



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Hamburg University of Applied Sciences

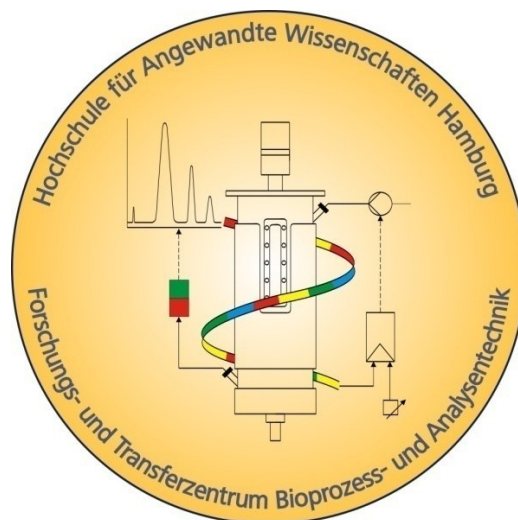
# Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

---

## Etablierung einer Kultivierung von *Pichia pastoris* im Laborfermenter zur Expression von eGFP

---



Christina Kirschnick  
12. November 2018

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)
2. Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Noll (HAW Hamburg)



## **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 Verfassers

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysetechnik, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen angefertigt.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Bereitstellung des interessanten Themas und Unterstützung während dieser Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Noll bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die hilfreichen Anregungen bei Rückfragen.

Ein besonderer Dank geht an Janet Hirsch, die mir bei der Durchführung der Arbeit mit Engagement jegliche Fragen beantwortet und mich mit hilfreichen Anregungen unterstützt hat.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Herrn Dipl. -Ing. Ulrich Scheffler und Dipl.-Ing. Hans-Peter Bertelsen bedanken, die mir während der Durchführung der Arbeiten ebenfalls stets hilfreich zur Seite standen.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei Florian Schiffler für seine durchgehend bereitwillige Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>I</b>
<b>Vorwort</b>	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
3.1 Die Hefe <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	3
3.1.1 Methanol Metabolismus . . . . .	3
3.1.2 Expressionssystem . . . . .	5
3.2 eGFP . . . . .	5
3.3 Kultivierungsstrategie . . . . .	7
3.3.1 Batchphase . . . . .	8
3.3.2 Fed-Batchphase . . . . .	8
3.3.3 Produktions-Batchphase . . . . .	9
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>10</b>
4.1 Aufbau des Bioreaktors BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus . . . . .	10
4.1.1 Grundeinheit (DCU) . . . . .	11
4.1.2 Instrumentierung und Ausrüstung . . . . .	11
4.2 Prozessleitsystem MFCS/win . . . . .	17
4.3 <i>Pichia pastoris</i> Stamm <i>BSYBG11</i> . . . . .	20
4.4 Vorversuche . . . . .	22
4.5 Berechnungen der Kultivierungsphasen . . . . .	23
4.5.1 Batchphase . . . . .	23
4.5.2 Fed-Batchphase . . . . .	25
4.5.3 Produktionsphase . . . . .	26
4.6 Offline-Analytik . . . . .	27
	<b>III</b>

4.6.1	Bestimmung der optischen Dichte . . . . .	27
4.6.2	Bestimmung der Biotrockenmasse . . . . .	27
4.6.3	Bestimmung der Fluoreszenz . . . . .	28
4.6.4	SDS-PAGE . . . . .	28
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>31</b>
5.1	Vorversuche . . . . .	31
5.2	Klon 5 . . . . .	32
5.2.1	Kultivierung . . . . .	32
5.2.2	Floureszenzmessung . . . . .	35
5.2.3	SDS-PAGE . . . . .	37
5.3	Klon 3 . . . . .	38
5.3.1	Kultivierung . . . . .	38
5.3.2	Floureszenzmessung . . . . .	41
5.3.3	SDS-PAGE . . . . .	42
5.4	Klon 1 . . . . .	43
5.4.1	Kultivierung . . . . .	43
5.4.2	Floureszenzmessung . . . . .	46
5.4.3	SDS-PAGE . . . . .	47
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>50</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>51</b>
	<b>Nomenklatur</b>	<b>52</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>57</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>59</b>
	<b>Geräteliste</b>	<b>60</b>

<b>Chemikalienliste</b>	<b>62</b>
<b>Anhang</b>	<b>63</b>

# 1 Einleitung

Die Herstellung rekombinanter Proteine mithilfe von Mikroorganismen gewinnt zunehmend an Bedeutung. [1] Dadurch ist in der modernen Biotechnologie die Gentechnik fester Bestandteil geworden. Ziel ist es, ein wirtschaftlich interessantes Produkt zu entwickeln, welches vielseitig eingesetzt werden kann. [2]

Zielführend hat sich in den letzten Jahren die Hefe *Pichia pastoris*, aufgrund eines starken und gut regulierbaren Promotors, zu einem sehr erfolgreichen Expressionssystem für die Produktion heterologer Proteine entwickelt. [3] Dies führte zu einer Etablierung des Expressionssystems besonders für biopharmazeutische und industrielle Enzyme. Zur Maximierung und Optimierung der Produktion rekombinanter Produkte fokussieren sich aktuelle Forschungen unter anderem auf das Design des Expressionsvektors, die Optimierung der Anzahl an Genkopien, die Co-Expression sekretorischer Proteine und unterschiedliche Kultivierungsstrategien. [4]

Die Prozessentwicklung beschäftigt sich, unter dem Einsatz von Fermentern, mit der Entwicklung von optimalen Kultivierungsbedingungen für das Zellwachstum und die Produktbildung. Vordergründig ist die Ermittlung der passenden Zufuhr an Substrat unter kostengünstigen Bedingungen. Besonders geeignet dafür ist die Hochzelldichtekultivierung. Sie dient der höchstmöglichen Herstellung an Produktmenge in einem definierten Zeitraum und Volumen. Eine Zelldichte von 50 g/L ist Voraussetzung für die Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine. Diese Art der Kultivierung wurde zu Beginn für Hefen, zur Produktion von Ethanol, Einzelzellprotein und Zellmasse, erarbeitet. [5] Für *Pichia pastoris* wird daher eine dreistufige Kultivierungsstrategie angewendet. Die drei Stufen beinhalten eine Phase der Zellanzucht, der Vorbereitung auf die Induktion und zuletzt die Phase der Expression des heterologen Proteins.



## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Bachelorarbeit war die Etablierung einer Kultivierung eines klonierten Stammes der Hefe *Pichia pastoris* zur Expression des Proteins eGFP. Hierfür sollte zunächst anhand eines Klons eine robuste Kultivierungsstrategie erarbeitet werden und anschließend mit zwei weiteren Klonen Vergleichskultivierungen durchgeführt werden.

Um eine robuste Kultivierung aufzustellen, sollte sich an der Hochzelldichtekultivierung orientiert werden, sodass bei einer hohen Zelldichte in die sogenannte Expressionsphase, oder auch Produktionsphase genannt, übergegangen werden kann. In der Hochzelldichtekultivierung wird von einer unlimitierten Batchphase in eine substatlimitierte Fed-Batchphase gewechselt. Die Expressionsphase sollte mittels eines Induktors eingeleitet werden, welcher gleichermaßen als Substrat fungiert. Für die Prozessanalyse war der Reaktor mit mehreren Online-Messsystemen ausgestattet und zwei Offline-Analysetechniken waren zu erfassen. Für die Evaluation der Produktausbeute, zur Beurteilung der Produktivität der einzelnen Klone, sollten zwei analytische Methoden angewendet werden.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Die Hefe *Pichia pastoris*

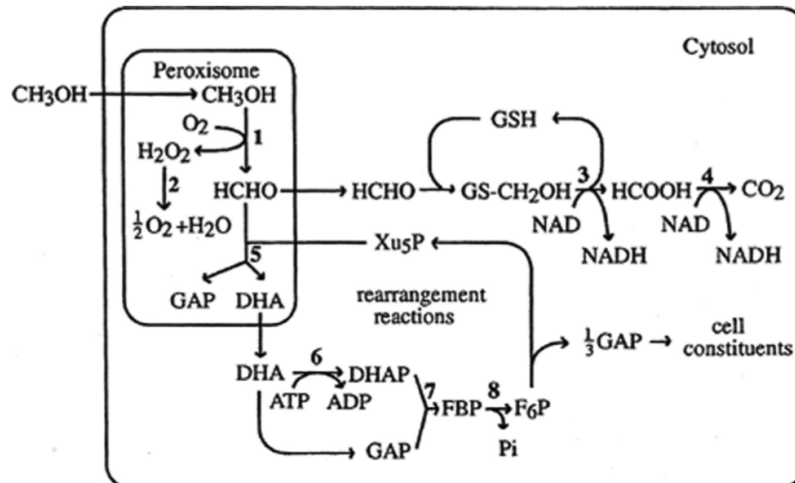
Der Mikroorganismus *Pichia pastoris* ist eine fakultativ methylothrophe Hefe, welche Glycerin, Glucose und Methanol verstoffwechseln kann. [2] Häufig werden Glycerin und Glucose als Kohlenstoffquelle genutzt, wobei Glycerin relativ schnell, mit hoher Biomassenausbeute, verarbeitet wird. Daher eignet sich Glycerin als Substrat besonders für das Erreichen hoher Zelldichten bei *Pichia pastoris*. [6]

*Pichia pastoris* ist in der Lage eine Vielfalt an heterologen Proteinen zu produzieren und hat sich als ein erfolgreiches Expressionssystem in der Biotechnologie etabliert. Dies ist auf zahlreiche Vorteile des Systems zurückzuführen. Im Wesentlichen zeichnet es sich durch den einfachen methodischen Aufwand zur genetischen Manipulation, die Fähigkeit Fremdprotein in hohen Mengen intrazelluläre sowie extrazellulär zu produzieren und effiziente eukaryotische posttranslationale Modifikationen vornehmen zu können aus. Zudem besitzt *Pichia pastoris* einen starken gut regulierbaren Promotor, welcher durch Methanol induziert wird und es kommt nur zu einer geringe Sekretion endogener Proteine während der Produktion des rekombinanten Proteins. [7] [6]

#### 3.1.1 Methanol Metabolismus

Als methylothropher Organismus ist *Pichia pastoris* fähig auf Basis von Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Grund hierfür ist die Überexpression bestimmter Gene, welche die Methanol Assimilation und Dissimilation codieren. [6] Diese zwei Gene, AOX1 und AOX2, werden nur bei Anwesenheit von Methanol induziert und codieren die Enzyme Alkoholoxidase1 und 2 (Aox1 und Aox2). Die Alkoholoxidasen katalysiert die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und cytotoxischem Wasserstoffperoxid. Das Enzym Katalase baut anschließend das Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser ab. Beide Oxidationsprozesse finden in den Peroxisomen der Zelle statt. Das Formaldehyd verlässt das Peroxisom und wird von zwei cytoplasmatischen Dehydrogenasen weiter zu Formiat und Kohlenstoffdioxid oxidiert. Zwei Reaktionen, welche die Energie für das Zellwachstum auf Methanol liefern. Verbleibendes Formaldehyd in den Pero-

xisomen wird über einen zyklischen Stoffwechselweg (Xu5P-Zyklus) zu zellulären Bestandteilen verarbeitet. [3] [6]



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Abbaus von Methanol in *Pichia pastoris*. 1 Alkoholoxidase; 2 Katalase; 3 Formaldehyd-Dehydrogenase; 4 Formiat-Dehydrogenase 5 Dihydroxyaceton-Synthase; 6 Dihydroxyaceton-Kinase; 7 Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase; 8 Fructose-1,6-bisphosphatase [3]

Das AOX1 Gen ist verantwortlich für den Großteil der Alkoholoxidaseaktivität. Die Expression des Gens wird auf Ebene der Transkription kontrolliert. Der starke AOX1 Promotor wird nicht durch die Abwesenheit der Kohlenstoffquelle, sondern nur durch das Vorhandensein von Methanol induziert. [3] In Bezug auf die Fähigkeit Methanol zu verarbeiten sind drei Phänotypen von *Pichia pastoris* zu unterscheiden. Der Wildtyp ( $Mut^+$ , *Methanol utilization plus phenotype*) besitzt beide funktionierende AOX Gene und wächst auf Methanol. Mutanten mit inaktiviertem oder entfernten AOX1 Gen ( $Mut^s$ , *Methanol utilization slow phenotype*) benötigen geringere Mengen an Methanol und wachsen langsamer, da für den Abbau des Methanols nur noch das schwächere AOX2 Gen zur Verfügung steht. Des Weiteren existieren Mutanten, welchen beide AOX Gene fehlen ( $Mut^-$ , *Methanol utilization minus phenotype*) und nicht fähig sind Methanol als Substrat zu verwenden. Es verbleibt ihnen dennoch die Fähigkeit des AOX1 Promotors, Methanol

als Induktor für eine hohe Expression von Fremdproteinen zu nutzen. [3] [4]

### 3.1.2 Expressionssystem

Zur Expression eines rekombinanten Proteins werden bei *Pichia pastoris* drei grundlegende Prozessschritte benötigt. Zuerst wird das relevante Gen in den Expressionsvektor inseriert. Anschließend folgt die Einführung des Expressionsvektors in das *Pichia pastoris* Genom und die Kontrolle der potentiellen Expressionsstämme über eine neu gewonnene Antibiotikaresistenz.

