



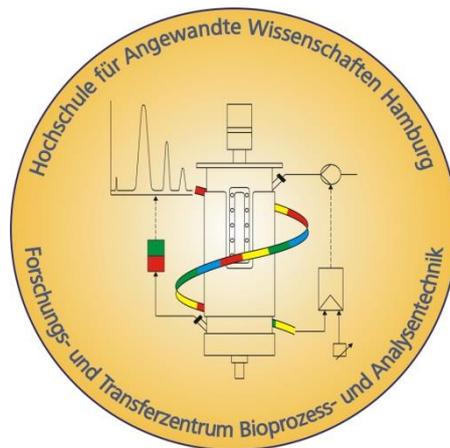
Fakultät Life Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit
Biotechnologie

Etablierung einer dreistufigen Kultivierung der Hefe
Pichia pastoris in einem Laborfermenter



Mohammad Javad Saeidi

05. Mai 2017

1. Gutachterin

Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg)

2. Gutachter

Dipl.-Ing. Ulrich Scheffler
(HAW Hamburg)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Cornelissen für die Erstellung dieser Arbeit, die Übernahme des Gutachtens und die hilfreichen Anregungen bedanken. Trotz sehr vielen Beschäftigungen war sie stets bei Problemen und Fragen zur Stelle und hat mich während meiner Zeit im BPA-Labor viel unterstützt.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Herrn Dipl. -Ing. Ulrich Scheffler bedanken, der meine Arbeit und somit mich mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft betreut und das Zweitgutachten übernommen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau M. Sc. Janet Hirsch für ihre hilfreichen Ratschläge und Unterstützungen bei meinen zahlreichen Fragen sehr bedanken. Sie hat mich mit viel Engagement während meiner Arbeit begleitet, obwohl sie selbst sehr beschäftigt war.

Ein herzlicher Dank gilt Frau M. Sc. Stefanie Kaul für das kritische Korrekturlesen der Arbeit und ihren konstruktiven Vorschlägen.

Ich bedanke mich auch bei den Mitarbeitenden des BPA-Labors, die mir immer hilfreich zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei Anja für ihren motivierenden Beistand und ihre Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Zielsetzung der Arbeit	2
3	Theoretische Grundlagen	2
3.1	<i>Pichia pastoris</i> als Produktionsorganismus	2
3.2	Grün fluoreszierendes Protein (GFP).....	5
3.3	Der dreistufige Produktionsprozess	7
4	Materialien und Methoden	9
4.1	Bioreaktor BIOSTAT® A plus.....	9
4.1.1	Begasung	9
4.1.2	Durchmischung	9
4.1.3	Probenentnahme über das Probenahmesteigrohr.....	10
4.1.4	Sonden und Elektroden.....	11
4.1.5	Schlauchpumpen.....	13
4.1.6	MFCs/win	15
4.1.7	Abgasanalyse.....	25
4.2	Offline-Analyse Methoden	25
4.2.1	Bestimmung der optischen Dichte (OD)	25
4.2.2	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)	26
4.2.3	Fluoreszenzmessung von GFP-Proben	26
4.3	Schüttelkolbenversuche	27
4.4	Ansetzen der Vorkultur.....	28
4.5	Vorbereitung der Kultivierung.....	28
4.5.1	Ansetzen der Medien	28
4.5.2	Vorbereiten des Bioreaktors	29
4.6	Kultivierung.....	31
4.6.1	Kultivierung eines anderen Stammes von <i>P. pastoris</i>	31
4.6.2	Dreistufige Kultivierung der Hefezellen <i>P. pastoris</i> KM71H	32
5	Ergebnisse und Diskussion	33
5.1	Ergebnis des Schüttelkolbenvorversuchs	33
5.2	Kultivierung eines anderen <i>Pichia pastoris</i> Stammes	35
5.3	Die dreistufige Kultivierung im BIOSTAT® Aplus	35
5.3.1	Die Batch-Phasen	36
5.3.2	Die Fed Batch-Phasen	38
5.3.3	Die Produktionsphasen	41

5.4 Fluoreszenzmessung von GFP-Proben.....	44
6 Zusammenfassung.....	45
7 Ausblick.....	47
8 Literaturverzeichnis.....	49
Abbildungsverzeichnis.....	52
Tabellenverzeichnis.....	53
A Anhang.....	55
A.1 Stocklösungen.....	55
A.2 Geräteliste.....	56
A.3 Chemikalienliste.....	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOX1	Alkoholoxidase 1
AOX2	Alkoholoxidase 2
AU	engl. <u>a</u> bsorption <u>u</u> nit
F_{nAir}	Begasungsrate (Luft)
F_{R1}	Zufütterrata aus Reservoir 1 (Glycerin)
F_{R2}	Zufütterrata aus Reservoir 2 (Methanol)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
max	maximal
N_{St}	Rührerdrehzahl
OD	optische Dichte
PBS	engl. <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline; Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	pH-Wert
pO_2	relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase
R1	Reservoir 1 (Glycerin)
R2	Reservoir 2 (Methanol)
rpm	engl. <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute; Umdrehung pro Minute (UpM)
S1	Substrat 1 (Glycerin)
S2	Substrat 2 (Methanol)
Tab.	Tabelle
w	Sollwert
x_{O_2}	Sauerstoffmengenanteil
x_{CO_2}	Kohlendioxidstoffmengenanteil
λ	Wellenlänge
μ	zellspezifische Wachstumsrate

1 Einleitung

Seit Tausenden von Jahren versucht der Mensch durch Entwicklung von Apparaturen, Verfahren und Techniken die Kultivierung von Mikroorganismen zu ermöglichen und die benötigten Kultivierungsbedingungen zu erfüllen. Die Entdeckung vieler Mikroorganismen und deren biochemischen Eigenschaften haben zur Entwicklung der technischen Voraussetzungen Ende des 19. Jahrhunderts und am Anfang des 20. Jahrhunderts geführt. Im Wesentlichen sind entweder die Zellen selbst, oder deren primäre sowie sekundäre Stoffwechselprodukte die Zielprodukte von Kultivierungsprozessen. Durch das Einsetzen von Fermentern wurde die technische Züchtung von Mikroorganismen unter Abschluss von Fremdkeimen und unter konstanten Bedingungen vereinfacht (Rehm, 1970). Ein Fermenter besteht aus dem Kulturgefäß, einem Rührwerk zur Durchmischung der Kultur, einer Begasungsanlage, einer Möglichkeit zur Temperierung und einer Probenentnahme. Dabei werden vorher definierte Wachstumsbedingungen durch entsprechenden Mess- und Regelungstechnik aufrechterhalten (Munk et al., 2008).

In der industriellen Praxis werden, um eine möglichst hohe Effizienz der biotechnischen Produktionsprozesse zu erreichen, anspruchsvolle Prozessführungsstrategien eingesetzt (Hass, Pörtner, 2011). Die Entwicklung dieser Produktionsprozesse benötigt reproduzierbare Strategien, die zuerst durch die Durchführung der Operationen und Prozessabläufe in einem kleinen Maßstab entwickelt werden. So können zum Beispiel Veränderungen der Medienzusammensetzung, der Temperatur, des pH-Werts und anderer Parameter in einem Laborfermenter schnell und kostengünstig getestet werden (Madigan et al., 2013). Dabei ist zu beachten, dass die industriellen Abläufe in Großeinrichtung für kommerzielle Zwecke selten auf die gleiche Weise wie in kleineren Labormaßstäben ablaufen (Madigan et al., 2013).

Bei der Prozessentwicklung und Reproduzierbarkeit müssen verschiedene Anforderungen wie z. B. niedrigere Kosten, Automatisierung der Sensoren sowie minimaler manueller Aufwand erfüllt werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, in einem Laborfermenter (BIOSTAT® Aplus) eine reproduzierbare dreistufige Kultivierung zu etablieren. Hierfür sollte ein GFP produzierender *Pichia pastoris* Stamm in den drei Phasen Batch, Fed Batch und Induktion/Produktion kultiviert und hinsichtlich seiner maximalen Wachstumsrate und Substrataufnahme charakterisiert werden. Die Reproduzierbarkeit dieses Prozesses sollte anhand der Wachstumsrate, der Zelldichte, des Substratverbrauchs und der Masse, beziehungsweise Leuchtintensität, des Zielproteins bewertet werden, sowie als auch anhand ausgewählter Prozessdaten.

3 Theoretische Grundlagen

Zum Verständnis der Durchführung dieser Arbeit werden in diesem Abschnitt die wichtigsten theoretischen Grundlagen beschrieben. Dabei wird zunächst auf die zur Kultivierung verwendeten Mikroorganismen und anschließend auf die Eigenschaften des Zielprodukts (GFP) eingegangen. Danach werden die wichtigsten Grundlagen zur Kultivierung und der in dieser Arbeit verwendeten Strategien dargestellt.

3.1 *Pichia pastoris* als Produktionsorganismus

Für den Einsatz in biotechnologischen Verfahren müssen die verwendeten Mikroorganismen bestimmte Anforderungen an Sicherheit, Handhabbarkeit und Wirtschaftlichkeit erfüllen (Munk et al., 2008).

Neben vielen anderen Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, hat sich die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* in den letzten Jahren weltweit erfolgreich zu einem bedeutenden Organismus für die rekombinante Herstellung biotechnologischer Produkte entwickelt (Janson, Rothhämel, 2012). Als Vorteile von *P. pastoris* zählen unter anderem, dass er sich verhältnismäßig leicht genetisch manipulieren lässt, dass die Sequenz ihres Genoms frei zugänglich ist, dass die rekombinanten Klone eine hohe genetische Stabilität besitzen und ein starker und streng regulierter Promotor verfügbar ist. Des Weiteren sind keine Endotoxine oder lysogenen Viren enthalten, die benötigten Kultivierungsbedingungen sind mit denen von einfachen prokaryotischen Systemen vergleichbar, die Generationszeit ist sehr kurz (Verdoppelungszeit ca. 2 – 4 h in Vollmedien) und mit preisgünstigen, synthetischen Medien können sehr hohe Zelldichten in Fermentern erreicht werden (bis zu über 600 g l⁻¹ Biofeuchtmasse). Zudem verfügen sie als Eukaryoten

über eine effiziente Sekretions- und Proteinfaltungsmaschinerie und führen fast alle co- und posttranslationalen Modifikationen durch (Bildung von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Palmitoylierung etc.), die bei der Proteinproduktion in prokaryotischen Systemen fehlen. *P. pastoris* besitzt extrem hohe Produktionsraten bei der intrazellulären Proteinproduktion und sie sind in der Lage viele Proteine effektiv in das nahezu proteinfreie Medium zu sekretieren, welches die Proteinaufreinigung erleichtert und kostengünstiger macht.

Darüber hinaus bietet das *P. pastoris*-System im Vergleich zum klassischen *S. cerevisiae*-System weitere Vorteile (Janson, Rothhämel, 2012), denn der AOX1-Promotor in *P. pastoris*, der üblicherweise für die Expression von Fremdgenen benutzt wird, besitzt eine sehr effiziente Regulation. Dieser Promotor wird erst dann aktiviert, wenn nur Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Da AOX1 (Alkoholoxidase-1) eine sehr geringe Affinität für Sauerstoff aufweist, muss die Hefe große Mengen an AOX1 bilden, sodass AOX1 unter Induktionsbedingungen bis zu 30% des intrazellulären Gesamtproteins ausmachen kann. Aufgrund einer sehr stark reduzierten ethanolischen Gärung bei *P. pastoris* im Vergleich zu *S. cerevisiae* entstehen selbst bei sehr hohen Zelldichten ($>100 \text{ g l}^{-1}$ Biofeuchtmasse im Fermenter) keine toxischen Ethanolkonzentrationen. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* werden rekombinante Proteine in *P. pastoris* wesentlich seltener hyperglykosyliert.

Bei der sekretorischen Expression besteht häufig die Gefahr, dass die rekombinanten Proteine proteolytisch abgebaut werden. Dieses Problem tritt oft bei der Fermentation von *P. pastoris* auf, allerdings lässt sich dies durch einige Maßnahmen, wie zum Beispiel Verwendung Stämmen mit unvollständigen Proteasen, Zusatz von leicht verwertbaren Aminosäurequellen (z. B. Casein-Totalhydrolysat oder Trypton) oder pH-Wert im Bereich 3 – 7, verringern (Wink, 2011).

Es gibt bei *P. pastoris* zwei allelische variante Gene, die das Enzym Alkoholoxidase kodieren. Eins von diesen beiden Genen kodiert AOX1, das andere AOX2. Methanol induziert die Promotoren beider Gene. Allerdings wird AOX2 in geringeren Mengen als AOX1 produziert und besitzt eine schwächere Aktivität. Im Vergleich zum AOX1-Promoter ist das Wachstum mit AOX2 geringer (Cregg et al., 1989; Lucks, 2016).

Beim Wachstum auf Methanol nimmt das Volumen der *P. pastoris*-Zellen ab und sie werden wesentlich kleiner und kugelförmiger, wie in Abb. 1 dargestellt ist.

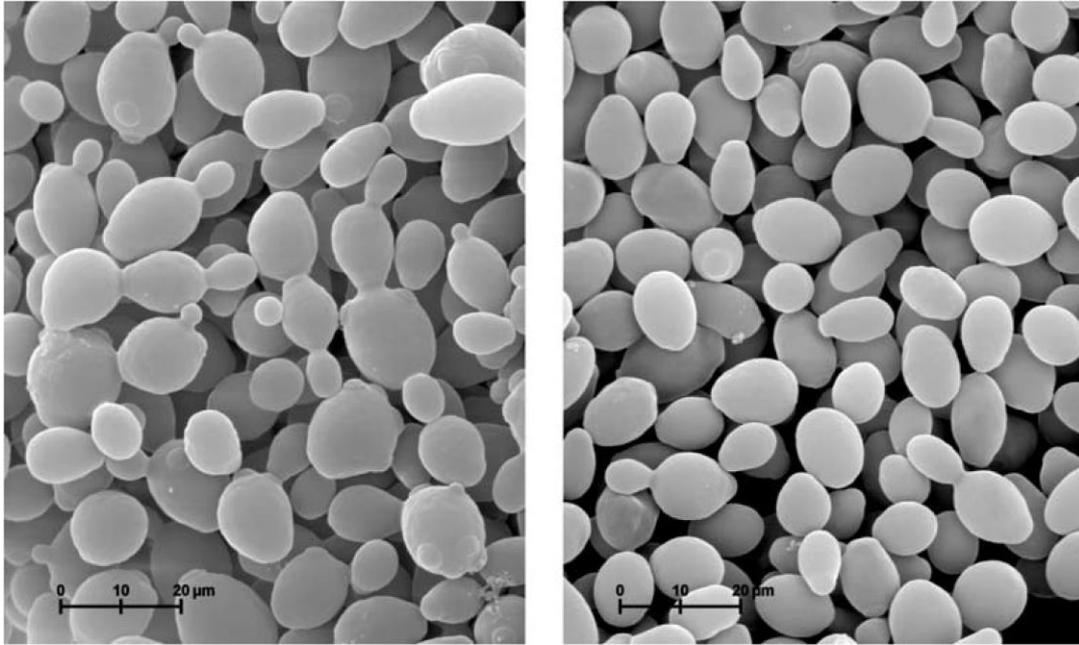


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pichia pastoris*. Links: Wachstum auf Glycerin; rechts: Wachstum auf Methanol. Die Strukturunterschiede sind deutlich erkennbar (Cornelissen, 2004).

In dieser Arbeit wurde für die Fermentationen ein rekombinanter *P. pastoris* KM71H Stamm eingesetzt.

3.2 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Grün fluoreszierende Proteine wurden erstmals bei der Untersuchung der Biolumineszenz der Qualle *Aequorea aequorea* entdeckt (Shimomura et al., 1962). Das charakteristische grüne Licht wird durch die Organe emittiert, die an dem Rand der schirmartig erscheinenden Qualle liegen. Eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Organe in das kurzwellige elektromagnetische Spektrum zeigt, dass die grüne Fluoreszenz durch mehr als nur ein Protein verursacht wird. In der Qualle *Aequorea aequorea* sind die zwei Proteine Aequorin und GFP für die Erzeugung der grünen Fluoreszenz verantwortlich. In Abb. 2 ist der Mechanismus des Energietransfers zwischen diesen beiden Proteinen dargestellt. Bei diesem Mechanismus wird die Biolumineszenz des Aequorins vom GFP absorbiert, das dann die Emission einer schmalbandigen grünen Fluoreszenz verursacht (Ward et al., 1980; Ward, Cormier, 1979).

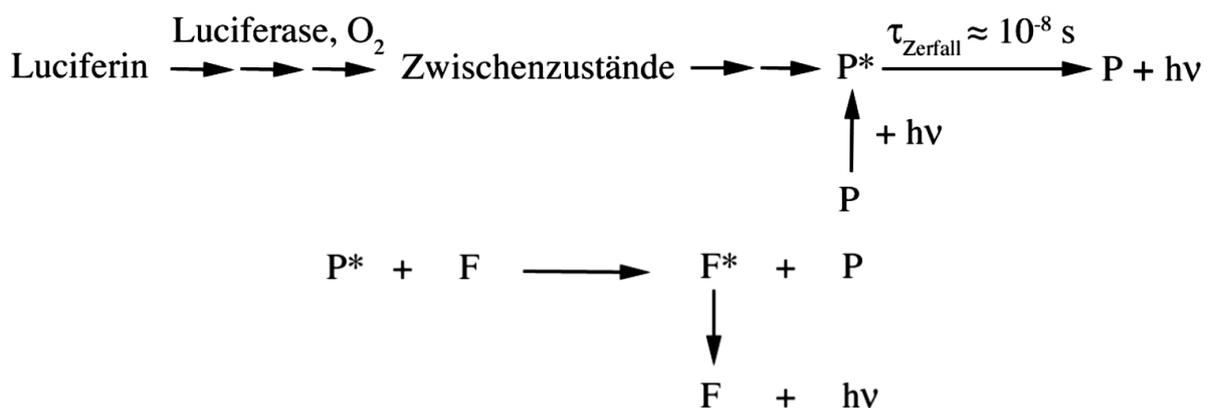


Abb. 2: Energietransfer von Aequorin auf GFP und die weitere Fluoreszenzemission von GFP. Bei der Biolumineszenz werden Luciferine mittels des Enzyms Luciferase und molekularem Sauerstoff in Zwischenzustände umgewandelt, was wiederum zur Anregung des Proteins Aequorin (P in Abb. 2) führt. Die Energie des bereits angeregten Aequorin (P* in Abb. 2) kann auf das GFP (F in Abb. 2) übertragen werden. Durch den Zerfall des angeregten Zustands des GFP wird ein sichtbares Licht emittiert (Dietz, 2004).

Natürlich vorkommendes GFP emittiert Licht in einem Wellenlängenbereich von 490 – 520 nm (Winkler, 2002). Das Emissionsmaximum liegt bei 508 – 509 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 395 nm und 475 nm (Chalfie, Kain, 1998).

Im Vergleich zu anderen Proteinen ist GFP gegenüber chemischer und physikalischer Veränderungen relativ stabil. Diese Stabilität wird durch die kompakte Struktur des GFP, die in Abb. 3 erkennbar sind, verursacht (Yang et al., 1996; Ormö et al., 1996). Aufgrund dieser

Struktur weist GFP auch ohne Beteiligung von Kofaktoren Fluoreszenz auf. Aufgrund dieser Eigenschaften herrscht für GFP ein vielfältiger Einsatz in Biologie, Biotechnologie, Chemie, Physik und Medizin, wie zum Beispiel die Beobachtung der Expression von Genen durch die Markierung mit GFP (Chalfie et al., 1994), Verfolgung der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen (Zimmer, 2002), Anwendung von GFP und seine modifizierten Variationen als Fluorophore für strukturelle Untersuchungen zum Beispiel an DNA oder Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zwischen GFP-Paaren (Cubitt et al., 1995; Zimmer, 2002), sowie die Bedienung des GFP als Metallionen-spezifische Sonde (quenching) (Janson, Rothhämel, 2012; Li et al., 2001).

