



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Systematische Untersuchung des Einflusses
von Aminosäurezusätzen auf das Wachstumsverhalten
und die Produktbildung rekombinanter *Escherichia coli*
im Mikrotiterplattenformat

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Lukas Franzgrote

Hamburg
am 18. Dezember 2014

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

Zweitgutachter: Dr. Christian Kaiser
Richter-Helm BioLogics Hamburg

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen
Ulmenliet 20
21033 Hamburg

Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG
Standort Hamburg
Abteilung Prozessentwicklung - *Upstream Processing*
Herr Dr. Christian Kaiser
Suhrenkamp 59
22335 Hamburg

Zur Erlangung des Bachelor of Science (B. Sc.) vorgelegt von:

Lukas Franzgrote
Matrikelnummer 2078966



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG für die Realisierung der Durchführung dieser Abschlussarbeit am Standort Hamburg bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Christian Kaiser für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Unterstützung und beste wissenschaftliche Betreuung, die ich hier über die gesamte Zeit erfahren durfte.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Übernahme der Erstkorrektur meinen Dank aussprechen.

Für die freundliche Atmosphäre und das gute Arbeitsklima möchte ich des Weiteren dem gesamten USP- und DSP-Team in der Prozessentwicklung danken.

Mit der Beendigung meines Bachelorstudiums danke ich abschließend insbesondere meiner Familie im entfernten Rheinland und meinen Freunden für ihre Geduld, die vielen Ratschläge, ihr Verständnis sowie die Unterstützung während den gesamten sieben Semestern und darüber hinaus.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung der Bachelorarbeit	2
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Kultivierungsorganismus <i>E. coli</i>	3
2.2 Aminosäuren	3
2.3 Fermentationsprinzip	5
2.3.1 Batch-Betrieb	5
2.3.2 Fed-Batch-Betrieb	5
2.4 Messtechnik und Analytik	8
2.4.1 Optische Dichte	8
2.4.2 Zellaufschluss	8
2.4.3 SDS-PAGE	9
3 Material und Methoden	11
3.1 Versuchssystematik	12
3.2 Vorkultivierung	14
3.2.1 Vorkulturmedien	14
3.3 Mikrotiterplattenfermentation	17
3.3.1 Plattensystem Duetz	18
3.3.2 Handhabung der Mikrotiterplatte	20
3.3.3 Fermentationsmedien	22
3.3.4 Aminosäuren	25
3.3.5 Befüllung der Mikrotiterplatte	28
3.3.6 Batch-Fermentation	33
3.3.7 Fed-Batch-Fermentation	35
3.3.8 Induktionsstrategie	37
3.4 1-Liter-Fermentation	38
3.4.1 Hauptfermentationsmedien	38
3.4.2 Prozessparameter	39
3.4.3 Prozessführungsstrategie	40
3.5 Messtechnik und Analytik	41
3.5.1 Probenahme und Probenvorbereitung	41
3.5.2 Optische Dichte	44
3.5.3 Chemische Zellyse und SDS-PAGE	48
3.5.4 pH-Wert	54

4	Experimenteller Teil	55
4.1	Fermentationen mit dem B080-Stamm	56
4.1.1	Batch-Verfahren zur Wachstumsuntersuchung (V01)	56
4.1.2	Batch-Verfahren zur primären Expressionsanalyse (V02 bis V06)	58
4.1.3	Fed-Batch-Vorversuch mit FeedBeads (V07)	71
4.1.4	Fed-Batch-Verfahren zur primären Expressionsanalyse (V08 und V09)	73
4.1.5	Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Maßstab (V16 bis V18)	78
4.2	Fermentationen mit dem B117-Stamm	82
4.2.1	Batch-Verfahren zur Wachstumsuntersuchung (V10 bis V12)	83
4.2.2	Batch-Verfahren zur parallelen Wachstums- und Expressionsuntersuchung (V13 und V14)	86
4.2.3	Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Maßstab (V15)	92
5	Zusammenfassung	97
6	Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	101
	Anhang	
	Eidesstattliche Erklärung	

Abbildungsverzeichnis

2.1	Auszug aus den Stoffwechsel- und Biosynthesewegen von Aminosäuren in <i>Escherichia coli</i> [1]	4
2.2	Freigesetzte Glucosemenge pro FeedBead in Abhängigkeit des Durchmessers, nach [17]	6
3.1	Darstellung der Teilprozesse jedes Versuchslaufes im USP und der Analytik	11
3.2	Entscheidungsbaum für das systematische Aminosäurescreening	13
3.3	Schematische Zeichnung der Fermentations-Deepwell-Platte mit 24 Wells und Pyramidböden	18
3.4	Schematische Zeichnung des Verbunddeckels	18
3.5	Querschnittsdarstellung der Mikrotiterplatte mit aufgesetztem Verbunddeckel, Abb. erstellt nach [9]	19
3.6	Aktions- und Zustandskreislauf der Mikrotiterplatten mit Vor- und Nachbereitung zur allgemeinen Kultivierung	20
3.7	Plattenbelegungsprinzip zur Verdeutlichung des Pipettierschemas	29
3.8	Relative Kulturbrühenbestandteile und Veranschaulichung der Pipettierreihenfolge zur Kultivierung	30
3.9	1-Liter-Multifermenter-System der Fa. <i>DasGip</i>	38
3.10	Ablauf der Probenahme von MTP-Entnahme bis zum Transfer in Messmatrizes	42
3.11	Schematische Zeichnung der verwendeten 1000 μL Deepwell-Platten mit einer 8x12 Matrix, Abb. erstellt nach [10]	43
3.12	Eingestellter Prozesslauf des Multireaders zur Vermessung und Berechnung der Zellsuspension	46
3.13	Korrelationsgerade zur Umrechnung der gemessenen OD_{600} -Werte zwischen MultiSkan zu Photometer	47
3.14	Darstellung des Vorgangs vom Zeitpunkt der Probenahme über die Zellyse bis zur anschließenden SDS-PAGE	48
3.15	Beispielhaft angefärbtes SDS-PAGE Gel mit aufgetragenen Fermentationsproben aus Versuch V02 des B080-Stammes	53
4.1	Wachstumskurven des B080-Stammes unter Einfluss von Aminosäurezusätzen mit einer Konzentration von je 200 mg L^{-1}	57
4.2	V02 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte	59
4.3	V03 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte	61
4.4	V04 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte	63
4.5	V05 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte	66
4.6	Einflussnahme der Aminosäurezusätze auf Zellwachstums- und Expressionsverhalten	68
4.7	V06 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte	70
4.8	V07 – Wachstumskurve zum Vorversuch mit FeedBeads	73
4.9	Wachstumskurve des B080-Stamm unter Einfluss von FeedBeads und ohne Aminosäurezusatz	74
4.10	V08 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte bei Einsatz von 3 FeedBeads	75

4.11 V09 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte bei Einsatz von 1 FeedBead	77
4.12 V16 bis V18 – Offline Messdaten	79
4.13 Wachstumskurven des B117-Stammes unter Einfluss von Aminosäurezusätzen	82
4.14 V10 bis V12 – Gemessene optische Dichten nach 3, 6, 9 und 25 Stunden unter Einfluss von Kombinationen aus sechs Aminosäuren.	85
4.15 V13 und V14 – Kinetik der erreichten End-ODs (OD_{EoF}) ohne Induktion in Abhängigkeit der zugesetzten Leucinkonzentration	89
4.16 V13 und V14 – Kinetik der erreichten Zielproteinkonzentrationen in Abhängigkeit der zugesetzten Leucinkonzentrationen	91
4.17 V15 – Online Messdaten	93
4.18 V15 – Offline Messdaten	94

Tabellenverzeichnis

3.1	Gesetzte Prozessparameter zur Vorkultivierung im Schüttelinkubator der Fa. <i>New Brunswick Scientific</i> (Typ <i>Innova 4230</i>).	14
3.2	Verwendetes Equipment zum Ansatz von Kulturmedien und Zusätzen.	15
3.3	Vorkulturmedienbestandteile und Konzentrationen (VKM-B080 und VKM-B117).	16
3.4	Verwendetes Equipment zur Durchführung der Fermentation im MTP-Format.	17
3.5	Ansatzkonzentrationen für das Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Batch- und Fed-Batch-Verfahren.	22
3.6	Ansatzkonzentrationen für das Fermentationsmedium zur Kultivierung des B117-Stammes im Batch-Verfahren.	24
3.7	Verwendete kanonische Aminosäuren zum Ansatz im Fermentationsmedium.	25
3.8	Verbrauchsmaterial zum Ansatz von Aminosäurelösungen.	26
3.9	Lösungsansatz der verwendeten Aminosäuren in durchnummerierter Reihenfolge.	27
3.10	Relativer (<i>rel.</i>) und absoluter (<i>abs.</i>) Anteil an Lösungen in der Kulturbrühe.	31
3.11	Exemplarische Berechnungen nach Gl. (3.1) bis Gl. (3.3) des Zusatzvolumens von Aminosäuren zum Mediumvolumen im Batch-Verfahren.	32
3.12	Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Batch-Verfahren.	33
3.13	Gesetzte Prozessparameter zur B080-Batch-Kultivierung im MTP-Format im <i>Multitron Pro</i> Schüttelinkubator der Fa. <i>Infors HT</i>	34
3.14	Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B117-Stammes im Batch-Verfahren.	34
3.15	Gesetzte Prozessparameter zur B117-Batch-Kultivierung im MTP-Format im <i>Multitron Pro</i> Schüttelinkubator der Fa. <i>Infors HT</i>	35
3.16	Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Fed-Batch-Verfahren.	36
3.17	Relativer (<i>rel.</i>) und absoluter (<i>abs.</i>) Anteil an Lösungen in der Fed-Batch-Kulturbrühe.	36
3.18	Gesetzte Prozessparameter zur B080-Fed-Batch-Kultivierung im MTP-Format im <i>Multitron Pro</i> Schüttelinkubator der Fa. <i>Infors HT</i>	37
3.19	Reduzierte Glycerol- und Glucosekonzentrationen für die Fermentationsmedien im 1-Liter-Maßstab.	38
3.20	Endkonzentrationen der Komponente im Feedmedium zur Kultivierung des B080 und B117-Stammes im Fed-Batch-Verfahren.	39
3.21	Gesetzte Prozessparameter für den B080- und B117-Stamm zur Kultivierung im Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Fermenter.	39
3.22	Verwendete Prozessparameter der exponentiellen Zufütteraten.	40
3.23	Übersicht der durchgeführten Analytik.	41
3.24	Equipment und Verbrauchsmaterial zur Probenahme und Vorlage in spezifische Analytikmatrix.	42
3.25	Equipment zur Durchführung der Abzentrifugation der Zellsuspension.	44
3.26	Material zur Bestimmung der optischen Dichte von Vorkulturen.	45

3.27	Material zur Bestimmung der optischen Dichte im MP-Format.	45
3.28	Material zur Durchführung der chemischen Zellyse.	49
3.29	Übersicht der verwendeten Verdünnungsfaktoren (VF) und entsprechenden Pipettiervolumina zur Vorbereitung der SDS-PAGE-Proben.	50
3.30	Verwendete Chemikalien für die SDS-PAGE.	50
3.31	Verwendete Proteinstandards und Marker.	51
3.32	Verwendetes Equipment zur unmittelbaren Probenvorbereitung zur SDS-PAGE.	51
3.33	Verwendetes Equipment zur Durchführung der SDS-PAGE.	52
3.34	Verwendetes Equipment zur pH-Messung im MTP-Format.	54
4.1	Übersicht der durchgeführten Fermentationen mit dem B080-Stamm.	55
4.2	Übersicht der durchgeführten Fermentationen mit dem B117-Stamm.	56
4.3	Charakteristische Merkmale der Versuche V02 bis V06 im Batch-Verfahren zur Expressionsuntersuchung.	58
4.4	V04 – Gegenüberstellung von pH- und den erreichten OD ₆₀₀ -Werten zum Fermentationsende.	64
4.5	Aminosäurekomponenten der Klassifizierungen nach Lederberg [20].	65
4.6	V05 – Gegenüberstellung von pH- und den erreichten OD ₆₀₀ -Werten zum Fermentationsende.	67
4.7	Eingesetzte Glucosekonzentrationen, FeedBead-Kombinationen und resultierende Messwerte zur Erprobung des Fed-Batch-Verfahrens (OD _{EoF} aufsteigend sortiert).	72
4.8	Charakteristische Merkmale der Versuche V08 und V09 im Fed-Batch-Verfahren zur Expressionsuntersuchung.	73
4.9	Eingesetzte Aminosäuren und Konzentrationen der 1-Liter-Fermentationen mit B080-Stamm.	78
4.10	Startzeitpunktangaben für die Prozessphasen der Fermentationen V16 bis V18.	79
4.11	Generierte maximale B080-Proteinkonzentrationen zu spezifischen Fermentationszeiten.	81
4.12	Verwendete Aminosäuren und Konzentrationen für die Versuche V10 bis V12.	84
4.13	Verwendete Leucinkonzentrationen für Versuche V13 und V14 und resultierende OD _{Ind} -Werte nach 8 h Fermentation im MTP-Format.	87
4.14	Verwendete Leucinkonzentrationen für die Fed-Batch-Fermentation V15.	92

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
Ala	L-Alanin
Arg	L-Arginin
Art.Nr.	Artikelnummer
AS	Aminosäure(n)
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
c	Massenkonzentration [g L^{-1}]
c_0	Ausgangskonzentration [g L^{-1}]
c_{ASi}	individuelle Aminosäurekonzentration [g L^{-1}]
c_{P}	Zielproteinkonzentration [g L^{-1}]
$c_{\text{ASi},0}$	individuelle Aminosäurekonzentration der Stammlösung [g L^{-1}]
c_{Leu}	Leucinkonzentration [g L^{-1}]
c_{SR1}	Substratkonzentration in der Vorlage [g L^{-1}]
c_{XL}	Zellkonzentration [g L^{-1}]
c_{XL1}	Zellkonzentration zu Beginn der Zufütterung [g L^{-1}]
C	Stoffmengenkonzentration [mol L^{-1}]
C_{ASi}	individuelle Aminosäurekonzentration [mol L^{-1}]
Cys	L-Cystein
d	Schichtdicke des durchstrahlten Körpers [cm]
DTT	Dithiothreitol
DWP	<i>Deepwell Plate</i>
ϵ	Extinktionskoeffizient [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
E	Extinktion [-]
EAS	essentielle Aminosäuren für heterotrophe Organismen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titrplex II)
el.	elektronisch
EMP	Embden-Meyerhof-Parna
EoF	<i>End of Fermentation</i>
ePTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
F	Kraft
Fa.	Firma
FB	FeedBead
FG _{FB6}	freigesetzte Glucose von 6 mm Feedbead [mg FeedBead ⁻¹]
FG _{FB12}	freigesetzte Glucose von 12 mm Feedbead [mg FeedBead ⁻¹]
FM	Fermentationsmedium
F _R	Zufütterungsrate [L h ⁻¹]
F _{R1,0}	Startwert der Zufütterungsrate [L h ⁻¹]
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	L-Glycin
His	L-Histidin
I	Intensität [-]
I ₀	Ausgangsintensität [-]
Ind.	Induktion
Ino.	Inokulation
IB	<i>Inclusion Body</i>
Ile	L-Isoleucin, essentielle Aminosäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa	Kilodalton
KF	Korrelationsfaktor

λ	Wellenlänge [nm]
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Leu	L-Leucin, essentielle Aminosäure
Lsg.	Lösung
Lys	L-Lysin, essentielle Aminosäure
max.	maximal
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Met	L-Methionin, essentielle Aminosäure
min.	minimal
MP	<i>Microplate</i>
MTP	<i>Microtiter Plate</i>
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_w	Wachstumsrate während der Fed-Batch-Phase [h^{-1}]
n	Anzahl
n_{AS}	Anzahl an Aminosäuren
n_{FB}	Anzahl an FeedBeads
N_{St}	Rührerdrehzahl [rpm]
Na-EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex III)
OD	optische Dichte [-], entspricht OD_{600}
OD_0	Anfangs-OD [-]
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm [-]
OD_{Blank}	Leerwert [-]
OD_{EoF}	optische Dichte zum Fermentationsende [-]
OD_{Ind}	Induktions-OD [-]
OD_{M}	Messwert der ermittelten optischen Dichte einer Suspension [-]
OD_{S}	optische Dichte einer Suspension [-]
OD_{VK}	optische Dichte der Vorkultur
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	proteinogene Aminosäuren

Phe	L-Phenylalanin, essentielle Aminosäure
pI	Isoelektrischer Punkt
pO ₂	relativer Sauerstoffpartialdruck [%]
PP	Polypropylen
Pro	L-Prolin
RCB	<i>Research Cell Bank</i>
rel.	relativ
RHB	Richter-Helm BioLogics
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung [g]
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	L-Serin
SP1	Solubilisierungspuffer
t	Zeit [h]
t _{VK}	Inkubationszeit der Vorkultur [h]
t _{Ind}	Induktionszeitpunkt [h]
T	Temperatur [°C]
T _L	Temperatur der Flüssigphase [°C]
TCA	Citronensäurezyklus (<i>Tricarboxylic acid</i>)
Thr	L-Threonin, essentielle Aminosäure
Trp	L-Tryptophan, essentielle Aminosäure
Typbez.	Typbezeichnung
Tyr	L-Tyrosin
USP	<i>Upstream Processing</i>
V	Volumen [L]
V _{AS}	Volumen der Aminosäurelösung [μL]
V _{ASi}	individuelles Volumen der Aminosäure [μL]
V _{Batch/Fed-Batch}	Volumen des Batch-/Fed-Batch-Ansatzes im MTP-Format [μL]

V_{FM}	Volumen des Fermentationsmediums [μL]
V_{L1}	Volumen der Flüssigphase zu Beginn der Zufütterung [L]
Val	L-Valin, essentielle Aminosäure
VF	Verdünnungsfaktor [-]
VK	Vorkultur
VKM	Vorkulturmedium
Vol.-%	Volumenprozent
WCB	<i>Working Cell Bank</i>
$Y_{X/S}$	substratspezifischer Ausbeutekoeffizient [g g^{-1}]

1 Einleitung

Die Entwicklung von Prozessen in der Biotechnologie, wie zum Beispiel zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, zeichnet sich durch aufeinander folgende Grundoperationen aus. Eine erste grobe Einteilung erfolgt in *Upstream Processing* (USP) und *Downstream Processing* (DSP). Der USP beschäftigt sich mit dem Syntheseprozess sowie den dazu notwendigen Vorbereitungen, während der DSP alle folgenden Schritte von der Abtrennung der Biomasse von der Flüssigphase bis hin zur Aufreinigung des Zellproduktes durch chromatographische Methoden oder Filtrationen umfasst.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Prozessentwicklung im Team Stamm- und Fermentationsentwicklung der Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG (RHB) am Standort Hamburg angefertigt. Der USP lässt sich dabei in folgende Punkte unterteilen:

- Produktdefinition
- Stammentwicklung
- Stammauswahl
- Fermentationsentwicklung
- Fermentationsoptimierung und Charakterisierung
- Scale-up in den Pilot- oder Produktionsmaßstab

Angesiedelt ist diese Arbeit im Bereich der Fermentationsentwicklung und -optimierung, welcher die Untersuchung des Einflusses verschiedener biologischer sowie verfahrenstechnischer Parameter auf die Kultivierung des Organismus und das Produkt umfasst. Häufig wird zur Prozessentwicklung wie auch zur Optimierung auf Erfahrungswerte und bestehende Fermentationsmethoden zurückgegriffen. Dennoch können Prozessparameter für verschiedene Organismen und Produkte oftmals nicht einfach übernommen werden, sondern müssen angepasst werden [28]. Einen entscheidenden Einfluss auf den Fermentationsprozess hat dabei das verwendete Kultivierungsmedium. Über dieses müssen der Zelle alle für das Zellwachstum und die Produktbildung essentiellen Bestandteile zur Verfügung gestellt werden.

Der Kultivierungsorganismus *E. coli* ist als Wildtyp ein prototropher Organismus und dazu in der Lage, alle notwendigen Aminosäuren für den Stoffwechsel, das Wachstum und die Reproduktion zu synthetisieren. Es existieren jedoch Mutanten, deren Eigenschaft der Prototrophie nicht mehr aktiv ist. Sie sind auxotroph und haben redundante und essentielle Biosynthesewege deaktiviert oder vollständig verloren. Zur Kultivierung ist es daher notwendig, die Aminosäuren dem Medium zuzuführen. Darüber hinaus stellen L-Aminosäuren Wachstumsfaktoren dar, die auch bei prototrophen Organismen

zur Förderung des Zellwachstums und der Produktbildung dem Kultivierungsmedium zugesetzt werden. [11]

Da der Arbeitsaufwand für ein systematisches Medienscreening relativ hoch und damit mit höheren Entwicklungskosten verbunden ist, wird in der Fermentationsentwicklung häufig mit undefinierten Komplettnährmedien gearbeitet. Besonders bei anspruchsvollen Mikroorganismen, beabsichtigten hohen Wachstumsraten, aber auch bei unzureichendem Wissen bezüglich Nährstoffbedarf, werden diese Medien genutzt. Unter anderem gelangen durch Peptone oder Hefeextrakte organische Komplexbestandteile wie wasserlösliche Vitamine, Spurenelemente, Stickstoffquellen, Purin- und Pyrimidinbasen sowie auch andere Wachstumsfaktoren in Form von Aminosäuren, in chargenabhängiger Qualität und Konzentration, in das Medium. [3]

Die Variabilität dieser zugesetzten Nährstoffe hat Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit des Prozesses und damit auf die Prozessausbeute und Produktqualität. Vor allem bei biotechnologisch hergestellten Wirkstoffen ist eine konstante Beschaffenheit der eingesetzten Rohstoffe wichtig, um eine gleichbleibend hohe Qualität sicherzustellen. Synthetische Medien weisen dafür exakt definierte Bestandteile auf, die je nach Organismus hinzugesetzt werden müssen. Neben Spurenelementen, Stickstoffquellen und Vitaminen sind es Aminosäuren, die eine unterstützende oder essentielle Funktion auf die Stoffwechselprozesse ausüben.

1.1 Zielsetzung der Bachelorarbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen von Aminosäurezusätzen in Minimalmedien auf ein auxotrophes und ein prototrophes *E. coli*-Derivat zu untersuchen. Dafür werden insbesondere das Zellwachstum und die Produktbildung näher analysiert. Um eine systematische Untersuchung zu realisieren sollen die Versuche im Mikrotiterplattenformat durchgeführt und die Möglichkeiten und Limitierungen dieses Formates aufgezeigt werden.

Die systematische Untersuchung im Mikrotiterplattenformat bietet die Möglichkeit, einen großen Datensatz analytischer Ergebnisse in kurzer Zeit zu generieren. Ein hoher experimenteller Durchsatz ist möglich. Dadurch können verschiedenste Aminosäuren und unterschiedliche Konzentrationen näher untersucht werden.

Zum Abschluss der Arbeiten sollte zusätzlich eine kurze Studie zur Übertragbarkeit der Mikrotiterplattenergebnisse in den 1-Liter-Maßstab durchgeführt werden.

2 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für die durchgeführten Versuche und Prozessschritte erläutert. Im Allgemeinen wird der Kultivierungsorganismus, die Aminosäuren, das Fermentationsprinzip mit Prozessführung sowie die Hintergründe der Analytik vorgestellt. Weitere Vertiefungen sind in Kapitel 3 *Material und Methoden* zum direkten Verständnis aufgeführt.

2.1 Kultivierungsorganismus *E. coli*

Bei den durchgeführten Fermentationen wird mit dem Kultivierungsorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*) gearbeitet. 1885 entdeckte Theodor Escherich dieses gram-negative, neutrophile, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe, nicht sporulierende Enterobakterium [12]. *E. coli* entwickelte sich zum bekanntesten bakteriellen Modellorganismus und ist in der biotechnologischen Produktion sowie in der Laborarbeit fest etabliert [26].

Neben dem bekanntesten Laborstamm *E. coli* K12 ist der B-Stamm ein ebenso weit verbreiteter Kultivierungsorganismus, dessen Genom vollständig sequenziert ist [16]. Zwei Derivate des *E. coli* BL21 sind in dieser Arbeit als Kultivierungs- und Expressionsorganismus verwendet. Sie unterscheiden sich im Plasmid und dem implementierten Expressionssystem. Eines der verwendeten BL21-Derivate kennzeichnet sich durch die genomisch integrierte T7 Expressionskassette aus und ist mit einem pET26b-Plasmid transformiert worden, welche die genomische Information des Zielproteins trägt. Die Induktion erfolgt über Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (*IPTG*). Nach RHB interner Nomenklatur wird dieser Stamm als RHBT7wt::pET26b_B117 bezeichnet. Der Einfachheit halber wird er in dieser Arbeit als *B117-Stamm* und dessen Zielproteinprodukt als *B117* bezeichnet.

Ein weiterer BL21-Stamm trägt einen hitzeinduzierbaren pHIP-Vektor und wird als BL21::pHIP_B080 geführt. Analog wird der Stamm innerhalb dieser Arbeit als *B080-Stamm* mit dem zu exprimierenden Protein *B080* bezeichnet. Die verwendeten Medien werden ebenfalls alternativ B080- oder B117-Medium genannt.

2.2 Aminosäuren

Aminosäuren sind Aminoderivate von Carbonsäuren, welche die Bestandteile von jeglichen Peptiden und damit auch von Proteinen bilden. Alle Organismen benötigen den

gleichen Standardsatz dieser 20 proteinogenen Aminosäuren (*PAS*) – die sogenannten kanonischen Aminosäuren – für den Aufbau langkettiger Proteinmoleküle. Trotz der begrenzten Zahl an Aminosäuren ist eine Vielzahl von Kombinationen und Wiederholungen möglich [2, 13]. Im Stoffwechsel von Bakterien tragen sie eine hohe Bedeutung und sind in der Herstellung von biotechnologischem Interesse [23].

In Abb. 2.1 ist ein Auszug der Stoffwechselwege mit Beteiligung von Aminosäuren für den Kultivierungsorganismus *E. coli* aufgeführt. Alle Synthesewege sind für den prototrophen Wildtyp erschließbar. In der Abbildung stehen die blauen Pfeile für die Biosynthesewege der Aminosäuren. Zusätzlich ist die Glykolyse (*EMP pathway*), die anaplerotische, citratzyklus-ergänzende Reaktion (*anapleurotic reaction*) und der Citratzyklus selber (*TCA cycle*) dargestellt. Außerdem wird der Pentosephosphatweg (*pentose phosphat pathway*) stark vereinfacht aufgeführt. Vorprodukte zur Aminosäuresynthese sind in den Stoffwechselwegen kenntlich gemacht [1].

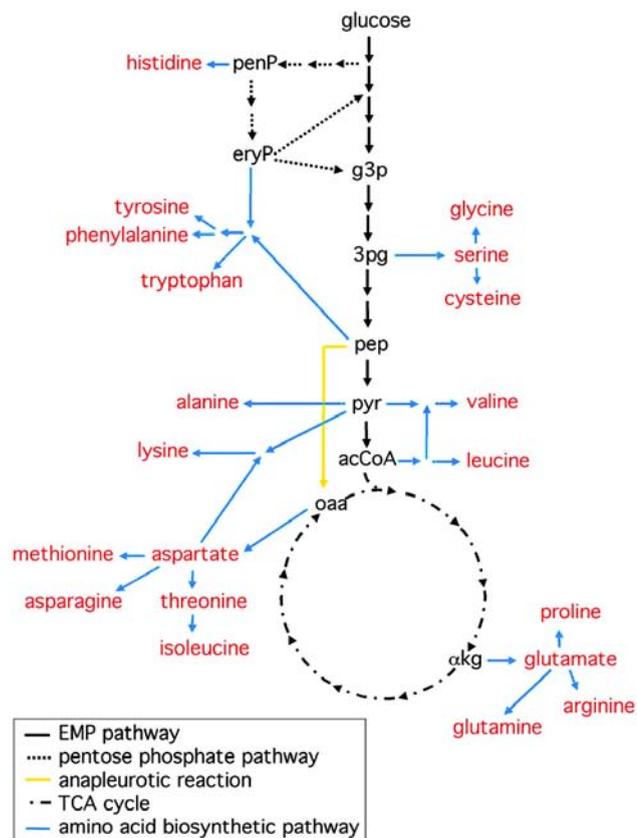


Abb. 2.1: Auszug aus den Stoffwechsel- und Biosynthesewegen von Aminosäuren in *Escherichia coli* [1].

In den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit werden Aminosäuren mit dem Ziel der Unterstützung des Zellwachstums und der Proteinbildung zugesetzt. Sie sind strukturelle Bestandteile des Organismus und können, je nach verwendetem Stamm, selber synthetisiert werden und eine unterstützende, jedoch nicht zwingend essentielle Funktion besitzen [3].

2.3 Fermentationsprinzip

In dieser Arbeit werden zwei Fermentationsprinzipien in Abhängigkeit des Maßstabes angewendet. Die Kultivierung in Mikrotiterplatten umfasst sowohl das Batch- als auch das Fed-Batch-Verfahren. Fermentationen im 1-Liter-Maßstab werden stets als Fed-Batch-Prozess durchgeführt. Da es sich um zwei grundlegend verschiedene Maßstäbe mit unterschiedlichen Möglichkeiten handelt, bedarf es der separaten Betrachtung der theoretischen Hintergründe.

2.3.1 Batch-Betrieb

Die Kultivierung als Batch-Verfahren bezeichnet einen Chargen- oder auch Satzbetrieb, sodass nur vorgelegte Substrate nach der Inokulation verbraucht werden [26]. Charakteristisch ist, dass sich mit der Fermentationszeit und fortschreitendem Wachstum die Konzentrationen von Zellen, Produkt und Nährstoffen ändert. Der Kulturbrühe wird laut Definition nichts mehr zu- oder abgeführt [6]. Im Mikrotiterplattenformat – in welchem das Batch-Verfahren durchgeführt wird – gilt jedoch, dass zur Offlineprozessüberwachung ein Probevolumen kontinuierlich abgenommen wird, welches das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (A/V-Verhältnis) verkleinert. Konzentrationsverhältnisse werden nicht verändert, da bei Probenahme von einer homogenen Kulturbrühe auszugehen ist. Mit anhaltender Fermentationszeit steigen im Idealfall die Zell- und nach Induktion die Produktkonzentration. Während sich die Nährstoffkonzentration entgegengesetzt verhält.

2.3.2 Fed-Batch-Betrieb

Das Fed-Batch-Verfahren zeichnet sich im Gegensatz zum Batch-Verfahren durch eine Nachfütterung von Substrat aus. Im Allgemeinen wird dieses über die Zugabe von hochkonzentrierten, flüssigen Nährmedien – für *E. coli* meist Zuckerlösungen – realisiert, wodurch sich das Volumen der Kulturbrühe erhöht. Dieses Verfahren ist jedoch nicht beliebig miniaturisierbar.

Mikrotiterplattenfermentation im Fed-Batch-Betrieb

Im Mikrotiterplattenformat kann keine kontinuierliche Zufütterung von Zuckerlösung in das System erfolgen. Um dieses Problem zu umgehen, werden sogenannte *FeedBeads* der Fa. *Kühner* angeboten. Es handelt sich um *Slow Release Discs*, Polymerpartikel, die aus Glucose bestehen, welches in eine Silikonmatrix eingebunden ist. Mit einer definierten Kinetik wird Substrat freigesetzt [18].

Zur Verfügung stehen zwei unterschiedliche Größen von FeedBeads mit 6 mm und 12 mm Durchmesser. In Abhängigkeit ihrer Größe, geben die FeedBeads eine unterschiedliche Menge an Glucose über die Zeit in das Medium ab. Der Hersteller sichert die in Abb. 2.2 aufgezeigten Abgabemengen des kristallinen Stoffes zu, welche sich durch die Gl. (2.1) und Gl. (2.2) darstellen lassen.

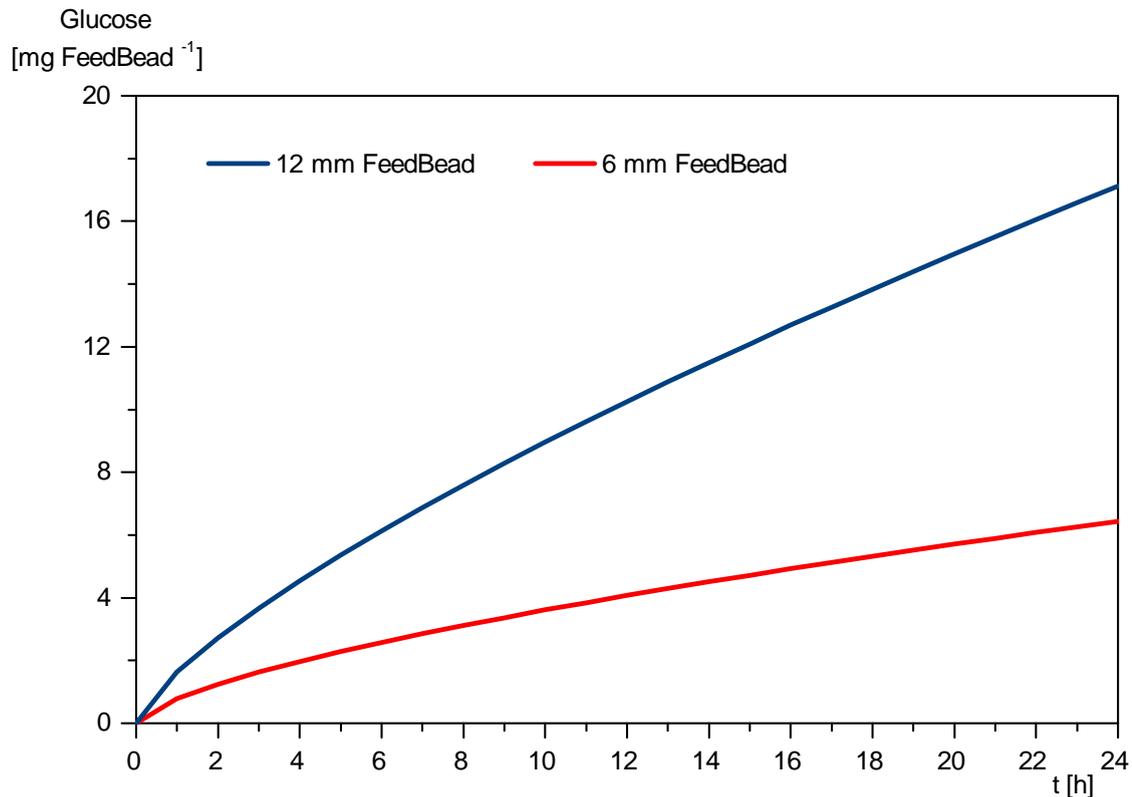


Abb. 2.2: Freigesetzte Glucosemenge pro FeedBead in Abhängigkeit des Durchmessers, nach [17]. Prozessbedingungen: 0.1 M Phosphatpuffer, pH=7.0, 37 °C.

Die freigesetzte Glucose FG_{FB6} ,

$$FG_{FB6}(t) = n \cdot 0.79 \cdot t^{0.66}, \quad (2.1)$$

ergibt sich aus der Fermentationszeit t und der verwendeten Anzahl an n eingesetzten 6 mm FeedBeads [18]. Nach 24 Stunden sind unter den in Abb. 2.2 gegebenen Bedingungen 6.4 mg Glucose aus der Silikonmembran gelöst worden.

Analog wird die freigesetzte Glucose FG_{FB12} ,

$$FG_{FB12}(t) = n \cdot 1.63 \cdot t^{0.74}, \quad (2.2)$$

für die eingesetzten 12 mm FeedBeads berechnet [18]. Nach 24 Stunden ergibt sich eine freigesetzte Glucosemenge von 17.1 mg.

In Abhängigkeit der zugesetzten FeedBeads werden die Bakterien mit Substrat versorgt. Dadurch lassen sich substratlimitierte Fed-Batch Prozesse bei ausreichender Sauerstoffversorgung in MTPs realisieren.

1-Liter-Fermentation im Fed-Batch-Betrieb

Im 1-Liter-Maßstab sind alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen als Fed-Batch-Prozess angelegt. Die Fermentation lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Zunächst wird eine bestimmte Substratmenge vorgelegt und mit einer Batch-Phase begonnen. In der Batch-Phase können sich die Bakterien mit maximaler Wachstumsrate μ_{\max} vermehren, solange eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt ist. Nach dem Verbrauch der primären C-Quelle steigt der pO_2 -Wert an, die Nachfütterungsphase und damit zweite Prozessphase beginnt. Unter ausreichender Sauerstoffversorgung wird die C-Quelle substratlimitiert zugefüttert. So kann die Bildung unerwünschter Nebenprodukte wie z.B. Acetat unterbunden, eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt und höhere Zelldichten als im Batch-Verfahren erreicht werden [6, 26].

In allen durchgeführten Fed-Batch-Fermentationen im 1-Liter-Fermenter wird zu Beginn der Zufütterphase ein exponentielles Zufütterungsprofil zur Steuerung der zellspezifischen Wachstumsrate verwendet. Die zeitvariante Zufütterungsrate F_R ,

$$F_R(t) = F_{R1,0} \cdot e^{\mu_w(t-t_1)}, \quad (2.3)$$

wird über die Zufütterungsrate zum Beginn der Zufütterung, $F_{R1,0}$, und die Exponentialfunktion der während der Fed-Batch-Phase gewünschten Wachstumsrate μ_w berechnet. Dabei ist der Zeitpunkt des Zufütterstarts t_1 von der Prozesszeit t zu subtrahieren.

Der Startwert der Zufütterungsrate $F_{R1,0}$,

$$F_{R1,0} = \frac{\mu_w \cdot V_{L1} \cdot c_{XL1}}{Y_{X/S} \cdot c_{SR}}, \quad (2.4)$$

wird durch den Quotienten der Produkte von gewünschter Wachstumsrate μ_w , Kulturvolumen V_{L1} und Zellkonzentration c_{XL1} zu Beginn der Zufütterung sowie dem substratspezifischen Ausbeutekoeffizienten des Substrates $Y_{X/S}$ und der Konzentration der C-Quelle in der Substratvorlage c_{SR} – hier Glycerin bzw. Glucose – bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Aminosäuren zusammen mit der C-Quelle zugeführt. Somit sind die Zufütterprofile von C-Quelle und AS identisch.

2.4 Messtechnik und Analytik

2.4.1 Optische Dichte

Die optische Dichte von Zellkulturen wird durch eine photometrische Messung, standardmäßig bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}), bestimmt. Es handelt sich um eine Trübungsmessung, bei der die Extinktion gemessen wird [15]. Die Extinktion E ,

$$E = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot C \cdot d, \quad (2.5)$$

wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus dem Logarithmus der Ausgangsintensität (I_0) zur gemessenen Intensität (I) gebildet. Neben der Stoffmengenkonzentration C und dem Extinktionskoeffizienten ϵ , ist die Extinktion abhängig von der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, dessen Bedeutung bei den angewandten Messmethoden dieser Arbeit wichtig ist.

Die optische Dichte einer Suspension, OD_S ,

$$OD_S = VF \cdot (OD_M - OD_{Blank}), \quad (2.6)$$

wird durch die Multiplikation der Differenz zwischen Messwert der ermittelten optischen Dichte, OD_M , und Leerwert, OD_{Blank} , und dem Verdünnungsfaktor VF berechnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wird jede Suspension doppelt vermessen. Das arithmetische Mittel der optischen Dichte \overline{OD}_S ,

$$\overline{OD}_S = \frac{OD_{S,A1} + OD_{S,A2}}{2}, \quad (2.7)$$

wird durch zwei Messwerte $A1$ und $A2$ einer Suspensionen gebildet. Im Zuge dieser Arbeit erfolgt die Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension bei 600 nm, somit gilt $\overline{OD}_S \stackrel{!}{=} OD_{600} \stackrel{!}{=} OD$.

2.4.2 Zellaufschluss

Die verwendeten *E. coli*-Stämme exprimieren ihr spezifisches Zielprotein cytosolisch. Um die Proteine zur Analyse zu isolieren, muss der Organismus lysiert werden. Neben dem biologischen Aufschluss, z.B. durch Enzyme wie Lysozym oder Proteinase K, und physikalischen Aufschlussmethoden, wie z.B. ein mechanischer Ultraschallaufschluss, existieren auch chemische Methoden.

Es können Detergenzien wie Triton-X, Guanidinhydrochlorid oder SDS, Chelatbildner wie EDTA sowie Antibiotika wie Penicillin verwendet werden. Ebenso ist der Einsatz

hochmolarer chaotroper Reagenzien möglich. Innerhalb dieser Arbeit wird Harnstoff als chemisches Zellaufschlussreagenz verwendet. Die nichtionische Verbindung hat wie andere chaotrope Reagenzien die Eigenschaft, die Grundordnung der Wassermoleküle zu zerstören und die Löslichkeit unpolarer Substanzen zu erhöhen. Durch den Effekt der Solvatisierung von unpolaren Gruppen im Zentrum von Proteinen, werden die hydrophoben Wechselwirkungen reduziert, das Protein verliert seine native Konformation. Da die Zellwand von Bakterien u.a. aus hydrophoben Substanzen wie Membranproteinen besteht, die durch das hochkonzentrierte chaotrope Reagenz denaturiert werden, stellt die Zugabe von hochkonzentrierten Harnstofflösungen eine effektive Methode zum Zellaufschluss dar. [13, 26]

2.4.3 SDS-PAGE

Zur Quantifizierung der Zielproteine wird eine reduzierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. In einem unter Spannung gesetzten Polyacrylamidgel werden die Proteine dazu anhand ihrer Größe getrennt. Um diese Trennung in Richtung der Kathode zu vollziehen, werden die Nettoladungen der Polypeptide bei der Probenvorbereitung durch eine einheitliche negative Ladung überdeckt. Im Probenpuffer ist dazu Natriumdodecylsulfat als ionische Detergenz vorhanden. Lithiumdodecylsulfat (LDS) wird u.a. ebenso verwendet. Der Puffer enthält des Weiteren Tris-HCl, Bromphenolblau, Glycerin und eine Thiolverbindung als zusätzliche Komponenten. Tris-HCl sorgt während der Trennung für einen stabilen pH-Wert, Bromphenolblau ist ein niedermolekularer Farbmaler, der das Ende der PAGE erkennen lässt, da er als erstes an der Kathode angelangt. Glycerin dient unterdessen als Probenbeschwerer zur Erleichterung des Einpipettierens in die Geltaschen. Die Thiolverbindung sorgt für eine Reduzierung der Disulfidbrücken zur Trennung der Cystein-Reste der Proteine. Dazu werden Substanzen wie DTT oder β -Mercaptoethanol eingesetzt.

Die Polyacrylamidgele bestehen aus einem kurzen großporigen Sammelgel und einem langen kleinporigen Trenngel (diskontinuierliche PAGE). Die geringere Ladungsdichte im Sammelgel führt zu einem schnellen Durchlaufen der Proteine, die sich an der Grenze zum Trenngel aufkonzentrieren. Das engporige Trenngel weist eine höhere Ladungsdichte als das Sammelgel auf, die Proteine wandern langsam durch das Gel und werden anhand ihrer Größe aufgetrennt. Hochmolekulare Moleküle werden durch die dichten und kleinen Poren stärker zurückgehalten als niedermolekulare. Die Porengröße wird durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad der Acrylamid-Monomere bestimmt. Je größer die Konzentration desto kleiner sind die Poren.

Nach der Trennung werden die Proteine angefärbt. Mit einem Triphenylmethanfarbstoff wie Coomassie-Brilliant-Blau gelingt das Sichtbarmachen von Proteinbanden, indem sich der Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren haftet. [15, 27]

3 Material und Methoden

Nach der Einführung in die theoretischen Grundlagen und Hintergründe der durchgeführten Arbeit werden im Folgenden die Methoden und Materialien für die Versuchssystematik (3.1), die Kultivierungsvorgänge (3.2 und 3.3) und die Analytik (3.5) erläutert.

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, lässt sich jeder Versuchsdurchlauf in die Teilprozesse USP und Analytik unterteilen. Im späteren Verlauf dieses Kapitels wird auf die genauen Fermentationsdurchführungen und Bedingungen eingegangen. Das Prinzip der Vorkultivierung und anschließender Inokulation zur Hauptkultur (3.1 *Versuchssystematik*) wird dabei stets beibehalten.

Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien in Vorkultur erfolgt dabei im Schüttelkolben (3.2 *Vorkultivierung*), die anschließenden Hauptfermentationen werden in 24-Well-Mikrotiterplatten (3.3 *Mikrotiterplattenfermentation*) oder im 1-Liter-Fermenter (3.4 *1-Liter-Fermentation*) durchgeführt.