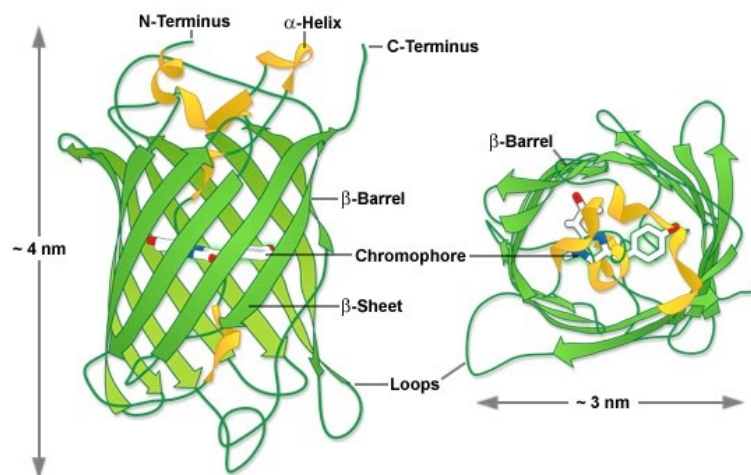
Als molekulare Methoden zur gentechnischen Manipulation von *Pichia pastoris* werden klassische Verfahren wie die Elektroporation, die Sphäroplasten-Transformation oder Ganzzellmodelle verwendet. *Pichia pastoris* zeigt zudem eine Neigung zur homologen Rekombination zwischen genomischer und künstlich eingeführter DNA. Gerade die Spaltung des *Pichia pastoris* Vektors in einer Sequenz, welche mit dem Wirtsgenom geteilt wird, regt die homologe Rekombination an und fördert wirksam die Integration des Vektors in den bestimmten Genort. [3]

## 3.2 eGFP

Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) ist in vielen Organismen zu finden. Entdeckt wurde es erstmals bei der Untersuchung der Biolumineszenz einer Qualle der Gattung *Aequorea victoria* von Osamu Shimomura als ein Begleitprotein zum chemilumineszenten Protein Aequorin. [8] 1955 wurde zum ersten Mal berichtet, dass *Aequorea* unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht grün fluoresziert. [9] GFP ist mittlerweile ein häufig genutzter biologischer Marker in der molekularen Biologie, Medizin und Zellbiologie. Die starke Verwendung beruht auf der Stabilität des Proteins ohne des Bedarfs eines Co-Faktors oder Substrats. Dazu scheint die Fusionierung von GFP an ein anderes Protein, die Funktion oder den Ort des Proteins nicht zu beeinflussen. [9]

Die zylindrische Kristallstruktur des GFP Wildtyps besteht aus einer  $\alpha$ -Helix und 11  $\beta$ -Faltblättern, welche zusammen eine b-Fass-Struktur bilden. Das Chromophor sitzt im Kern der b-Fass-Struktur, wo es geschützt ist vor der Fluoreszenzlöschung durch Wasserdipole, paramagnetischem Sauerstoff oder der Cis-Trans-Isomerisierung. Die Bildung des Chromophors, ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)imidazolidin-

5-on, beruht auf der kovalenten Umlagerung benachbarter Aminosäuren, bei Anwesenheit von Sauerstoff. [10] Die Primärsequenz von GFP besteht aus 238 Aminosäuren, wovon die Tripeptidsequenz, Serin<sup>65</sup>-Tyrosin<sup>66</sup>-Glycin<sup>67</sup>, an der Faltung beteiligt ist. Ein nukleophiler Angriff der Amid-Gruppe des Gly<sup>67</sup> und eine anschließende Dehydrierung führen zu Bildung des Imidazolinon. Die Oxidation durch Sauerstoff der  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung des Tyr<sup>66</sup>, hat die Konjugation des aromatischen Rests mit dem Imidazolinon-Ring zur Folge. [11] [10]

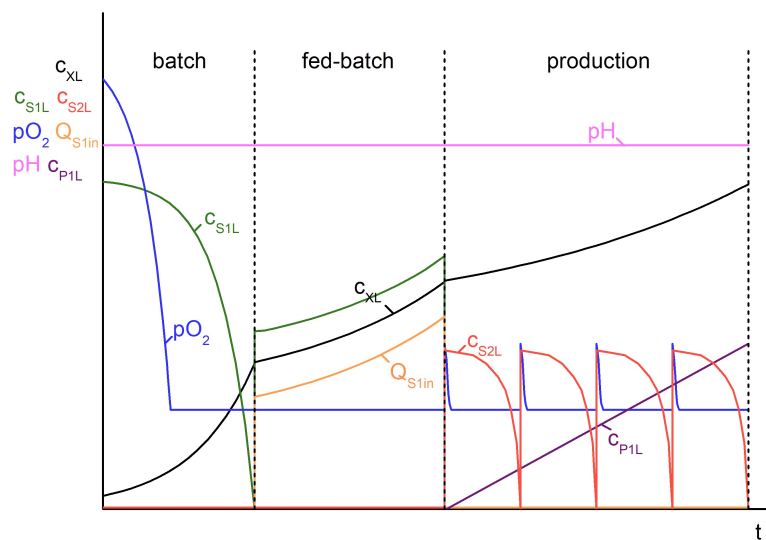


**Abbildung 2:** Eine dreidimensionale Darstellung der Kristallstruktur von GFP. Gezeigt werden die 11  $\beta$ -Faltblätter in der tertiären  $\beta$ -Fass-Struktur, durch dessen zylindrischen Hohlraum eine  $\alpha$ -Helix Struktur führt, welche das Chromophor trägt. [11]

Der ursprüngliche Wildtyp von GFP hat einige Nachteile, die seine Wirksamkeit als ein Werkzeug für die Zellbildgebung minimieren. Durch Protein-Engineering wurden diese Nachteile teilweise behoben. Eine der ersten und wichtigsten dieser modifizierten Versionen des GFP ist das „erweiterte“/*enhanced* GFP (eGFP). Es weist eine höhere Faltungseffizienz auf, wodurch, aufgrund eines höheren Anteils an korrekt gefaltetem Protein, eine höhere Fluoreszenz erreicht werden kann. Dazu hat es einen einzigen Anregungspeak bei 490 nm. Die Kristallstruktur des eGFP weist ebenfalls die traditionelle  $\beta$ -Fass-Struktur, mit dem Chromophor im Kern, auf. [10]

### 3.3 Kultivierungsstrategie

Der prinzipielle Verlauf der geplanten Kultivierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 3 zu sehen. Es handelt sich um einen dreistufigen Kultivierungsprozess, welcher typisch für die heterologe Proteinproduktion in *Pichia pastoris* ist. Die Kultivierung beginnt mit einer Batchphase und geht anschließend über in die Fed-Batchphase, gefolgt von der Produktionsphase. [4] Das in einer Adaptionsphase auftretende verzögerte Wachstum der Zellkultur, zu Beginn einer Kultivierung, wird durch eine Vorkultur im Schüttelkolben bestmöglich umgangen.



**Abbildung 3:** Dargestellt wird der prinzipielle Verlauf einer dreiphasigen Fermentation, welcher mit der Grafiksoftware Origin erstellt wurde. [12]

$pO_2$ :	relativer Sauerstoffpartialdruck	[%]
pH:	pH-Wert	[–]
$c_{XL}$ :	Dichte der Biotrockenmasse	[g/L]
$c_{S1L}$ :	Zellanzucht-Substratkonzentration	[g/L]
$c_{S2L}$ :	Induktor-Substratkonzentration	[g/L]
$c_{P1L}$ :	Produktkonzentration	[g/L]
$Q_{S1in}$ :	Substrateintragsrate	[g/L·h]

### 3.3.1 Batchphase

Zu Beginn der Batchphase zeigt sich ein leicht verzögertes Wachstum, welches auf den Wechsel vom Schüttelkolben in den Bioreaktor und somit veränderten Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist. Während der Batchphase ist das Substrat im Überschuss vorhanden und es herrscht unlimitiertes exponentielles Wachstum bis eine essentielle Komponente im Medium verbraucht ist. Die Zellen erreichen ihre maximale Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ) und es können weitere Charakteristika des Mikroorganismus direkt bestimmt werden. Als erste Substratkomponente (S1) wird Glycerin, aufgrund der in 3.1 genannten Vorteile, verwendet. Des Weiteren findet in dieser Phase kein Austausch von Flüssigkeiten statt und das Reaktorvolumen bleibt konstant, solange keine Proben genommen werden. Deshalb wird mit einer hohen Substratkonzentration gestartet, unter der Voraussetzung, dass dies nicht zur Substratinhibierung bei dem jeweiligen Mikroorganismus führt. Eine  $pO_2$ -Regelung sorgt für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen. Die Regelung greift, sobald der  $pO_2$ -Wert kurzzeitig unter einen zuvor eingestellten Sollwert sinkt und reagiert mit einer steigenden Rührerdrehzahl. [2] [5] Das Ende der Batchphase wird durch einen starken  $pO_2$ -*Peak* und ein dadurch bedingtes Sinken der Rührerdrehzahl signalisiert.

