1972] führt ein induziertes *lac*-Operon zu ca. 1000 Miller Units. Danach wurde ca. nur ein Drittel der von Miller prognostizierten Aktivität erreicht. Bei Hogema et al. [1997] wurden bei Wachstum auf Lactat und Induktion mit Lactose Miller Units von ca. 3000 erreicht, welche dreimal so hoch sind wie bei Miller [1972] und 10-mal so hoch wie die hier ermittelten Werte. Das Assay wurde in der Arbeit von Hogema et al. [1997] nach der Methode von Giacomini et al. [1992] durchgeführt, dessen Veröffentlichung nicht zur Einsicht verfügbar ist. Eine Untersuchung, auf welche Weise das Assay erfolgt ist und ob signifikante Unterschiede zu dem hier durchgeführten Assay bestehen, die zu solch hohen Werten führen, ist folglich nicht möglich. Es bestätigt sich dadurch jedoch, dass in den hier durchgeführten Versuchen signifikant weniger β -Galactosidase-Aktivität erzeugt werden konnte als ein voll induziertes *lac*-Operon im Normalfall generiert. Mögliche Ursachen können unbekannte Mutation im Organismus sein oder in der Induktions-, Aufschluss- oder Assay-Methode liegen. Nach Deutscher [1974] eignet sich die Aufschlussmethode zur Freisetzung von Molekülen bis zu einer Größe von 50 kDa, da durch Toluol die innere Zellmembran perforiert und die äußere intakt gelassen wird, wodurch β -Galactosidase mit 465 kDa zum Großteil in den Zellen verbleibt und durch Zentrifugation sedimentiert und entfernt wird [Jackson & DeMoss 1965]. Bei der durch den Aufschluss bei 0 °C erzeugten Aktivität, konnte im Vergleich zu dem Aufschluss bei 37 °C jedoch eine Erhöhung um 50 % festgestellt werden. Auch die reproduzierbaren Kurvenverläufe in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass zumindest ein Teil durch den Aufschluss freigesetzt wird. Ebenfalls könnte das Waschen der Proben nach Auftauen der Zellpellets durch teil-lysierte Zellen zu dem β -Galactosidase-Verlust beigetragen haben. In der Theorie müssten höhere β -Galactosidase-Werte gemessen werden, wenn die Zelltrümmer wie bei Miller [1972] nicht entfernt werden oder die Aufschlussmethode zu einem vollständigeren Aufschluss hin verändert wird. Der Aufschlussgrad könnte zusätzlich zum Toluol durch Perforation der äußeren Membran mit EDTA erhöht werden [De Smet et al. 1978]. Ebenfalls wurde als Aufschlussreagenz für ein β -Galactosidase-Assay - ohne Entfernung des Zelldebris - das anionische Tensid Natriumdesoxycholol verwendet [Zang & Bremer 1995]. Auch auf Grund der Gesundheitsschädlichkeit von Toluol ist es sinnvoll, in weiteren Versuchen einen Aufschlusspuffer zu entwickeln, der zu einem effizienteren Aufschluss führt. Da durch den

Aufschluss durch Toluol sinnvolle Kurven erzeugt werden können, wird die Methode vorerst in die Versuchsanleitung für das Praktikum übernommen.

5.2. Kultivierung nach Praktikumsanleitung

Zwei Kultivierungen wurden in Doppelbestimmung nach dem bis dato theoretisch erstellten Praktikumskript durchgeführt, um den Ablauf und die Kurvenverläufe in der Praxis zu bestätigen. Irrtümlich wurden 10 g l^{-1} Glycerin anstatt die berechneten $6,7 \text{ g l}^{-1}$ eingesetzt. Lactose-Einwaagen und -Konzentrationen sind in Tabelle 5-4 aufgelistet.

Tab. 5-4: Einwaagen, Konzentrationen und Volumina bezüglich Lactose-Monohydrat sowie die eingesetzte Glycerin-Konzentration für die Kultivierungen in Bioreaktoren.

| $c_{\text{lac,stock}}$ in g l^{-1} | V_{ind} in ml | c_{lac} in g l^{-1} | V_{lac} in ml | m in g | m_{real} in g | c_{gly} in g l^{-1} | Beschreibung |
|---|------------------------|---------------------------------------|------------------------|----------|------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 255 | 20 | 5 | 50 | 12,75 | 12,72 | 10 | Ind. bei $t = 2 \text{ h}$ |

Im Folgenden werden die Verläufe der Mess- und Analytik-Daten ausgewertet und anschließend eine Auswertung wie im Praktikum verlangt durchgeführt.

5.2.1. Kultivierungsverlauf

In Abbildung 5-4 sind die ermittelten Kurvenverläufe der Übersichtlichkeit halber in drei Diagrammen dargestellt. In Diagramm A sind die zwei prognostizierten Wachstumsphasen im Verlauf der optischen Dichte deutlich zu erkennen. In den ersten vier Stunden liegt ein Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,53 \text{ h}^{-1}$ vor, die nicht bei Zugabe, sondern erst nach vollständiger Metabolisierung der Lactose ($t = 4 \text{ h}$) auf $0,28 \text{ h}^{-1}$ absinkt. Eine Erhöhung der Wachstumsrate durch die effektivere Verstoffwechslung der Glucose ist wahrscheinlich bedingt durch eine zu niedrige Glucose-Konzentration während des Lactose-Abbaus. Durch die sofortige Verstoffwechslung der Glucose (Messwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze und sind nicht in Diagramm 5-4 aufgetragen), verschiebt sich das Verhältnis aus PEP zu Pyruvat und führt zum Absinken des cAMP-Spiegels, wodurch sich der Abbau des Glycerins verlangsamt (Katabolitrepession) [Bettenbrock et al. 2005; Hogema et al. 1998]. Die Messung der Glycerin-Konzentration wurde zweimal jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt und ergab besonders zu Beginn stark streuende Werte. Nach Anleitung des Glycerin-Assays von Megazyme sollten die enzymatischen Reaktionen nach wenigen Minuten abgeschlossen sein, während tatsächlich mehrere Stunden benötigt wurden. Dargestellt wurde eine Kurve, die dem erwarteten Verlauf entspricht. Danach ergibt sich in den zwei Stunden, in denen die Lactose gespalten und die Glucose verstoffwechselt wird, ein Abflachen der Kurve, die nach Verbrauch der Lactose und damit auch der Glucose wieder stär-

ker absinkt. Ebenfalls deutet der 20-minütige Anstieg des $pO_2\%$ bei vier Stunden auf eine Umstellung im Stoffwechsel hin, in der erneut nach Aufhebung der Katabolitrepression die metabolen Enzyme für den Glycerin-Abbau exprimiert werden. Ein ähnlicher Wachstumsverlauf bei Übergang von Glucose zu Glycerin lässt sich bei Bettenbrock et al. [2005] finden. Im Gegensatz zur Glucose sammelt sich die Galactose im Medium an, da *E. coli* BL21 unfähig ist den Zucker zu metabolisieren (s. Diagramm 5-4 B). Bei Messung der Lactose konnte eine Anfangskonzentration von $4,3 \text{ g l}^{-1}$ ermittelt werden, die damit unter den theoretischen 5 g l^{-1} liegt, jedoch für die Durchführung und Auswertung des Versuchs unerheblich ist. Bedingt kann dies durch Pipettier- und Messfehler und die Vernachlässigung des Monohydrats der Lactose sein. Nach vier Stunden Kultivierung wird davon ausgegangen, dass die Lactose verstoffwechselt ist und die Konzentrationen somit unterhalb der Nachweisgrenze im Lactose-Assay lagen. Mit der eingesetzten Induktor-Konzentration konnte eine zweistündige Zunahme der β -Galactosidase-Aktivität und zusätzlich die Abnahme nach Verbrauch der Lactose aufgezeichnet werden, wodurch den Schülern der Zusammenhang zwischen Induktor und Expression veranschaulicht wird und auch ohne Lactose-Analytik eine Aussage über den Zeitpunkt des vollständigen Verbrauchs der Lactose getroffen werden kann. Ähnlich wie in Versuch 1 und Versuch 3 wurde eine maximale β -Galactosidase-Aktivität von ca. 130 U g^{-1} erreicht. Auf Grund der irrtümlich zu hoch eingesetzten Glycerin-Konzentration betrug die Kultivierungsdauer sechs Stunden, die für ein Praktikum zu lang ist. Abgeleitet aus den aufgezeichneten Verlauf des Glycerins und der β -Galactosidase-Aktivität sollte die Glycerin-Konzentration zu Beginn der Kultivierung 4 g l^{-1} betragen. Um auch bei der erniedrigten Glycerin-Konzentration ein Absinken der β -Galactosidase-Aktivität beobachten zu können, sollte diese im gleichen Verhältnis auf 2 g l^{-1} reduziert werden. Bei Betrachtung der $pO_2\%$ -Verläufe der beiden Reaktoren fällt gegen Ende ein Unterschied in den ansonsten synchron verlaufenden Kurven auf. So steigt der $pO_2\%$ in Reaktor B gegen Ende der Kultivierung kurz an und sinkt anschließend erneut ab, während die Kultivierung im Reaktor BPlus bereits zu einem deutlichen Anstieg im $pO_2\%$ geführt hat. Der kurze Anstieg weist auf einen erneuten Substratwechsel hin. Da der Versuchsaufbau und die Durchführung bei beiden Reaktoren bis auf die Dauer der Abnahme der Sauerstoff-Konzentration während der dynamischen Methode deckungsgleich war, könnte durch mögliche Fehler in der Messelektronik die Kultur in Reaktor B für einige Minuten einer Sauerstofflimitierung ausgesetzt gewesen sein und Gärungsprodukte wie Aceton gebildet haben, die gegen Ende der Kultivierung verstoffwechselt wurden. Da die Ursache für den unerwarteten $pO_2\%$ -Verlauf jedoch ungeklärt ist, ist die Erklärung rein hypothetisch.

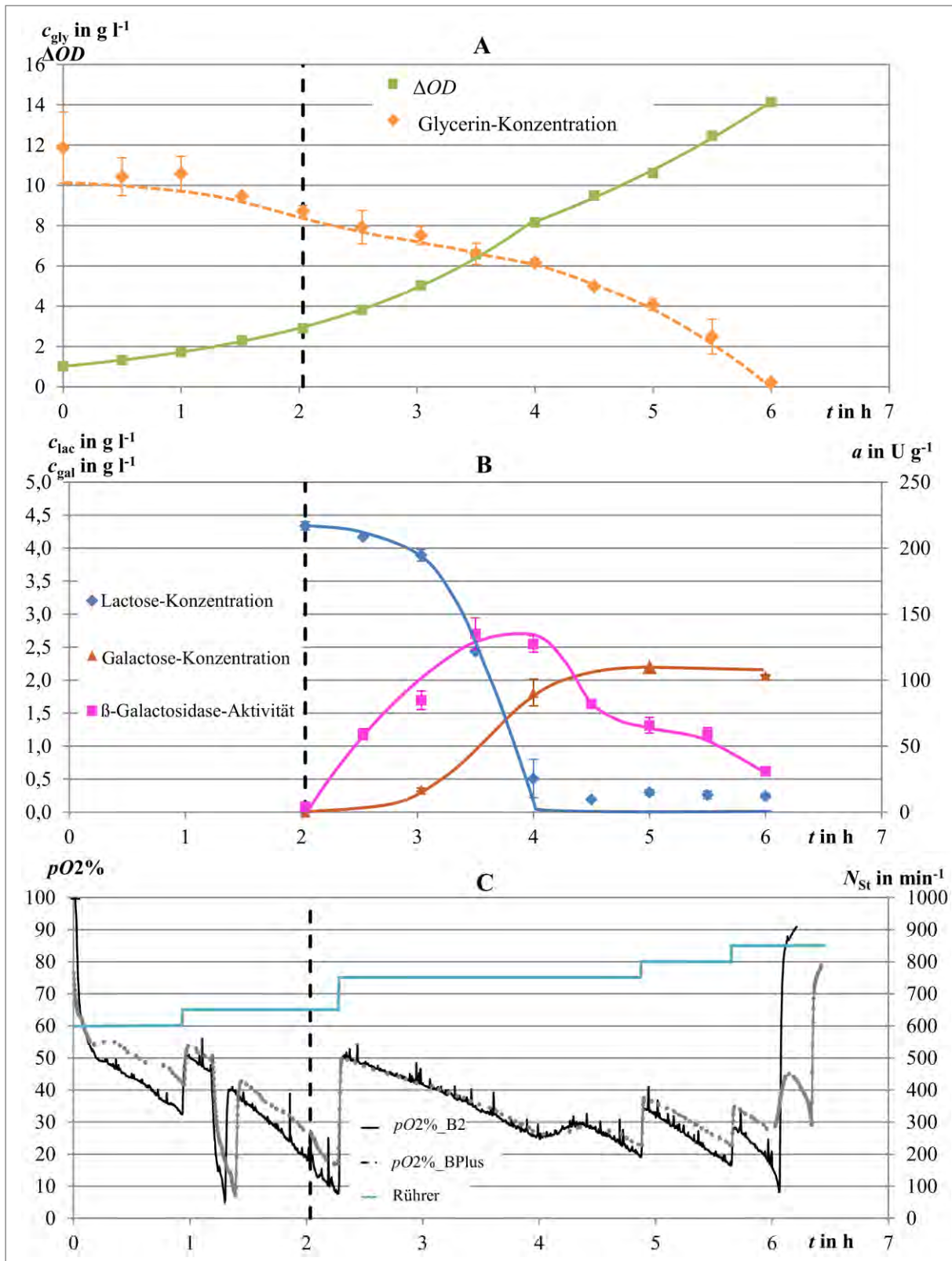


Abb. 5-4: Verläufe zur Kultivierung in den Reaktoren BPlus und B bei 37 °C. Die gemittelten Werte der Glycerin-Konzentrationen aus zwei unabhängigen Messungen sind in Diagramm A abgebildet. Die gestrichelte Linie gibt den erwarteten Verlauf wieder. Ebenfalls aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte (Diagramm A) und der Lactose- und Galactose-Konzentration sowie die β -Galactosidase-Aktivität in Diagramm B. In Diagramm C sind die Sauerstoffverläufe und die Änderung der Rührerdrehzahl abgebildet, die von dem MFCS aufgezeichnet wurden. Die schwarze, gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion.

5.2.2. Auswertung nach Praktikumsskript

Im Nachfolgenden sind die ermittelten Daten dargestellt, um die Ziele der Auswertung des Praktikums zu verdeutlichen. In 5.2.1 „Kultivierungsverlauf“ aufgeführte Verläufe wurden nicht erneut analysiert.