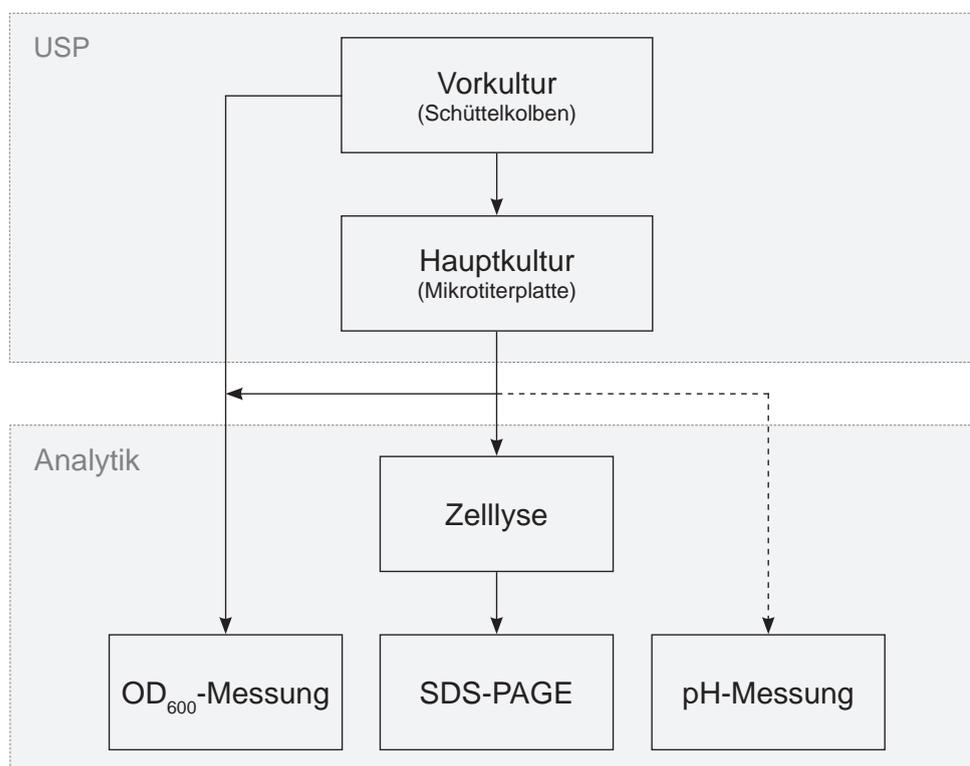


Abb. 3.1: Darstellung der Teilprozesse jedes Versuchslaufes im USP und der Analytik.

Es werden drei analytische Methoden eingesetzt (3.5 *Messtechnik und Analytik*), um die entsprechenden Fermentationen zu bewerten und zu vergleichen. Während für die Vorkultur lediglich unmittelbar vor Transfer in die Hauptkultur eine Probe zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen wird, werden alle drei analytische Verfahren für die Hauptkultur eingesetzt.

Zum einen wird die optische Dichte, zur Beobachtung des Zellwachstums während der Fermentationsprozesse, bestimmt (3.5.2 *Optische Dichte*). Zum anderen erfolgt eine Quantifizierung des Zielproteins mittels SDS-PAGE. Da das Zielprotein von den verwendeten *E. coli*-Derivaten nicht sekretiert wird, muss zunächst eine Zellyse durchgeführt werden. Anschließend können die cytosolisch exprimierten Proteine analysiert werden (3.5.3 *Chemische Zellyse und SDS-PAGE*).

Die zusätzliche pH-Messung wird bei Bedarf zum Ende einer Kultivierung durchgeführt (3.5.4 *pH-Wert*) und ist in Abb. 3.1 durch einen perforierten Verlauf gekennzeichnet. Der pH-Wert gibt Hinweise darüber, ob das Bakterium Säure produziert hat. Ein Indiz für Stoffwechselprozesse bedingt durch ein Überangebot an Nährstoffen oder sauerstofflimitierte Prozessphasen. In den durchgeführten Mikrotiterplattenfermentationen ist im laufenden Prozess keine Messung und demnach auch keine Korrektur möglich, womit Wachstums- und Expressionslimitierungen in Kauf genommen werden müssen.

3.1 Versuchssystematik

Das Aminosäurescreening unterliegt in seiner Durchführung einer bestimmten systematischen Strategie, zunächst unabhängig vom zu kultivierenden *E. coli*-Derivat und dessen Eigenschaften. Die geplante und umgesetzte Versuchsstrategie des Screenings ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt.

Jeder einzelne Versuchslauf, unabhängig ob im Batch- oder Fed-Batch-Verfahren, beginnt mit dem Ansetzen einer Vorkultur im Schüttelkolben. Diese Zellen dienen als Inokulum für die Hauptfermentationen im MTP-Format, welches eine Vielzahl an Variationen zulässt und somit ein effektives Screening ermöglicht.

Ein Screening beginnt mit ersten Versuchen im *Batch-Verfahren*, die zur Orientierung und weiteren Versuchsplanung herangezogen werden. Bereits hier können sich die Einflüsse von einzelnen Aminosäuren und/oder deren Kombinationen auf das Wachstumsverhalten und/oder die Produktbildung zeigen.

Einzelne Teilversuche sind stets abhängig von vorherigen Versuchsergebnissen und dessen Auswertung und bauen deshalb immer aufeinander auf. Im Idealfall erzeugen sie zusammen ein eindeutiges Ergebnis, das den positiven Einfluss einer Aminosäure mit einer spezifischen Konzentration aufzeigt. Diese Aminosäure gilt dann als positiver Wachstums- und/oder Produktbildungsfaktor.

Alle Zwischenversuche auf dem Weg zur Identifizierung tragen zu der Entscheidung bei, ob die aktuelle Strategie weiter verfolgt, ein *Fed-Batch-Verfahren* eingeführt wird, bereits ein *Scale-up* erfolgen kann (Fed-Batch-Verfahren im 1-L-Maßstab) oder das Screening ergebnislos ist.

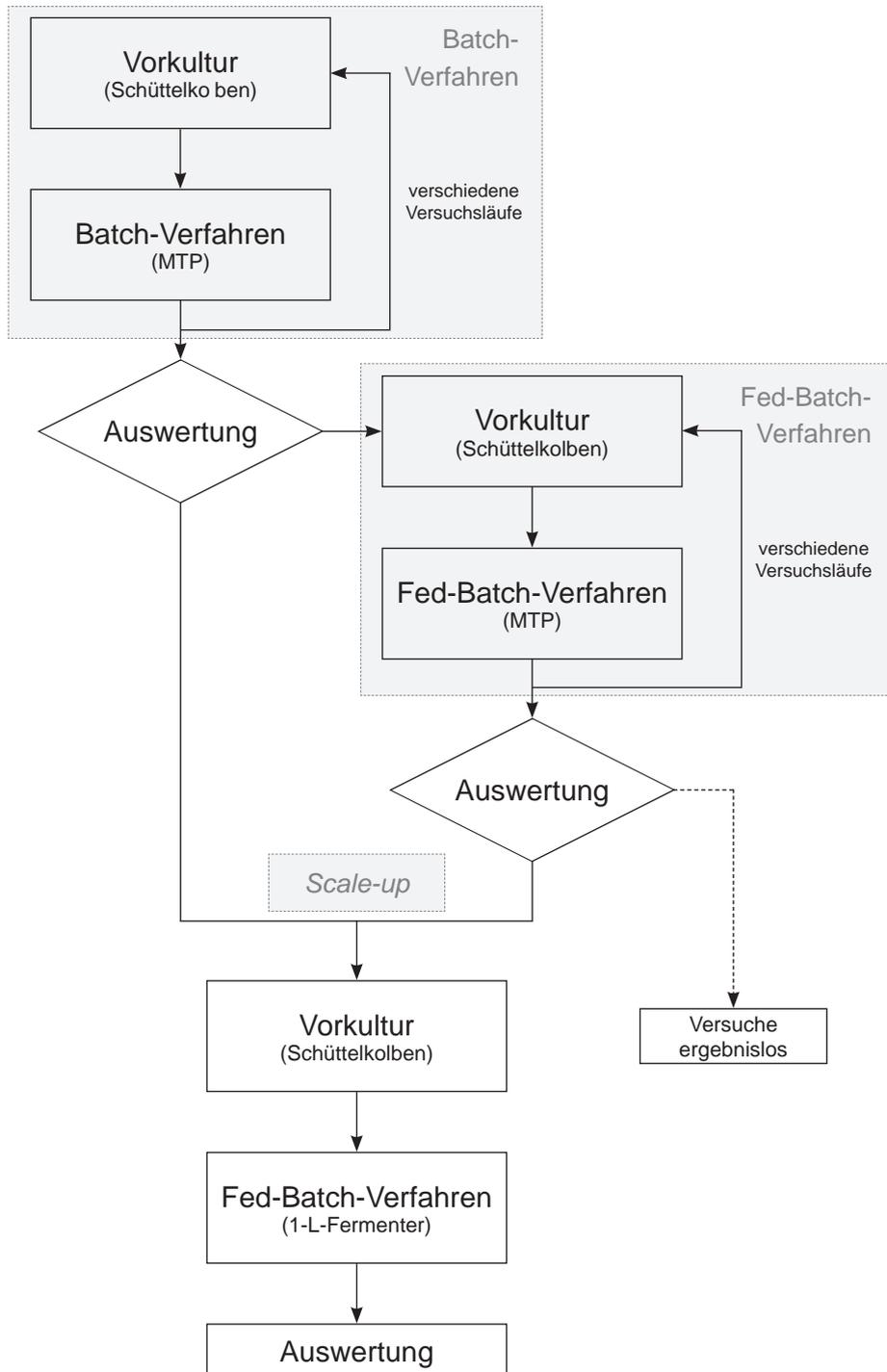


Abb. 3.2: Entscheidungsbaum für das systematische Aminosäurescreening.

3.2 Vorkultivierung

Für die Vorkulturen (VK) werden die Vorkulturmedien (Absatz *Vorkulturmedium-B080* und *Vorkulturmedium-B117*) mit dem entsprechenden *E. coli* B080- bzw. B117-Stamm im Verhältnis 1:1000 inokuliert. Alle verwendeten Bakterienstämme werden als Kryokulturen in Zellbankröhrchen (*CryoPure*, Fa. *Sarstedt*) mit Glycerinmedium bei -80°C gelagert. Der B080-Stamm wird aus einer *Working Cell Bank* (WCB), der B117-Stamm aus einer *Research Cell Bank* (RCB) entnommen.

Die 100 mL Schikanekolben der Fa. *Duran* vom Typ 1267659 aus Glas werden über Nacht bei den spezifischen Parametern (s. Tab. 3.1) mit einem Medienvolumen von 10 ml und dem Inokulum inkubiert. Morgens wird die Kultur in die MTPs überführt (3.3 *Mikrotiterplattenfermentation*). Die durchschnittliche Inkubationszeit über Nacht beträgt für den B080-Stamm 13–16 Stunden, mit einer End-OD von meistens 8–11 (Ausnahmen s. 4.1 *Fermentationen mit dem B080-Stamm*). Der B117-Stamm wächst über 14–18 Stunden, gemessen wird eine End-OD von 17–27.

Tab. 3.1: Gesetzte Prozessparameter zur Vorkultivierung im Schüttelinkubator der Fa. *New Brunswick Scientific* (Typ *Innova 4230*).

Prozessparameter	VK B080	VK B117
Temperatur	35.0 °C	37.0 °C
Drehzahl	200 rpm	200 rpm

Identisch sind die spezifischen Parameter für die Vorkulturen zur Inokulation der 1-Liter-Fermenter. Die Vorkulturzeiten ändern sich jedoch hinsichtlich des B117-Stammes mit einer Inkubationszeit von 12 Stunden und einer erreichten OD von 15.4. 75 mL Vorkulturvolumen werden für einen Fermenter angesetzt (500 mL Schikanekolben). Für den B080-Stamm wird ein Vorkulturvolumen von 200 mL in einem 1000 mL Schikanekolben benötigt. Die Inkubationszeit beträgt 13.8 Stunden (OD 6.2).

3.2.1 Vorkulturmedien

Zur Vorkultivierung sind zwei grundverschiedene Medienansätze verwendet worden. Für den B080-Stamm reicht ein Minimalmedium aus, das ausreichend Nährstoffe für ein adäquates Wachstum liefert. Für den B117-Stamm ist ein Komplexmedium notwendig, da auf reduzierten Medien kein Wachstum zu verzeichnen ist.

Zum generellen Ansetzen von Medien sind die in Tab. 3.2 aufgeführten Gerätschaften genutzt worden. Sie gehören zur Grundausstattung aller durchgeführten Ansatzverfahren und sind demnach nicht nur zum Vorkulturmedienansatz notwendig.

Tab. 3.2: Verwendetes Equipment zum Ansatz von Kulturmedien und Zusätzen.

Equipment	Hersteller (Typbez.)	Zweck
Analysenwaage	<i>Mettler Toledo</i> (<i>XSE 205 Dual Range</i>)	Einwaagen
Autoklav	<i>Systec</i> (<i>VX-150 u. 2540 EL</i>)	Autoklavieren von Medien und Utensilien
Magnetrührer	<i>Heidolph</i> (<i>MR 3000 u. 3001</i>)	Ansetzen von Lösungen
pH-Meter	<i>Mettler Toledo</i> (<i>MPC 227</i>)	pH-Wert Einstellung
Pipetboy	<i>IBS Integra Biosciences</i> (<i>Pipetboy acu</i>)	Pipettieren von Medienbestandteilen
Präzisionswaage	<i>Sartorius (Cubis</i> <i>MSE6202S-100-DO)</i>	Einwaagen
Sicherheitswerkbank	<i>Heraeus</i> (<i>HeraSafe HSP12</i>)	Realisierung aseptischer Peripherie
Trockenschrank	<i>Memmert (210133)</i>	Trocknung autoklavierter Utensilien bei 80 °C
Vakuumpumpe	<i>KNF Neuberger</i> (<i>Laboport®</i>)	Sterilfiltration

Vorkulturmedium-B080

Das VKM-B080 ein Minimalmedium mit den in Tab. 3.3 aufgeführten Substanzen. Als Grundlage dient ein Phosphatpuffersystem, Ammoniumsulfat, zugesetzte Spurenelemente, Magnesiumsulfat und Thiaminhydrochlorid als Mikronährstoffe sowie Citronensäure und das Dinatriumsalz von EDTA als organische Additive. Als Makronährstoff und C-Quelle wird Glucose verwendet.

Die Medienbestandteile werden als vier getrennte Lösungen angesetzt, die erst nach jeweiliger Sterilisation zusammengeführt werden. Di-Kaliumhydrogenphosphat, Citronensäure und Ammoniumsulfat werden zusammen in Lösung gebracht, mit 1 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt und bei 121 °C (20 Minuten Haltezeit) autoklaviert. Glucose wird separat gelöst und sterilfiltriert. Ansonsten können beim hitzeintensiven Autoklavieren Karamelisierungsreaktionen stattfinden. Sämtliche Spurenelemente, zusammen mit Titriplex III (EDTA-Dinatriumsalz) und 10-prozentiger Salzsäure, werden ebenso sterilfiltriert und den autoklavierten Bestandteilen im Verhältnis 1:100, zusammen mit Glucose, nach Abkühlung aseptisch zugesetzt.

Eine Besonderheit gilt für Thiaminhydrochlorid, das auch separat angesetzt und sterilfiltriert wird. Thiamin zersetzt sich bei hohen Temperaturen und hat zudem eine geringe Halbwertszeit in gelöster Form, weshalb eine Langzeitlagerung vermieden werden sollte. Um den Zersetzungsprozess zu vermeiden, wird die Thiamin-Lösung

stets erst unmittelbar vor der Vorkultivierung angesetzt. Aus pragmatischen Gründen wird Thiamin zusammen mit Magnesiumsulfat im angesetzten Medium selber gelöst und gemeinsam sterilfiltriert. Es kann für die Vor- und Hauptkultivierung ein gemeinsamer Ansatz hergestellt werden, wodurch Ressourcen geschont werden können.

Vorkulturmedium-B117

Das flüssige VKM-B117 kennzeichnet sich vor allem durch die Bestandteile Hefeextrakt und Soja-Pepton aus (s. Tab 3.3). Dadurch werden dem Medium bestimmte Konzentrationen von Aminosäuren, Peptiden, Purinbasen und Vitaminen zugesetzt. Zudem wird als C-Quelle Glycerol vorgelegt. Mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH wird, nach Zugabe der weiter aufgeführten Komponenten, auf pH 7.0 eingestellt. Bei 121 °C wird die Lösung für 20 Minuten autoklaviert.

Tab. 3.3: Vorkulturmedienbestandteile und Konzentrationen (VKM-B080 und VKM-B117).

Komponente	Hersteller (Art.Nr.)	VKM-B080	VKM-B117
<u>Medium</u>		[g L ⁻¹]	
Glucose	Merck (1.08346)	10.0	–
Glycerol	Merck (1.04093)	–	15.0
Hefeextrakt	Oxoid (LP0021)	–	7.00
Soja-Pepton	BD (211906)	–	13.5
Citronensäure	Merck (1.00244)	1.01	–
K ₂ HPO ₄	Merck (1.05101)	–	1.50
KH ₂ PO ₄	Merck (1.04871)	7.81	1.75
NaCl	Merck (1.16224)	–	2.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck (1.01217)	2.33	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck (1.05882)	–	0.250
<u>Spurenelemente</u>		[mg L ⁻¹]	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Merck (1.02533)	2.68	–
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Merck (1.02787)	2.20	–
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Merck (1.03963)	32.5	–
H ₃ BO ₃	Merck (1.00162)	3.36	–
MnCl ₂ · 2H ₂ O	Merck (1.05934)	16.4	–
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Merck (1.06524)	2.68	–
ZnCl ₂	Merck (1.08815)	14.8	–
Titriplex III	Merck (1.08421)	6.32	–
10% HCl		[μL L ⁻¹]	
	AppliChem (A1710)	200	–
<u>MgSO₄-Thiamin-Lösung</u>		[mg L ⁻¹]	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck (1.05882)	92.8	–
Thiamine-HCl	Sigma (T4562)	23.1	–

3.3 Mikrotiterplattenfermentation

In 3.1 *Versuchssystematik* wurde gezeigt, dass verschiedene Hauptfermentationsverfahren für das Aminosäurescreening eingesetzt werden. Das Batch- und Fed-Batch-Verfahren wird im späteren Verlauf des Kapitels vorgestellt.

In der Einleitung des Kapitels 3 *Material und Methoden* und der Abb. 3.1 wurde bereits aufgezeigt, dass zur Kultivierung der Hauptkulturen und somit zum Aminosäurescreening Mikrotiterplatten (*24-deepwell Microplates, MTP*) genutzt werden. Zur Verfügung stehen zwei dieser Platten der Fa. *EnzyScreen* mit je 24 Wells. In Kombination mit sogenannten *Sandwich Covern* bildet jede Platte so 24 Fermentationseinheiten.

Das sogenannte *System Duetz* wurde vom biotechnologischen Institut der ETH Zürich und Wouter A. Duetz entwickelt und verifiziert [7, 8]. Das notwendige Equipment zur Kultivierung sowie Vor- und Nachbereitung der MTPs ist in Tab. 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.4: Verwendetes Equipment zur Durchführung der Fermentation im MTP-Format.

Equipment	Hersteller (Typ.bez.)	Spezifikation	Zweck
<i>24-deepwell Microplates</i> (Mikrotiterplatte)	<i>EnzyScreen</i> (CR1424a)	24 Wells (11 mL, 40x17x17 mm), Polypropylen	Kultivierung im MTP-Maßstab
<i>24-deepwell Sandwich Cover</i> (Verbunddeckel)	<i>EnzyScreen</i> (CR1224b)	2.5 x 5.0 mm Belüftungs- löcher, Abstandshalter	Abdeckung der MTPs
Einkanalpipette	<i>Eppendorf</i> (3759788)	500–5000 µL	Pipettieren des FM
Multikanalpipette (el.)	<i>Rainin</i> (E3-8-200R u. E3-8-1200R)	8 Kanäle, 20–200 µL u. 100–1200 µL	Inokulation und Pipettieren von Kom- plementärlösungen in MTP-Format
Reagenz- Behälter	<i>A. Hartenstein</i> (RE60)	60 mL, autoklavierbar	Reservoir zur Vorlage für Multikanalpipette
Schüttelinkubator	<i>Infors HT (Multitron Pro)</i>	20–400 rpm, T = 4 bis 80 °C, Schüttelhub 12.5, 25 oder 50 mm	Inkubation der MTPs
Trockenschrank	<i>Memmert</i> (210133)	-	Trocknung der MTPs mit Deckel nach Sterilisation
<i>Universal Cover Clamps</i>	<i>EnzyScreen</i> (CR1800)	-	Einspannvorrichtung für MTPs in Inkubator

3.3.1 Plattensystem Duetz

Als Basis des Systems dient eine spezielle 24-Well-Mikrotiterplatte. Jedes Well umfasst durch die Maße 40x17x17 mm ein Volumen von über 11 mL. Laut Hersteller *EnzyScreen* sollten davon maximal 30% und somit 4 mL an Kulturvolumen genutzt werden. Eine exemplarische Platte ist mit seiner Matrix von 4x6 Wells in Abb. 3.11 dargestellt. Die Mikrotiterplatte besteht aus Polypropylen und wurde von Herstellerseite aus entgiftet, indem Extractables und Leachables aus dem verwendeten Polymer systematisch entfernt wurden.

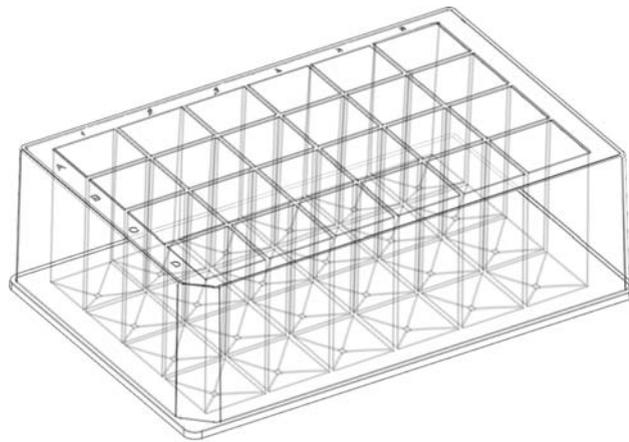


Abb. 3.3: Schematische Zeichnung der Fermentations-Deepwell-Platte mit 24 Wells und Pyramidböden.

Die Grundform wird ergänzt durch einen passenden Deckel (Abb. 3.4). Dieser wirkt als Steril- und Flüssigkeitsverlustbarriere und bildet durch seine Belüftungslöcher die einzige Möglichkeit der Sauerstoffversorgung während der Kultivierung.

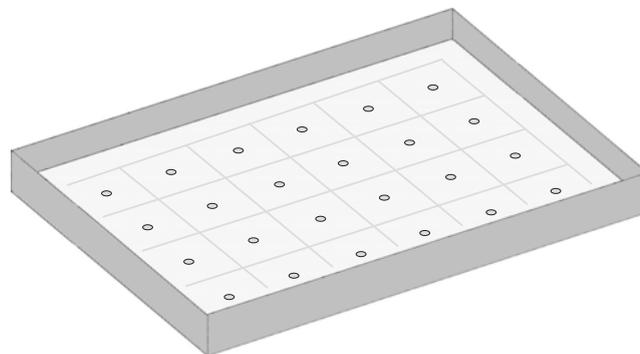


Abb. 3.4: Schematische Zeichnung des Verbunddeckels mit nach oben zeigender Silikoneinlage zur Abdichtung der Wells und angedeuteten Belüftungslöchern.

In Abb. 3.5 ist das gesamte System von *EnzyScreen* beispielhaft durch ein Kultivierungswell und den genannten Verbunddeckel im Querschnitt dargestellt. Ein inertes Kultivierungssystem wird durch die Materialwahl und deren Vorbehandlung sichergestellt. Der aufgesetzte Verbunddeckel aus Edelstahl umfasst einen Mikrofaserfilter (blau), einen ePTFE-Filter (0.3 μm) zwischen zwei Polyester- und Polyamidgeweben (grün) und eine Silikonlage (gelb). 2.5 x 5.0 mm große Belüftungslöcher sorgen mit den verwendeten Membranen für die Zuluftversorgung der Kultur und eine definierte Austauschrate der Luft im Kopfraum des Wells während der Inkubation. Dies sorgt für vergleichbare physikalische Bedingungen in den Wells [9].

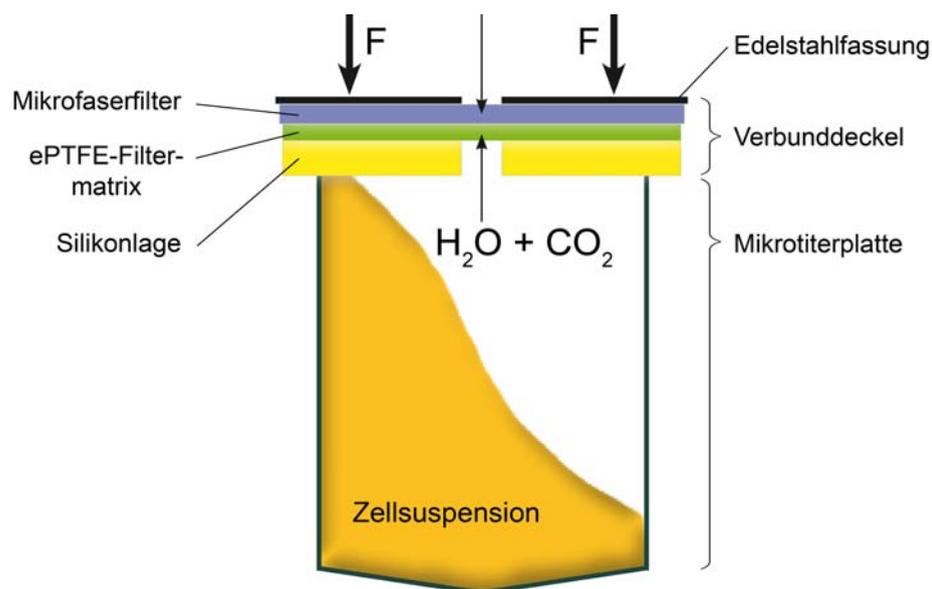


Abb. 3.5: Querschnittsdarstellung der Mikrotiterplatte (*EnzyScreen*, CR1424a) mit aufgesetztem Verbunddeckel (*EnzyScreen*, CR1224b), Abb. erstellt nach [9].

Zusätzlich werden für das System *Duetz* spezifische *Universal Cover Clamps* (CR1800) verwendet, ebenfalls von *EnzyScreen*. Es handelt sich um die Einspannvorrichtung die im Schüttelinkubator *Infors HT* vom Typ *Multitron Pro* für die Fixierung der MTPs während der Inkubation sorgt. Mit einer manuell eingestellten Spannkraft F (s. Abb. 3.5) drückt ein Stempel auf den Verbunddeckel, der das gesamte System in seiner Vorrichtung hält. Beachtet werden muss eine sichere aber gleichzeitig nicht zu feste Einspannung der Platten, um die Sauerstoffversorgung durch den aufsitzenden Stempel nicht zu unterbinden oder einzuschränken.

3.3.2 Handhabung der Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatten sind zur Wiederverwendung ausgelegt, wodurch Ressourcen gespart werden können. Es findet daher vor und nach jedem Kultivierungsprozess eine Sterilisation mit zwischengeschalteter Reinigung der Platten statt. Zusammen mit der Vor- und Nachbereitung ergibt sich ein Kreislauf für die Mikrotiterplatten, der in Abb. 3.6 dargestellt ist und als Grundlage zur Handhabung der Platten genutzt wird.

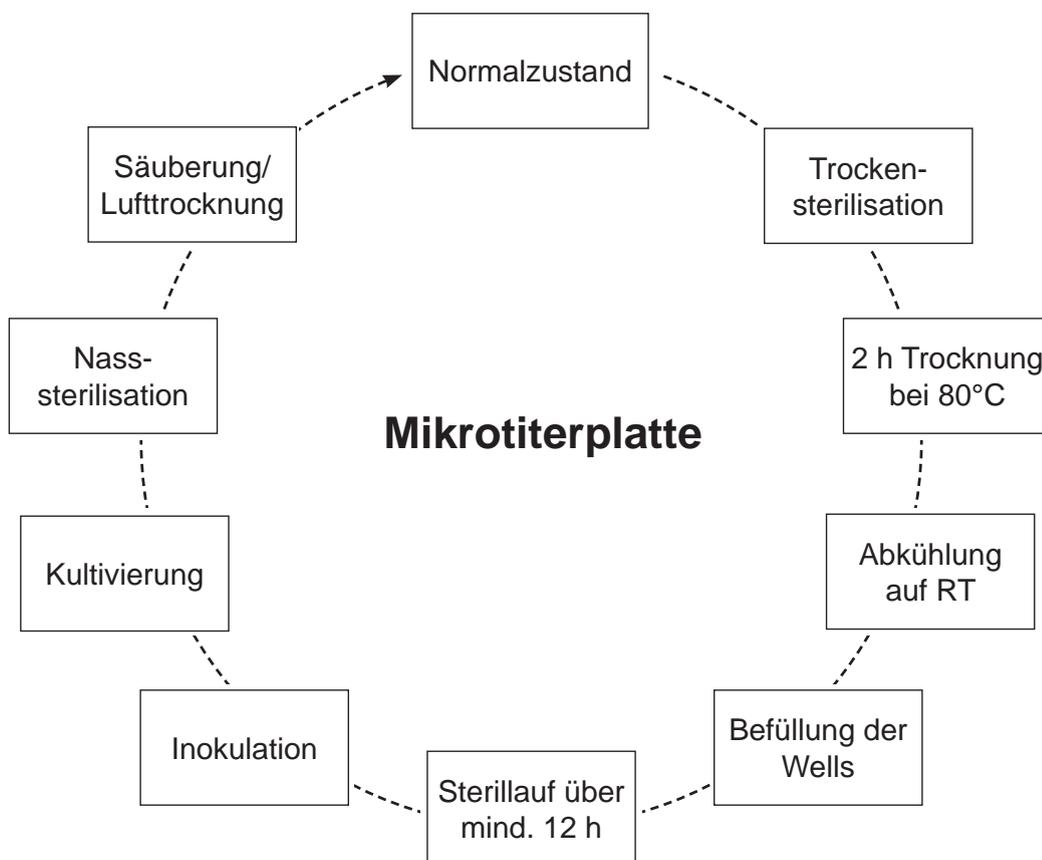


Abb. 3.6: Aktions- und Zustandskreislauf der Mikrotiterplatten mit Vor- und Nachbereitung zur allgemeinen Kultivierung.

Die Mikrotiterplatte liegt in seiner Grundfassung ausgewaschen und unsteril vor. Die Vorbereitung für den nächsten Kultivierungslauf beginnt am Tag zuvor mit einer Sterilisation. Dazu wird die MTP mit Deckel in Autoklavierfolie verpackt und bei 121 °C über eine Haltezeit von 20 Minuten autoklaviert (*Trockensterilisation*). Wahlweise wird der Autoklav *Systec VX-150*, der eine eingebaute Vakuum-Trockenfunktion besitzt (mindestens 30 Minuten *Superdry*), oder der Autoklav *Systec 2540 EL* genutzt. Letzterer besitzt keine Trockenfunktion, weshalb eine längere Nachtrockenzeit notwendig ist.

Der Prozess wird fortgeführt indem die sterile Platte von der Folie befreit wird, ungeöffnet bleibt und für 2 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank der Fa. *Memmert* erhitzt wird. Dadurch werden Feuchtigkeitsrückstände aus den MTP-Wells entfernt. Durchlief die Platte bereits ein Superdry-Programm, so reichen 20 Minuten zusätzliche Trockenzeit aus. Eine langsame Abkühlung der Platte erfolgt anschließend bei Raumtemperatur.

Die MTP ist zu diesem Zeitpunkt steril und kann unter der Sterilwerkbank von *Heraeus* (Typ *HeraSafe HSP12*) zur Präparation vorbereitet werden. Dieser Prozessschritt umfasst das Befüllen der Wells mit Medium (s. 3.3.5 *Befüllung der Mikrotiterplatte*). Die Platte bleibt damit weiterhin steril und wird im aseptischen Zustand unter Kultivierungsbedingungen im Schüttelinkubator *Multitron Pro* der Fa. *Infors HT* einem Sterillauf unterzogen. Dieser sollte mindestens 12 Stunden bis zur Inokulation andauern und kann mögliche Kontaminationen des Fermentationsmediums und der Mikrotiterplatte aufzuzeigen. Die Kontrolle nach dem Sterillauf erfolgt rein optisch, indem auf Trübungserscheinungen des Mediums geachtet wird. Die Inokulation und Kultivierung kann nach erfolgreicher Prüfung beginnen.

Nach Beendigung der Fermentation im Mikrotiterplattenformat erfolgen letzte Messungen – bei Bedarf die Messung des pH-Wertes – und die Platte wird wiederum in Autoklavierfolie verpackt und im Autoklaven sterilisiert (*Abfallsterilisation mit Flüssigkeiten* bei 121 °C und 20 Minuten Sterilisationszeit). Vermieden werden muss eine Schräglage der Platte während des Transportes und der Autoklavierung selber, damit keine Kulturbrühe in die Belüftungslöcher und damit Membranen des Deckels gelangt.

Anschließend kann die Platte entleert und gesäubert werden. Eine Reinigung der Mikrotiterplatte in der Spülmaschine ist zu empfehlen. Der Deckel darf jedoch nur mit einem feuchten Tuch grundgereinigt werden; ein Fluten der Membranen mit Flüssigkeit beschädigt das System. Die gesamte MTP befindet sich nach erfolgter Lufttrocknung wieder im Normalzustand.

3.3.3 Fermentationsmedien

Zur Kultivierung in den Mikrotiterplatten werden zwei verschiedene Fermentationsmediensätze genutzt (*FM-B080* und *FM-B117*). Es handelt sich bei beiden um Minimalmedien. Beachtet werden müssen im Folgenden die Angabe der Komponentenkonzentrationen. Es sind die Ansatzkonzentrationen und nicht die Endkonzentrationen im letztendlich vollständigen Fermentationsmedium aufgeführt. Die Endkonzentrationen können unter 3.3.6 *Batch-Fermentation* und 3.3.7 *Fed-Batch-Fermentation* eingesehen werden.

Fermentationsmedium-B080

Das FM-B080 ist identisch zum Vorkulturmedium für den B080-Stamm. Als C-Quelle wird wiederum Glucose eingesetzt. Die Ansatzkomponenten sind in Tab. 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5: Ansatzkonzentrationen für das Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Batch- und Fed-Batch-Verfahren.

Komponente	Hersteller (Art.Nr.)	FM-B080 (Batch)	FM-B080 (Fed-Batch)
<u>Medium</u>		[g L ⁻¹]	
Glucose	<i>Merck</i> (1.08346)	10.0	0.00
KH ₂ PO ₄	<i>Merck</i> (1.04871)	7.81	7.81
Citronensäure	<i>Merck</i> (1.00244)	1.01	1.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Merck</i> (1.01217)	2.33	2.33
<u>MgSO₄-Thiamin-Lösung¹</u>		[g L ⁻¹]	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	<i>Merck</i> (1.05882)	9.28	9.28
Thiamine-HCl	<i>Sigma</i> (T4562)	2.31	2.31
<u>Spurenelemente</u>		[mg L ⁻¹]	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	<i>Merck</i> (1.02533)	268	268
CuSO ₄ · 5H ₂ O	<i>Merck</i> (1.02787)	220	220
FeSO ₄ · 7H ₂ O	<i>Merck</i> (1.03963)	3250	3250
H ₃ BO ₃	<i>Merck</i> (1.00162)	336	336
MnCl ₂ · 2H ₂ O	<i>Merck</i> (1.05934)	1640	1640
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	<i>Merck</i> (1.06524)	268	268
ZnCl ₂	<i>Merck</i> (1.08815)	1480	1480
Titriplex III	<i>Merck</i> (1.08421)	632	632
		[mL L ⁻¹]	
10% HCl	<i>AppliChem</i> (A1710)	0.200	0.200

¹ Als Lösungsmittel dient das zuvor angesetzte Medium.

Der Ansatz der Glucose-Lösung erfolgt zusammen mit Phosphat, Citronensäure und Sulfat. Der pH-Wert wird mit 1 M NaOH auf 7.0 eingestellt. Es folgt eine Sterilfiltration.

Die Spurenelemente werden zusammen mit Titriplex III gelöst, 10-prozentige Salzsäure zutitriert und ebenfalls sterilfiltriert. Unter aseptischer Umgebung werden die Lösungen im Verhältnis 1:100 vereint (1 Vol.-% Spurenelemente). Vervollständig wird das Medium durch die Zugabe der MgSO₄-Thiamin-Lösung, die kurz vor Vorkultivierungsbeginn im Medium angesetzt, sterilfiltriert und den Wells einzeln zugesetzt wird (19 Vol.-%).

Im Gegensatz zum Batchmedium wird dem Fed-Batchmedium keine Glucose zugesetzt. Für das Fed-Batch Verfahren werden jedoch sowohl das Batch- als auch das Fed-Batchmedium verwendet. Der weitere Glucose Eintrag (Feed) erfolgt beim Fed-Batch mittels FeedBeads. Diese geben kontinuierlich Glucose in das Medium ab. Unabhängig von den zugesetzten FeedBeads stellt sich durch die verwendeten Medien eine Anfangsglucosekonzentration von 2 g L⁻¹ ein. Das genaue Vorgehen und die Zusammensetzung ist unter 3.3.7 *Fed-Batch-Fermentation* beschrieben.

Fermentationsmedium-B117

Die Vorkultur für den B117-Stamm wurde in einem Komplettmedium durchgeführt (3.2.1 *Vorkulturmedium-B117*, S. 16). Die Inokulation aus der Vorkultur erfolgt im MTP-Format in ein Minimalmedium, dessen Zusammensetzung in Tab. 3.6 aufgezeigt ist.

Da die C-Quelle identisch zum Vorkulturmedium bleiben soll, wird weiterhin Glycerol verwendet. Dies wird zusammen mit Phosphat, Natronlauge, Citronensäure, den Sulfaten und Titriplex III angesetzt. Unbedingt zu beachten ist die Reihenfolge der Komponentenzugabe nach Tab. 3.6 des Mediumansatzes. Ammoniumsulfat neigt dazu bei pH-Werten >7.0 auszufallen. Eine Rücktitration führt zu keiner erneuten Lösung des Ammoniums. Vor der Zugabe von Ammoniumsulfat muss die Citronensäure vollständig gelöst sein, eine pH-Wert-Überwachung ist ratsam.

Generell ist nach der Lösung aller Substanzen von Glycerol bis Ammoniumsulfat sowie Titriplex III keine pH-Wert-Korrektur notwendig. Die Lösung weist bereits einen pH-Wert von etwa 7.0 auf. Nach der Zugabe der angesetzten Spurenelemente im Verhältnis 3:20 wird der Ansatz sterilfiltriert (15 Vol.-% Spurenelemente).

Wie bereits bei dem Vorkulturmedium zu beachten war, wird Thiaminhydrochlorid separat und vor jeder Kultivierung neu angesetzt. Thiamin wird im angesetzten Medium gelöst und mittels Sterilfiltration dem restlichen Medium zugesetzt (19 Vol.-%).

Tab. 3.6: Ansatzkonzentrationen für das Fermentationsmedium zur Kultivierung des B117-Stammes im Batch-Verfahren.

Komponente	Hersteller (Art.Nr.)	FM-B117 (Batch)
<u>Medium</u>		[g L ⁻¹]
Glycerol	<i>Merck</i> (1.04093)	19.8
KH ₂ PO ₄	<i>Merck</i> (1.04871)	7.75
MgSO ₄ · 7H ₂ O	<i>Merck</i> (1.05882)	0.695
NaOH	<i>Merck</i> (1.06462)	1.86
Citronensäure	<i>Merck</i> (1.00244)	0.955
(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Merck</i> (1.01217)	2.32
		[mg L ⁻¹]
Titriplex III	<i>Merck</i> (1.08421)	5.25
		[g L ⁻¹]
<u>Thiamin-Lösung²</u>		
Thiamine-HCl	<i>Sigma</i> (T4562)	3.25
<u>Spurenelemente</u>		[mg L ⁻¹]
CoCl ₂ · 6H ₂ O	<i>Merck</i> (1.02533)	22.1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	<i>Merck</i> (1.02787)	6.96
FeCl ₃ · 6H ₂ O	<i>Merck</i> (1.03943)	412
H ₃ BO ₃	<i>Merck</i> (1.00162)	12.1
MnSO ₄ · H ₂ O	<i>Merck</i> (1.05882)	8.16
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	<i>Merck</i> (1.06524)	15.7
ZnSO ₄ · 5H ₂ O	<i>Merck</i> (1.08881)	50.7
		[mL L ⁻¹]
H ₂ SO ₄ (≥ 95%)	<i>Merck</i> (1.00713)	3.71

²Als Lösungsmittel dient das zuvor angesetzte Medium.

3.3.4 Aminosäuren

Alle bisher vorgestellten Medienbestandteile haben die Gemeinsamkeit, dass sie bei jedem Versuchsbeginn in gleichbleibender Konzentration zugegeben werden. Sie stellen die Grundbestandteile der Kulturmedien dar. Die Anfangskonzentration in den finalen Medienansätzen sind dabei in allen Versuchen konstant. Es ist der entscheidende Unterschied zu den eingesetzten Aminosäuren. Diese werden in ihren Anfangskonzentrationen in den finalen Medienansätzen variabel eingesetzt. Dies ermöglicht das Screening.

Verwendet werden alle 20 kanonischen Aminosäuren (Tab. 3.7). Zu beachten ist, dass vom Cystein die Hydrochlorid-Monohydrat-Form verwendet wird. Als Lösungsmedium wird das jeweilige Batch-Fermentationsmedium (FM-B080 bzw. FM-B117) genutzt. So wird sichergestellt, dass keine Konzentrationsunterschiede der Medienkomponenten in Abhängigkeit des zugesetzten Aminosäurevolumens auftreten.

Tab. 3.7: Verwendete kanonische Aminosäuren zum Ansatz im Fermentationsmedium.

Kanonische AS	Abk. [14]	Hersteller (Art.Nr.)
Alanin	Ala	<i>Merck</i> (1.01007)
Arginin	Arg	<i>Merck</i> (1.01587)
Asparagin	Asn	<i>Merck</i> (1.01566)
Asparaginsäure	Asp	<i>Merck</i> (1.00126)
Cystein	Cys	<i>Merck</i> (1.02839)
Glutamin	Gln	<i>Merck</i> (1.00289)
Glutaminsäure	Glu	<i>Merck</i> (1.00291)
Glycin	Gly	<i>Calbiochem</i> (3570)
Histidin	His	<i>Merck</i> (1.04351)
Isoleucin	Ile	<i>Merck</i> (1.05357)
Leucin	Leu	<i>Merck</i> (1.05020)
Lysin	Lys	<i>Sigma</i> (211-519-9)
Methionin	Met	<i>Merck</i> (1.05707)
Phenylalanin	Phe	<i>Merck</i> (1.07256)
Prolin	Pro	<i>Merck</i> (1.07430)
Serin	Ser	<i>Merck</i> (1.07769)
Threonin	Thr	<i>Merck</i> (1.08411)
Tryptophan	Trp	<i>VWR</i> (28821131)
Tyrosin	Tyr	<i>Merck</i> (1.08371)
Valin	Val	<i>Merck</i> (1.08495)

Das Vorgehen beim Lösen der Aminosäuren folgt einem bestimmten Muster, das die Vergleichbarkeit der Aminosäurelösungen garantieren soll.

Alle 20 Aminosäurestammlösungen werden einzeln, in voneinander unabhängigen Vorgängen angesetzt. Nach der Einwaage auf der Analysewaage *XSE 205 Dual Range* der Fa. *Mettler Toledo* von 250 mg Aminosäure für 50 mL Fermentationsmedium, werden die Ansätze auf einer Magnetrührerplatte mit neun Stellplätzen (Fa. *IKA*, Typ *IKAMAG[®]EoA 9*) nacheinander in Lösung gebracht. Im ersten Lösungsansatz wird versucht die Aminosäuren bei Raumtemperatur per Rührfisch in Lösung zu bringen. Dies ist bei 80% aller Aminosäuren möglich (s. Tab. 3.9: *Besonderheiten bei Lösungsansatz*). Gelingt dies nicht wird das Fermentationsmedium mit zugegebener Aminosäure leicht erhitzt. Dabei wird beachtet, dass die Solltemperatur am Heizblock nicht höher als auf 60 °C eingestellt wird, um Verdunstungseffekte mit einhergehenden Konzentrationsveränderungen zu vermeiden. Gelingt auch so die vollständige Lösung nicht, wird der pH-Wert der Lösung verändert, um sich weiter vom pI-Wert der Aminosäure zu entfernen. Dies ist bei Tyrosin notwendig. Mit Natronlauge wird der pH-Wert der Suspension zum Lösen in den alkalischen Bereich (pH 10.0) gebracht, wodurch die Aminosäure deprotoniert wird und eine Lösung entsteht. Ausgereizt wird damit jedoch das Puffersystem. Die maximale Konzentration an Tyrosin im Medium wird in Folge dessen auf 200 mg L⁻¹ reduziert, was im Fermentationsmedienansatz in einem pH-Wert von 7.05 resultiert.