### 3.3.2 Fed-Batchphase

Für das Erreichen einer hohen Zelldichte und zur Vorbereitung der Zellen auf die Induktion, wird nach der Batchphase in eine Fed-Batchphase übergegangen. [3] Es herrscht ein kontrolliertes Wachstum der Zellen bei einer bestimmten zellspezifischen Wachstumsrate. Diese Rate wird über ein Fütterungsprofil konstant gehalten. Die Substratlimitierung verhindert eine Akkumulation des Substrats im Medium und kontrolliert das Wachstum. Es wird eine Wachstumsrate unter oder gleich der maximalen Wachstumsrate der Batchphase angestrebt. Das zugefügte Substrat wird direkt verbraucht, weshalb die Zellen nur so schnell wachsen wie die Zufütterrate es ermöglicht. Um ein konstantes exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten, wird ein exponentielles Fütterungsprofil gewählt. [4] Der Sauerstoffbedarf wird auch in dieser Phase über die  $pO_2$ -Regelung ausreichend gedeckt. [2]

### 3.3.3 Produktions-Batchphase

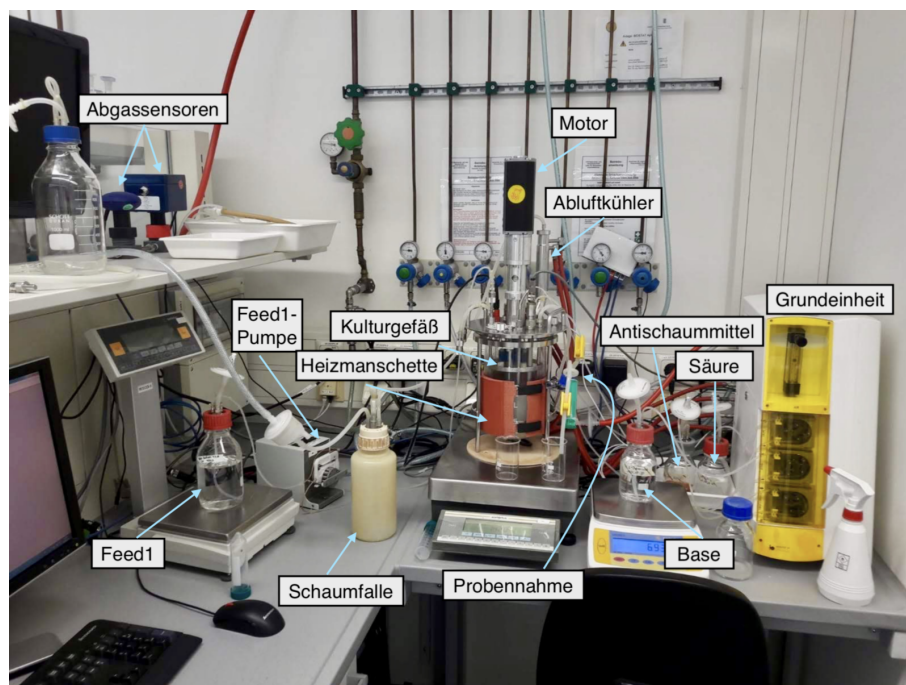
Die Produktionsphase folgt auf die Fed-Batchphase und wird durch das Beenden der Zufütterung an Glycerin und den Beginn der Zugabe an Methanol (S2) gestartet. Das als Induktor dienende Methanol, kann mittels bestimmter Fütterungsprofile oder manuell über ein Septum zugegeben werden. Das Zugabevolumen sollte zwischen 0,5-1,5 % des Kultivierungsvolumens betragen. Volumina darüberhinaus können zu einer toxischen Methanolkonzentration im Medium führen und eine inhibierende Wirkung auf die Produktion des rekombinanten Proteins, sowie das Wachstum der Zellen haben. [2] Die Zugabe erfolgte in dieser Arbeit manuell und sollte, um ebenfalls eine erhöhte Methanolkonzentration zu verhindern, erst nach dem Verbrauch der zuvor zugegebenen Menge an Methanol wiederholt werden. Der komplette Verbrauch an Methanol zeigt sich durch einen  $pO_2$ -*Peak* und sinkende Rührerdrehzahl, wie bei einem Batch-Ende. Für jede Zugabe kann somit ein kleiner Batchverlauf angenommen werden.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Aufbau des Bioreaktors BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus

Für die Kultivierungen wurden zwei Tischfermenter BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus der Firma Sartorius Stedim Biotec GmbH verwendet. Im Labor für Bioprozessautomatisierung werden die Fermenter zur Unterscheidung intern als BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 und 2 betitelt, wobei der BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 das jüngere Modell von beiden Reaktoren ist. Die Fermenter sind kompakt gebaut und für den Einstieg in die Zellkultur und zu Ausbildungszwecken konzipiert.



**Abbildung 4:** Aufbau der gesamten Anlage zur Kultivierung am BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1.

Die Fermenter besitzen ein einwandiges Kulturgefäß aus Glas mit rundem Innenboden, welches auf ein Maximalvolumen von 5 L ausgelegt ist und ein Höhen-Durchmesser-Verhältnis von etwa 2:1 aufweist. Halt findet das Kulturgefäß in ei-

nem dreibeinigen Edelstahlstativ, welches an einem Bein über eine Halterung für das Probenahmegefäß verfügt. Fest verschlossen wird es mit einem Edelstahldeckel, der zwölf Öffnungen und eine Rührerwelle (Obenantrieb) besitzt, durch Verschrauben des Deckels mit dem Stativ. Im Deckel werden eine pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde, ein Abluftkühler, ein Kühlfinger, ein Schikanenkorb, Zugänge für die Korrekturmittel (Säure, Base und Antischaummittel), eine Sterilkupplung zur Inokulation, ein Probeentnahmerohr sowie ein *Feed*-Rohr mit Sterilkupplung und Schlauchverlängerung am Ende montiert. Der BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus 1 besitzt dazu ein Tauchrohr für einen Temperaturfühler. Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 findet die Temperaturmessung über die pH-Sonde statt. Beheizt wird während der Fermentation elektrisch über eine Heizmanschette und gekühlt wird mit Kühlwasser über einen Kühlfinger. Die Heizmanschette wird um das Kulturgefäß angelegt und über die zugehörige Spannungsversorgung der Versorgungseinheit angesteuert. Das Kühlwasser wird beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 von einem Umlaufkühler geliefert und beim Aplus1 durch das Kühlwassersystem des Labors zur Verfügung gestellt. Die Abluftkühler beider Reaktoren werden ebenfalls durch das Kühlwassersystem des Labors versorgt. Die Fermenter können mit kompletter Instrumentierung, der Motor nicht inbegriffen, autoklaviert werden.

### 4.1.1 Grundeinheit (DCU)

Die Grundeinheit (*Digital Controlling Unit*, DCU) ist das Kontrollsystem der Anlage und steuert die Kultivierung durch Regelung der Prozessparameter. An die DCU sind Signalwandler für die pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde, Ventile und drei Pumpen angeschlossen. Zudem liefert sie die Versorgungsspannung für die Heizmanschette und besitzt zwei *Mass-Flow-Controller* (MFC) für die Regelung der Sauerstoff- und Luftversorgung.

### 4.1.2 Instrumentierung und Ausrüstung

#### Temperaturfühler

Der BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 besitzt als Temperaturfühler einen Pt-100-Sensor (Platin-temperatursensor). Der gemessene Widerstand des Platins steht in Abhängigkeit zur Temperatur. Platin weist bei einer Temperatur von 0 °C einen Widerstand

von 100  $\Omega$  auf. Bei steigender Temperatur steigt ebenfalls der Widerstand und der Spannungsabfall über dem, konstant mit Strom versorgten Pt-100, ändert sich. Der Temperaturfühler wird in ein Tauchrohr eingebaut, welches zur besseren Wärmeübertragung zuvor mit Wasser gefüllt wird.

Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 ist in der pH-Sonde als Temperaturfühler ein NTC 30K-Temperatursensor (*Negativ Temperatur Coefficient*) eingebaut. Dieses weist bei einer Bezugstemperatur von 25 °C einen Widerstand von 30 k $\Omega$  auf. Es handelt sich um einen Heißleiter aus polykristallinem Halbleiter-Material, dessen elektrischer Widerstand bei zunehmender Temperatur sinkt, da zunehmend mehr Elektronen aus ihren Kristallbindungen herausgerissen werden.

#### **pO<sub>2</sub>-Sonde**

Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 wird zur Gelöst-Sauerstoffmessung (pO<sub>2</sub>) eine digitale Sonde der Firma Endress + Hauser<sup>®</sup> verwendet. Es wird die firmeninterne Memosens-Technologie verwendet, wodurch die Messwerte in der Sonde digitalisiert und kontaktlos über Induktion an die DCU transferiert werden. Es kann dadurch zu keinen Störungen oder Ausfällen durch Feuchtigkeit und Korrosion kommen und die Messwerte weisen eine höhere Richtigkeit auf. Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 wird der relative Sauerstoffpartialdruck im Medium mit einer digitalen Sonde von Mettler Toledo<sup>®</sup> gemessen.

Die Sonden nutzen das Clark-Prinzip, dieses basiert auf einer amperometrischen Messung. Eine Arbeitselektrode (Platin-Kathode) und eine Gegenelektrode (Silber-Anode) befinden sich in einem gemeinsamen Reaktionsraum und sind von einer leitenden Elektrolytflüssigkeit umgeben. Beide Elektroden sind mit Gleichspannung beaufschlagt. Der Reaktionsraum wird unten durch eine gasdurchlässige Membran geschlossen und trennt die Elektrolytlösung von der Messlösung. Durch Permeation gelangt Sauerstoff aus der Messlösung in die Elektrolytlösung und wird an der Arbeitselektrode reduziert. Es fließt ein Strom der proportional zum Sauerstoffpartialdruck in der Messlösung ist. Als chemische Äquivalenzreaktion wird an der Gegenelektrode Silber zu Silber-Ionen oxidiert, welche sich an der Elektrode anlagern. [13] [14]

Die Sonden werden, nach Sterilisation des Fermenters im Autoklaven, bei Fermentationsbedingungen kalibriert. Hierfür wird zunächst eine Nullpunktmessung

vorgenommen und anschließend eine Messung bei maximaler Begasung mit Luft zur Ermittlung der Steigung. Für die Nullpunktmessung wird mit reinem Stickstoff begast, sodass der  $pO_2$ -Wert und der gemessene Strom auf Null sinken. Die Steigung wird durch eine Messung der bei Kultivierung entsprechenden Begasungsrate durchgeführt. Bei den Fermentationen wird eine Begasungsrate von 2 vvm gewählt. Zur Verbesserung der Durchmischung des Mediums wird bei der Kalibrierung die Rührerdrehzahl auf 1000 rpm erhöht.

#### **pH-Sonde**

Die pH-Sonde des BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 der Firma Endress + Hauser<sup>®</sup> verwendet auch bei der pH-Sonde die Memosens-Technologie. Beide verwendeten Sonden sind sterilisierbare Glaselektroden und basieren auf der Spannungsmessung zwischen zwei unterschiedlichen Potentialen. In der Glaselektrode befindet sich eine Messelektrode aus Silberdraht, welche mit einer wässrigen Elektrolytlösung, wie Kaliumchlorid, und einem Puffer, z.B. Phosphatpuffer, gefüllt ist und eine dünne Glasmembran am unteren Ende besitzt. Diese Membran steht in Kontakt mit der Messlösung und ist Wasserstoffionen-sensitiv. Die Wasserstoffionen diffundieren, je nach gegebenem pH-Wert, durch die Membran hinein (saure Messlösung) oder heraus (alkalische Messlösung). Die Messelektrode ist konzentrisch von einer Referenzelektrode aus Silberdraht umgeben. Diese ist mit definiertem Referenzelektrolyt, ebenfalls Kaliumchlorid, gefüllt und hat über ein Diaphragma (poröses Keramik) indirekten Kontakt zur Messlösung. Die Kontaktkette gewährleistet ein stabiles von der Messlösung unabhängiges Potential in der Elektrode. Die entstehende Spannung zwischen der Mess- und Referenzelektrode steht in Abhängigkeit zum pH-Wert der Messlösung. [15]

Die Kalibrierung der pH-Sonde wird vor Sterilisation des Fermenters vorgenommen. Es wird eine Zwei-Punkt-Kalibrierung durchgeführt, da sich der pH-Sollwert des Kulturmediums bei fünf befindet. Zuerst wird eine Nullpunkt-Messung bei einem pH-Wert von sieben und im Anschluss eine Steigungs-Messung bei einem pH-Wert von vier ausgeführt.

### **Niveausonde**

Die Niveausonde, oft auch als Antischaumsonde bezeichnet, wird ebenfalls im Edelstahldeckel verschraubt und weist durchgehend die selbe Höhenposition bei der Fermentation auf. Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 ergibt sich eine Position, oberhalb des Schaumzerstörers, aus der Konstruktion der Sonde, da die Verschraubung eine feste Höhe an der Sonde besitzt. Die längere und variierbare Sonde des BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 ist somit auf eine Position kurz oberhalb des Schaumzerstörers festzustellen.

Zur Detektion des Schaumniveaus wird ein elektrischer Leitfähigkeitssensor genutzt. Es wird der Unterschied in der Leitfähigkeit zwischen der Luft und bei Kontakt mit Schaum detektiert. Für die Messung werden die Edelstahlteile am Kulturgefäß als Gegenelektrode genutzt. Bei Kontakt der Einstab-Sonden mit Schaum ändert sich die Leitfähigkeit sprunghaft, wodurch die Regelung zur Antischaummittelzugabe aktiviert wird.