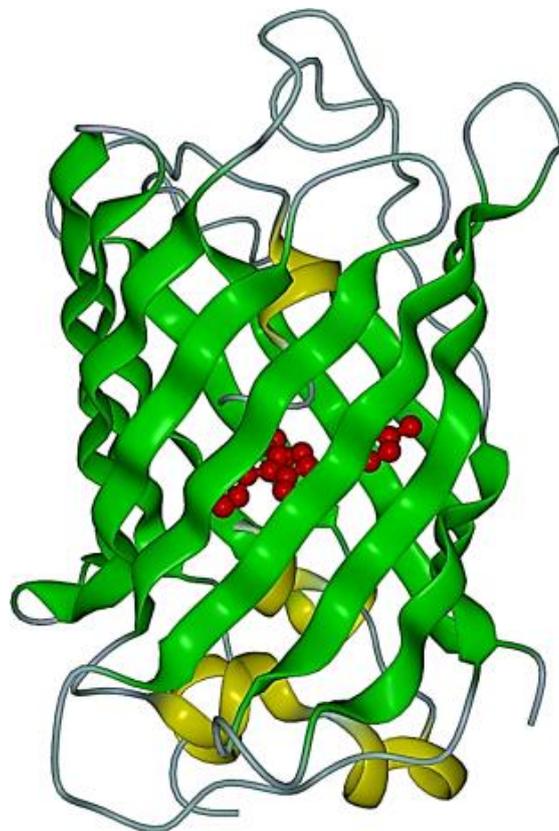


Abb. 3: Kristallstruktur des GFP. Durch die Anordnung der Strukturelemente des GFP bilden die β -Faltblätter (grün) einen Zylinder, in dessen Inneres eine α -Helix (gelb) lokalisiert ist. Aufgrund der hohen Symmetrie dieses Zylinders ordnen sich Wasserstoffmoleküle außerhalb des Zylinders zu Strängen an. Der Chromophor des GFP liegt im Zentrum des Zylinders (rot) am Ende der α -Helix (Winkler, 2002).

3.3 Der dreistufige Produktionsprozess

Typischerweise werden rekombinante Proteine mit *P. pastoris* durch einen dreistufigen Prozess produziert. Dieser besteht aus einer wachstumsunlimitierten Batch-Phase und einer wachstumslimitierten Fed Batch-Phase auf Glycerin, sowie einer Produktionsphase, in der durch die Methanolzugabe der Promotor des Zielproteins induziert wird (Higgins, Cregg, 1998; Martens, 2014). Eine Kultivierungsstrategie für die Etablierung eines dreistufigen Produktionsprozesses ist in Abb. 4 als prinzipieller Prozessverlauf dargestellt.

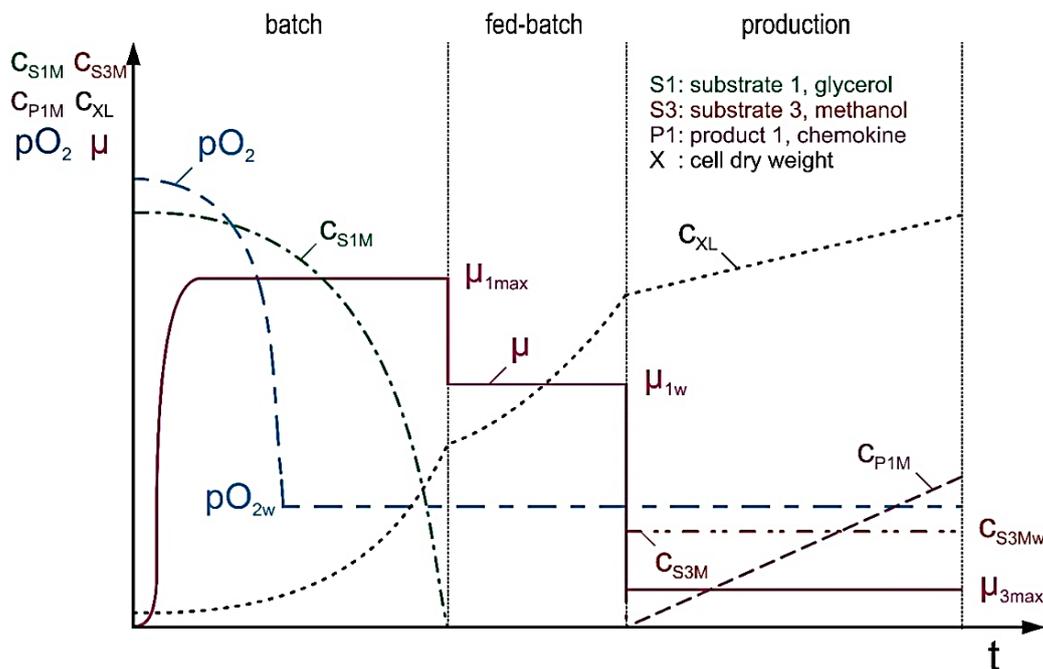


Abb. 4: Prinzipieller Prozessverlauf zur Herstellung rekombinanter Proteine. c_{XL} : Biotrockenmasse-dichte, c_{S1M} : Glycerin-Konzentration, c_{S3M} : Methanolkonzentration, c_{P1M} : Zielproteinkonzentration, μ : spezifische Wachstumsrate, pO_2 : relativer Sauerstoffpartialdruck. Prozessvariablen und Phasenlängen sind maßstabsgetreu eingetragen. Graphik adaptiert aus (Cornelissen, 2004).

Am Anfang der Batch-Phase trifft oft eine Phase auf in der noch keine Zunahme der Zellkonzentration c_{XL} zu sehen ist. Diese wird als „Lag-Phase“ bezeichnet und tritt aufgrund der Umstellung des Zellmetabolismus auf das frische Nährmedium auf. (Madigan et al., 2013). Für diese Umstellung brauchen die Zellen Zeit (Lag-Phase). Die Dauer der Lag-Phase ist unterschiedlich und hängt von der Lebensgeschichte der Kultur und den Wachstumsbedingungen sowie der Größe des Unterschieds zwischen der Vorkultur und der Medienzusammensetzung des Fermenters ab (Madigan et al., 2013).

In der Batch-Phase wachsen die Zellen unlimitiert und exponentiell mit maximaler Wachstumsrate μ_{\max} , bis das vorgelegte Substrat vollständig aufgebraucht ist (Cornelissen, 2004).

Um höhere Zelldichten zu erreichen, folgt ein auf die Batchphase ein Fed Batch mit Glycerin. Sobald das Substrat in der Batch-Phase verbraucht ist, wird Glycerin exponentiell zugefüttert (Sanders, 2012). Mit dieser exponentiellen Zufütterung wird die spezifische Wachstumsrate μ konstant gehalten (Cornelissen, 2004). Durch die Substratlimitierung ist die spezifische Wachstumsrate μ kleiner als μ_{\max} . Hierdurch kann der Sauerstoffbedarf der Zellen mit Sauerstoffversorgungsmöglichkeiten des Fermenters versorgt werden (Cornelissen, 2004). Außerdem werden die Zellen dadurch auf die folgende Induktion vorbereitet (Martens, 2014).

Nach dem Ende der Fed Batch-Phase wird der Induktor Methanol als Kohlenstoffquelle eingesetzt, wodurch die Produktionsphase beginnt. Die Zufütterung von Methanol kann konstant oder exponentiell erfolgen (Cornelissen, 2004).

4 Materialien und Methoden

4.1 Bioreaktor BIOSTAT® A plus

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Fermentationen wurden am BIOSTAT® A plus von Sartorius stedim biotech GmbH durchgeführt. Das Kulturgefäß des Fermenters besteht aus einem einwandigen Glas mit einem Edelstahldeckel. Der Maßstab des Bioreaktors beläuft sich auf max. 5 l Arbeitsvolumen. Das Gesamtvolumen beträgt 6,6 l. Das Kulturgefäß und die angeschlossenen Gefäße werden in einem Autoklaven sterilisiert.

Nach dem Einhängen des Glas-Fermentationskessels in einem dreibeinigen Edelstahl-Gestell werden Gestell, Glasdeckel und Edelstahldeckel miteinander verschraubt. Auf der Deckelplatte werden die Sonden (pH, pO₂ und Schaum), Rührwerkantrieb, Abluftkühler, Kühlfinger, Schläuche für Probenentnahme sowie Schläuche für Korrekturmittel (Säure, Base und Antischaummittel) montiert. Außerdem befinden sich auf dem Deckel weitere Anschlüsse für Sterilkupplungen. Durch diese Sterilkupplungen wird der Fermenter inokuliert, die sterile Zugabe von Medien, thermolabilen Bestandteilen und Induktoren durchgeführt, sowie auch die sterile Suspensions-Entnahme. Zur Temperierung wird ein Kühlfinger und eine um den Glas-Fermentationskessel gebundene eine Temperiermanschette genutzt. Das Kühlwasser für die Temperierung wird durch einen Umlaufkühler zur Verfügung gestellt.

4.1.1 Begasung

Das Begasungsrohr hat einen Begasungsring, der mit gleichmäßig angeordneten Bohrungen versehen ist. Durch diese Bohrungen gelangt das zugeführte Gas in das Kulturmedium. Das dünne Edelstahlbegasungsrohr befindet sich in der dazu gehörigen Deckelöffnung und wird über einen Schlauch mit einem Kapselfilter mit 0,2 µm Porengröße verbunden.

4.1.2 Durchmischung

Die Rührwelle ist mit einer einfachen Gleitringdichtung in der Deckelplatte montiert und oberhalb des Stahldeckels über eine steckbare Kupplung mit dem Rührwerkantrieb verbunden. Drei 6-Blatt-Scheibenrührer sind als Rührelement an der Rührwelle befestigt. Bei der letzten Fermentation wurden die Scheibenrührer näher zueinander nach unten fixiert, so dass sich alle drei 6-Blatt-Scheibenrührer innerhalb des Kulturmediums befanden.

Eine zu hohe Rührerdrehzahl führt zur Bildung von zu kleinen Blasen, die innerhalb weniger Sekunden mit der umgebenden Flüssigkeit im Gleichgewicht stehen und nicht mehr am

Sauerstofftransport beteiligt sind (Madigan et al., 2013). Daher sollte die maximale Rührerdrehzahl des für diese Arbeit verwendeten Bioreaktors nicht größer als 800 rpm sein.

4.1.3 Probenentnahme über das Probenahmesteigrohr

Die Probenahme erfolgt durch Absaugen der Zellsuspension über das Probenahmesteigrohr. Dabei werden die Proben mithilfe einer Spritze zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Kulturgefäß gezogen und über ein Probenröhrchen in ein Probengefäß befördert. Bei der Probenentnahme muss darauf geachtet werden, dass sich im Probenahmesteigrohr sowie in der Schlauchleitung keine Zellsuspension von der vorherigen Probenahme befindet. Daher muss bei jeder Probenentnahme zweimal jeweils 10 ml Probe entnommen werden, wovon die erste Probe verworfen wird.

Die beiden Verbindungsschläuche zwischen Probenahmesteigrohr und Probenröhrchen beziehungsweise zwischen Probenröhrchen und Probengefäß sind mittels Schlauchklemmen abgeklemmt. Vor der Probenentnahme wird die erste Schlauchklemme geöffnet, damit die Probe vom Kulturgefäß in das Röhrchen geleitet werden kann. Dabei ist zu beachten, dass bei geöffneter erster Schlauchklemme die zweite Schlauchklemme abgeklemmt ist. Ohne Abklemmung der zweiten Schlauchklemme reichen der durch die Begasung im Kulturgefäß vorhandene geringe Überdruck und die Schwerkraftwirkung aus, um die Probe zu überführen. Dies führt dann zur Überfüllung des Probenröhrchens und der darauffolgenden Verstopfung des Sterilfilters. Nachdem die Probe in das Röhrchen gelangt ist, wird der erste Schlauch wieder abgeklemmt und die zweite Schlauchklemme geöffnet. Durch Hineindrücken des Spritzenkolbens wird die Probe aus dem Röhrchen in das Probengefäß geleitet. Anschließend wird der zweite Schlauch auch abgeklemmt und sein freies Ende in ein Gefäß mit 70%igem Ethanol eingetaucht, damit keine Fremdorganismen in den Schlauch gelangen.

4.1.4 Sonden und Elektroden

4.1.4.1 Digitale Sonden

In Kombination mit dem BIOSTAT® Aplus werden digitale Sonden verwendet, die durch die Induktion Energie und Daten zwischen elektrochemischen Sensoren und Analysengeräten kontaktlos transferieren. Aus diesem Grund können keine Störungen mehr durch die Salzbrücken, Feuchtigkeit und Korrosion, die den Messwert verfälschen oder Ausfall der Messstelle verursachen, stattfinden. Die Funktion dieser Sonden beruht auf die Memosens-Technologie von Endress + Hauser.

pO₂-Sonde

Als Sauerstoffpartialdruck pO₂ wird der Gelöst-Sauerstoff mit einer sterilisierbaren digitalen pO₂-Sonde gemessen. Diese Sonde funktioniert nach dem polarographischen Prinzip und besteht aus einer Silber-Anode (Referenzelektrode) und einer Platin-Kathode (Arbeitselektrode). Durch eine gasdurchlässige, polymere Membran werden die Anode und die Kathode von der Messlösung getrennt. Über eine leitende Elektrolytlösung stehen Anode und Kathode in Verbindung. Der Sauerstoffpartialdruckunterschied zwischen der Membranaußenseite (Messlösung) und der Membraninnenseite führt zu einer Diffusion des Sauerstoffs durch die Membran in die Messkammer. Der Sauerstoff wird an der Kathode reduziert, wodurch an der Kathode OH⁻-Ionen entstehen. An der Silber-Anode wird Silber zur Silber-Ionen (z. B. zu AgCl) oxidiert. Diese entstehenden Silber-Ionen lagern sich an die Silber-Anode an.

An der Kathode: $O_2 + 2 e^- + 2 H_2O \rightarrow H_2O_2 + 2 OH^-$ und $H_2O_2 + 2 e^- \rightarrow 2 OH^-$

An der Anode: $4 Ag \rightarrow 4 Ag^+ + 4 e^-$ und $4 Ag^+ + 4 Cl^- \rightarrow 4 AgCl$

Durch diese chemische Reaktion ergibt sich ein elektrischer Strom, der proportional zum pO₂ in der Messlösung ist. Die Sauerstofflöslichkeit und die Permeabilität der Membran sind temperaturabhängig. Aus diesem Grund kann der entstehende elektrische Strom bei steigenden Temperaturen exponentiell ansteigen. Um diesen Effekt zu kompensieren, wurde in der pO₂-Sonde ein integrierter Thermistor eingebaut.

Die pO₂-Sonde musste nach dem Autoklavieren des Fermenters zuerst mindestens 6 Stunden polarisiert werden, indem die die Sonde an die Kontrolleinheit angeschlossen. Falls die Sonde nach der Polarisation von der Kontrolleinheit getrennt wird, muss diese wieder, für

circa das dreifache der Trennungsdauer, polarisiert werden. Die Sonde wird im Kulturmedium unter Fermentationsbedingungen (Temperatur, Druck) kalibriert. Bei der Kalibrierung werden der Elektroden-Nullpunkt und die Steilheit ermittelt werden. Zur Nullpunktermittlung wird das Medium mit Stickstoff begast, bis der gelöste Sauerstoff vollständig verdrängt ist. Die Steilheit und der Messbereich werden durch Luftbegasung eingestellt. Für die Ermittlung der Steilheit muss die Begasungsrate auf ihren vorgesehenen maximalen Wert eingestellt werden. Die Begasungsrate kann nach der Kalibrierung der pO_2 -Sonde wieder auf ihren vorgesehenen Wert für den Beginn der Fermentation eingestellt werden.

pH-Sonde

Der pH-Wert wurde mittels einer sterilisierbaren Glaselektrode gemessen. Diese besteht aus einem inneren Rohr, der Messelektrode, sowie einem äußeren Mantel, der Bezugselektrode, und besitzt eine kugelförmige, wasserstoffdurchlässige Glasmembran, die mit dem inneren Rohr verbunden und mit einer Pufferlösung gefüllt ist. In dieser Pufferlösung taucht eine Kalomel- oder Ag/AgCl-Elektrode ein. Zusätzlich befindet sich im inneren Rohr die Elektrolytlösung KCl. Der äußere Mantel ist auch mit einer Elektrolytlösung (meist KCl) gefüllt und besteht aus einer Ag/AgCl-Elektrode. Dieser Mantel ist mit einem für den Elektrolyten durchlässigen Diaphragma (meist aus poröser Keramik) verbunden und steht darüber im elektrischen Kontakt mit der Messlösung. Beim Eintauchen der pH-Sonde in eine Messlösung wird durch Wasserstoffionen an der Messelektrode ein vom pH-Wert der Messlösung abhängiges Potential gebildet. Die Bezugselektrode hat ein konstantes und vom pH-Wert unabhängiges Potential. Hierdurch entsteht eine Potentialdifferenz (Spannung) zwischen den beiden Elektroden. Die entstehende Spannung entspricht dem pH-Wert der Messlösung (Rocnefahrt, 1964) und wird dann durch einen Messumformer in den dazugehörigen pH-Wert umgewandelt. In die für diese Arbeit verwendete pH-Sonde war ein Thermometer integriert.

Vor Sterilisation des Fermenters wird die pH-Sonde kalibriert. Wie bei der pO_2 -Sonde erfolgt die Kalibrierung der pH-Sonde durch die Ermittlung des Nullpunktes und der Steilheit. Der Nullpunkt wurde bei $pH = 7$ ermittelt. Nach der Einstellung des Nullpunktes wurde darauf geachtet, die pH-Sonde nicht mit Papiertüchern abzutrocknen, da dies die Steilheitskalibrierung beeinträchtigen kann. Für die Ermittlung der Steilheit wurde eine Pufferlösung mit $pH = 4$ verwendet.

Thermometer

In der verwendeten pH-Sonde war ein externes Thermometer integriert. Bei diesem Thermometer handelte es sich um Heißleiter, oder auch NTC-Widerstand (*Negativ Temperatur Coefficient*). Heißleiter sind halbleitende, polykristalline Keramiken, bei denen der elektrische Widerstand mit zunehmender Temperatur abnimmt. Diese Widerstandsabnahme kommt dadurch zustande, dass bei höheren Temperaturen mehr Ladungsträgern angeregt und freigesetzt werden. Das integrierte Thermometer in der verwendeten pH-Sonde war ein NTC 30K-Temperatursensor, wobei K für Temperaturkompensation steht und das Thermometer bei 25 °C (die Bezugstemperatur für die NTC-Widerstände) einen Widerstand von 30 kΩ aufweist. Zusätzlich wurde kein anderes Thermometer für die Temperaturmessung während der Fermentation verwendet.

4.1.4.2 Schaum-Sonde

Die Schaumsonde, auch als Antischaumsonde bezeichnet, arbeitet nach dem Leitfähigkeitsprinzip. Die Edelstahlteile des Fermenters dienen als Gegenelektrode. Der Kontakt zwischen Schaum und der Schaumsonde führt zu einer sprunghaften Leitfähigkeitsänderung in der Schaumsonde. Mittels dieser Sprungfunktion wird der Antischaumregler aktiviert.

4.1.5 Schlauchpumpen

4.1.5.1 Interne Schlauchpumpenmodule

Der BIOSTAT® Aplus besitzt drei digitale Schlauchpumpenmodule. Zur Titration des Mediums befördern zwei jeweils Säure und Base als Korrekturmittel. Die dritte Pumpe dient für die Beförderung des Antischaummittels. Alle drei Schlauchpumpen sind On/Off Pumpen, mit konstanter Drehzahl. Die Abdeckungen der nicht verwendeten Schlauchpumpen müssen geschlossen bleiben, damit keine Verschmutzungen eindringen können. Die Verschmutzungen der Schlauchpumpenmechanik können zu Funktionsstörungen und Verkürzung der Lebensdauer führen.

Alle verwendeten Schläuche müssen ausreichend lang sein.

4.1.5.2 Externe Pumpen

Zusätzlich ist eine weitere analoge Pumpe für die spätere Zufütterung oder die Ernte an BIOSTAT® Aplus angeschlossen. Die Drehzahl dieser Pumpe ist variabel, sodass damit ein

exponentielles Pumpprofil durchführbar ist. Da der Arbeitsbereich der Pumpe für die geplante Zusammensetzung des Zufüttermediums nicht ausgelegt war, musste das Zufüttermedium angepasst werden, sodass die minimale Pumprate erreicht werden konnte.