Tab. 3.8: Verbrauchsmaterial zum Ansatz von Aminosäurelösungen.

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Art.Bez.)	Spezifikation	Zweck
Tubes	<i>Sarstedt</i> (62.547.254)	50 mL, steril	Lagerung der Aminosäurelösungen
Verschlusskonus	<i>Sarstedt</i> (744.311)	<i>Luer Lock</i>	Verschluss von Spritzen zur Lagerung/Transport
<i>Omnifix[®]</i> Spritzen	<i>B.Braun</i> (4617509F)	50 mL, <i>Luer Lock</i>	Sterilfiltration
<i>Whatman[®]</i> Spritzenvorsatzfilter	<i>GE Healthcare</i> (10462200)	0.2 µm Poren, Celluloseacetat-Membran	Sterilfiltration

Anschließend müssen alle Aminosäurelösungen sterilfiltriert werden. Die dazu notwendigen Materialien sind in Tab. 3.8 aufgeführt. Jeder Aminosäureansatz wird in 50 mL *Omnifix[®]* Spritzen gefüllt (unsteril). Unter aseptischer Umgebung werden die Spritzen anschließend jeweils mit einem *Whatman[®]* Spritzenvorsatzfilter der Fa. *GE Healthcare* ausgestattet und durch tropfenweise Abgabe der Lösung in sterile 50 mL Tubes (*Sarstedt*) entleert. Nach sterilem Verschluss werden die Röhrchen bei 2–8 °C gelagert und vor jedem neuen Medienansatz auf Raumtemperatur gebracht.

Tab. 3.9: Lösungsansatz der verwendeten Aminosäuren in durchnummerierter Reihenfolge.

Nr.	AS	EAS	c_{ASi}	C_{ASi}	pl	Löslichkeit [21]	Löslichkeit [4]	Besonderheiten bei Lösungsansatz	pH ($c_{ASi}=5 \text{ g L}^{-1}$)		pH ($c_{ASi}=1 \text{ g L}^{-1}$)	
			[g L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]	[-]	(bei 20 °C)	(bei 50 °C)		B117	B080	B117	B080
						[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]					
1	Arg		5.00	28.70	11.5	149	–	–	8.50	8.41	7.08	7.05
2	Val	✓	5.00	42.68	5.96	85	–	–	7.05	7.06	–	–
3	Leu	✓	5.00	38.12	5.98	24	–	–	7.03	7.05	–	–
4	Gly		5.00	66.60	5.97	225	–	–	7.00	7.04	–	–
5	Lys	✓	5.00	34.20	9.59	2000	–	–	7.01	7.00	–	–
6	Phe	✓	5.00	30.27	5.48	27	–	–	7.01	7.06	–	–
7	Thr	✓	5.00	41.97	5.64	90	–	–	7.00	7.05	–	–
8	Pro		5.00	43.43	6.30	1550	–	–	7.04	7.06	–	–
9	Ile	✓	5.00	38.12	5.94	32	–	–	7.02	7.06	–	–
10	Ala		5.00	56.12	6.02	85	–	–	7.06	7.04	–	–
11	Ser		5.00	47.58	5.68	360	–	–	7.02	7.02	–	–
12	Tyr		5.00	27.60	5.65	0.38	1.1	Lsg. unter NaOH-Zugabe	10.0	10.0	7.66	7.70
13	Trp	✓	5.00	24.48	5.88	10	17	Erwärmung notw. (60 °C)	7.10	7.06	–	–
14	Cys		5.00	28.47	5.02	160	–	–	5.85	5.95	6.96	6.97
15	Asn		5.00	37.84	5.41	20	–	–	7.01	7.03	–	–
16	Gln		5.00	34.21	5.65	35	–	–	7.06	7.05	–	–
17	Glu		5.00	33.98	3.22	7.5	22	Erwärmung notw. (60 °C)	5.92	5.93	6.97	6.96
18	Asp		5.00	37.57	2.77	4.0	12	Erwärmung notw. (60 °C)	5.55	5.60	6.92	6.93
19	His		5.00	32.22	7.50	38	–	–	7.21	7.18	–	–
20	Met	✓	5.00	33.51	5.74	53	–	–	7.04	7.05	–	–

Tab. 3.9 zeigt die Zusammenfassung der Aminosäureansätze mit der Angabe, ob es sich um allgemein essentielle Aminosäuren (EAS) für heterotrophe Organismen handelt [29]. Die Konzentration beträgt immer 5 g L^{-1} wobei die Konzentration in mmol L^{-1} in Abhängigkeit der molaren Masse M im Bereich zwischen 24.5 mmol L^{-1} (Tryptophan) und 66.6 mmol L^{-1} (Glycin) liegt.

Die theoretischen Werte für die spezifischen isoelektrischen Punkte und die Löslichkeiten bei 20 und 50°C sind zudem aufgelistet, um das Löslichkeitsverhalten der Aminosäuren nachzuvollziehen. Die Lösungsvorgänge bestätigen die Angaben meistens, weichen jedoch teilweise auch von den Literaturwerten ab [4, 21]. Bereits bei Löslichkeitsangaben von 10 g L^{-1} führt die praktische Lösung bei Raumtemperatur zu Schwierigkeiten (Tryptophan), die vollständige Auflösung ist nicht mehr ohne weiteres möglich.

Zur Kontrolle werden die pH-Werte sämtlicher Aminosäureansätze gemessen (Tab. 3.9: pH ($c_{\text{ASi}}=5 \text{ g L}^{-1}$)). Sauer bzw. alkalisch reagierende Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure bzw. Arginin) verändern die H^+ - bzw. OH^- -Konzentration des Fermentationsmediums. Das Puffersystem des Fermentationsmediums ist bei einer Konzentration von 5 g L^{-1} Aminosäuren nicht mehr fähig dieses abzupuffern. Korrekturen sind dennoch nicht notwendig, da die Aminosäurelösungen im späteren Ansatz verdünnt im Fermentationsansatz vorliegen (3.3.5 *Befüllung der Mikrotiterplatte*). Es erfolgt für diese Annahme eine weitere Kontrolle des pH-Wertes mit verdünntem Aminosäureansatz und maximaler Aminosäurekonzentration von 1 g L^{-1} im Fermentationsmedium (Arginin, Tyrosin, Glutamin- und Asparaginsäure). Die zuvor von pH 7.0 stark abweichenden Aminosäurelösungen weisen mit der reduzierten Konzentration einen akzeptablen pH-Wert auf (Tab. 3.9: pH ($c_{\text{ASi}}=1 \text{ g L}^{-1}$)), der eine Fermentation im physiologischen pH-Bereich erlaubt. Tyrosin ist wie oben erwähnt davon ausgenommen, eine maximale Konzentration von 200 mg L^{-1} ist zulässig.

Mit diesem Satz von 2×20 Aminosäurelösungen (gelöst im FM-B080 und FM-B117) gelingt es, die Mikrotiterplatten in systematischer Abfolge zu befüllen (3.3.5 *Befüllung der Mikrotiterplatte*). Je nach Well- und Plattenbelegung können so die Aminosäuren schnell, effektiv und steril den Ansätzen hinzugegeben werden.

3.3.5 Befüllung der Mikrotiterplatte

In 3.3.2 *Handhabung der Mikrotiterplatte* wurde die Methodik zum generellen Umgang mit der Mikrotiterplatte vorgestellt. Vertieft wird an dieser Stelle die Technik zur Präparation und somit zur Befüllung der MTP mit den entsprechenden Fermentationsmedienkomponenten (3.3.3 *Fermentationsmedien* und 3.3.4 *Aminosäuren*). Zu diesem Zeitpunkt liegt die Platte steril vor und kann unter der Sicherheitswerkbank geöffnet und aseptisch befüllt werden.

Die sinnvolle Planung zur Belegung der MTP ist essentiell. Über die gesamten Versuchsreihen wurde stets ein Grundschema verwendet, das darauf ausgelegt war sowohl übersichtlich, praktisch durchführbar und fehlerunanfällig zu sein. Zudem sollte es die spätere Probenahme und Ergebnisauswertung vereinfachen. In Abb. 3.7 ist das verwendete Schema zur Plattenbelegung und Kultivierung aufgeführt. Das Prinzip beruht stets auf einer Doppelfermentation mit jeder zugesetzten Aminosäure bzw. deren Kombinationen. Als praktikabel erwiesen hat sich ein Vorgehen zur Befüllung der MTP von oben links nach unten rechts. Dies bedeutet, dass beim ersten Wellpaar A1-B1 begonnen und die Reihe bei A6-B6 abgeschlossen wird. Dies wiederholt sich in der unteren Hälfte der MTP beginnend bei C1-D1 und schließt mit C6-D6 ab. Das gleiche Prinzip wird ebenso auf der zweiten verfügbaren MTP parallel mit anderen AS-Zusätzen durchlaufen.

	1	2	3	4	5	6
A	Arg	Val	Leu	Gly	Lys	Phe
B	Arg	Val	Leu	Gly	Lys	Phe
C	Thr	Pro	PAS	EAS	0AS	Blank
D	Thr	Pro	PAS	EAS	0AS	Blank

Abb. 3.7: Plattenbelegungsprinzip zur Verdeutlichung des Pipettierschemas. Das Prinzip der Doppelfermentation durch Wellpaare wird stets beibehalten.

Neben Einzelzusätzen von Aminosäuren sind diverse Kombinationen der unterschiedlichen Aminosäuren und deren Konzentrationen möglich. Die komplexeste Kombination stellt der Aminosäurecocktail aus allen verfügbaren 20 proteinogenen Aminosäuren (*PAS*) dar. Eine reduzierte Kombination ist der Cocktail aus den acht heterotroph essentiellen Aminosäuren (*EAS*).

Als Besonderheit sind die letzten beiden Wellpaare zu nennen. Um Vergleiche ziehen zu können, werden bei Bedarf *Nullmedien* der Fermentation hinzugefügt. Darunter wird eine Zusammensetzung des Fermentationsmediums verstanden, das keine Zusätze in Form von Aminosäuren enthält. Die Wellpaare C5-D5 (*0AS*) und C6-D6 (*Blank*) sind jeweils mit Nullmedium befüllt. Im Gegensatz zu den Blanks werden die Wells *0AS* jedoch inokuliert, um Vergleichswerte für die Kultivierung mit Aminosäuren zu erhalten.

Zur schnellen und effektiven Befüllung der 24-Well-Matrix der MTP sind sterile Reagenz-Behälter (A. Hartenstein, Typ RE60) zur Vorlage der entsprechenden Lösungen sowie diverse Pipetten notwendig. Für Lösungsvolumina im Bereich 20 bis zu 200 μL wird die elektronische Multikanalpipette E3-8-200R von *Rainin* verwendet, im Bereich 200–1200 μL die Variante E3-8-1200R. Für größere Volumina wird die manuelle Einkanalpipette von *Eppendorf* (Typ 3759788) – ausgelegt für 500–5000 μL – genutzt (s. Tab. 3.4, S. 17).

Das Prinzip der Befüllung der Wells mit den entsprechenden Medienbestandteilen ist in Abb. 3.8 grafisch dargestellt. Vorgelegt wird stets der reine Medienanteil der zusammen mit dem Aminosäurezusatz 80% des gesamten Kultivierungsansatzes ausmacht.

Ergänzt wird das Medium ausschließlich mit der Thiamin- (B117) bzw. Thiamin- und Magnesiumsulfatlösung (B080), die zusammen 19% des Gesamtansatzes ausmacht. Da die Vitamin, bzw. Vitamin und Magnesiumlösung im Medium selber gelöst sind, besteht der Ansatz letztendlich aus 99% Medium. Wie bereits in Abb. 3.6 erläutert wurde, folgt der Sterillauf selbsterklärend ohne das Inokulum. Erst danach wird das Medium im Verhältnis 1:100 inokuliert (1 Vol.%) und das Gesamtvolumen wird erreicht. Die Kulturbrühe ist damit vollständig.

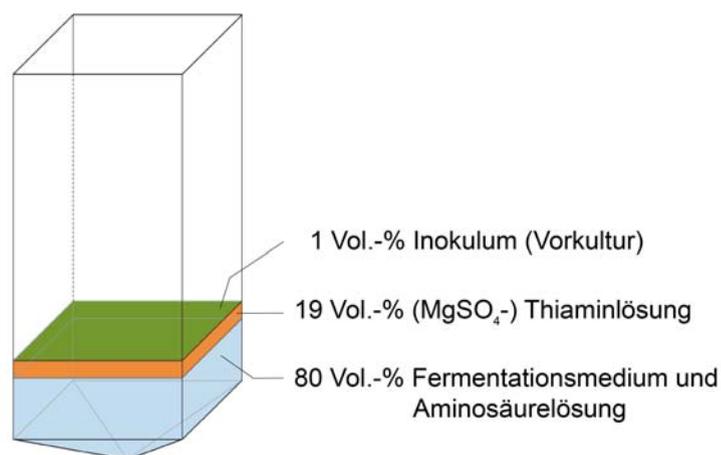


Abb. 3.8: Relative Anteile an Kulturbrühenbestandteile und Veranschaulichung der Pipettierreihenfolge zur Kultivierung, dargestellt in einem maßstabgetreuen Well mit Pyramidboden.

Als Gesamtvolumen werden zwei unterschiedliche Füllvolumina verwendet. Unabhängig vom Kultivierungsorganismus, jedoch abhängig vom Kultivierungsverfahren (Batch oder Fed-Batch) sind die absoluten Anteile am Füllvolumen in Tab. 3.10 aufgeführt. Im Batch-Verfahren wird ein Kultivierungsvolumen von 2500 μL benötigt. Im Fed-Batch-Verfahren hingegen 3000 μL , um die Anzahl an Probenahmemöglichkeiten zu erhöhen (s. 3.5.1 *Probenahme und Probenvorbereitung*).

Wie bereits geschildert ergänzen sich das reine Medium und die Aminosäureansätze gegenseitig und sind voneinander abhängig. Der Gesamtanteil beträgt stets 80%, wobei die Zusammensetzung sich nach der Anzahl der Aminosäuren richtet. Jede Aminosäure liegt nach Absatz 3.3.4 in einer Konzentration von 5 g L^{-1} im Fermentationsmedium vor. Maximal können alle 20 Aminosäuren im Batch-Verfahren mit einem Einzelvolumen von $100 \text{ }\mu\text{L}$ zugesetzt werden. Dies ergibt ein Volumen von $2000 \text{ }\mu\text{L}$ und eine Konzentration von 200 mg L^{-1} je Aminosäure. Medium wird in diesem Fall nicht mehr hinzugegeben. Im Fed-Batch ist die Konzentration identisch, jedoch müssen hier $120 \text{ }\mu\text{L}$ pro Aminosäure zugesetzt werden um die Verhältnismäßigkeiten aufrecht zu erhalten. Dies ergibt ein theoretisches Volumen von $2400 \text{ }\mu\text{L}$ an Aminosäurelösung. Praktisch ist das Aminosäurevolumen begrenzt auf $600 \text{ }\mu\text{L}$. Dies hat ansatztechnische Gründe (s. 3.3.7 *Fed-Batch-Fermentation*, Tab. 3.17, S. 36).

Tab. 3.10: Relativer (*rel.*) und absoluter (*abs.*) Anteil an Lösungen in der Kulturbrühe.

	Kulturbrühenanteil (rel. [%])	Batch (abs. [μL])	Fed-Batch (abs. [μL])
Aminosäuren	80 bis 0	je AS 100, max. 2000	je AS 120, max. 600
Medium	0 bis 80	0 bis 2000	0 bis 2400
(MgSO_4 -) Thiaminlösung	19	475	570
Inokulum	1	25	30
Gesamtvolumen	100	2500	3000

Das System ist dafür ausgelegt in einem Konzentrationsbereich c_{AS} von 0 bis 4 g Aminosäure pro Liter zu arbeiten. Die maximale Konzentration ergibt sich jedoch immer aus der Anzahl n an Aminosäuren, indem der maximale Volumenanteil stets 80% des Gesamtansatzes ausmachen darf. Die nachfolgende Tabelle 3.11 soll beispielhaft einige Zusammensetzungsverhältnisse sowie Ober- und Untergrenzen des Systems aufzeigen. Vereinfacht ist die individuelle Aminosäurekonzentration c_{AS_i} in den Berechnungen als konstant pro Fermentationsansatz angesehen.

Das benötigte Volumen an Stammlösung einer individuellen Aminosäure V_{AS_i} ,

$$V_{\text{AS}_i} = V_{\text{Batch/Fed-Batch}} \cdot \frac{c_{\text{AS}_i}}{c_{\text{AS}_i,0}}, \quad (3.1)$$

ergibt sich aus dem Volumen des Gesamtansatzes $V_{\text{Batch/Fed-Batch}}$ und dem Quotienten aus der finalen Konzentration der Aminosäure c_{AS_i} sowie der Konzentration der Aminosäure in der Stammlösung $c_{\text{AS}_i,0}$, die auf 5000 mg L^{-1} festgelegt ist.

Das Gesamtvolumen an zugesetzten Aminosäuren $\sum V_{AS}$,

$$\sum_{i=1}^n V_{AS} = V_{ASi}, \quad (3.2)$$

ergibt sich aus der Summe der Volumina der einzeln zugesetzten Stammlösungen der Aminosäuren.

Das Gesamtvolumen an zuzusetzendem Fermentationsmedium ΔV_{FM} ,

$$\Delta V_{FM} = 0.8 \cdot V_{\text{Batch/Fed-Batch}} - \sum V_{AS}, \quad (3.3)$$

ergibt sich dann als Differenz aus zuzusetzendem Fermentationsmediumanteil (80% Volumenanteil des Gesamtansatzes) und dem Gesamtvolumen an zugesetzten Aminosäuren. Die restlichen 20% jedes Ansatzes sind die $MgSO_4$ -Thiamin- bzw. Thiaminlösung und das Inokulum.

Tab. 3.11: Exemplarische Berechnungen nach Gl. (3.1) bis Gl. (3.3) des Zusatzvolumens von Aminosäuren zum Mediumvolumen im Batch-Verfahren.

n_{AS}	c_{ASi} [mg L ⁻¹]	V_{ASi} [μL]	$\sum V_{AS}$ [μL]	ΔV_{FM} [μL]
0	0	0	0	2000
1	50	25	25	1975
1	200	100	100	1900
1	4000	2000	2000	0
2	100	100	200	1800
5	200	100	500	1500
5	800	400	2000	0
20	200	100	2000	0

mit

n_{AS}	[-]	Anzahl an Aminosäuren im Ansatz
c_{ASi}	[mg L ⁻¹]	finale Konzentration pro Aminosäure
V_{ASi}	[μL]	Volumen pro zugesetzter AS-Lösung
$\sum V_{AS}$	[μL]	Gesamtvolumen an zugesetzter AS-Lösung
ΔV_{FM}	[μL]	Gesamtvolumen an notwendigem FM

3.3.6 Batch-Fermentation

Das Batch-Verfahren ist für alle durchgeführten Versuche das grundlegende Prozedere um erste Ergebnisse zu generieren und erste Erkenntnisse zu erhalten. Ist die Befüllung der Mikrotiterplatte nach 3.3.5 erfolgt, liegen in jedem Well vergleichbare Konzentrationen an Medienkomponenten – bis auf die der individuell zugesetzten Aminosäuren – vor. In 3.3.3 *Fermentationsmedien* wurden die Ansatzkonzentrationen dargelegt. Die sich ergebenden Endkonzentrationen sind in den Tabellen 3.12 und 3.14 für die Batch-Prozesse aufgeführt. Allen Hauptfermentationen liegt ein 40 mM Phosphatpuffersystem zu Grunde. Die verwendeten Prozessparameter, die sich von den Vorkultivierungsparametern unterscheiden, sind in Tab. 3.13 und 3.15 aufgeführt.

Batch-Fermentation B080

In Tab. 3.12 sind die Substratkonzentrationen aufgeführt, die für die Batch-Kultivierung des B080-Stammes verwendet werden.

Tab. 3.12: Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Batch-Verfahren.

Komponente	FM-B080 (Batch)	
	[g L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
Glucose	9.9	55.0
KH ₂ PO ₄	7.73	56.8
Citronensäure	1.00	5.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.31	17.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.76	7.14
Thiamine-HCl	0.439	1.30
	[mg L ⁻¹]	[μmol L ⁻¹]
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.65	17.9
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.18	8.73
FeSO ₄ · 7H ₂ O	32.2	116
H ₃ BO ₃	3.33	53.9
MnCl ₂ · 2H ₂ O	16.2	113
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.65	11.8
ZnCl ₂	14.7	108
Titriplex III	6.26	16.8
	[mL L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
10% HCl	0.198	6.36

Die Prozessparameter für die Batch-Fermentation des B080-Stammes sind in Tab. 3.13 aufgeführt. Als Schüttelhub wird der eingestellte Radius bezeichnet, in dem sich die gesamte Ebene mit eingespannten MTPs bewegt.

Tab. 3.13: Gesetzte Prozessparameter zur B080-Batch-Kultivierung im MTP-Format im *Multitron Pro* Schüttelinkubator der Fa. *Infors HT*.

Prozessparameter	Set-Points B080
Temperatur	35.0 °C
Drehzahl	300 rpm
Schüttelhub	50 mm
Ansatzvolumen	2500 µL

Batch-Fermentation B117

Im Folgenden sind die Substratkonzentrationen aufgeführt, die für die Batch-Kultivierung des B117-Stammes in jedem Well vorliegen.

Tab. 3.14: Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B117-Stammes im Batch-Verfahren.

Komponente	FM-B117 (Batch)	
	[g L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
Glycerol	19.6	213
KH ₂ PO ₄	7.67	56.4
NaOH	1.84	46.0
Citronensäure	0.945	4.92
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.688	2.79
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.30	17.4
Thiamine-HCl	0.618	1.83
	[mg L ⁻¹]	[µmol L ⁻¹]
CoCl ₂ · 6H ₂ O	3.28	22.2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.03	4.13
FeCl ₃ · 6H ₂ O	61.2	226
H ₃ BO ₃	1.80	29.1
MnSO ₄ · H ₂ O	1.21	7.16
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.33	9.63
ZnSO ₄ · 5H ₂ O	7.53	29.9
Titriplex III	5.20	14.0
	[mL L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
H ₂ SO ₄ (≥ 95%)	0.551	10.3

In Tab. 3.15 sind die zur Kultivierung des B117-Stammes verwendeten Prozessparameter zusammen mit dem eingesetzten Kultivierungsvolumen aufgeführt. Die Parameter unterscheiden sich zur Batch-Fermentation B080 in der erhöhten Inkubationstemperatur und Schüttelfrequenz. Es ist die höchst mögliche Schüttelfrequenz eingestellt den der Schüttelinkubator zulässt (s. Tab. 3.4). Dies ermöglicht den maximalen Sauerstoffeintrag.

Tab. 3.15: Gesetzte Prozessparameter zur B117-Batch-Kultivierung im MTP-Format im *Multitron Pro* Schüttelinkubator der Fa. *Infors HT*.

Prozessparameter	Set-Points B117
Temperatur	37.0 °C
Drehzahl	400 rpm
Schüttelhub	50 mm
Ansatzvolumen	2500 µL

3.3.7 Fed-Batch-Fermentation

Das Fed-Batch-Verfahren ist nach dem Entscheidungsbaum der Versuchssystematik der nächste Schritt, falls das Batch-Verfahren keine eindeutigen Ergebnisse generiert hat. Die Nachfütterung wird durch FeedBeads realisiert, die kontinuierlich Glucose abgeben (s. 2.3.2 *Fed-Batch-Betrieb*). Das Fed-Batch-Verfahren wird in dieser Arbeit auf den B080-Stamm angewendet.

Fed-Batch-Fermentation B080

Die verwendeten Substratkonzentrationen sind in Tab. 3.16 aufgeführt. Die Medienansatzkonzentrationen unterscheiden sich vom Medium ausschließlich in der anfänglichen Glucosekonzentration, die auf 2 g L^{-1} festgelegt wird. Gleichzeitig zur Inokulation werden die FeedBeads hinzugegeben.

Da eine Anfangsglucosekonzentration von 2 g L^{-1} Glucose nicht überschritten werden soll, wird das maximale Volumen an zugesetzten Aminosäuren auf 20% des Gesamtansatzes festgelegt. Daraus ergeben sich Einschränkungen auf die maximale Anzahl an zuzusetzenden Aminosäuren. Die Volumenanteile der einzelnen Stammlösungen sind in Tab. 3.17 aufgeführt.

Tab. 3.16: Endkonzentrationen der Komponente im Fermentationsmedium zur Kultivierung des B080-Stammes im Fed-Batch-Verfahren.

Komponente	FM-B080 (Fed-Batch)	
	[g L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
Glucose	1.98	11.0
KH ₂ PO ₄	7.73	56.8
Citronensäure	1.00	5.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.31	17.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.76	7.14
Thiamine-HCl	0.439	1.30
	[mg L ⁻¹]	[μmol L ⁻¹]
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.65	17.9
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.18	8.73
FeSO ₄ · 7H ₂ O	32.2	116
H ₃ BO ₃	3.33	53.9
MnCl ₂ · 2H ₂ O	16.2	113
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.65	11.8
ZnCl ₂	14.7	108
Titriplex III	6.26	16.8
	[mL L ⁻¹]	[mmol L ⁻¹]
10% HCl	0.198	6.36

Tab. 3.17: Relativer (*rel.*) und absoluter (*abs.*) Anteil an Lösungen in der Fed-Batch-Kulturbrühe.

	Kulturbrühenanteil (rel. [%])	Fed-Batch (abs. [μL])
Aminosäuren	20 bis 0	je AS 120, 600 bis 0
FM-B080 (10 g L ⁻¹ Glucose)	0 bis 20	0 bis 600
FM-B080 (0 g L ⁻¹ Glucose)	60	1800
MgSO ₄ -Thiaminlösung	19	570
Inokulum	1	30
Gesamtvolumen	100	3000

Bis auf das verwendete Anfangsvolumen sind die Prozessparameter für die Batch- und Fed-Batch Kultivierung identisch (Tab. 3.18).

Tab. 3.18: Gesetzte Prozessparameter zur B080-Fed-Batch-Kultivierung im MTP-Format im *Multitron Pro* Schüttelinkubator der Fa. *Infors HT*.

Prozessparameter	Set-Points B080
Temperatur	35.0 °C
Drehzahl	300 rpm
Schüttelhub	50 mm
Ansatzvolumen	3000 µL

3.3.8 Induktionsstrategie

Um die Auswirkung von Aminosäurezusätzen nicht nur auf das Wachstumsverhalten sondern auch auf das Expressionsverhalten zu untersuchen, erfolgt in ausgewählten Versuchen zusätzlich eine Induktion.

Induktion B080

Die Induktion erfolgt beim pHIP-System mittels Temperaturerhöhung auf 39 °C sowohl im Batch- als auch im Fed-Batch-Verfahren.

Vor der Induktion erfolgt eine reine Wachstumsphase, wobei zwei unterschiedliche Induktionszeitpunkte gewählt werden. Zum einen wird im Batch-Verfahren nach 4–5 Stunden, bei einer OD zwischen 0.1 und 2.2, induziert. Im Fed-Batch-Verfahren wird die Wachstumsphase verkürzt auf 2 Stunden, wonach OD-Werte von 0.2 bis 0.4 erreicht werden. Die Expressionsdauer unterscheidet sich ebenfalls. Im Fed-Batch-Verfahren beträgt diese 22 Stunden, im Batch-Vorgang, je nach Auslegung und Ziel, 6 bis 19 Stunden.

Induktion B117

Auch der B117-Stamm wird neben dem Wachstumsverhalten auf die Expressionsfähigkeit bei Aminosäurezugabe untersucht. Der Lactose-Promotor des B117-Stammes wird über die Zugabe von IPTG induziert. Angesetzt werden 50 mmolL⁻¹ bzw. 11.9 mgL⁻¹ IPTG der Fa. *Biosynth* (Typ I-8000). Für die Expressionstests wird nach einer Wachstumsphase von 8 bis 9 Stunden bei einer OD zwischen 0.3 und 1.3 durch die Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert (Volumenverhältnis zur Kulturbrühe 1:100). Die Expressionsphase dauert 16 Stunden für jeden B117-Versuch.

3.4 1-Liter-Fermentation

Im letzten Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse der MTP-Kultivierung auf Fed-Batch Fermentationen im 1-Liter-Maßstab übertragen. Die Kultivierungen werden in einem 1-Liter-Multifermentersystem (SR1000ODLS) der Fa. *DasGip* umgesetzt. In einem Ansatz werden vier Kultivierungen gleichzeitig durchgeführt, wobei der B080-Stamm in drei, der B117-Stamm in einer Kultivierungen näher untersucht wird. Das Multifermentersystem ist in Abb. 3.9 dargestellt.

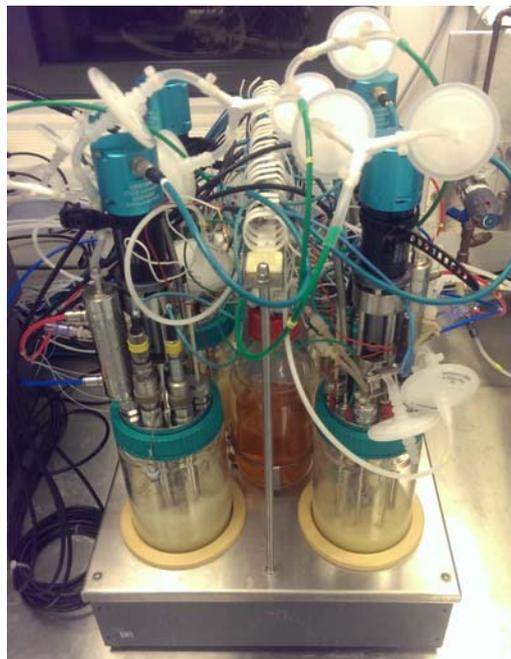


Abb. 3.9: 1-Liter-Multifermenter-System der Fa. *DasGip*.

3.4.1 Hauptfermentationsmedien

Die Fermentationsmedien (Batch-Medien) sind von ihren Grundbestandteilen identisch zu den verwendeten Medien aus Abschnitt 3.3.3 *Fermentationsmedien*. Sämtliche Komponentenkonzentrationen – bis auf die der C-Quellen – sind übernommen worden. Die Konzentrationen der C-Quellen sind in Tab. 3.19 aufgeführt.

Tab. 3.19: Reduzierte Glycerol- und Glucosekonzentrationen für die Fermentationsmedien im 1-Liter-Maßstab.

	B080	B117
	[g L ⁻¹]	
Glycerin	–	5.0
Glucose	2.0	–

Die Feedmedien setzen sich aus C-Quelle, den möglichen Aminosäuren und Spurenelementen zusammen. Der Medienansatz erfolgt wie in Abschnitt 3.3.3 *Fermentationsmedien* und 3.3.4 *Aminosäuren* beschrieben mit den in Tab. 3.19 angegebenen Endkonzentrationen. Der Zusatz der verwendeten Aminosäuren ist im *Experimentellen Teil* (Kapitel 4) angegeben. Alle Feedmedien werden sterilfiltriert.

Tab. 3.20: Endkonzentrationen der Komponente im Feedmedium zur Kultivierung des B080 und B117-Stammes im Fed-Batch-Verfahren.

Komponente	Feedmedium B080	Feedmedium B117
	[g L ⁻¹]	
Glycerol	–	300
Glucose	500	–
je Aminosäure	10.0	3.00
	[mL L ⁻¹]	
Spurenelemente	10.0	150

3.4.2 Prozessparameter

Durch die Regelungsmöglichkeiten des *DasGip*-Systems sind mehr Prozessparameter zu setzen als bei den MTP-Fermentationen. Neben dem Sollwert für pH-Wert und Temperatur, die denen der Kultivierungen in den MTPs entsprechen, werden sinnhafte Anfangswerte für die Begasung und die Rührerdrehzahl gewählt, um aerobes Wachstum bei einem Sollwert von 30% pO₂ sicherzustellen (Tab. 3.21). Die Parameter werden 12 Stunden vor dem eigentlichen Fermentationsstart zum Start des Sterillaufes gesetzt.

Tab. 3.21: Gesetzte Prozessparameter für den B080- und B117-Stamm zur Kultivierung im Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Fermenter.

Prozessparameter	B080	B117
Temperatur	35.0 °C	37.0 °C
Drehzahl	300 rpm	300 rpm
Sauerstoffpartialdruck	30%	30%
Begasung	1.0 vvm	1.0 vvm
pH-Wert	7.0	7.0
Ansatzvolumen	0.7 L	0.7 L

3.4.3 Prozessführungsstrategie

Als Prozessführungsstrategie wird ein Fed-Batch Verfahren gewählt. Im Anschluss an die initiale Batch-Phase erfolgt eine Zufütterung der C-Quelle. Dabei wird ein exponentielles Zufütterungsprofil nach Gl. (2.4) gewählt, gefolgt nach zehn Stunden Zufütterung von einem linearen Feedprofil. Die verwendeten Parameter zur Realisierung des exponentiellen Feedprofils sind in Tab 3.22 aufgeführt.

Tab. 3.22: Verwendete Prozessparameter der exponentiellen Zufütterraten.

Parameter	B080	B117
μ_w	0.20 h ⁻¹	0.13 h ⁻¹
V_{L1}	0.7 L	0.7 L
c_{XL1}	4.9 g L ⁻¹	8.0 g L ⁻¹
$Y_{X/S}$	0.5 g g ⁻¹	0.4 g g ⁻¹
c_{SR}	500 g L ⁻¹	300 g L ⁻¹

Die Expressionsphase des B080-Stammes wird durch eine automatisiert Temperaturerhöhung 4.5 Stunden nach Feed-Start auf 39.0 °C induziert.

Die Induktion des B117-Stamm erfolgt bei einer OD zwischen 30 und 35 per IPTG-Zugabe. Dabei wird die gleiche Konzentration, wie für die MTPs eingesetzt (0.5 mM IPTG).

3.5 Messtechnik und Analytik

Im vorhergegangenen Abschnitt ist die Durchführung und Handhabung der Kultivierungsprozesse erläutert worden. Im Folgenden ist die Probenahme und Probenvorbereitung sowie die eingesetzte Messtechnik und Analytik Thema und stellt vor, inwiefern eine Aus- und Bewertung für jeden Versuch möglich ist. Im Wesentlichen wird die Analytik auf die Fermentation im Mikrotiterplattenformat und 1-Liter-Maßstab angewendet. Für die Vorkulturen im Schüttelkolben wird lediglich die OD₆₀₀-Messung durchgeführt, die unter 3.5.2 *Optische Dichte* beschrieben ist. In Tab. 3.23 sind die angewandten Analytikmethoden aufgeführt.

Tab. 3.23: Übersicht der durchgeführten Analytik.

Analytik	Bewertung
OD ₆₀₀	Zellwachstum
SDS-PAGE	Zielproteinbildung
pH-Messung	anaerober Stoffwechsel

3.5.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Jede Probenahme geht einher mit einem bestimmten Volumenverlust an Kulturbrühe und einer daraus resultierenden Vergrößerung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses. Gleichzeitig begrenzt das verwendete Ansatzvolumen im MTP-Format die Anzahl an möglichen Probenahmen erheblich. Die Messpunkte müssen daher genau festgelegt und definiert werden sowie von der Häufigkeit an das Fermentationsvolumen angepasst sein. Für jede Analytik ist ein bestimmtes Volumen an Probe notwendig, das für alle Versuchsläufe konstant gehalten wird, um Vergleiche zwischen einzelnen Fermentationsläufen zuzulassen und somit systematische Fehler klein zu halten. Jeder Messvorgang während der Kultivierung unterliegt damit einem bestimmten Ablauf, der sich lediglich darin unterscheidet, für welche Analytik Proben entnommen werden.

In Abb. 3.10 ist dieses Prozedere zum Ablauf der Probenahme schematisch dargestellt. Grundlegend entspricht jede Plattenentnahme aus dem Inkubator zur Probenahme einer Unterbrechung der Kultivierung, da die MTP der thermisch konstanten Umgebung und der Rotation temporär entzogen wird.

Die Öffnung der MTP erfolgt in aseptischer Umgebung. Anschließend wird entweder eine reine Probenahme zur Vermessung der optischen Dichte oder, in Kombination, zusätzlich eine Probenahme zur Bestimmung der Zielproteinkonzentration mittels SDS-PAGE durchgeführt.

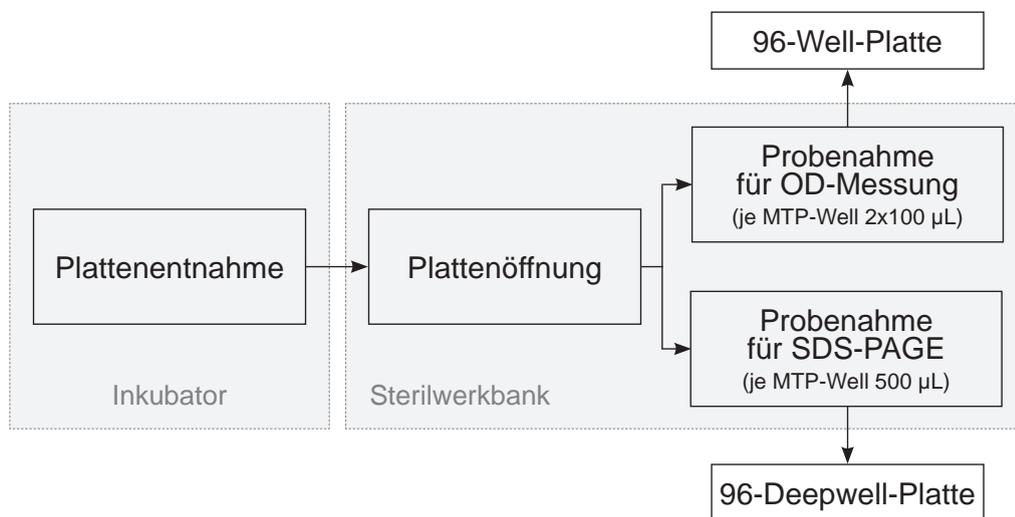


Abb. 3.10: Ablauf der Probenahme von MTP-Entnahme bis zum Transfer in Messmatrizes.

Sämtliche Probenahmen erfolgen durch elektrische Multikanalpipetten der Fa. *Mettler Toledo* (*Rainin*, s. Tab. 3.24), wobei ein spezifisches Volumen entnommen wird. Für eine Einfachbestimmung der optischen Dichte ist ein Volumen von 100 µL notwendig. Da eine Doppelbestimmung erfolgt, ist dieses Volumen jedem Fermentationswell zweifach zu entnehmen. Durch die verwendete 8-Kanal-Multikanalpipette ist ein einfacher Transfer vom MTP-Format in eine zur OD-Messung eingesetzten *96-Well Microplate* (MP) möglich³. Das angewandte Messverfahren ist in 3.5.2 *Optische Dichte* dargestellt.

Tab. 3.24: Equipment und Verbrauchsmaterial zur Probenahme und Vorlage in spezifische Analytikmatrix.

Material	Hersteller (Typbez.)	Spezifikation	Zweck
<i>96-Deepwell Plate</i> (DWP)	<i>Eppendorf</i> (0030501233)	96 Wells, je 30–1000 µL Arbeitsvolumen	Probenvorlage und Probenlagerung für die SDS-PAGE-Analytik
<i>96-Well Microplate</i> (MP)	<i>Thermo Scientific Nunc</i> (269620)	96 Wells, <i>F-Bottom</i>	Probenvorlage für die OD-Messung
Multikanalpipette (el.)	<i>Rainin</i> (E3-8-1200R u. E3-8-200R)	8-Kanäle, 20–200 u. 100–1200 µL	Probennahme unter der Sterilwerkbank
Pipettentips	<i>Rainin</i> (GP-L250S u. RT-L1200F)	max. 250 u. 1200 µL	Sterile Probennahme

³MTP und MP bezeichnen i.d.R. identisches Equipment, werden zur Unterscheidung im Folgenden jedoch differenziert (MTP: 24-Deepwell Fermentationsmatrix, MP: 96-Well Analysematrix).

Um die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE-Analytik effektiv und systematisch durchführen zu können, werden die Proben in eine *96-Deepwell Plate (DWP)* der Fa. *Eppendorf* überführt. Da pro Probenahme aus zwei Fermentations-MTPs zeitgleich 48 Proben anfallen und gehandhabt werden müssen, ermöglicht das 96-Well-Format eine wesentlich schnellere Handhabung der Proben, als mit gewöhnlichen Eppendorf-Tubes. Die Erprobung und Umstellung des Verfahrens auf DWPs erfolgt im Rahmen dieser Arbeit.

Der verwendete DWP-Typ (0030501233) ist in Abb. 3.11 skizziert und besitzt ein Arbeitsvolumen von je 1000 μL pro Well. Die Grundfläche der Wells ist konisch konzipiert, wodurch sich abzentrifugierte Zellpellets leichter resuspendieren lassen.

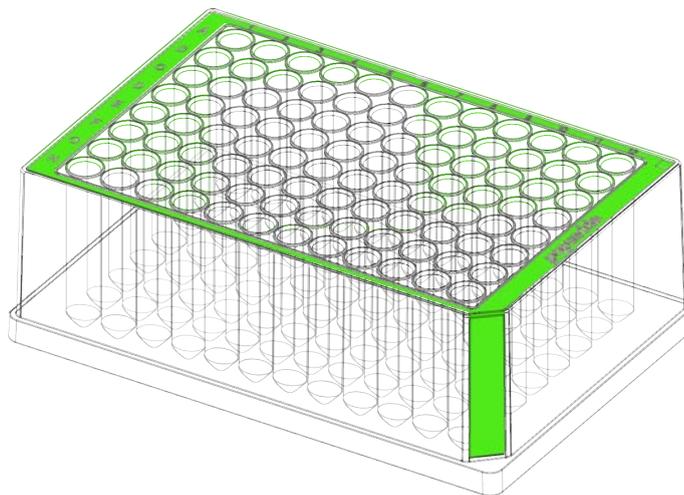


Abb. 3.11: Schematische Zeichnung der verwendeten 1000 μL Deepwell-Platten mit einer 8x12 Matrix, Abb. erstellt nach [10].

Der Probentransfer in die DWP erfolgt wiederum mit einer elektrischen *Rainin*-Mehrkanalpipette (Tab. 3.24). Pro MTP-Well werden 500 μL abgenommen und in die DWP überführt.

Zu diesem Zeitpunkt der Probenahme werden die Doppelfermentationswells durch den Transfer in zwei DWPs getrennt. So entstehen im Prinzip zwei identische Probenahmeplatten (Probenplatte A und Probenplatte B) mit der selben Belegung. In der anschließenden Zielproteinbestimmung wird i.d.R. nur auf eine Probenplatte zurückgegriffen (A- bzw. B-Proben). Diese Proben werden analysiert und stehen als repräsentatives Ergebnis für die Doppelfermentationen zur Verfügung. Die zweite DWP dient als Rückstellmuster.

Zur Vorbereitung auf die nachfolgende chemische Zellyse, bzw. zur Probenlagerung, werden die DWPs direkt nach Befüllung mit 3760 g bei 4 °C 30 min zentrifugiert. Eine höhere RZB ist aufgrund des verfügbaren Rotors nicht möglich. Über die Laufzeit wird das entstehende Zellpellet komprimiert. Die Festigkeit reicht danach aus, um den Überstand sauber abzunehmen. Das verwendete Equipment ist in Tab. 3.25 aufgeführt.

Die Überstandabnahme erfolgt unter Verwendung einer halb-automatischen Multikanalpipette von *Rainin* (Typ EA8-1200XLS) in Kombination mit ineinander gesteckten Pipettenspitzen von *Rainin* (Typ RT-L1200, 1200 μL) und der Fa. *Eppendorf* (Typ 0030073.363, 10 μL). Die aufgesetzten 10 μL Pipettenspitzen ermöglichen eine exakte, nahezu vollständige Abnahme des Überstandes. Der Überstand wird verworfen und die Platten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 3.25: Equipment zur Durchführung der Abzentrifugation der Zellsuspension.

Equipment	Hersteller (Typbez.)	Spezifikation	Zweck
Ausschwingrotor	<i>Heraeus</i> (6445)	max. RZB von 3760 <i>g</i>	Rotor für Mikroplattenschaukel
Mikroplattenschaukel	<i>Thermo Scientific</i> (75006449)	-	Zentrifugeneinsatz für Mikrotiterplatten
Zentrifuge	<i>Heraeus</i> (<i>Multifuge 3 S-R</i>)	kühlbar	Abzentrifugieren der Kulturbrühenproben

3.5.2 Optische Dichte

Um das Wachstumsverhalten der Bakterien zu ermitteln wird die optische Dichte bei 600 nm, OD_{600} , über zwei verschiedene Verfahren gemessen, welche beide auf dem Prinzip der Durchstrahlungsmessung beruhen. Um Einzelproben zu untersuchen dient ein übliches Küvetten-Photometer. Für parallel zu vermessene Proben im Multiplatten-Format steht ein Multireader zur Verfügung. Es können auf diese Art und Weise bis zu 96 Proben gleichzeitig gemessen werden.