### **Abgassensoren**

Zur Analyse des Kohlenstoffdioxid- und Sauerstoffgehalts im Abgas, werden am BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 zwei Abgassensoren der Firma BlueSens gas sensor GmbH verwendet. Für die Kohlenstoffdioxidmessung arbeitet der Sensor mit Infrarotstrahlung bei zwei Wellenlängen, da Kohlenstoffdioxid auf charakteristische Weise IR-Strahlung adsorbiert. Der Sensor besteht aus einer IR-Lichtquelle, einem Detektor und der entsprechenden Elektronik für die Auswertung. Die vom Kohlenstoffdioxid abgeschwächte Infrarotstrahlung wird vom Detektor gemessen. Der Sensorkopf erwärmt den Messadapter, damit keine Feuchtigkeit kondensieren kann. Die Aufwärmzeit beträgt bei der Erstinbetriebnahme sowie nach jedem Trennen des Gerätes von der Stromversorgung etwa eine Stunde. Während dieser Aufheizzeit gibt der Sensor keine Messwerte aus.

Für die Sauerstoffmessung arbeitet der zweite Sensor mit einer amperometrischen Messung. Die Messung funktioniert unabhängig von Referenzgasen und basiert auf einer Sauerstoffpumpzelle. In dieser Zelle werden zwei Zirkoniumdioxidplatten als Elektroden verwendet. Die Platten sind mit einem Sauerstoff permeablen Film beschichtet. Führt man der Zelle Spannung zu, wird Sauerstoff an der Kathode reduziert und die Sauerstoffionen wandern anschließend zur Anode,

wodurch ein Strom fließt. Der Strom ist proportional zur Sauerstoffkonzentration im Abgas. [16] Beim BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 wird ein kombinierter Sensor, der beide Gasanalysen gleichzeitig durchführen kann, verwendet.

### **Begasung**

Die Begasung erfolgt durch einen Begasungsrohr mit Ringbrause. Die Ringbrause ist mit gleichmäßig angeordneten Bohrungen versehen, durch welche das Gas in das Kulturmedium strömt. Nach Einbau in den Edelstahldeckel des Fermenters, wird oberhalb des Deckels ein Schlauch mit Kapselfiter (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) angeschlossen. An diesen Filter wird nach Sterilisation die geregelte Zuluft von der DCU aus angekoppelt.

### **Durchmischung**

Für eine gute Durchmischung des Kulturmediums zur gleichmäßigen Sauerstoffverteilung und Temperierung werden zwei 6-Blatt-Scheibenrührer verwendet. Zusätzlich wird ein Schikanenkorb, ein ringförmiger Gefäßeinsatz mit vier Stromstörern, eingebaut. Der obere Rührer ist an die Füllhöhe während der Kultivierung angepasst und der untere Rührer befindet ca. einen Zentimeter über der Ringbrause des Begasungsrohrs. Nach Außen abgedichtet wird die Rührerwelle mittels einer einfachen Gleitringdichtung und in den Kultivierungsraum eingeführt durch den Edelstahldeckel. Oberhalb des Deckels befindet sich die steckbare Standard-Antriebskupplung, auf welcher der Motor montiert wird.

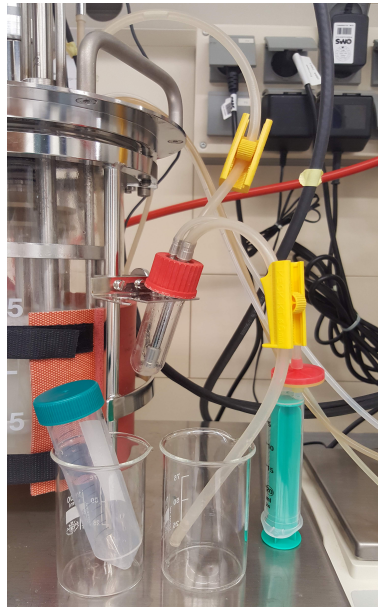
### **Pumpen**

Die Grundeinheit besitzt drei Pumpenköpfe für den Transport von Base, Säure und Antischaummittel in das Kulturmedium. Es handelt sich um On/Off-Pumpen, deren Drehzahl konstant und unveränderbar ist. Eine weitere externe Pumpe wird in der Fed-Batchphase für die Zuführung des Substrats (S1) verwendet. Die Pumpe ist in ihrer Drehzahl variabel und liefert die Möglichkeit bestimmte Pumpprofile anzuwenden. Alle Pumpen arbeiten mit einer peristaltischen Bewegungsform durch Verdrängung. Der Pumpenkopf besteht aus mehreren am Rotor befestigten Rollen und bestimmten verengten Bereichen. Der Schlauch wird in den Pumpenkopf eingespannt und durch die Rotation kommt es in den

verengten Bereichen zur Verdrängung der Flüssigkeit im Schlauch. Dadurch entsteht zusätzlich ein Unterdruck, wodurch Flüssigkeit aus der Reservoirflasche nachgezogen wird. [17]

### Probenahme

Die Probenahme erfolgt manuell und diskontinuierlich durch einen Handprobennehmer. Dieser umfasst ein Probenröhrchen mit 15 mL Fassungsvermögen, eine Absaugspritze mit einem 0,2  $\mu\text{m}$  Sterilfilter als Spritzenvorsatz und Schlauchklemmen für den Probeentnahmeschlauch und den Probenauslassschlauch. Der Sterilfilter an der Spritze verhindert das Eindringen insteriler Luft beim Aufziehen der Spritze.



**Abbildung 5:** Foto der Probenahmeeinheit am BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2.

Für die Probenahme wird zunächst eine Probe von ca. 5 mL gezogen, indem der Entnahmeschlauch geöffnet wird und die Spritze auf ca. 8 mL aufgezogen. Anschließend wird der Entnahmeschlauch wieder abgeklemmt und der Probenauslass geöffnet, um mittels der Spritze die Probe in ein Probengefäß zu befördern. Die erste Probe wird, zur Vermeidung der Durchmischung mit Zellsuspension einer

vorherigen Probenahme, verworfen.

### **Waagen**

Zur Analyse des Substrateintrags in das Kulturmedium während der Fed-Batchphase wird die Flasche mit dem enthaltenden Substrat (S1) zu Beginn auf eine Waage gestellt und tariert. Gleichzeitig steht das Kulturgefäß samt Instrumentierung auf einer Waage, um das Kulturvolumen und dessen Änderung während der gesamten Kultivierung aufzunehmen. Mit beiden Signalen lässt sich im Nachhinein der Substrateintrag in das Medium über die Zeit berechnen. Zur Kontrolle einer ausreichenden Stickstoffversorgung während der Fermentation steht die Base zusätzlich auf einer Waage.

### **Septum**

Die Zugabe des zweiten Substrats (S2)/ Induktors, in der Produktionsphase der Fermentation, erfolgt durch ein Septum. Verwendet wird dazu eine Einmalspritze der Firma Braun (Injekt<sup>®</sup>, Luer Solo) mit 25 mL maximalen Fassungsvermögen und eine Einmal-Injektions-Kanüle der Firma Braun (Sterican<sup>®</sup>, 0.90x40 mm). Unter der Sterilwerkbank wird das gewünschte Volumen aufgezogen. Erst bei Zugabe des Substrats wird die Aluminiumfolie vom Septum, von der Sterilisation des Reaktors, abgenommen. Nach der Injektion wird das Septum wieder bedeckt und die Kanüle verworfen.

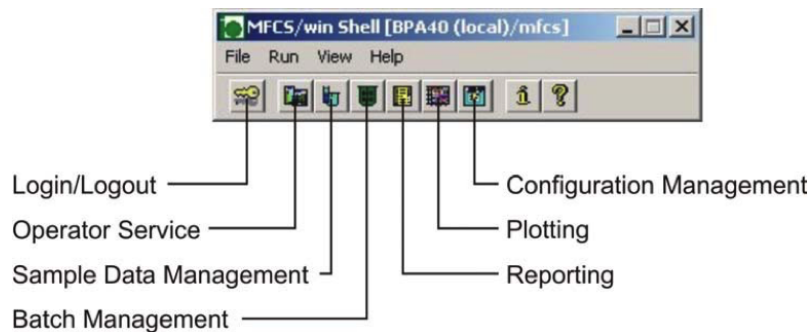
## **4.2 Prozessleitsystem MFCS/win**

Die Bedienung der DCU erfolgt über eine Benutzeroberfläche, welche sich entweder auf einen PC befindet oder als Weboberfläche verfügbar ist. Im Hauptmenü ist mittig der Fermenter abgebildet und um diesen herum die Regelkomponenten inklusive Korrekturmittel, Substrat1 (S1) und Begasungsoptionen. Die Pumpen der Korrekturmittel, des Antischaummittels und des Substrats sind individuell einstell- und ansteuerbar. Ebenfalls lässt sich in der Begasung zwischen Luft und Sauerstoff wählen, sowie jeweils die Begasungsrate einstellen. Die Kalibrierung der pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde erfolgt über diese Benutzeroberfläche.

Zu Erfassung und Steuerung der Kultivierungsdaten wird mit einem zusätz-



lichen Prozessleitsystem gearbeitet. Dabei handelt es sich um die Software MFCS/win (*Multi Fermentor Control System for Windows<sup>TM</sup>*) der Firma Sartorius Stedim GmbH. Das Prozessführungssystem wurde speziell für die Handhabung von Bioreaktorsystemen in der Biotechnologie entwickelt. [2] Es stellt Client-Module zur Verfügung, über welche der Anwender auf die aktuellen Prozessdaten zugreifen und in den laufenden Prozess eingreifen kann.



**Abbildung 6:** Dargestellt ist ein Screenshot der *Client*-Module des MFCS/win Shell. [2]

Es stehen fünf Module zur Verfügung. Im **Operator Service** lässt sich der Prozess bedienen. Das **Batch Management** gibt die Möglichkeit Fermentationen für den Start zu definiert. Durch das **Plotting Modul** kann der Anwender den Kultivierungsverlauf graphisch verfolgen. Im **Configuration Management** können Rezepte für halb- oder vollautomatische Fermentationsprozesse erstellt werden. Das **Sample Data Management** stellt die Option offline Daten der laufenden Kultivierung eintragen zu können. Im **Reporting** können die Daten der abgeschlossenen Fermentationen tabellarisch aufgezeigt und exportiert werden. [2] [14] Zur Steuerung der Fermentation wurde ein Rezept erstellt, welches sich in die vier Phasen Initiation, Inokulation, Fermentation und Termination gliedert. Die Initiationsphase besteht aus dem Einfügen bestimmter Organismus spezifischer Parameter, die in Tabelle 1 zu finden sind.

**Tabelle 1:** Übersicht der angenommenen Wachstumskriterien für *Pichia pastoris* BSYBG11. Die Nomenklatur befindet sich auf Seite 53.

Variable	Wert	Einheit
$\mu_{max}$	0,3	1/h
$q_{S1X_m}$	0,01	g/g
$y_{X/S1}$	0,6	g/g
$F_{R1max}$	0,222	L/h
$c_{XL_j}$	18,3	g/L
$K_{cX/OD}$	0,5	-
$\mu_w$	0,1	1/h

Ebenfalls wird die Berechnung des Reaktorvolumens aktiviert, welche sich aus der Subtraktion des aktuellen Waagensignals der Reaktorwaage mit dem Gewicht des leeren Bioreaktors ergibt. Dazu werden die Umschalter (*Switch-Points*) für das Batch-Ende und die Zufütterungs-Pumpe auf Null gesetzt. Die Regler, außer der  $pO_2$ -Regelung, werden aktiviert, sowie auf automatisch gesetzt und bekommen ihre *Setpoints* übermittelt. Die  $pO_2$ -Regelung wird erst in der dritten Phase (Fermentation) aktiviert, da in dieser Phase die Kalibrierung der  $pO_2$ -Sonde durchgeführt wird. Ebenfalls wird die Rekalibrierung des pH-Wertes ausgeführt. Dies wird durch eine *Messagebox* abgefragt, ohne eine Bestätigung dieser wird nicht in die nächste Phase übergegangen.

Die folgende Phase der Inokulation besteht aus einer *Messagebox*, welche nach dem Erreichen der Setpoints und der Zugabe des Inokulums fragt. Bei der Bestätigung der Nachfrage wird direkt in die nächste Phase übergegangen.