5.2.2.1. Bestimmung von $f_{X/OD}$

Um zu zeigen, dass eine Korrelation zwischen optischer Dichte und Biomasse besteht, wurden die Umrechnungsfaktoren $f_{X/OD}$ und $f_{X,wet/OD}$ bestimmt. Die Biomasse-Konzentrationen wurden dafür über ΔOD aufgetragen und die Steigung der Ausgleichsgerade bestimmt. Bei der Durchführung der Biomassebestimmung soll zusätzlich zur praktischen Durchführung die Erfahrung gemacht werden, dass, besonders in den niedrigen Biomassebereichen zu Beginn der Kultivierung, sorgfältiges Pipettieren notwendig ist, um Werte mit geringen Schwankungen zu erhalten.

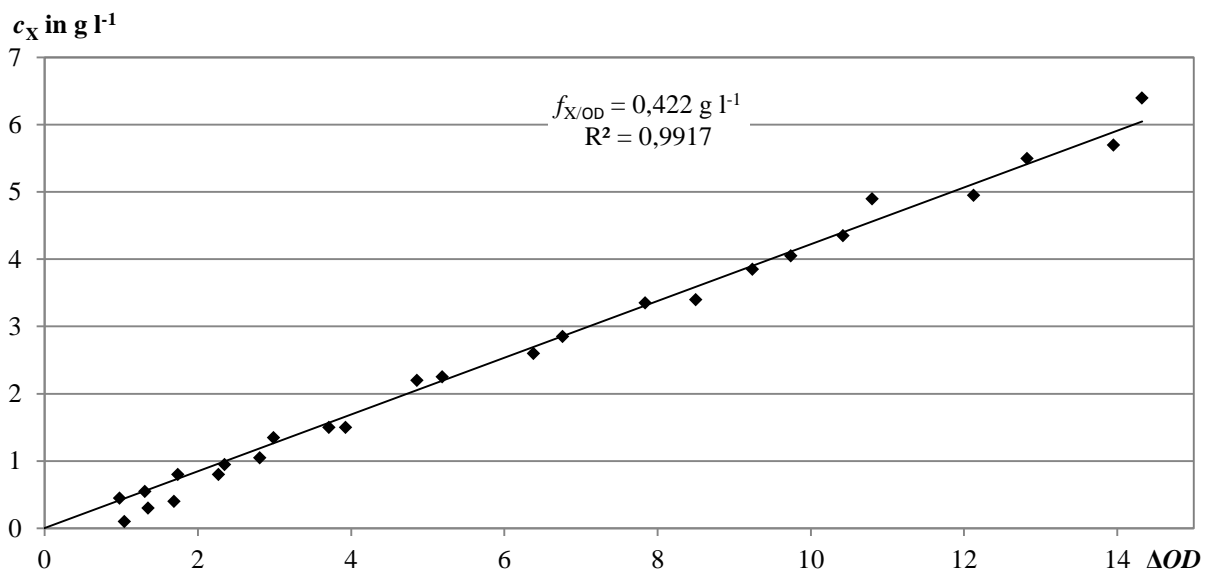


Abb. 5-5: Grafische Ermittlung des Umrechnungsfaktors von optischer Dichte auf Biotrockenmasse-Konzentration. Aufgetragen sind die Werte der Kultivierung im Reaktor BPlus und B, durch die eine lineare Ausgleichsgerade gelegt wurde.

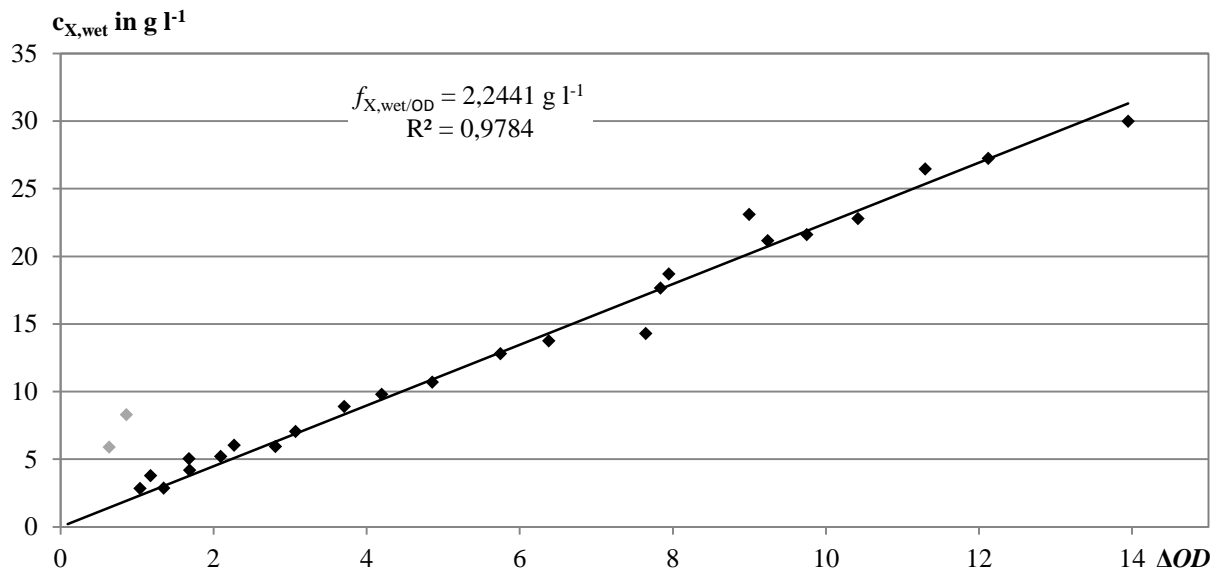


Abb. 5-6: Grafische Ermittlung des Umrechnungsfaktors der optischen Dichte auf Biofeuchtmasse-Konzentration. Dafür wurden die Werte der Kultivierungen im Reaktor BPlus und B aufgetragen und durch eine lineare Ausgleichsgerade die Steigung bestimmt. Die ausgegrauten Punkte wurden als Ausreißer bewertet.

Für die Biotrockenmasse ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von $f_{X/OD} = 0,42\ g\ l^{-1}$ (s. Abb. 5-5). Der gruppeninterne Standardwert für $f_{X/OD}$ liegt bei $0,4\ g\ l^{-1}$ und bestätigt damit den ermittelten Wert. Für die Biofeuchtmasse konnte ein Faktor von $f_{X,wet/OD} = 2,24\ g\ l^{-1}$ ermittelt werden (s. Abb. 5-6).

5.2.2.2. Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten μ

Die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate ist für die Überwachung der Kultivierung ein wichtiger Bestandteil. Am besten eignet sich die grafische Ermittlung aus dem Verlauf der optischen Dichte bzw. aus den Biotrockenmasse-Konzentrationen wie in Abb. 5-7.

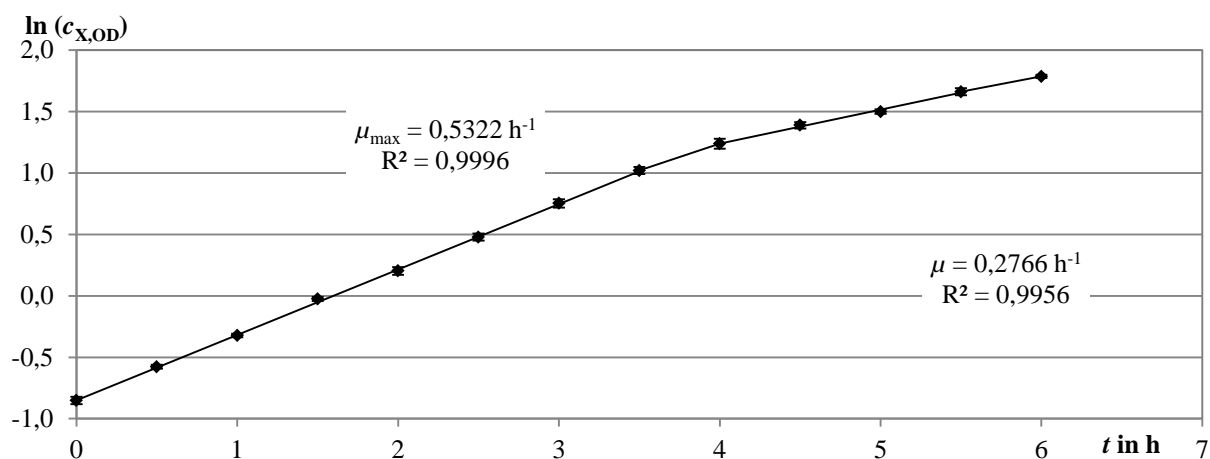


Abb. 5-7: Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate der Kultivierungen in den Reaktoren BPlus und B. Die Mittelwerte der Biotrockenmasse-Konzentrationen, berechnet aus der optischen Dichte, wurden logarithmisch dargestellt und eine lineare Ausgleichsgerade durch die Werte gelegt.

Wie schon in Abbildung 5-4 Diagramm A sind zwei Wachstumsphasen mit $\mu_{max} = 0,53\ h^{-1}$ und $\mu = 0,28\ h^{-1}$ zu erkennen. Die spezifische Wachstumsrate ist kleiner als die in vorherigen

Versuchen bestimmte Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$ (s. Abb.8-1). Der Unterschied ist wahrscheinlich durch das Wachstum in der Schüttelkultur bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bedingt.

5.2.2.3. Verlauf der Sauerstoffaufnahme *OUR*

In Abb. 5-8 wurden die Sauerstoffaufnahme und die Anteile des Sauerstoffs in der Abluft für die Kultivierung im Reaktor BPlus dargestellt. Die Berechnungen erfolgten mit den Gleichung 5-2 bis 5-4. Für die Berechnung von $x_{\text{O}_2,\text{out}}$ wurde eine Respirations-Quotient von 1 angenommen.

$$OUR = \frac{1}{y_{\text{X/O}_2}} \cdot \mu(t) \cdot c_{\text{X}}(t) \quad (5-2)$$

$$OUR = \frac{F_{\text{G,in,STP}} \cdot M_{\text{O}_2}}{V_{\text{L}} \cdot V_{\text{m}}} \cdot (x_{\text{O}_2,\text{air}} - x_{\text{O}_2,\text{out}}(t)) \quad (5-3)$$

Gleichung 5-2 in 5-3 eingesetzt und nach $x_{\text{O}_2,\text{out}}(t)$ umgeformt, ergibt

$$x_{\text{O}_2,\text{out}}(t) = -\frac{OUR \cdot V_{\text{L}} \cdot V_{\text{m}}}{F_{\text{G,in,STP}} \cdot M_{\text{O}_2}} + x_{\text{O}_2,\text{air}} \quad (5-4)$$

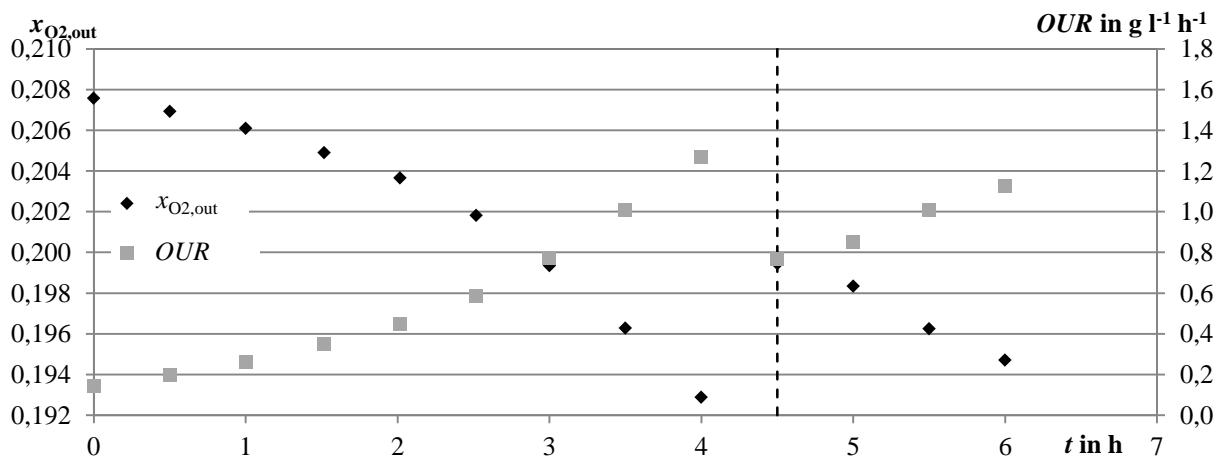


Abb. 5-8: Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme zum Anteil an Sauerstoff in der Abluft. Verwendet wurden die Daten aus der Kultivierung in Reaktor BPlus.

Durch die grafische Auftragung von *OUR* und $x_{\text{O}_2,\text{out}}$ lässt sich die Korrelation der beiden Variablen untereinander verdeutlichen. Die Erhöhung der Sauerstoffaufnahme führt zu einer Erniedrigung des Sauerstoffanteils in der Abluft. Ebenfalls wird der Zusammenhang zwischen der Sauerstoffaufnahme und der spezifischen Wachstumsrate visualisiert. Durch das Absinken der spezifischen Wachstumsrate verringert sich ebenfalls *OUR*, welches z. B. zur Erzeugung von hohen Zelldichten (Hochzelldichtekultivierung) genutzt wird.