OD_{600} der Vorkultur

Die Messung der Absorption erfolgt in Küvetten im Photometer per Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 600 nm. Gemessen wird lediglich zum Ende der Vorkultivierung unmittelbar vor der Inokulation der Hauptfermentation. Absorptionswerte zwischen 0.1 und 0.5 liegen im linearen Bereich des verwendeten Messsystems. Liegen die Werte oberhalb von 0.5 wird mit dem jeweiligen reinen Vorkulturmedium verdünnt (max. 1:10 pro Verdünnungsschritt). Der Leerwertabzug erfolgt ebenfalls gegen reines Vorkulturmedium. Die verwendeten Materialien zur Bestimmung der optischen Dichte sind in Tab. 3.26 aufgeführt.

Die ermittelte optische Dichte einer Vorkultur (OD_{VK}) dient zur Berechnungen der Anfangs-OD (OD_0) nach der Inokulation der MTPs.

Tab. 3.26: Material zur Bestimmung der optischen Dichte von Vorkulturen.

Material	Hersteller (Typbez.)	Spezifikation	Zweck
Küvetten	<i>Sarstedt</i> (67.742)	10 mm, 1000 µL	Matrix zur Probenvorlage
UV-Vis- Spektralphotometer	<i>Amersham Biosciences</i> (<i>Ultrospec 3300 pro</i>)	Küvetten- reader	Bestimmung optischer Dichten von Vor-kulturen

OD₆₀₀ der Hauptkultur

Die Messung der optischen Dichte der Hauptkultur muss für eine Vielzahl von Proben zeitgleich und schnell erfolgen. Die Proben liegen mit einem Volumen von je 100 µL in einer 96-Well-Platte vor. Dies ermöglicht den Messvorgang im Photometer *MultiSkan GO* der Fa. *Thermo Scientific*.

Identisch zur Küvettenmessung wird in einem Absorptionsbereich bis 0.5 gemessen. Durch das geringe Probenvolumen von 100 µL und einer entsprechend geringen Schichtdicke liegen die Absorptionswerte oft unter 0.1. Erst bei höheren Zelldichten werden Absorptionen von ≥ 0.1 erreicht. Oberhalb von Absorptionswerten mit 0.5 wird mit Kulturmedium (Minimalmedium) verdünnt. Da sich die Proben in einem üblichen 96-Well-Format befinden, erleichtern Multikanalpipetten die Arbeit. Mit Multikanalpipetten der Fa. *Eppendorf* vom Typ T27870 und T30966 werden Verdünnungen von höchstens 1:10 pro Verdünnungsschritt durchgeführt. Das Endvolumen zur Vermessung muss stets 100 µL betragen, da die Messung schichtdickenabhängig ist. In Tab. 3.27 sind die verwendeten Materialien und Geräte zusammengefasst.

Tab. 3.27: Material zur Bestimmung der optischen Dichte im MP-Format.

Material	Hersteller (Typbez.)	Spezifikation	Zweck
<i>96-Well Microplate (MP)</i>	<i>Thermo Scientific Nunc</i> (269620)	96 Wells, <i>F-Bottom</i>	Matrix zur Probenvorlage
Multikanalpipetten	<i>Eppendorf</i> (T27870 u. T30966)	8-Kanäle, 5–50 µL und 30–300 µL	Probentransfer und Verdünnung
UV-Vis- Spektralphotometer	<i>Thermo Scientific</i> (<i>MultiSkan GO</i>)	MP-Reader	Bestimmung optischer Dichten von Kulturbrühen in Mikrotiterplatte

Die OD-Messung erfolgt als Doppelbestimmung. Eine komplett belegte 24-Well-MTP füllt somit die Hälfte einer 96-Well-MP. Zusätzlich ist die Vorlage von sterilem Minimalmedium zur Bestimmung des Leerwertes notwendig, falls keine Blanks in den MTPs vorliegen.

Ist die Belegung der Platte abgeschlossen, folgt ein einprogrammierter Prozesslauf im Multireader gemäß Abb. 3.12.

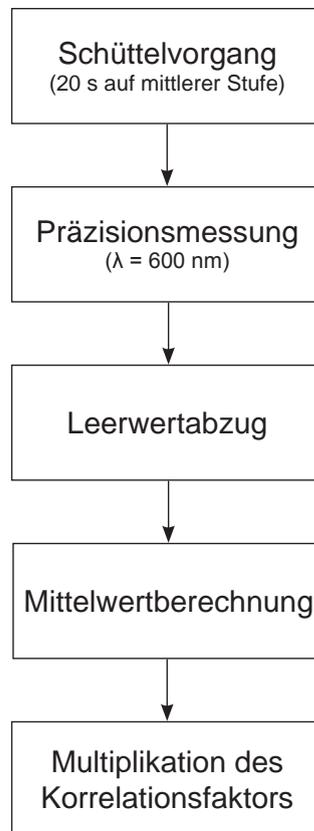


Abb. 3.12: Eingerichteter Prozesslauf des Multireaders zur Vermessung und Berechnung der Zellsuspension-ODs im 96-Well-Format.

Zur Homogenisierung der Zellsuspensionen wird die Platte im Multireader auf mittlerer Stufe 20 Sekunden lang geschüttelt. Oberflächenspannungseffekte werden dadurch zusätzlich reduziert. Es folgt die Präzisionsmessung durch ein vertikales Einstrahlmessprinzip. Die Lichtquelle des Multireaders ist eine Xenon-Lampe. Im Folgenden wird die Berechnung – nach Gl. (2.6) und Gl. (2.7) – zur Ermittlung der optischen Dichte durchgeführt (s. 2.4.1 *Optische Dichte*).

Um die Vergleichbarkeit zwischen den gemessenen Absorptionen des Küvettenphotometers und des Multireaders zu ermöglichen, wird ein Korrelationsfaktor (KF) berechnet. Wie unter 2.4.1 *Optische Dichte* aufgezeigt, ist die Extinktion Gl. (2.5) nach dem Lambert-beerschen Gesetz unter anderem abhängig von der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers.

Alle gemessenen Absorptionswerte werden durch den erstellten Korrelationsfaktor auf eine Schichtdicke von 10 mm normiert (Küvettschichtdicke). Die Korrelationsgerade wird durch die parallele Vermessung einzelner Vorkulturproben in Mineralmedium im Küvettenphotometer sowie im Multireader aufgenommen. Die Werte verhalten sich im gemessenen Absorptionsbereich von 0.1 bis 0.5 zueinander linear. Für ein Probenvolumen von 100 μL in den MP-Wellen und dem verwendeten Mineralmedium ergibt sich ein Korrelationsfaktor KF von 5.90 (Abb. 3.13). Dieser wird verwendet, um die Messwerte des MultiSkans, $OD_{600, \text{MultiSkan}}$, in die theoretischen Messwerte des Küvettenphotometers, $OD_{600, \text{Photometer}}$,

$$OD_{600, \text{Photometer}} = \text{KF} \cdot \overline{OD}_{600, \text{MultiSkan}}, \quad (3.4)$$

umzurechnen.

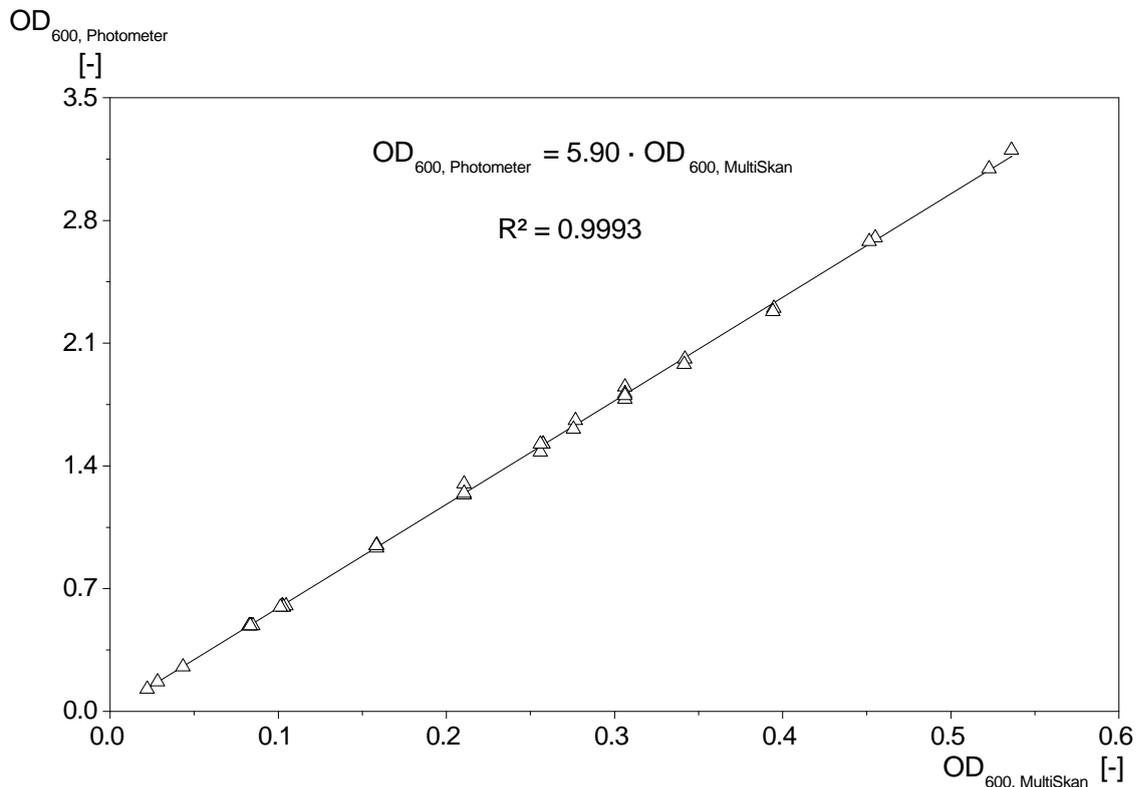


Abb. 3.13: Korrelationsgerade zur Umrechnung der gemessenen OD_{600} -Werte zwischen MultiSkan zu Photometer.

3.5.3 Chemische Zelllyse und SDS-PAGE

Neben der Betrachtung des Wachstums der Zellen steht die Expressionsauswertung im Vordergrund. In Abb. 3.14 ist der Vorgang von der bereits beschriebene Probenahme und Zentrifugation bis zur SDS-PAGE schematisch dargestellt.

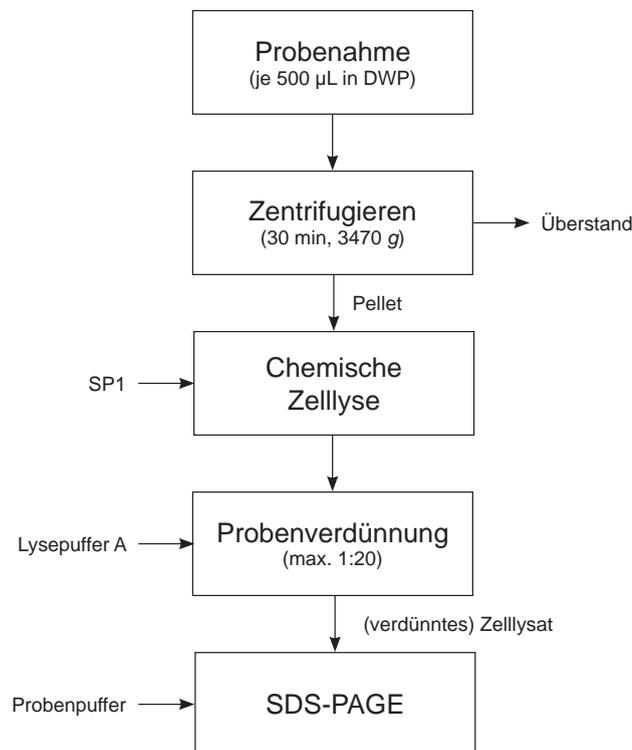


Abb. 3.14: Darstellung des Vorgangs vom Zeitpunkt der Probenahme über die Zelllyse bis zur anschließenden SDS-PAGE.

Die Zelllyse ist zur Konzentrationsbestimmung der cytosolisch exprimierten Proteine essentiell. Zur Anwendung kommt eine schnelle und effektive chemische Methode, die die Zelle mittels 8 M Harnstoff aufschließt. Dies ermöglicht die parallele Bearbeitung vieler unterschiedlicher Proben.

Die Proben liegen nach 3.5.1 *Probenahme und Probenvorbereitung* in der *96-Deepwell Plate* als Zellpellets eingefroren bei -20 °C vor. Vor der Zelllyse sind diese auf Raumtemperatur zu bringen. Der Zellaufschluss erfolgt mit dem Solubilisierungspuffer *SP1* (s. Tab. 3.28).

Mit *Combitips® plus* (Typ 0030069.269) und einer *Multipette®* (Typ 1613518) der Fa. *Eppendorf* wird jedes Pellet in 500 µL *SP1* resuspendiert. Durch die Zugabe von 500 µL Puffer ergibt sich eine leichte Verdünnung, da das Volumen des Zellpellets vernachlässigt wird. Bei einem maximalen Pelletvolumen von 50 µL vernachlässigt ergibt sich ein Fehler von bis zu 10%, der in Kauf genommen wird.

Auf einem Thermomixer *comfort* mit speziellem *MTP*-Aufsatz der Fa. *Eppendorf* wird die DWP bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 1300 rpm mindestens 20 Minuten bewegt. Falls die Resuspension danach nicht vollständig erfolgt ist, erfolgt eine leichte Erwärmung der Proben im Thermomixer auf 30 °C bei gleichzeitiger Rotation. Insgesamt beträgt die Inkubationszeit, in der das Zellpellet in Kontakt mit dem SP1 steht, mindestens 45 und maximal 60 Minuten. Anschließend werden die Proben weiter für die SDS-PAGE-Analytik vorbereitet. Sämtliche Materialien für die chemisch Zelllyse sind in Tab. 3.28 aufgelistet.

Tab. 3.28: Material zur Durchführung der chemischen Zelllyse.

Material	Hersteller (Bez./ Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
Solubilisierungspuffer (<i>SP1</i>)	RHB (B000-004)	8 M Harnstoff, 100 mM Tris-HCl, 50 mM DTT, pH 8.0	Solubilisierung von Zellmembranproteinen
<i>Combitips® plus</i>	<i>Eppendorf</i> (0030069.269)	10 mL	Pipettieren von <i>SP1</i>
<i>Multipette®</i>	<i>Eppendorf</i> (1613518)	-	Pipettieren von <i>SP1</i>
Thermomixer	<i>Eppendorf</i> (<i>comfort</i>)	bis 1400 rpm, bei Bedarf aufheizbar	Schütteln der DWPs zur Pelletresuspension
Thermoblock	<i>Eppendorf</i> (<i>MTP</i>)	-	DWP-Aufsatz für Thermomixer

Im direkten Anschluss an die chemische Zelllyse erfolgt die weitere Vorbereitung zur SDS-PAGE-Analytik. Eine Unterbrechung des Analytikvorgangs ist an dieser Stelle mit den verwendeten *E. coli*-Stämmen und deren exprimierten Zielproteinen nicht möglich, da die Zielproteine in gelöster und freier Form im Solubilisierungspuffer degradieren.

Um per SDS-PAGE die Zielproteinkonzentration zu bestimmen, sind klare Gelbilder und vor allem eindeutige, jedoch nicht zu hoch konzentrierte, Zielproteinbanden notwendig. Aufgrund des geringen zellspezifischen Produktgehalts kann das Zelllysate der B117-Stämme unverdünnt für die SDS-PAGE-Analytik verwendet werden. Die B080-Lysate werden in einem Standardverfahren auf eine OD von etwa 1 verdünnt. Dazu werden die zuvor gemessenen OD-Werte herangezogen, um das jeweilige Probenzelllysate entweder 1:2, 1:5, 1:10 oder maximal 1:20 zu verdünnen. Ist die gemessene OD nicht größer als 1.5 wird von einer Verdünnung abgesehen.

Zur Probenverdünnung wird Lysepuffer A (20 mM Tris-HCl, 5 mM Na-EDTA, pH 7.4) verwendet. Die Verdünnung erfolgt in den 48 nicht benutzten Wells der selben Probenplatte in der auch die Zellyse zuvor stattfand. Dies spart Ressourcen und hilft die Übersicht bei der Vielzahl der Proben zu wahren. Die entsprechenden Verdünnungsvolumina werden mit einer Einkanalpipette in der DWP vorgelegt und anschließend mit der Mehrkanalpipette von *Eppendorf* (Typ T30966) 50 μL des Zelllysats hinzugegeben. Die verwendeten Verdünnungen und entsprechende Volumina sind in Tab. 3.29 aufgeführt.

Tab. 3.29: Übersicht der verwendeten Verdünnungsfaktoren (VF) und entsprechenden Pipettierolumina zur Vorbereitung der SDS-PAGE-Proben.

VF	Lysepuffer A [μL]	Zelllysats [μL]
1	0	50
2	50	50
5	200	50
10	450	50
20	950	50

Nach erfolgter Zellyse und ausreichender Verdünnung werden die Proben mit einem Probenpuffer für die reduzierende SDS-PAGE versetzt. Dazu sind von der Fa. *Invitrogen* zwei Pufferkomponenten vorgesehen (Tab. 3.30), der Probenpuffer (*LDS Sample Buffer*) und das Reduktionsreagenz (*Sample Reducing Agent*).

Tab. 3.30: Verwendete Chemikalien für die SDS-PAGE.

Chemikalie	Hersteller (Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
Probenpuffer (<i>LDS Sample Buffer</i>)	<i>Life Technologies</i> (NP0007)	4x konzentriert, mit LDS und Glycerin, pH 8.4	Negation der Protein- ladung und Denatu- rierung
Reduktionsreagenz (<i>Sample Reducing Agent</i>)	<i>Life Technologies</i> (NP0009)	10x konzentriert, mit 500 mM DTT	Reduzierung von Di- sulfidbrücken

Für die Quantifizierung des Zielproteins werden Proteinstandards eingesetzt. Dabei werden immer mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen aufgetragen. Das B080-Protein wird gegen BSA quantifiziert, für das B117-Protein liegt aufgereinigtes Zielprotein vor. Zur Bestimmung der Molekülgrößen wird der *Broad Range Marker* der Fa. *Life Technologies* genutzt. In Tab. 3.31 sind die verwendeten Standards aufgeführt.

Tab. 3.31: Verwendete Proteinstandards und Marker.

Proteinstandards	Hersteller (Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
<i>Broad Range Marker</i>	<i>Invitrogen (P6649)</i>	6.5 bis 205 kDa	Molekulargewichtsstandard
BSA	<i>Thermo Scientific (23209)</i>	2 mg mL ⁻¹	Quantifizierung von Proteinbanden (B080)
B117	RHB (-)	6 mg mL ⁻¹	Quantifizierung von Proteinbanden (B117)

Sämtliche Proben, Proteinstandard sowie der Marker werden mit Probenpuffer versetzt. Dieses erfolgt in einer hitzestabilen 96-Well-Platte (*Sarstedt, 96 Well PCR DuoPlates*). Pro Well werden 26 µL Zellysate mit 14 µL Probenpuffer gemischt. Die Referenzen werden gleichermaßen gemischt, zusätzlich jedoch entsprechend ihrer Gel-Auftragungsmasse zuvor mit Reinstwasser verdünnt. Aufgetragen werden Referenzproteinmengen zwischen 0.2 und 1.0 µg. Nach vollständiger Belegung der Platte wird diese mit Alu-Klebefolie (*Sarstedt, Typ 951.995*) verschlossen, um Verdunstungsverluste beim Erhitzen zu vermeiden. Das verwendete Equipment ist in Tab. 3.32 aufgeführt.

Tab. 3.32: Verwendetes Equipment zur unmittelbaren Probenvorbereitung zur SDS-PAGE.

Equipment	Hersteller (Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
<i>96 Well PCR DuoPlates</i>	<i>Sarstedt (721.962.202)</i>	8x12 Matrix	Probenmatrix zur Erhitzung der SDS-Proben
Alu-Klebefolie	<i>Sarstedt (951.995)</i>	-	Abdeckung der <i>96 Well PCR DuoPlates</i>
<i>Combitips</i>	<i>Eppendorf (0030089.405)</i>	Combitips [®] advanced (0.1 mL)	Vorlegen des reduzierenden Probenpuffers
<i>Mastercycler[®]</i>	<i>Eppendorf (pro)</i>	8 °C s ⁻¹	Erhitzung der Proben
<i>Multipette[®]</i>	<i>Eppendorf (1613518)</i>	Dispenser	Vorlegen des reduzierenden Probenpuffers
Zentrifuge	<i>Heraeus (Multifuge 3 S-R)</i>	-	Aufkonzentrierung der Proben nach Erhitzung

Zur Denaturierung der Proben erfolgt eine Erhitzung der Proben auf 99 °C mit 10 Minuten Haltezeit durch einen einprogrammierten Prozessablauf im Thermocycler der Fa. *Eppendorf (Mastercycler®)*. Anschließend wird mit der *Multifuge 3 S-R (Heraeus)* die abkühlende 96-Well-Platte kurz zentrifugiert. Im Anschluss können die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Die SDS-PAGE wird mit 10% Bis-Tris Fertigele der Fa. *Life Technologies* durchgeführt. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Als Laufpuffer dient ein MES-Puffer. In eine separate Anodenkammer, die im Kontakt mit den Probentaschen steht, wird ebenfalls MES-Puffer gefüllt. Zusätzlich wird in die Anodenkammer ein Antioxidationsmittel der Fa. *Life Technologies* (500 µL auf 200 mL Puffer) zugesetzt. Das Equipment zur Durchführung der SDS-PAGE ist in Tab. 3.33 aufgeführt.

Tab. 3.33: Verwendetes Equipment zur Durchführung der SDS-PAGE.

Equipment	Hersteller (Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
<i>Antioxidant</i>	<i>Life Technologies</i> (NP0005)	-	Antioxidationsmittel
Coomassie- Brillant-Blau (<i>SimplyBlue™</i> <i>SafeStain</i>)	<i>Life Technologies</i> (LC6065)	<i>Coomassie® G-250</i>	Proteinfärbung
Einkanalpipette	<i>Rainin</i> (Pipet-Lite L20)	2–20 µL	Beladung von Polyacrylamid- Gelen
Elektrophorese- kammer	<i>Hoefer</i> (SE 260)	15-Well-Gele	PAGE-Kammer
Geladapter	<i>Life Technologies</i> (WA0999)	-	Trennung von Anode und Kathode
Gelscanner	<i>biostep</i> (<i>ViewPix® 900</i>)	-	Scannen der gefärbten Gele
MES-Puffer	<i>Life Technologies</i> (NP0005)	50 mM MES, 50 mM Tris, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3	Laufpuffer für PAGE
Polyacrylamid- Gele	<i>Life Technologies</i> (WG1203 u. NP0303)	10% Bis-Tris, 15 o. 26 Wells, NuPAGE® Gel	Matrix zur Proteinauftrennung
Schüttler	<i>Zipperer</i> (Cat ST5)	-	Waschen/ Färben/ Entfärben der Gele
Spannungsquelle	<i>Amersham</i> <i>pharmacia</i> (EPS 601)	-	Spannungs- versorgung

In die Geltaschen werden jeweils 15 μL Probe, 15 μL Protein-Referenz oder 7.5 μL Marker geladen. Die Gelelektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 200 V für 35 Minuten durchgeführt. Nach der Elektrophorese wird das Gel dreimal mit Reinstwasser gewaschen, indem jeweils eine kurze Erwärmung über 60 Sekunden in der Mikrowelle erfolgt. Weitere 60 Sekunden auf dem Schüttler schließen den Vorgang der Vorwäsche ab.

Im Anschluss wird das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt, indem das Gel mit der Färbelösung 60 Sekunden in der Mikrowelle erwärmt wird. Die vollständige Färbung des Gels erfolgt im Anschluss für 20 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wird das Gel 10 Minuten in Reinstwasser entfärbt. Um die Hintergrundfärbung weiter zu reduzieren erfolgt eine Lagerung des Gels in Reinstwasser über mindestens 12 Stunden. Für die weitere Auswertung wird das Gel eingescannt. Die Quantifizierung des Zielproteins erfolgt mittels der Gel Analyse Software *Phoretix 1D* der Fa. *Total Lab*. In Abb. 3.15 ist als Beispiel ein typisches SDS-PAGE Gel dargestellt.

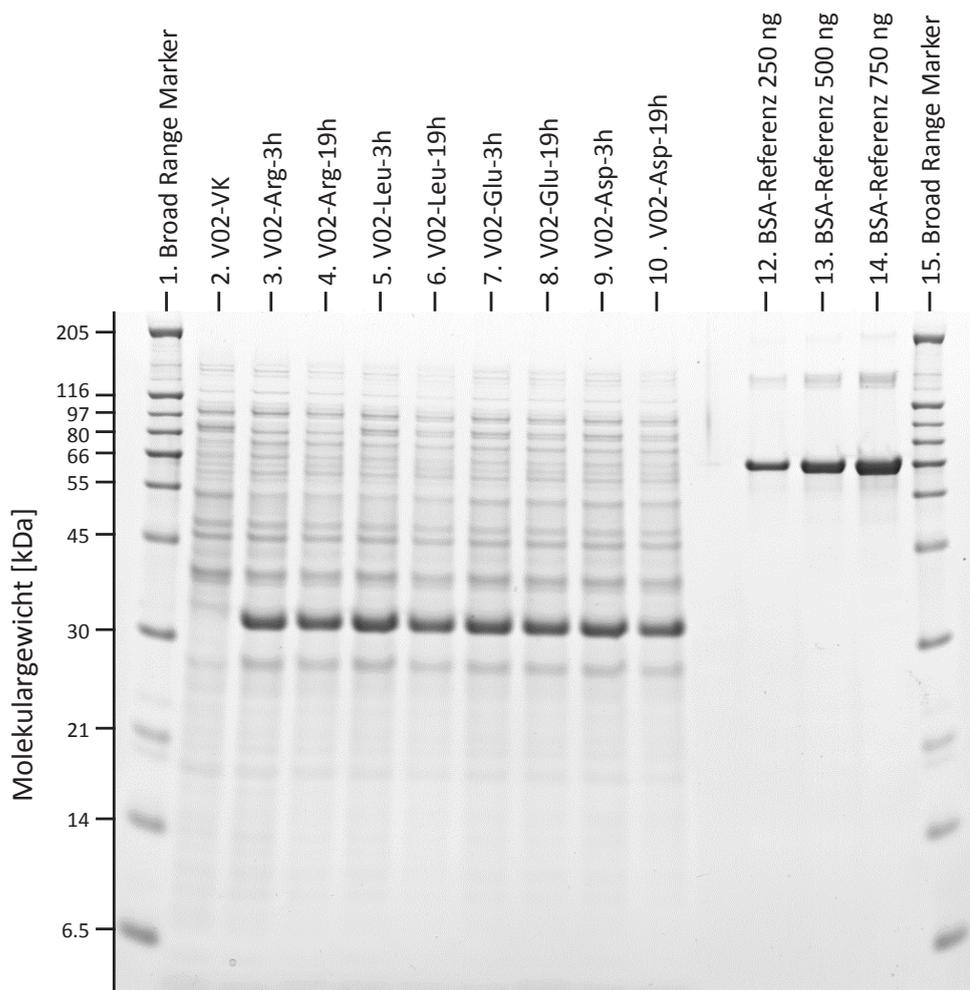


Abb. 3.15: Beispielhaft angefärbtes SDS-PAGE Gel mit aufgetragenen Fermentationsproben aus Versuch V02 des B080-Stammes.

Das abgebildete 15-Well-Gel ist in typischer Art und Weise beladen. Die äußersten Spuren sind durch den *Broad Range Marker* belegt. Weiterführend sind von links nach rechts die Expressionsproben aufgetragen (Spur 3 bis 10). Eine bis zwei Prozessverlaufspröben und eine Probe zum Fermentationsende (*EoF*) werden pro Fermentation analysiert. Die Nomenklatur zur Probenbeschriftung besteht aus der Versuchsnummer (hier V02), der zugesetzten Aminosäure sowie der Expressionslaufzeit. Auf Spur 2 ist zudem eine Vergleichspröbe hinzugefügt, die das Expressionsmuster des B080-Stammes vor der Induktion zeigt (V02-VK). In den Spuren 12 bis 14 ist das Referenzprotein (hier BSA) mit unterschiedlichen Massen, zur Ermittlung der Kalibriergeraden, aufgetragen.

3.5.4 pH-Wert

Zur Bestimmung des pH-Wertes wird, bei Bedarf, am Ende einer Fermentation im MTP-Format eine Mikro-Elektrode verwendet. Ist nur eine grobe Einschätzung des pH-Wertes erforderlich, so wird dieser per pH-Teststreifen kontrolliert. Das für die pH-Messung eingesetzte Material ist in 3.34 aufgeführt.

Tab. 3.34: Verwendetes Equipment zur pH-Messung im MTP-Format.

Equipment	Hersteller (Art.Nr.)	Spezifikation	Zweck
Kalibrierlösung	<i>Mettler Toledo</i> (51302047 u. 51302069)	pH 7.00 und 4.01 (bei 25 °C)	Kalibrierung pH-Meter
pH-Elektrode	<i>WTW</i> (SenTix Mix)	Mikroelektrode	pH-Messung im MTP-Format
pH-Teststreifen	<i>Macherey- Nagel</i> (92118)	pH-Fix 2.0–9.0	pH-Schnelltests
Präzisions-pH- Meter	<i>WTW</i> (inoLab Cond Level 2)	-	Messstation für pH-Messung
Temperaturelektrode	<i>WTW</i> (TFK 325)	Mikroelektrode	Temperaturmessung

4 Experimenteller Teil

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Fermentationen ausgewertet und diskutiert. Dabei werden die beiden *E. coli*-Stämme B080 und B117 getrennt betrachtet. Die Kultivierungen mit dem B080-Stamm umfassen neun Batch- und Fed-Batch Prozesse im MTP-Format sowie drei Fed-Batch Fermentationen im 1-Liter-Maßstab. Der B117-Stamm wird im MTP-Batch-Verfahren in sechs Läufen und als Fed-Batch-Prozess einmalig im 1-Liter-Maßstab kultiviert.

Tab. 4.1 (B080-Stamm) und Tab. 4.2 (B117-Stamm) geben eine Übersicht über die durchgeführten Versuche und deren jeweiligen Ziele. Die detaillierte Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse ist in den folgenden Abschnitten dargestellt. Jeder Kultivierungslauf ist durch eine V-Nummer gekennzeichnet (MTP-Versuche mit V01 bis V14, 1-Liter-Versuche mit V15 bis V18). Ein einzelner MTP-Versuch umfasst dabei Fermentationen in jeweils zwei Mikrotiterplatten die gleichzeitig durchgeführt werden.

Tab. 4.1: Übersicht der durchgeführten Fermentationen mit dem B080-Stamm.

Versuch	Prozessverfahren (Format)	Ziele
V01	Batch (MTP)	Vorversuch, Betrachtung des Wachstumsverhaltens
V02	Batch (MTP)	1. Expressionsversuch
V03	Batch (MTP)	Reproduktion von V02
V04	Batch (MTP)	2. Expressionsversuch mit geringerer Induktions-OD im Vgl. zu V02 u. V03
V05	Batch (MTP)	3. Expressionsversuch, reduzierte c_{ASi}
V06	Batch (MTP)	4. Expressionsversuch, verschiedene c_{ASi} für ausgewählte AS
V07	Fed-Batch (MTP)	Vorversuch zur Testung von FeedBeads in Komplettmedium
V08	Fed-Batch (MTP)	1. Expressionsversuch bei Zufütterung durch drei FeedBeads pro Ansatz
V09	Fed-Batch (MTP)	2. Expressionsversuch, Zufütterung durch ein FeedBead pro Ansatz
V16	Fed-Batch (1-L-Fermenter)	Kultivierung mit Mess- und Regelungsmöglichkeiten, ohne AS-Zusatz
V17	Fed-Batch (1-L-Fermenter)	Kultivierung mit Mess- und Regelungsmöglichkeiten, einzelne AS als Zusatz
V18	Fed-Batch (1-L-Fermenter)	Kultivierung mit Mess- und Regelungsmöglichkeiten, Kombination aus 3 AS als Zusatz

Tab. 4.2: Übersicht der durchgeführten Fermentationen mit dem B117-Stamm.

Versuch	Prozessverfahren (Format)	Ziele
V10	Batch (MTP)	Betrachtung des Wachstumsverhaltens, Verwendung von EAS-Kombinationen
V11	Batch (MTP)	Fortsetzung von V10
V12	Batch (MTP)	Fortsetzung von V11
V13	Batch (MTP)	Expressions- und separate Wachstumsuntersuchung
V14	Batch (MTP)	Reproduktion von V13
V15	Fed-Batch (1-L-Fermenter)	Kultivierung mit Mess- und Regelungsmöglichkeiten, Einsatz einer EAS

4.1 Fermentationen mit dem B080-Stamm

Das *E. coli* BL21-Derivat B080 ist ein auf Minimalmedium gut wachsendes Bakterium, das generell keinen Medienzusatz von essentiellen Wachstumsfaktoren in Form von Aminosäuren benötigt. Ziel der durchgeführten Kultivierungen ist es, spezifische Aminosäuren zu identifizieren, die das Wachstum und die Produktbildung des Stammes auf Minimalmedium verbessern.

4.1.1 Batch-Verfahren zur Wachstumsuntersuchung (V01)

Zur Einschätzung des Wachstumsverhaltens des B080-Stammes wird ein Batch-Versuch durchgeführt. Alle Aminosäuren werden in diesem Vorversuch mit je 200 mg L^{-1} dem Fermentationsmedium zugesetzt. Als Referenz dient das Minimalmedium ohne Aminosäurezusätze, mit dem Zusatz der acht essentiellen Aminosäuren (EAS) sowie mit Zusatz aller 20 proteinogenen Aminosäuren (PAS). Die Aminosäuren liegen alle mit einer Konzentration von 200 mg L^{-1} vor. Die zur Inokulation eingesetzte Vorkultur zeigte eine OD von 4.4 nach 14.5 Stunden (resultierende Anfangs-OD (OD_0) von 0.04).

In Abb. 4.1 sind die offline Messdaten aufgeführt und gegen die Zeit aufgetragen. Nach 6 Stunden Kultivierungszeit ist ein Wachstum von *E. coli* nachweisbar. Ausnahme bildet die Fermentation mit dem Zusatz der PAS, durch welche das Wachstum bereits nach 4 Stunden soweit gefördert wird, dass eine signifikante Zunahme der Extinktion messbar ist. Dieser Effekt ist um etwa eine Stunde verzögert ebenfalls beim Zusatz der EAS zu beobachten.

Ausgehend von der Referenz ohne Aminosäurezusatz (OAS) sind in Abb. 4.1 grafische Einteilungen vorgenommen. Die Messwerte sind nach Aminosäuren gruppiert und farblich von einander getrennt. Die Referenzwerte sind rot dargestellt.

Die Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und Prolinuzsätze setzten sich, wie auch die grünen Aminosäurezusätze, von der optischen Dichte des Nullmediums (0AS) ab. Die grau dargestellte Gruppierung zeigt keine Auswirkungen auf das Zellwachstum im Vergleich zum Nullmedium. Die Referenzen PAS und EAS fördern im Vergleich das Wachstum eindeutig. Wachstumsinhibierend wirken hingegen die Aminosäuren Leucin, Alanin und Histidin.

Vorversuch V01 zeigt, dass die OD-Werte bei Einzelzugabe der Aminosäuren über einen Zeitraum von 6 Stunden im Bereich zwischen 0.6 und 1.4 liegen (in Abb. 4.1 markiert). Diese Einschätzung ist wichtig, um in folgenden Batch-Versuchen zur Expressionsuntersuchung die Induktion per Temperaturerhöhung bei möglichst ähnlichen OD-Werten durchzuführen. Es wird festgelegt, dass die minimale und maximale OD zum Induktionszeitpunkt nicht mehr als 1.5 voneinander abweichen darf. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wird für folgende Expressionsversuche eine verzögerte Inokulation der Medien definiert, in denen die PAS oder EAS zugesetzt sind. Es wird festgeschrieben, dass in Gegenwart der EAS 1 Stunde und bei PAS 2 Stunden später inokuliert wird. Zum Induktionszeitpunkt liegen die OD-Werte, bezogen auf den Vorversuch, in einem vergleichbaren theoretischen Bereich zwischen 0.6 und 2.0.

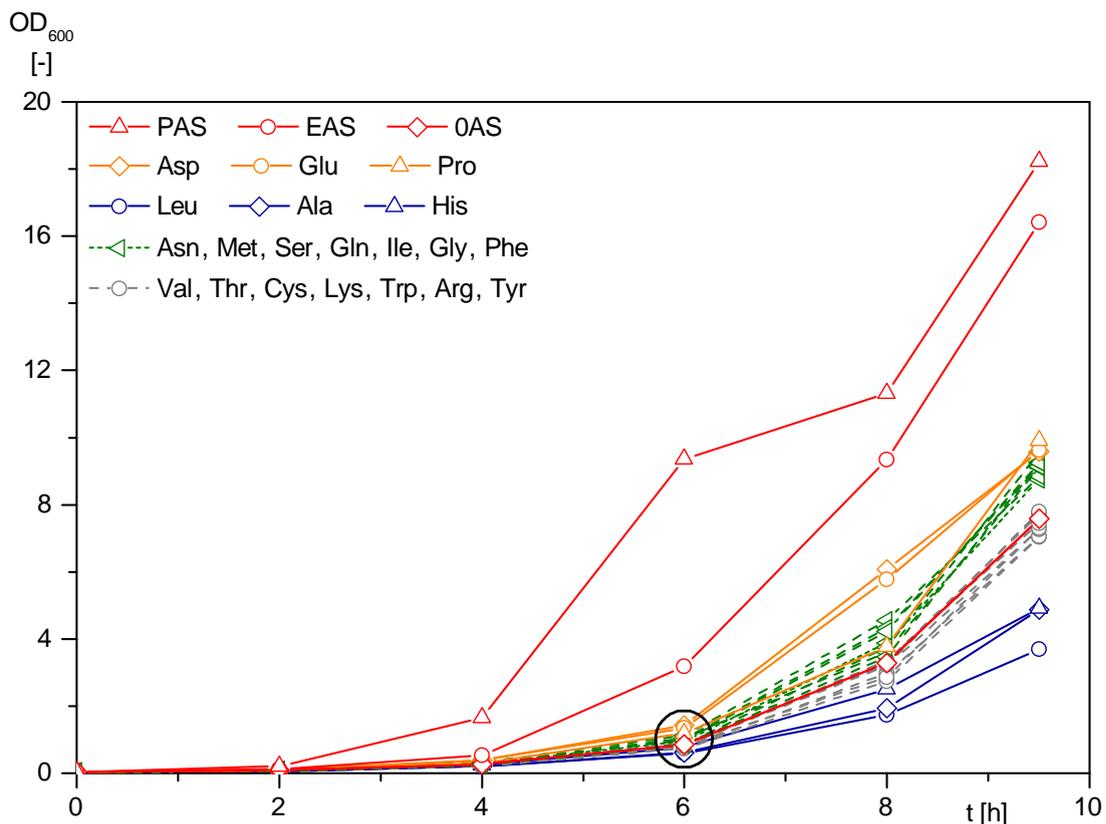


Abb. 4.1: Wachstumskurven des B080-Stammes unter Einfluss von Aminosäurezusätzen mit einer Konzentration von je 200 mg L^{-1} . U.a. mit 20 proteinogenen Aminosäuren (PAS), 8 essentiellen Aminosäuren (EAS) und ohne Aminosäurezusatz (0AS).

4.1.2 Batch-Verfahren zur primären Expressionsanalyse (V02 bis V06)

Die Versuche V02 bis V06 bilden zusammen eine Experimentabfolge, welche die Zielproteinexpressionsfähigkeit des B080-Stammes unter Aminosäureeinfluss im Batch-Verfahren herausstellen soll. Hierzu werden die Aminosäuren, einzeln unter verschiedenen Bedingungen, hinzugesetzt (variable c_{ASi} , reduzierte Inokulations-ODs) sowie spezifische Gruppierungen nach Lederberg (1950) eingesetzt [20]. Die genauen charakteristischen Merkmale sind in Tab. 4.3 aufgeführt. Die Bewertung der Versuche erfolgt nach den ersten 4 Läufen. V06 ist der abschließende Batch-Versuch für den B080-Stamm.

Tab. 4.3: Charakteristische Merkmale der Versuche V02 bis V06 im Batch-Verfahren zur Expressionsuntersuchung.

Versuch	AS (c_{ASi} [mg L^{-1}])	OD_{VK} [-]	t_{VK} [h]	OD_{Ind} [-]	t_{Ind} [h]
V02	PAS einzeln, PAS, EAS (200)	8.9	15.0	0.1–2.3	5.0
V03	PAS einzeln, PAS, EAS (200)	10.0	15.0	1.1–2.2	5.0
V04	PAS einzeln, PAS, EAS (200)	2.4	13.8	0.3–0.7	5.0
V05	PAS einzeln (50), Glu (400), 4 AS-Klassen [20]	10.9	14.5	0.9–1.7	4.0
V06	Arg, Asp, Pro, Ser, Thr (100, 300, 400), 2 AS-Klassen (200, 400), Glu (50, 100, 300, 1000)	8.3	13.3	1.2–1.8	4.0

In V01 wurden die Wachstumskurven des B080-Stammes bei verschiedenen Aminosäurezusätzen ermittelt. Die Ergebnisse der folgenden Versuche werden durch eine kombinierte Ansicht von erreichten OD-Werten nach der Temperaturinduktion und die jeweiligen Zielproteinkonzentrationen dargestellt. Die erste Probenahme erfolgt stets nach 3 Stunden Expression. Die zweite und letzte Probenahme am Ende der Fermentation der ersten beiden Versuche V02 und V03 erfolgt nach 19 Stunden, in den darauf folgenden Versuchen nach bereits 6 Stunden Expression. Die Aminosäuren sind in den Abbildungen aufsteigend sortiert in Abhängigkeit der erreichten Zielproteinkonzentration zum EoF-Zeitpunkt.

Versuch V02

Die Kultivierung wird mit einer theoretischen Anfangs-OD von 0.1 begonnen. Aufgrund der Ergebnisse im Vorversuch werden die Medien mit den EAS und den PAS verzögert inokuliert. Die Aminosäurekonzentrationen sind mit 200 mg L^{-1} identisch zu V01. Bei den Fermentationen mit den Aminosäuren Phenylalanin, Prolin, Lysin und Threonin sind dabei Inokulationsfehler unterlaufen. Die Experimente mit Prolin und Threonin wurden mit dem doppelten Volumen, die Phenylalanin und Lysin Kultivierungen hingegen 2.5 Stunden später inokuliert. Diese Werte werden im abschließenden Bewertungssystem ausgelassen. In den verbleibenden Kultivierungen sind nach 5 Stunden Inkubation OD-Werte

zwischen 0.1 und 2.3 nachweisbar. Dies entspricht nicht der festgelegten Bedingung, dass eine maximale Differenz der optischen Dichten von 1.5 zum Induktionszeitpunkt vorliegen darf. Histidin und Cystein weisen nach 5 Stunden optische Dichten von 0.1 bis 0.2 auf (s. Anhang) und inhibieren das Wachstum damit stark. Werden diese Ergebnisse nicht in die Bewertung mit einbezogen, so sind zum Induktionszeitpunkt optische Dichten zwischen 1.2 und 2.2 feststellbar. Dies entspricht der definierten Bedingung.