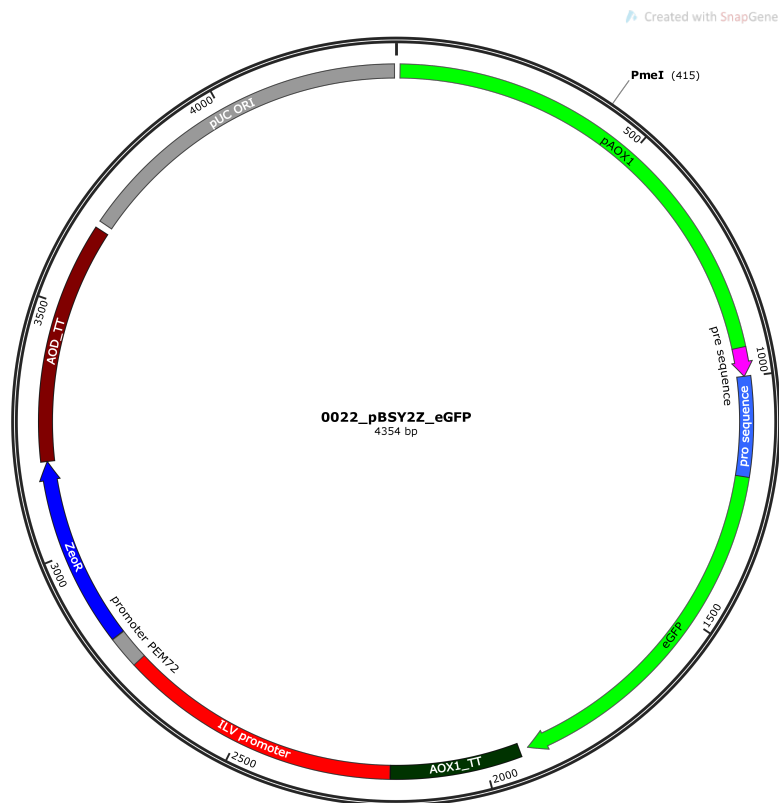
In der Fermentationsphase wird gleich zu Beginn die  $pO_2$ -Regelung und Datenspeicherung gestartet. Anschließend wartet die Phase auf eine Änderung des *Switch-Points* der *Batch-End* Erkennung auf Eins. Hier arbeitet MFCS/win mit einem MFCS-Tool zusammen. Das *Add-on* liest die aktuellen Werte vom  $pO_2$  und der Rührerdrehzahl ein. Bei einem Anstieg des  $pO_2$ -Mittelwertes über 35 % und einer Abnahme des Rührers von 30 rpm innerhalb von vier Zeitintervallen, wird der *Switch-Point* der *Batch-End* Erkennung und der Zufütterungs-Pumpe von Null auf Eins gesetzt. Die Pumpe startet daraufhin mit einer Pumprate, welche durch das *Add-on* berechnet wird. Es wird ein exponentielles Pumpprofil gefahren. Auf die Berechnungen wird in Kapitel 4.5.2 genauer eingegangen. Mit dem Start der

Fütterung beginnt ein Warteabschnitt. Dabei handelt es sich um die Dauer der Fed-Batchphase. Die Wartezeit lässt sich manuell eintragen.

Nach Ablauf der Fed-Batchphase wird der *Switch-Point* für die Zufütterung auf Null gesetzt und die Pumpe stoppt. Ebenfalls wird manuell mit Substrat 2 (S2) induziert und dadurch die Expressionsphase gestartet. Es folgt ein Warteabschnitt, der aufgrund des noch unbekanntes Verhaltens der Klone auf das zweite Substrat zunächst mit dem Stopp-Element in die Halte-Position versetzt wird. Bei gewünschter Beendigung der Fermentation kann durch eine gezwungenes Fortschreiten im Rezept die Termination starten. Die Terminationsphase schaltet alle Regelungen aus und stoppt den Rührer. Im Anschluss sollte das Rezept im *Operator Service* direkt beendet werden, damit die Erfassung und Speicherung der Daten aufhört.

### 4.3 *Pichia pastoris* Stamm *BSYBG11*

Der zur Expression von eGFP fähige rekombinante *Pichia pastoris* Stamm *BSYBG11* wurde in der Arbeitsgruppe Noll an der HAW Hamburg hergestellt. Es wurde das Gen eGFP, codon-optimiert für *Pichia pastoris*, in den Vektor *pBSY2Z* unter die Kontrolle des AOX1-Promotors (pAOX1) kloniert. Das entstandene Plasmid, in Abbildung 7 dargestellt, dient als Shuttle Vektor und wird in *E.coli* Bakterien repliziert. Der Vektor wurde anschließend linearisiert und mittels Elektroporation in den *BSYBG11* Stamm gebracht, der diesen in sein Genom an die Stelle des AOX1 Promotors rekombiniert hat. Das AOX1 Gen wurde im ursprünglichen *BSYBG11* Stamm entfernt, wodurch der Methanol-Metabolismus durch das AOX2 bestimmt wird. Dadurch weist der Stamm einen Mut<sup>S</sup> Phänotyp auf und wächst nur langsam auf der Basis von Methanol.



**Abbildung 7:** Das Plasmid *pBSY2z\_eGFP* des rekombinanten Stammes *BSYBG11*, dargestellt mit Hilfe der Software SnapGene.

pAOX1:	AOX1 Promotor
pre sequence:	Präpeptid Sequenz
pro sequence:	Propeptid Sequenz
AOX1_TT:	AOX1-Transkriptionsterminationsregion
ZeoR:	Zeocinresistenz
ILV promotor:	Promotor in <i>P. pastoris</i> für ZeoR-Gen
Promotor PEM72:	Promotor in <i>E. coli</i> für ZeoR-Gen
AOD_TT:	Terminator in <i>P. pastoris</i> für ZeoR-Gen
pUC ORI:	Replikationsursprung

Durch den in das Genom rekombinierten Vektor besitzt der Stamm eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Die Präpeptid und Propeptid Sequenz sind betei-

ligt an der Faltung von eGFP und verantwortlich für die Sekretion des Proteins in den extrazellulären Raum. Folgend werden die Aminosäuresequenzen des eGFP, der Präpeptid Sequenz und der Propeptid Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Das Protein eGFP besteht, wie der Wildtyp, aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26,9 kDa.

eGFP:

VSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYG  
VQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG  
NILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYL  
STQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

Präpeptid Sequenz:

MRFPSIFTAVLFAASSALA

Propeptid Sequenz:

APVNTTTEDETAQIPAEAVIGTSDLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLELR

Die tabellarische Legende für die Zuordnung der Aminosäuren befindet sich im Anhang in Tabelle 12 auf Seite 64.

## 4.4 Vorversuche

Zur Etablierung der Vorkultur und Bestimmung der Wachstumsparameter der Klone, wurden zunächst Versuche im Schüttelkolben durchgeführt. Die Vorkultur sollte eine optische Dichte (s. Kapitel 4.6.1, Seite 27) zwischen 5 und 7 AU erreichen, um ein verzögertes Wachstum zu Beginn der Kultivierung zu vermeiden.

Es wurde 1 mL Zellsuspension aus der Kryokultur auf ein Vorkulturmedium von 99 mL gegeben und bei 30 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Die Zusammensetzung des Vorkulturmediums entspricht dem Batchmedium (s. Tabelle 11, Seite 63), lediglich die Glycerinkonzentration betrug 20 g/L. Für die Ermittlung der maximalen Wachstumsrate wurde stündlich 1 mL Probe für eine OD<sub>600</sub>-Messung genommen. Die Entnahme erfolgte unter der Sterilwerkbank.

## 4.5 Berechnungen der Kultivierungsphasen

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde ein dreistufiger Kultivierungsprozess gewählt. Die Fermentationen wurden mit einer Vorkultur mit 10g/L Glycerin, einem Batchmedium mit 30 g/L Glycerin und ungefähren Dauer von 12 Stunden, sowie einer Fed-Bachtphase von 15 Stunden mit einem gesteuertem  $\mu_w$  von 0,1 1/h, durchgeführt. Die Produktionsphase wurde mit einem Volumen an Methanol induziert, welches 1,5% des aktuellen Reaktorvolumens betrug. Zudem wurde bei einem pH von 5, einer Temperatur von 30 °C, einem pO<sub>2</sub>-Sollwert von 25 % und einer Begasung von 2 vvm kultiviert. Von fünf zur Verfügung stehenden Klonen wurde mit dreien gearbeitet, welche die Nummerierung 1, 3 und 5 tragen. Im Folgenden wird die Festlegung und Berechnung bestimmter Parameter erläutert.

### 4.5.1 Batchphase

Für die Berechnung der Batchphasen der Klone wurden bestimmte Parameter aus vorangegangenen Arbeiten mit der Hefe *Pichia pastoris* übernommen und für das definierte Batchmedium eine Substratkonzentration von 30 g/L gewählt (s. Seite 63). Die maximale Wachstumsrate aus den Vorversuchen ermöglicht eine Berechnung der theoretischen Dauer der Batchphase. Dafür werden die folgenden Formeln verwendet.

Das exponentielle Wachstum in der unlimitierten Phase wird beschrieben durch:

$$c_{XL}(t_{exp}) = c_{XL0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot (t_{exp} - t_0)} \quad (4.1)$$

$c_{XL}(t_{exp})$ :	Zellkonzentration zum Zeitpunkt $t_{exp}$	[g/L]
$c_{XL0}$ :	Zellkonzentration zum Zeitpunkt $t_0$	[g/L]
$\mu_{max}$ :	maximale spezifische Wachstumsrate	[1/h]
$t_{exp}$ :	Ende der exponentiellen Wachstumsphase	[h]
$t_0$ :	Beginn exponentiellen Wachstumsphase	[h]

Dies kann ebenfalls mit der optischen Dichte beschrieben werden:

$$OD(t) = OD(t_0) \cdot e^{\mu_{max} \cdot (t_{exp} - t_0)} \quad (4.2)$$

OD: optische Dichte zum Zeitpunkt  $t_{exp}$  [-]

OD( $t_0$ ): optische Dichte zum Zeitpunkt  $t_0$  [-]

Um die theoretische Dauer der Batchphase zu berechnen, wird Formel 4.1 nach dem zeitlichen Ende der exponentiellen Wachstumsphase ( $t_{exp}$ ) umgestellt.

$$t_{exp} = \ln\left(\frac{c_{XL}}{c_{XL0}}\right) \cdot \frac{1}{\mu_{max}} + t_0 \quad (4.3)$$

Für die Berechnung von der Zellkonzentration am Ende ( $c_{XL}$ ) und zu Beginn ( $c_{X0}$ ) der Batchphase wurden folgende Formeln verwendet.

Theoretische Startzellkonzentration der Batchphase:

$$c_{XL0} = \frac{OD_{VK} \cdot V_{LVK}}{V_{LB}} \cdot K_{X/OD} \quad (4.4)$$

OD<sub>VK</sub>: optische Dichte der Vorkultur [-]

V<sub>LVK</sub>: Gesamtvolumen der Vorkultur [L]

V<sub>LB</sub>: Gesamtvolumen des Kulturmediums im Biotreaktor [L]

K<sub>X/OD</sub>: Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zur Zellkonzentration [-]

Theoretische Endzellkonzentration am Batchende:

$$c_{XL} = c_{S10} \cdot y_{X/S1} + c_{XL0} \quad (4.5)$$

c<sub>S0</sub>: Substratkonzentration zu Beginn der Batchphase [g/L]

y<sub>X/S1</sub>: Substratausbeutekoeffizient [g/g]

### 4.5.2 Fed-Batchphase

In der Fed-Batchphase wird ein kontrolliertes Wachstum mit einem exponentiellen Zufütterungsprofil gesteuert. Das *Add-On*, für die Erkennung des Batchendes, berechnet den Sollwert der Substratzufuhr rate wie folgt:

$$F_{Rw}(t) = F_{Rj} \cdot e^{\mu_w(t-t_j)} \quad (4.6)$$

$F_{Rw}$ :	Sollsubstratzufütterungsrate	[L/h]
$F_{Rj}$ :	Startsubstratzufütterungsrate	[L/h]
$\mu_w$ :	Sollwert der Wachstumsrate	[1/h]
t:	Prozesszeit	[h]
$t_j$ :	Start der Fütterung	[h]

Die Startsubstratzufütterungsrate wird berechnet durch:

$$F_{Rj}(t) = \frac{(\mu_w + q_{S1/Xm} \cdot y_{X/S1}) \cdot V_{Lj} \cdot c_{XLj}}{y_{X/S1} \cdot c_{S1,R}} \quad (4.7)$$

$q_{S1/Xm}$ :	zellspezifische Maintenance-Substrataufnahmerate	[1/h]
$V_{Lj}$ :	Kulturvolumen im Reaktor zum Zeitpunkt $t_j$	[L]
$c_{XLj}$ :	Zellkonzentration zum Zeitpunkt $t_j$	[g/L]

Damit das *Add-On* diese Berechnungen durchführen kann, müssen die notwendigen Parameter im Rezept bei MFCS/win eingetragen sein. Die maximale Förderrate der verwendeten Pumpe muss ebenfalls eingepflegt werden.