5.2.2.4. Bestimmung von *OUR* durch die dynamische Methode

Nachfolgend wurde durch die dynamische Methode die Sauerstoffaufnahme rate bestimmt. Aus dem *pO2*%-Werten nach Ausschalten der Begasung wurde mit Gleichung 5-9 die gelöste Sauerstoffkonzentration im Medium berechnet und die Steigung des linearen Abfalls ermittelt. Gleichung 5-5 wurde umgestellt zu 5-6

$$pO2\% (t) = \frac{p_{O_2}(t)}{p_{O_2,cal}} \cdot 100\% \quad (5-5)$$

$$p_{O_2}(t) = \frac{p_{O_2,cal} \cdot pO2\% (t)}{100\%} \quad (5-6)$$

und zusammen mit Gleichung 5-7 in Gleichung 5-8 eingesetzt

$$p_{O_2,cal} = (p - p_{H_2O}) \cdot x_{O_2,air} \quad (5-7)$$

$$c_{O_2}(t) = \frac{p(t)}{H_{O_2}} \quad (5-8)$$

$$c_{O_2}(t) = \frac{pO2\% (t) \cdot (p - p_{H_2O}) \cdot x_{O_2,air}}{H_{O_2} \cdot 100\%} \quad (5-9)$$

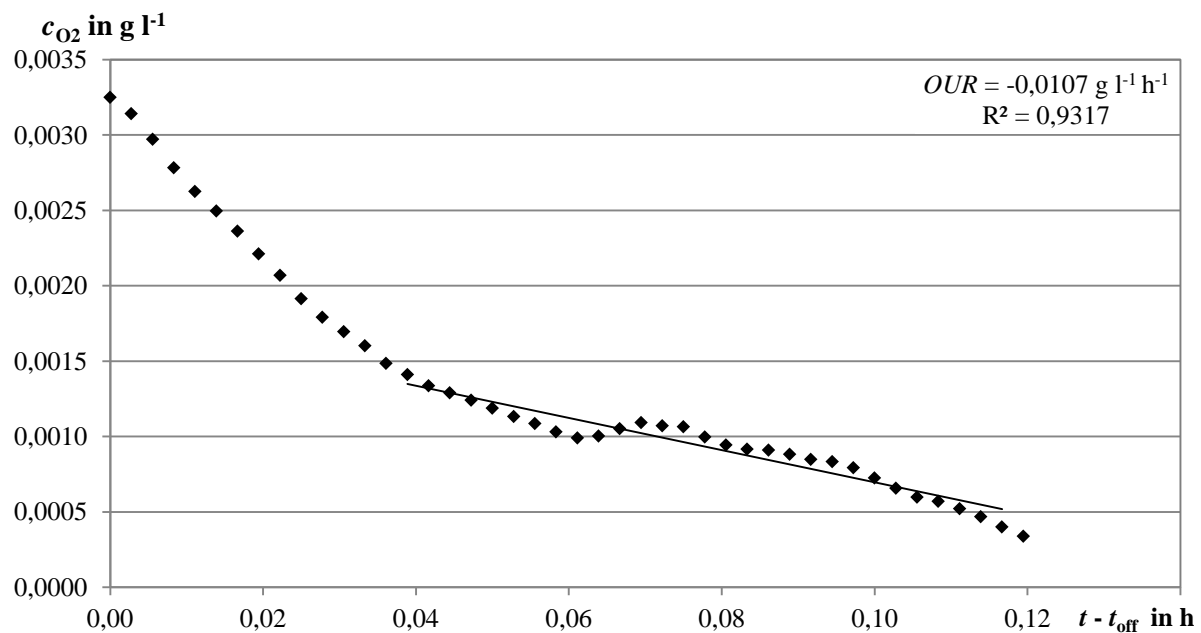


Abb. 5-9: Grafische Ermittlung des *OUR* für die Kultivierung im Bioreaktor BPlus durch die dynamische Methode.

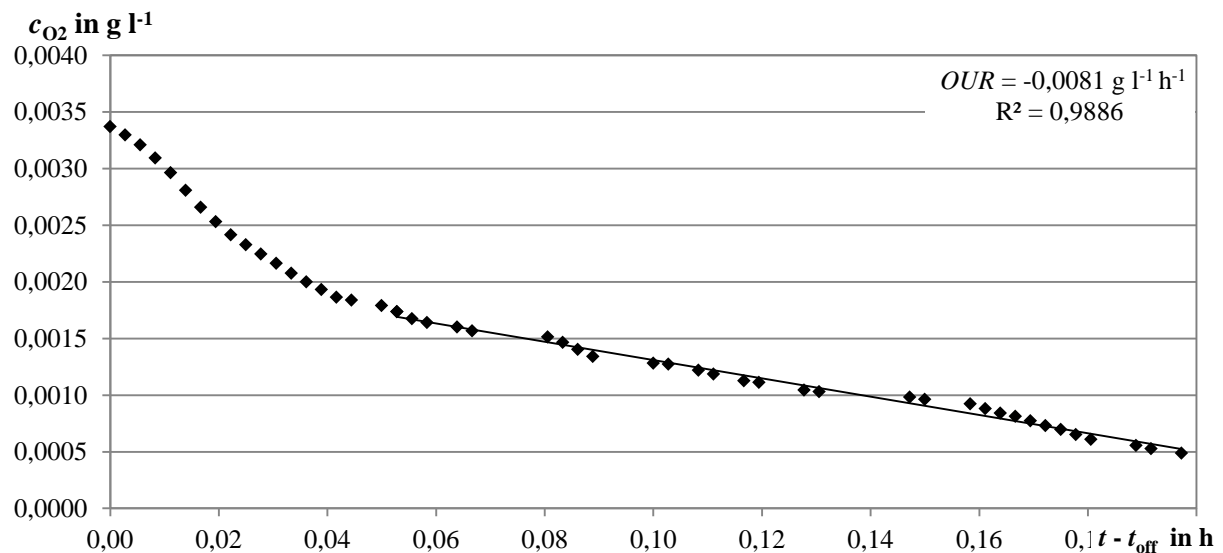


Abb. 5-10: Grafische Ermittlung des *OUR* für die Kultivierung im Bioreaktor B durch die dynamische Methode.

Der Abfall der Sauerstoff-Konzentration im Medium erfolgte im Reaktor BPlus innerhalb von sieben Minuten (s. Abb. 5-9) und im Bioreaktor B innerhalb 12 Minuten (s. Abb. 5-10). Dies ist im Vergleich zu anderen Bestimmungen bei ähnlichen Zellkonzentrationen doppelt bzw. dreifach so lang. Zudem flacht die Kurve beider Reaktoren nach ca. zwei Minuten ab, was ebenfalls der Erwartung eines durchgehend linearen Abfalls widerspricht. Mögliche Ursachen für einen derartigen Verlauf sind nicht bekannt. Die Bestimmung sollte wiederholt werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die hier aufgenommenen Verläufe für den Versuchsaufbau Regel- oder Einzelfälle sind. Die berechneten Werte liegen im Reaktor BPlus bei $OUR(1\text{ h}) = 0,037\text{ g l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ und im Reaktor B bei $0,036\text{ g l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ und sind damit signifikant höher als die bestimmten Werte.

5.2.2.5. Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La}

Die Bestimmung des k_{La} -Wertes erfolgte durch die dynamische Methode nach circa 1 h Kultivierung sowie durch die Berechnung über Gleichung 5-12. Die Werte wurden anschließend miteinander verglichen. Die Abbildung für die k_{La} -Bestimmung im B (Abb. 8-6) ist im Anhang dargestellt.

$$c_{\text{O}_2, \text{max}} = \frac{P}{H_{\text{O}_2}} \quad (5-10)$$

$$OTR(t) = k_{La} \cdot (c_{\text{O}_2, \text{max}} \cdot x_{\text{O}_2, \text{out}}(t) - c_{\text{O}_2}(t)) \quad (5-11)$$

Aus einsetzen von 5-10 in 5-11 und umstellen nach k_{La} ergibt sich 5-12

$$k_L a = \frac{OTR(t)}{\left(\frac{p}{H_{O_2}} \cdot x_{O_2, out}(t) - c_{O_2}(t) \right)} \quad (5-12)$$

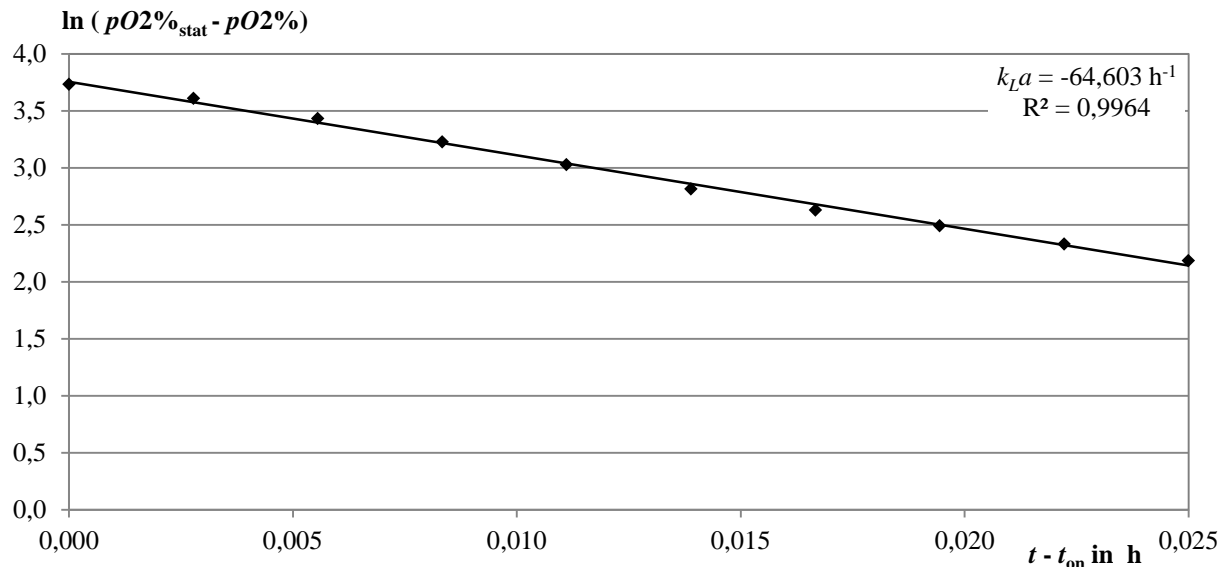


Abb. 5-11: Bestimmung des $k_L a$ mit der dynamischen Methode aus der Kultivierung im Reaktor BPlus. Aufgetragen sind die Werte nach Einschalten der Zuluft.

Im Reaktor BPlus konnten $k_L a$ -Werte von $64,6 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 5-11) und in Reaktor B $59,8 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 8-6) durch die dynamische Methode und durch die Berechnung Werte von $108,5 \text{ h}^{-1}$ und $115,2 \text{ h}^{-1}$ ermittelt werden. Grundsätzlich werden zur Vereinfachung für die Berechnung einige Werte angenommen und abgeschätzt, wie z. B. der Respirations-Quotient, die Henry-Konstante, die vereinfacht für Wasser anstatt des tatsächlichen Mediums berechnet wurde, und der Sauerstoffausbeutekoeffizient. Zudem findet in den Reaktoren keine Druckmessung statt, wodurch die abgeschätzten Drücke ebenfalls Fehlerfaktoren in der Berechnung darstellen. Die Ermittlung über die dynamische Methode wird dagegen über die Messqualität der pO₂-Elektrode sowie durch die Annahme eines stationären Zustands in der Sauerstoffkonzentration zu Beginn der Messung beeinflusst. Die Ermittlung durch die dynamische Methode besitzt folglich weniger Fehlereinflüsse und sollte normalerweise bei reaktionsschneller pO₂-Elektrode als die genauere Variante zur $k_L a$ -Ermittlung betrachtet werden. Da die Bestimmung des *OUR* durch die dynamische Methode einen unerwarteten Verlauf ergeben hat, sollte in diesem Fall mehr Gewichtung auf den berechneten $k_L a$ -Wert gelegt und in weiteren Versuchen eine erneute Bestimmung durchgeführt werden. Bis dahin sollten die Werte maximal als Richtwerte betrachtet werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde eine Praktikumsanleitung für eine Batchkultivierung mit *E. coli* BL21 und Induktion zur β -Galactosidase-Expression erstellt. Das Zielprotein β -Galactosidase eignet sich auf Grund der schnellen, reproduzierbaren und günstigen Nachweismethode durch ONPG und der Möglichkeit einer Induktion ohne vorherige genetische Veränderung besonders für ein Praktikum. Auf den Einsatz des oft gebräuchlichen IPTGs als Induktor wurde aus Kostengründen verzichtet und stattdessen verschiedene Induktionsbedingungen durch Lactose untersucht. Zu Beginn wurde getestet, ob die eingesetzte Lactose-Konzentration die β -Galactosidase-Expression beeinflusst und ob so eine Induktorkonzentration für maximale Ausbeuten ermittelt werden kann. Im Bereich der Lactose-Konzentrationen von $0,34 \text{ g l}^{-1}$ bis 10 g l^{-1} ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der β -Galactosidase-Aktivität. Als weiterer Schritt wurde untersucht, ob sich eine erhöhte Expressionsrate durch Wachstum auf Lactose anstatt auf einem Lactose-Glycerin-Gemisch ergibt. Da bei Wachstum auf Lactose nicht auf eine Induktion verzichtet werden sollte, musste die Lactose bei Übergang in die stationäre Phase zugegeben werden, so dass das Glycerin bereits verstoffwechselt war. Auf Grund der Veränderung des Energielevels in der Zelle konnte dadurch eine β -Galactosidase-Expression erst nach einer Lag-Phase von 1,5 Stunden mit 60 % der Aktivität im Vergleich zur Induktion in der exponentiellen Phase erzeugt werden. Für das Praktikum ist eine Induktion in der stationären Phase daher nicht sinnvoll. Auffällig erschien, dass die erreichten Aktivitäten im Vergleich zu Literaturwerten um ca. 67 % niedriger waren. Als Aufschlussmethode wurde der chemische Aufschluss durch Toluol wie bei Miller beschrieben gewählt [Miller 1972]. Für die Bestimmung der Aktivitäten mittels Extinktionskoeffizienten wurde die geeignetere Methode nach Invitrogen angewendet. Anders als bei Miller werden die Zelltrümmer vor der Durchführung des Assays entfernt. Toluol perforiert die innere Zellmembran und lässt die äußere in Takt, wodurch in der Theorie die β -Galactosidase nicht aus der Zelle freigesetzt wird, sondern dem Substrat die Diffusion in die Zelle ermöglicht. Eine Zentrifugation sollte demnach zum Abtrennen der β -Galactosidase führen [Jackson & DeMoss 1965]. Dennoch konnten sinnvolle und reproduzierbare Kurvenverläufe durch die Aufschlussmethode generiert werden. Zudem erbrachte der Vergleich des Aufschlusses bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Aktivitätssteigerung von ca. 50 %, wodurch sich Theorie und Praxis zumindest teilweise widersprechen. In weiteren Experimenten sollte um eine Aktivitätssteigerung zu erreichen und zudem das gesundheitsschädliche Toluol zu ersetzen ein Aufschlusspuffer, der zu höheren Aufschlussgraden führt, etabliert werden. Da durch die

angewendete Methode mit Toluol sinnvolle Kurvenverläufe erzeugt werden, wurde die Methode mit der Möglichkeit einer zukünftigen Optimierung in die Versuchsanleitung übernommen. Ebenfalls wurde untersucht, ob sich der Einsatz von β -Mercaptoethanol im β -Galactosidase-Assay positiv oder negativ auswirkt. Bestätigt werden konnte, dass unter reduzierenden Bedingungen eine Aktivitätssteigerung von $(28 \pm 6) \%$ auftritt (s. 8.1.5 „Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die β -Galactosidase-Ausbeute). Aus Gründen der Toxizität und des Geruchs sollte zukünftig die Verwendung von DTT angestrebt werden und zur Konzentrationsbestimmung entsprechende Versuche durchgeführt werden.