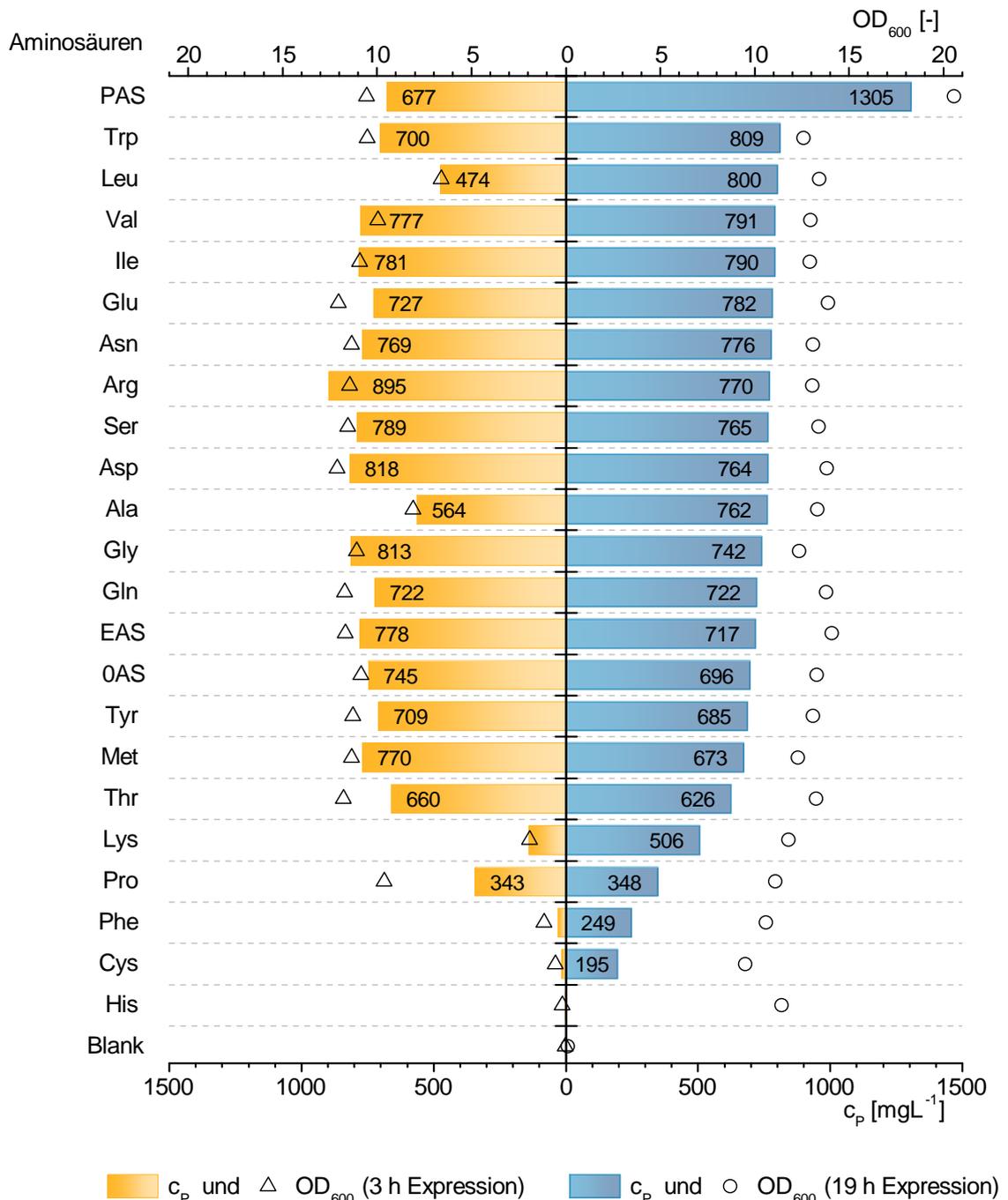


Abb. 4.2: V02 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte. Zugesetzt sind neben den PAS, EAS und 0AS alle einzelnen Aminosäuren mit $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$. ($OD_0=0.1$, $t_{Ind}=5.0 \text{ h}$, $OD_{Ind}=0.1-2.2$)

In Abb. 4.2 sind die Zielproteinkonzentrationen und OD-Werte nach 3 und 19 Stunden Expression dargestellt. Die im Vorversuch als wachstumshemmend eingestuftes Aminosäuren (Leucin, Alanin und Histidin) zeigen auch nach 3 Stunden Expression eine Hemmung des Wachstums und der Expression. Cystein wirkt ebenso inhibierend. Dennoch zeigen die Versuche mit Leucin und Alanin optische Dichten und Proteinkonzentrationen nach 19 Stunden Expressionszeit, die mit dem Nullmedium vergleichbar sind.

Die Zugabe aller PAS führt zu einer hohen Produktkonzentration von 1.3 g L^{-1} Zielprodukt nach 19 Stunden Expression (0AS führt zu 0.7 g L^{-1}). Eindeutige positive Effekte durch den Zusatz einzelner Aminosäuren auf Wachstum und Produktbildung bleiben allerdings aus.

Versuch V03

Versuch V03 wird als Wiederholungsversuch analog zum ersten Expressionsversuch (V02) ohne Inokulationsfehler durchgeführt. Mit einer Anfangs-OD von 0.1 werden die Kultivierungen begonnen. Zum Induktionszeitpunkt nach 5 Stunden sind optische Dichten zwischen 1.1 und 2.2 nachweisbar. Die maximale Differenz von 1.5 ist hiermit unterschritten und ermöglicht ohne Einschränkungen eine Vergleichbarkeit zwischen den Kultivierungen zum Induktionsstart.

Abb. 4.3 stellt die Versuchsergebnisse dar. Wiederholt sind die inhibierenden Effekte der Aminosäuren Cystein, Histidin und Leucin zu beobachten. Auch Alanin wirkt leicht hemmend auf das Wachstum. Eine anfängliche Hemmung des Wachstums bewirkt gleichzeitig eine niedrige Proteinkonzentration. Nach 19 Stunden Expression ist, wie in Versuch V02, ein vergleichbares Wachstum nachweisbar – der Inhibierungseffekt ist aufgehoben.

Zudem ist hervorzuheben, dass die Proteinkonzentration bei einem Zusatz ohne Aminosäuren (0AS) nach 19 Stunden im Vergleich zur End-OD verhältnismäßig hoch ausfällt. An dieser Stelle muss die Unregelmäßigkeit beim Zusammenhang zwischen Zelldichte und Zielproteinkonzentration hinterfragt werden.

Bei den beiden ersten Versuchsdurchführungen macht sich das gute Wachstumsverhalten auf Minimalmedium des B080-Stammes besonders bemerkbar. Eindeutige und reproduzierbare Expressionsunterschiede durch Aminosäurezusätze sind nicht zu beobachten. Einen besonders positiven Einfluss auf Wachstum und Expression besitzen lediglich die Zusätze in Form der PAS und EAS, wie auch schon in Versuch V01 gezeigt wurde. Eindeutiger ist der bisherige Inhibierungseffekt der oben genannten Aminosäuren.

Um eindeutiger Effekte durch Aminosäurezusätze zu erzeugen werden die Versuchsstrategien angepasst. Zum einen wird die Inokulations-OD einmalig verringert (V04). Damit liegt zum Batch-Start eine höhere Konzentration von Aminosäure pro Zelle vor, wodurch stärkere inhibierende bzw. fördernde Effekte erzeugt werden sollen. Zum anderen wird in einem weiteren Versuch (V05) gegenteilig die Aminosäurekonzentration

auf 50 mg L^{-1} reduziert. Effekte, die durch Überschussreaktionen auftreten, sollen damit vermieden werden. Eine weitere Änderung betrifft die Expressionsphasen. Diese werden auf 6 Stunden verkürzt. Grund dieser Änderung ist die Vermutung, dass der Effekt von zugesetzten Aminosäuren über längere Fermentationszeiten verloren geht, da *E. coli*-Zellen prototroph sind. Der Effekt der zugesetzten Aminosäuren könnte damit ohne Nachfütterung der jeweiligen Aminosäure verloren gehen.

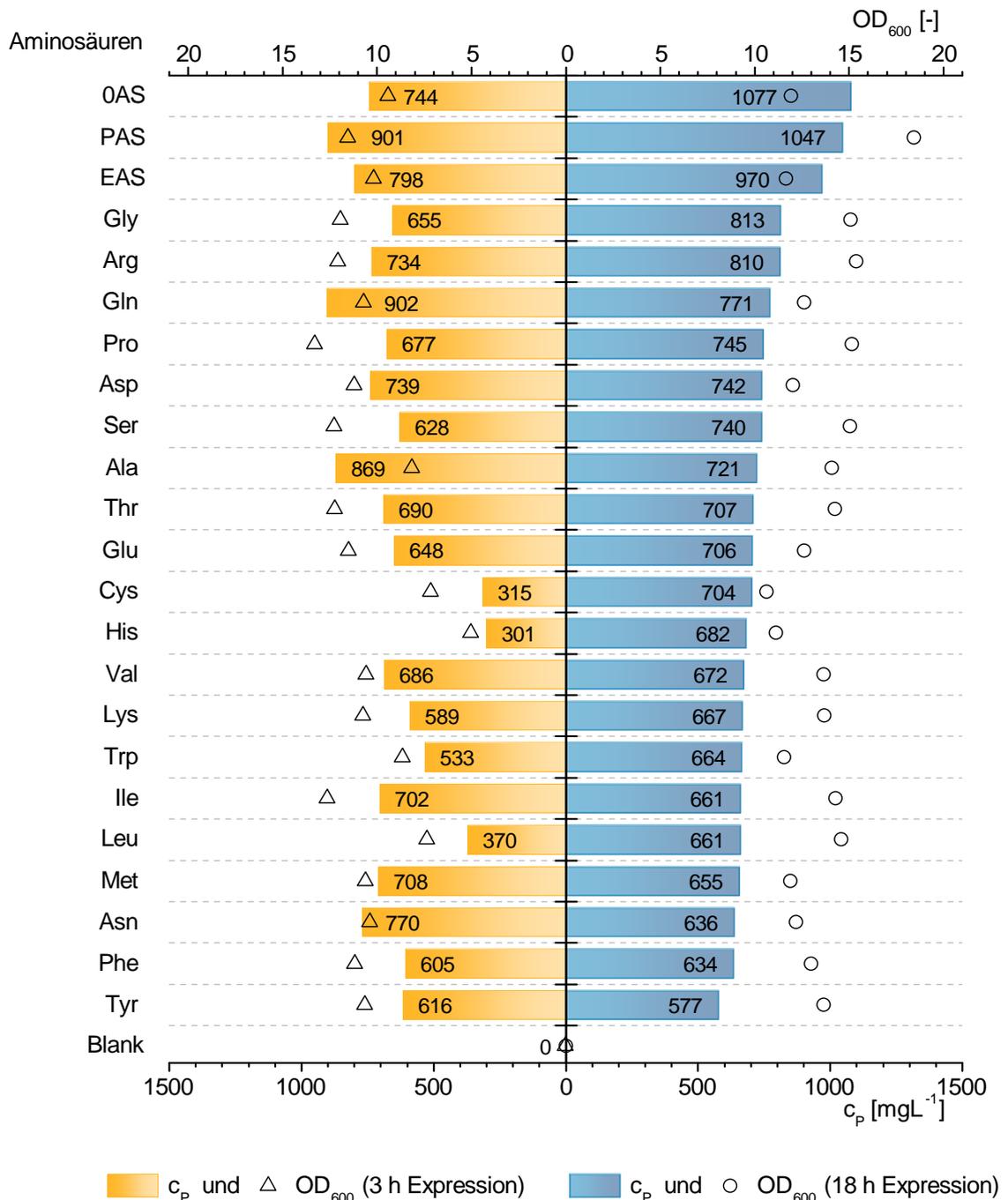


Abb. 4.3: V03 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte. Wiederholung von V02. Zugesezt sind neben den PAS, EAS und OAS alle einzelnen Aminosäuren mit $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$. ($OD_0=0.1$, $t_{ind}=5.0 \text{ h}$, $OD_{ind}=1.1-2.2$)

Versuch V04

Aus den beschriebenen Gründen und Schlussfolgerungen der Versuche V02 und V03 wird die Inokulations-OD in Versuch V04 auf etwa 0.02 reduziert. Die Induktion erfolgt nach 5 Stunden Fermentation bei OD-Werten zwischen 0.3 und 0.7. Die Aminosäurekonzentrationen sind mit 200 mg L^{-1} identisch zu den vorherigen Versuchen. Die Probenahme erfolgt nach 3 und 6 Stunden Expression. Erstmals wird zudem eine pH-Messung zum Fermentationsende durchgeführt (Tab. 4.4), um anaerobe Stoffwechselfvorgänge zu identifizieren.

Abb. 4.4 zeigt die Ergebnisse des Versuchs V04. Nach 3 Stunden Expression sind nahezu vergleichbare Zelldichten und Zellproteinkonzentrationen für alle Ansätze zu erkennen. Eindeutiger sind die Ergebnisse nach 6 Stunden Expression. Die verschiedenen Aminosäuren wirken sich unterschiedlich fördernd oder inhibierend auf das Wachstum und die Expressionsfähigkeit aus. Neben den PAS und EAS fördern Prolin, Asparaginsäure und Glutaminsäure das Zellwachstum und die Produktbildung. Die erzielten optischen Dichten liegen auf dem Niveau des EAS Versuches. Zusätzlich zeigen die Versuche Produktkonzentrationen von etwa 0.7 g L^{-1} .

Wiederholt sind in Abb. 4.4 die inhibierenden Effekte der Aminosäuren Leucin, Alanin und Histidin festzustellen. Durch die niedrigeren OD-Werte zwischen 1.6 und 5.5 nach 3 Stunden Expression sind diese Effekte jedoch nicht so eindeutig ausgeprägt wie in den vorherigen Versuchen. Zu beobachten ist, dass vor allem durch Leucin auch am Ende des Versuches eine deutlich reduzierte optische Dichte und Produktkonzentration vorliegt.

In Tab. 4.4 sind die $OD_{E_{0F}}$ -Werte zusammen mit den pH-Werten aufgeführt. Festgestellt werden Zusammenhänge zwischen Wachstum und pH-Wert. Niedrigere pH-Werte haben demnach eine höhere optische Dichten zur Folge. Gemessen werden pH-Werte zwischen 4.3 und 6.8. Eine Ausnahme bildet die Kultivierung mit den verwendeten proteinogenen Aminosäuren. Hier ist der pH-Wert mit 6.3, trotz hoher optischer Dichte, relativ neutral. Allgemein ist *E. coli* in einem pH-Milieu von 5.5–9.0 in der Lage, den internen pH-Wert von 7.0–7.5 durch die Selbstregulierung (Homöostase) aufrecht zu erhalten [25]. Dennoch handelt es sich um ein neutrophiles Bakterium, das optimale pH-Werte im Bereich zwischen 6.0 und 7.8 benötigt, um uneingeschränkt wachsen und exprimieren zu können [5].

Diese Betrachtung des pH-Wertes nach 6 Stunden Expression lässt darauf schließen, dass durch die höheren Wachstumsraten die Sauerstoffeintragsrate gegen Ende des Versuches nicht mehr ausreicht, um die Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Unter anaeroben Bedingungen werden durch Gärung organische Stoffe zu Protonen, Kohlendioxid und organische Säuren wie Acetat und Lactat umgesetzt. Neben der Einschränkung des Wachstums, nimmt vor allem Acetat negativen Einfluss auf das Produkt und die Expressionsfähigkeit [5, 26].

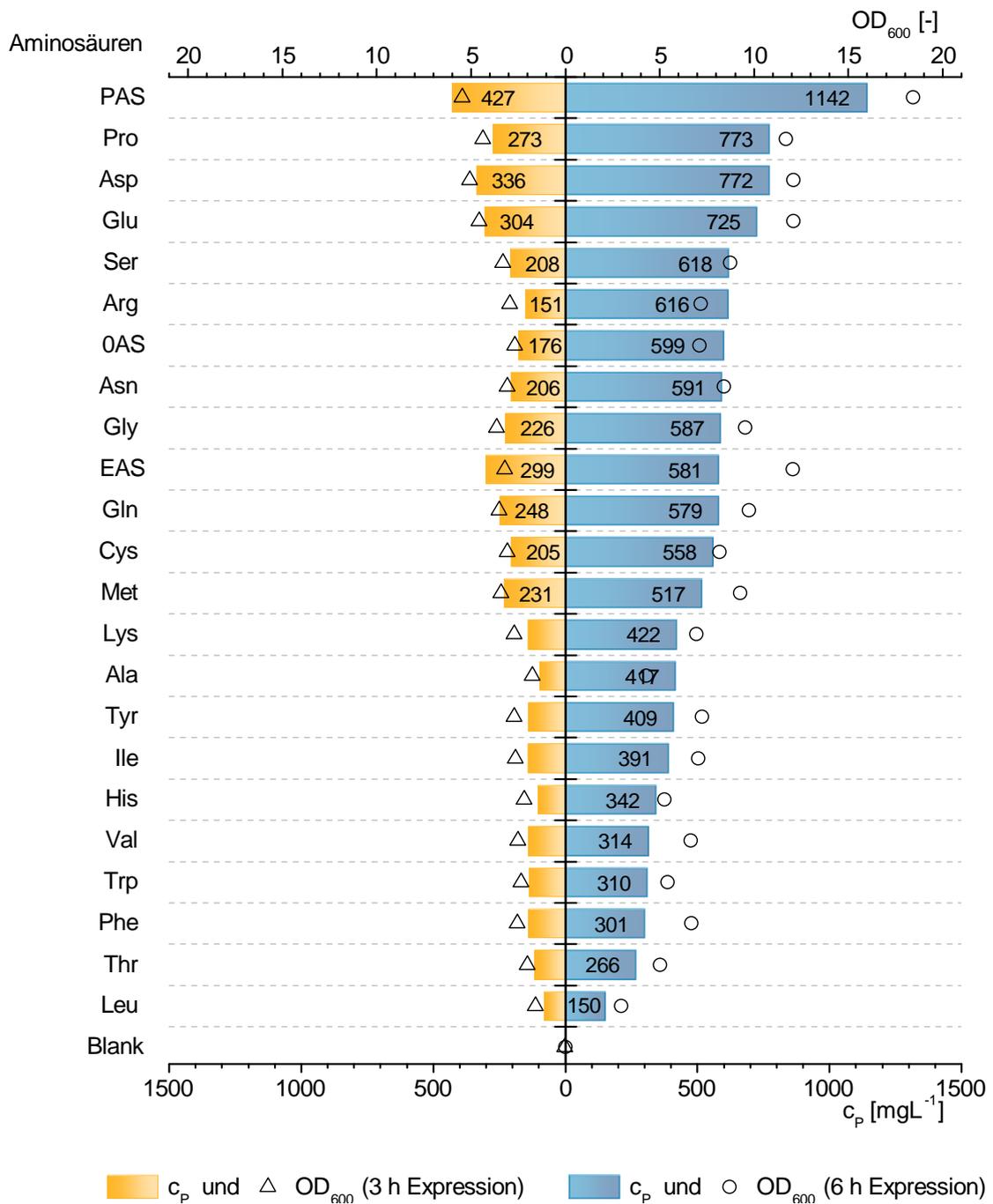


Abb. 4.4: V04 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte. Zugesetzt sind neben den PAS, EAS und 0AS alle einzelnen Aminosäuren mit $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$. ($OD_0=0.02$, $t_{Ind}=5.0 \text{ h}$, $OD_{Ind}=0.3-0.7$)

Tab. 4.4: V04 – Gegenüberstellung von pH- und den erreichten OD₆₀₀-Werten zum Fermentationsende.

	OD _{EOF} [-]	pH [-]
PAS	18.4	6.3
Asp	12.1	5.0
Glu	12.1	4.3
EAS	12.1	5.1
Pro	11.7	4.6
Gln	9.8	5.7
Gly	9.5	5.7
Met	9.3	5.5
Ser	8.7	5.8
Asn	8.4	5.9
Cys	8.2	5.8
Tyr	7.2	6.1
Arg	7.2	6.0
OAS	7.1	6.5
Ile	7.0	5.9
Lys	7.0	6.2
Phe	6.7	6.3
Val	6.7	6.2
Trp	5.4	5.8
His	5.3	5.7
Thr	5.0	6.1
Ala	4.3	6.6
Leu	3.0	6.8
Blank	0.0	6.8

Versuch V05

Im Versuch V05 werden zwei Parameter variiert. Der Induktionszeitpunkt t_{Ind} wird auf 4 Stunden Fermentationszeit gesetzt, wodurch die Induktions-ODs vergleichbarer werden (OD_{Ind} zwischen 0.9 und 1.7 – Anfangs-OD = 0.1) und damit zu ähnlicheren Ausgangsbedingungen für die Expressionsphase führen. Außerdem werden die Anfangskonzentrationen der Aminosäuren auf 50 mg L⁻¹ reduziert. Mit der Konzentrationsreduzierung sollen mögliche Aminosäureüberschussreaktion mit Inhibierungseffekten vermieden werden. Eine Ausnahme bildet die Glutaminsäure, die als Einzelzusatz mit einer Konzentration von 400 mg L⁻¹ vorliegt, um Effekte in höheren Konzentrationsbereichen für diese Aminosäure herauszufinden. Überschussreaktionen sind nicht zu erwarten [11].

Zudem werden nach Lederberg (1950) vier verschiedene Aminosäureklassen gebildet, die aufgrund von biochemischer Kompatibilität und ähnlichen Aminosäure-Transportsystemen zusammengesetzt sind [19, 20]. Die bisherigen Referenzwerte werden im folgenden Versuch ersetzt. In Tab. 4.5 sind die genutzten Klassen aufgeführt. Es wird sich auf die Gruppen mit kanonischen Aminosäuren beschränkt. Durch den Zusatz

von bestimmten Aminosäurekombinationen sollen Überschuss- und Inhibierungseffekte durch konzentrationsgleiche Zusätze aufgehoben werden. Alle Komponenten werden im Gleichgewicht mit einer Konzentration von 50 mg L^{-1} zum Minimalmedium zugesetzt.

Tab. 4.5: Aminosäurekomponenten der Klassifizierungen nach Lederberg [20].

Klasse	Aminosäurekomponenten
1	Arginin, Cystein, Lysin, Methionin
2	Isoleucin, Leucin, Valin
3	Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin
4	Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Prolin, Threonin

In Abb. 4.5 sind die Messwerte der Fermentationen dargestellt. Eine gute Korrelation besteht wiederholt vor allem bei den Wertepaaren nach 3 Stunden Expression. Die EoF-Proben zeigen, dass mit 50 mg L^{-1} Aminosäure eine verbesserte Expression möglich ist. Gleichzeitig wird jedoch auch der Inhibierungs- sowie der Stimulierungseffekt weniger stark ausgeprägt. Dies gibt einen weiteren Hinweis auf die prototrophe Eigenschaft der Organismen. Durch reduzierte Aminosäurekonzentrationen wird der Effekt des Aminosäureüberschusses weiter vermindert.

Durch die Zugabe von 400 mg L^{-1} Glutaminsäure ergibt sich nach 3 Stunden Expressionszeit eine erhöhte optische Dichte, als bei Aminosäurezugaben mit einer Konzentration von 50 mg L^{-1} . Der Zellen steht mehr Aminosäure zur Verfügung, wodurch ein erhöhtes aber womöglich auch schnelleres Wachstum möglich ist.

Nach weiteren 3 Stunden Kultivierungszeit ist jedoch nur eine geringe Zunahme der Zelldichte zu verzeichnen. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Limitierung des Wachstums und der Expressionsfähigkeit frühzeitig eintritt.

Des Weiteren sind die Wirkungen der Aminosäureklassen nach Lederberg zu betrachten. Die Aminosäureklasse 1 kann die zuvor beschriebene Inhibierung durch Cystein nicht aufheben. Die Klassen 2 und 4 hingegen wirken leicht fördernd auf Wachstum und Produktbildung. Ein eindeutiger Effekt durch die Gruppierungen bleibt jedoch auch mit der 3. Klasse aus.

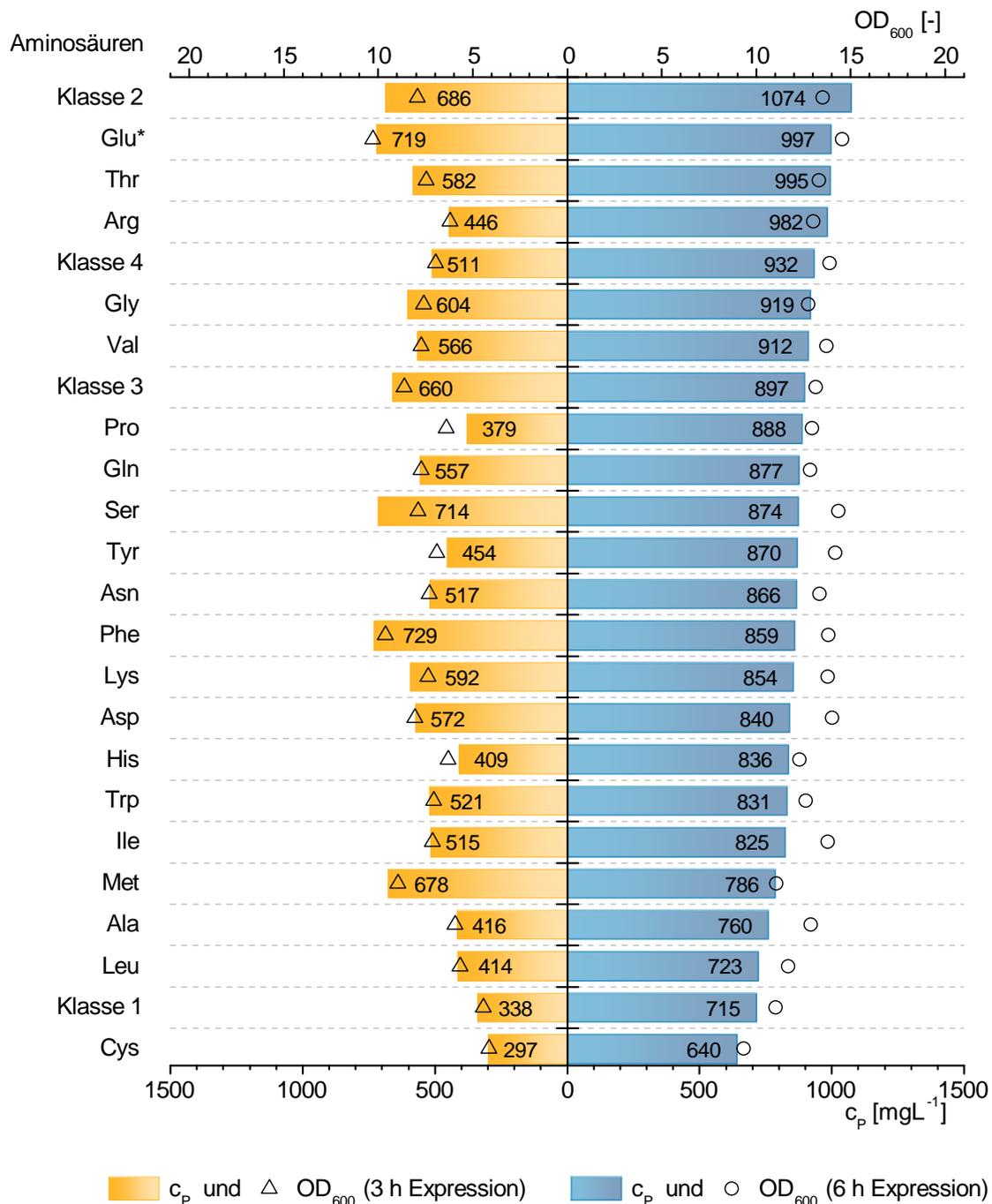


Abb. 4.5: V05 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte. Zugesezt sind neben den PAS, EAS und OAS alle einzelnen Aminosäuren mit $c_{ASi}=50 \text{ mg L}^{-1}$, Ausnahme Glu* mit $c_{ASi}=400 \text{ mg L}^{-1}$. ($OD_0=0.1$, $t_{Ind}=4.0 \text{ h}$, $OD_{Ind}=0.9-1.7$)

In Tab. 4.6 sind die pH-Werte aufgeführt. Durch die erhöhte Inokulations-OD sind die Zelldichten zum EoF-Zeitpunkt höher. Auffallend ist die starke Absenkung des pH-Wertes auf durchschnittlich 5.1. Durch niedrige pH-Werte unter 6.0 kommen die Zellen in kritische Bereiche. Von optimalen Bedingungen für Wachstum und Expression ist demnach nicht mehr auszugehen. Im Rahmen dieser Arbeit wird nicht geklärt, wann die Sauerstofflimitierung eintritt und wann damit die stärkere Absenkung des pH-Wertes

zu einer Einschränkung der Stoffwechselprozesse von *E. coli* führt. Es ist davon auszugehen, dass die Bakterien unter bestimmten Aminosäuren diese Sauerstofflimitierungsbereiche schneller als andere erreichen. Das Wachstum und die Produktbildung wird früher eingeschränkt. Gleichzeitig wachsen Bakterien unter dem Zuschuss anderer Aminosäuren wiederum länger, da sie erst später in kritische pH-Bereiche gelangen. Dadurch erreichen sie letztendlich ähnliche optische Dichten und Proteinkonzentrationen.

Tab. 4.6: V05 – Gegenüberstellung von pH- und den erreichten OD₆₀₀-Werten zum Fermentationsende.

	OD _{EoF} [-]	pH [-]
Glu	14.5	5.3
Ser	14.4	5.2
Tyr	14.2	4.9
Asp	14.0	5.2
Klasse 4	13.9	5.0
Phe	13.8	5.1
Lys	13.8	5.1
Ile	13.8	5.0
Val	13.7	5.3
Klasse 2	13.5	4.8
Asn	13.4	5.0
Thr	13.3	5.3
Klasse 3	13.2	5.6
Arg	13.0	5.3
Pro	13.0	5.1
Ala	12.9	5.2
Gln	12.9	5.4
Gly	12.8	5.1
Trp	12.6	5.1
His	12.3	4.9
Leu	11.7	5.3
Met	11.1	4.5
Klasse 1	11.0	4.8
Cys	9.3	5.5

Mit den Versuchen V02 bis V05 im Batch-Verfahren wird eine Ergebniszusammenfassung generiert, die über das weitere Vorgehen entscheidet. Um alle vier Versuche vergleichen zu können, wird eine relative Einflussgröße eingeführt, die prozentual angibt, inwiefern eine einzelne Aminosäure Einfluss auf Wachstum- und Expressionsverhalten besitzt. Dazu wird jeder Versuch separat für sich ausgewertet und die Versuchsergebnisse in Relation zueinander gesetzt. Für jede Zielgröße (optische Dichte, Zielproteinkonzentration) wird ein Mittelwert gebildet. Für die Mittelwertberechnung werden die Referenzen (Versuche mit EAS und PAS) nicht beachtet, da sie Grenzwerte des Systems darstellen. In die Berechnung fließen lediglich die Effekte der Aminosäuren nach Einzelzugabe ein.

Aus allen OD- und Proteinkonzentrationswerten werden zu jedem Probenahmezeitpunkt in der Expressionsphase die versuchsspezifischen Mittelwerte gebildet. Jeder Versuch weist durch zwei Probenahmen und zwei Zielgrößen vier Mittelwerte auf. Pro Versuch erhält jede Aminosäure dadurch vier spezifische Einflusswerte, die angeben, inwiefern die Zielgrößen von den Mittelwerten abweichen. In Abb. 4.6 sind die arithmetischen Mittel aus den Versuchen V02 bis V05 dargestellt. Als Referenz dient der Einflusswert durch den Zusatz ohne Aminosäure (0AS). Ab einem Einflusswert über 10% gilt die Aminosäure als stimulierender Zusatz auf Wachstums- und Expressionsverhalten. Hervorzuheben sind an dieser Stelle Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin, die besonders fördernd auf die Zielgrößen wirken.

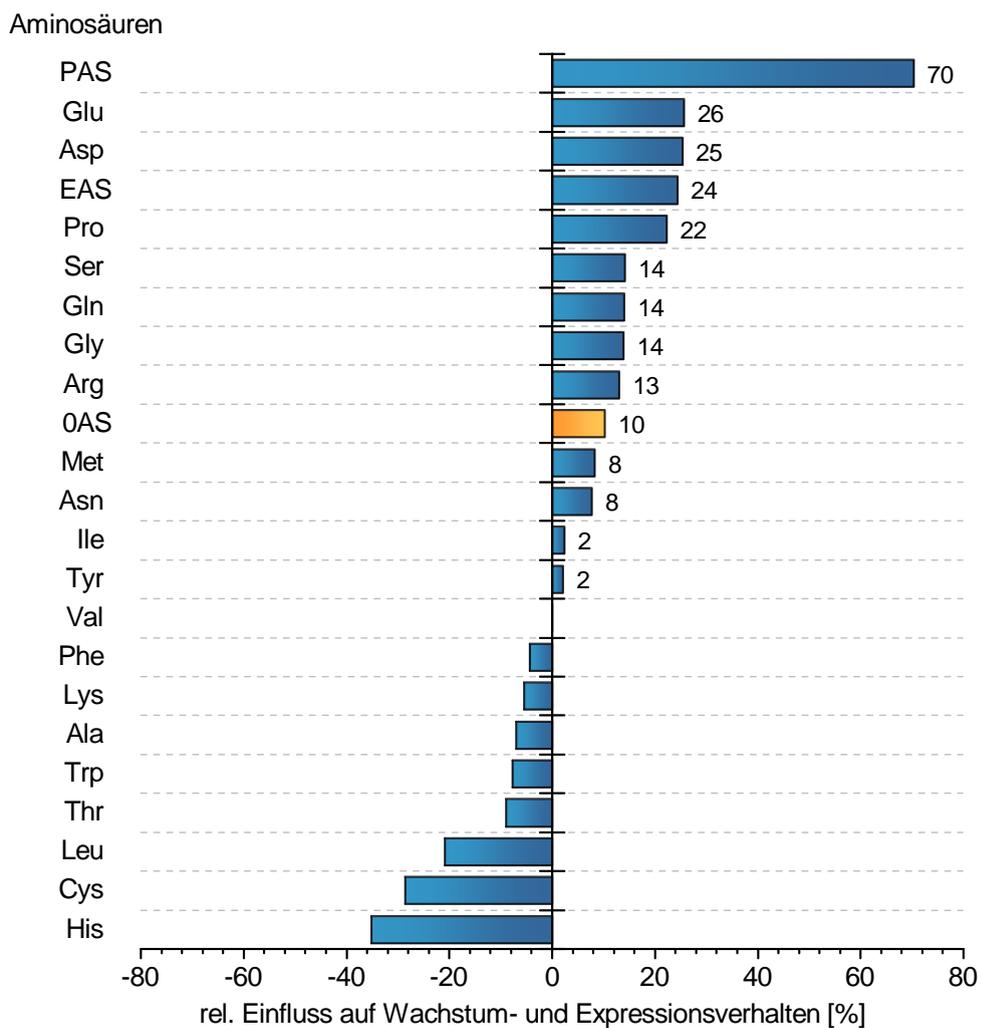


Abb. 4.6: Einflussnahme der Aminosäurezusätze auf Zellwachstums- und Expressionsverhalten.

Versuch V06

Versuch V06 wird als abschließendes Batch-Experiment im MTP-Format durchgeführt. Ziel des Versuches ist es, auf der Basis unterschiedlicher Aminosäurekonzentrationen Aussagen über deren hemmende und fördernde Wirkung zu machen. Auf der Grundlage der Ergebnisse der Batch-Versuche V02–V05 werden Aminosäuren ausgewählt und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen dem Minimalmedium zugesetzt.

Zum einen werden die drei einflussreichsten Aminosäuren nach Abb. 4.6 verwendet (Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin). Zum anderen werden Arginin und Serin eingesetzt, die im mittleren Einflussbereich liegen sowie Threonin, das einen negativen Einfluss auf Wachstum und Expression zeigt. Zusätzlich werden die Aminosäureklassen 2 (Isoleucin, Leucin, Valin) und 4 (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Prolin, Threonin) untersucht. Als Referenz dient das Minimalmedium ohne Aminosäure (0AS).

Nach Inokulation ergibt sich eine OD von 0.08. Die Induktion erfolgt nach 4 Stunden bei einer OD von 1.2 bis 1.8.

In Abb. 4.7 sind die Ergebnisse der Kultivierungen dargestellt. Arginin und Serin wurden zuvor als neutral wirkende Aminosäuren definiert. Auch durch verschiedene Konzentrationen zeigen sich in den ersten 3 Stunden Expression keine signifikanten Einflüsse auf Wachstum und Produktbildung. Bei einer Konzentration von 400 mg L^{-1} Arginin fällt nach 3 Stunden Expression eine sehr hohe Zielproteinkonzentration auf, die sich jedoch trotz Wachstum nach weiteren 3 Stunden nicht verändert. Serin wächst bis zum Kultivierungsende noch weiter – hohe Proteinkonzentrationen sind das Resultat.

Asparaginsäure, Glutaminsäure und Prolin wurden als einflussreiche Aminosäuren herangezogen. Sie weisen alle eine steigernde Wachstums- wie auch Expressionsleistung mit höher werdender Konzentration auf. Vor allem Glutaminsäure mit 1000 mg L^{-1} bewirkt eine schnelle Zunahme der Zelldichte. Dies wird beim Vergleich der optischen Dichten nach 3 Stunden festgestellt, welche durch die bis zu 20-fach niedrigere Aminosäurekonzentration erwirkt wird (50 mg L^{-1} bis 1000 mg L^{-1} Glutaminsäure). Glutaminsäure ist für alle Aminosäuren Ausgangsstoff der Biosynthesewege. Es ist offensichtlich, dass hohe Konzentrationen zu einer Wachstumsstimulation führen. Auch die hohen Konzentrationen bewirken keine chemischen Ungleichgewichte, womit Inhibierungseffekte auftreten könnten [11].

Neben den fördernden Aminosäuren ist die als auf Wachstum und Produktbildung hemmend wirkende Aminosäure Threonin zu nennen. Je höher die Konzentration gewählt wird, desto niedriger ist im Endeffekt die optische Dichte und Zielproteinkonzentration. Eindeutig inhibierende Auswirkungen werden festgestellt.

Abschließend sind die beiden ausgewählten Klassen zu nennen. Klasse 2 – u.a. mit dem bei Einzelzugabe inhibierenden Leucin – stimuliert das Wachstum. Klasse 4 hingegen wirkt bei niedrigen Konzentrationen inhibierend und erst ab einer erhöhten Konzentration von 400 mg L^{-1} stimulierend. Somit werden nahezu identische Zelldichten und Produktkonzentrationen im Vergleich zu OAS erreicht.

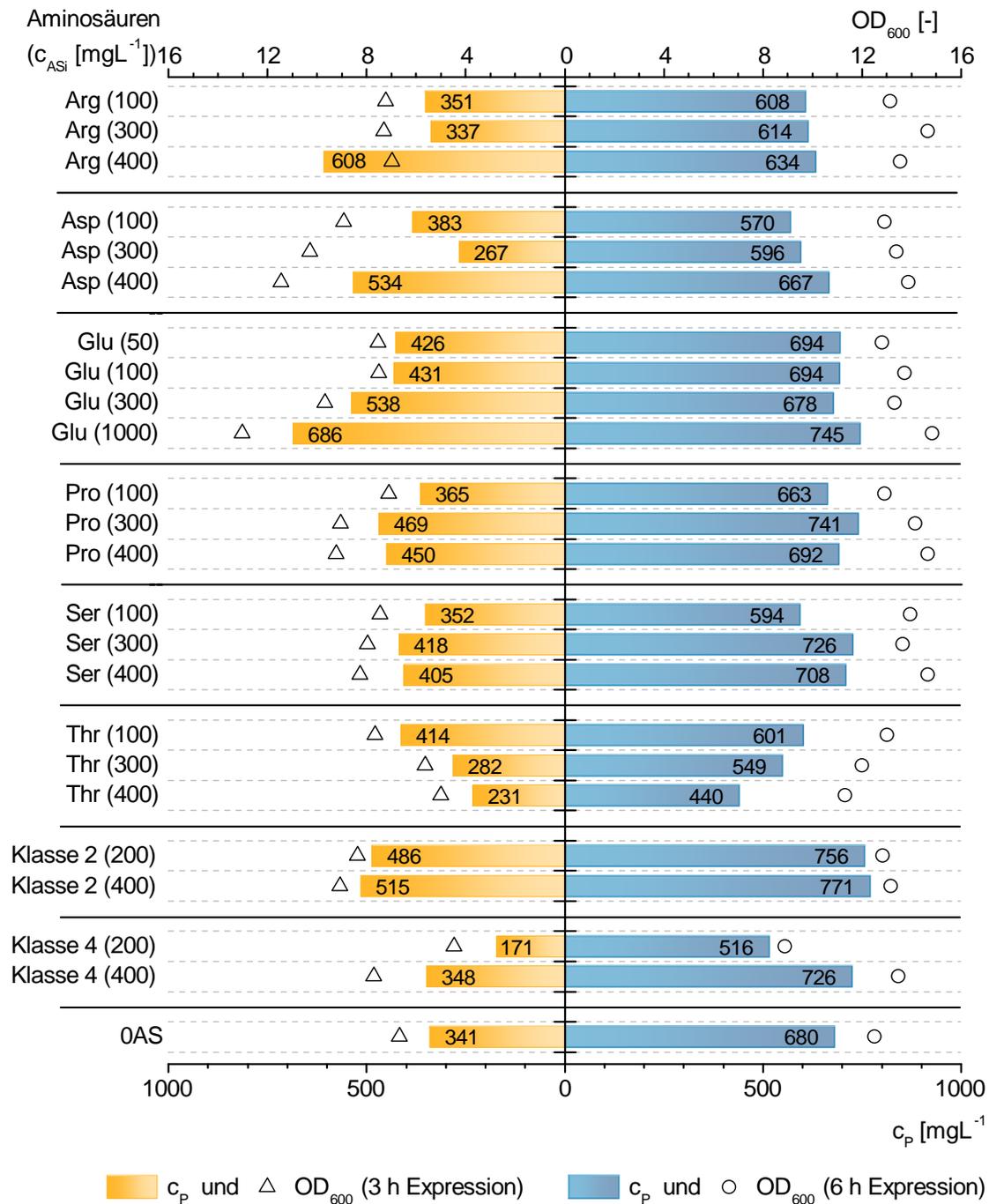


Abb. 4.7: V06 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte. Zugewetzt sind ausgewählte Aminosäuren, basierend auf vorherigen Versuchsergebnissen. Die Konzentrationen sind unterschiedlich gewählt. ($OD_0=0.08$, $t_{\text{Ind}}=4.0 \text{ h}$, $OD_{\text{Ind}}=1.2-1.8$)

Grundlegend muss die Interpretation der Batch-Versuche mit Bedacht erfolgen. Durch das substratlimitierte Wachstum kann die benötigte Sauerstoffzufuhr nicht über den gesamten Prozess sichergestellt werden. Hohe Wachstumsraten und höhere Zelldichten führen zu Sauerstofflimitierungen und damit zu anaerobem Wachstum. Dieses führt zu Acetatbildung, zur pH-Wert Absenkung und einer starken Einschränkung des Zellwachstums und der Produktbildung. Zusätzlich wird bereits während der sauerstofflimitierten Batch-Phase, aufgrund des Crabtree-Effektes, Acetat von *E. coli* gebildet [5]. Je nach spezifischer Wachstumsrate, beeinflusst vom jeweiligen Aminosäurezusatz, findet eine unterschiedlich starke pH-Wert Absenkung bereits während dieser Phase statt. Auf Grund dieser Effekte ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche eingeschränkt.

4.1.3 Fed-Batch-Vorversuch mit FeedBeads (V07)

Mit der Einführung des Fed-Batch-Systems soll die Säureproduktion von *E. coli* eingeschränkt und kontinuierliches Wachstum sowie Produktexpression erwirkt werden. Durch die Limitierung der Glucosezufuhr wird die Acetatbildung durch den Crabtree-Effekt vermieden. Zusätzlich wird der Sauerstoffbedarf der Zellen reduziert und dadurch anaerobe Prozessphasen verhindert. Im Vorversuch werden verschiedene Kombinationen von FeedBead-Durchmessern, Beadanzahl (n_{FB}) und die Batch-Konzentration von Glucose ($c_{Glu,0}$) im MTP-Format variiert, um die optimalen Versuchsbedingungen zu identifizieren.

Als Fermentationsmedium wird ein Komplexmedium mit 20 g L^{-1} Soja-Pepton und einem 60 mM Phosphatpuffer (pH 7.2) verwendet, um maximales Zellwachstum bei optimalen Zellbedingungen durch Komplexbestandteile zu erreichen. Die FeedBeads werden dem Medium zeitgleich mit dem Inokulum zugesetzt. Die Anfangs-OD beträgt 0.1. Das Fermentationsvolumen liegt bei $2500 \mu\text{L}$. Die Inkubationszeit beträgt 24 Stunden bei 35°C und einer Schüttelfrequenz von 300 rpm . In Tab. 4.7 sind die Ergebnisse der Variationen aufgeführt.

Abb. 4.8 zeigt neun Wachstumskurven der Kombinationen aus Tab. 4.7. Aufgeführt sind zum einen, als Referenz, die drei Wachstumskurven der Batch-Kultivierungen mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen. Diese lassen eine Einschätzung zu, in welcher Zeit die Verstoffwechslung der vorgelegten Glucose in der Batchphase erfolgt ist. Nach etwa 5 Stunden ist die Glucose vollständig verbraucht. Durch die Erhöhung der Vorlagekonzentration an Glucose von 1.5 g L^{-1} auf 3.0 g L^{-1} , wird eine Steigerung der optischen Dichte um etwa 2 erreicht. Beachtet man den OD-Wert der 0 g L^{-1} Glucosevorlage, so wird trotzdem eine optische Dichte von 3.5 erzielt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Zellen Energie aus Nährstoffen des Komplexmediums gewinnen. Da ab einem Zeitpunkt von 5 Stunden die Wachstumsverläufe aller Versuche ohne FeedBeads parallel zueinander verlaufen, ist davon auszugehen, dass die vorgelegte Glucose nach spätestens 5 Stunden verbraucht ist.