Es wurde mit einem  $\mu_w$  von 0,1 1/h, einer Substratkonzentration von 400 g/L mit einer Fed-Batchdauer von 15 Stunden gearbeitet.

Um die Versorgung der Zellen mit Substrat (S1) im Medium pro Zeiteinheit zu ermitteln, wird die volumetrische Substrateintragsrate berechnet. Dies ist über die Pumprate oder das Waagensignal möglich.



Die Substrateintragsrate über die Pumprate:

$$Q_{S1in}(t) = \frac{(F_R(t) \cdot c_{S1,R})}{V_L(t)} \quad (4.8)$$

$Q_{S1in}$ :	volumetrische Substrateintragsrate zum Zeitpunkt t	[g/l · h]
$F_R$ :	Pumprate zum Zeitpunkt t	[L/h]
$c_{S1,R}$ :	Substratkonzentration im Reservoir	[g/L]
$V_L$ :	Reaktorvolumen	[L]

Für die Substrateintragsrate über das Waagensignal wird zuerst der Massenstrom des Substrats in das Medium berechnet. Die Dichte des Reservoirs wurde mittels zehnfachem Auswiegen von 1 mL Suspension und nachfolgender Mittelwertberechnung bestimmt.

$$\dot{m}_{S1in}(t) = \frac{\dot{m}_{R1}(t)}{\rho_{S1}} \cdot c_{S1R} \quad (4.9)$$

$\dot{m}_{S1in}$ :	Substrateintragsrate	[l/h]
$\dot{m}_{R1}$ :	Substratmassenstrom in den Reaktor	[g/h]
$\rho_{S1}$ :	Dichte des Substratreservoirs	[g/l]

Anschließend wird die volumetrische Substrateintragsrate durch Teilen der Substrateintragsrate mit der Masse an Kulturvolumen im Reaktor ermittelt.

$$Q_{S1in}(t) = \frac{\dot{m}_{S1in}(t)}{m_L(t)} \quad (4.10)$$

$m_L$ :	Reaktorvolumen	[g]
---------	----------------	-----

Die Berechnungen wurden teilweise mit dem Software Programm MATLAB<sup>®</sup> durchgeführt. Da die korrekteren Ergebnisse über das Waagensignal geliefert werden, wurde dieser Berechnungsweg, nach einem Vergleich der Ergebnisse gewählt.

### 4.5.3 Produktionsphase

Die Produktionsphase wird durch das Ende der Zufütterung von Glycerin und mit der Zugabe des Induktors Methanol begonnen. Zur Beurteilung der Produktivität der einzelnen Klone wird die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate ermittelt.

Dafür wird die gemessene Fluoreszenz als Indikator für die eGFP-Bildung genommen.

$$Q_{P1}(t) = \frac{\dot{A}_{eGFP}(t)}{c_{XL}(t)} \quad (4.11)$$

$Q_{P1}$ : wachstumgekoppelte Produktbildungsrate zum [AU/g·h]  
 $\dot{A}_{eGFP}$ : Geschwindigkeit der Fluoreszenzbildung [AU/h]

Diese Berechnung wurde ebenfalls mit Hilfe des Software Programms MATLAB® durchgeführt.

## 4.6 Offline-Analytik

### 4.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der Zellwachstums während einer laufenden Fermentation wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Photometer gemessen. Das Photometer arbeitet mit dem Durchlichtverfahren und misst das gestreute Licht, welches nicht von der Hefesuspension reflektiert oder absorbiert wurde. Diese Extinktion nimmt mit zunehmender Zellkonzentration zu und weist nur in einem Messwertbereich von 0,1 - 0,6 AU eine proportionale Linearität zur Zellkonzentration auf. Als Referenz und zur Verdünnung der Proben wird demineralisiertes Wasser genutzt. Vermessen wird 1 mL Probe in einer Halbmikroküvette. Die optische Dichte verdünnter Proben ergibt sich aus folgender Formel:

$$OD = F \cdot OD_{Probe} \quad (4.12)$$

OD: optische Dichte [–]  
 F: Verdünnungsfaktor [–]  
 $OD_{Probe}$  : optische Dichte der verdünnten Probe [–]

### 4.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für eine exaktere Bestimmung der Zellkonzentration und des Zellwachstums der Hefen wird die Biotrockenmasse bei jeder Probenahme bestimmt. Hierfür werden einen Tag vor der Fermentation Eppendorfgläser beschriftet und über Nacht bei

70 °C getrocknet. Am Folgetag werden die Gefäße nach Abkühlen gewogen. Während der Kultivierung werden in der Batchphase 2 mL und in der Fed-Batch- und Produktionsphase 1 mL Probe genommen und bei 14.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in der Batch- und Fed-Batchphase, bis auf die letzte Probe der Fed-Batchphase, mit der Pipette abgesaugt und verworfen. Während der Produktionsphase werden die Überstände für die spätere Fluoreszenzmessung direkt bei -20 °C eingefroren. Anschließend werden alle Probengefäße mit offenem Deckel bei 70 °C getrocknet über Nacht getrocknet. Am folgenden Tag werden die Gefäße wieder nach ausreichendem Abkühlen gewogen. Aus der Biotrockenmasse ergibt sich nach folgender Formel die Zellkonzentration wie folgt:

$$c_{XL} = \frac{m_X - m_0}{V_{Probe}} \quad (4.13)$$

$c_{XL}$ :	Zellkonzentration	[g/L]
$m_X$ :	Gewicht des Mikroreaktionsgefäßes mit Pellet	[g]
$m_0$ :	Gewicht des leeren Mikroreaktionsgefäßes	[g]
$V_{Probe}$ :	Volumen der Probe	[L]

#### 4.6.3 Bestimmung der Fluoreszenz

Als Maß für die eGFP-Konzentration in der Produktionsphase wird mit einem Fluoreszenzphotometer in einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte die Fluoreszenz gemessen. Vermessen werden 200  $\mu$ L der unverdünnten Überstände aus der Produktionsphase und ein Überstand der letzten Fed-Batchprobe als Blindwert. Verwendet wird der Platten-Reader GENios der Firma TECAN Trading GmbH, in dessen zugehörigem Programm eine Methode zur Messung definiert wurde. Diese beinhaltet eine Anregungswellenlänge von 400 nm und eine Emissionswellenlänge von 510 nm. Die Messung erfolgt zudem von oben.

#### 4.6.4 SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (englisch: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophorese*) ist ein Verfahren zum Trennen von Proteinen, basierend auf ihrer Fähigkeit sich innerhalb eines elektrischen

Stroms zu bewegen. Die Geschwindigkeit der Bewegung steht in Abhängigkeit zu der Länge ihrer Polypeptidketten oder ihres Molekulargewichts. Um sekundäre und tertiäre Proteinstrukturen zu entfernen und Polypeptidketten zu erhalten wird SDS-Detergens zugegeben. Das anionische Tensid (SDS) beschichtet die Proteine, meist proportional zu ihrem Molekulargewicht, und verleiht ihnen eine negative Nettoladung, wodurch sie im elektrischen Feld zum Pluspol wandern.

Das bisher am stärksten verbreitete Gelsystem, zur Trennung von Proteinen mittels der SDS-PAGE, ist das sogenannte Laemmli-System. Es werden Tris-Glycin-Gele verwendet, die aus einer Sammelgel-Komponente und einer Trenngel-Komponente bestehen. Durch das Sammelgel werden die Proteine zu Beginn des elektrophoretischen Durchlaufs in scharfe Banden aufkonzentriert. Im Trenngel variieren die Acrylamidgel-Prozentsätze, um die Proteine ihres Molekulargewichts nach aufzutrennen. Polyacrylamid ist ein Polymer von Acrylamidmonomeren. Das Polyacrylamidgel ist nicht fest, sondern besteht aus quervernetzten Tunneln durch ein Geflecht aus Fasern, in welchem die Proteine wandern. [?]

Das System benutzt ein diskontinuierliches Puffersystem, da der Laufpuffer (Tris pH 8.3), der Puffer für das Sammelgel (Tris, pH 6.8) und der Puffer für das Trenngel (Tris, pH 8.8) unterschiedlich sind (s. Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Die Zusammensetzung eines 12%igen Trenngel und eines 10%igen Sammelgels für insgesamt zwei Gele.

Chemikalie	Trenngel	Sammelgel	Einheit
VE-Wasser	3,237	2,070	mL
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	-	mL
1 M Tris pH 6,8	-	380	$\mu\text{L}$
Rotiphorese 30	4,028	0,490	mL
10 % SDS	100	30	$\mu\text{L}$
TEMED	10	3,8	$\mu\text{L}$
10 % APS	100	30	$\mu\text{L}$

Zuerst wird das 12%ige Trenngel (ca. 4,5 mL) gegossen und mit Isopropanol geglättet bevor das 10%ige Sammelgel (ca. 1,5-2 mL) überdies gegossen wird. In der Zeit zum Aushärten des Gels werden die Proben vorbereitet. Hierfür werden

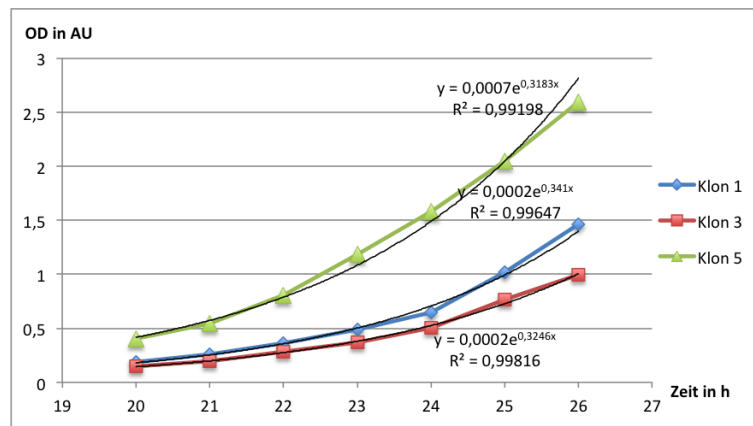
24  $\mu\text{L}$  Probe mit 8  $\mu\text{L}$  einer Probenpuffer-Mercaptoethanol-Suspension (92  $\mu\text{l}$  Probenpuffer, 8  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Inkubation unterstützt den Vorgang der Denaturierung der Proteine. Die Proben und ein Marker, mit Banden zwischen 10 und 200 kDa, werden anschließend in die Taschen appliziert.

Die Elektrophorese läuft, in einer vertikalen Kammer unter Kühlung, bei einer Gleichspannung von 200 V. Nach dem Lauf wird das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in einer Fixierlösung für eine Stunde leicht geschwenkt. Danach kann es für maximal 15 Stunden in eine Färbelösung mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt werden. Das Entfärben erfolgt in einer 25 %igen Methanol-Lösung für einmal 30 Minuten und nochmal 15 Minuten.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Vorversuche

Die Vorversuche im Schüttelkolben ergaben die, der Abbildung 8 zu entnehmenden, Wachstumskurven.