Die Kultivierungen in den Bioreaktoren führten zu den erwarteten Verläufen, jedoch mit einer niedrigeren spezifischen Wachstumsrate von $0,53 \text{ h}^{-1}$ anstatt $0,6 \text{ h}^{-1}$ und einer für das Praktikum zu langen Kultivierungsdauer, die auf Grund der irrtümlich zu hoch eingesetzten Glycerin-Konzentration erzeugt wurde. Die Glycerin-Konzentration konnte durch die ermittelten Werte auf 4 g l^{-1} angepasst werden. Zudem konnte durch die eingesetzte Lactose-Konzentration von 5 g l^{-1} eine Zu- und Abnahme der β -Galactosidase erreicht werden, wodurch der Einfluss der Lactose als Induktor verdeutlicht wird. Für weitere Kultivierungen wird die Lactose im gleichen Verhältnis wie das Glycerin auf 2 g l^{-1} herabgesetzt. Grundsätzlich können in der Durchführung die Grundtechniken für Kultivierungen, wie Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate und der Biomasse, praktiziert werden. Zur Vorbereitung und Auswertung wird ein gewisser theoretischer Hintergrund vorausgesetzt. Der praktische Teil ist jedoch durch eine relativ detaillierte Beschreibung auch mit wenig Laborerfahrung durchführbar.

7. Literaturverzeichnis

- Andrew, K.J., Lin, E.C.C., 1976. Thiogalactoside transacetylase of the lactose operon as an enzyme for detoxification. *Journal of Bacteriology* 128, 510–513.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., Gilles, E.D., 2006. A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2578-2584.
- Casali, N., 2003. *Escherichia coli* host strains. *Methods in Molecular Biology* 235, 27-48.
- Chan, V., Dreolini, L.F., Flintoff, K.A., Lloyd, S.J., Mattenley, A.A., 2002. The effects of glycerol, glucose, galactose, lactose and glucose with galactose on the induction of β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 2, 130–137.
- Chapman, A.G., Fall, L., Atkinson, D.E., 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *Journal of Bacteriology* 108, 1072–1086.
- Cozzarelli, N.R., Freedberg, W.B., Lin, E.C.C., 1968. Genetic control of the L-alpha-glycerophosphate system in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 31, 371-387.
- Daegelen, P., Studier, F.W., Lenski, R.E., Cure, S., Kim, J.F., 2009. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B Strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of Molecular Biology* 394, 634–643.
- De Smet, M.J., Kingman, J. Witholt, B., 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 506, 64–80.
- Deutscher, M.P., 1974. Preparation of cells permeable to macromolecules by treatment with toluene: studies of transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase. *Journal of Bacteriology* 118, 633–639.
- Deutscher, J., Francke, C., Postma, P.W., 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Biology Reviews* 70, 939–1031.
- Biotechnologie.de, 2014. Die deutsche Biotechnologie–Branche 2014, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/studien-statistiken,did=172508.html?listBliId=74636&> (21. Januar 2015)
- Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.K., 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology* 177, 1497–1504.
- Eron, L., Block, R., 1971. Mechanism of initiation of repression of in vitro transcription of the *lac* operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68, 1828–1832.

- Fowler, A.V., Zabin, I., 1970. The amino acid sequence of β -Galactosidase I. Isolation and composition of tryptic peptides. *Journal of Biological Chemistry* 245, 5032–5041.
- Gebler, J., Aebersold, R., Withers, S., 1992. Glu-537, not Glu-461, is the nucleophile in the active site of (*lacZ*) beta-galactosidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 11126–11130.
- Giacomini, A., Corich, V., Ollero, F.J., Squartini, A., Nuti, M.P., 1992. Experimental conditions may affect reproducibility of the β -galactosidase assay. *FEMS Microbiology Letters* 100, 87-90.
- Gombert, A., Kilikian, B., 1998. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology* 60, 47–54.
- Heller, K.B., Lin, E., Wilson, T.H., 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 144, 274–278.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., Postma, P.W., 1998. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Molecular Microbiology* 30, 487–498.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Inada, T., Aiba, H., Van Dam, K., Postma, P.W., 1997. Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 24, 857–867.
- Inada, T., Kimata, K., Aiba, H., 1996. Mechanism responsible for glucose–lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to Cells* 1, 293–301
- Invitrogen life technologies, 2015. β -gal assay Kit. Katalog-Nr. K1455-01, Version F, 082301, 28-0102, https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bgalassay_man.pdf, (18. Januar 2015)
- Jackson, R.W., DeMoss, J., 1965. Effects of toluene on *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 90, 1420–1425.
- Jobe, A., Bourgeois, S., 1972. *Lac* repressor-operator interaction: VI. The natural inducer of the *lac* operon. *Journal of Molecular Biology* 69, 397–408.
- Juers, D.H., Jacobson, R.H., Wigley, D., Zhang, X.-J., Huber, R.E., Tronrud, D.E., Matthews, B.W., 2000. High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α -complementation. *Protein Science* 9, 1685–1699.
- Juers, D.H., Matthews, B.W., Huber, R.E., 2012. *LacZ* β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* 12, 1792-1802.
- Kreuzmann, J., 2003. Establishing a process system to cultivate *Escherichia coli* K12 TG 1 pUC18 for the expression of β -D-Galactosidase. Master Thesis, Hamburg University of Applied Sciences

- Law, J., Lee, S., Tseng, A., Tsui, K.W., Yu, N., 2002. The role of glycerol and isopropyl thiogalactoside in *Escherichia coli* growth and lactose induction of β -galactosidase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 2, 97-102.
- Lin, E., 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 30, 535–578.
- Miller, J.H., 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Müller-Hill, B., 1976. *Lac* repressor and *lac* operator. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 30, 227–252.
- Nelson, D., Cox, M., 2001. *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Auflage 3, 1174-1176, 1183-118
- Nelson, S.O., Wright, J.K., Postma, P.W., 1983. The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III^{Glc} of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 2, 715-720.
- Neubauer, P., Wolff, C., Hecker, M., Hofmann, K., Meyer, L., Kruschke, P., Heinrich, H., 1991. Introduction of the *tac*-promoter by lactose under fermentation conditions. *Acta Biotechnologica* 11, 23–29.
- Park, Y.-H., Lee, B.R., Seok, Y.-J., Peterkofsky, A., 2006. In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 6448–6454.
- Postma, P., Lengeler, J., Jacobson, G., 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews* 57, 543.
- Roderick, S.L., 2005. The *lac* operon galactoside acetyltransferase. *Comptes Rendus Biologies* 328, 568–575.
- Sanno, Y., Wilson, T., Lin, E., 1968. Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 32, 344–349.
- Seras-Franzoso, J., Affentranger, R., Ferrer-Navarro, M., Daura, X., Villaverde, A., García-Fruitós, E., 2012. Disulfide bond formation and activation of *Escherichia coli* β -galactosidase under oxidizing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2376-2385.
- Shiloach, J., Fass, R., 2005. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 5, 345-357.
- Viitanen, M.I., Vasala, A., Neubauer, P., Alatossava, T., 2003. Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2:2.
- Weissenborn, D.L., Wittekindt, N., Larson, T.J., 1992. Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6122–6131.

- Zhang, X., Bremer, H., 1995. Control of the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter strength by ppGpp. *Journal of Biological Chemistry* 270, 11181–11189.
- Zwaig, N., Kistler, W., Lin, E., 1970. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 102, 753–759.

8. Anhang

8.1. Ergebnisse zusätzlich durchgeführter Untersuchungen

8.1.1. Kultivierung zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate bei 37 °C

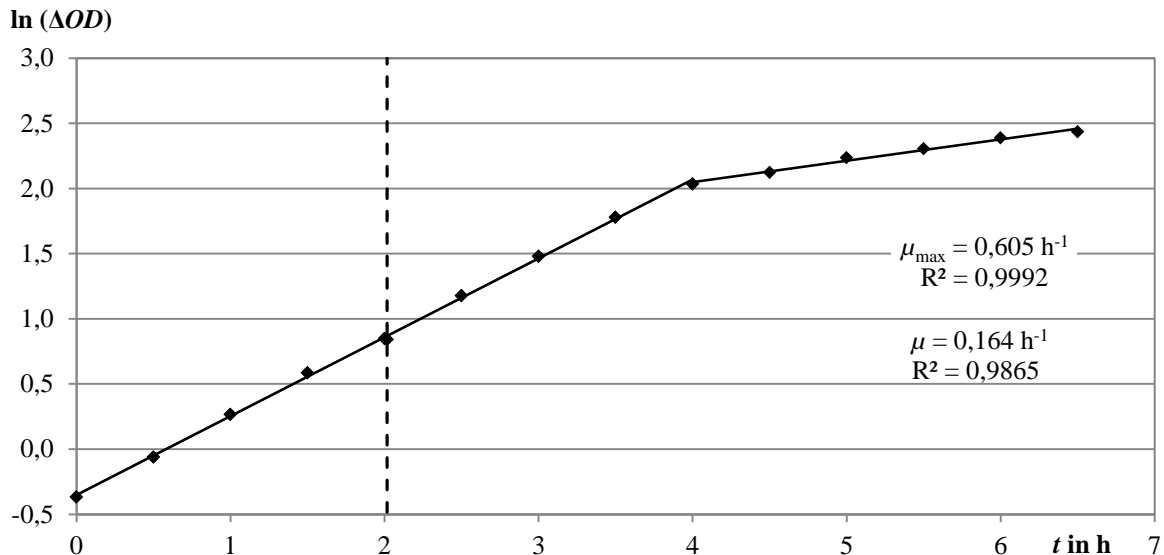


Abb. 8-1: Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate bei 37 °C von *E. coli* BL21 in den Bioreaktoren BPlus und B mit $c_{\text{gly}} = 9 \text{ g l}^{-1}$ und $c_{\text{lac}} = 5 \text{ g l}^{-1}$ zur Induktion. Angeimpft wurde mit einer Schüttelkultur, die über Nacht bei 37 °C auf $\Delta OD = 9$ gewachsen ist. Prozesseinstellungen s. Tab. 4-4.

8.1.2. Untersuchungen zum Aufschluss mit Toluol

Die Untersuchung des Aufschlusses erfolgte unter verschiedenen Bedingungen (Puffer und Temperatur) mit mehreren Proben, die zur gleichen Zeit genommen wurden. So wurde anstelle von Phosphatpuffer ohne β -Mercaptoethanol, Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol verwendet und der Aufschluss sowohl auf Eis als auch bei 37 °C durchgeführt. Die Aktivität der β -Galactosidase wurde anschließend nach der Methode „Invitrogen“ vermessen und in Abb. 8-2 dargestellt.

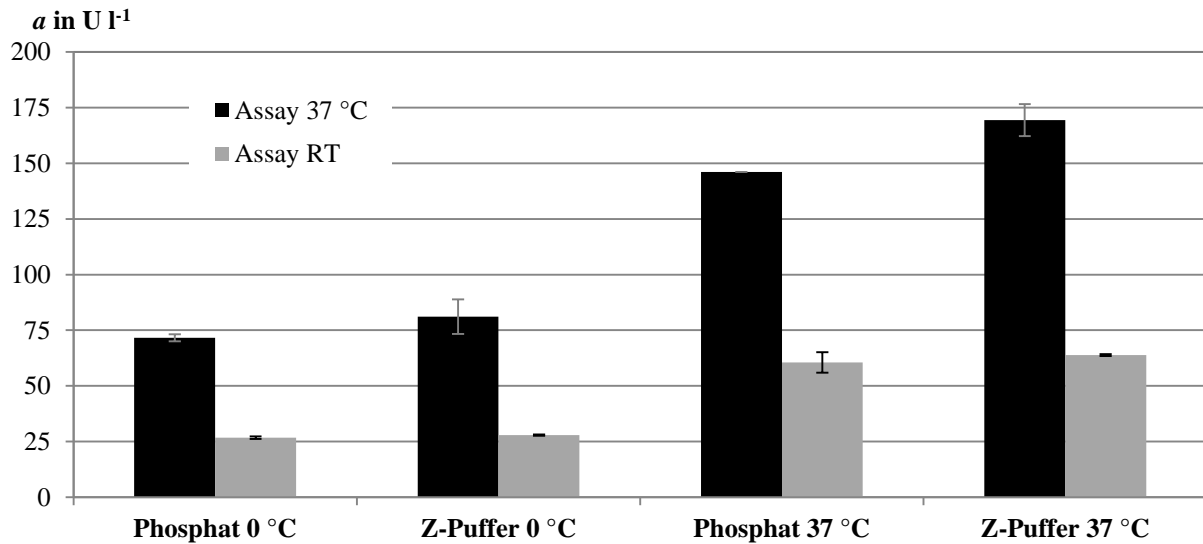


Abb. 8-2: Vergleich der Aufschlussmethode durch Toluol durchgeführt mit Phosphat- und Z-Puffer bei 0 °C und bei 37 °C. Die Zellproben wurden nach Induktion mit Lactose zu identischen Zeitpunkten genommen. Das β -Galactosidase-Assay wurde zusätzlich bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei Verwendung des Z-Puffers in einem Aufschluss bei 37 °C ist eine 15 %ige Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität zu erkennen, die jedoch mit Vorsicht betrachtet werden muss, da der Wert des Phosphatpuffers bei 37 °C nicht doppelbestimmt wurde. Um einem Aktivitätsverlust bei Lagerung entgegenzuwirken und vergleichbare Messungen zu einem späteren Zeitpunkt zu ermöglichen, sollte in dem Aufschlusspuffer β -Mercaptoethanol enthalten sein. Der Temperaturunterschied zwischen 0 °C und 37 °C liegt bei ca. 50 %. Der Aufschluss ist bei 37 °C damit deutlich effektiver.

8.1.3. Temperatureinfluss auf das β -Galactosidase-Assay

Wird das Assay bei Raumtemperatur anstatt bei 37 °C durchgeführt, sind die Werte um $(64 \pm 4) \%$ auf Grund der gesenkten Umsatzgeschwindigkeit der β -Galactosidase erniedrigt (s. Abb. 8-2).