4.1.5.3 Exponentielles Pumpprofil

Bei exponentiellem Wachstum muss das verwendete Substrat exponentiell zugegeben werden. Nach vollständigem Substratverbrauch in der Batch-Phase wird eine exponentielle Zufütterung durchgeführt. Die zellspezifische Wachstumsrate μ kann dabei durch ein geeignetes exponentielles Pumpprofil gesteuert werden. Hierbei kann der Sauerstoffbedarf der Zellen mit den vorhandenen Sauerstoff-Versorgungsmöglichkeiten des Fermenters erfüllt werden und es ist nicht nötig, für die Begasung reinen Sauerstoff einzusetzen (Cornelissen, 2004). Außerdem werden die Zellen auf die folgende Induktion regulatorisch vorbereitet (Martens, 2014). Das exponentielle Pumpprofil kann mit dem Programmmodul MFCS-Tool, der mit der Prozessleitsoftware MFCS/win (*Multi Fermenter Control System for Windows*) in Verbindung steht, gesteuert werden. Darüber hinaus kann das Tool das Ende der Batch Phase automatisch detektieren über einen Rührerdrehzahlabfall von 25 rpm in 12 Sekunden und einem pO_2 über 35%, welches die Automatisierung des Prozesses ermöglichen kann.

Um die exponentielle Zufütterung online zu steuern, wird mittels MFCS-Tool der Sollwert der Substratzufütterraterate F_{Riw} ,

$$F_{Riw}(t) = F_{Rij} \cdot e^{\mu_{iw} \cdot (t - t_j)}, \quad (1)$$

mit	F_{Riw}	:= Sollsubstratzufütterraterate	$[h^{-1}]$
	F_{Rij}	:= Startsubstratzufütterraterate	$[h^{-1}]$
	μ_{iw}	:= Sollwert der μ -Steuerung	$[h^{-1}]$
	t	:= Zeit	$[h]$
	t_j	:= Startzeitpunkt der μ -Steuerung	$[h]$,

der wiederum durch die Vorgabe des Startwertes F_{Rij} ,

$$F_{Rij} = \frac{(\mu_{iw} + q_{Si/Xm} \cdot Y_{X/Sigr}) \cdot V_{Lj} \cdot c_{XLj}}{Y_{X/Sigr} \cdot c_{SiRi}} \quad (2)$$

mit	$q_{Si/Xm}$:= zellspezifische Maintenance-Substrataufnahmerate	$[h^{-1}]$
	$Y_{X/Sgr}$:= Ausbeutekoeffizient des Zellzuwachses auf Substrat	$[-]$

V_{Lj}	:= Volumen der Flüssigphase bei t_j	[l]
C_{XLj}	:= Zellkonzentration bei t_j	[g ⁻¹]
C_{SiRi}	:= Konzentration im Substratreservoir R_i	[g ⁻¹]
i	:= Glycerin, Methanol	[-] ,

ermittelt wird, bestimmt. Hierfür müssen die Endzellkonzentrationen der jeweiligen Phase und das aktuelle Volumen, abhängig vom geschriebenen Rezept, in MFCS/win oder das MFCS-Tool eingegeben werden.

Bei MFCS/win muss die maximale Substratzufüterraterate als $F_{Ri,max}$ eingegeben werden. Dafür wurde mit einer Waage die gepumpte Wasser-Masse pro Zeiteinheit (Massenstrom des Wassers) mit maximaler Pumpleistung ermittelt. Unter der Annahme, dass das gepumpte Wasser eine Dichte von 1 kg m^{-3} hat, kann hierdurch der maximale Volumenstrom des Wassers $F_{Ri,max}$ ermittelt werden. Es wurde angenommen, dass das verwendete Substrat die gleiche Viskosität wie Wasser hat. Zwar hat das Substrat im Vergleich zum Wasser eine höhere Viskosität. Aber die Abnahme von $F_{Ri,max}$ wurde vernachlässigt. Anhand der $F_{Ri,max}$ wird die Substratzufüterraterate im MFCS-Tool zu verschiedenen Zeitpunkten als der prozentuelle Start- und Sollwert der Substratzufüterraterate $F_{Ri,rel}$,

$$F_{Ri,rel}(t) = \frac{F_{Ri}(t)}{F_{Ri,max}} \cdot 100\% \quad (3)$$

mit $F_{Ri,rel}$:= prozentuale Substratzufüterraterate	[%]
$F_{Ri,max}$:= maximale Substratzufüterraterate	[%] ,

errechnet.

4.1.6 MFCS/win

Alle durchgeführten Fermentationsprozesse wurden mit dem Datenaufzeichnungs- und Überwachungssystem MFCS/win gesteuert. Mittels dieser Batchorientierten Prozessführungssysteme sind alle aufgenommenen Prozessdaten gleichzeitig erfassbar. Für die Steuerung der Erkennung des Batch-Endes sowie Durchführung der Fed Batch- und der Produktionsphase, steht MFCS/win mit dem Modul MFCS-Tool in Verbindung. Dargestellt ist in Abb. 5 die Werkzeugleiste MFCS/win Shell, über die die folgenden Client-Module aufrufbar sind (Sartorius Stedim Systems GmbH, 2012):

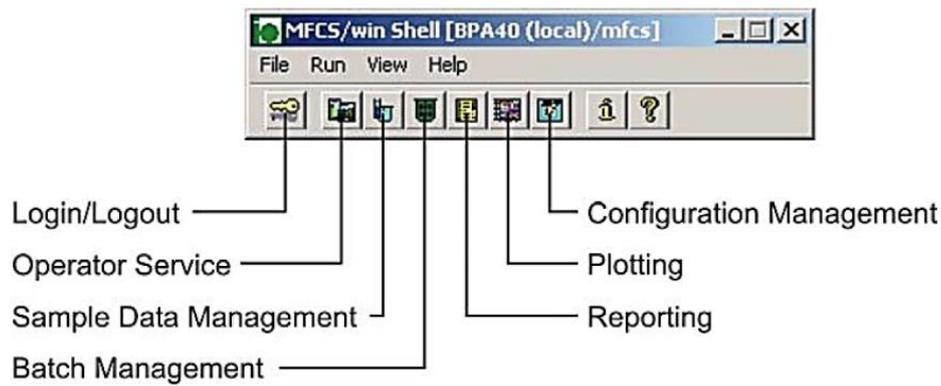


Abb. 5: MFCS/win Shell (Cornelissen, 2004).

Operator Service: Zur Darstellung und Änderung der Informationen und Bedienung eines Prozesses.

Sample Data Management: Zur Verwaltung der offline Ergebnisse (wie zum Beispiel optische Dichte) während der Fermentation.

Batch Management: Zur Definition neuer Kultivierungen.

Reporting: Zum tabellarischen Anzeigen und Exportieren der aufgenommenen Daten.

Plotting: Zur grafischen Darstellung der aufgenommenen Daten von Prozessen.

Configuration Management: Zum Erstellen, Modifizieren und Dokumentieren der unterschiedlichen Konfigurationstabellen in der MFCS/win-Konfigurations-Datenbank.

Neben den Client-Modulen hat MFCS/win Servermodule, die im Hintergrund arbeiten und mit den Client-Modulen zusammenwirken. Änderungen der Konfigurationen in einem laufenden MFCS/win-System können nicht direkt von Servermodulen übernommen werden, wodurch es bei Änderungen der Konfigurationen in einem laufenden MFCS/win-System zu einer Störung in der Zusammenwirkung der beiden Module kommen kann. Um diese Störung zu vermeiden wird nach jeder Änderung der Konfiguration ein „Configuration Update“ durchgeführt, wodurch die Servermodule ihre Datenstrukturen aus der Datenbank erneuern. Das „Operator Service Programm“ dient zur Visualisierung laufender Prozesse. Dies erfolgt durch eine Reihe von Displays und gibt die Möglichkeit laufender Prozesse zu kontrollieren. Zu den wichtigsten Displays zählen, das Batch, Group und Variable Display.

Batch Display: Zeigt in tabellarischer Form einen Überblick über alle konfigurierten Prozesswerte. Außerdem können alle Operationen eines Rezeptes in Batch Display dargestellt und modifiziert werden. In Abb. 6 ist eine Darstellung des Batch Displays zu sehen.

Group Display: Stellt eine ausgewählte Prozesseinheit und Gruppe dar und zeigt zum Beispiel Messwert, Sollwert und Reglerausgang eines Reglers.

Variable Display: Stellt eine ausgewählte Prozesseinheit und Gruppe dar und zeigt für alle Variablen deren Messwerte und ihre Einheiten.

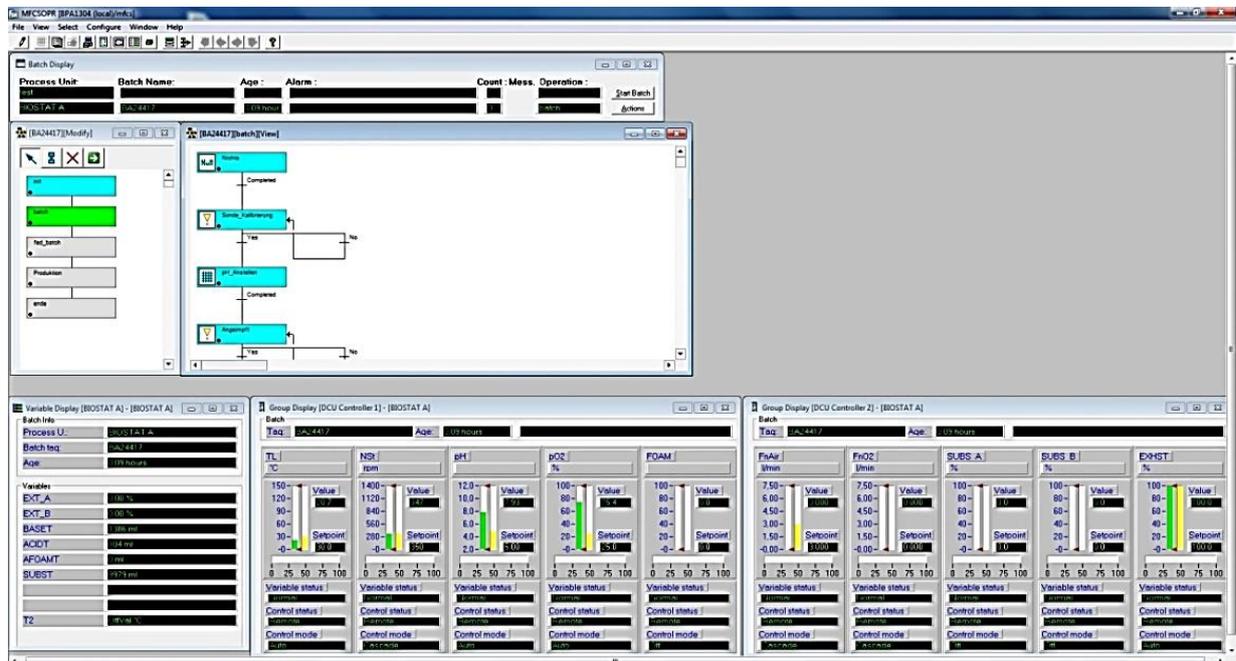


Abb. 6: Batch Display von MFC5/win. Unter dem Batch Display können alle Operationen eines Rezeptes, Group Display und Variable Display dargestellt und modifiziert werden.

Mit MFC5/win können (unter „Configuration Management“) Rezepte für halb- oder vollautomatisierte Prozesse erstellt werden. Diese Rezepte beinhalten Befehle zur Prozessführung und dienen so zur Steuerung verschiedener Phasen in einer Operation. Das für diese Arbeit geschriebene Rezept, wie in Abb. 7 ersichtlich ist, besteht aus fünf Operationen: Initialisierung, Batch, Fed Batch, Produktion und Ende.

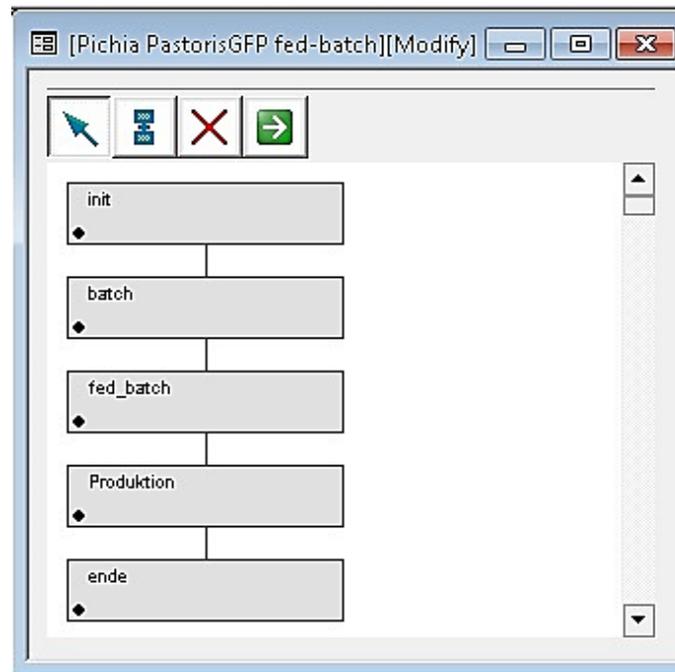


Abb. 7: Die fünf verwendete Operationen dieser Arbeit

Durch die Befehle in der Initialisierungsoperation „init“ werden die Startzustände für die Fermentation initialisiert und Anfangswerte gesetzt. In Abb. 8 sind die Phasen dieser Operation dargestellt. In dem Phasenblock „Init_variable“ werden alle benötigten Variablen aktiviert. Der Variablenzustand, das Speichern von Variablen, sowie die Berechnungen von gekennzeichneten Variablen werden gemäß den entwickelten Strategien ein- oder ausgeschaltet. Bei Durchführung einer exponentiellen Zufütterung in der Produktionsphase wird der dazugehörige Umschalter `switch_production` auf „0“ gestellt. Unter dem „Regler_Status“-Block wird definiert, ob die Variablen lokal (von MFCS/win) oder remote (vom Fermenter Kontrollsystem DCU) kontrolliert werden. Die Sollwerte für die Regler werden in dem Phasenblock „Regler_Sollwerte“ festgelegt. Die Art des Regelns, manuell oder automatisch, wird in dem „Regler_Mode“-Block eingestellt.

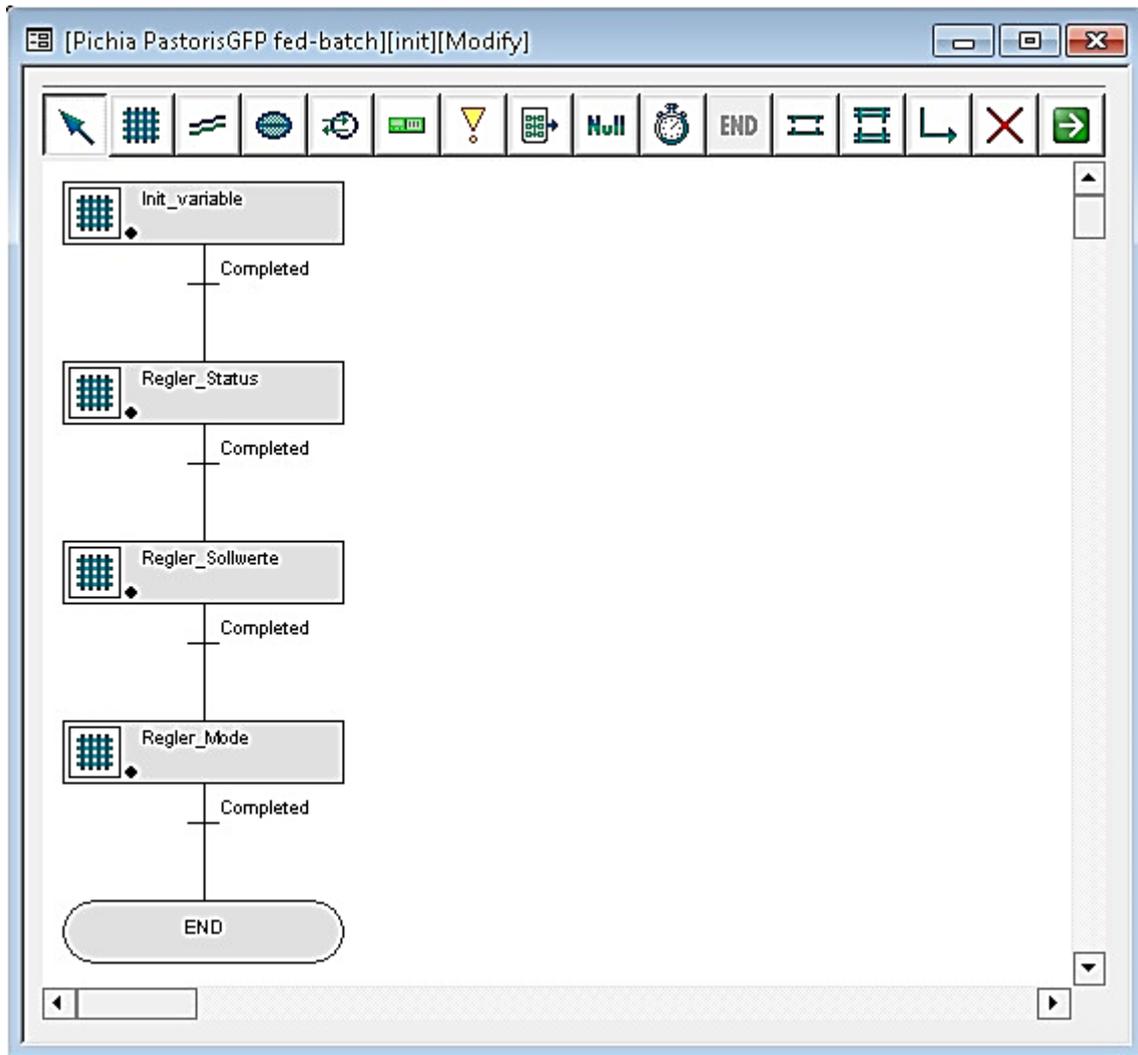


Abb. 8: Definierte Phasen für die Init-Operation

Im Anschluss an „init“-Operation gelangt MFCS/win in die Operation Batch, deren Phasen in Abb. 9 dargestellt sind. Über eine MessageBox wird gefragt, ob die pO_2 - und die pH-Sonde kalibriert sind. Durch die Bestätigung dieser MessageBox springt das Programm zum nächsten Schritt, in dem der Kontrollstand der PH-Reglung auf automatisch gesetzt und der PH-Sollwert festgelegt wird. Nach Animpfen des Reaktors wird eine MessageBox mit der Frage „Animpfen erledigt“ bestätigt, wodurch die Batch Phase eingeleitet wird. Nach der „Begasung“ wurde eine Warteschleife eingebaut, damit der pO_2 erst nach einer zweiminütigen Luftzufuhr geregelt wird.

Die pO_2 -Reglung erfolgte über die Rührerdrehzahl. Nach Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl von 800 rpm wird die Begasungsrate erhöht. Sobald die maximale Begasungsrate von 7500 l min^{-1} erreicht wird auf reine Sauerstoffbegasung umgestellt werden.