Tab. 4.7: Eingesetzte Glucosekonzentrationen, FeedBead-Kombinationen und resultierende Messwerte zur Erprobung des Fed-Batch-Verfahrens (OD_{EoF} aufsteigend sortiert).

c_0 [g L ⁻¹]	n_{FB} x6 mm	n_{FB} x12 mm	OD_{EoF} [-]	pH [-]
0.0	–	–	3.5	7.8
1.5	–	–	6.2	7.7
3.0	–	–	8.1	7.6
0.0	1	–	10.3	7.4
1.5	1	1	12.7	7.3
1.5	1	–	13.1	7.4
3.0	–	2	14.1	4.9
3.0	1	–	14.8	7.2
0.0	2	–	14.9	7.1
3.0	3	–	17.7	7.0
1.5	2	–	17.8	7.1
1.5	–	1	17.9	7.0
1.5	–	2	17.9	5.6
3.0	2	–	18.1	7.1
0.0	–	1	18.3	7.0
3.0	–	1	18.3	6.9
0.0	1	1	18.9	6.9
0.0	3	–	19.7	7.0
1.5	3	–	19.8	7.0
3.0	1	1	21.5	6.8
0.0	–	2	22.3	6.5

Werden als Zufütterung FeedBeads eingesetzt, so gelangt bereits während der Batch-Phase Glucose in die Kulturbrühe. Mit steigender Anzahl und Größe der FeedBeads wird Glucose vermehrt abgegeben. Somit steigt die Glucosekonzentration in der Batch-Phase an, wodurch diese länger andauert.

Die Wachstumsgeschwindigkeit in der substratlimitierten Fed-Batch-Phase wird mit der Anzahl und Größe der FeedBeads gesteuert. Wie beschrieben sinkt der pH-Wert bei zu hohen Glucosekonzentrationen oder Sauerstofflimitierung ab. Um dies zu verhindern, dürfen nicht beliebig viele FeedBeads eingesetzt werden. Der pH-Wert von 4.9 bewirkt bereits eine Inhibierung des Wachstums, erkennbar an der reduzierten Steigerung der optischen Dichte zwischen den Messpunkten nach 7 und 22 Stunden. Der pH-Verlauf über die Kultivierung ist unbekannt.

Nach Tab. 4.7 eignen sich vorzugsweise FeedBeads mit einem Durchmesser von 6 mm. Beim Einsatz von 12 mm FeedBeads ist das Risiko einer pH-Absenkung größer. Mit einem 12 mm FeedBead werden, nach 24 Stunden Kultivierung, ähnliche Zelldichte wie mit 3x6 mm FeedBeads erreicht. Im Folgenden werden die 6 mm FeedBeads eingesetzt, da sie in ihrer Zugabeanzahl variabler sind und somit ermöglichen, die Zufütterrate stufenweise einzustellen. Die Batchkonzentration von Glucose wird auf 2 g L⁻¹ festgelegt.

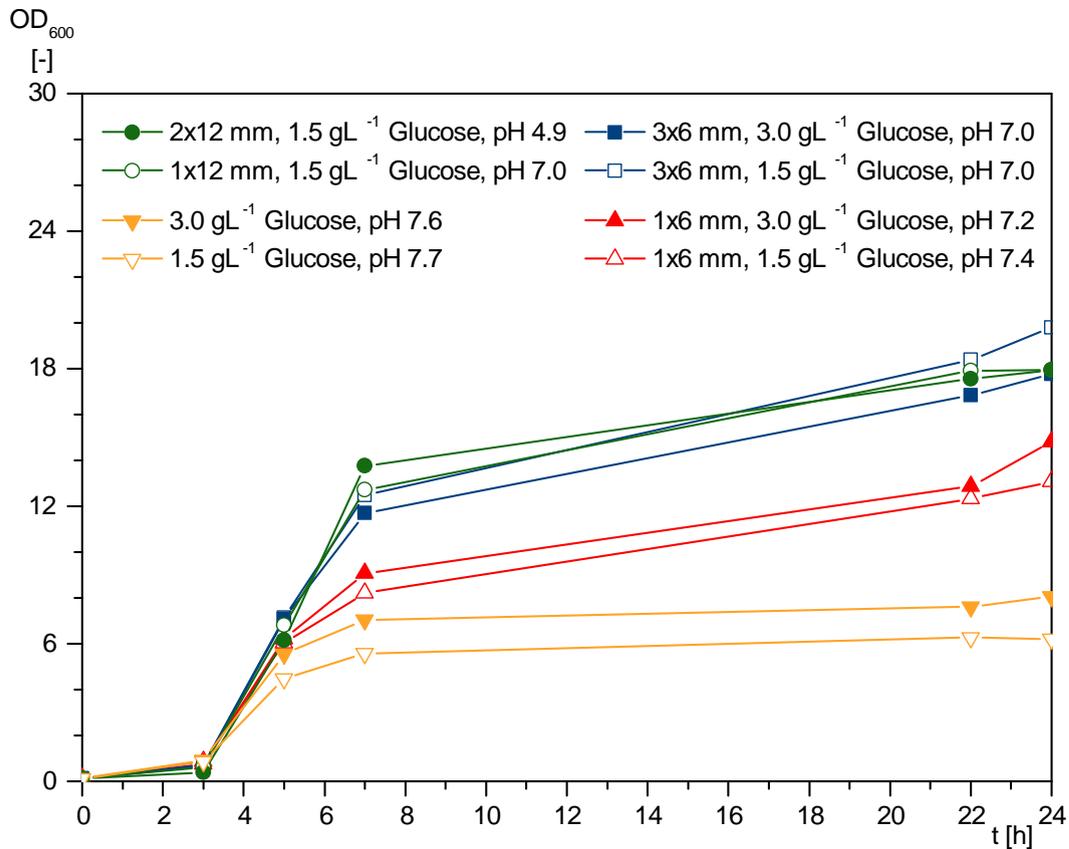


Abb. 4.8: V07 – Wachstumskurve zum Vorversuch mit FeedBeads. Auswahl an Kombinationen der eingesetzten FeedBeads in Komplexmedium (pH 7.2). (OD₀=0.1)

4.1.4 Fed-Batch-Verfahren zur primären Expressionsanalyse (V08 und V09)

Die Erkenntnisse aus dem Vorversuch werden im weiteren Verlauf auf die Kultivierung auf Minimalmedium und die Produktexpression übertragen. Zwei Versuchsläufe umfasst das Fed-Batch-Verfahren. In Tab. 4.8 sind die Merkmale der zwei Versuche aufgeführt.

Tab. 4.8: Charakteristische Merkmale der Versuche V08 und V09 im Fed-Batch-Verfahren zur Expressionsuntersuchung.

Versuch	AS (C _{ASi} [mg L ⁻¹])	n _{FB}	OD _{VK} [-]	t _{VK} [h]	OD _{Ind} [-]	t _{Ind} [h]
V08	PAS einzeln (200) AS-Klassen 2 u. 4 (200)	3	10.9	15.5	0.20–0.40	2.0
V09	PAS einzeln (200) AS-Klassen 2 u. 4 (200)	1	10.7	15.5	0.20–0.40	2.0

Im Vergleich zu den bisherigen Batch-Versuchen wird die Induktion früher durchgeführt. Bereits nach 2 Stunden Fermentation wird die Temperatur auf 39 °C erhöht. Durch die frühzeitigere Induktion unterscheiden sich die optischen Dichten um höchstens 0.2, was zu einer besseren Vergleichbarkeit führt. Es erfolgen drei Probenahmen nach 3, 6 und 22 Stunden Expression.

In den Abbildungen werden jeweils die Ergebnisse nach 6 und 22 Stunden dargestellt, um eine Aussage über eine kurze Expressionsphase, zum Ende der Batch-Phase, und über eine lange Expression, zum Ende der Fed-Batch-Phase, zu erhalten.

Beide Versuche sind mit Ausnahme der FeedBead-Anzahl analog aufgebaut. Es erfolgt jeweils eine Einzelzugabe der Aminosäuren mit einer Anfangskonzentration von je 200 mg L^{-1} . Zusätzlich werden die beiden Aminosäureklassen 2 und 4 eingesetzt, die auch in den Batch-Versuchen eingesetzt wurden. Die Anfangs-OD beträgt bei beiden Versuchen 0.1. Induziert wird nach 2 Stunden bei ODs zwischen 0.2 und 0.4.

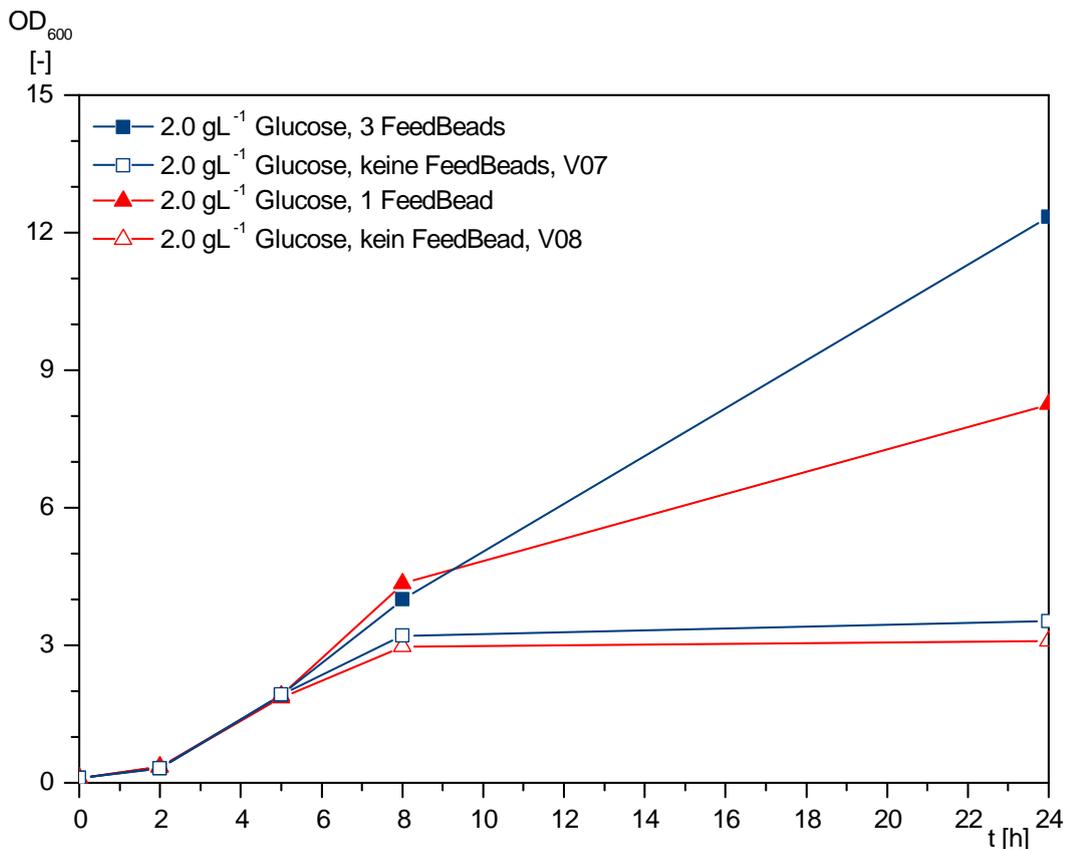


Abb. 4.9: Wachstumskurve des B080-Stammes unter Einfluss von FeedBeads und ohne Aminosäurezusatz. Darstellung der zeitlichen Entwicklung der optischen Dichte mit und ohne Einsatz von FeedBeads.

Als Referenzen werden jeweils zwei Kultivierungen ohne Aminosäurezusätze durchgeführt. Die erste Referenzkultivierung wird im Fed-Batch-Verfahren, die zweite im Batch-Verfahren umgesetzt. In Abb. 4.9 sind die vier Wachstumskurven der Referenzkultivierung aus den Versuchen V08 und V09 abgebildet. Durch die beiden Batch-Fermentationen ohne FeedBeads ist eine Abschätzung des Übergangs von Batch zu Fed-Batch-Phase möglich. Nach etwa 8 Stunden ist die Glucosevorlage von 2 g L^{-1} aufgebraucht. Durch den Einsatz von FeedBeads und deren kontinuierliche Abgabe von Glucose verlängert sich die Batch-Phase dementsprechend, bevor die substratlimitierende Fed-Batch Phase eintritt.

Versuch V08

Im ersten Fed-Batch-Versuch zur Expressionsuntersuchung werden 3 FeedBeads eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10 dargestellt.

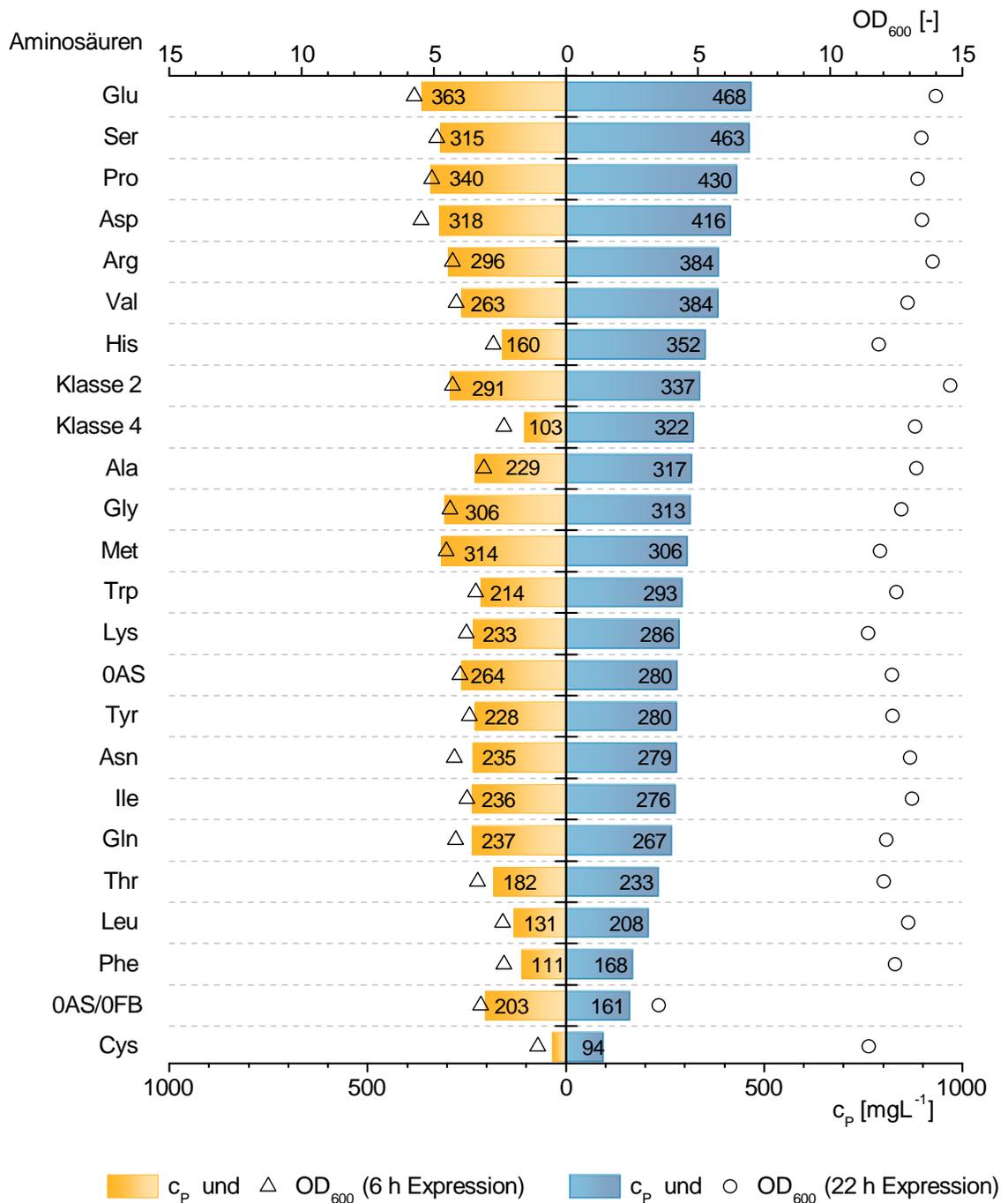


Abb. 4.10: V08 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte bei Einsatz von 3 Feed-Beads. Zugesetzt sind alle PAS einzeln (200 mg L⁻¹) und die Aminosäureklassen 2 und 4 (200 mg L⁻¹). (OD₀=0.1, t_{Ind}=2.0 h, OD_{Ind}=0.2–0.4)

Versuch V08 zeigt, dass durch den Einsatz von jeweils 3 FeedBeads zwar ein Wachstum erfolgt, jedoch die Proteinexpression nach Beginn des Fed-Batchs stark limitiert ist. Die Kontrolle des pH-Wertes zeigt, dass eine Absenkung auf etwa pH 5.0 bei allen Ansätzen mit FeedBeads nach 24 Stunden Fermentation stattgefunden hat. Dies gibt Hinweise darauf, dass ein zu niedriger pH-Wert die Expressionsfähigkeit stärker limitiert, als das Wachstum. Auch Rückblickend auf die Batch-Versuche erklärt dies, weshalb die Ausbeuten von erreichter Zielproteinkonzentration pro erreichter optischer Dichte im Laufe der Fermentation geringer werden.

Außerdem ist die Temperaturdifferenz zum Vorversuch zu beachten. Zur Induktion wird die Temperatur auf 39 °C erhöht und ist damit im Vergleich zur Temperatur vor der Induktion und im gesamten Vorversuch um 4 °C höher. Mit einer Temperaturerhöhung nimmt die Löslichkeit des Sauerstoffs in der Flüssigphase ab. Die Sauerstoffversorgung für die Zellen wird damit schlechter und es kann zu anaerobem Wachstum führen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Lösungsgeschwindigkeit der Glucose aus den FeedBeads mit steigender Temperatur erhöht wird. Die gemessenen freigesetzten Glucosemengen sind um bis zu 50% höher als die berechneten Werte. Diese Daten sind jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt.

Im folgenden Versuch V09 wird die FeedBead-Anzahl aufgrund der pH-Absenkung reduziert, da möglicherweise zu hohe Glucoseabgaben zu Überschussreaktionen führen. Die geringe Produktkonzentration weist darauf hin, dass bereits zum Ende der Batch-Phase Effekte auftreten, welche die Expression stark und das Wachstum leicht limitieren.

Versuch V09

Im zweiten Fed-Batch-Versuch wird die Substratzufuhr reduziert, indem pro Ansatz ein FeedBead verwendet wird. In Abb. 4.11 sind die Ergebnisse dargestellt. Zusätzlich werden durch Stichprobenmessungen die pH-Werte kontrolliert. Festgestellt wird ein pH-Wert von etwa 6 nach 24 Stunden Kultivierung. Die leichte Absenkung des pH-Wertes limitiert die Produktbildung im Vergleich zu Versuch V08 nur noch gering. Außerhalb dieser Arbeit muss nachgewiesen werden, ob ein geeigneteres Puffersystem verwendet und die Absenkung des pH-Wertes weiter reduziert werden kann.

Betrachtet man die Versuche V08 und V09 zusammengefasst, so stellt sich eine bessere Reproduzierbarkeit heraus, als es die Batch-Versuche zuließen. Besonders die Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure und Asparaginsäure stellen sich im Fed-Batch-Verfahren als wachstums- und expressionsfördernd heraus. Auch wenn diese Aminosäuren bereits im Batch-Verfahren für eine erhöhte Ausbeute sorgten, kann erst mit Vermeidung von Sauerstofflimitierungen durch einen glucoselimitierten Ansatz eine Aussage über Aminosäureeffekte getroffen werden. Sauerstofflimitierung und pH-Absenkungen führen zu undefinierten Kultivierungszuständen und Effekten in den Stoffwechselwegen, die nicht ohne weiteres zu interpretieren sind.

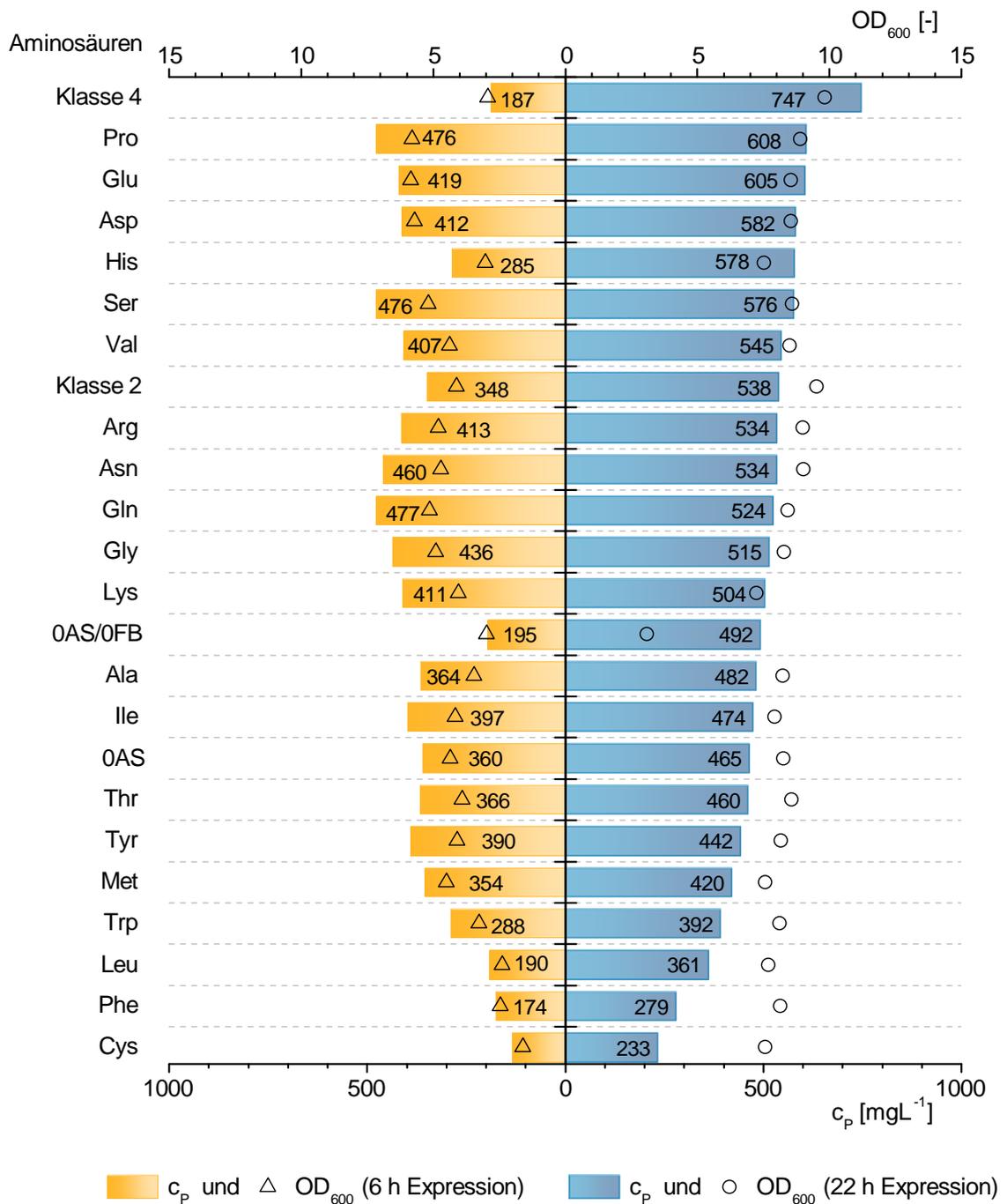


Abb. 4.11: V09 – Zielproteinkonzentration und erreichte OD-Werte bei Einsatz von 1 Feed-Bead. Zugewetzt sind alle PAS einzeln (200 mg L⁻¹) und die Aminosäureklassen 2 und 4 (200 mg L⁻¹). (OD₀=0.1, t_{Ind}=2.0 h, OD_{Ind}=0.2–0.4)

Mit den gewonnenen Erkenntnissen aus dem Batch- und Fed-Batch-Verfahren im MTP-Format wird die Untersuchung des B080-Stammes im 1-Liter-Maßstab fortgeführt. Dabei sollte im Rahmen dieser Arbeit ein erster Versuch unternommen werden, die erzielten Ergebnisse aus dem MTP-Format auf ein Fed-Batch Verfahren im Fermenter zu übertragen.

4.1.5 Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Maßstab (V16 bis V18)

Mit den abgeschlossenen MTP-Versuchen vom *E. coli*-Derivat B080 haben sich einige Aminosäuren als wachstums- und expressionsfördernd gegenüber dem aminosäurefreien Minimalmedium herausgestellt. In Tab. 4.9 sind die Aminosäurezusätze der 3 Kultivierungen aufgeführt.

Als Referenz wird eine Fermentation mit reinem Minimalmedium ohne Aminosäurezusätze durchgeführt. Glutaminsäure wird in der zweiten Fermentation einzeln zugesetzt. In der dritten Kultivierung werden die 3 Aminosäuren eingesetzt, die bisher einzeln gute Wachstums- und Expressionsstimulationen bewirken konnten und gleichzeitig Bestandteile der 4. Aminosäureklasse nach Lederberg sind. Die Konzentration im Batchmedium wird nach den bisherigen Fed-Batch-Versuchen auf 200 mg L^{-1} belassen. Im Feedmedium wird das Verhältnis der Aminosäure- zu Glucosekonzentration des Batchmediums der MTP-Versuche mit B080 verwendet. Eingesetzt wurden 200 mg L^{-1} einer Aminosäure zu 10 g L^{-1} Glucose. Dieses Verhältnis wird im Feedmedium durch 10 g L^{-1} Aminosäure pro 500 g L^{-1} Glucose aufrechterhalten.

Tab. 4.9: Eingesetzte Aminosäuren und Konzentrationen der 1-Liter-Fermentationen mit B080-Stamm.

Versuch	Aminosäurezusatz	Batch	Fed-Batch
		$c_{\text{ASi}} [\text{g L}^{-1}]$	
V16	keiner	–	–
V17	Glutaminsäure	0.2	10.0
V18	Glutaminsäure, Asparaginsäure, Prolin	0.2	10.0

Das Fermentationsmedium wird mit 50 mL Vorkultur inokuliert. Die Anfangs-OD beträgt 0.5 für alle drei Fermentationen. Alle Kultivierungsverläufe werden im Folgenden anhand der in Abb. 4.12 dargestellten offline Daten beschrieben.

Die Dauer der Batch-Phasen unterscheidet sich leicht durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten voneinander. In V18 – mit Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin – ist die Glucose bereits nach etwas weniger als 2.5 Stunden verstoffwechselt. 30 Minuten später folgen V17 und kurz darauf V16. Die Zufütterung startet für alle drei Versuche automatisch, sobald der $p\text{O}_2$ -Wert schlagartig ansteigt. Die Induktion erfolgt für alle Kultivierungen 4.5 Stunden nach Feed-Start durch eine Temperaturerhöhung auf 39°C . Die genauen Zeitpunkte der Prozessphasen sind in Tab. 4.10 aufgeführt. In Abb. 4.12 ist die minimale und maximale Dauer der Batch-Phase gekennzeichnet. Daraus resultieren entgegengesetzt die maximale und minimale Dauer der Fed-Batch-Phase. Die Expressionsphase dauert bei allen regulär beendeten Kultivierungen 25 Stunden.

Tab. 4.10: Startzeitpunktangaben für die Prozessphasen der Fermentationen V16 bis V18.

	Batch	Fed-Batch	Expression
Start V16	0 h	3.5 h	8.0 h
Start V17	0 h	3.4 h	7.9 h
Start V18	0 h	2.8 h	7.3 h

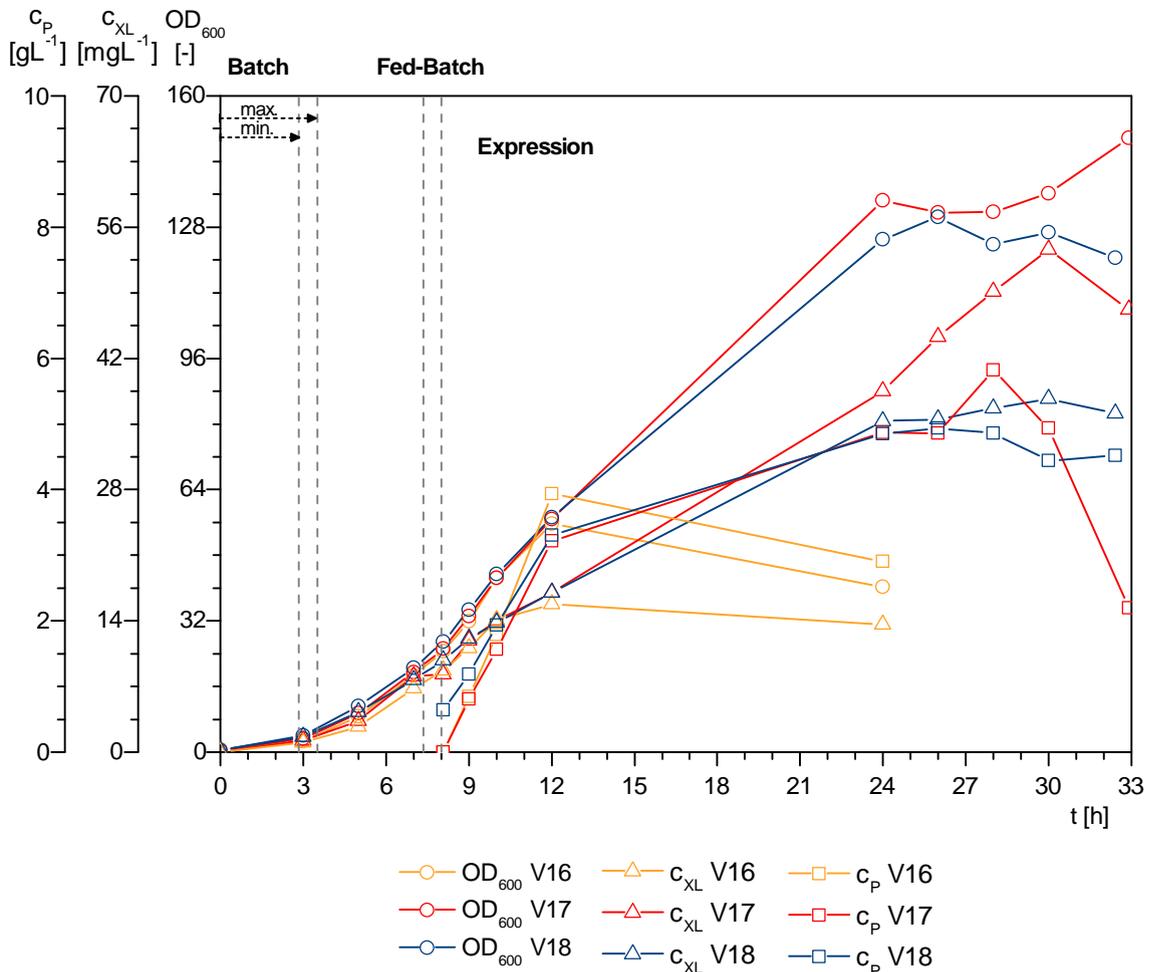


Abb. 4.12: V16 bis V18 – Offline Messdaten. Mit c_P - Zielproteinkonzentration (B080), c_{XL} - Zellkonzentration, OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm.

Die offline Messdaten zeigen, dass die Zellkonzentrationen c_{XL} und die optischen Dichten OD_{600} in der Batch-Phase exponentiell ansteigen, da die im Überschuss vorliegende Glucose zu unlimitiertem Wachstum führt. Aufgrund der gesteuerten Wachstumsrate μ_w in der Fed-Batch-Phase wird das Wachstum limitiert. Dennoch wächst *E. coli* hier nahezu exponentiell weiter. Bis kurz nach Induktionsstart ist ein nahezu paralleler Verlauf der Zellkonzentration und der optischen Dichte der drei unterschiedlichen Kultivierungen zu beobachten.

Nach der Induktion verhalten sich die Zellen in den Kultivierungen unterschiedlich und die Zielproteinexpression ist nachweisbar.

Da der Induktionsstart bei V18 30 Minuten vor der ersten Zielproteinprobenahme liegt, ist bereits nach 8 Stunden Kultivierungszeit eine Proteinkonzentration von etwa 0.6 g L^{-1} nachweisbar. Bis zum Messzeitpunkt nach 4 Stunden Expression ist in allen Fermentationen eine starke und vergleichbare Zielproteinkonzentration zu beobachten. Die leichten Konzentrationsunterschiede zwischen den Kultivierungen liegen im Bereich der Variabilität der analytischen Methode.

Bei Kultivierung V16 (Minimalmedium ohne Aminosäurezusätze) ist nach 24 Stunden Kultivierungsdauer keine Zunahme der Produkt- und Zellkonzentration mehr zu beobachten. Die Fermentation wird auf Grund von Glucose Akkumulation beendet (Glucoseschnelltest während des Prozesses).

V17 und V18 werden fortgeführt, bis diese eine Expressionszeit von 25 Stunden erreichen. Unterschiede werden zwischen den beiden Fermentationen zum Ende der Kultivierung festgestellt. Betrachtet man den Verlauf von V17, so wächst die Zellkonzentration weiterhin bis nach 30 Stunden Kultivierungsdauer an. Die optische Dichte verläuft zur Zellkonzentration nicht mehr parallel, wie zu Beginn der Kultivierung zu beobachten war. Stattdessen ist ein konstanter Verlauf zu beobachten. Erst zum Ende steigt die optische Dichte wieder an, wobei die Zell- und die Zielproteinkonzentration absinken. Die Ursachen dieser Phänomene konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Kultivierung V18 zeigt mit den Analysedaten nach 24 Stunden einen kontinuierlichen und konstanten Verlauf. Auch hier ist zu beobachten, dass die Zellkonzentration und die optische Dichte nicht mehr parallel verlaufen, jedoch ein proportionaler Zusammenhang besteht. Die Akkumulation des Zielproteins in IBs findet statt, welche sich auf die OD-Messung auswirken kann. Im Gegensatz zur Kultivierung V17 wird insgesamt eine niedrigere Zellkonzentration erreicht.

Die Einzelzugabe von Glutaminsäure zeigt damit einen besseren stimulierenden Effekt auf das Zellwachstum. Die Interpretation der Produktbildung ist insbesondere gegen Ende der Fermentation schwierig, da sich für V17 sehr hohe Schwankungen zeigen. Nach 30 Stunden Kultivierungszeit zeigen sich sehr ähnliche Produkttiter für beide Versuche, V17 und V18. Ein Vergleich mit der Kultivierung ohne Zusätze kann an dieser Stelle nicht durchgeführt werden. Es bleibt offen, ob die Aminosäuren die Fermentation und die Aufrechterhaltung der Stoffwechselwege beeinflusst haben oder die Kultivierung ohne Aminosäure aufgrund anderer Gegebenheiten über lange Sicht fehlgeschlagen ist. Des Weiteren ist offen, ob die Kombination von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin Effekte auf Transport- oder andere biochemische Systeme nimmt und somit das Wachstum nach der Akkumulationen von Aminosäuren inhibiert.

Bisher ist die Kombination der drei Aminosäuren im MTP-Format nicht untersucht worden. Möglich sind Aminosäureüberschusseffekte, die durch Glutaminsäure alleine nicht auftraten. Glutaminsäure ist wie bereits geschildert der Ausgangsstoff für alle Aminosäuresynthesewege [11]. Eine Überschussreaktion kann mit Asparaginsäure und Prolin zusammen erfolgen. Ein Ausgleich ist möglicherweise durch Threonin und Histidin möglich, welche die 4. Klasse nach Lederberg vervollständigen würden [20].

In Tab. 4.11 sind abschließend die maximal erreichten Zielproteinkonzentrationen, die jeweiligen Zellkonzentrationen und die optischen Dichten zum individuellen Kultivierungszeitpunkt aufgeführt.

Tab. 4.11: Generierte maximale B080-Proteinkonzentrationen zu spezifischen Fermentationszeiten.

	c_P [g L ⁻¹]	c_{XL} [g L ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]	Fermentationszeit [h]
V16	3.9	15.8	55.6	12.0
V17	5.8	49.1	131.8	28.0
V18	4.9	35.5	130.5	26.0

4.2 Fermentationen mit dem B117-Stamm

In den folgenden Versuchen wird das *E. coli* BL21-Derivat B117 verwendet. Minimalmedium ist für diesen Bakterienstamm, ohne Zusätze von Wachstumsfaktoren in Form von Aminosäuren, ungeeignet und führt zu keinem Wachstum des Organismus.

In vorherigen Arbeiten bei RHB konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die umfassende Aminosäurelösung aus den 20 proteinogenen Aminosäuren (PAS) als auch der Zusatz der acht essentiellen Aminosäuren (EAS) ein Wachstum ermöglicht. Die Anzahl der zugesetzten Aminosäuren – bei konzentrationsgleichem Zusatz – nimmt dabei Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die maximal erreichbare optische Dichte, wie in Abb. 4.13 nachzuvollziehen ist.

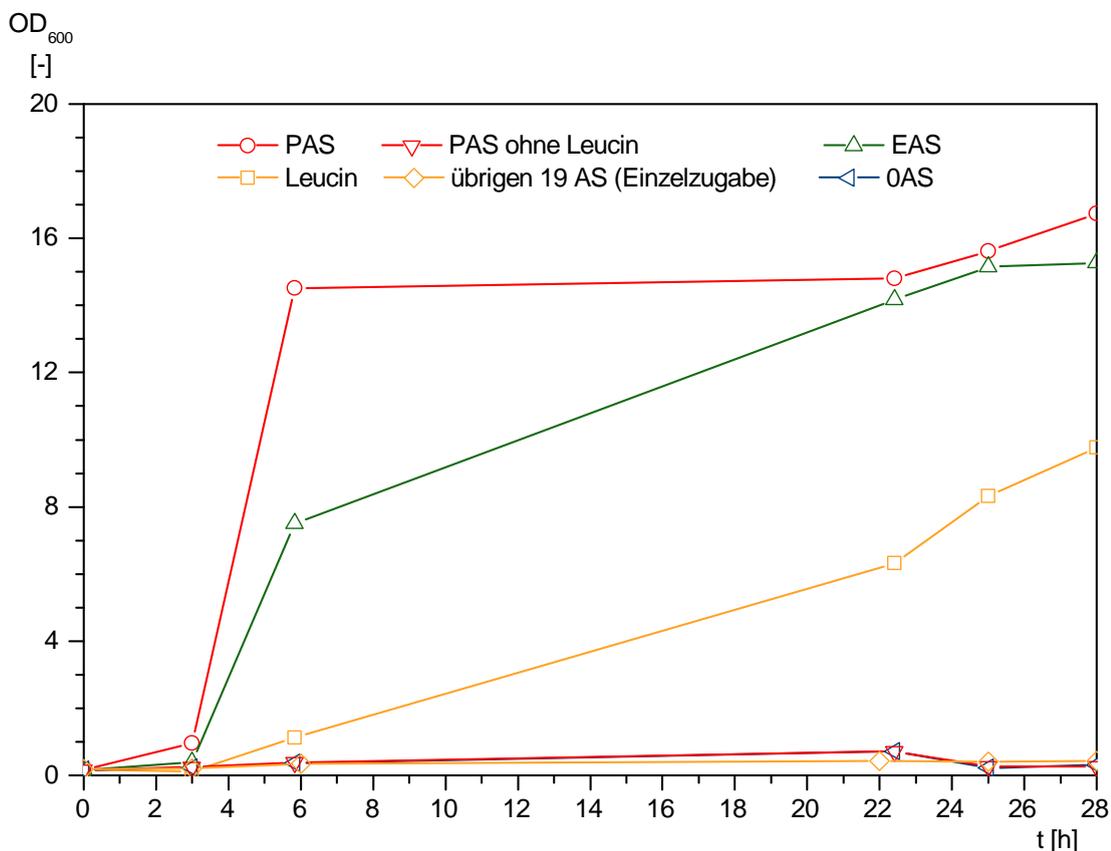


Abb. 4.13: Wachstumskurven des B117-Stammes unter Einfluss von Aminosäurezusätzen im MTP-Format unter den üblichen Einstellungen. OD_0 zwischen 0.16 und 0.17.

Neben der Verwendung der multiplen Aminosäurelösungen, wurde jede Aminosäure ebenso einzeln dem Fermentationsmedium zugesetzt. Der resultierende Effekt auf das Wachstum von *E. coli* ist in Abb. 4.13 (*übrigen 19 AS*) wiedergegeben. Leucin ist die einzige Aminosäure, welche ein Wachstum bei Einzelzugabe ermöglicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass Leucin als essentielle Aminosäure für den B117-Stamm fungiert. Grund der Annahme ist die Unfähigkeit des Bakteriums zu wachsen, wenn

Leucin aus dem PAS-Ansatz fern bleibt (*PAS ohne Leucin*). Ein Ausgleich durch die 19 weiteren Aminosäuren im Ansatz scheint über Stoffwechselwege des *E. coli* nicht möglich zu sein. Der verwendete Stamm stellt sich so als ein Mangelmutant hinsichtlich der Aminosäure Leucin heraus. Er hat seine prototrophen Eigenschaften damit verloren und weist eine Leucin-Auxotrophie auf (Leu^-).

Ziel der durchgeführten Kultivierungen ist es zum einen, die Anzahl an zugesetzten Aminosäuren zu reduzieren und die wachstums- und produktbildungshemmenden sowie fördernden Konzentrationen und Komponenten zu ermitteln. Zum anderen soll die optimale Leucinkonzentration bestimmt werden, die zu maximalem Zellwachstum und Produktausbeute führt. Um zu untersuchen inwieweit Leucin mit zusätzlichen Aminosäuren ergänzt werden kann, wird ein systematisches Verfahren angewendet bei dem alle möglichen Kombinationen aus sechs ausgewählten Aminosäuren, inklusive Leucin, dem Mineralmedium zugesetzt werden. Um auszuschließen, dass Leucin nicht über andere Stoffwechselwege in Kombination der zusätzlichen fünf Aminosäuren generiert werden kann, werden außerdem auch alle Permutationen ohne Leucin verwendet. Die Untersuchung des Wachstums erfolgt im Batch-Verfahren mit den Versuchen V10 bis V12.

Die Untersuchung verschiedener Leucinkonzentrationen auf Wachstums- und Expressionsfähigkeit erfolgt im MTP-Format in den Batch-Versuchen V13 und V14 und wird mit einer Fed-Batch Fermentation im 1-Liter-Maßstab (V15) abgeschlossen.

4.2.1 Batch-Verfahren zur Wachstumsuntersuchung (V10 bis V12)

Das Wachstumverhalten steht zu Beginn der systematischen Untersuchung des B117-Stammes im Vordergrund. Es wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass ein Wachstum auf Minimalmedium möglich ist, wenn Aminosäuren zugesetzt werden. Dies beschränkte sich jedoch auf alle PAS, EAS und auf Leucin als Einzelzugabe.

Ziel der Versuche V10 bis V12 ist es die Aminosäureanzahl auf ein Minimum zu reduzieren, bei gleichzeitig gutem Zellwachstum. Neben ökonomischen Gründen spielen hier der praktische Aspekt eine entscheidende Rolle. Je mehr Aminosäuren zugesetzt werden, desto höher ist der Aufwand bei der Medienvorbereitung. Um die Anzahl an MTP-Versuchen zu reduzieren, werden sechs ausgewählte Aminosäuren aus der EAS-Gruppe verwendet. Leucin wird als B117-essentielle Aminosäure, mit Valin und Isoleucin aufgrund von ähnlichen Stoffwechselwegen bei *E. coli*, verwendet [20]. Zusätzlich werden Lysin, Phenylalanin und Threonin eingesetzt. Alle sechs Aminosäuren sind für heterotrophe Organismen allgemein essentiell (EAS). In Tab. 4.12 sind die ausgewählten Aminosäuren in ihren eingesetzten Konzentrationen von 200 mg L^{-1} aufgeführt. Zum Vergleich wird zusätzlich eine verringerte Konzentration von 100 mg L^{-1} in Form aller sechs Aminosäuren einmalig verwendet.

Tab. 4.12: Verwendete Aminosäuren und Konzentrationen für die Versuche V10 bis V12.

AS	c_{ASi} [mg L ⁻¹]	C_{ASi} [mmol L ⁻¹]	c_{ASi} [mg L ⁻¹]	C_{ASi} [mmol L ⁻¹]
Isoleucin	100	0.76	200	1.52
Leucin	100	0.76	200	1.52
Lysin	100	0.68	200	1.37
Phenylalanin	100	0.61	200	1.21
Threonin	100	0.84	200	1.68
Valin	100	0.85	200	1.71

Bei einer Kombination von sechs Aminosäuren ergeben sich 64 verschiedene Möglichkeiten der Zusammensetzung. Jede Kombination wird als Zusatz in der üblichen duplizierten Ausführung dem Kulturmedium zugesetzt. Die zusätzliche Kombination aus allen sechs Aminosäuren mit einer Konzentration von 100 mg L⁻¹ komplettiert die Versuchsläufe V10 bis V12. Dadurch ergibt sich ein Umfang von 130 Fermentationen.

In Abb. 4.14 sind die Aminosäurekombinationen dargestellt, die ein Wachstum und somit messbare OD-Werte bewirken. Die Kombinationen sind zur besseren Übersicht durchnummeriert. Jeder OD-Wert entspricht dabei dem arithmetischen Mittel der gemessenen optischen Dichten der Fermentations-Duplikate. Kombinationen ohne positive Effekte sind der Übersicht halber nicht dargestellt. Ausnahmen bilden drei exemplarische Kombinationen (Nr. 27 bis 29) und die Referenzmessung von Kulturbrühe, der keine Aminosäuren zugesetzt werden (Nr. 30).