8.1.4. Aktivitätsverhältnisse verschiedener Aufschluss- und Assay-Bedingungen

Tab. 8-1: Bestimmung des Temperatur- sowie Puffereinflusses auf den Aufschluss durch Toluol. Dafür wurden vier induzierte Proben zu gleichen Zeitpunkten genommen und diese unter unterschiedlichen Bedingungen aufgeschlossen. Das Assay zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität wurde sowohl bei 37 °C als auch bei 22 °C durchgeführt. Der Einfluss der Puffer wurde als Faktor aus den Aktivitäten jeweils gleicher Aufschluss- und Assay-Temperaturen bestimmt. Der Faktor für den Einfluss der Temperatur wurde aus den Aktivitäten gleicher Assay-Temperaturen und gleicher Puffer bestimmt. Für die Aktivität wurden Mittelwerte aus der Doppelbestimmung gebildet. Der ausgegraute Wert wurde einmal bestimmt. Fett dargestellte Werte sind Mittelwerte entsprechender Spalte.

| ϑ_{assay} | Probe | a in U l ⁻¹ | s_a in U l ⁻¹ | f_{buffer} | $f_{\beta,\text{lysis}}$ | $f_{\beta,\text{assay}}$ |
|----------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 37 °C | Phosphat 0 °C | 71,60 | 1,58 | 1,13 | 2,04 | 2,68 |
| | Z-Puffer 0 °C | 81,14 | 7,75 | 1,16 | 2,09 | 2,91 |
| | Phosphat 37 °C | 146,07 | - | 1,04 | 2,27 | 2,41 |
| | Z-Puffer 37 °C | 169,43 | 7,16 | 1,05 | 2,29 | 2,65 |
| 22 °C | Phosphat 0 °C | 26,72 | 0,54 | 1,10 | 2,17 | 2,66 |
| | Z-Puffer 0 °C | 27,85 | 0,30 | | | |
| | Phosphat 37 °C | 60,54 | 4,64 | | | |
| | Z-Puffer 37 °C | 63,85 | 0,44 | | | |

8.1.5. Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die β -Galactosidase-Ausbeute

In der Literatur wird die Aussage getroffen, dass eine durch eine Punktmutation veränderte β -Galactosidase unter oxidierenden Bedingungen eine höhere Aktivität als unter reduzierender Umgebung durch DTT aufweist [Seras-Franzoso et al. 2012]. Bei Miller [1972] wiederum wird in dem β -Galactosidase-Assay β -Mercaptoethanol eingesetzt und bei Juers et al. [2000] wird entweder β -Mercaptoethanol oder DTT bei Arbeiten mit β -Galactosidase verwendet. Die Aktivität wurde daher zum Vergleich mit und ohne β -Mercaptoethanol im Z-Puffer bestimmt, indem eine induzierte Probe aufgeschlossen und jeweils sechsmal mit der Methode nach „In-vitrogen“ vermessen wurde.

Bei Verwendung des β -Mercaptoethanols im Assay konnte eine Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität von durchschnittlich (28 ± 6) % erreicht werden. In dem Praktikum sollten folglich reduktive Bedingungen durch Thiole vorliegen, die sowohl durch β -Mercaptoethanol als auch durch DTT [Seras-Franzoso et al. 2012] erzeugt werden können. Aus Toxizitäts- und Geruchsgründen bietet sich die Verwendung von DTT bei Praktikanten mit wenig Laborerfahrung an. Die optimale DTT-Konzentration sollte in weiteren Versuchen ermittelt werden.

8.2. Ergebnistabellen und Darstellungen

8.2.1 Versuch 1

Tab. 8-2: Einfluss von β -Mercaptoethanol (BME) auf das β -Galactosidase-Assay. Dazu wurde eine aufgeschlossene Probe sechsmal jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Aus den Mittelwerten der Extinktion wurde die spezifische Aktivität berechnet und ein Quotient aus der Aktivität mit und ohne BME (\emptyset BME) gebildet.

| Bestimmung | BME | | | | \emptyset BME | | | | f_{BME} | MW f_{BME} | $s_{f_{\text{BME}}}$ |
|------------|------------------------|------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|------------|--------------------------|----------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| | V_s in μl | ΔE | a in U l^{-1} | s_a in U l^{-1} | V_s in μl | ΔE | a in U l^{-1} | s_a in U l^{-1} | | | |
| 1 | 10 | 0,14 | 80,30 | 6,83 | 10 | 0,09 | 54,81 | 3,98 | 1,46 | 1,40 | 0,11 |
| 2 | 30 | 0,38 | 75,95 | | 30 | 0,28 | 54,72 | | 1,39 | | |
| 3 | 10 | 0,14 | 81,48 | | 10 | 0,11 | 65,19 | | 1,25 | | |
| 4 | 30 | 0,38 | 74,07 | | 30 | 0,27 | 53,33 | | 1,39 | | |
| 5 | 10 | 0,16 | 94,81 | | 10 | 0,10 | 59,26 | | 1,60 | | |
| 6 | 30 | 0,39 | 77,04 | | 30 | 0,30 | 58,27 | | 1,32 | | |

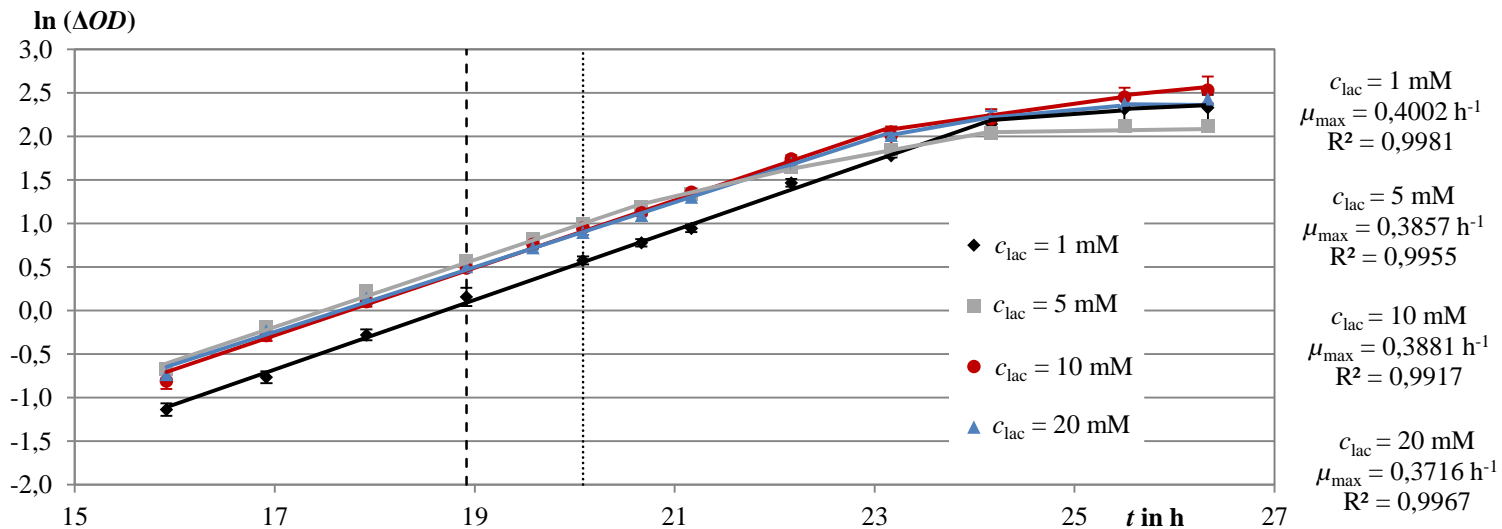


Abb. 8-3: Wachstumsverlauf von Versuch 1. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen. Zudem wurden die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt der Kolben mit 5 mM, 10 mM und 20 mM Lactose-Konzentration und die gepunktete Linie den für die Kolben mit 1 mM.

Tab. 8-3: Daten zur optischen Dichte aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte aus den Kolben gleicher Induktor-Konzentration mit der entsprechender Standardabweichung. Grau markierte Zellen kennzeichnen den Zeitpunkt der Induktion.

| t in h | $c_{\text{lac}} = 1 \text{ mM}$ | | | | $c_{\text{lac}} = 5 \text{ mM}$ | | | | $c_{\text{lac}} = 10 \text{ mM}$ | | | | $c_{\text{lac}} = 20 \text{ mM}$ | | | |
|----------|---------------------------------|----------|------------------|---------------|---------------------------------|----------|------------------|---------------|----------------------------------|----------|------------------|---------------|----------------------------------|----------|------------------|---------------|
| | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ |
| 0,0 | 0,00 | 0,00 | -6,91 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -6,91 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -6,91 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -6,91 | 0,00 |
| 15,9 | 0,32 | 0,02 | -1,14 | 0,07 | 0,51 | 0,01 | -0,67 | 0,02 | 0,45 | 0,04 | -0,81 | 0,09 | 0,48 | 0,02 | -0,73 | 0,04 |
| 16,9 | 0,47 | 0,03 | -0,77 | 0,07 | 0,83 | 0,01 | -0,19 | 0,01 | 0,75 | 0,05 | -0,29 | 0,06 | 0,79 | 0,02 | -0,23 | 0,03 |
| 17,9 | 0,76 | 0,05 | -0,28 | 0,06 | 1,25 | 0,01 | 0,22 | 0,01 | 1,11 | 0,06 | 0,10 | 0,06 | 1,15 | 0,04 | 0,14 | 0,03 |
| 18,9 | 1,18 | 0,12 | 0,16 | 0,10 | 1,76 | 0,03 | 0,56 | 0,02 | 1,63 | 0,06 | 0,49 | 0,04 | 1,66 | 0,06 | 0,51 | 0,04 |
| 19,6 | - | - | - | - | 2,20 | 0,01 | 0,83 | 0,01 | 2,00 | 0,11 | 0,76 | 0,04 | 1,98 | 0,05 | 0,72 | 0,02 |
| 20,1 | 1,78 | 0,08 | 0,58 | 0,04 | 2,53 | 0,03 | 0,99 | 0,00 | 2,31 | 0,14 | 0,95 | 0,04 | 2,28 | 0,08 | 0,90 | 0,03 |
| 20,7 | 2,08 | 0,10 | 0,78 | 0,04 | 2,98 | 0,03 | 1,19 | 0,03 | 2,63 | 0,10 | 1,12 | 0,01 | 2,66 | 0,05 | 1,10 | 0,01 |
| 21,2 | 2,37 | 0,14 | 0,95 | 0,04 | 3,39 | 0,10 | 1,34 | 0,02 | 3,13 | 0,13 | 1,36 | 0,02 | 3,15 | 0,11 | 1,30 | 0,02 |
| 22,2 | 3,53 | 0,04 | 1,47 | 0,04 | 4,42 | 0,10 | 1,65 | 0,00 | 4,19 | 0,20 | 1,74 | 0,04 | 4,31 | 0,11 | 1,69 | 0,01 |
| 23,2 | 4,49 | 0,20 | 1,78 | 0,02 | 5,22 | 0,02 | 1,85 | 0,02 | 5,10 | 0,09 | 2,01 | 0,10 | 5,56 | 0,16 | 2,01 | 0,00 |
| 24,2 | 5,94 | 0,21 | 2,14 | 0,05 | 6,16 | 0,14 | 2,04 | 0,00 | 5,89 | 0,13 | 2,20 | 0,11 | 6,77 | 0,01 | 2,26 | 0,04 |
| 25,5 | 6,77 | 0,20 | 2,32 | 0,14 | 6,58 | 0,01 | 2,12 | 0,03 | 7,11 | 0,26 | 2,45 | 0,11 | 7,46 | 0,16 | 2,38 | 0,06 |
| 26,3 | 6,85 | 0,24 | 2,33 | 0,15 | 6,59 | 0,15 | 2,12 | 0,06 | 7,54 | 0,06 | 2,53 | 0,15 | 7,79 | 0,21 | 2,43 | 0,07 |

Tab. 8-4: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Kolben mit 1 mM und 5 mM Lactose-Konzentration sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die bei Kreuzmann verwendete Methode und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Aktivitäten dieser Arbeit zu schaffen, wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 3 korrigiert.

| t in h | $c_{\text{lac}} = 1 \text{ mM}$ | | | | | | $c_{\text{lac}} = 5 \text{ mM}$ | | | | | |
|----------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|--|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|--|
| | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $s_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $s_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} |
| 18,9 | 0,0 | 0,6 | 0,4 | 0,0 | 1,3 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,5 | 0,0 | 1,5 | 0,0 |
| 19,6 | 0,2 | 0,7 | 10,6 | 1,7 | 32,7 | 5,2 | 0,3 | 0,8 | 16,4 | 1,3 | 50,5 | 4,1 |
| 20,1 | 0,4 | 0,8 | 19,9 | 1,4 | 61,2 | 4,4 | 0,5 | 0,9 | 24,9 | 0,9 | 76,8 | 2,8 |
| 20,7 | 1,1 | 1,2 | 39,7 | 1,1 | 122,4 | 3,4 | 0,8 | 1,1 | 31,1 | 2,5 | 95,9 | 7,6 |
| 21,2 | 1,3 | 1,6 | 36,4 | 4,4 | 112,1 | 13,4 | 1,0 | 1,2 | 34,8 | 2,2 | 107,1 | 6,7 |
| 22,2 | 1,8 | 2,1 | 37,5 | 3,9 | 115,7 | 12,0 | 1,4 | 1,6 | 38,3 | 1,5 | 118,0 | 4,7 |
| 23,2 | 2,1 | 2,4 | 38,7 | 10,8 | 119,0 | 33,3 | 1,8 | 1,9 | 41,5 | 8,8 | 127,8 | 27,1 |
| 24,2 | 1,6 | 2,4 | 29,0 | 1,3 | 89,4 | 4,1 | 2,0 | 2,3 | 39,2 | 3,9 | 120,8 | 12,1 |
| 25,5 | - | - | - | - | - | - | 1,8 | 2,4 | 32,8 | 2,7 | 101,1 | 8,2 |
| 26,3 | - | - | - | - | - | - | 2,0 | 2,4 | 36,7 | 1,0 | 113,2 | 3,0 |

Tab. 8-5: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase aus Versuch 1. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Kolben mit 10 mM und 20 mM Lactose-Konzentration sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die bei Kreuzmann verwendete Methode und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Aktivitäten dieser Arbeit zu schaffen, wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 3 korrigiert.