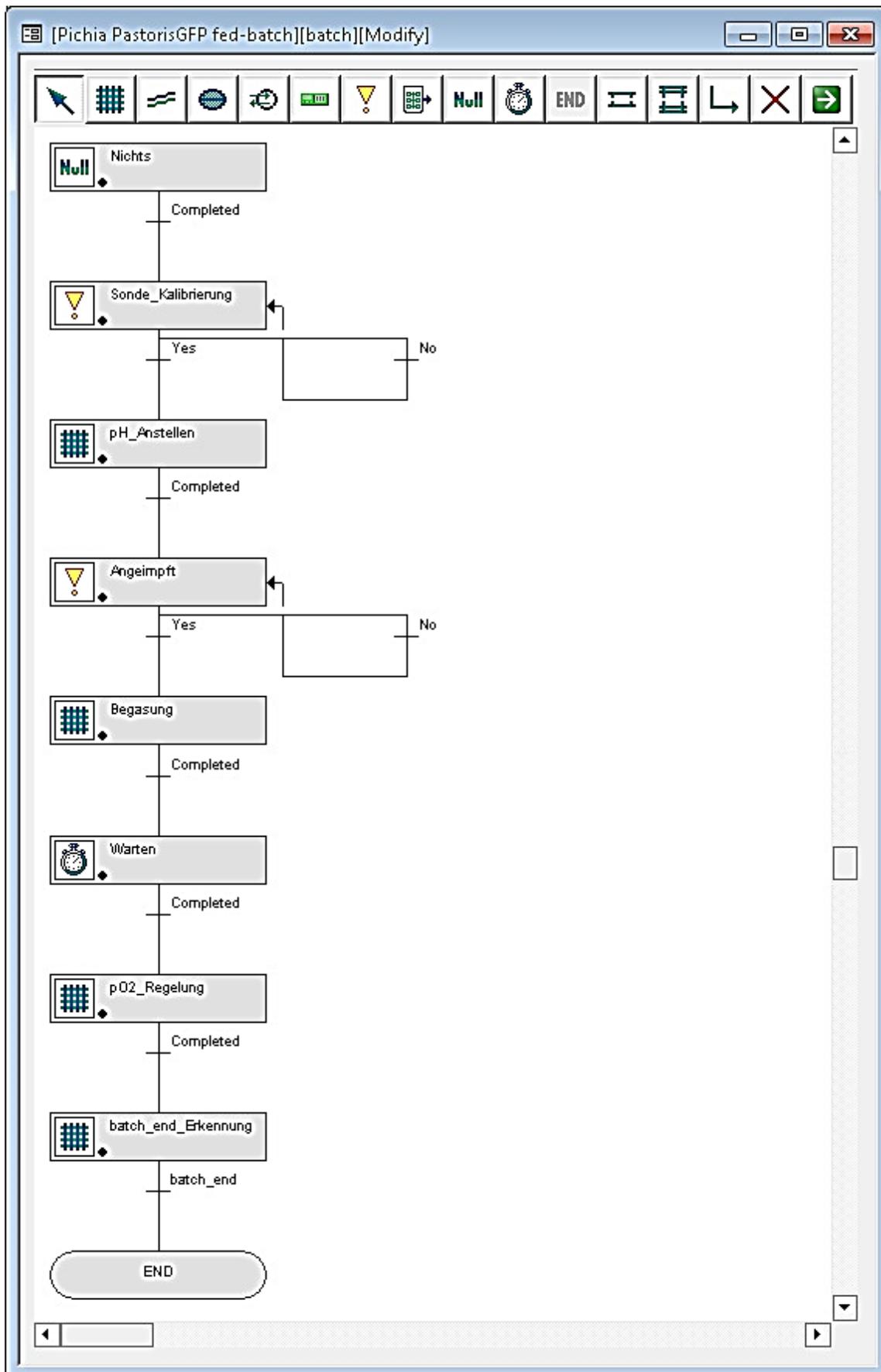


Abb. 9: Definierte Phasen für die Batch-Operation

Für die automatische Erkennung des Batch-Endes wurde im Modul MFCS-Tool ein Umschalter der Abb. 10 gemäß definiert. Hierfür muss der pO_2 einen Mittelwert von 35 erreichen und dabei die Rührerdrehzahl innerhalb von vier Zyklen, circa 12 Sekunden, um 25 rpm gesunken sein.

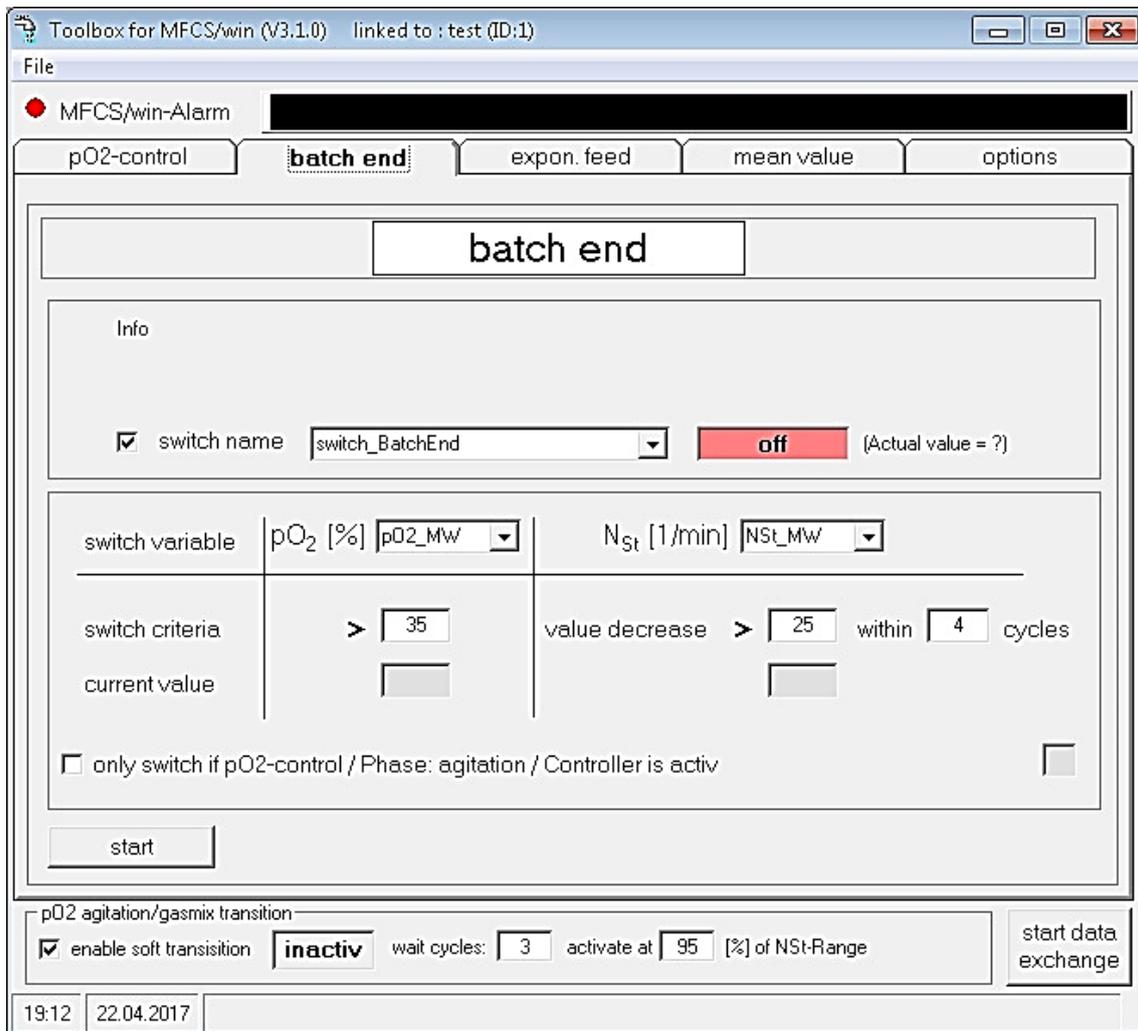


Abb. 10: Einstellung eines Umschalters in MFCS-Tool für die Batch-End-Erkennung

Vor dem Eintritt in die Fed Batch-Phase wurde die Zufütterungspumpe automatisch gestartet und eine exponentielle Zufütterung eingeleitet. Die Fed Batch-Phase wird durch die Bestätigung einer Messagebox beendet. Dadurch wird die Zufütterungspumpe automatisch gestoppt und der Schlauch mit dem Schlauch, der für die Induktor-Zugabe in der Produktionsphase vorgesehen war, getauscht. In Abb. 11 sind die definierten Phasen-Blöcke für die Fed Batch-Phase dargestellt.

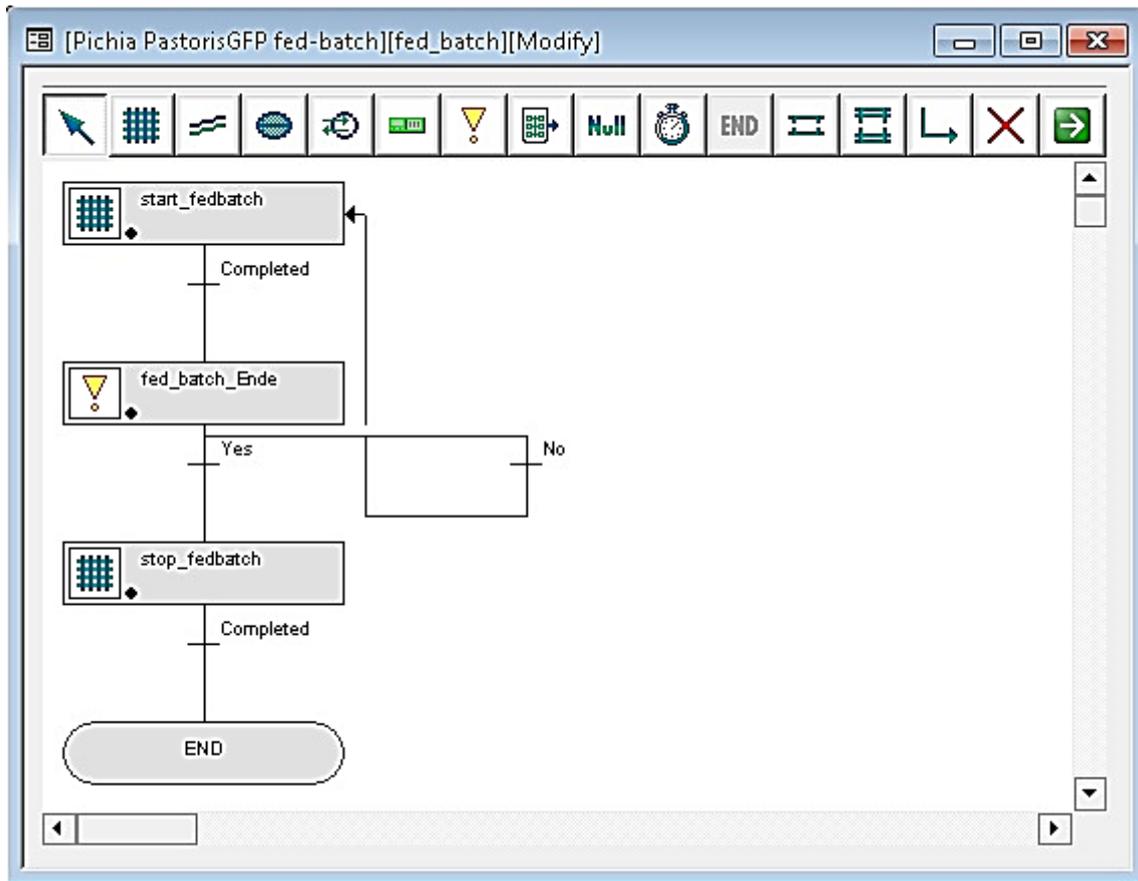


Abb. 11: Definierte Phasen für die Fed Batch-Operation

Als nächstes folgte die Operation „Produktion“, deren Phasen in Abb. 12 zu sehen sind. Nach dem Bestätigen des Schlauchwechsels in der „start_production“-Messagebox wird die exponentielle Methanol-Zugabe automatisch gestartet. Die Produktionsphase wird durch die Bestätigung der „Produktion_Ende“-Messagebox beendet.

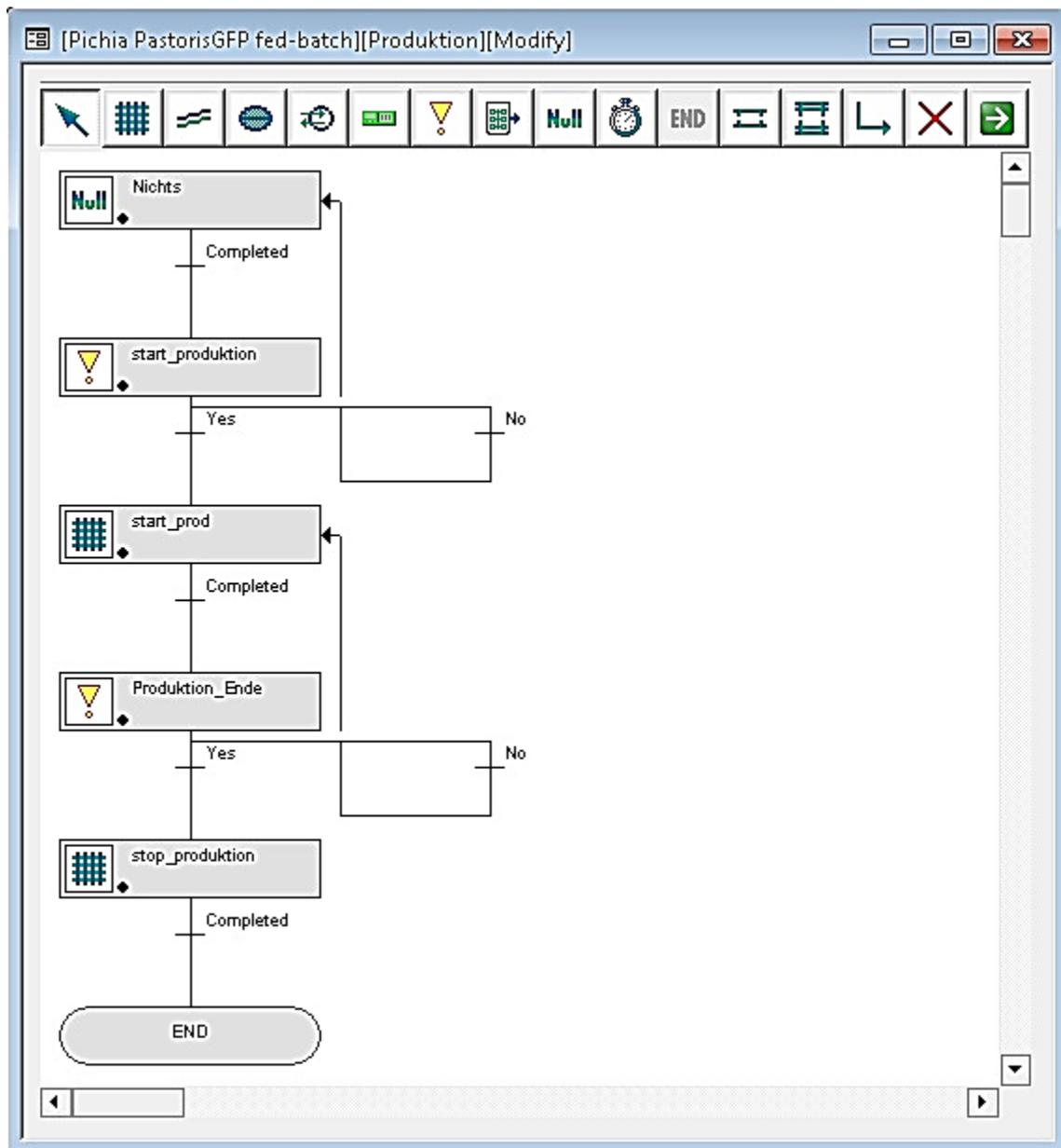


Abb. 12: Definierte Phasen für die Operation Produktion

Anschließend wurden alle Regler gemäß den Befehlen in der „ende“-Operation, deren Phasen in Abb. 13 ersichtlich sind, ausgeschaltet und die Kultivierung wurde beendet.

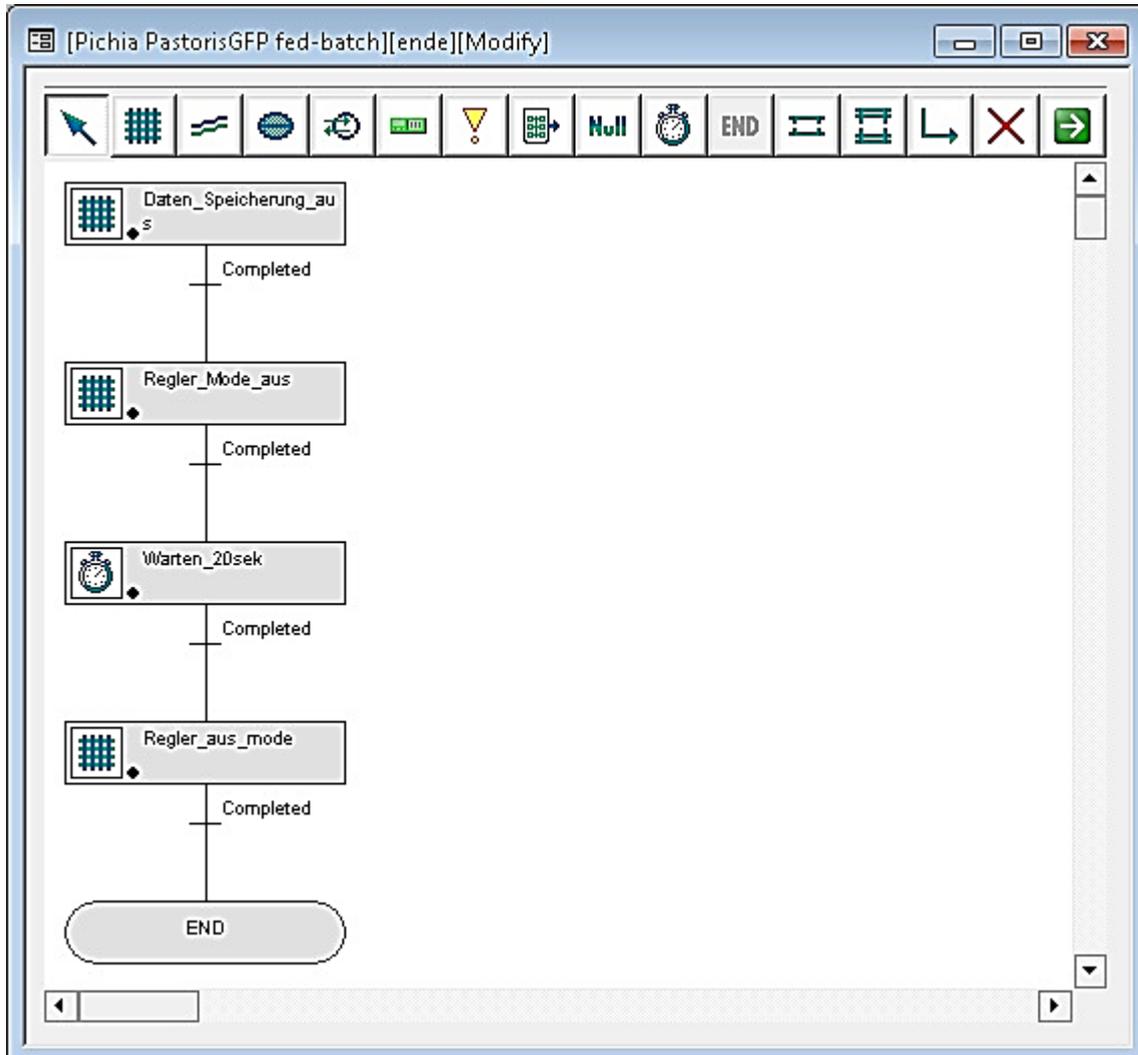


Abb. 13: Definierte Phasen für die Operation Ende

4.1.7 Abgasanalyse

Für die Abgasanalyse kam „BlueInOne FERM“ von Firma BlueSens zum Einsatz. Hier handelt es sich um einen Kombisensor, der eine parallele Messung von CO₂- und O₂-Stoffmengenanteil ermöglicht. Die Messung des O₂-Stoffmengenanteils basiert auf einer galvanischen Konzentrationszelle. Diese Zelle besteht aus Zirkoniumdioxid (ZrO₂) und hat die Aufgabe, die O₂-Konzentration im Abgas mit der O₂-Konzentration im Referenzgas, hier Umgebungsluft, zu vergleichen. Der CO₂-Stoffmengenanteil im Abgas wird durch die Infrarotlichtabsorption von den CO₂-Molekülen ermittelt (Martens, 2014). Der Abgasanalysator wurde über einen Schlauch an die Abgasflasche angeschlossen und vor dem Einsatz eine Ein-Punkt Kalibrierung durchgeführt. Für die Kalibrierung wurde der Analysator für 30 min mit Fermenter-Abluft durchgeströmt und danach die zwei Knöpfe auf der vorderen Seite für fünf Sekunden gleichzeitig gedrückt.

4.2 Offline-Analyse Methoden

Während der Fermentation wurden in allen drei Phasen Batch, Fed Batch und Produktion Proben entnommen, um die Zellkonzentration zu ermitteln. Zwei Offline-Analyse Messmethoden kamen zum Einsatz, Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmasse. Zudem wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, um die GFP-Produktion nachzuweisen.