Es wird festgestellt, dass ohne Leucin kein Wachstum möglich ist. Dies bestätigt die bisherige Annahme. Keine andere Aminosäure – im Rahmen der fünf weiteren verwendeten Wachstumsfaktoren – kann den Mangel an Leucin kompensieren (Nr. 28).

Die Zugabe von Valin in Gegenwart von Leucin resultiert in eine Wachstumsinhibition, die lediglich von Isoleucin aufgehoben werden kann (Vergleich Nr. 13 und 26). Grund hierfür sind möglicherweise Überschusseffekte durch Valin auf gemeinsame Transportsysteme mit Leucin oder Inhibition im Metabolismus [30, 22]. Isoleucin stellt das Gleichgewicht wieder her und sorgt für eine Leucin-Aufnahme respektive dessen Verstoffwechslung bei einer equimolaren Konzentration zu Valin. Letztere Aminosäure weist bei einer Vorlage von 200 mg L⁻¹, entsprechend der molaren Masse, eine Konzentration von 1.7 mmol L⁻¹ auf. Isoleucin steht dem mit 1.5 mmol L⁻¹ gegenüber. Der leichte Überschuss an Valin wird womöglich von Leucin selber kompensiert bzw. führt zu keiner Inhibition.

Der Effekt, welcher bei der Zugabe der sechs Aminosäuren in unterschiedlichen Konzentrationen (200 und 100 mg L⁻¹) erfolgt, ist ebenfalls zu beobachten (Nr. 2 und 9). Die erwirkten optischen Dichten unterscheiden sich mit 14.8, bei einer Aminosäurekonzentration von 200 mg L⁻¹, und 13.3, bei 100 mg L⁻¹ Aminosäuren. Die Konzentrationsunterschiede machen sich demnach im Wachstumsverhalten von *E. coli* bemerkbar.

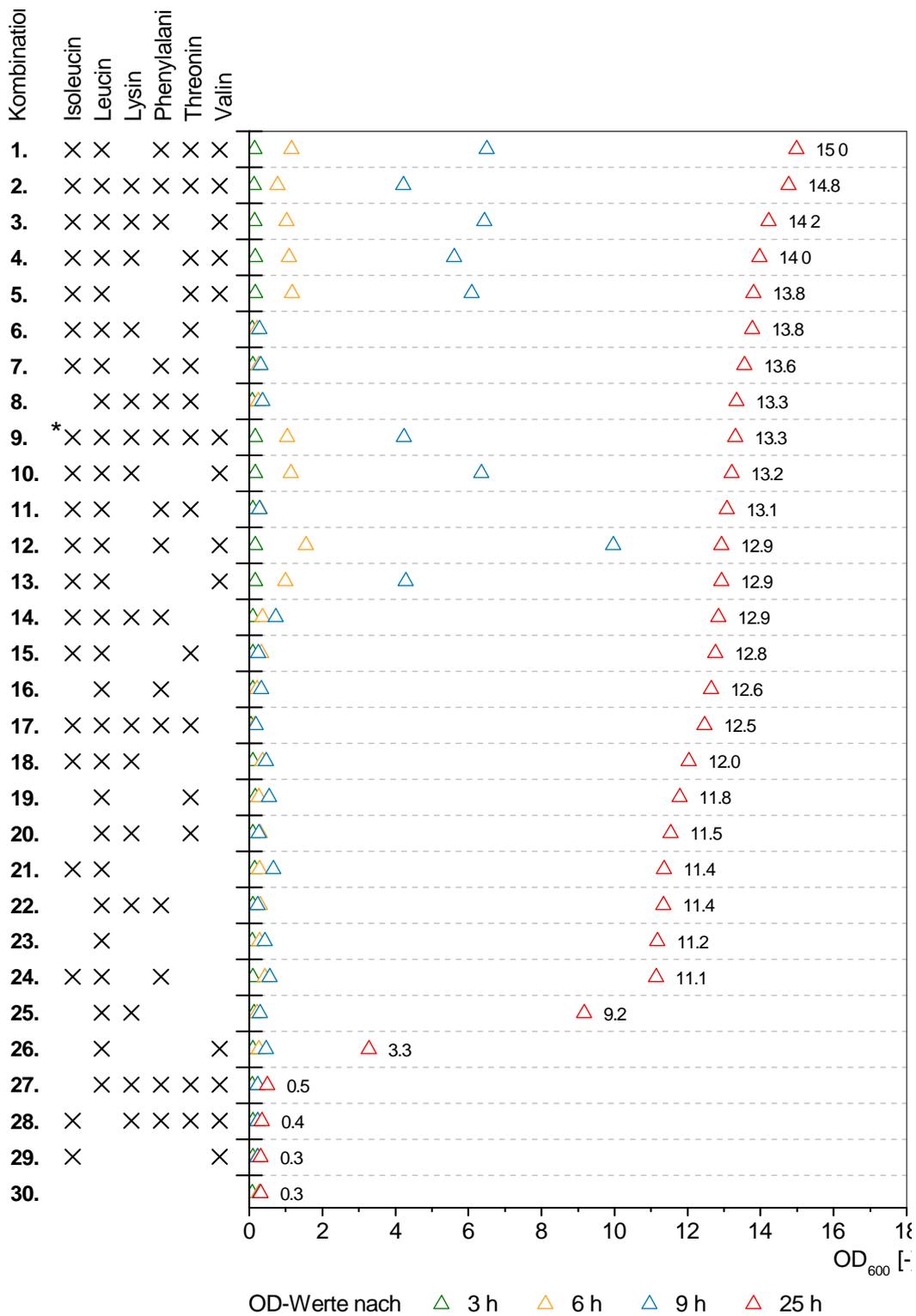


Abb. 4.14: V10 bis V12 – Gemessene optische Dichten nach 3, 6, 9 und 25 Stunden unter Einfluss von Kombinationen aus sechs Aminosäuren. Zugesezt sind pro Aminosäure 200 mg L⁻¹ mit Ausnahme der Kombination Nr. 9 (* mit 100 mg L⁻¹). OD₀ zwischen 0.23 und 0.27

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von der Aminosäurezusammensetzung abhängt. Der horizontale Abstand der Messpunkte in Abb. 4.14 gibt Aufschluss darüber, wie viel Zeit *E. coli* benötigt hat, um sich an das neue Fermentationsmedium zu adaptieren und die vorliegenden Aminosäuren zu verstoffwechseln. Je näher die ersten 3 Messpunkte (3, 6 und 9 Stunden) aneinander liegen, desto länger benötigen die Mangelmutanten, um entsprechend zu wachsen. In der Zeit zwischen den beiden letzten Messpunkten (9 und 25 Stunden) beträgt das Zeitfenster 16 Stunden, wonach bei den Kombinationen 1 bis 26 stets ein Wachstum feststellbar ist. Hervorgehoben werden muss an dieser Stelle wiederum Valin, da ein Mangel an dieser α -Aminosäure zu einer Wachstumsinhibition in den ersten 9 Stunden führt (Nr. 6, 7, 8, 11 und 14 bis 25). Dies ist ein gegenteiliger Effekt zum zuvor festgestellten, wonach die Aminosäure inhibierte. In Gegenwart von Valin wird die Adaptionszeit verkürzt, eine Zellvermehrung ist innerhalb der ersten 9 Stunden messbar (Nr. 1 bis 5, 9, 10, 12 und 13). Voraussetzung für dieses Verhalten ist jedoch die zeitgleiche Existenz von Isoleucin.

Es wurde in den Versuchen V10 bis V12 festgestellt, dass Leucin als essentielle Aminosäure nicht ersetzbar ist. Gleichzeitig kann in Kombination mit Isoleucin und Valin das Wachstum gefördert werden. Zusätzlich bewirkt die Zugabe weiterer Aminosäuren leichte wachstumsunterstützende Effekte. In den folgenden Versuchen wird der Effekt durch verschiedene Leucinkonzentrationen genauer untersucht.

4.2.2 Batch-Verfahren zur parallelen Wachstums- und Expressionsuntersuchung (V13 und V14)

Durch die Versuche V10 bis V12 konnte die essentielle Bedeutung von Leucin für das Wachstum des B117-Stammes bestätigt werden. Um optimale Bedingungen hinsichtlich des Expressions- und Wachstumsverhaltens sicherzustellen, werden in den folgenden Versuchen V13 und V14 die Stimulations- und Inhibierungseffekte bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen betrachtet.

Es erfolgt in jedem Versuch eine getrennte Betrachtung von Wachstum und Produktbildung, indem die Induktion bei der Hälfte der Fermentationsansätze erfolgt. Ein Kultivierungslauf umfasst daher zwei identisch belegte MTPs, wobei nur eine MTP mit IPTG induziert wird. Zur Verifikation der Versuchsergebnisse wird V13 in V14 wiederholt. Im Rahmen der EoF-Zielproteinbestimmung werden alle relevanten Fermentationen analysiert. Dazu werden die Proteinkonzentrationen in allen induzierten Fermentationen und die Ergebnisse der Duplikate arithmetisch gemittelt.

In Tab. 4.13 sind die verwendeten Leucinkonzentrationen aufgeführt. In den Versuchen wird ein Konzentrationsbereich von 0 bis 400 mg L⁻¹ untersucht. Höhere Konzentrationen werden aufgrund von Erfahrungs- und Literaturwerten nicht ausgewählt [11, 19, 20]. Gleichzeitig wird eine höhere Auflösung im Bereich ≤ 200 mg L⁻¹ als im Bereich > 200 mg L⁻¹ gewählt.

Tab. 4.13: Verwendete Leucinkonzentrationen für Versuche V13 und V14 und resultierende OD_{Ind}-Werte nach 8 h Fermentation im MTP-Format.

c _{ASi} [mg L ⁻¹]	C _{ASi} [mmol L ⁻¹]	V13 OD _{Ind} [-]	V14 OD _{Ind} [-]
0	0.00	0.37	0.37
25	0.19	1.07	0.68
50	0.38	0.92	0.67
75	0.57	0.85	0.63
100	0.76	0.75	0.59
125	0.95	0.71	0.56
150	1.14	0.57	0.54
175	1.33	0.51	0.48
200	1.52	0.50	0.48
250	1.91	0.40	0.45
300	2.29	0.31	0.36
400	3.05	0.27	0.30

Die berechnete Anfangs-OD für Versuch V13 und V14 beträgt 0.17 bzw. 0.18. Nach 8 Stunden erfolgt die Induktion in der jeweiligen MTP. Die Fermentationen werden über Nacht durchgeführt, bevor nach 16 Stunden Expression die EoF-Probe entnommen wird.

In Tab. 4.13 sind die Induktions-ODs aufgelistet. In den uninduzierten MTPs entsprechen sie analog den optischen Dichten nach 8 Stunden ($OD_{Ind} \stackrel{!}{=} OD_{8h}$). In den Abb. 4.16 und 4.15 sind diese Werte zusammen mit den End-ODs und den per Teststreifen gemessenen pH-Werten dargestellt.

Die beiden Versuche V13 und V14 werden im Folgenden parallel analysiert und verglichen. Die Auswirkung auf das reine Wachstumsverhalten wird dabei separat von der Expressionsleistung betrachtet. Wie in Tab. 4.13 zu sehen, werden in Abhängigkeit verschiedener Aminosäurekonzentrationen bereits zum Induktionszeitpunkt unterschiedliche OD-Werte erreicht. Dies gibt bereits erste Aufschlüsse über positive sowie negative Einflüsse der eingesetzten Leucinkonzentrationen auf das Zellwachstum.

Nach 8 Stunden ist festzustellen, dass niedrige Leucinkonzentrationen um 25 mg L^{-1} das Wachstum stärker fördern als höhere Konzentrationen. Mit steigender Anfangskonzentration von Leucin ist verlangsamtetes Zellwachstum zu beobachten. Ab 300 mg L^{-1} kann nach 8 Stunden Inkubation kein Zellwachstum mehr festgestellt werden, die erreichten OD-Werte sind vergleichbar mit denen ohne Leucin.

In Abb. 4.15 sind die erreichten optischen Dichten in Abhängigkeit der Leucinkonzentrationen aufgetragen. Zur besseren Ansicht der Kinetik sind nicht untersuchte Konzentrationsbereiche von Leucin ausgespart.

Der positive Effekt niedriger Konzentrationen auf das Wachstum lässt sich in Abb. 4.15 durch die OD-Werte nach 8 Stunden optisch nachvollziehen.

Die nach 8 Stunden festgestellten Effekte verändern sich mit fortschreitender Kultivierungszeit und zunehmenden Zelldichten. Zum Fermentationsende werden höhere optische Dichten bei höheren Konzentrationen, um 200 mg L^{-1} , erreicht. Die zuvor als wachstumsfördernd identifizierten niedrigen Leucinkonzentrationen verlieren an Einfluss. Grund hierfür ist das Verhältnis von vorliegendem Leucin zu Zelldichte, das mit höheren Zelldichten und gleichzeitig mehr verbrauchtem Leucin kleiner wird. Die Förderung des Wachstums verschiebt sich daher mit anhaltender Inkubation in Richtung höherer Anfangskonzentrationen des Leucins.

Werden die erzeugten OD-Werte nach 24 Stunden Fermentation ohne Induktion verglichen, können allgemein in V13 höhere optische Dichten erzielt werden. Dennoch sind die Effekte in beiden Läufen durch die eingesetzten Leucinkonzentrationen deutlich erkennbar. Stimulierende Effekte durch den Wachstumsfaktor treten mit eingesetzten Konzentrationen von etwa 150 bis 200 mg L^{-1} auf. Geringere Konzentrationen bewirken eine nicht ausreichende Versorgung der Zellen mit der notwendigen Aminosäure über 24 Stunden. Dagegen wirkt eine höhere Leucinkonzentration inhibierend, es kommt zu einer Substratüberschusshemmung.

In Abb. 4.15 lassen sich in beiden Diagrammen maximal mögliche optische Dichten feststellen, die durch ideale Leucinkonzentrationen ermöglicht werden. Konzentrationen von 175 bis 200 mg L^{-1} Leucin sind in diesen Versuchen wachstumsoptimal.

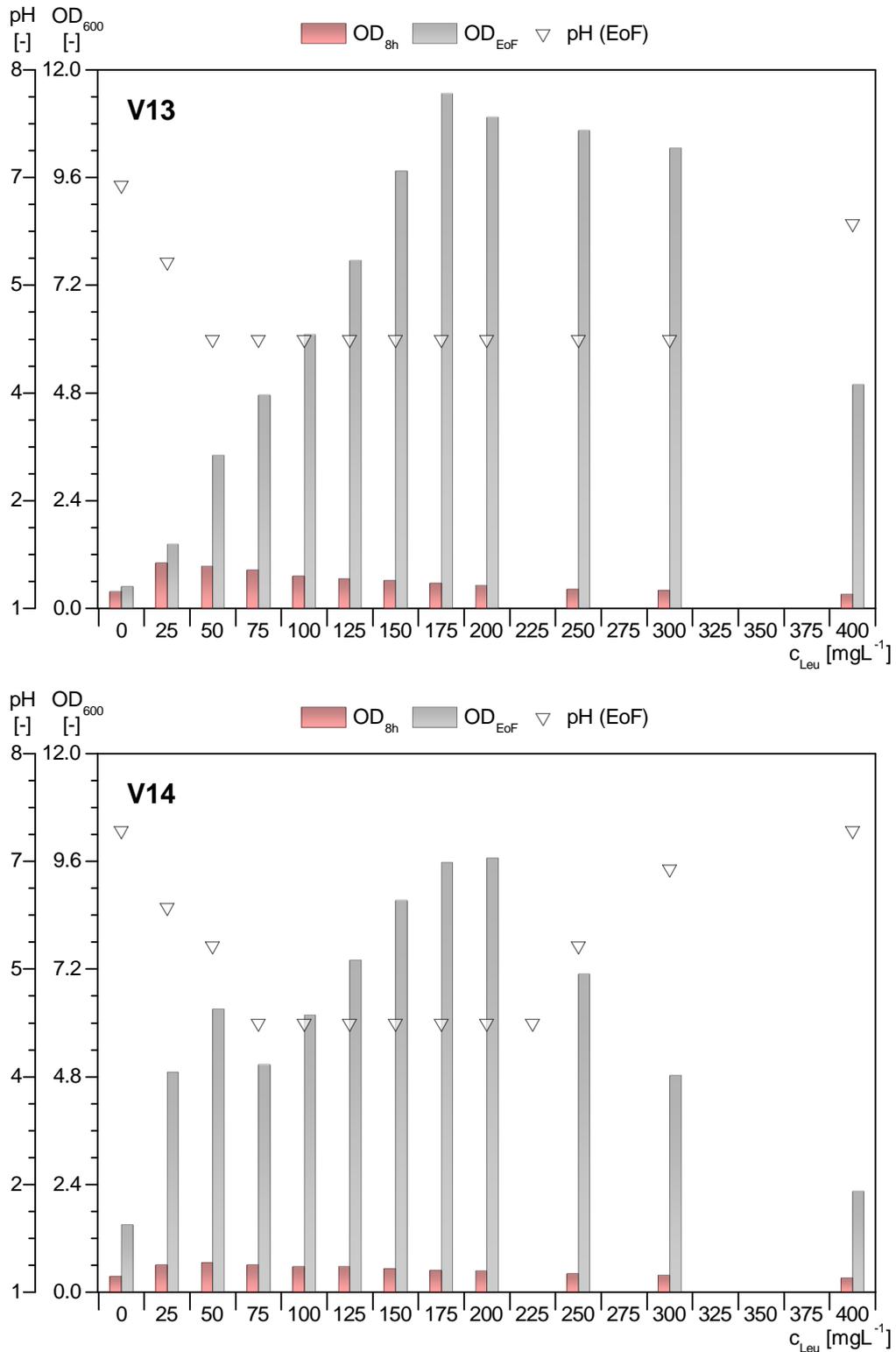


Abb. 4.15: V13 und V14 – Kinetik der erreichten End-ODs (OD_{EoF}) ohne Induktion in Abhängigkeit der zugesetzten Leucinkonzentration (c_{Leu}). Zum Vergleich ist der gemessene OD-Wert nach 8 Stunden aufgetragen (OD_{8h}).

Die Abb. 4.16 ermöglicht die Betrachtung der Grenzen, in denen der Einsatz der Aminosäure Leucin auf die Zielgrößen förderlich ist, nachdem eine Induktion erfolgt ist. Zudem werden auch die Bereiche gezeigt, in welchen wachstums- und expressionseinschränkende Effekte durch zu hohe oder niedrige Aminosäurekonzentrationen erzeugt werden. Die Abb. 4.16 ist analog zu Abb. 4.15 aufgebaut. Der Unterschied besteht in der zusätzlichen Abbildung der Zielproteinkonzentration. Linear interpoliert sind die Proteinkonzentrationswerte der Leucinkonzentrationen, welche nicht untersucht werden, jedoch der grafischen Übersicht dienen (225, 275, 325, 350, 375 mg L⁻¹ Leucin).

Mit der Darstellung der erzeugten Zielproteinkonzentrationen c_P in Abhängigkeit der zugesetzten Leucinkonzentrationen c_{Leu} ergibt sich in Abb. 4.16 eine Kinetik, die stimulierende und inhibierende Effekte durch diesen Wachstumsfaktor aufzeigt. Im Vergleich zur Wachstumskinetik in Abb. 4.15 werden geringere End-OD-Werte erreicht. Entscheidend ist an dieser Stelle, dass das T7-RNA-Polymerase basierte Promotorsystem nach der durchgeführten IPTG-Induktion für eine Wachstumsinhibierung bzw. -Einschränkung sorgt. So werden Energieressourcen vor allem für die Expression verwendet und das Wachstum wird reduziert. Dies macht sich in den erreichten Zelldichten bemerkbar, die im Vergleich zu den erreichten Werten in Abb. 4.15 deutlich niedriger ausfallen.

In allen Fermentationen ist ein Zusammenhang zwischen den gemessenen pH-Werten sowie den erreichten End-OD-Werten und Proteinkonzentrationen zu erkennen. Werden hohe optische Dichten festgestellt, so ist die Absenkung des pH-Wertes in saure Bereiche ein einhergehender Effekt.

Sofern Leucin in ausreichender Konzentration vorliegt bzw. nicht inhibierend wirkt, kann *E. coli* mit der im Überschuss vorliegenden C-Quelle hohe Wachstumsraten erreichen. Bedingt durch das Überangebot kann vermehrt Säure in Form von Acetat und Lactat gebildet werden. Gleichzeitig bewirkt ein Anstieg der Zelldichte einen höheren Bedarf an gelöstem Sauerstoff in der Kulturbrühe. Anaerobe Bedingungen sind mit den zur Verfügung stehenden Sauerstoffeintragsraten nicht auszuschließen, womit zusätzlich Acetat als unerwünschtes Nebenprodukt gebildet wird [6, 24].

Das Wachstum kann durch saure Milieubedingungen eingeschränkt und maximale optische Dichten möglicherweise nicht erreicht werden. Vor allem aber kann das Absinken des pH-Wertes besonders Einfluss auf die Produktbildung nehmen. Der Vergleich der Versuche V13 und V14 in Abb. 4.16 zeigt, dass bei niedrigeren pH-Werten ein geringeres Wachstums- und Produktbildungspotential zu beobachten ist. In Versuch V13 beträgt die maximale Zielproteinkonzentration 49 mg L⁻¹ bei pH 6.0. In Versuch V14 beträgt die maximale Proteinkonzentration 75 mg L⁻¹ bei pH 7.0. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Absinken des pH-Wertes und geringeren Zielproteinkonzentrationen könnte außerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden.

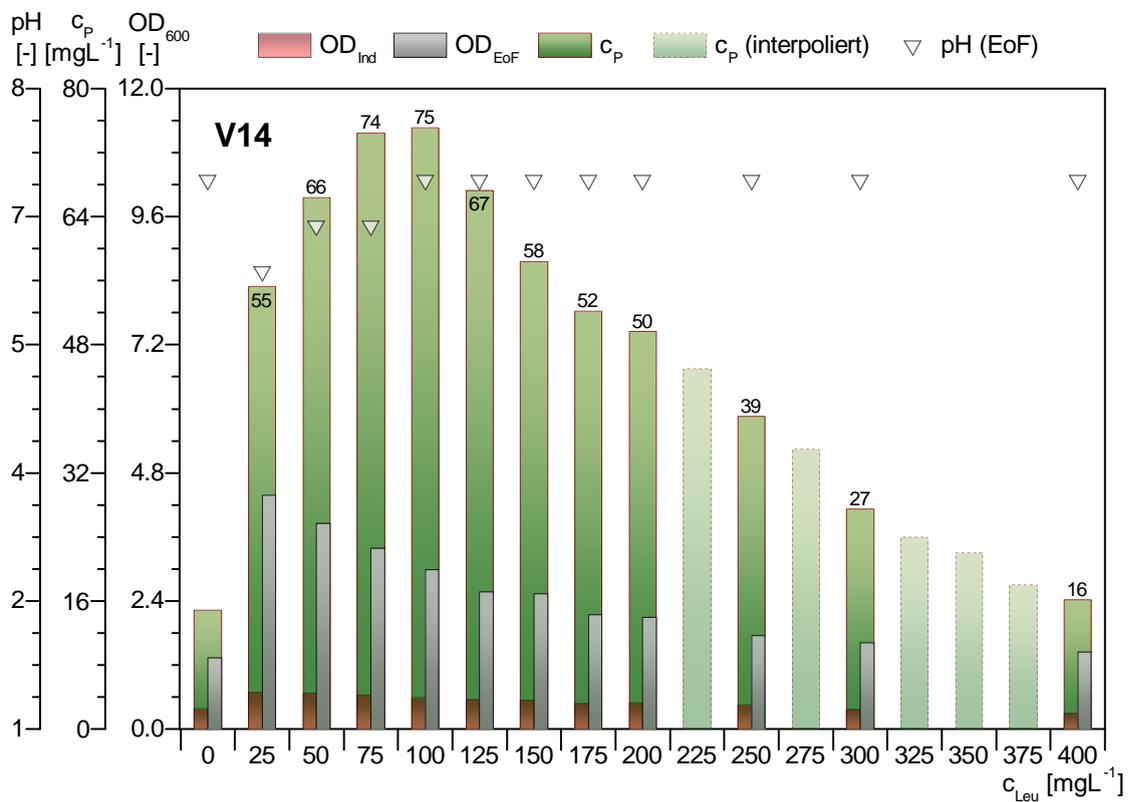
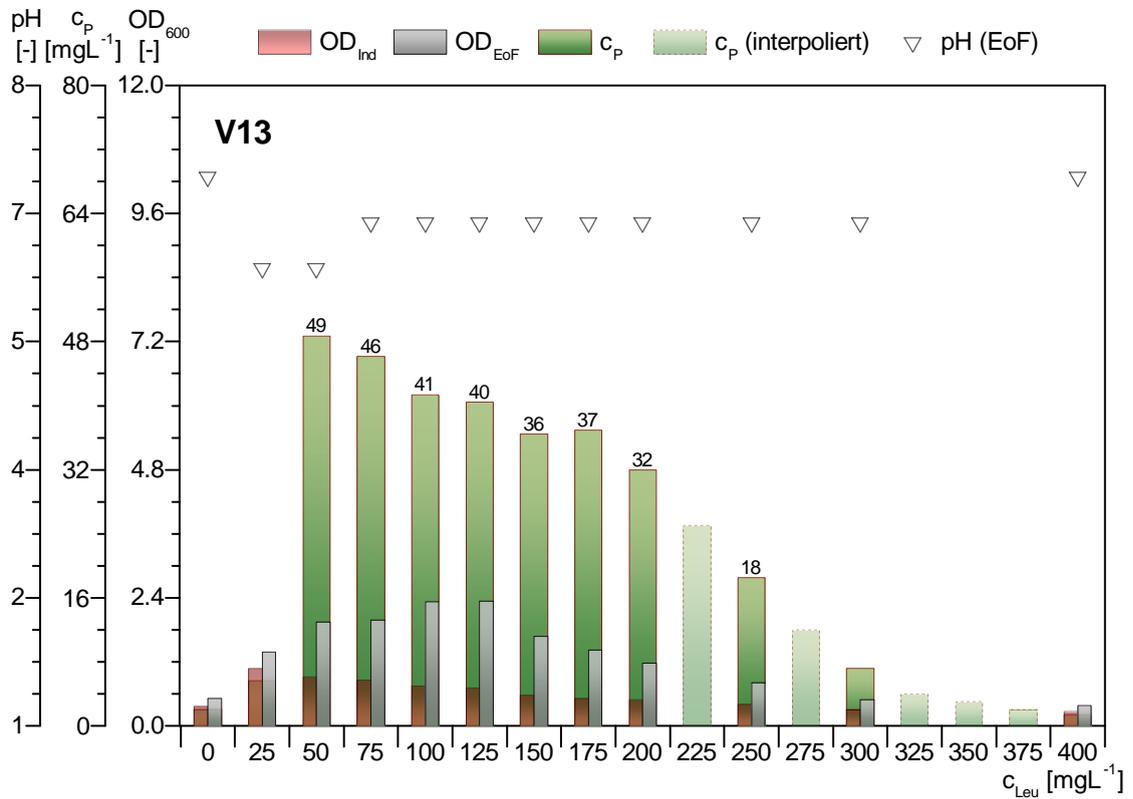


Abb. 4.16: V13 und V14 – Kinetik der erreichten Zielproteinkonzentrationen in Abhängigkeit der zugesetzten Leucinkonzentrationen. Mit der Induktions-OD (OD_{Ind}), der End-OD (OD_{EoF}) und dem pH-Wert nach 16 Stunden Expression.

Die Produktbildung in Abb. 4.16 ist in beiden Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt. In erster Linie fällt auf, dass in V13 weitaus geringere Zielproteinkonzentrationen und End-OD-Werte erreicht werden als in V14. Beachtet man den abgesunkenen pH-Wert, so sind vermehrt Nebenprodukte wie Acetat oder Lactat produziert worden und weisen auf eine mögliche Sauerstofflimitierung hin. Beide Effekte schränken sowohl das Zellwachstum als auch die Expressionsleistung ein. Hervorzuheben ist die Verschiebung des Leucinkonzentrationsoptimums für das Wachstumsverhalten und die Produktbildungsaktivität nach der Induktion in Bereiche von 50 bis 125 mg L⁻¹. Deutlich wird dies vor allem in Versuch V14, in welchem niedrige Aminosäurekonzentrationen der Zelle zu höheren Zelldichten verhelfen. In Versuch V14 ist die Expression im Bereich zwischen 75 bis 100 mg L⁻¹ optimal. Leichte Unterschiede existieren in Versuch V13. Hier sind Konzentrationen von 50 bis 75 mg L⁻¹ am besten geeignet sind.

Aus den Versuchen V13 und V14 werden die Schlüsse gezogen, dass für den Wachstumsprozess Leucinkonzentrationen von etwa 200 mg L⁻¹ im Batchmedium geeignet ist. Für die Proteinexpression im Batch-Verfahren führen Leucinkonzentrationen von 50 bis 100 mg L⁻¹, unter den gegebenen Bedingungen im MTP-Format, zur maximalen Produktausbeute. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wird eine erste 1-Liter-Fermentation zur Maßstabsübertragung durchgeführt. Dazu wird die optimale Konzentration für das Wachstum von 200 mg L⁻¹ verwendet.

4.2.3 Fed-Batch-Verfahren im 1-Liter-Maßstab (V15)

In den vorherigen Versuche mit dem *E. coli* Derivat B117 im MTP-Format wurde die Leucinkonzentration ermittelt, bei der ein Wachstum des Bakteriums auf Minimalmedium unter den gegebenen Bedingungen optimal verläuft. Das bisherige Ergebnis aus den Batch-Versuchen wird in einen größeren Maßstab überführt und im 1-Liter-Fermenter im Fed-Batch-Verfahren angewandt.

Tab. 4.14: Verwendete Leucinkonzentrationen für die Fed-Batch-Fermentation V15.

	$c_{\text{ASi}} [\text{g L}^{-1}]$
Batchmedium	0.2
Feedmedium	3.0

In Tab. 4.14 sind die verwendeten Leucinkonzentrationen für das Batch- und Feedmedium aufgeführt. Für die Leucinkonzentration im Batch wird das Optimum der MTP-Versuche verwendet und auf 200 mg L⁻¹ gesetzt. Im Feedmedium wird das Verhältnis der Leucin- zu Glycerinkonzentration des Batchmediums der MTP-Versuche mit B117 verwendet (200 mg L⁻¹ Leucin zu 20 g L⁻¹ Glycerin). Dieses Verhältnis wird im Feedmedium bei einer Glycerinkonzentration von 300 g L⁻¹ aufrecht erhalten und beträgt demnach 3.0 g L⁻¹.

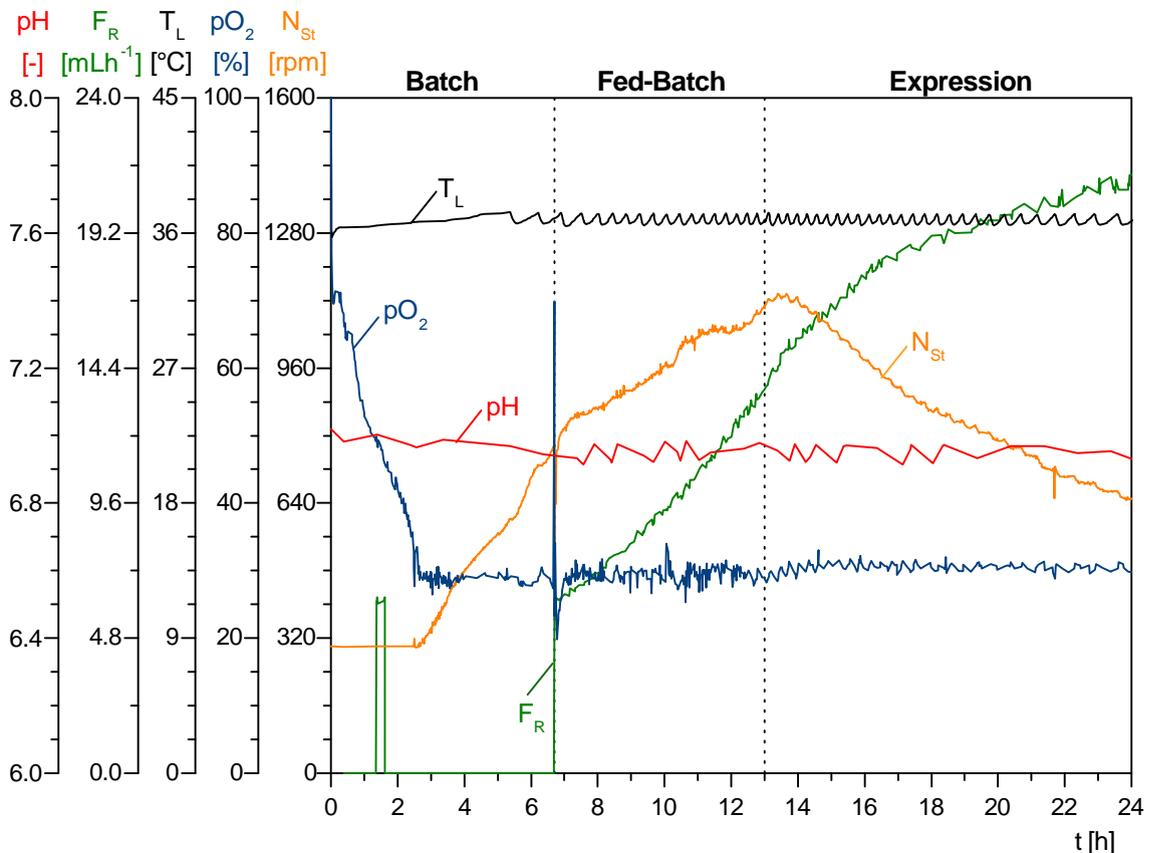


Abb. 4.17: V15 – Online Messdaten. Mit F_R - Zufütterrata Substrat, T_L - Temperatur der Flüssigphase, pO_2 - Sauerstoffpartialdruck und N_{St} - Rührerdrehzahl.

Das sterile Fermentationsmedium wird mit 50 mL inokuliert. Der Kultivierungsverlauf wird im Folgenden anhand der online und offline Messdaten beschrieben, die in Abb. 4.17 und 4.18 dargestellt sind.

Die online Messdaten in Abb. 4.17 zeigen nach Inokulation einen abfallenden pO_2 -Wert in der Batch-Phase. Reguliert wird dieser durch die pO_2 -Drehzahlregelung ab dem Erreichen eines Grenzwertes von 30%. Ein dauerhaftes Absinken des pO_2 -Wertes wird damit verhindert. Notwendig ist dafür die kontinuierliche Erhöhung der Rührerdrehzahl N_{St} ab diesem Zeitpunkt des Regelungseinsatzes (ca. 2.5 Stunden Kultivierungsdauer). Dadurch wird der Sauerstoffeintrag in das Medium erhöht und der Sauerstoffpartialdruck aufrecht erhalten. Das Ende der Batch-Phase kennzeichnet sich durch einen plötzlichen Anstieg des pO_2 -Wertes aus, der den Verbrauch der primären C-Quelle Glycerin signalisiert. Aufgrund der pO_2 -Drehzahlregelung sinkt gleichzeitig für kurze Zeit die Rührerdrehzahl.

Die Zufütterung des Feedmediums startet automatisch am Ende der Batch-Phase, ausgelöst durch den plötzlichen Anstieg des pO_2 -Wertes.

Bereits vor dem Ende der eigentlichen Batch-Phase wird die Feed-Pumpe nach ca. 2.5 Stunden durch ein fehlerhaftes Signal kurzzeitig aktiviert. Das vorhandene Totvolumen in der Zufütterungsvorrichtung sowie die kurze Dauer von etwa 10 Minuten verhindern jedoch einen effektiven Feed-Eintrag. Nach regulärer Aktivierung der Zufütterung (6.8 Stunden) verläuft die Zufüttertrate $F_R(t)$ zunächst exponentiell und nach 10 Stunden Zufütterung linear. Die Parameter sind nach der Beschreibung in Abschnitt 2.3.2 und 3.4.3 gesetzt.

Mit dem Erreichen der Induktions-OD von 31.1 (s. Abb. 4.18) wird nach 13 Stunden Fermentationszeit die Expressionsphase durch IPTG induziert. Die abfallende Rührerdrehzahl N_{St} gibt Aufschluss über den geringer werdenden Bedarf an Sauerstoff in der Flüssigphase.

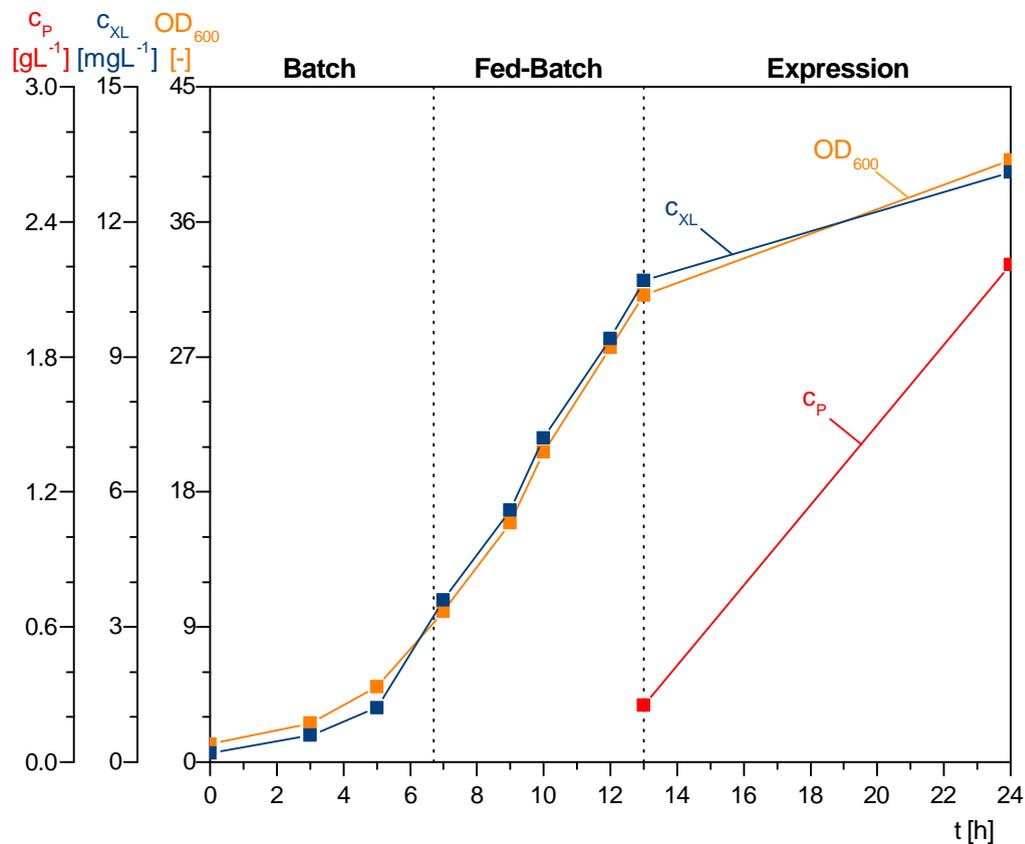


Abb. 4.18: V15 – Offline Messdaten. Mit c_P - Zielproteinkonzentration (B117), c_{XL} - Zellkonzentration, OD_{600} - Optische Dichte bei 600 nm.

Abb. 4.18 zeigt die offline Messdaten der Fermentation V15. Die über die Biotrockenmasse bestimmte Zellkonzentration c_{XL} und die optische Dichte OD_{600} verlaufen nahezu parallel. In der Batch-Phase steigen sie exponentiell an, da das vorliegende Glycerin zu unlimitiertem Wachstum führt. In der Fed-Batch-Phase wird das Wachstum aufgrund der gesteuerten Wachstumsrate μ_w limitiert. Dennoch wachsen die Zellen exponentiell weiter.

Nach der Induktion wird das Wachstum eingeschränkt. Dies war bereits in den Versuchen V13 und V14 im MTP-Format zu beobachten. Eine Probenahme zur Bestimmung der Zielproteinkonzentration c_P erfolgt zum Induktionszeitpunkt und nach 11 Stunden Expression. Die Kultivierung wird nach 24 Stunden beendet, da der gemessene OD_{600} -Wert nach 24 Stunden Kultivierungszeit und die kontinuierlich sinkende Rührerdrehzahl auf ein stark limitiertes Wachstum schließen lassen. Ein Glycerin-Test zeigt eine Akkumulation der C-Quelle auf und bestätigt die Annahme des inhibierten Wachstums.

Neben dem grundlegenden Effekt von IPTG das Wachstum durch die Stimulation der Promotorregion einzuschränken, sind die Gründe beim Wachstumsfaktor Leucin zu suchen. Offenbar kam es nach der Induktion zu einer starken Inhibierung durch zu kritische Leucinkonzentrationen. Die zuvor erzeugten Versuchsergebnisse mit den Versuchen V14 und V15 zeigten optimale Leucinkonzentrationen im Bereich zwischen 50 und 125 mg L⁻¹ Leucin. Unklar ist, ob Leucin akkumuliert ist oder verbraucht worden ist. Beide Szenarien sind möglich. Einerseits könnte durch die Zufütterung zu viel Leucin in die Kulturbrühe gelangt sein, das nach der Induktion und dem dadurch limitierten Wachstum durch den T7-RNA-Polymerase stimulierten Promotor nicht mehr verstoffwechselt werden konnte. Eine Leucin-Überschusslimitierung tritt ein.

Andererseits kann durch die starke Expressionsaktivität auch Leucin zur Generierung der Zellproteine benötigt worden sein. Die Leucin-Zufuhr durch die Zufütterung reicht in diesem Fall nicht mehr aus und ein Leucin-Mangel entsteht. Die Leucin-Fütterung limitiert in diesem Fall das Wachstum und auch die Produktbildungsaktivität stark durch eine unzureichende Versorgung mit dem essentiellen Wachstumsfaktor.

Es fällt auf, dass die Rührerdrehzahl ab Induktionszeitpunkt kontinuierlich absinkt. Dies deutet stark auf eine zu hohe Leucinkonzentration hin, da das Wachstum induziert durch IPTG und der dadurch verbundenen geringeren Notwendigkeit an Leucin limitiert wird. Tendenziell ist eine Aminosäureüberschusslimitierung in diesem Fall wahrscheinlicher.

Die Fermentation ist mit bereits durchgeführten Kultivierungen auf Komplett- und Minimalmedium zu vergleichen. In der Vergangenheit bei RHB durchgeführte Fermentationen, die vor einer abschließenden systematischen Untersuchung mittels Mikrotiterplatten stattfanden, wurden unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Nach 11 Stunden Expression kann in Versuch V15 eine Zielproteinkonzentration von 2.2 g L⁻¹ generiert werden. Vergleichsweise sind auf dem Komplettmedium Konzentrationen von etwa 7 g L⁻¹ möglich. Anzumerken ist, dass bis zum Induktionszeitpunkt die Kultivierungsverläufe ähnlich sind und die Wachstumsphasen übereinstimmen. Erst nach Induktion kommt es zu starken Abweichungen von bisherigen Kultivierungen des B117-Stammes durch Wachstumsinhibitionen.

Auf Minimalmedium wurde bisher bei RHB mit Leucinkonzentrationen von 2.5 und 5.0 g L⁻¹ kultiviert, dessen Inhibierung bereits zu Beginn der Fermentation zu keinem ausreichenden Wachstum führte. Mit 2.5 g L⁻¹ Leucin konnte nach 24 Stunden eine OD₆₀₀ von etwa 24 erreicht werden, bei 5 g L⁻¹ gelang man nicht über eine OD₆₀₀ von 4. Eine Induktion wurde nicht durchgeführt. Dies zeigt wiederholt deutlich, dass eine Aminosäureüberschusslimitierung in höheren Konzentrationsbereichen einsetzt und das Wachstum stark limitiert bzw. verhindert. Auch wenn sich der B117-Stamm als Leucin-Mangelmutant herausgestellt hat, sind zu hohe Konzentrationen nicht zielführend.

Mit der abschließenden Kultivierung des BL21-Derivates auf Minimalmedium konnte gezeigt werden, dass das Wachstum und die Produktbildung trotz einer Leucin-Auxotrophie möglich ist. Diese erste Fermentation bietet eine erste Grundlage für weitere Prozesse im 1-Liter-Maßstab. Die bereits gesammelten Erkenntnisse aus dem MTP-Format könnten dabei helfen die Kultivierung zu verbessern. Vor allem muss dabei die Anpassung und Optimierung der Leucinkonzentration nach der Induktion durchgeführt werden. Limitierungen durch den Wachstumsfaktor werden so vermieden.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Bachelorarbeit stand die systematische Untersuchung von Aminosäurezusätzen zu Mineralmedien und deren Auswirkung auf das Wachstumsverhalten und die Produktbildung rekombinanter *Escherichia coli* im Mikrotiterplattenformat (MTP-Format). Als Modellorganismen wurden zwei verschiedene BL21-Derivate verwendet, die sich in ihrem Wachstumsverhalten auf Minimalmedium wesentlich unterscheiden.