| t in h | $c_{\text{lac}} = 10 \text{ mM}$ | | | | | | $c_{\text{lac}} = 20 \text{ mM}$ | | | | | |
|----------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|--|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|--|
| | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $s_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $s_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} |
| 18,9 | 0,0 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 1,7 | 0,3 | 0,0 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 1,5 | 0,2 |
| 19,6 | 0,2 | 0,7 | 10,6 | 0,6 | 32,8 | 2,0 | 0,2 | 0,7 | 10,3 | 0,1 | 31,6 | 0,3 |
| 20,1 | 0,4 | 0,8 | 21,7 | 2,2 | 66,7 | 6,6 | 0,4 | 0,8 | 22,1 | 0,5 | 68,1 | 1,6 |
| 20,7 | 0,5 | 0,9 | 25,7 | 2,6 | 79,2 | 8,0 | 0,6 | 1,0 | 27,1 | 1,2 | 83,5 | 3,6 |
| 21,2 | 0,7 | 1,1 | 29,6 | 0,2 | 91,3 | 0,6 | 0,6 | 1,1 | 24,5 | 0,1 | 75,5 | 0,4 |
| 22,2 | 1,1 | 1,5 | 32,4 | 2,6 | 99,8 | 8,1 | 1,2 | 1,6 | 34,1 | 5,5 | 105,1 | 16,8 |
| 23,2 | 1,4 | 1,8 | 34,6 | 1,0 | 106,6 | 3,0 | 1,9 | 2,0 | 42,0 | 1,9 | 129,3 | 6,0 |
| 24,2 | 1,9 | 2,1 | 40,4 | 1,6 | 124,6 | 4,8 | 2,7 | 2,5 | 49,1 | 5,2 | 151,3 | 16,1 |
| 25,5 | 2,3 | 2,5 | 40,6 | 1,6 | 125,1 | 4,9 | 2,4 | 2,7 | 38,9 | 4,9 | 119,8 | 15,1 |
| 26,3 | 2,0 | 2,7 | 33,7 | 1,2 | 103,7 | 3,5 | 2,7 | 2,8 | 41,9 | 3,3 | 129,2 | 10,3 |

8.2.2. Versuch 2

Tab. 8-6: Daten zur optischen Dichte aus Versuch 2 mit Induktion in der stationären Phase. Aufgelistet sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmung der Schüttelkulturen gleicher Induktor-Konzentration. Die grau unterlegten Zeilen markieren den Zeitpunkt der Induktion.

| t in h | $c_{\text{lac}} = 3 \text{ g l}^{-1}$ | | | | $c_{\text{lac}} = 5 \text{ g l}^{-1}$ | | | | $c_{\text{lac}} = 10 \text{ g l}^{-1}$ | | | |
|----------|---------------------------------------|----------|------------------|---------------|---------------------------------------|----------|------------------|---------------|--|----------|------------------|---------------|
| | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ |
| 0,0 | 0,00 | 0,00 | -5,81 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -5,52 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -5,81 | 0,00 |
| 16,0 | 2,44 | 0,02 | 0,89 | 0,01 | 2,44 | 0,02 | 0,89 | 0,01 | 2,39 | 0,02 | 0,87 | 0,01 |
| 16,8 | 2,41 | 0,00 | 0,88 | 0,00 | 2,42 | 0,01 | 0,88 | 0,01 | 2,41 | 0,01 | 0,88 | 0,00 |
| 17,3 | 2,36 | 0,00 | 0,85 | 0,00 | 2,41 | 0,03 | 0,88 | 0,01 | 2,42 | 0,00 | 0,89 | 0,00 |
| 17,8 | 2,34 | 0,02 | 0,84 | 0,01 | 2,36 | 0,04 | 0,86 | 0,02 | 2,41 | 0,05 | 0,88 | 0,02 |
| 18,4 | 2,33 | 0,03 | 0,84 | 0,01 | 2,42 | 0,05 | 0,88 | 0,02 | 2,44 | 0,04 | 0,89 | 0,02 |
| 18,9 | 2,35 | 0,02 | 0,85 | 0,01 | 2,42 | 0,03 | 0,89 | 0,01 | 2,45 | 0,00 | 0,90 | 0,00 |
| 19,9 | 2,59 | 0,02 | 0,96 | 0,01 | 2,64 | 0,04 | 0,98 | 0,02 | 2,71 | 0,02 | 1,02 | 0,01 |
| 20,4 | 2,94 | 0,01 | 1,10 | 0,00 | 2,98 | 0,04 | 1,12 | 0,01 | 3,03 | 0,04 | 1,15 | 0,01 |
| 20,8 | 3,21 | 0,10 | 1,20 | 0,04 | 3,19 | 0,02 | 1,20 | 0,01 | 3,26 | 0,02 | 1,24 | 0,01 |
| 21,8 | 3,93 | 0,29 | 1,43 | 0,08 | 3,78 | 0,06 | 1,39 | 0,02 | 3,98 | 0,03 | 1,47 | 0,00 |
| 22,8 | 3,74 | 0,16 | 1,37 | 0,04 | 4,52 | 0,01 | 1,60 | 0,00 | 4,64 | 0,15 | 1,65 | 0,04 |
| 23,8 | 3,78 | 0,05 | 1,39 | 0,02 | 4,81 | 0,01 | 1,67 | 0,01 | 6,08 | 0,03 | 1,97 | 0,01 |
| 24,8 | 3,77 | 0,04 | 1,38 | 0,01 | 5,00 | 0,19 | 1,71 | 0,05 | 7,36 | 0,06 | 2,20 | 0,00 |
| 25,8 | - | - | - | - | 4,65 | 0,37 | 1,63 | 0,10 | 7,70 | 0,08 | 2,25 | 0,02 |

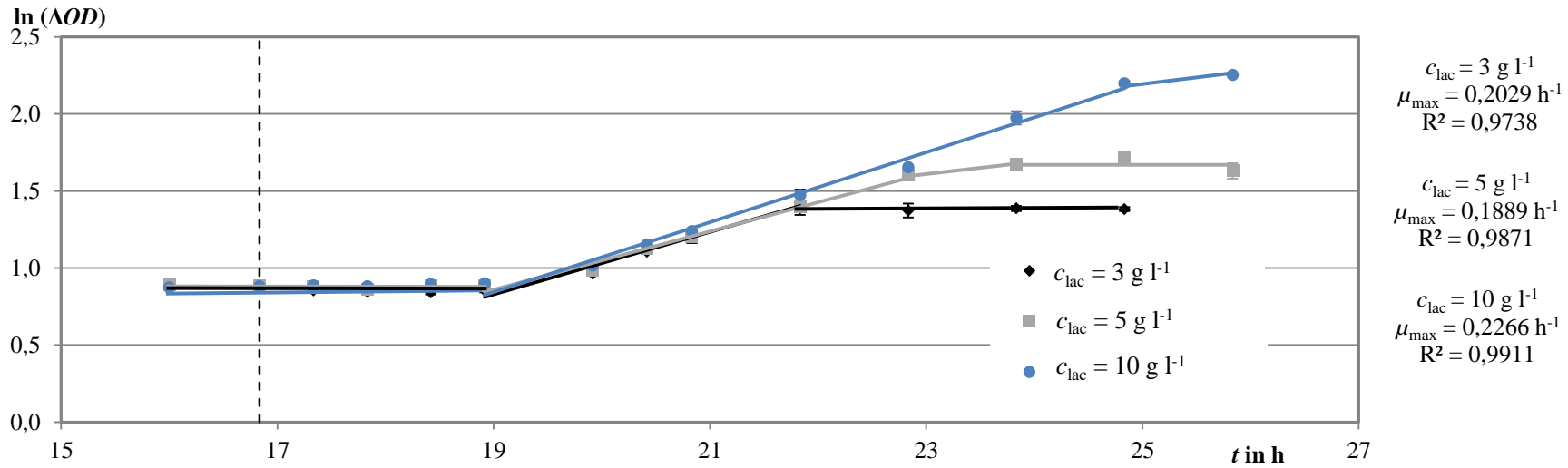


Abb. 8-4: Wachstumsverlauf von Versuch 2. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen. Zudem wurden die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt mit beschriebenen Lactose-Konzentrationen in der stationären Phase.

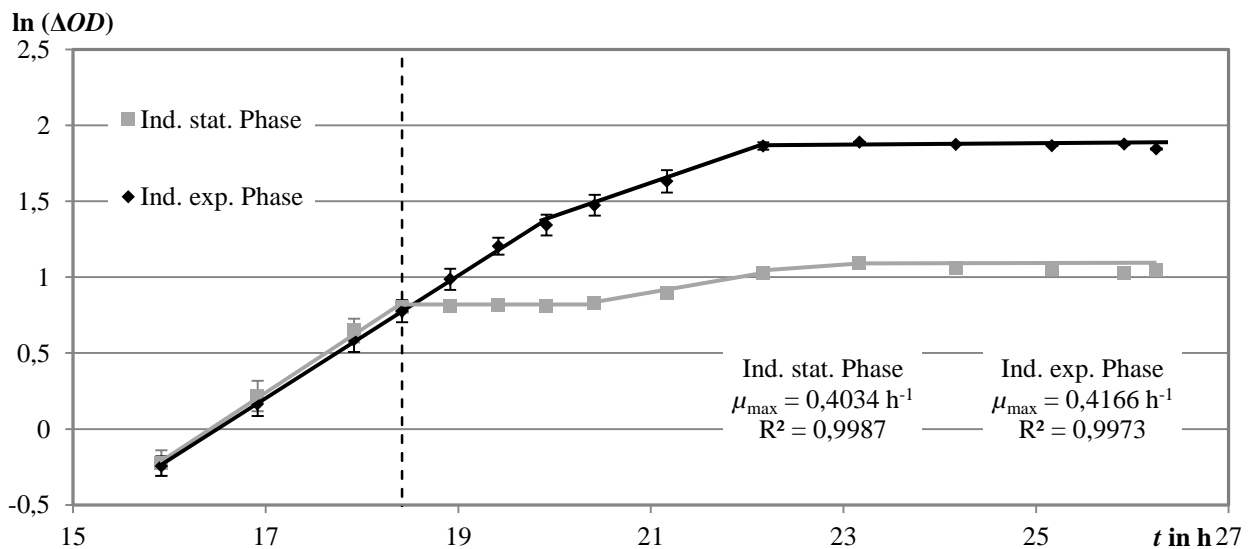
Tab. 8-7: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase sowie deren Standardabweichung aus den Kolben mit jeweils gleicher Lactose-Konzentrationen zu Versuch 2. Aufgelistet sind die Mittelwerte der Daten. Zur Bestimmung wurde die Methode wie bei Kreuzmann und der Aufschluss bei 0 °C durchgeführt, so dass die Aktivität zur Vergleichbarkeit um den Faktor 3 korrigiert wurde.

| <i>t</i> in h | $c_{\text{lac}} = 3 \text{ g l}^{-1}$ | | | | | | $c_{\text{lac}} = 5 \text{ g l}^{-1}$ | | | | | | $c_{\text{lac}} = 10 \text{ g l}^{-1}$ | | | | | |
|---------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|--|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | S_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $S_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | S_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $S_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | S_α in U g^{-1} | α_{cor} in U g^{-1} | $S_{\alpha,\text{cor}}$ in U g^{-1} |
| 16,8 | 0,01 | 0,87 | 0,48 | 0,07 | 1,83 | 0,28 | 0,01 | 0,86 | 0,33 | 0,03 | 1,27 | 0,10 | 0,00 | 0,84 | 0,26 | 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 17,3 | 0,02 | 0,86 | 1,17 | 0,54 | 4,43 | 2,06 | 0,01 | 0,86 | 0,73 | 0,16 | 2,79 | 0,62 | 0,01 | 0,85 | 0,55 | 0,08 | 2,10 | 0,31 |
| 17,8 | 0,02 | 0,85 | 1,10 | 0,04 | 4,18 | 0,14 | 0,02 | 0,85 | 0,91 | 0,01 | 3,45 | 0,02 | 0,02 | 0,84 | 0,85 | 0,17 | 3,22 | 0,64 |
| 18,4 | 0,03 | 0,85 | 1,55 | 0,00 | 5,87 | 0,00 | 0,03 | 0,86 | 1,54 | 0,12 | 5,87 | 0,46 | 0,02 | 0,85 | 1,12 | 0,19 | 4,27 | 0,73 |
| 18,9 | 0,05 | 0,85 | 2,57 | 0,20 | 9,78 | 0,78 | 0,04 | 0,87 | 2,25 | 0,19 | 8,56 | 0,72 | 0,06 | 0,86 | 3,04 | 0,10 | 11,54 | 0,38 |
| 19,9 | 0,18 | 0,94 | 8,68 | 1,63 | 32,97 | 6,19 | 0,19 | 0,94 | 9,68 | 1,46 | 36,77 | 5,56 | 0,20 | 0,95 | 9,55 | 0,06 | 36,28 | 0,22 |
| 20,4 | 0,30 | 1,07 | 12,40 | 0,27 | 47,12 | 1,03 | 0,25 | 1,07 | 11,38 | 0,98 | 43,24 | 3,72 | 0,31 | 1,06 | 13,04 | 2,09 | 49,54 | 7,95 |
| 20,8 | - | 1,17 | - | - | - | - | 0,30 | 1,14 | 12,49 | 0,29 | 47,47 | 1,10 | 0,35 | 1,14 | 13,65 | 0,00 | 51,85 | 0,00 |
| 21,8 | 0,56 | 1,43 | 17,33 | 1,05 | 65,86 | 4,00 | 0,50 | 1,35 | 17,90 | 0,78 | 68,01 | 2,98 | 0,46 | 1,39 | 14,74 | 4,14 | 56,00 | 15,75 |
| 22,8 | 0,56 | 1,36 | 18,53 | 4,51 | 70,42 | 17,14 | 0,69 | 1,62 | 20,86 | 5,39 | 79,25 | 20,50 | 0,70 | 1,62 | 19,29 | 0,23 | 73,31 | 0,87 |
| 23,8 | 0,65 | 1,36 | 21,11 | 0,00 | 80,22 | 0,00 | 0,78 | 1,72 | 21,51 | 0,53 | 81,75 | 2,01 | 0,89 | 2,13 | 18,57 | 0,06 | 70,58 | 0,23 |
| 24,8 | - | - | - | - | - | - | 0,86 | 1,79 | 22,83 | 3,84 | 86,75 | 14,58 | 1,33 | 2,57 | 23,09 | 2,89 | 87,74 | 10,99 |
| 25,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,32 | 2,69 | 21,80 | 1,45 | 82,83 | 5,52 |

8.2.3. Versuch 3

Tab. 8-8: Daten zur optischen Dichte von Versuch 3. Aufgelistet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmung.