4.2.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Die optische Dichte der Proben wurde in Doppelbestimmung direkt nach der Entnahme photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

Als Referenz diente demineralisiertes Wasser. Der beste lineare Zusammenhang zwischen der Extinktion und der ermittelten Konzentration ist, wenn die gemessenen Extinktionswerte zwischen 0,1 und 0,6 liegen. Aus diesem Grund wurden einige Proben verdünnt. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit demineralisiertem Wasser. Für die Messung der optischen Dichte wurde 1 ml der verdünnten Probe in eine Halbmikroküvette überführt, geschüttelt und anschließend gemessen. Die OD,

$$OD = F \cdot OD_{\text{Probe}} \quad (4)$$

mit OD := optische Dichte [-]

F := Verdünnungsfaktor [-]

OD_{Probe} := gemessene optische Dichte der verdünnten Probe [-] ,

konnte dann aus der OD der Suspension errechnet werden.

4.2.2 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Biotrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt. Hierfür wurden die 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße beschriftet, gewogen und in einem Träger in den Trockenschrank hineingestellt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 70 °C über Nacht getrocknet und für ca. 1 h beim Raumtemperatur abkühlen lassen. Darauffolgend wurden diese Reaktionsgefäße mit einer Pinzette aufgenommen und ausgewogen. Es ist zu beachten, dass die Mikroreaktionsgefäße vor dem Auswiegen gut abgekühlt sind.

Die Mikroreaktionsgefäße wurden mit 1 ml gut gemischter Probe befüllt und 10 min bei 20.160 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und das Pellet bei 70 °C über Nacht getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Gefäße ausgewogen. Abschließend wurde die Zellmassenkonzentration c_X ,

$$c_X = \frac{m_{M,X} - m_{M,0}}{V_{\text{Probe}}} \quad (5)$$

mit c_X := Biotrockenmasse [g⁻¹]
 $m_{M,X}$:= Gewicht des getrockneten Mikroreaktionsgefäßes mit Pellet [g]
 $m_{M,0}$:= Leergewicht des getrockneten Mikroreaktionsgefäßes [g]
 V_{Probe} := Probevolumen (hier $1 \cdot 10^{-3}$ l) [l] ,

berechnet.

4.2.3 Fluoreszenzmessung von GFP-Proben

Die GFP-Konzentration wurde mittels Fluoreszenzphotometer gemessen. Hierfür kam eine schwarze 96well Mikrotiterplatte zum Einsatz und es wurden jeweils 100 µl PBS als Blindwert, Standards oder unverdünnte Proben in das dafür vorgesehene Well pipettiert. Die Proben wurden vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Induktor-Zugabe entnommen. Die Standards und die Proben wurden zwischendurch auf Eis gelagert. Vom Pipettieren der Standards in die Welle bis zur Messung der Platte im TECAN-Genios wurde der Versuch unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Die Fluoreszenz der Proben wurde über das Plattenlesegerät Genios der Firma TECAN, Männedorf (Schweiz) detektiert. Hierfür wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 400 nm angeregt und das emittierte Licht bei 510 nm detektiert.

4.3 Schüttelkolbenversuche

Für die Planung der Arbeitsstrategien wurde die maximale Wachstumsrate der verwendeten Zellen benötigt und es wurde ermittelt, wie viel Volumen an Zellen von der vorhandenen Kryokultur ins Vorkulturmedium pipettiert werden muss, damit das Zellmedium abschließend eine optische Dichte von 3 – 5 AU aufweist und die Dauer der Vorkultur um diese OD zu erreichen. Bei OD kleiner als 3 AU kommt es zu einer längeren Lag-Phase im Fermenter. Bei einer OD größer als 5 AU besteht die Gefahr, dass die Zellen in Limitierungsphase gehen, bevor der Fermenter damit angeimpft wird, was ebenfalls zu einer längeren Lag-Phase im Fermenter führt. Daher wurden Schüttelkolbenvorversuche durchgeführt.

Die Kryokultur weist eine OD von 133 AU auf. Drei 1000 ml-Schikanekolben wurden jeweils mit 100 ml Vorkulturmedium für die Vorversuche vorbereitet. In den ersten Schikanekolben wurden 25 µl, in den zweiten 50 µl und in den dritten 75 µl Zellmedium pipettiert und von jedem 1 ml Probe für die Bestimmung der OD entnommen. Die angeimpften Kolben wurden in den Inkubations-Schüttelschrank hineingestellt und über Nacht bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden von jedem Kolben unter der Sicherheitswerkbank zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die OD gemessen. Vor jeder Probenentnahme wurden die Schikanekolben gut geschwenkt.

4.4 Ansetzen der Vorkultur

Für die ersten zwei Fermentationen wurden jeweils vier 1000 ml-Schikanekolben als Vorkultur angesetzt. Hierfür wurden 400 ml Vorkulturmedium nach dem dazugehörigen Protokoll (s. Anhang) vorbereitet. Darauffolgend wurden das Vorkulturmedium und vier Schikanekolben autoklaviert. Die Zugabe der thermolabilen Medium-Bestandteile, Biotin und PTM4, erfolgte nach dem Autoklavieren des Vorkulturmediums unter der Sicherheitswerkbank. Die steril filtrierten thermolabilen Bestandteile werden mit einer sterilen Spritze, an derer Spitze ein Filter mit 0,2 µm Porengröße befestigt war, erneut steril filtriert werden. Danach wurden in vier autoklavierten Schikanekolben jeweils 100 ml Vorkulturmedium überführt. Anschließend wurde jeder Schikanekolben mit 1500 µl Zellmedium von der Kryokultur angeimpft. Diese wurden danach im Inkubations-Schüttelschrank über Nacht bei 30 °C mit 150 rpm inkubiert. Sowohl bei der ersten Fermentation nach 20 h als auch bei der zweiten Fermentation nach 21,20 h wurde von einem Schikanekolben 1 ml Probe entnommen, um deren OD vor dem Animpfen des Fermenters zu messen (gemessene OD für die erste Fermentation 5,60 AU und für die zweite Fermentation 5,92 AU). Die Zellkulturen der anderen drei Schikanekolben, insgesamt 300 ml, wurden in die Inokulumflasche überführt, geschwenkt und der Fermenter damit angeimpft.

Für die dritte Fermentation wurde nur ein 1000 ml- Schikanekolben als Vorkultur angesetzt. Der Schikanekolben wurde mit 100 ml Vorkulturmedium befüllt und mit 1500 µl Zellmedium von der Kryokultur angeimpft. Der Inhalt des Schikanekolbens wurde über Nacht bei 30 °C und mit 150 rpm im Inkubations-Schüttelschrank inkubiert und nach 20,15 h in den Fermenter überführt. Die optische Dichte des Vorkulturmediums nach dieser Inkubationszeit betrug 3,99 AU.

4.5 Vorbereitung der Kultivierung

4.5.1 Ansetzen der Medien

Die Zusammensetzung der Medien ist in der Tab. 1 dargestellt. Es handelte sich um ein Minimalmedium. Abhängig von der Dauer der geplanten Batch Phase, wurden verschiedene Glycerin-Konzentrationen eingesetzt. In den ersten beiden Kultivierungen wurde ein größeres Volumen vom Fed Batch-Medium angesetzt, damit die geplante Substratmasse pro Zeit in den Fermenter gepumpt wurde. Zudem wurde die Batch Phase mit einem kleineren Medium-Volumen gestartet, um das Arbeitsvolumen vom Bioreaktor nicht zu überschreiten.

Die Glycerin-Konzentration des Zufüttermediums für den Fed Batch wurde in allen drei Fermentationen variiert. Die Glycerin-Konzentration des Fed Batch-Mediums betrug in der ersten Kultivierung $69,21 \text{ g l}^{-1}$, in der zweiten 47 g l^{-1} und in der dritten 700 g l^{-1} . Außerdem enthielten die ersten zwei Fed Batch-Medien 8 ml l^{-1} Biotin und 4 ml l^{-1} PTM4.

Für die Produktionsphase wurde als Zufüttermedium Methanol verwendet. Hierfür kamen kein Biotin und PTM4 zum Einsatz. Die verwendeten Methanol-Konzentrationen sind in Kapitel 4.6.1 angegeben.

Tab. 1: Medienzusammensetzung, P.: Phase

Medium-Bestandteil	Konzentration [g l^{-1}]				
	1. und 3. Vorkultur	2. Vorkultur	1. Batch P.	2. Batch P.	3. Batch P.
Glycerin	20	8	16,67	10	25
KH_2PO_4	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
K_2SO_4	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15
$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
$\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
Biotin Stock ($0,2 \text{ g l}^{-1}$)	8	8	8	8	8
PTM4 Stock (s. Tab. 2)	4	4	4	4	4

4.5.2 Vorbereiten des Bioreaktors

Es kam der BIOSTAT® Aplus als Fermenter zum Einsatz. Vor der Sterilisation wurden einige Vorbereitungen durchgeführt. Mittels von Schrauben wurden der Edelstahldeckel und das Glasgefäß auf dem dreibeinigen Edelstahl-Gestell befestigt. Auf die Deckelplatte wurden Abluftkühler, Rührwerkantrieb, Sonden (pO_2 , pH und Schaum), Schläuche für Kühlfinger, Schläuche für Probenentnahme und Zugabe von Korrekturmitteln sowie die Schläuche mit Sterilkupplungen montiert. Die Septen dieser Sterilkupplungen wurden gegen neue ausgetauscht. Die Schläuche, die später durch diese Sterilkopplungen mit dem Kulturgefäß verbunden werden sollten, waren an die Kupplungen angeschlossen. Über zwei Schläuche erfolgte die Verbindung der Abluftkühler mit dem Umlaufkühler. Alle bereits eingebauten Sonden wurden an die Kabel angeschlossen. Die Temperiermanschette wurde um das Glasgefäß gebunden und dessen Kabel an die Grundeinheit des Reaktors angeschlossen. Der Bio-

reaktor wurde auf der dazugehörigen Waage ausgewogen. Dies ermittelte Gewicht wurde als Leergewicht des Bioreaktors, m_{B0} , in das dazugehörige Feld im Variable Display eingegeben. Das Leergewicht des Bioreaktors war für die Ermittlung der Substratzufüterraten in der Fed Batch und der Produktionsphase notwendig zum Errechnen des Volumens der Flüssigphase V_{Lj} (s. Gleichung 2).

Die Waage wurde tariert und das schon vorbereitete Batch-Medium ohne Biotin und Spurenelemente in den Fermenter überführt. Der Volumenverlust wurde nach dem Autoklavieren mittels Zugabe von sterilem VE-Wassers kompensiert.

Anschließend wurden die Kabel von den Sonden beziehungsweise die Umlaufkühlerschläuche von dem Abluftkühler und dem Kühlfinger getrennt, die Temperiermanschette abgenommen und in die Deckel aller verwendeten Flaschen Dichtungen eingelegt, damit die Zuluft nur durch die an den Deckel angeschlossenen Filter strömt. Säure und Antischaummittel wurden mit dem Bioreaktor zusammen autoklaviert werden. Aufgrund der Verwendung einer flüchtigen Base (Ammoniak) durfte diese nicht mitautoklaviert werden. Erst nach dem Autoklavieren wurde die Base in eine leere Flasche, die statt der Basenflasche am Bioreaktor verbunden war und mitautoklaviert wurde, eingefüllt. Alle Filter und die Rührerwellenkupplung sowie der elektrische Anschluss der Schaumsonde wurden mit Alufolie umwickelt. Da die Sterilisation während des Autoklavierens durch die Dampfentwicklung erfolgt, musste in alle Schläuche und Gefäße einige Tropfen VE-Wasser gegeben werden. Alle Schlauchverbindungen mussten mittels eines Kabelbinders befestigt sein. Die Schläuche zwischen dem Fermenter und den anderen Flaschen, bis auf die Abluftflasche, wurden mittels Schlauchklemmen abgeklemmt, um ein Überfließen der Flüssigkeiten aus sowie in den Fermenter zu verhindern.

4.5.2.1 Kalibrierung der Sonden (Zwei-Punkt-Kalibrierung)

pO₂-Sonde

Die Kalibrierung wurde bei 30 °C und Umgebungsdruck durchgeführt. Für die Nullpunktkalibrierung wurde das Kulturgefäß solange mit Stickstoff begast, bis der dazugehörige Elektrodenstrom konstant war. Dieser wurde als Nullpunkt (0% pO₂) festgelegt. Um den Bezugswert für die Steilheit zu ermitteln, wurde die Begasung auf Luft umgestellt und das Kulturgefäß bis zur Sauerstoffsättigung begast. Nach der Ermittlung eines konstanten Werts wurde dieser als 100% pO₂ festgelegt. Die Steilheit (100% pO₂) hängt von den Bedingungen und der Begasung

zum Zeitpunkt der Kalibrierung ab. Daher kann der aktuell gemessene pO_2 während der Kultivierungen auch Werte von mehr als 100% pO_2 zeigen.

pH-Sonde

Vor der Autoklavierung wurde die pH-Sonde in eine dabei gerührte Pufferlösung mit pH 7 getaucht. Nach dem Erreichen eines stabilen Stromwerts wurde dieser als Nullpunkt festgelegt. Für die Ermittlung der Steilheit wurde die Sonde in eine Pufferlösung mit pH 4 unter Rühren getaucht. Nachdem der dazugehörige Strom einen konstanten Wert erreichte, wurde dieser Wert als die Steilheit angenommen.

4.5.2.2 Autoklavieren

Nach der Vorbereitung des Bioreaktors wurde dieser mit allen seinen Zubehörteilen in den Autoklaven hineingestellt. Beim Autoklavieren der Flaschen sollten diese etwa mit einer Umdrehung geöffnet sein. Das Thermometer des Autoklaven wurde vor der Autoklavierung in eine mit VE-Wasser gefüllte Flasche, deren Wasservolumen dem größten Volumen von Medien im Autoklaven entsprach, gehängt. Zur Vermeidung der Überschreitung der zulässigen Druckbelastung im Fermenter während des Autoklavierens wurde eine Schraube am Fermenterdeckel aufgedreht und umgekehrt auf ihre zugehörige Deckelöffnung aufgelegt. Alle im Prozess verwendeten Gefäße und Chemikalien wurden bei einer Sterilisiertemperatur von 121 °C und einer Sterilisierzeit von 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die geöffnete Fermenterdeckel-Schraube sowie alle Flaschendeckel zugedreht.

4.6 Kultivierung

4.6.1 Kultivierung eines anderen Stamms von *P. pastoris*

Da die produzierte GFP-Konzentration durch die verwendeten Zellen (*P. pastoris* KM71H) so niedrig war, dass kein auffälliges grünes Leuchten bei den Proben nach der Induktor-Zugabe und unter dem UV-Licht möglich war, wurden Versuche mit einem anderen Stamm von *P. pastoris* durchgeführt. Hierfür wurde mittels der vorhandenen Daten der Schüttelkolbenversuche für *P. pastoris* KM71H Vorkulturen angesetzt und nach 20 h in den Fermenter überführt.

4.6.2 Dreistufige Kultivierung der Hefezellen *P. pastoris* KM71H

Um eine reproduzierbare dreistufige Kultivierung zu etablieren, wurden drei Fermentationen durchgeführt. Der pH-Wert wurde auf pH = 5 und die Temperatur auf $T = 30\text{ °C}$ eingestellt. In den ersten zwei Fermentationen wurde versucht, den pH-Wert durch die Zugabe von 25%igen Ammoniak zu regeln, in der dritten Fermentation wurde 12,5%igen Ammoniak eingesetzt. Als Säure wurde H_3PO_4 mit einer Konzentration von 2 M verwendet. In der ersten und der zweiten Kultivierung wurde die Batch Phase mit 1,4 l Batch-Medium und einem 300 ml Inokulum gestartet, die dritte Kultivierung mit 3,4 l Batch-Medium und 100 ml Inokulum.

Bei allen drei Fermentationen wurde der Fermenter mit einer Begasungsrate von 3 l min^{-1} begast. Bei der dritten Fermentation wurde der Sollwert der Begasungsrate vor dem Ende der Batch-Phase von 3 l min^{-1} auf 6 l min^{-1} erhöht.

Bei keinem der Versuche konnte das Batch-Ende durch das Programmmodul MFCS/Tool automatisch erkannt werden. Deshalb wurde der Übergang zur Fed Batch-Phase manuell durchgeführt.

Die Zufütterung der Zellen wurde bei allen drei Fermentationen von oben betrieben.

Bei der ersten Produktionsphase wurden den 3,5 l Volumen im Fermenter direkt nach dem Ende der Fed Batch-Phase 30 ml Methanol mit einer Konzentration von 621 g l^{-1} auf einmal als Induktor mit zugegeben. Am kommenden Tag vor 50 h Prozessdauer wurden 10 ml von 100%igen Methanol auf einmal zugegeben. Das Volumen des Zellmediums im Bioreaktor betrug dabei 3,49 l.

Bei der zweiten Kultivierung wurde die Methanol-Zugabe mit einem exponentiellen Pumpprofil eingeleitet. Das zugegebene Methanol hatte eine Konzentration von 402 g l^{-1} und wurde am Anfang mit einem exponentiellen Pumpprofil dem Fermenter zugegeben. Das Zellmedium im Fermenter hatte in dieser Zeit ein Volumen von 3 l. Die Zufütterung wurde dreimal während der Produktionsphase abgebrochen.

Bei der dritten Fermentation wurden die Zellen mithilfe eine andere Pumpe mit kleinerer minimaler Pumprate zur Zufütterung genutzt und daher war ein kleiner Volumenansatz von dem Substrat nötig, um die vorgesehene Substratzielkonzentration pro Zeit in den Bioreaktor einzufüllen. Die Zufütterungspumpe wurde siebenmal ausgeschaltet, um die Adaption der Zellen an das Methanol zu überprüfen. Gemäß der Literatur sollte eine Methanolkonzentration von 0,5 – 1,5 % für den Rest der Produktionsphase im Bioreaktor aufrechterhalten

werden, damit die Akkumulation des Methanols im Bioreaktor und das Auslösen einer toxischen Methanol-Wirkung auf die Zellen verhindert wird (Janson, Rothhämel, 2012). In den durchgeführten Versuchen war keine Methanol-Sonde vorhanden, daher wurde in regelmäßigen Abständen die Methanolzufuhr gestoppt, um den Erfolg der Methanol-Zufütterung unter limitierenden Bedingungen zu überprüfen. Ein schneller Anstieg des pO_2 nach Stopp der Methanolzufuhr konnte die Adaption der Zellen an das Methanol zeigen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Ergebnis des Schüttelkolbenvorversuchs

Die graphischen Darstellungen des Zellwachstums in den durchgeführten Schüttelkolbenversuchen sind in Abb. 14 – 16 zu sehen.

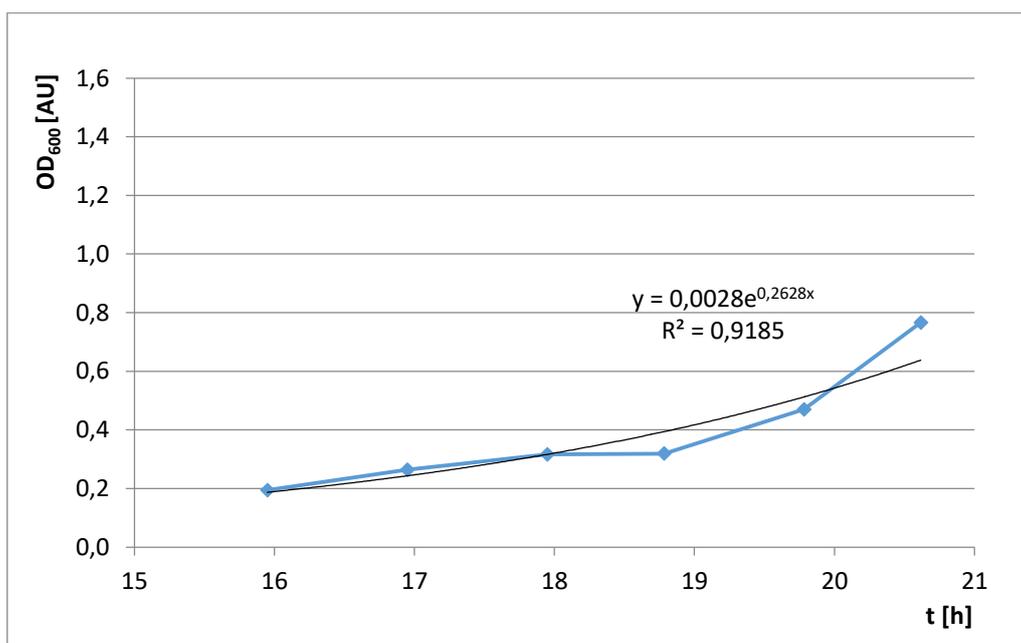


Abb. 14: Wachstumskurve der Kryokultur in erstem Schikanekolben. Es wurden 25 μ l von der Kryokultur mit einer OD = 133 AU bei 30 °C und 150 rpm im Inkubations-Schüttelschrank inkubiert. Die gemessenen OD₆₀₀-Werte wurden gegenüber der Zeit aufgetragen.