Zum einen wurde ein prototropher *E. coli*-Mutant (B080-Stamm) verwendet, der auf Minimalmedium fähig war zu wachsen und das Zielprotein zu exprimieren. Für die qualitative Bewertung von Aminosäurezugaben wurden diese vorzugsweise in Form von Einzelzugaben, aber auch in definierten Gruppierungen dem Medium zugesetzt und das Wachstumsverhalten und die Produktbildung im Batch- sowie im Fed-Batch-Verfahren im MTP-Format analysiert. Im Batch-Verfahren stellte sich im Verlauf die Problematik einer starken pH-Absenkung aufgrund von Substratüberschusseffekten und anaerobem Stoffwechsel heraus. Inhibierende und stimulierende Aminosäuren konnten zwar identifiziert werden, jedoch waren die Ergebnisse nicht immer eindeutig. Die Stoffwechseleffekte wurden daraufhin durch die Einführung eines Fed-Batch-Verfahrens reduziert aber nicht gänzlich vermieden. Die Zufütterung gelang durch FeedBeads. Im laufenden Verfahren stellten sich letztendlich vor allem die Wachstumsfaktoren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin bei Einzelzugabe heraus.

Mit den gewonnen Erkenntnissen wurde eine erste Realisierung im 1-Liter-Maßstab vorgenommen. Durch drei Fermentationen im Multibioreaktorsystem konnte gezeigt werden, dass der Zusatz der im MTP-Format identifizierten Aminosäuren auch im geregelten Fermentersystem einen stimulierenden Effekt auf Wachstum und Produktbildung besitzen. Die Kultivierung mit Glutaminsäure als Einzelzugabe und die Kultivierung mit Glutaminsäure-, Asparaginsäure- sowie Prolinzusatz zeigten dabei bis 25 Stunden nach Induktion Zellwachstum. Ohne Aminosäurezusatz musste die Fermentation nach 16 Stunden und geringer werdenden Zellkonzentrationen abgebrochen werden.

Zum anderen wurde ein Mangelmutant bezüglich der Aminosäure Leucin eingesetzt (B117-Stamm). Dieser Stamm wurde in unterschiedlichen Batch-Versuchen im MTP-Format näher untersucht. Einerseits wurden Experimente durchgeführt, bei der Leucin durch fünf andere Aminosäuren ersetzt wurde sowie Wechselwirkungen von Aminosäureklassen betrachtet wurden. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass Leucin unersetzbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Leucin in Gegenwart von Valin seine stimulierende Wirkung verliert. Wurde zusätzlich Isoleucin hinzugegeben konnte der Valin-Überschusseffekt aufgehoben werden.

Auf der anderen Seite konnte der Einsatz verschiedener Leucinkonzentrationen von 25–400 mg L⁻¹ zeigen, dass stimulierende und inhibierende Einsatzkonzentrationen des Wachstumsfaktors existieren. Differenziert werden musste zwischen geeigneten Konzentrationen für das Wachstum sowie für die Produktbildung. Für das Wachstum waren 175–200 mg L⁻¹ Leucin optimal, für die Produktbildung hingegen 50–125 mg L⁻¹. Wurden diese Bereiche über- oder unterschritten, konnten Inhibierungen bzw. Mangelercheinungen festgestellt werden.

Mit einer Batch-Konzentration von 200 mg L⁻¹ Leucin wurde darauf eine 1-Liter-Fermentation im Multireaktorsystem durchgeführt. Diese ergab, bis zur Induktion, ein typisches Wachstumsverhalten für das B117-Derivat. Ab Induktionsstart wurde eine Inhibierung festgestellt und die verwendete C-Quelle akkumulierte. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch der B117-Stamm fähig ist auf Mineralmedium zu wachsen. Die Auxotrophie in Bezug auf Leucin kann mit der zutreffenden Konzentration des Wachstumsfaktors ausgeglichen werden. Das Wachstum und bedingt auch die Produktbildung wurden damit ermöglicht.

6 Ausblick

Durch die Versuche konnte nachgewiesen werden, dass Aminosäuren einen stimulierenden aber auch inhibierenden Effekt auf das Wachstum und die Produktbildung in Abhängigkeit ihrer Spezifität sowie Konzentration besitzen.

Der B080-Stamm konnte ohne Aminosäuren auf Minimalmedium wachsen. Dennoch wurde der Stamm bisher auf Kompletmedium fermentiert. Im Vorwege wurde bei RHB eine 1-Liter-Fermentation durchgeführt. Für eine Kultivierung auf Kompletmedium im Fed-Batch-Verfahren ergab sich nach 26 Stunden Expression eine Ausbeute von 12.9 g L^{-1} Zielprotein bei einer erreichten End-OD von 276. Mit den durchgeführten Fermentationen auf Minimalmedium konnte diese Ausbeute mit zugesetzten Wachstumsfaktoren nicht erreicht werden (maximal 5.9 g L^{-1} Zielprotein bei erreichter End-OD von 132). Ausstehend ist an dieser Stelle die weiterführende Analyse verschiedener Aminosäurekonzentrationen, die in den ersten Fermentationen im Modell-Reaktor nicht spezifisch angepasst wurden. Besonders Glutaminsäure kann auch in höheren Konzentrationen zugesetzt werden und die Produktbildung maximieren [3].

Mit der Identifikation einer stimulierenden Leucinkonzentration gelang es, den auxotrophen B117-Stamm auch auf Minimalmedium zu reproduzieren. Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse kann eine weitere Optimierung durchgeführt werden, um die Zielgrößen (optische Dichte und Zielproteinkonzentration) zu maximieren. Eine Anpassung der Leucinkonzentration nach Induktionsstart muss besonders erfolgen, um *E. coli* neben der Produktbildung auch weiterhin ein ausreichendes Wachstum zu ermöglichen. Die durchgeführte Fermentation auf Minimalmedium im 1-Liter-System bietet dabei einen guten Startpunkt zur weiteren Fermentationsentwicklung und erlaubt womöglich die Ablösung der Kultivierung auf Kompletmedium.

Ein weiterer Punkt ist bezüglich der interaktiven Wirkung von Leucin mit Isoleucin und Valin zu klären, da zu Kultivierungsbeginn im MTP-Format eine verbesserte Adaption des Organismus zu beobachten war, als bei der Einzelzugabe von Leucin.

Mit der Durchführung von MTP-Fermentationen war es möglich viele verschiedene Aminosäuren und deren Kombinationen sowie Konzentrationsspektren systematisch zu untersuchen. Das etablierte System ist als Applikation dafür geeignet auch weitere Medienkomponenten – wie zum Beispiel Spurenelemente oder auch Vitamine – qualitativ als auch quantitativ zu untersuchen. Das Verfahren kann genutzt werden, um von undefinierten Kompletmedien auf definierte Minimalmedien zu wechseln, indem essentielle oder unterstützende Bestandteile für Wachstum und Produktbildung identifiziert werden.

Eindeutige Ergebnisse liefert die systematische Untersuchung bei Organismen mit einem Mutationsdefekt, wenn redundante Biosynthesewege ausgeschaltet sind und essentielle Wachstumsfaktoren benötigt werden. Bei prototrophen Organismen ist die Selektion von stoffwechselunterstützenden Faktoren schwieriger, da die Ergebnisse nicht immer eindeutig sind. Es sind Wiederholungen und Verifikationen notwendig. Neben dem Medienscreening kann das System auch zur Stammauswahl und Stammentwicklung genutzt werden.

Das Fed-Batch-Verfahren im MTP-Format sollte im Folgenden noch weitreichender angewendet und weiter etabliert werden, um noch eindeutigere Ergebnisse, durch Vermeidung von Sauerstofflimitierungen, zu erzeugen.

Literaturverzeichnis

- [1] AKASHI, H. ; GOJOBORI, T.: Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In: *PNAS* 99 (2002), Nr. 6, S. 3695–3700
- [2] BALTES, W. ; MATISSEK, R.: *Lebensmittelchemie*. Springer, 2011 (Springer-Lehrbuch)
- [3] BAST, E.: *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Springer Berlin Heidelberg, 2001
- [4] BELITZ, H.D. ; GROSCH, W. ; SCHIEBERLE, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, 2008
- [5] BUJNICKI, R.: *Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten*. Forschungszentrum Jülich, 2007 (Reihe Lebenswissenschaften)
- [6] CHMIEL, H.: *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2011 (Springer-Link)
- [7] DUETZ, W.A.: Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. In: *Trends in Microbiology* 15 (2007), Nr. 10, S. 469–475
- [8] DUETZ, W.A. ; RÜEDI, L. ; HERMANN, R. ; O'CONNOR, K. ; BÜCHS, J. ; WITHOLT, B.: Methods for Intense Aeration, Growth, Storage, and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), Nr. 6, S. 2641–2646
- [9] ENZYSCREEN: *24-deepwell microplates*, 2014. <http://enzyscreen.com>, Abruf: 24.09.2014
- [10] EPPENDORF: *Get More! Quality - Stability - Purity: Eppendorf Plates 96 and 384*, 2012. http://eshop.eppendorfn.com/documents/download/Brochure_Microplates_Deepwell_Plates_Get_More_Quality_157647_Brochure, Abruf: 24.09.2014
- [11] FLICKINGER, M.C.: *Upstream Industrial Biotechnology*. Bd. 2. Wiley, 2013
- [12] FUCHS, G. ; EITINGER, T. ; SCHLEGEL, H.G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, 2007
- [13] HORTON, H.R.: *Biochemie*. Pearson Studium, 2008

- [14] IUPAC-IUB: *Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations 1983)*, *Pure Appl. Chem.*, 1984. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>, Abruf: 29.10.2014
- [15] JANSOHN, M. ; ROTHHÄMEL, S. ; AIGNER, A. ; ROTHAMEL, S.: *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag, 2012
- [16] JEONG, H. ; BARBE, V. ; HOON LEE, C. ; VALLENET, D. ; SU YU, D. ; CHOI, S.-H. ; COULOUX, A. ; LEE, S.-W. ; YOON, S.H. ; CATTOLICO, L. ; HUR, C.-G. ; PARK, H.-S. ; SÉGURENS, B. ; KIM, S.-C. ; OH, T.-K. ; LENSKI, R.E. ; STUDIER, F.W. ; DAEGELEN, P. ; KIM, J.F.: Genome Sequences of Escherichia coli B strains {REL606} and BL21(DE3). In: *Journal of Molecular Biology* 394 (2009), Nr. 4, S. 644–652
- [17] JEUDE, M. ; DITTRICH, B. ; NIEDERSCHULTE, H. ; ANDERLEI, T. ; KNOCKE, C. ; KLEE, D. ; J., Büchs: Fed-Batch Mode in Shake Flasks by Slow-Release Technique. In: *Biotechnology and Bioengineering* 95 (2006), Nr. 3, S. 433–445
- [18] KÜHNER: *FeedBeads*, 2014. <http://www.kuhner.com/de/produkte/anwendungstechnologien/slow-release/feedbeads.html>, Abruf: 24.11.2014
- [19] KUTTER, E. ; SULAKVELIDZE, A.: *Bacteriophages: Biology and Applications*. Taylor & Francis, 2004
- [20] LEDERBERG, J.: Isolation and Characterization of Biochemical Mutants of Bacteria. In: *Methods in Medical Research* 3 (1950), S. 5–22
- [21] MAISON, W. ; KNAPP, H.: *Römpp Enzyklopädie Online: Aminosäuren*, 2014. <http://www.roempp.com>, Abruf: 24.10.2014
- [22] MARIN, K. ; KRÄMER, R.: Amino Acid Transport Systems in Biotechnologically Relevant Bacteria. In: *Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering* 1 (2007), Nr. 5, S. 289–325
- [23] MARIN, K. ; KRÄMER, R.: Import und Export von Aminosäuren in Bakterien. In: *BIOspektrum* 6 (2009), Nr. 15, S. 600–604
- [24] NAKANO, K. ; RISCHKE, M. ; SATO, S. ; MÄRKL, H.: Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (1997), Nr. 5, S. 597–601
- [25] NETTEKOVEN, J.A.: *Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO₂-Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von Escherichia coli*. Universität zu Köln, 2009
- [26] PRÄVE, P. ; FAUST, U. ; SITTIG, W. ; SUKATSCH, D.A.: *Handbuch der Biotechnologie*. Oldenbourg, 1994

- [27] RICHTER, G.: *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*. Thieme, 2003
- [28] ROHE, P.: Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen. In: *Schriften des Forschungszentrums Jülich* 58 (2012)
- [29] SCHENCK, M. ; KOLB, E.: *Grundriss der physiologischen Chemie für Veterinärmediziner, Humanmediziner und Biologen*. G. Fischer, 1964
- [30] TRAKHANOV, S. ; VYAS, N.K. ; LUECKE, H. ; KRISTENSEN, D.M. ; MA, J. ; QUIOCHO, F.A.: Ligand-Free and -Bound Structures of the Binding Protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC Leucine/Isoleucine/Valine Transport System: Trajectory and Dynamics of the Interdomain Rotation and Ligand Specificity. In: *Biochemistry* 44 (2005), Nr. 17, S. 6597–6608

Anhang

A Übersicht der Messdaten der Kultivierungen des B080-Stammes

Tab. A.1: Versuchs- und RHB-Nummern für den B080-Stamm.

	B080											
V-Nr.	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09	V16	V17	V18
RHB-Nr.	U11	U13	U15	U17	U19	U20	U10	U21	U22	U25	U26	U27

Tab. A.2: V01 – Messwerte (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben), $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$.

Aminosäure	OD ₆₀₀ [-]					
	Ino.	2 h	4 h	6 h	8 h	9.5 h
Ala	0.04	0.06	0.21	0.62	1.94	4.87
Arg	0.04	0.06	0.23	0.80	3.32	7.73
Asn	0.04	0.08	0.28	0.96	3.86	8.75
Asp	0.04	0.09	0.38	1.42	6.07	9.58
Cys	0.04	0.07	0.23	0.83	3.20	7.26
EAS	0.04	0.12	0.53	3.19	9.34	16.41
Gln	0.04	0.08	0.29	1.01	4.33	9.13
Glu	0.04	0.09	0.38	1.35	5.77	9.63
Gly	0.04	0.07	0.28	0.98	4.21	9.26
His	0.04	0.08	0.25	0.78	2.51	4.92
Ile	0.04	0.08	0.25	0.85	3.46	9.25
Leu	0.04	0.06	0.19	0.59	1.74	3.70
Lys	0.04	0.07	0.26	0.81	2.85	7.31
Met	0.04	0.09	0.32	1.13	4.55	8.84
PAS	0.04	0.20	1.65	9.35	11.31	18.22
Phe	0.04	0.07	0.24	0.86	3.75	9.57
Pro	0.04	0.07	0.31	1.18	3.78	9.91
Ser	0.04	0.09	0.29	1.05	3.61	9.11
Thr	0.04	0.06	0.22	0.74	2.74	7.06
Trp	0.04	0.08	0.26	0.82	3.36	7.45
Tyr	0.04	0.07	0.26	0.90	3.21	7.79
Val	0.04	0.06	0.22	0.74	2.97	7.04
0AS	0.04	0.08	0.26	0.86	3.29	7.59
0AS	0.04	0.08	0.27	0.88	3.47	8.06

Tab. A.3: V02 – Messwerte (B-Proben), $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $OD_{5 \text{ h}} \stackrel{!}{=} OD_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	Ino.	OD ₆₀₀ [-]						c _P [mg L ⁻¹]	
		2 h	4 h	5 h	6.5 h	8 h	24 h	8 h	24 h
Ala	0.09	0.25	0.74	1.31	4.09	8.09	13.34	564	762
Arg	0.09	0.26	0.85	1.65	5.56	11.44	13.08	895	770
Asn	0.09	0.27	0.90	1.80	5.25	11.34	13.10	769	776
Asp	0.09	0.31	1.17	2.30	7.06	12.10	13.81	818	764
Cys	0.09	0.10	0.14	0.18	0.23	0.55	9.52	16	195
EAS	0.11	0.19	0.91	2.11	7.48	11.67	14.08	778	717
Gln	0.09	0.27	0.95	1.93	5.73	11.71	13.81	722	722
Glu	0.09	0.30	1.12	2.17	6.73	12.03	13.89	727	782
Gly	0.09	0.24	0.96	1.70	5.77	11.06	12.36	813	742
His	0.09	0.10	0.11	0.12	0.09	0.18	11.43	2	0
Ile	0.09	0.26	0.85	1.59	5.74	10.91	12.92	781	790
Leu	0.09	0.22	0.69	1.17	3.46	6.60	13.42	474	800
Lys	-	0.11	0.18	0.35	1.08	1.90	11.81	138	506
Met	0.09	0.31	1.09	2.06	6.49	11.33	12.29	770	673
PAS	-	0.11	0.39	1.00	4.90	10.55	20.58	677	1305
Phe	-	0.11	0.18	0.32	0.85	1.14	10.62	30	249
Pro	0.17	0.59	2.15	4.22	9.6	9.61	11.12	343	348
Ser	0.09	0.29	1.02	1.84	6.04	11.55	13.40	789	765
Thr	0.17	0.54	1.67	3.10	8.86	11.78	13.25	660	626
Trp	0.09	0.26	0.89	1.57	4.78	10.52	12.61	700	809
Tyr	0.09	0.29	0.94	1.84	5.84	11.28	13.11	709	685
Val	0.09	0.25	0.82	1.55	5.12	9.94	12.96	777	791
OAS	0.09	0.29	0.95	1.79	5.50	10.83	13.30	745	696

Tab. A.4: V03 – Messwerte (A-Proben), $c_{ASi}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $OD_{5 \text{ h}} \stackrel{!}{=} OD_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	Ino.	OD ₆₀₀ [-]						c _P [mg L ⁻¹]	
		2 h	4 h	5 h	8 h	24 h	8 h	24 h	
Ala	0.10	0.29	0.85	1.46	8.14	14.11	869	721	
Arg	0.10	0.33	1.19	2.11	12.07	15.40	734	810	
Asn	0.10	0.33	1.00	1.72	10.38	12.21	770	636	
Asp	0.10	0.36	1.18	2.14	11.18	12.03	739	742	
Cys	0.10	0.28	0.72	1.19	7.15	10.63	315	704	
EAS	-	0.20	0.87	1.80	10.19	11.66	798	970	
Gln	0.10	0.33	1.06	1.85	10.72	12.64	902	771	
Glu	0.10	0.38	1.19	2.14	11.51	12.64	648	706	
Gly	0.10	0.33	1.19	2.23	11.94	15.09	655	813	
His	0.10	0.30	0.69	1.14	5.03	11.18	301	682	
Ile	0.10	0.32	1.11	2.09	12.65	14.31	702	661	
Leu	0.10	0.28	0.85	1.45	7.36	14.60	370	661	
Lys	0.10	0.33	1.07	1.93	10.75	13.68	589	667	
Met	0.10	0.37	1.12	1.86	10.59	11.90	708	655	
PAS	-	0.09	0.58	1.67	11.53	18.43	901	1047	
Phe	0.10	0.33	1.10	2.02	11.19	13.00	605	634	
Pro	0.10	0.34	1.19	2.29	13.31	15.16	677	745	
Ser	0.10	0.34	1.19	2.23	12.27	15.05	628	740	
Thr	0.10	0.32	1.18	2.10	12.25	14.25	690	707	
Trp	0.10	0.32	0.92	1.61	8.64	11.57	533	664	
Tyr	0.10	0.31	1.05	1.89	10.63	13.65	616	577	
Val	0.10	0.32	1.11	1.92	10.59	13.66	686	672	
OAS	0.10	0.32	0.89	1.64	9.41	11.93	744	1077	

Tab. A.5: V04 – Messwerte (A-Proben), $c_{\text{ASi}}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{OD}_{5 \text{ h}} \stackrel{!}{=} \text{OD}_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	Ino.	OD ₆₀₀ [-]					pH [-] 11 h	c _P [mg L ⁻¹]	
		2 h	4 h	5 h	8 h	11 h		8 h	11 h
Ala	0.02	0.06	0.22	0.31	1.74	4.31	6.6	96	417
Arg	0.02	0.06	0.28	0.45	2.93	7.19	6.0	151	616
Asn	0.02	0.07	0.30	0.49	3.08	8.41	5.9	206	591
Asp	0.02	0.07	0.42	0.75	5.05	12.11	5.0	336	772
Cys	0.02	0.06	0.27	0.46	3.06	8.17	5.8	205	558
EAS	0.03	0.05	0.26	0.47	3.20	12.08	5.1	299	581
Gln	0.02	0.07	0.31	0.55	3.50	9.75	5.7	248	579
Glu	0.02	0.08	0.40	0.74	4.56	12.11	4.3	304	725
Gly	0.02	0.08	0.32	0.53	3.63	9.55	5.7	226	587
His	0.02	0.08	0.27	0.39	2.17	5.27	5.7	102	342
Ile	0.02	0.07	0.26	0.41	2.63	7.04	5.9	142	391
Leu	0.02	0.06	0.22	0.32	1.57	2.96	6.8	79	150
Lys	0.02	0.07	0.27	0.45	2.69	6.96	6.2	142	422
Met	0.02	0.08	0.36	0.55	3.39	9.27	5.5	231	517
PAS	-	0.03	0.17	0.45	5.46	18.45	6.3	427	1142
Phe	0.02	0.07	0.28	0.45	2.55	6.69	6.3	138	301
Pro	0.02	0.08	0.34	0.59	4.37	11.72	4.6	273	773
Ser	0.02	0.07	0.30	0.50	3.32	8.74	5.8	208	618
Thr	0.02	0.06	0.24	0.37	2.02	5.03	6.1	114	266
Trp	0.02	0.07	0.28	0.44	2.33	5.44	5.8	136	310
Tyr	0.02	0.07	0.28	0.43	2.72	7.24	6.1	138	409
Val	0.02	0.07	0.26	0.41	2.51	6.66	6.2	138	314
0AS	0.02	0.07	0.28	0.44	2.66	7.11	6.5	176	599

Tab. A.6: V05 – Messwerte (A-Proben), $c_{\text{ASi}}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $*c_{\text{ASi}}=400 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{OD}_{4 \text{ h}} \stackrel{!}{=} \text{OD}_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	Ino.	OD ₆₀₀ [-]				pH [-] 10 h	c _P [mg L ⁻¹]	
		2 h	4 h	7 h	10 h		7 h	10 h
Ala	0.11	0.28	0.96	5.92	12.89	5.2	379	888
Arg	0.11	0.26	0.98	7.12	13.80	5.0	409	836
Asn	0.11	0.37	1.32	8.06	14.04	5.2	454	870
Asp	0.11	0.35	1.21	7.87	14.36	5.2	719	997
Cys	0.11	0.30	1.08	6.88	14.18	4.9	416	760
Gln	0.11	0.27	0.93	5.67	11.70	5.3	572	840
Glu*	0.11	0.32	1.18	7.34	13.81	5.1	517	866
Gly	0.11	0.35	1.36	9.62	13.82	5.1	557	877
His	0.11	0.31	1.15	7.27	13.37	5.0	297	640
Ile	0.11	0.23	0.77	4.44	11.04	4.8	446	982
Leu	0.11	0.37	1.44	8.61	13.18	5.6	521	831
Lys	0.11	0.32	1.23	7.73	12.87	5.4	729	859
Met	0.11	0.24	0.94	6.40	12.97	5.1	678	786
Phe	0.11	0.37	1.66	10.28	14.55	5.3	338	715
Pro	0.11	0.23	0.72	4.12	9.33	5.5	660	897
Ser	0.11	0.36	1.38	8.94	11.06	4.5	582	995
Thr	0.11	0.32	1.22	7.57	12.75	5.1	604	919
Trp	0.11	0.31	1.10	7.47	13.32	5.3	592	854
Tyr	0.11	0.24	0.90	6.18	13.04	5.3	686	1074
Val	0.11	0.33	1.20	7.91	13.52	4.8	714	874
Klasse 1	0.11	0.35	1.14	7.07	12.64	5.1	515	825
Klasse 2	0.11	0.31	1.13	7.72	13.72	5.3	414	723
Klasse 3	0.11	0.30	1.09	6.95	13.89	5.0	566	912
Klasse 4	0.11	0.31	1.01	6.31	12.30	4.9	511	932

Tab. A.7: V06 – Messwerte (B-Proben). $OD_{4\text{ h}} \stackrel{!}{=} OD_{\text{Ind}}$

Aminosäure ([mg L ⁻¹])	Ino.	OD ₆₀₀ [-]				c _P [mg L ⁻¹]	
		2 h	4 h	7 h	10 h	7 h	10 h
Arg (100)	0.08	0.31	1.18	7.23	13.15	351	608
Arg (300)	0.08	0.32	1.20	7.30	14.65	337	614
Arg (400)	0.08	0.38	1.15	6.98	13.55	608	634
Asp (100)	0.08	0.38	1.45	8.92	12.91	383	570
Asp (300)	0.08	0.40	1.72	10.29	13.40	267	596
Asp (400)	0.08	0.40	1.85	11.44	13.88	534	667
Glu (50)	0.08	0.35	1.30	7.54	12.80	426	694
Glu (100)	0.08	0.36	1.27	7.50	13.71	431	694
Glu (300)	0.08	0.36	1.56	9.67	13.31	538	678
Glu (1000)	0.08	0.35	1.85	13.02	14.84	686	745
Pro (100)	0.08	0.30	1.22	7.10	12.91	365	663
Pro (300)	0.08	0.32	1.36	9.03	14.17	469	741
Pro (400)	0.08	0.32	1.35	9.23	14.66	450	692
Ser (100)	0.08	0.33	1.22	7.45	13.94	352	594
Ser (300)	0.08	0.33	1.19	7.96	13.65	418	726
Ser (400)	0.08	0.30	1.19	8.25	14.67	405	708
Thr (100)	0.08	0.31	1.15	7.65	13.03	414	601
Thr (300)	0.08	0.32	1.14	5.62	12.00	282	549
Thr (400)	0.08	0.29	1.07	5.01	11.33	231	440
Klasse 2 (200)	0.08	0.32	1.24	8.35	12.85	486	756
Klasse 2 (400)	0.08	0.36	1.34	9.07	13.16	515	771
Klasse 4 (200)	0.08	0.25	1.06	4.45	8.89	171	516
Klasse 4 (400)	0.08	0.31	1.40	7.71	13.48	348	726
OAS	0.08	0.30	1.14	6.65	12.52	341	680

Tab. A.8: V07 – Anfangsparameter und Messwerte (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben).

C _{Glu,0} [g L ⁻¹]	n _{FB} x6 mm	n _{FB} x12 mm	Ino.	OD ₆₀₀ [-]					pH [-] 24 h
				3 h	5 h	7 h	22 h	24 h	
0	-	-	0.11	0.65	2.00	2.78	3.50	3.49	7.8
0	-	1	0.11	0.63	6.87	11.68	17.83	18.63	7.0
0	-	2	0.11	0.38	6.80	14.70	23.25	22.30	6.5
0	1	-	0.11	0.81	5.08	6.86	10.00	10.33	7.4
0	1	1	0.11	0.61	7.16	13.23	19.95	18.94	6.9
0	2	-	0.11	0.71	6.24	9.49	15.23	14.88	7.1
0	3	-	0.11	0.71	7.23	12.68	18.98	19.71	7.0
1.5	-	-	0.11	0.86	4.47	5.58	6.27	6.21	7.7
1.5	-	1	0.11	0.61	6.82	12.71	17.92	17.93	7.0
1.5	-	2	0.11	0.39	6.16	13.77	17.55	17.95	5.6
1.5	1	-	0.11	0.88	6.03	8.21	12.34	13.09	7.4
1.5	1	1	0.11	0.86	5.95	8.07	11.74	12.73	7.3
1.5	2	-	0.11	0.76	6.54	10.24	15.61	17.76	7.1
1.5	3	-	0.11	0.73	7.13	12.48	18.37	19.78	7.0
3.0	-	-	0.11	0.93	5.54	7.06	7.62	8.07	7.6
3.0	-	1	0.11	0.63	6.92	11.81	16.35	18.31	6.9
3.0	-	2	0.11	0.39	6.27	12.55	12.93	14.14	4.9
3.0	1	-	0.11	0.75	6.20	9.08	12.87	14.80	7.2
3.0	1	1	0.11	0.58	6.96	12.77	18.91	21.49	6.8
3.0	2	-	0.11	0.67	6.59	10.87	15.61	18.11	7.1
3.0	3	-	0.11	0.66	7.07	11.70	16.85	17.75	7.0

Tab. A.9: V08 – Messwerte (B-Proben), $c_{\text{ASi}}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{OD}_{2 \text{ h}} \stackrel{!}{=} \text{OD}_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	$\text{OD}_{600} [-]$					$c_{\text{P}} [\text{mg L}^{-1}]$		
	Ino.	2 h	5 h	8 h	24 h	5 h	8 h	24 h
Ala	0.11	0.30	1.44	3.10	13.27	65	229	317
Arg	0.11	0.33	2.03	4.29	13.89	72	296	384
Asn	0.11	0.34	1.91	4.20	13.04	93	235	279
Asp	0.11	0.37	2.45	5.46	13.49	130	318	416
Cys	0.11	0.19	0.46	1.06	11.47	13	34	94
Gln	0.11	0.33	1.89	4.16	12.14	95	237	267
Glu	0.11	0.33	2.59	5.72	14.00	134	363	468
Gly	0.11	0.33	1.97	4.36	12.71	109	306	313
His	0.11	0.28	1.19	2.74	11.84	45	160	352
Ile	0.11	0.30	1.74	3.74	13.11	84	236	276
Leu	0.11	0.28	1.24	2.38	12.96	49	131	208
Lys	0.11	0.33	1.85	3.75	11.44	86	233	286
Met	0.11	0.34	1.99	4.52	11.88	106	314	306
Phe	0.11	0.30	1.12	2.35	12.47	45	111	168
Pro	0.11	0.33	2.20	5.07	13.31	116	340	430
Ser	0.11	0.39	2.15	4.87	13.46	98	315	463
Thr	0.11	0.32	1.58	3.33	12.05	79	182	233
Trp	0.11	0.33	1.70	3.41	12.52	81	214	293
Tyr	0.11	0.32	1.67	3.63	12.36	85	228	280
Val	0.11	0.32	1.79	4.14	12.95	91	263	384
Klasse 2	0.11	0.33	1.92	4.29	14.54	111	291	337
Klasse 4	0.11	0.24	1.11	2.34	13.22	37	103	322
0AS	0.11	0.32	1.91	4.01	12.34	107	264	280
0AS (0FB)	0.11	0.31	1.92	3.20	3.53	107	203	161

Tab. A.10: V09 – Messwerte (B-Proben), $c_{\text{ASi}}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{OD}_{2 \text{ h}} \stackrel{!}{=} \text{OD}_{\text{Ind}}$.

Aminosäure	$\text{OD}_{600} [-]$					$c_{\text{P}} [\text{mg L}^{-1}]$		
	Ino.	2 h	5 h	8 h	24 h	5 h	8 h	24 h
Ala	0.11	0.27	1.44	3.45	8.24	98	364	482
Arg	0.11	0.32	1.99	4.80	9.00	179	413	534
Asn	0.11	0.41	2.34	4.71	9.03	194	460	534
Asp	0.11	0.38	2.42	5.71	8.56	191	412	582
Cys	0.11	0.18	0.73	1.60	7.58	47	134	233
Gln	0.11	0.39	2.24	5.14	8.43	193	477	524
Glu	0.11	0.36	2.45	5.84	8.55	203	419	605
Gly	0.11	0.32	2.01	4.90	8.28	170	436	515
His	0.11	0.27	1.36	3.03	7.54	89	285	578
Ile	0.11	0.29	1.78	4.17	7.93	149	397	474
Leu	0.11	0.24	1.27	2.37	7.71	83	190	361
Lys	0.11	0.31	1.89	4.04	7.25	156	411	504
Met	0.11	0.34	1.91	4.48	7.57	185	354	420
Phe	0.11	0.26	1.17	2.46	8.16	80	174	279
Pro	0.11	0.32	2.26	5.79	8.92	180	476	608
Ser	0.11	0.33	2.21	5.18	8.59	177	476	576
Thr	0.11	0.31	1.72	3.89	8.56	152	366	460
Trp	0.11	0.34	1.70	3.27	8.13	147	288	392
Tyr	0.11	0.29	1.69	4.08	8.18	148	390	442
Val	0.11	0.31	1.85	4.39	8.49	170	407	545
Klasse 2	0.11	0.31	1.75	4.11	9.53	148	348	538
Klasse 4	0.11	0.26	1.30	2.92	9.84	76	187	747
0AS	0.11	0.34	1.89	4.34	8.25	150	360	465
0AS/0FB	0.11	0.35	1.85	2.97	3.08	160	195	492

Tab. A.11: V16 – Übersicht der offline Messwerte.

Probe [-]	Prozesszeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _{XL} [g L ⁻¹]	C _P [g L ⁻¹]
0	0	0.46	-	-
1	3.0	2.72	1.0	-
2	5.0	8.78	2.7	-
3	7.0	18.60	6.8	-
4	8.1	24.50	8.7	-
5	9.0	31.90	11.1	0.8
6	10.0	42.40	14.1	1.8
7	12.0	55.60	15.8	3.9
8	24.0	40.30	13.6	2.9

Tab. A.12: V17 – Übersicht der offline Messwerte.

Probe [-]	Prozesszeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _{XL} [g L ⁻¹]	C _P [g L ⁻¹]
0	0.0	0.46	-	-
1	3.0	3.32	1.2	-
2	5.0	9.45	3.3	-
3	7.0	19.50	8.1	-
4	8.1	25.25	8.3	-
5	9.0	33.15	11.9	0.8
6	10.0	42.45	14.0	1.6
7	12.0	56.80	17.0	3.2
8	24.0	134.50	38.5	4.9
9	26.0	131.50	44.3	4.9
10	28.0	131.75	49.1	5.8
11	30.0	136.25	53.6	4.9
12	32.9	149.75	47.2	2.2

Tab. A.13: V18 – Übersicht der offline Messwerte.

Probe [-]	Prozesszeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _{XL} [g L ⁻¹]	C _P [g L ⁻¹]
0	0	0.46	0.2	-
1	3.0	4.06	1.6	-
2	5.0	11.13	4.3	-
3	7.0	20.53	7.7	-
4	8.1	26.90	9.8	0.6
5	9.0	34.70	12.1	1.2
6	10.0	43.45	13.8	1.9
7	12.0	57.25	17.0	3.3
8	24.0	125.00	35.3	4.8
9	26.0	130.50	35.5	4.9
10	28.0	123.75	36.7	4.9
11	30.0	126.75	37.7	4.4
12	32.4	120.50	36.1	4.5

B Übersicht der Messdaten der Kultivierungen des B117-Stammes

Tab. B.14: Versuchs- und RHB-Nummern für den B117-Stamm.

	B117					
V-Nr.	V10	V11	V12	V13	V14	V15
RHB-Nr.	U06	U07	U08	U16	U18	U24

Tab. B.15: V10 bis V12 – Messwerte (Arithmetisches Mittel aus A- und B- Proben),
 $c_{\text{ASi}}=200 \text{ mg L}^{-1}$, $*c_{\text{ASi}}=100 \text{ mg L}^{-1}$.

Aminosäure	OD ₆₀₀ [-]				
	Ino.	3 h	6 h	9 h	25 h
Iso	0.23	0.09	0.23	0.26	0.32
Leu	0.23	0.09	0.28	0.43	11.17
Leu+Iso	0.23	0.15	0.29	0.66	11.35
Leu+Lys	0.23	0.13	0.22	0.29	9.18
Leu+Lys+Iso	0.27	0.10	0.36	0.46	12.04
Leu+Lys+Phe	0.27	0.09	0.30	0.23	11.35
Leu+Lys+Phe+Iso	0.26	0.11	0.36	0.74	12.85
Leu+Lys+Phe+Thr	0.26	0.09	0.25	0.36	13.34
Leu+Lys+Phe+Thr+Iso	0.26	0.05	0.15	0.17	12.46
Leu+Lys+Thr	0.27	0.10	0.29	0.27	11.54
Leu+Lys+Thr+Iso	0.26	0.08	0.22	0.29	13.78
Leu+Phe	0.23	0.10	0.22	0.33	12.65
Leu+Phe+Iso	0.27	0.10	0.43	0.57	11.14
Leu+Phe+Thr+Iso	0.26	0.09	0.26	0.32	13.56
Leu+Phe+Tre	0.27	0.10	0.29	0.28	13.08
Leu+Thr	0.23	0.17	0.27	0.55	11.80
Leu+Thr+Iso	0.27	0.10	0.33	0.26	12.77
Lys	0.23	0.09	0.32	0.48	0.54
Lys+Iso	0.23	0.15	0.22	0.50	0.72
Lys+Phe	0.23	0.16	0.27	0.32	0.36
Lys+Phe+Iso	0.27	0.10	0.38	0.22	0.60
Lys+Phe+Thr	0.27	0.13	0.43	0.30	0.35
Lys+Phe+Thr+Iso	0.26	0.07	0.17	0.20	0.63
Lys+Thr	0.23	0.17	0.29	0.49	0.67
Lys+Thr+Iso	0.27	0.09	0.19	0.19	0.27
Phe	0.23	0.09	0.30	0.33	0.34
Phe+Iso	0.23	0.14	0.20	0.23	0.35
Phe+Thr	0.23	0.14	0.27	0.31	0.34
Phe+Thr+Iso	0.27	0.09	0.19	0.19	0.26
Thr	0.23	0.09	0.36	0.43	0.54
Thr+Iso	0.23	0.14	0.22	0.28	0.61
Val	0.23	0.08	0.21	0.26	0.30
Val+Iso	0.23	0.10	0.22	0.23	0.32
Val+Leu	0.23	0.10	0.27	0.46	3.28
Val+Leu+Iso	0.27	0.16	0.99	4.29	12.93
Val+Leu+Lys	0.27	0.10	0.20	0.21	0.25

Fortsetzung Tab. B.15

	Ino.	3 h	6 h	9 h	25 h
Val+Leu+Lys+Iso	0.26	0.16	1.13	6.36	13.21
Val+Leu+Lys+Phe	0.26	0.09	0.23	0.23	0.44
Val+Leu+Lys+Phe+Iso	0.26	0.14	1.03	6.43	14.22
Val+Leu+Lys+Phe+Thr	0.26	0.09	0.23	0.24	0.50
Val+Leu+Lys+Phe+Thr+Iso	0.26	0.13	0.78	4.22	14.78
Val+Leu+Lys+Phe+Thr+Iso*	0.27	0.17	1.04	4.24	13.32
Val+Leu+Lys+Thr	0.26	0.09	0.25	0.22	0.28
Val+Leu+Lys+Thr+Iso	0.26	0.17	1.10	5.61	13.98
Val+Leu+Phe	0.27	0.10	0.20	0.22	0.25
Val+Leu+Phe+Iso	0.26	0.17	1.56	9.97	12.93
Val+Leu+Phe+Thr	0.26	0.09	0.25	0.22	0.28
Val+Leu+Phe+Thr+Iso	0.26	0.15	1.16	6.50	14.99
Val+Leu+Thr	0.27	0.10	0.24	0.22	0.32
Val+Leu+Thr+Iso	0.26	0.17	1.17	6.09	13.81
Val+Lys	0.23	0.08	0.24	0.26	0.32
Val+Lys+Iso	0.27	0.11	0.29	0.25	0.38
Val+Lys+Phe	0.27	0.11	0.29	0.27	0.44
Val+Lys+Phe+Iso	0.26	0.11	0.30	0.27	0.38
Val+Lys+Phe+Thr	0.26	0.10	0.29	0.28	0.36
Val+Lys+Phe+Thr+Iso	0.26	0.10	0.24	0.23	0.35
Val+Lys+Thr	0.27	0.12	0.28	0.32	0.59
Val+Lys+Thr+Iso	0.26	0.09	0.23	0.25	0.34
Val+Phe	0.23	0.09	0.24	0.28	0.32
Val+Phe+Iso	0.27	0.11	0.28	0.24	0.35
Val+Phe+Thr	0.27	0.10	0.27	0.28	0.42
Val+Phe+Thr+Iso	0.26	0.10	0.23	0.24	0.34
Val+Thr	0.23	0.10	0.23	0.26	0.33
Val+Thr+Iso	0.27	0.10	0.25	0.25	0.37
0AS	0.23	0.08	0.26	0.30	0.32

Tab. B.16: V13 – Messwerte der induzierten MTP (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben), $OD_{8h} \stackrel{!}{=} OD_{Ind}$.

c_{Leucin} [mg L ⁻¹]	OD_{600} [-]				pH [-] 24 h	c_p [mg L ⁻¹] 24 h
	Ino.	6 h	8 h	24 h		
0	0.17	0.36	0.37	0.51	7.0	0
25	0.17	0.54	1.07	1.39	6.0	5.6
50	0.17	0.47	0.92	1.94	6.0	48.7
75	0.17	0.44	0.85	1.98	6.5	46.1
100	0.17	0.40	0.75	2.33	6.5	41.3
125	0.17	0.38	0.71	2.34	6.5	40.4
150	0.17	0.36	0.57	1.68	6.5	36.5
175	0.17	0.34	0.51	1.42	6.5	37.0
200	0.17	0.35	0.50	1.18	6.5	31.9
250	0.17	0.31	0.40	0.81	6.5	18.5
300	0.17	0.25	0.31	0.49	6.5	7.2
400	0.17	0.24	0.27	0.38	7.0	1.4

Tab. B.17: V13 – Messwerte der uninduzierten MTP (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben).

C _{Leucin} [mg L ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]				pH [-] 24 h	c _P [mg L ⁻¹] 24 h
	Ino.	6 h	8 h	24 h		
0	0.17	0.36	0.38	0.49	6.5	-
25	0.17	0.48	1.01	1.43	5.5	-
50	0.17	0.46	0.95	3.41	4.5	-
75	0.17	0.43	0.86	4.76	4.5	-
100	0.17	0.38	0.73	6.10	4.5	-
125	0.17	0.36	0.66	7.76	4.5	-
150	0.17	0.37	0.62	9.74	4.5	-
175	0.17	0.33	0.57	11.47	4.5	-
200	0.17	0.31	0.51	10.95	4.5	-
250	0.17	0.29	0.43	10.65	4.5	-
300	0.17	0.29	0.41	10.26	4.5	-
400	0.17	0.25	0.31	4.99	6.0	-

Tab. B.18: V14 – Messwerte der induzierten MTP (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben), $OD_{8h} \stackrel{!}{=} OD_{Ind.}$

C _{Leucin} [mg L ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]				pH [-] 24 h	c _P [mg L ⁻¹] 24 h
	Ino.	6 h	8 h	24 h		
0	0.18	0.35	0.37	1.33	7.0	0
25	0.18	0.41	0.68	4.38	6.0	55.3
50	0.18	0.40	0.67	3.86	6.5	66.4
75	0.18	0.39	0.63	3.39	6.5	74.4
100	0.18	0.37	0.59	2.98	7.0	75.1
125	0.18	0.36	0.56	2.57	7.0	67.3
150	0.18	0.35	0.54	2.53	7.0	58.4
175	0.18	0.33	0.48	2.14	7.0	52.2
200	0.18	0.34	0.48	2.09	7.0	49.7
250	0.18	0.34	0.45	1.75	7.0	39.1
300	0.18	0.31	0.36	1.62	7.0	27.5
400	0.18	0.27	0.30	1.44	7.0	16.1

Tab. B.19: V14 – Messwerte der uninduzierten MTP (Arithmetisches Mittel aus A- und B-Proben).

C _{Leucin} [mg L ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]				pH [-] 24 h	c _P [mg L ⁻¹] 24 h
	Ino.	6 h	8 h	24 h		
0	0.18	0.32	0.35	1.50	7.0	-
25	0.18	0.36	0.61	4.90	6.0	-
50	0.18	0.39	0.66	6.31	5.5	-
75	0.18	0.37	0.61	5.07	4.5	-
100	0.18	0.36	0.57	6.18	4.5	-
125	0.18	0.37	0.57	7.41	4.5	-
150	0.18	0.35	0.53	8.73	4.5	-
175	0.18	0.34	0.49	9.58	4.5	-
200	0.18	0.33	0.47	9.68	4.5	-
250	0.18	0.31	0.41	7.09	5.5	-
300	0.18	0.30	0.38	4.83	6.5	-
400	0.18	0.28	0.32	2.25	7.0	-

Tab. B.20: V15 – Übersicht der offline Messwerte.

Probe [-]	Prozesszeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	C _{XL} [g L ⁻¹]	C _P [g L ⁻¹]
0	0	1.21	0.2	-
1	3.0	2.57	0.6	-
2	5.0	5.00	1.2	-
3	7.0	10.03	3.6	-
4	9.0	15.95	5.6	-
5	10.0	20.65	7.2	-
6	12.0	27.60	9.4	-
7	13.0	31.10	10.7	0.25
8	24.0	40.10	13.1	2.21

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem im Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 18. Dezember 2014

Lukas Franzgrote