| t in h | Ind. stat. Phase | | | | Ind. exp. Phase | | | |
|----------|------------------|----------|------------------|---------------|-----------------|----------|-----------------|---------------|
| | ΔOD | s_{OD} | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | $\ln \Delta OD$ | $s_{\ln(OD)}$ |
| 0,0 | 0,00 | 0,00 | -6,91 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -6,56 | 0,35 |
| 15,9 | 0,80 | 0,07 | -0,22 | 0,08 | 0,79 | 0,05 | -0,24 | 0,06 |
| 16,9 | 1,25 | 0,13 | 0,22 | 0,10 | 1,18 | 0,09 | 0,16 | 0,08 |
| 17,9 | 1,92 | 0,15 | 0,65 | 0,08 | 1,81 | 0,15 | 0,59 | 0,08 |
| 18,4 | 2,24 | 0,00 | 0,80 | 0,00 | 2,18 | 0,16 | 0,78 | 0,07 |
| 18,9 | 2,25 | 0,05 | 0,81 | 0,02 | 2,69 | 0,19 | 0,99 | 0,07 |
| 19,4 | 2,26 | 0,01 | 0,82 | 0,01 | 3,34 | 0,19 | 1,20 | 0,06 |
| 19,9 | 2,25 | 0,00 | 0,81 | 0,00 | 3,84 | 0,26 | 1,34 | 0,07 |
| 20,4 | 2,29 | 0,04 | 0,83 | 0,02 | 4,38 | 0,30 | 1,47 | 0,07 |
| 21,2 | 2,45 | 0,02 | 0,90 | 0,01 | 5,13 | 0,38 | 1,63 | 0,07 |
| 22,2 | 2,79 | 0,01 | 1,03 | 0,00 | 6,45 | 0,15 | 1,86 | 0,02 |
| 23,2 | 2,99 | 0,04 | 1,09 | 0,01 | 6,61 | 0,01 | 1,89 | 0,00 |
| 24,2 | 2,89 | 0,06 | 1,06 | 0,02 | 6,51 | 0,01 | 1,87 | 0,00 |
| 25,2 | 2,86 | 0,06 | 1,05 | 0,02 | 6,46 | 0,01 | 1,87 | 0,00 |
| 25,9 | 2,80 | 0,05 | 1,03 | 0,02 | 6,53 | 0,03 | 1,88 | 0,00 |
| 26,3 | 2,84 | 0,04 | 1,04 | 0,01 | 6,33 | 0,02 | 1,84 | 0,00 |

Abb. 8-5: Wachstumsverlauf von Versuch 2. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichung. Zudem wurden die spezifischen Wachstumsraten durch Ausgleichsgeraden ermittelt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Induktionszeitpunkt mit einer Lactose-Konzentration von jeweils $1,5 \text{ g l}^{-1}$ in der stationären bzw. exponentiellen Phase.

Tab. 8-9: Daten zur Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase für Versuch 3. Aufgelistet sind jeweils die Volumina des verwendeten Probevolumens zur Aktivität-Bestimmung, die Mittelwerte der Daten sowie die Standardabweichungen der spezifischen Aktivität. Induziert wurde mit einer Lactose-Konzentration von $1,5 \text{ g l}^{-1}$ in der stationären bzw. exponentiellen Phase.

| t in h | Ind. stat. Phase | | | | | Ind. exp. Phase | | | | |
|----------|------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | V_s in μl | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} | V_s in μl | ΔE | c_X in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} |
| 18,92 | 0,03 | 0,01 | 0,90 | 1,04 | 0,31 | 30 | 0,02 | 0,93 | 2,09 | 0,08 |
| 19,42 | 0,03 | 0,03 | 0,91 | 2,95 | 0,67 | 30 | 0,66 | 1,41 | 46,56 | 0,30 |
| 19,92 | 0,03 | 0,04 | 0,90 | 4,75 | 0,91 | 30 | 1,12 | 1,87 | 58,96 | 3,18 |
| 20,42 | 0,03 | 0,07 | 0,92 | 7,36 | 1,77 | 30 | 0,87 | 2,20 | 58,71 | 1,87 |
| 21,17 | 0,03 | 0,31 | 0,98 | 31,61 | 6,40 | 30 | 0,61 | 2,64 | 68,10 | 1,04 |
| 22,17 | 0,03 | 0,40 | 1,12 | 35,76 | 9,65 | 10 | 0,52 | 2,65 | 58,48 | 2,18 |
| 23,17 | 0,01 | 0,14 | 1,20 | 35,04 | 3,65 | 10 | - | - | - | - |

8.2.4. Kultivierung nach Praktikumsanleitung

Tab. 8-10: Daten zur Abb. 5-4. Aufgelistet sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte, der Substrat-Konzentrationen und der spezifischen Aktivitäten der β -Galactosidase der Kultivierungen in den Reaktoren BPlus und B.

| t in h | $\ln(\Delta OD)$ | $s_{\ln(OD)}$ | ΔOD | s_{OD} | c_{lac} in g l^{-1} | s_{lac} in g l^{-1} | c_{gal} in g l^{-1} | s_{gal} in g l^{-1} | c_{gly} in g l^{-1} | s_{gly} in g l^{-1} | α in U g^{-1} | s_α in U g^{-1} |
|----------|------------------|---------------|-------------|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 0,0 | 0,01 | 0,03 | 1,01 | 0,03 | - | - | - | - | 11,88 | 1,76 | - | - |
| 0,5 | 0,29 | 0,02 | 1,33 | 0,02 | - | - | - | - | 10,43 | 0,94 | - | - |
| 1,0 | 0,54 | 0,01 | 1,72 | 0,02 | - | - | - | - | 10,58 | 0,85 | - | - |
| 1,5 | 0,84 | 0,02 | 2,31 | 0,04 | - | - | - | - | 9,48 | 0,00 | - | - |
| 2,0 | 1,06 | 0,03 | 2,90 | 0,09 | 4,34 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 8,72 | 0,28 | 4,25 | 1,11 |
| 2,5 | 1,34 | 0,03 | 3,82 | 0,11 | 4,17 | 0,02 | - | - | 7,92 | 0,83 | 59,10 | 4,13 |
| 3,0 | 1,61 | 0,03 | 5,03 | 0,17 | 3,89 | 0,09 | 0,34 | 0,02 | 7,52 | 0,45 | 84,78 | 7,04 |
| 3,5 | 1,88 | 0,03 | 6,57 | 0,19 | 2,44 | 0,00 | - | - | 6,60 | 0,53 | 135,08 | 11,99 |
| 4,0 | 2,10 | 0,04 | 8,17 | 0,33 | 0,51 | 0,29 | 1,81 | 0,20 | 6,17 | 0,20 | 127,44 | 6,19 |
| 4,5 | 2,25 | 0,03 | 9,49 | 0,25 | 0,19 | 0,02 | - | - | 4,99 | 0,00 | 82,02 | 2,52 |
| 5,0 | 2,36 | 0,02 | 10,61 | 0,19 | 0,30 | 0,04 | 2,20 | - | 4,08 | 0,28 | 65,87 | 5,92 |
| 5,5 | 2,52 | 0,03 | 12,48 | 0,35 | 0,26 | 0,06 | - | - | 2,49 | 0,87 | 59,20 | 4,72 |
| 6,0 | 2,65 | 0,01 | 14,14 | 0,19 | 0,25 | 0,03 | 2,07 | 0,01 | 0,21 | 0,02 | 31,07 | 1,07 |

Tab. 8-11: In Abb. 5-8 verwendete Daten der Kultivierung im Reaktor BPlus.

| t in h | N_{St} in min^{-1} | $c_{X,OD}$ in g l^{-1} | μ in h^{-1} | OUR in $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ | $pO_2\%$ in % | c_{O_2} in g l^{-1} | $x_{O_2,out}$ |
|----------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--|---------------|--------------------------------|---------------|
| 0,0 | 600 | 0,41 | 0,53 | 0,20 | 100,5 | 0,0068 | 0,207 |
| 0,5 | | 0,55 | | 0,27 | 43,9 | 0,0030 | 0,206 |
| 1,0 | 650 | 0,73 | | 0,35 | 49,8 | 0,0034 | 0,205 |
| 1,5 | | 0,99 | | 0,48 | 35,6 | 0,0024 | 0,203 |
| 2,0 | | 1,26 | | 0,61 | 18,3 | 0,0012 | 0,201 |
| 2,5 | 750 | 1,66 | | 0,80 | 48,2 | 0,0033 | 0,199 |
| 3,0 | | 2,19 | | 1,06 | 41,8 | 0,0028 | 0,195 |
| 3,5 | | 2,85 | | 1,38 | 33,3 | 0,0023 | 0,191 |
| 4,0 | | 3,59 | | 1,73 | 25,1 | 0,0017 | 0,186 |
| 4,5 | 800 | 4,11 | | 0,28 | 1,05 | 26,9 | 0,0018 |
| 5,0 | | 4,56 | 1,16 | | 31,4 | 0,0021 | 0,194 |
| 5,5 | | 5,42 | 1,38 | | 19,5 | 0,0013 | 0,191 |
| 6,0 | 850 | 6,05 | 1,54 | | 15,7 | 0,0011 | 0,188 |

Tab. 8-12: Ermittelte Daten bezüglich des Sauerstoffs zur Kultivierung in Reaktor B.

| t in h | N_{St} in min^{-1} | $c_{X,OD}$ in g l^{-1} | μ in h^{-1} | OUR in $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ | $pO_2\%$ in % | c_{O_2} in g l^{-1} | $x_{O_2,out}$ |
|----------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--|---------------|--------------------------------|---------------|
| 0,00 | 600 | 0,44 | 0,53 | 0,21 | 76,4 | 0,0052 | 0,207 |
| 0,5 | | 0,57 | | 0,27 | 51,7 | 0,0035 | 0,206 |
| 1,1 | 650 | 0,71 | | 0,34 | 53,0 | 0,0036 | 0,205 |
| 1,5 | | 0,96 | | 0,46 | 41,8 | 0,0028 | 0,203 |
| 2,0 | | 1,19 | | 0,57 | 26,7 | 0,0018 | 0,202 |
| 2,5 | 750 | 1,57 | | 0,75 | 47,4 | 0,0032 | 0,199 |
| 3,1 | | 2,05 | | 0,99 | 41,3 | 0,0028 | 0,196 |
| 3,5 | | 2,69 | | 1,30 | 35,5 | 0,0024 | 0,192 |
| 4,0 | | 3,31 | | 1,60 | 26,3 | 0,0018 | 0,188 |
| 4,6 | 800 | 3,90 | | 0,28 | 1,88 | 27,4 | 0,0019 |
| 5,0 | | 4,40 | 2,12 | | 35,6 | 0,0024 | 0,180 |
| 5,6 | | 5,12 | 2,47 | | 25,2 | 0,0017 | 0,176 |
| 6,0 | 850 | 5,89 | 2,84 | | 28,7 | 0,0019 | 0,171 |

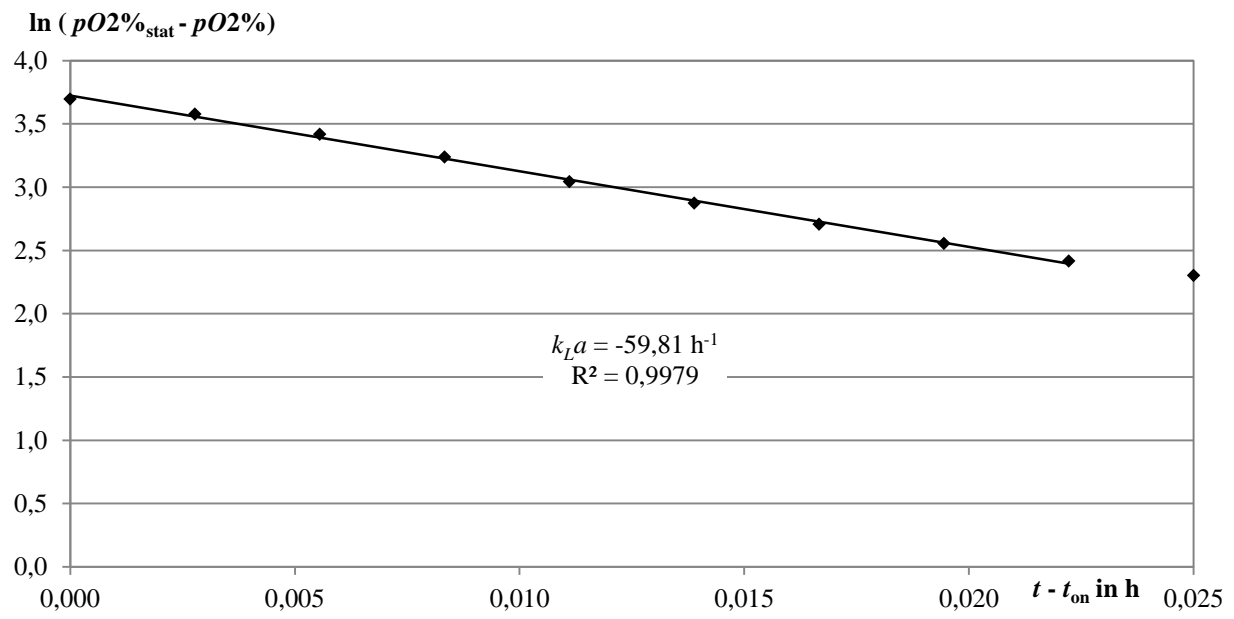


Abb. 8-6: Bestimmung des $k_L a$ mit der dynamischen Methode aus der Kultivierung in Reaktor B. Aufgetragen sind die Werte nach Einschalten der Zuluft.