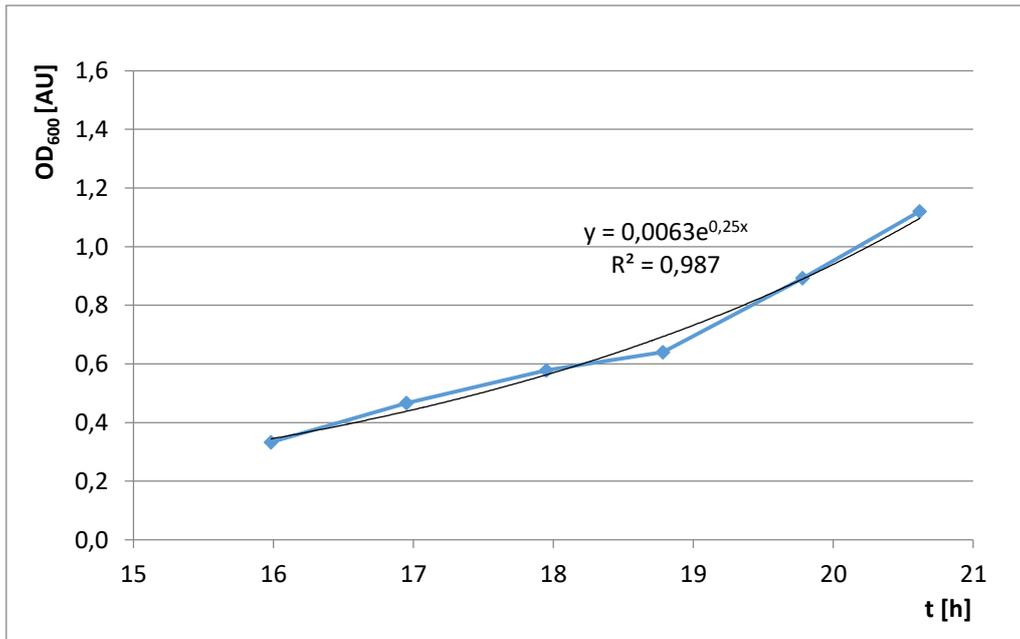


Abb. 15: Wachstumskurve der Kryokultur in zweitem Schikanekolben. Es wurden 50 µl von der Kryokultur mit einer OD = 133 AU bei 30 °C und 150 rpm im Inkubations-Schüttelschrank inkubiert. Die gemessenen OD₆₀₀-Werte wurden gegenüber der Zeit aufgetragen.

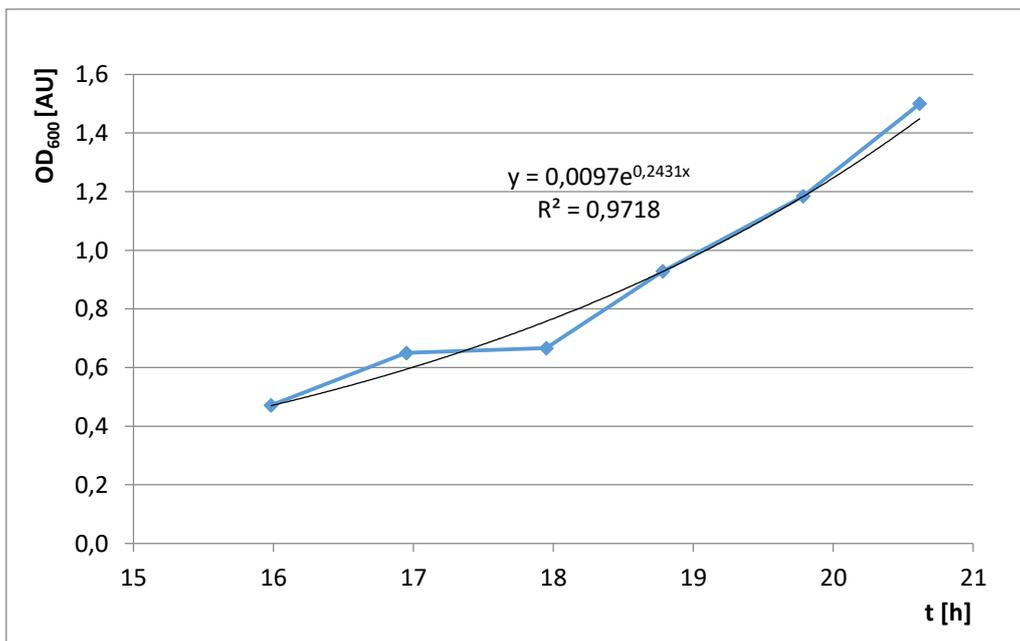


Abb. 16: Wachstumskurve der Kryokultur in drittem Schikanekolben. Es wurden 75 µl von der Kryokultur mit einer OD = 133 AU bei 30 °C und 150 rpm im Inkubations-Schüttelschrank inkubiert. Die gemessenen OD₆₀₀-Werte wurden gegenüber der Zeit aufgetragen.

Es wurden zum Animpfen der Vorkultur für die folgenden Versuche 1500 µl von der Kryokultur und circa 20 h Dauer gewählt.

5.2 Kultivierung eines anderen *Pichia pastoris* Stammes

Obwohl die Farbe der angesetzten Vorkulturen nach dieser Zeit noch zu hell und nicht getrübt wie erwartet war, wurde der Inhalt in den bereits vorbereiteten Bioreaktor eingefüllt, ohne vorher mikroskopiert zu werden. Die mikroskopischen Betrachtungen ein Tag nach dem Animpfen des Fermenters, wiesen eine bakterielle Kontamination auf. Die dazugehörige Stammkryokultur wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Die Kontamination war auch in der Stammkryokultur auffällig. Aus diesem Grund wurde sich für die weitere Arbeit für *P. pastoris* KM71H entschieden.

5.3 Die dreistufige Kultivierung im BIOSTAT® Aplus

Der pH-Wert und die Temperatur wurden in allen drei Fermentationen geregelt und sind bis zum Ende aller Kultivierungen nahezu konstant geblieben. Die Kurvenverläufe der anderen Parameter wie die Rührerdrehzahl und der x_{O_2} waren bis auf die Batch-Phase nicht wie erwartet. Außerdem erfolgte das erstellte exponentielle Pumpprofil nur in den ersten zwei Fed Batch-Phasen sowie in der ersten Produktionsphase wie erwartet.

Für eine bessere Vergleichsmöglichkeit wurden die Ergebnisse jeweiliger Phasen (Batch, Fed Batch und Produktion) von allen drei Fermentationen zusammen dargestellt.

5.3.1 Die Batch-Phasen

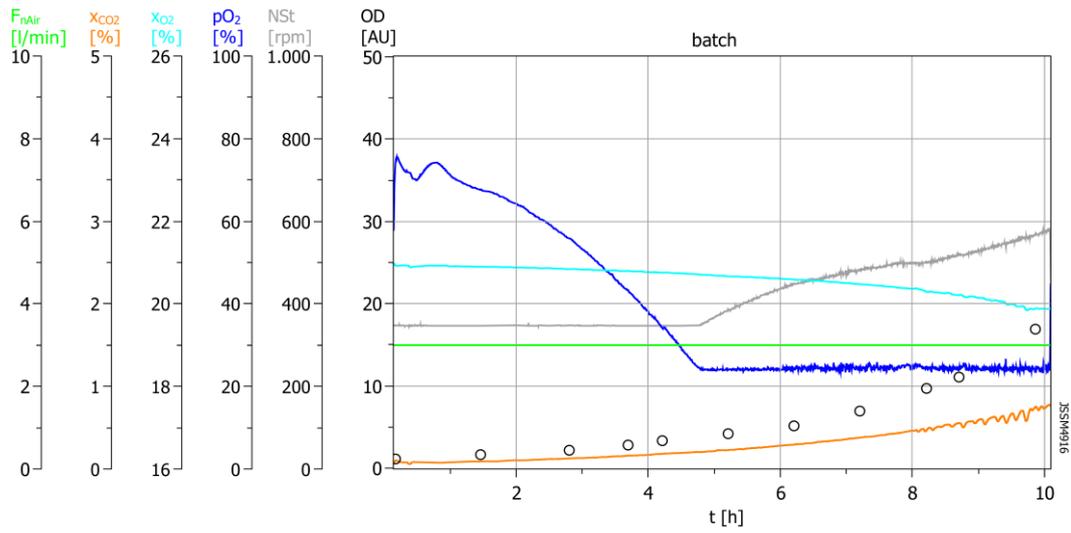


Abb. 17: Batch-Phase der ersten Kultivierung *P. pastoris*

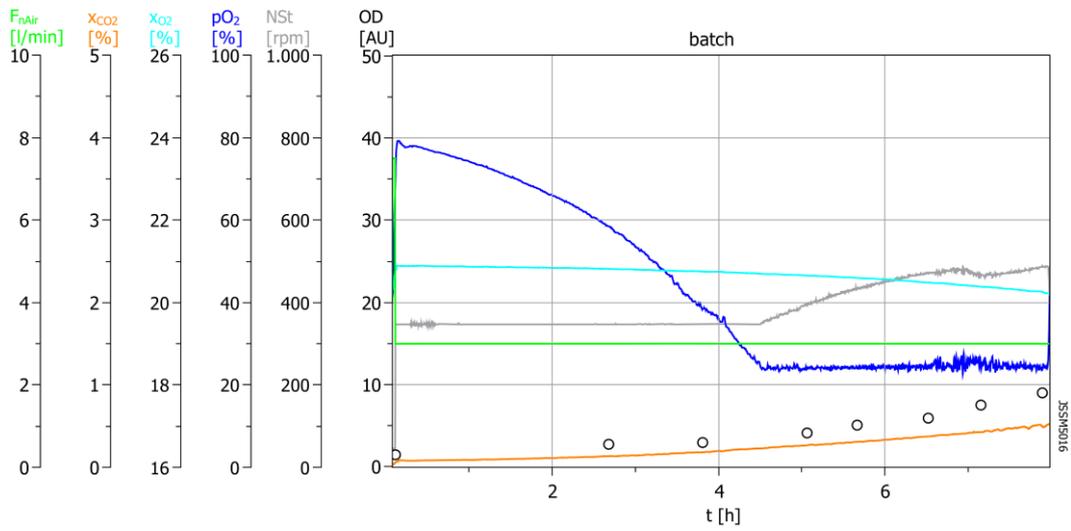


Abb. 18: Batch-Phase der zweiten Kultivierung *P. pastoris*

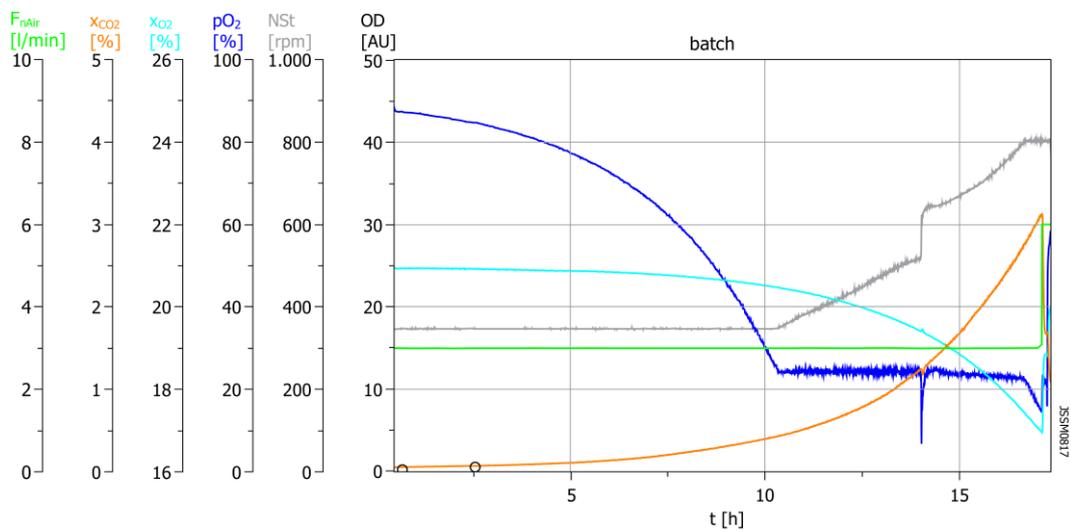


Abb. 19: Batch-Phase der dritten Kultivierung *P. pastoris*

Vor dem Animpfen hatte der pO_2 einen Wert von 100%. Dieser Wert nahm direkt nach dem Einfüllen des Inokulums in den Bioreaktor in kurzer Zeit stark ab, da die lebensfähigen Zellen Sauerstoff verbrauchen. Bei den ersten zwei Fermentationen ist ein senkrechter Abstieg mit anschließendem Anstieg direkt nach dem Animpfen auffällig. Dies ist aber bei der letzten Fermentation nicht der Fall. Diese sprunghafte Ab- und Zunahme des pO_2 -Wertes wird durch das zu große Volumenverhältnis von Inokulum/Batch-Medium in den ersten zwei Fermentationen verursacht. Darauf folgend sinkt der pO_2 exponentiell, bis er seinen Sollwert (hier: 25%) erreicht. Nachdem der pO_2 seinen Sollwert erreicht, wird durch den Anstieg der Rührerdrehzahl geregelt.

In der dritten Fermentation ist vor der 15. Prozessstunde bei dem senkrechten Anstieg der Rührerdrehzahl ein senkrechter Abstieg mit anschließendem Anstieg in pO_2 signifikant. Dies wurde durch die Antischaumzugabe ausgelöst. Aufgrund eines kleineren Zellkulturvolumens im Bioreaktor macht sich dieses Phänomen bei der ersten sowie der zweiten Fermentation nicht bemerkbar. Bei diesen beiden war nur ein Drittel des Arbeitsvolumens besetzt und die gebildeten Schäume waren nicht in der Lage vor dem Batch-Ende mit der Schaumsonde in Kontakt zu kommen. Deshalb wurden durch die Schaumsonde keine Signale zum Schaumregler gesendet, durch den normalerweise die Antischaummittelzugabe geregelt wird.

Veranlasst durch eine höhere Zellkonzentration bei der dritten Fermentation im Vergleich zu den ersten zwei Fermentationen vor dem Ende der Batch-Phase, erhöhte sich der Sauerstoffbedarf soweit, dass dieser auch durch die maximale Rührerdrehzahl nicht gedeckt werden konnte. Neben der maximalen Rührerdrehzahl konnte eine Erhöhung der Begasungsrate, der Sauerstoffbedarf für eine kurze Zeit decken.

Wegen des vollständigen Substratverbrauchs durch die wachsenden Zellen, stieg der pO_2 am Ende der Batch Phase stark an und die Rührerdrehzahl nahm stark ab, bis sie ihren Sollwert wieder erreichte.

Die kürzeste Batch-Phase ist bei der zweiten Fermentation, dessen Batch-Medium die niedrigste Substratkonzentration (s. Tab. 1) enthielt, erkennbar.

Aufgrund eines geringeren Volumenverhältnisses von Inokulum/Batch-Medium und einer höheren Substratkonzentration bei der dritten Fermentation, verlängerte sich die dazugehörige Batch-Phase mehr als bei den anderen Fermentationen. Hierdurch wurde auch eine höhere Zellkonzentration am Ende der dritten Batch-Phase verursacht.

5.3.2 Die Fed Batch-Phasen

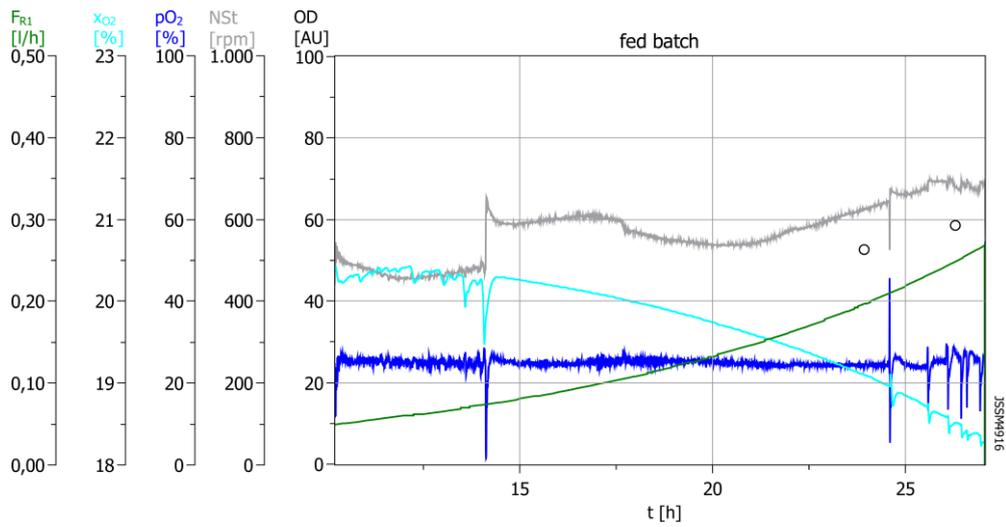


Abb. 20: Fed Batch-Phase der ersten Kultivierung *P. pastoris*

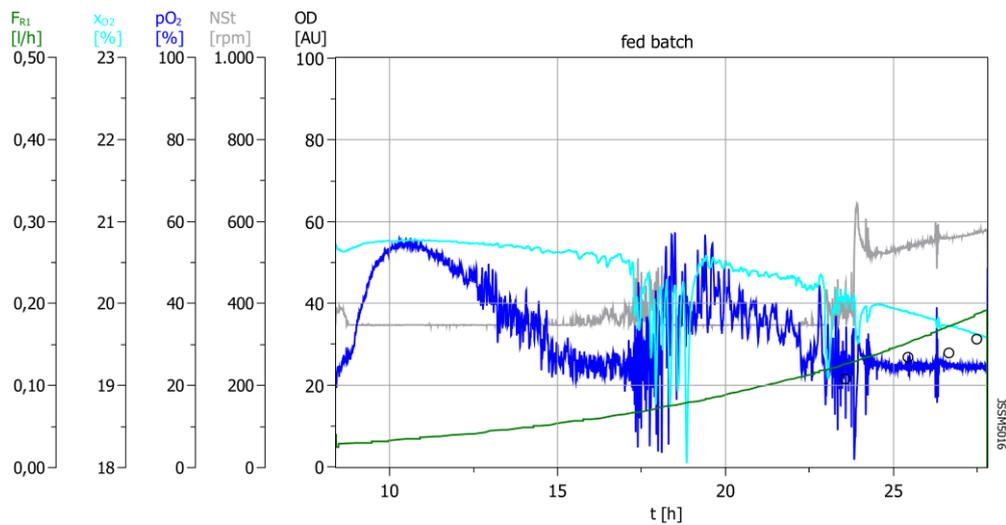


Abb. 21: Fed Batch-Phase der zweiten Kultivierung *P. pastoris*

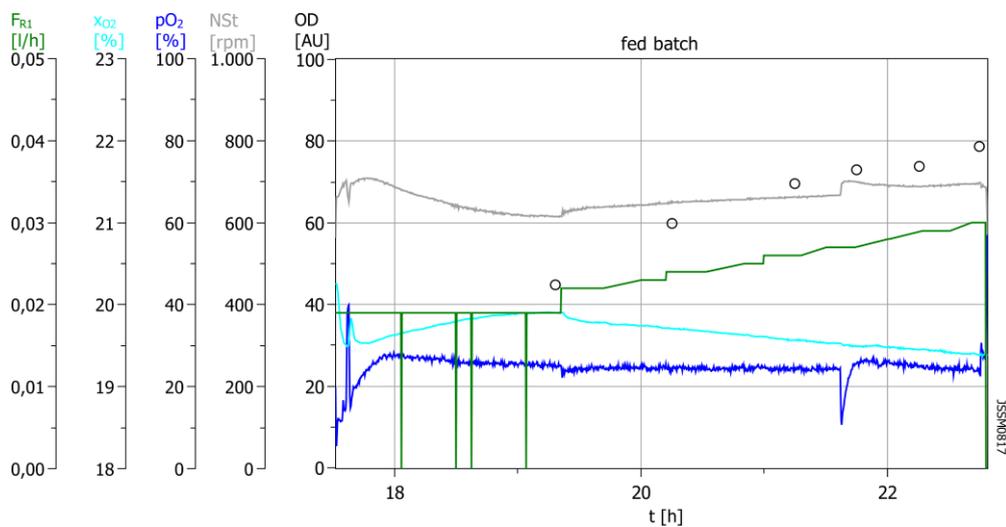


Abb. 22: Fed Batch-Phase der dritten Kultivierung *P. pastoris*. Im Vergleich zu den anderen zwei Fed Batch-Phasen wurde die FR1 hier in einem kleineren Maßstab aufgetragen.