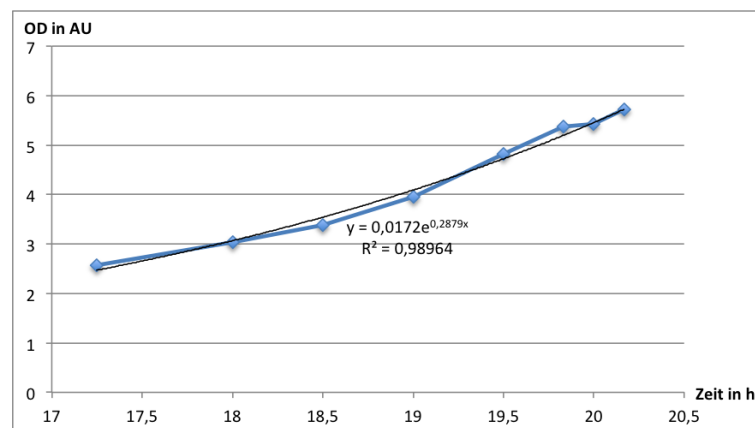


**Abbildung 8:** Wachstumskurven der Klone, mit 1 mL Animpfvolumen auf 99 mL Vorkulturmedium, im Schüttelkolben. Angezeigt wird dazu die mittels Excel eingetragene exponentielle Trendlinie und deren Richtigkeit ( $R^2$ ).

Die Klone weisen minimal unterschiedliche maximale Wachstumsraten auf:

- Klon 1: 0,341 1/h
- Klon 3: 0,3246 1/h
- Klon 5: 0,3183 1/h

Mit Klon 5 wurden die ersten Kultivierungen durchgeführt und daher eine Arbeitszellbank erstellt. Die Klyroröhrchen besitzen eine OD von 1,648 AU. Zur Kontrolle wurde eine Wachstumskurve aufgenommen (s. Abb. 9).



**Abbildung 9:** Wachstumskurve der Arbeitszellbank von Klon 5, mit 2 mL Animpfvolumen auf 98 mL Vorkulturmedium, im Schüttelkolben. Angezeigt wird dazu die mittels Excel eingefügte exponentielle Trendlinie und deren Richtigkeit ( $R^2$ ).

Die Arbeitszellbank erreichte eine maximale Wachstumsrate von 0,2879 1/h. Die Umstellung von Formel 4.2 ergab eine Dauer der Vorkultur von ca. 17,5 Stunden bei einer gewünschten OD von 5 AU am Ende.

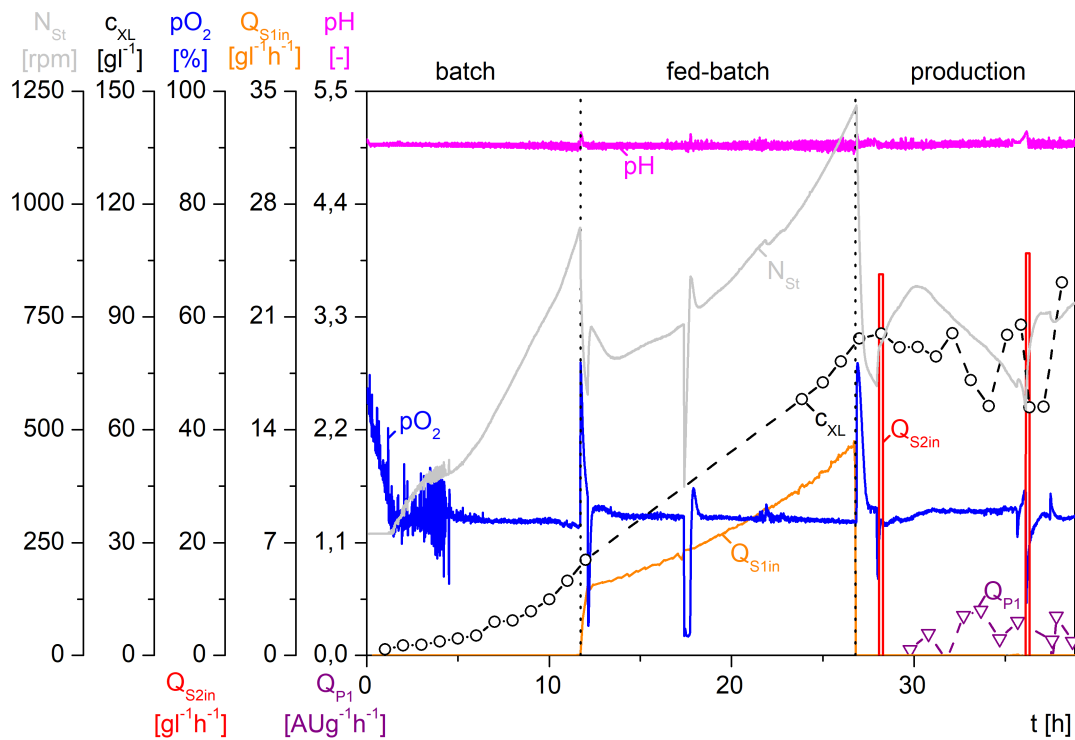
## 5.2 Klon 5

Alle Kultivierungen verliefen in ihrer Batchphase wie erwartet. Die Fed-Batchphasen zeigten anfänglich kleine Schwierigkeiten, verliefen im Anschluss jedoch den Erwartungen entsprechend. In der Produktionsphase kam es nicht wie angenommen zu einem Zellwachstum, dennoch wurde bei allen Klonen eGFP gebildet. Nach der Kultivierung von Klon 5 wurde für die weiteren Klone die  $pO_2$ -Regelung abgestellt und die letzte Rührerdrehzahl der Fed-Batchphase konstant gehalten, um mehr Aufschluss bezüglich der Reaktion der Hefe auf das Methanol zu bekommen. Die Fermentation von Klon 5 und 3 wurden am BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus1 durchgeführt. Klon 1 wurde am BIOSTAT<sup>®</sup> Aplus2 kultiviert.

### 5.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung von Klon 5 erfuhr zur 19. Prozessstunde einen kurzzeitigen Absturz der DCU, verlief daraufhin dennoch ohne weitere Vorkommnisse und mit

einer konstanten Temperatur und konstantem pH-Wert.



**Abbildung 10:** Kultivierungsverlauf von Klon 5 im BIOSTAT® Aplus1.

Die Batchphase wurde mit einer Vorkultur angeimpft, deren OD 6,54 AU betrug. Der  $pO_2$ -Wert sinkt von anfänglichen 46,5 % innerhalb der ersten 1,5 Stunden auf 25 %. Dementsprechend greift die  $pO_2$ -Regelung und die Rührerdrehzahl steigt nach 1,5 Stunden von ihrem festgelegten Minimalwert (270 rpm) an. Die  $pO_2$ -Sonde lieferte für diesen Zeitraum stark schwankende Werte, wodurch die Rührerdrehzahl fast linear anstieg. Erst nach einer Prozessdauer von ungefähr 5 Stunden erreicht der Rührer eine Drehzahl von 400 rpm. Dadurch lieferte die  $pO_2$ -Sonde ruhigere Werte und die Rührerdrehzahl stieg exponentiell. Dies hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, da die Zellkonzentration ein exponentielles Wachstum aufweist. Klon 5 erzielte in der Phase des unlimitierten Wachstums ein  $\mu_{max}$  von 0,2409 1/h und eine Zellkonzentration von 25,45 g/L. Das Batchende wurde nach 11,8 Stunden erreicht.



Zu Beginn der Fed-Batchphase zeigte sich kurzzeitig eine starke Zunahme der Rührerdrehzahl, gefolgt von leichtem Sinken. Nach ungefähr 2 Stunden stieg die Drehzahl passend zum exponentiellen Pumpprofil des Substrats (S1). Das Zellwachstum wurde von den anfänglichen Umständen wenig beeinflusst und erreichte eine kontrollierte Wachstumsrate ( $\mu_w$ ) von 0,0803 1/h und eine Zellkonzentration von 84,2 g/L.

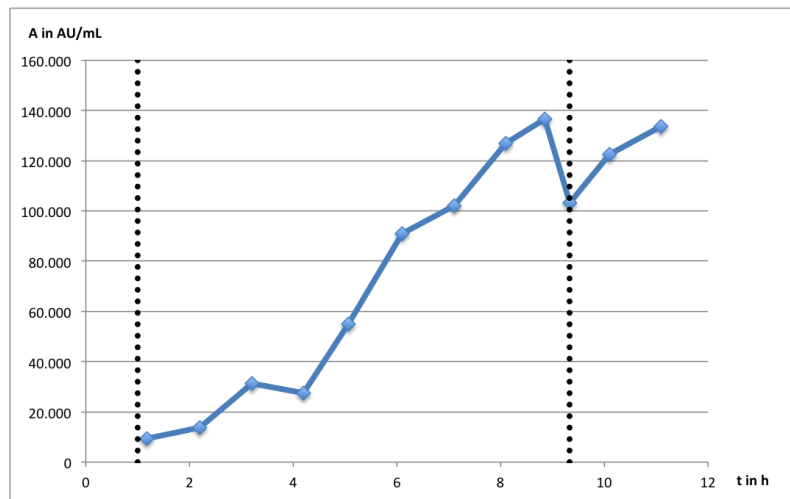
Nach 15 Stunden Fed-Batchphase begann die Produktionsphase, indem die Fütterung stoppte. Ein  $pO_2$ -*Peak* entstand, wodurch die Rührerdrehzahl stark sank. Unverzüglich nach Anstieg des  $pO_2$ -Wertes nahm dieser wieder ab und wurde bei 25 % von dem Rührer wieder aufgefangen. Nach 1 Stunde Wartezeit wurden 20 mL Methanol über das Septum hinzugegeben. Auf die Volumenzugabe reagierte der  $pO_2$ -Wert direkt mit einem kurzzeitigen Absinken auf 13,6 %. Die Rührerdrehzahl stieg auf 817 rpm bis zur 30. Prozessstunde an und sank anschließend für 6 Stunden, bis zur nächsten Methanolzugabe, auf 545 rpm. Die zweite Methanolzugabe von 20 mL verursachte ein schwächeres Absinken des  $pO_2$ -Wertes als die erste Zugabe. Eine Stunde danach zeigte sich ein kleiner  $pO_2$ -*Peak*. Die Rührerdrehzahl pendelte sich, nach einer leichten Zunahme, um die 750 rpm ein. Die Zellkonzentration nahm zu Beginn der Phase minimal ab und unterlag nach 4 Stunden starken Schwankungen. Die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate schwankte dadurch ebenfalls. Nach der ersten Methanolzufuhr nahm die Produktbildungsrate für 2,7 Stunden zu und sank dann bis in den negativen Wertebereich ab, um kurz darauf wieder stark zuzunehmen und vorübergehend für eine Stunde fast konstant zu bleiben. In diesem Zeitraum erreichte die Produktbildungsrate ihren Maximalwert von 0,436 AU/(g · h). Es folgt ein erneutes Absinken mit anschließendem Anstieg. Nach zweiter Zugabe von Methanol nahmen Zellkonzentration und Produktbildungsrate erst ab. Nach ca. 40 Minuten kam es zu einer kräftigen Zunahme für beide Parameter. In der letzten Produktionsstunde nahm die Produktbildungsrate ab.