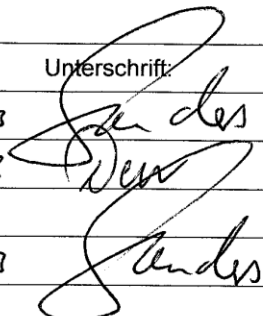
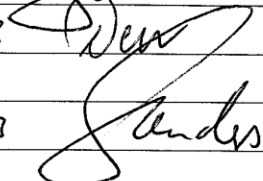
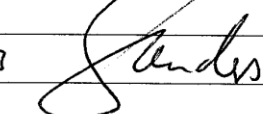
8.3. Standardarbeitsanweisungen (SOP)

8.3.1. Bestimmung der optischen Dichte SOP-Nr. 320101-04

Standardarbeitsanweisung

| | |
|---|-----------------------|
| Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm | SOP-Nr.: 320101-04 |
| | Gültig ab: 01.07.2013 |
| | Seite: 1 von 4 |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|--|
| Standardarbeitsanweisung Nr.: | 320101-04 | | |
| Titel: | Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm | | |
| Gültig ab: | 01.07.2013 | | |
| Geltungsbereich: | Unternehmen: | Hochschule für Angewandte Wissenschaften | |
| | Abteilung: | Fakultät Life Sciences | |
| | Standort: | Hamburg / Campus Bergedorf | |
| | Gebäude: | Laborgebäude Biotechnologie | |
| | Abteilung: | Bioverfahrenstechnik | |
| | Raum: | - entfällt - | |
| Betroffene Produkte: | - entfällt - | | |
| Änderungsverwaltung: | Änderungsfassung | | |

| | Name: | Abteilung: | Datum: | Unterschrift: |
|---------------|----------------------------|-----------------|----------|---|
| Verfasst: | Prof. Dr. Ernst A. Sanders | Laborleiter BVT | 29.05.13 |  |
| Geprüft: | Dipl.-Ing. Petra Derr | BVT | 29.05.13 |  |
| Mitzeichnung: | entfällt | | | |
| Freigegeben: | Prof. Dr. Ernst A. Sanders | Laborleiter BVT | 29.05.13 |  |

Schlüsselworte:

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| Vergebene Schlüsselworte: | Offline Analytik, OD-Messung |
|---------------------------|------------------------------|

Standardarbeitsanweisung

| | |
|---|------------------------------|
| Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm | SOP-Nr.: 320101-04 |
| | Gültig ab: 01.07.2013 |
| | Seite: 2 von 4 |

Änderungsverwaltung:

| | |
|----------------------------|--|
| SOP ersetzt SOP Nr. / vom: | 320101-01 vom 01.04.2008 |
| Grund der Änderung: | Das Pipettieren kleiner Volumina bei hohen Zelldichten führt zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen |
| Änderungen: | Es wurde ein dritter Verdünnungsschritt für höhere Zelldichten eingefügt, so dass die zu pipettierenden Volumina größer sind |

| | |
|----------------------------|--|
| SOP ersetzt SOP Nr. / vom: | 320101-02 vom 09.11.2011 |
| Grund der Änderung: | Bezeichnung OD_0 führte zu Verwechslungen mit dem Wert zu Versuchsbeginn ($t = 0$) |
| Änderungen: | Variable in OD_{med} geändert sowie kleine redaktionelle Änderungen |

| | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| SOP ersetzt SOP Nr. / vom: | 320101-03 vom 15.02.2012 |
| Grund der Änderung: | Redaktionelle Änderungen |
| Änderungen: | Bezeichnung Standardarbeitsanweisung |

Standardarbeitsanweisung

| | |
|---|------------------------------|
| Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm | SOP-Nr.: 320101-04 |
| | Gültig ab: 01.07.2013 |
| | Seite: 3 von 4 |

1 Einleitung und Zielsetzung

Diese Anweisung beschreibt das Vorgehen bei der Bestimmung der Optischen Dichte ΔOD . Wegen der Geräteabhängigkeit muss das verwendete Photometer dokumentiert werden und darf innerhalb einer Versuchsserie nicht gewechselt werden. Die Verdünnungsstufen sind so gewählt, dass der ablesbare Extinktionswert zwischen 0,12 und 0,6 liegt, um eine Proportionalität zwischen ΔOD und der Biotrockenmassekonzentration zu erhalten.

2 Abkürzungen und Definitionen

| | |
|-------------|---|
| OD_{susp} | Optische Dichte einer Suspensionsprobe (Extinktionsmessung am Photometer) |
| OD_{med} | Optische Dichte einer Medienprobe |
| ΔOD | Differenz der Optischen Dichten von Suspension und zellfreiem Überstand |
| PK | Physiologische Kochsalzlösung, 0,9% w/v NaCl in vollentsalztem Wasser |

3 Material und Geräte

- Photometer mit Einstellmöglichkeit oder Filter für die vorgegebene Wellenlänge
- Kolbenhubpipette 10 - 100 μl
- Kolbenhubpipette 100 (200) – 1.000 μl
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße, Drehzahl $\geq 5.000 \text{ min}^{-1}$
- Halbmikroküvetten
- Mikroreaktionsgefäße mit ca. 1,5 ml
- Parafilm
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% w/v NaCl in vollentsalztem Wasser)

4 Durchführung

4.1 Vorbereitung

Einschalten des Photometers und bei 600 nm ohne Küvette im Strahlengang auf Null abgleichen (Set Ref).

4.2 Durchführung

1 ml unverdünnte Probe in eine Halbmikroküvette pipettieren. Nullabgleich wiederholen, wenn bei leerem Strahlengang nicht 0 angezeigt wird. Optische Dichte der Suspension messen. Ist $OD_{susp} > 0,6$ muss verdünnt (siehe 4.3) und erneut gemessen werden.

Nach der Messung wird die Probe oder, wenn verdünnt wurde, die verdünnte Suspension in einem Mikroreaktionsgefäß $5 \pm 2 \text{ min}$ bei $\geq 5.000 \text{ min}^{-1}$ zentrifugiert. Der Überstand wird sehr vorsichtig (es dürfen mit dem Auge keine Schlieren erkennbar sein) in eine zweite Küvette dekantiert oder mit einer Pipette übertragen. Im selben Photometer wird bei unveränderten Einstellungen die optische Dichte des Überstands OD_{med} bestimmt.

Standardarbeitsanweisung

| | |
|---|------------------------------|
| Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm | SOP-Nr.: 320101-04 |
| | Gültig ab: 01.07.2013 |
| | Seite: 4 von 4 |

4.3 Verdünnung

Die Verdünnungsstufen lassen sich mit zwei variablen Pipetten ohne Änderung der Volumeneinstellung mit physiologischer Kochsalzlösung herstellen. Erst wenn wegen Änderung der Zelldichte eine andere Verdünnungsstufe zu wählen ist, werden die Volumina an den Pipetten neu eingestellt.

| ΔOD | Verdünnung | F | Pipette 1 Probe μl | Pipette 2 PK μl | Pipette 1 2. Verd. μl | Pipette 2 PK μl | Pipette 1 3. Verd μl | Pipette 2 PK μl |
|-------------|------------|-------|-------------------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 0 bis 0,6 | keine | 1 | 1000 | - | - | - | - | - |
| 0,6 bis 3 | 1 : 5 | 5 | 200 | 800 | - | - | - | - |
| 3 bis 15 | 1 : 25 | 25 | 40 | 960 | - | - | - | - |
| 15 bis 75 | 1 : 123 | 123 | 90 | 910 | 90 | 910 | | |
| 75 bis 300 | 1 : 500 | 500 | 200 | 800 | 100 | 900 | 100 | 900 |
| > 300 | 1:1.000 | 1.000 | 100 | 900 | 100 | 900 | 100 | 900 |

Die Verdünnungen 1:5 und 1:25 erfolgen direkt in der Küvette, die mit Parafilm abgedeckt über einem Abfallbehälter (Becherglas, Abfallbeutel o. ä.) mehrfach zur Durchmischung umgeschwenkt wird. Bei den Verdünnungen 1:123, 1:500 und 1:1.000 erfolgen der/die ersten Verdünnungsschritte in einem Mikroreaktionsgefäß, der letzte direkt in der Küvette.

4.4 Berechnung von ΔOD

Die Differenz der Optischen Dichte der Probe und des Überstands wird mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert. OD_{susp} und OD_{med} stehen für die Extinktionswerte der verdünnten oder unverdünnten Proben, wobei beide der gleichen Verdünnungsstufe entstammen.

$$\Delta OD = F(OD_{\text{susp}} - OD_{\text{med}}) \quad (1)$$

5 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanleitungen der Photometer -

6 Anlagen


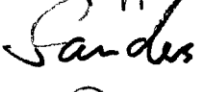

- keine -

8.3.2. Bestimmung der Biotrockenmasse SOP-Nr. 320001-02

Standard Arbeitsanweisung

| | |
|--|-----------------------|
| Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse- konzentration in Mikroreaktionsgefäßen | SOP-Nr.: 320001-02 |
| | Gültig ab: 01.12.2011 |
| | Seite: 1 von 3 |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| Standard Arbeitsanweisung Nr.: | 320001-02 | |
| Titel: | Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration in Mikroreaktionsgefäßen | |
| Gültig ab: | 01.12.2011 | |
| Geltungsbereich: | Unternehmen: | Hochschule für Angewandte Wissenschaften |
| | Abteilung: | Fakultät Life Sciences |
| | Standort: | Hamburg / Campus Bergedorf |
| | Gebäude: | Laborgebäude Biotechnologie |
| | Abteilung: | Bioverfahrenstechnik |
| | Raum: | - entfällt - |
| Betroffene Produkte: | - entfällt - | |
| Änderungsverwaltung: | Änderungsfassung | |

| | Name: | Abteilung: | Datum: | Unterschrift: |
|---------------|----------------------------|-----------------|----------|---|
| Verfasst: | Kristin Knüppel | Studentin BVT | 26.11.11 |  |
| Geprüft: | Prof. Dr. Ernst A. Sanders | Laborleiter BVT | 29.11.11 |  |
| Mitzeichnung: | entfällt | | | |
| Freigegeben: | Prof. Dr. Ernst A. Sanders | Laborleiter BVT | 01.12.11 |  |

Schlüsselworte:

| | |
|---------------------------|---|
| Vergebene Schlüsselworte: | Offline Analytik, Biotrockenmassekonzentration, BTM |
|---------------------------|---|

Standard Arbeitsanweisung

| | |
|--|------------------------------|
| Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse- konzentration in Mikroreaktionsgefäßen | SOP-Nr.: 320001-02 |
| | Gültig ab: 01.12.2011 |
| | Seite: 2 von 3 |

Änderungsverwaltung:

| | |
|----------------------------|--|
| SOP ersetzt SOP Nr. / vom: | 320001-02 / 320001-01, die nicht gültig wurde. |
| Grund der Änderung: | Prüfung auf Notwendigkeit eines Waschschriffs |
| Änderungen: | Waschschritt gelöscht |

1 Einleitung und Zielsetzung

Die SOP beschreibt die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration durch Auswiegen der in 1 ml Suspension enthaltenen Biomasse. Verwendet werden Mikroreaktionsgefäße.

2 Abkürzungen und Definitionen

BTM Biotrockenmasse

3 Material und Geräte

3.1 Material

- Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml)
- temperaturbeständiger Träger für Mikroreaktionsgefäße
- Pipettenspitzen
- vorbereitete Tabelle

3.2 Geräte

- Trockenschrank
- Exsikkator
- Pinzette
- Analysenwaage
- Kolbenhub-Pipette 200 - 1000 µl
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße, Drehzahl $\geq 10000 \text{ min}^{-1}$

4 Durchführung

4.1 Vorbereitung

Im Vorfeld ist zu klären in welcher Häufigkeit Proben zur BTM-Bestimmung zu nehmen sind. Auf den kompletten Prozess bezogen, wird eine entsprechende Anzahl an Mikroreaktionsgefäßen in einem Träger mit Aufkleber (Experimentator, Datum u. ä.) bereitgestellt. Die Mikroreaktionsgefäße werden auf dem Deckel nummeriert.

Wird die BTM-Bestimmung parallel zur OD-Messung gemacht, sind die Probennummern denen der OD-Messung anzugleichen. Bei Stichproben können abweichende Nummer verwendet werden.

Da die Zellkonzentrationen im mg-Bereich liegen, muss ausgeschlossen sein, dass an den Mikroreaktionsgefäßen befindliche Feuchtigkeit mitgewogen wird. Die beschrifteten, geöffneten Mikroreaktionsgefäße werden daher im Trockenschrank bei 105 °C über Nacht getrocknet. Sie müssen anschließend in einem Exsikkator abkühlen.

Zur Wägung werden die Mikroreaktionsgefäße im Exsikkator zur Analysenwaage gebracht.

M

Standard Arbeitsanweisung

| | | |
|---|-------------------|-------------------|
| Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration in Mikroreaktionsgefäßen | SOP-Nr.: | 320001-02 |
| | Gültig ab: | 01.12.2011 |
| | Seite: | 3 von 3 |

An der Waage ist eine Tabelle etwa folgenden Formats zurecht zu legen:

| Proben-Nr. | Probenahmezeit dd.mm.yy hh:mm | Prozesszeit h | Tara- Gewicht mg | Brutto- Gewicht mg | Zellmassen- konzentration mg ml ⁻¹ |
|------------|----------------------------------|------------------|------------------------|--------------------------|---|
| xx | | | | | |
| : | | | | | |

Die Mikroreaktionsgefäße werden nun einzeln mit einer Pinzette aus dem Exsikkator genommen und in den Raum der Analysenwaage gelegt. Der Exsikkator und die Analysenwaage werden wieder geschlossen. Bei stabiler Anzeige wird das Gewicht in die obige Tabelle unter „Tara-Gewicht“ und der entsprechenden Probennummer eingetragen.

Nach der Wägung werden die Mikroreaktionsgefäße in aufsteigender Reihenfolge wieder in einen Träger gestellt und dort platziert, wo die Proben pipettiert werden.

4.2 Durchführung

Zum Befüllen der Mikroreaktionsgefäße wird eine 1000 µl-Pipette, ein Kasten mit Pipettenspitzen sowie ein Abfallgefäß bereitgestellt.

Von der entnommenen, gut gemischten Probe werden 1000 µl mit der Pipette abgenommen und in das entsprechende Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dieses wird verschlossen und in der Zentrifuge mit einem Gegengewicht (entweder eine zweite Probe oder ein mit Wasser gefülltes Mikroreaktionsgefäß) 3 min bei $\geq 10000 \text{ min}^{-1}$ zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wird die restliche Flüssigkeit, die sich auf dem Zellpellet befindet, vorsichtig abpipettiert. Das Mikroreaktionsgefäß wird nun geschlossen in den Träger zurückgestellt.

4.3 Trocknung

Nach Beendigung der Probenbehandlung werden die Gefäße geöffnet und in einem temperaturbeständigen Träger in den Trockenschrank bei 105 °C gestellt, so dass die Feuchtigkeit entweichen kann.

4.4 Auswertung

Die trockenen Mikroreaktionsgefäße werden im Exsikkator abgekühlt bevor sie mit einer Pinzette entnommen und auf der Analysenwaage gewogen werden. Wenn die Anzeige einen stabilen Wert anzeigt, wird dieser in mg in die obige Tabelle unter „Brutto-Gewicht“ und der entsprechenden Probennummer eingetragen.

Zur Bestimmung der Zellmassenkonzentration wird nun jeweils die Gewichts Differenz errechnet. Das Ergebnis ist die Biotrockenmasse, die in 1 ml Probe vorhanden war.

5 Mitgeltende Unterlagen

- keine -

6 Anlagen

- keine -