Bei der ersten Fermentation ist nach dem Anfang der Fed Batch-Phase und bis zum senkrechten Anstieg der Rührerdrehzahl ein flacher Ab- und anschließender Anstieg des Rührerdrehzahlverlaufs auffällig. Diesem gegenüber steigt der Sauerstoffmengenanteil in diesem Zeitraum flach an und sinkt dann langsam bis zum senkrechten Ab- und anschließenden Anstieg. Eigentlich müsste die Rührerdrehzahl langsam exponentiell ansteigen und der Sauerstoffmengenanteil ständig abnehmen, was hier jedoch nicht der Fall ist. Eine Ursache hierfür könnte die fehlende Verfügbarkeit des Substrates für die wachsenden Zellen, trotz der exponentiellen Zufütterungsrate sein. Da das Medium nicht vor Beginn der Fermentation durch die Pumpe von seiner Flasche in die Transportschläuche gepumpt wurde, waren diese Schläuche zum Beginn nicht gefüllt. Es könnte sein, dass das Medium von seiner Flasche bis zum Eintritt in den Fermenter eine längere Zeit brauchte und die Zellen in diesem Zeitraum nicht rechtzeitig gefüttert wurden und als Ersatz ihre sekretierten Produkte verstoffwechselten. Möglicherweise war auch die Substratkonzentration im Fed Batch-Medium zu niedrig und als Konsequenz trat ein Substratmangel in dieser Phase auf. Eine weitere Ursache könnte in der Schaumbildung liegen, durch die die Zellen kein Substrat bekommen konnten. Das Herunterfallen der gepumpten Medium-Tropfen könnte durch vorhandenen Schaum behindert worden sein. Allerdings ist eine Antischaummittelzugabe vor der 15. Prozessstunde auffällig, wonach der x_{O_2} -Verlauf langsam exponentiell abnimmt. Die Bildung des Schaums könnte daran liegen, dass der zweiten 6-Platten-Scheibenrührer direkt auf der Zellmedium-Oberfläche im Fermenter rührte. Die Rührerdrehzahl, die langsam ansteigen musste, verläuft nach der Antischaumzugabe bis zur 20. Prozessstunde immer noch unerwartet. Aufgrund einer Regler-Störung beim Rührerdrehzahlregler nimmt die Rührerdrehzahl trotz des x_{O_2} -Sinkens ab. Eine Software-Störung im Programmmodul MFCS/win könnte dieses Verhalten der Rührerdrehzahl verursachen. Vor der 25. Prozessstunde ist ein senkrechter An- und anschließender Abstieg des pO_2 auffällig. Dies könnte durch einen kurzen Substratmangel verursacht worden sein. Die Ursache der letzten fünf sprungförmigen Ab- und Anstiege des pO_2 , bei denen keine schnelle Reaktion der Rührerdrehzahl auffällig ist, ist unklar. Möglicherweise sollte die Geschwindigkeit des Rührerdrehzahlreglers erhöht werden, damit der dazugehörige Regler schneller auf die pO_2 -Änderungen reagiert. Eine langsame Reaktion der Rührerdrehzahl war später nicht mehr auffällig, obwohl derer Reglerparameter nicht verändert wurden. Bei der zweiten Fermentation wurden über Nacht sehr starke Schäume gebildet. Das Rühren des 6-Platten-Scheibenrührer direkt auf der Zellmedium-Oberfläche hatte die Schaumbil-

derung wahrscheinlich noch mehr verstärkt. Da der Abluftweg mit Schaum oder Medium besetzt war, konnte zeitweise kein Abgas durch den Abgasanalysator strömen. Aus diesem Grund sind in manchen Prozesszeiten starke Schwankungen in dem Sauerstoffmengenanteil auffällig. Wegen des Zurückhaltens des gepumpten Fed Batch-Medium durch die Schäume konnten die wachsenden Zellen nicht zwischendurch gefüttert werden. Daher tauchte in der Kultivierung Substratmangel auf, wodurch der pO_2 in manchen Prozesszeiten anstieg. Durch eine manuelle Antischaumzugabe sank der pO_2 auf seinen Sollwert und wurde durch den Anstieg der Rührerdrehzahl geregelt.

Bei der dritten Fermentation verlief wie bei der ersten die Rührerdrehzahl nicht wie erwartet. Ein senkrechter An- und Abstieg des pO_2 zu Beginn der Fed Batch-Phase kann ein Zeichen für einen kurzen Substratmangel sein. Dieser eventuelle Substratmangel dauerte bis zur 19,4. Prozessstunde, wonach die Rührerdrehzahl wie erwartet anstieg und der x_{O_2} abnahm. Allerdings wurde eine langsam exponentiell ansteigende Rührerdrehzahl erwartet, was hier nicht der Fall war. Eine zu langsame Pumprate sowie kein rechtzeitiges Vorhandensein des Fed Batch-Mediums in der dazugehörigen Schlauchverbindung könnte dies verursacht haben. Auch auffällig ist, dass die Zellen bis zur 19,4. Prozessstunde nicht exponentiell, sondern mit einem konstantem Pumpprofil zugefüttert wurden. Dies könnte den vorher auftauchenden Substratmangel erklären. Die exponentielle Zufütterungsrate wurde erst nach der 19,4. Prozessstunde gestartet, wonach die Änderungen im Rührerdrehzahl- bzw. x_{O_2} -Verlauf auffällig sind. Die Störung bei dem exponentiellen Zufütterungsprofil war erst nach der zweiten Fed Batch-Phase aufgetaucht. Bei der zweiten Fermentation kam die erste Pumpe, die für diesen Fermenter nicht geeignet war, zum Einsatz, trotzdem ist ein nicht exponentielles Pumpprofil bei der zweiten Produktionsphase deutlich erkennbar (Abb. 23). Dies könnte darauf hinweisen, dass die eventuelle Störung des Pumpprofiles nicht an der Pumpe selbst, sondern an der steuernden Software und an dem Programmmodul MFCS/Tool liegt.

Der senkrechte Ab- und Anstieg im pO_2 -Verlauf vor der 22. Prozessstunde kann ein Zeichen für die Antischaummittelzugabe sein. Innerhalb der Fed Batch-Phase sind vier senkrecht Ab- und Anstieg-Stellen bei der Zufütterung auffällig, die jeweils ein eventuelles selbst Anhalten der verwendeten Pumpe verdeutlichen.

Nach dem Ausschalten der Pumpe kurz vor dem Ende der Fed Batch-Phase, wurde das noch vorhandene Substrat im Bioreaktor vollständig verbraucht. Daher stieg der pO_2 abschließend stark senkrecht an und die Rührerdrehzahl nahm senkrecht ab.

5.3.3 Die Produktionsphasen

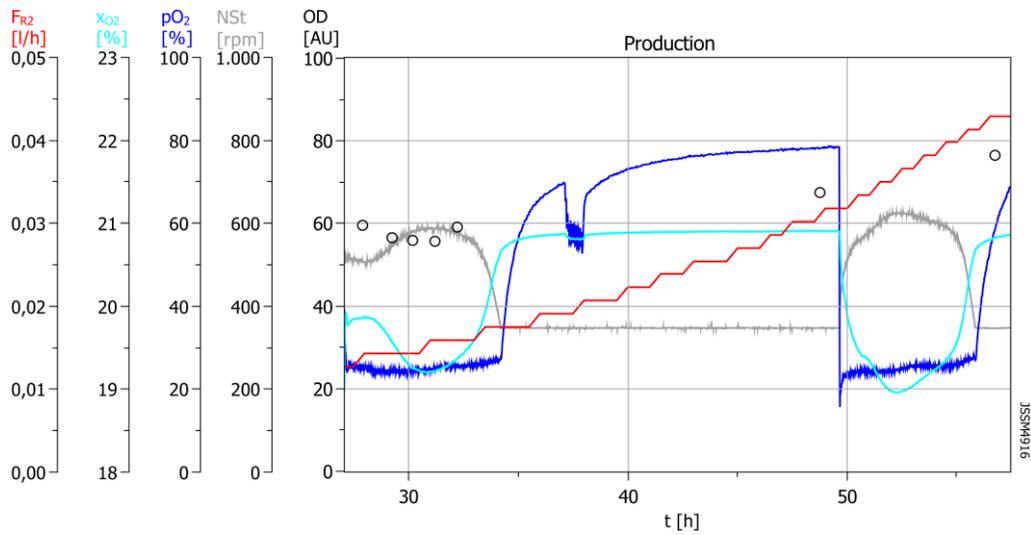


Abb. 23: Produktionsphase der ersten Kultivierung *P. pastoris*

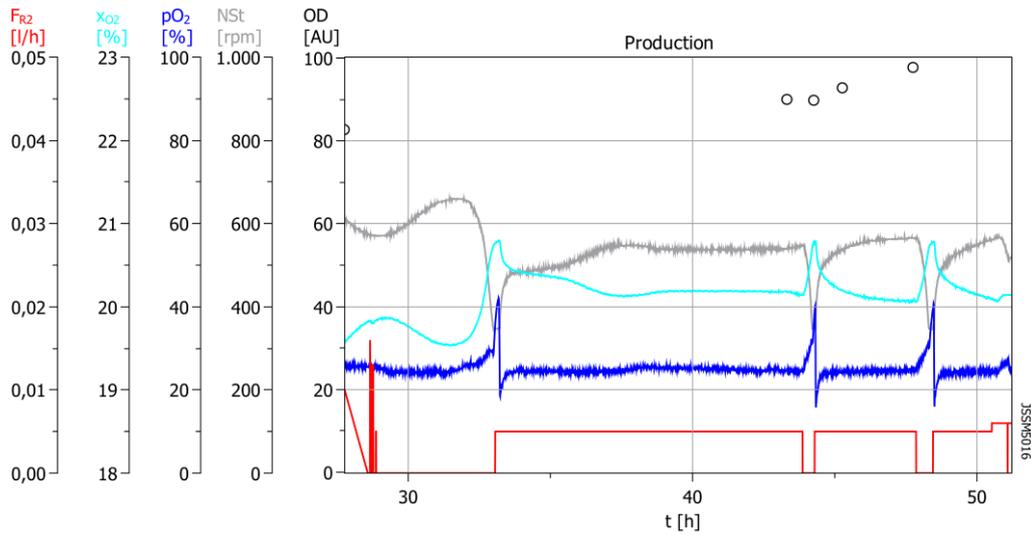


Abb. 24: Produktionsphase der zweiten Kultivierung *P. pastoris*

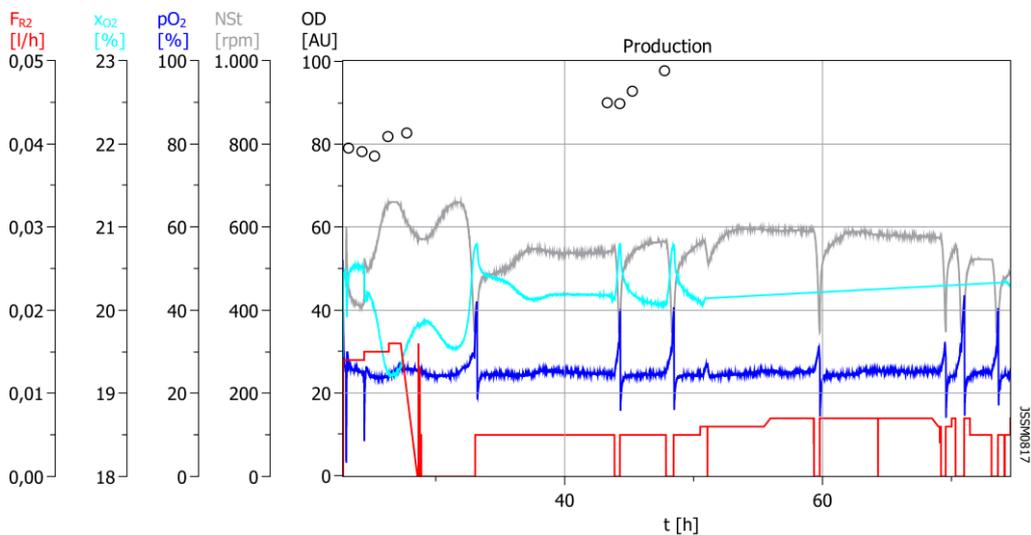


Abb. 25: Produktionsphase der dritten Kultivierung *P. pastoris*

Die auf einmal manuelle Zugabe des Methanols direkt nach der ersten Fed Batch-Phase führte dazu, dass der pO_2 auf seinen Sollwert (25%) sank und die Rührerdrehzahl wieder anstieg. Nach der 30. Prozessstunde der ersten Fermentation ist eine Zunahme in x_{O_2} sowie eine Abnahme in Rührerdrehzahl signifikant, sodass diese beiden nach einiger Zeit ihre Sollwerte erreichten. Dies kann durch den vollständigen Methanol-Verbrauch ausgelöst worden sein. Aufgrund des Substrat-Mangels wuchsen die Zellen eine lange Zeit nicht, bis ihnen am nächsten Tag vor der 50. Prozessstunde manuell Methanol gegeben wurde. Dies führte zu einer senkrechten pO_2 -Abnahme. Dabei sind ein Rührerdrehzahl-Anstieg sowie eine x_{O_2} -Abnahme auffällig, bis das bereits zugegebene Methanol vollständig verbraucht wurde, was durch den pO_2 - und den x_{O_2} -Anstieg sowie die Rührerdrehzahl-Abnahme deutlich wird.

Wie bei der Batch- und der Fed Batch-Phase war auch hier ein exponentieller Anstieg des Rührerdrehzahlverlaufs sowie die Abnahme des x_{O_2} -Verlaufs zu erwarten. Allerdings müssten die beiden Kurvenverläufe langsamer als bei den vorherigen Phasen sein, da *P. pastoris* auf Methanol viel langsamer als auf Glycerin wächst.

Am Anfang der Produktionsphase, bei der ersten Fermentation, sind eine Abnahme und die anschließende Zunahme bei dem OD-Verlauf auffällig. Dies wird durch die Strukturänderung der Zellen verursacht. Die Strukturänderung der Zellen durch das Wachsen auf Methanol wurde in Kapitel 3.1 näher erläutert. Aufgrund der neuen Struktur schwächte die Zellsuspension das eingestrahelte Licht bei der OD-Messung weniger ab als vorher. Die kleinere Abschwächung des eingestrahelten Lichtes bei der OD-Messung führte zur Ermittlung eines kleineren Extinktionswertes.

Durch den ersten Zufütterung-Abbruch bei der zweiten Kultivierung wurde vor der 35. Prozessstunde ein senkrechter Anstieg in pO_2 verursacht. Dies führte wiederum zu einer Rührerdrehzahl-Abnahme sowie einer x_{O_2} -Zunahme im Bioreaktor. Anschließend wurde die Zufütterungspumpe gestartet, wodurch ein Abstieg des pO_2 und des x_{O_2} -Werts sowie ein Anstieg der Rührerdrehzahl ausgelöst wurden. Die Rührerdrehzahl- sowie der x_{O_2} -Kurve verliefen bis kurz nach der 35. Prozessstunde wie erwartet, aber dann blieben ihre Verläufe bis zu dem nächsten pO_2 -Spitze konstant. Ein Grund für diesen stabilen Verlauf könnte die Limitierung der Spurenelemente (PTM4) gewesen sein, wodurch die Zellen nicht mehr wuchsen. Der eventuelle Mangel der Spurenelemente, wurde durch die Rührerdrehzahl- und die x_{O_2} -Verläufe nach dem zweiten bzw. dem dritten pO_2 -Spitze wieder verdeutlicht, bei denen die beiden Verläufe noch schneller ihre konstanten Zustände erreichen.

Durch das Ausschalten der Zufütterungspumpe zu verschiedenen Zeiten bei der dritten Fermentation, wurde gezeigt, dass unter einer Pumprate von $0,005 \text{ l min}^{-1}$ die $p\text{O}_2$ -Spikes 1,26 min nach dem Methanolzufuhr-Stopp auftauchen. Aufgrund einer Methanol-Akkumulation in den ersten Stunden der Produktionsphase ist bei dem ersten Methanolzufuhr-Stopp die Dauer bis zum Auftreten des $p\text{O}_2$ -Spikes wesentlich länger als beim Stoppen danach.

Am Anfang der dritten Fermentation sind ein stark senkrechter $p\text{O}_2$ - und x_{O_2} -Anstieg sowie eine senkrechte Abnahme der Rührerdrehzahl auffällig. Dies kann an der Schaumbildung liegen. Da das Methanol tropfenweise von oben her in den Fermenter zugefüttert wurde, wäre das Zurückhalten des Substrats durch den Schaum möglich, wodurch die Zellen kein Substrat bekämen. Dieser bereits entstandene Substratmangel kann die erwähnten Kurvenverläufe verursachen. Dies wurde allerdings durch die Antischaumzugabe beseitigt.

Einige Stunden nach der Antischaumzugabe, vor der 30. Prozessstunde, stieg der x_{O_2} an und die Rührerdrehzahl nahm ab, was auf einen Substratmangel hinweisen konnte. Eigentlich war in diesem Zeitraum kein Substratmangel zu erwarten, da die Zellen ausreichend Methanol zu Verfügung hatten, was deutlich durch die Dauer zwischen dem ersten Methanolzufuhr-Stopp vor der 30. Prozessstunde und dem dazugehörigen $p\text{O}_2$ -Spitze erkennbar war. Eine Ursache könnte eine kurzzeitige Inaktivität der Zellen durch die bereits entstandene kritische Methanol-Akkumulation sein. Der erste Methanolzufuhr-Stopp führte zum Verbrauch des akkumulierten Methanols und verhinderte das Absterben der Zellen durch eine Methanol-Vergiftung. Nach diesem Verlauf und durch den Substratverbrauch stieg die Rührerdrehzahl wieder an und x_{O_2} nahm wieder ab.

Nach dem ersten $p\text{O}_2$ -Spitze nach der 30. Prozessstunde verliefen die Rührerdrehzahl- und x_{O_2} -Kurve einige Zeit wie erwartet, aber sie erreichten danach, vor der 40. Prozessstunde, einen konstanten Wert. Dies könnte durch eine Spurenelement-Limitierung verursacht worden sein. Die eventuelle Spurenelement-Limitierung ist bei dem stabilen Kurvenverlauf der Rührerdrehzahl und des x_{O_2} nach den nächsten $p\text{O}_2$ -Spikes, die durch das Stoppen der Methanolzufuhr ausgelöst wurden, auch erkennbar.

5.4 Fluoreszenzmessung von GFP-Proben

Eine sehr niedrige GFP-Konzentration war nach der Fluoreszenzmessungsmethode bei den durch das Methanol induzierten *P. pastoris*-Zellen auffällig.

Es kann sein, dass in den verwendeten *P. pastoris*-Zellen das transformierte GFP-Gen zwischen den AOX2-Promotor und die AOX2-Sequenz eingefügt wurde. Es ist aber auch möglich, dass die AOX2-Sequenz durch das transformierte GFP-Gen ersetzt wurde. Der AOX2-Promotor weicht eventuell stark von der dazugehörigen Consensussequenz bei den verwendeten Zellen ab. Aus diesem Grund bindet die RNA-Polymerase nur sehr schwach an den AOX2-Promotor, wodurch die Transkription der AOX2-Sequenz viel schwächer als AOX1-Sequenz durchgeführt wird. Dies kann dazu führen, dass das GFP in sehr geringen Mengen produziert wurde.

Aufgrund einer sehr hohen Toleranz der für diese Arbeit verwendeten *P. pastoris*-Zellen gegenüber den hohen Methanolkonzentrationen, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass das transformierte GFP-Gen zwischen den AOX2-Promotor und die AOX2-Sequenz eingefügt geworden ist. Grund dafür ist, dass in diesem Fall sowohl die Alkoholoxidase-1 (AOX1) als auch Alkoholoxidase-2 (AOX2) produziert werden, wodurch eine große Menge an Alkoholoxidasen gebildet wurde.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine reproduzierbare dreistufige Kultivierung in einem Laborfermenter etabliert werden. Als Mikroorganismus wurde ein GFP produzierender *Pichia pastoris*-Stamm eingesetzt. Zur Herstellung der rekombinanten Proteine durch *P. pastoris* kommt typischerweise ein dreistufiger Prozess zum Einsatz. Dieser besteht aus einer wachstumsunlimitierten Batch-Phase und einer wachstumslimitierten Fed Batch-Phase auf Glycerin sowie einer Produktionsphase auf Methanol. Die Durchführung aller Fermentationsprozesse wurde mit dem Datenaufzeichnungs- und Überwachungssystem MFCS/win gesteuert. Durch die Verbindung mit einem anderen Programmmodul, MFCS-Tool, konnte das Prozessführungssystem MFCS/win einige Vorgänge wie die Erkennung des Batch-Endes, die Durchführung der Fed Batch- und der Produktionsphase steuern.

Um die Produktion der Proteine in dieser Arbeit zu beobachten, wurde GFP als Zielprodukt betrachtet. Die Gene dieses Proteins waren in einem *P. pastoris* KM71H-Stamm transformiert und für die Durchführung einer dreistufigen Kultivierung bereitgestellt. Da die erforderlichen Daten über diese Zellen fehlten, wurde vor den dreistufigen Fermentationen Schüttelkolbenversuche durchgeführt. Hierdurch konnten eine maximale Wachstumsrate von 25 h^{-1} , ein benötigtes Kryovolumen von $1500 \mu\text{l}$ pro 100 ml Vorkultur im 1000 ml -Schikanekolben für das Erreichen einer gewünschten Ziel-OD von $3 - 5 \text{ AU}$ vor Animpfen des Fermenters und eine Dauer der Vorkulturrückubation von 20 h ermittelt werden.

Die verwendeten *Pichia*-Zellen waren nicht in der Lage das Zielprotein in einer Menge zu produzieren, die ohne Fluoreszenzmessungsmethoden nachgewiesen werden konnte. Das Einfügen des transformierten GFP-Gens in eine nicht geeignete Stelle der AOX-Sequenz in den verwendeten *Pichia*-Zellen könnte eine Ursache für die niedrige GFP-Produktion sein.

Insgesamt wurden drei dreistufige Kultivierungen mit den vorhandenen rekombinanten *P. pastoris*-Zellen im BIOSTAT® Aplus durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Kultivierungen zu überprüfen.

Die ermittelten Daten während der Batch-Phase stellen eine reproduzierbare Batch-Phase dar. Bei der Fed Batch- und der Produktionsphase verliefen die Variablenprozesse nicht wie erwartet.

Aufgrund des Einsatzes einer zu starken Pumpe in den ersten zwei Fermentationen, wurde die Substratkonzentration dessen Fed Batch-Medium verringert, damit die Zielsubstratkonzentration pro Zeit in den Bioreaktor zugeführt wird. Bei der zweiten Fed Batch-Phase tauch-

te ein weiteres Problem auf, und zwar die Bildung sehr starker Schäume, die nicht durch eine automatische Antischaummittelzugabe vernichtet wurden. Diese löste einige Prozessstörungen auf, sodass sich anhand der ermittelten Daten während der zweiten Fed Batch-Phase keine besondere Aussage treffen lässt. Trotz der Verwendung einer anderen Pumpe bei der dritten Fermentation wurde das Pumpprofil am Anfang der dritten Fed Batch-Phase nicht exponentiell, sondern konstant betrieben. Eine eventuelle Software-Störung bei dem Programmmodul MFCS-Tool könnte dies verursacht haben.

Durch zwei manuelle Methanol-Zugaben wurden die Zellen in der ersten Produktionsphase zugefüttert beziehungsweise induziert. Diesem gegenüber war eine schnelle Methanol-Aufnahme von den Zellen auffällig. Es wurde versucht, die letzten zwei Produktionsphasen mit einem exponentiellen Pumpprofil zu betreiben. Dies konnte aber wegen einer eventuellen Störung beim MFCS-Tool nicht gelingen, so dass die Zellen mit einem konstanten Pumpprofil zugefüttert wurden.

Die Adaption der Zellen an das Methanol wurde bei der dritten Produktionsphase zu verschiedenen Zeitpunkten durch das Ausschalten der Pumpe bis zum Auftauchen eines pO_2 -Spikes überprüft. Die ermittelte Dauer zwischen dem Pumpenausschalten und dem Auftauchen eines pO_2 -Spikes betrug 1,26 min.

Nur bei einer in der Zielsetzung genannten Phase zur Reproduktion einer dreistufigen Kultivierung in einem Laborfermenter wurde das erwartete Ziel erreicht, und zwar bei der Batch Phase. Aufgrund der Probleme bei den verwendeten Pumpen tragen die Zielvorstellungen auch bei der Bestimmung des Substratverbrauchtes für den ganzen Prozess nicht bei.

7 Ausblick

Es sollte für die zukünftigen Versuche, in denen GFP das Zielprodukt ist, stärker GFP-produzierende Zellen verwendet werden oder es sollte das GFP-Gen nochmals in die für diese Arbeit verwendeten Zellen transformiert werden.

Für die zukünftigen Versuche sollte vor allem eine automatische Batch-End-Erkennung durch das Programmmodul MFCS-Tool sichergestellt werden. Außerdem muss die eventuelle Software-Störung in der Pumpenprofil-Einstellung in diesem Programmmodul verhindert werden, damit die Pumpen zwischendurch nicht von alleine stoppen und ein exponentieller Pumpenverlauf möglich wird.

Weiterhin ist darauf zu achten, vor dem Anfang der Fed Batch- bzw. der Produktionsphase die dazugehörigen Medien bis zu ihren Eingängen am Bioreaktor zu pumpen. Dies gilt auch für die Korrekturmittel. Es ist zu empfehlen, die Zugabe des Fed Batch-Mediums sowie des Indikators für die Produktionsphase nicht von Oben, sondern von Unten und durch das Eintauchrohr zu betreiben. Hierdurch kann das Zurückhalten des Mediums durch die gebildeten Schäume verhindert werden.

Der Ersatz der 25%igen Ammoniak durch 12,5%ige Ammoniak als Base kann die pH-Regelung beschleunigen und zu einem niedrigeren Säure-Verbrauch führen.

Der Einsatz der Spurenelemente im Fed Batch-Medium sollte auf keinen Fall vernachlässigt werden. Abhängig von der Dauer der Produktionsphase sollten die Spurenelemente auch in der Produktionsphase zugegeben werden.

Der Einsatz einer Methanol-Sonde im Bioreaktor wäre von Vorteil. Hierdurch kann die Methanolkonzentration zu jeder Zeit in der Produktionsphase kontrolliert und eine kritische Methanol-Akkumulation verhindert werden. Hiermit kann eine bessere Einstellung der exponentiellen Zufütterung in der Produktionsphase vertreten und den Methanol-Verbrauch für eine akzeptable Produktbildung bestimmt werden, obwohl die Produktkonzentration abhängig von der Zielsetzung später durch die genaueren Messmethoden vermittelt werden soll.

Im günstigsten Fall sollte bei dem Batch-Medium-Ansatz auf das Volumenverhältnis 1:10 (Inokulum/Batch-Medium) geachtet werden. Dies verursacht eine höhere Zellkonzentration am Ende der Batch-Phase und löst bessere Kurvenverläufe innerhalb dieser Phase aus. Allerdings hängt dieses Verhältnis von der vorgesehenen Dauer der Batch-Phase ab. Falls möglich, sollte das Volumen so gewählt werden, dass alle drei 6-Platten-Scheinenrührer in das

Medium eintauchen, wodurch ein besserer k_La -Wert erreicht werden kann. Darüber hinaus kann die Entstehung der Schäume, die aufgrund des Rührens auf der Medium-Oberfläche gebildet werden, verhindert werden.

8 Literaturverzeichnis

A. Richmond, Todd et al.: Engineered Metal Binding Sites on Green Fluorescence Protein, in: Biochem. And Biophys. Res. Commun., (2000) 268, S. 462 – 465.

A. Sanders, Ernst: Skript für Fermentations- und Bioreaktortechnik, Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg, 2012.

B. Cubitt, Andrew et al.: Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins, in: Trends Biochem. Sci., (1995) 20, S. 448–455.

Baron, Elena; Wani, Sascha: Induktionsfähigkeit von *E. coli* K12 M15 im repeated fed-batch Prozess mit Bestimmung der Wachstumsparameter, Studienprojekt, Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg, 2015.

Betriebsanleitung Biostat® A, 85037-543-36, Sartorius Stedim biotech

Betriebshandbuch für Laborfermentersystem BIOSTAT® B, BAD_BIOSTAT®B Rev. 3.0 – 0404 SW 4.1, Sartorius.

C. Hass, Volker; Pörtner, Ralf: Praxis der Bioprozesstechnik, Heidelberg (Spektrum), 2. Auflage, 2011.

Carnarius, Christian: Funktionelle Rekonstitution von Connexonen in artifizielle Membranen Expression, Reinigung und Charakterisierung von Connexin 43, Dissertation, Georg – August – Universität Göttingen, 2012.

Chalfie, Martin et al.: Green fluorescent Protein as a marker for gene expression, in: Science, (1994) 263, S. 502 – 805.

Chalfie, Martin; R. Kain, Steven (Hrsg.): Green Fluorescent Protein Properties, Applications and Protocols, (WILEY), 1998.

Clark, LC et al. „Clark-Elektrode“, 1953, unter:
<http://www.chemie.de/lexikon/Clark-Elektrode.html/> (abgerufen am 20. Apr. 2017)

Cornelissen, Gesine: Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*, Dissertation, Universität Hannover, 2004.

Demmer, Jan; Kleindienst, Birte: Site acceptance Test eines BIOSTAT® Aplus Prototypen, Studienprojekt, Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg, 2014.

Dietz, Hendrik: Mechanik des Grün Fluoreszierenden Proteins, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.

Endress + Hauser Management AG „Memosens – die wegweisende Sensortechnologie“, unter:
<http://www.de.endress.com/de/messgeraete-fuer-die-prozesstechnik/Messtechnik->

und-Technologien-f%C3%BC-die-industrielle-Kommunikation/memosens-digitale-sensor-technologie/ (abgerufen am 20. Apr. 2017)

Gruber, Wilhelm: Konstruktion und Aufbau eines Bioreaktors sowie die prozess- und regelungstechnische Umsetzung, Diplomarbeit, Fachhochschule Ulm, 2005.

Hering, Ekbert; Schönfelder, Gert (Hrsg.): Sensoren in Wissenschaft und Technik, Berlin (Viehweg + Teubner), 2012.

Janson, Monika, Rothhämel, Sophie: Gentechnische Methoden, Heidelberg (Spektrum), 5. Auflage, 2012.

Kratz, Ludwig „Glaselektrode“, 1950, unter:
<http://www.chemie.de/lexikon/Glaselektrode.html/> (abgerufen am 20. Apr. 2017)

Li, Y. et al.: Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography, in: J. Chromatogr A, (2001) 909, 183 – 190.

Lucks, Janko: Optimierung der Prozessbedingungen mittels adaptiver Regelung zur Stabilisierung eines potentiellen Malariaimpfstoffes in Fed-Batch-Prozessen mit *Pichia pastoris*, Masterarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg, 2016.

M. Cregg, James et al.: Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, in: Mol. and Cell. Biol., (1989) 9, S. 1316 - 1323.

Martens, Sanja: Analyse und Synthese von zyklischen Herstellungsprozessen artifizierender Diversity Covering (DiCo) Malariavakzinkandidaten, Dissertation, Gottfried Wilhelm-Leibniz-Universität Hannover, 2014.

Mechenbier, Dino „ZrO₂-Messsonden Restsauerstoffmessung in Rauchgasen“, 2010, unter:
http://www.fernuni-hagen.de/imperia/md/content/fakultaetfuermathematikundinformatik/agjob/vortrag_mechenbier.pdf/ (abgerufen am 20. Apr. 2017)

MFCS/win 3.0 Benutzerhandbuch, MFCSUSER.DOC, Sartorius Stedim Systems GmbH, 2012.

Morise, H. et al.: Intermolecular Energy Transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*, in: Biochemistry, (1974) 13, S. 2656–2662.

Munk, Katharina et al.: Taschenbuch Biologie Mikrobiologie, Stuttgart (Thieme), 2008.

Ormö, Mats et al.: Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, in: Science, (1996) 273, S. 1392 – 1395.

R. Higgins, David; M. Cregg, James: *Pichia* Protocols, Totowa (Humana Press), 1998, 103: 121 – 147.

Rehm, H. J.: Moderne mikrobiologisch-technische Fermentationen und ihre Auswirkungen auf verfahrenstechnische Entwicklungen, in: Chemie-Ing. –Techn, (1970) 9/10, S. 580 – 589.

Rocnefahrt, K. W.: Die pH-Messung mit Glaselektroden im Molkereibetrieb, in: FETTE. SEIFEN. ANSTRICHMITTEL, (1964) 4, S. 284 – 290.

Shimomura, Osamu; H. Johnson, Frank; Saiga, Yo: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*, in: J. Cell. Comp. Physiol., (1962) 59, S. 223 – 239.

Spektrum.de „Glaselektrode“, 1998, unter:
<http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/glaselektrode/3722/> (abgerufen am 20. Apr. 2017)

Spektrum.de „mikrobielles Wachstum“, 1999, unter:
<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/mikrobielles-wachstum/42936/> (abgerufen am 1. Mai 2017)

T. Madigan, Michael et al.: Brock Mikrobiologie, Deutschland (PEARSON), 13. Aktualisierte Auflage, 2013.

Ward, W. W.: Spectrophotometric Identity of the Energy-Transfer Chromophores in *Renilla* and *Aequorea* Green-Fluorescent Proteins, in: Photochem. Photobiol., (1980) 31, S. 611 – 615.

Ward, W. W.; Cormier, M. J.: An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green fluorescent protein, in: J. Biol Chem., (1979) 254, S. 781 – 788.

Wink, Michael: Molekulare Biotechnologie, Weinheim (WILEY-VCH), 2. aktualisierte Auflage, 2011.

Winkler, Kathrin: Ultraschnelle, lichtinduzierte Primärprozesse im elektronisch angeregten Zustand des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP), Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2002.

Yang, Fan; G. Moss, Larry; N. Phillips, George: The molecular structure of green fluorescent protein, in: Nat. Biotechnol., (1996) 14, S. 1246–1251.

Zimmer, Marc: Green Fluorescent Protein (GFP) Applications, Structure, and Related Photo-physical Behavior, in: Chem. Rev., (2002) 102, S. 759 – 781.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Pichia pastoris</i>	4
Abb. 2: Energietransfer von Aequorin auf GFP und die weitere Fluoreszenzemission von GFP.	5
Abb. 3: Kristallstruktur des GFP	6
Abb. 4: Prinzipieller Prozessverlauf zur Herstellung rekombinanter Proteine.	7
Abb. 5: MFCS/win Shell	16
Abb. 6: Batch Display von MFCS/win	17
Abb. 7: Die fünf verwendete Operationen dieser Arbeit.....	18
Abb. 8: Definierte Phasen für die Init-Operation	19
Abb. 9: Definierte Phasen für die Batch-Operation	20
Abb. 10: Einstellung eines Umschalters in MFCS-Tool für die Batch-End-Erkennung.....	21
Abb. 11: Definierte Phasen für die Fed Batch-Operation	22
Abb. 12: Definierte Phasen für die Operation Produktion.....	23
Abb. 13: Definierte Phasen für die Operation Ende	24
Abb. 14: Wachstumskurve der Kryokultur in erstem Schikanekolben.	33
Abb. 15: Wachstumskurve der Kryokultur in zweitem Schikanekolben	34
Abb. 16: Wachstumskurve der Kryokultur in drittem Schikanekolben.....	34
Abb. 17: Batch-Phase der ersten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	36
Abb. 18: Batch-Phase der zweiten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	36
Abb. 19: Batch-Phase der dritten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	36
Abb. 20: Fed Batch-Phase der ersten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	38
Abb. 21: Fed Batch-Phase der zweiten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	38
Abb. 22: Fed Batch-Phase der dritten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	38
Abb. 23: Produktionsphase der ersten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	41
Abb. 24: Produktionsphase der zweiten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	41
Abb. 25: Produktionsphase der dritten Kultivierung <i>P. pastoris</i>	41

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Medienzusammensetzung	29
Tab. 2: PTM4.....	55
Tab. 3: Biotinvorlage	55
Tab. 4: Verwendete Geräte	56
Tab. 5: Verwendete Chemikalien	57

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Unterschrift der Verfasserin / des Verfssers

A Anhang

A.1 Stocklösungen

Tab. 2: PTM4

Komponente	Konzentration	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2,00	g l^{-1}
NaI	0,08	g l^{-1}
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,00	g l^{-1}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,20	g l^{-1}
H_3BO_3	0,02	g l^{-1}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50	g l^{-1}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,50	g l^{-1}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7,00	g l^{-1}
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,00	g l^{-1}
H_2SO_4	1,00	ml l^{-1}

Tab. 3: Biotinvorlage

Komponente	Konzentration	
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0,20	g l^{-1}

A.2 Geräteliste

Tab. 4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Abgasanalysator BlueInOne FERM	BlueSens gas sensor GmbH
Abluftkühler	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Analysenwaage BA110S	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH
Bioreaktor	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Brut- und Schüttelschrank 3032	GFL
1. Externe Schlauch-Pumpe (Typ: 120U)	Watson Marlow
2. Externe Schlauch-Pumpe (Typ: Reglo Digital)	Ismatec
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Laborkühlschrank	Blomberg
Labortiefkühlschrank (-20 °C)	Siemens
Labortiefkühlschrank (-80 °C)	Heraeus
Lichtmikroskop	Leica
Motor	ebmpapst
Photometer Genesys 20	Thermo Scientific
pH-Meter	Sartorius
pH-Sonde im Fermenter	Endress + Hauser
Platten-Reader Tecan Genios	Tecan
pO ₂ -Sonde im Fermenter	Endress + Hauser
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo electron corporation
Temperiermanschette HEWID (SN. 98437)	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Trockenschrank vacuotherm	Heraeus Instruments
Umlaufkühler	Sartorius Stedim Biotec GmbH
UV-Lampe	Eurolite Germany
Vortexmischer	IKA Works INC
Waage CP6201	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Waage ED4202S	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Waage FB12 CCE-S	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Waage LP 34	Sartorius Stedim Biotec GmbH
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

A.3 Chemikalienliste

Tab. 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Chargen-/Lot-Nummer
Ammoniak-Lsg 25%	Carl Roth	205228370
CaSO ₄ ·2H ₂ O	Carl Roth	410152769
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Riedel-de Haën	Keine Angabe
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Carl Roth	349219664
D(+)-Biotin 98,5%	Carl Roth	314187556
Ethanol >99% vergällt	Carl Roth	4862522637
Fe(II)SO ₄ ·7H ₂ O	Carl Roth	01782949
Glycerin 99,5%	Carl Roth	336248165
H ₃ BO ₃	Riedel-de Haën	71910
H ₃ PO ₄ 85%	Carl Roth	395228526
H ₂ SO ₄ 95-97%	SIGMA-Aldrich	SZBB2690V
KH ₂ PO ₄	Carl Roth	246244041
K ₂ SO ₄	Carl Roth	106238242
Methanol 100%	Carl Roth	911721
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Carl Roth	394218355
MnSO ₄ ·2H ₂ O	Riedel-de Haën	90870
Na ₃ -citrate·2H ₂ O	Carl Roth	351168925
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Riedel-de Haën	51010
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Carl Roth	027251023
(NH ₄) ₂ SO ₄	Carl Roth	492194285
Pufferlösung pH = 4,00 +/- 0,02 (bei 20 °C)	Carl Roth	1622460
Pufferlösung pH = 7,00 +/- 0,02 (bei 20 °C)	Carl Roth	1731602
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Riedel-de Haën	3020