Die Kultivierung von Klon 5 verlief in der Batchphase und Fed-Batchphase wie erwartet. Der anfälligen  $pO_2$ -Messung am Anfang der Batchphase wurde für die nächste Kultivierung mit einer Erhöhung der minimalen Rührerdrehzahl versucht zu verhindern. Die Fed-Batchphase zeigte leichte Probleme zu Beginn, doch erreichte am Ende die geplante hohe Zelldichte. Die Produktionsphase lieferte keine

deutlichen Anzeichen im  $pO_2$  oder der Rührerdrehzahl, ab wann das Methanol verbraucht wurde. Wodurch eine weitere Zugabe sehr spät erfolgte, um die Zellen nicht mit einer zu hohen Methanolkonzentration zu vergiften. Das teilweise kurzweilige Ansteigen des Rührers lässt sich beim ersten Mal gegebenenfalls mit einer eGFP-Bildung (s. Abb. 11), möglicherweise auf Kosten des Zellwachstums, assoziieren. Ferner könnte der Anstieg nach der zweiten Methanolzugabe mit Zellwachstum und eGFP-Bildung in Verbindung gebracht werden. Dadurch kommt die Annahme auf, dass Klon 5 Biomasse und eGFP nicht durchgehend gleichzeitig produzieren kann. Die Wartezeit zwischen der Fed-Batch- und Produktionsphase sollte die Zellen besser auf das Methanol vorbereiten. Es könnte aber auch zu einer Stoffwechselumstellung auf die Nebenprodukte, des vorherigen Metabolismus auf Glycerin, geführt haben und daher den Substratwechsel von Glycerin auf Methanol für die Zellen erschwert.

### 5.2.2 Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzmessung ergab eine größtenteils konstante Zunahme in der eGFP-Bildung über den Zeitraum der Produktion.



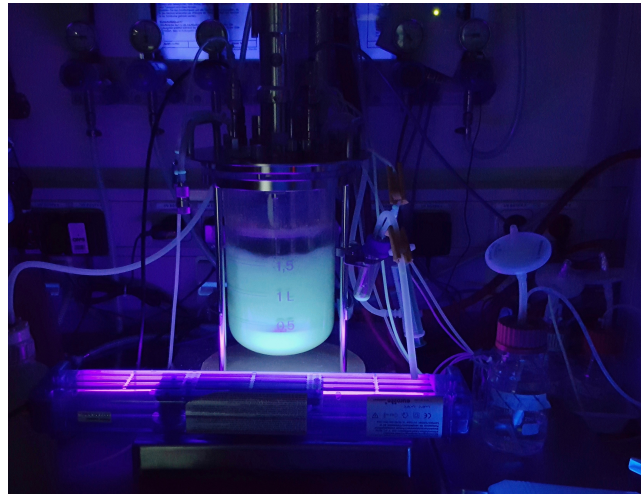
**Abbildung 11:** Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 5. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar.

Zehn Minuten nach Zugabe des Methanols befindet sich die Fluoreszenz bei 9.255 AU/mL. Dies ist die Zunahme gegenüber der letzten Probe aus dem Fed-Batch. Es folgt ein mehrheitlicher Anstieg über 9 Stunden bis zu 136.540 AU/mL, gefolgt von einem starken Einbruch auf 103.270 AU/mL. Nach dem Einbruch erfolgte die zweite Zugabe an Methanol und die Fluoreszenz stieg wieder auf 133.595 AU/mL.

Im Vergleich mit der Zellkonzentration zeigt sich, dass gerade im von Zeitraum 5 – 7 Stunden in der Produktion, die Fluoreszenz steigt und die Zellkonzentration sinkt. Das Absinken der Fluoreszenz nach 8 Stunden weist auf einen bestehenden Substratmangel hin. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Methanolzugabe bestätigt dies.

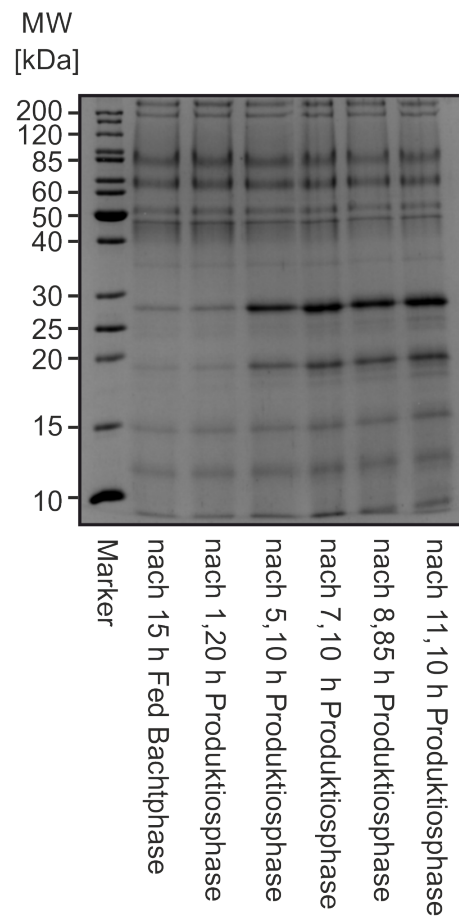
Die hohe Fluoreszenz schon kurz nach Methanolzugabe ist, durch bereits existierendes eGFP, bedingt durch die Autoinduktion, am Ende der Fed-Batchphase erklärbar. Genaueres dazu findet sich im folgenden Kapitel.

Nach ca. 6 Stunden Produktionsphase war genügend eGFP vorhanden, sodass sich die grüne Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht deutlich zeigte.



**Abbildung 12:** Foto der Kultivierung von KlON 5 nach über 8 Stunden in der Produktionsphase.

## 5.2.3 SDS-PAGE



**Abbildung 13:** SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 5. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen.

In Abbildung 13 sind Überstände der Proben aus der Produktionsphase, sowie der Überstand der letzten Probe im Fed-Batch in einem SDS-Gel zu sehen. Das Protein eGFP besitzt ein Molekulargewicht von 26,9 kDa und ist in jeder *Lane* mit einer Bande vertreten. Die Bande nimmt mit der Zeit an Stärke zu. Die zweite *Lane* zeigt, dass es im Fed-Batch schon zur Bildung von eGFP kam. Dies kann durch Autoinduktion zustande gekommen sein. F. William Studier beschrieb 2005 bei einem rekombinanten *E.coli*-Stamm, die Fähigkeit bestimmter Medien, die Proteinexpression zu induzieren, sobald die Zellen ihre Sättigung erreicht hatten. [18] Zwischen der zweiten und dritten *Lane* besteht optisch keinen ein Unterschied, da die erste Probenahme in der Produktionsphase 1,2 Stunden nach Beginn dieser genommen wurde, jedoch erst 10 Minuten seit der Methanolzugabe vergangen waren. Dies zeigt wiederum, dass es zu keiner verstärkten Autoinduktion kam. Zudem weisen die letzten drei *Lanes* stärkere Banden im Bereich von 10 – 20 kDa auf. Besonders um die 19 kDa befindet sich eine Bande, welche nach der Induktion an Stärke zunimmt. Es kann sich hierbei nicht um das Enzym Alkoholoxidase 2 handelt. Diese besitzt mit seinen acht Proteinuntereinheiten ein Molekulargewicht von ca. 675 kDa. Daher könnte es auf Zellbruchstücke abgestorbener Zellen hindeuten.

## 5.3 Klon 3

### 5.3.1 Kultivierung

Die Fermentation von Klon 3 startete mit einer hohen OD aus der Vorkultur. Möglicherweise befanden sich die Hefen im Schüttelkolben schon in einer Sauerstofflimitierung. Dies wird jedoch von dem Verlauf der Kultivierung nicht bestätigt. Kurz nach Beginn der Batchphase kam es zu einem Absinken des  $pO_2$ -Werts als Folge fehlender Druckluft. Diese wurde ca. 50 Minuten nach Start für das Gebäude abgestellt und ungefähr eine Stunde später erst wieder angestellt. Diese Zeit wurde mit einer einminütigen Sauerstoffbegasung überbrückt. Die restliche Kultivierung verlief ohne weitere äußerliche Einflüsse.

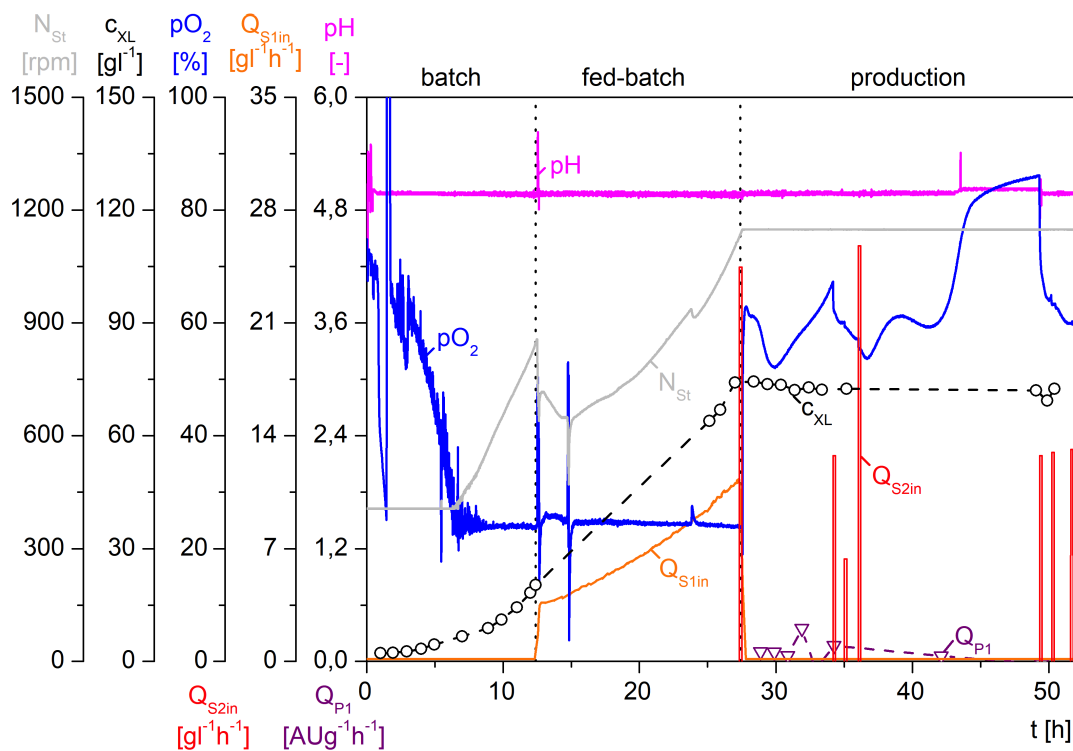


Abbildung 14: Kultivierungsverlauf von Klon 3 im BIostat<sup>®</sup> Aplus1.

Die Vorkultur von Klon 3 betrug eine OD von 8,64 AU beim Animpfen. Der Batch startete wie erwartet mit einem sinkenden  $pO_2$ -Wert und konstanter Rühr-

erdrehzahl. Die minimale Rührerdrehzahl wurde auf 400 rpm hochgesetzt, um ein klareres Messsignal der  $pO_2$ -Sonde zu erhalten. Dies schwankt trotzdem relativ deutlich bis eine Drehzahl von um die 500 rpm erreicht wurde. Nach 6,3 Stunden begann die  $pO_2$ -Regelung und der Rührer stieg fast linear bis zum Batch-Ende an. Das Zellwachstum verlief exponentiell und erreichte am Ende der Batchphase eine Zellkonzentration von 20,4 g/L mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,1987 1/h. Zum Batch-Ende kam es nach 12,5 Stunden.

Die Fed-Batchphase startete mit einer abfallenden Rührerdrehzahl, bis es kurz vor der 15. Prozessstunde zu einem erneuten  $pO_2$ -*Peak* mit drastischen Sinken der Rührerdrehzahl kam. Der  $pO_2$  nahm zuerst einen Wert von 53 % an und sank im Anschluss direkt auf 4 % ab. Der Rührer regulierte den  $pO_2$  sofort wieder auf 25 %. Danach verlief die Fütterungsphase wie erwartet und erzielte eine Zellkonzentration von 74,1 g/L am Ende. Zudem wurde ein Wachstumsrate von 0,0801 1/h erreicht.

Nach der Fed-Batchphase wurde unverzüglich Methanol hinzugegeben. Für die Produktionsphase wurde die  $pO_2$ -Regelung ausgestellt und die Drehzahl auf den letzten Wert der Fed-Batchphase gesetzt. Dadurch wurde die Produktion mit einer konstanten Drehzahl von 1.148 rpm durchgeführt.

Direkt nach der Zugabe von 20 mL Methanol stieg der  $pO_2$ -Wert auf 63 % an und begann anschließend zu sinken. Nach einer kurzen Stagnation nahm der Wert in den nächsten 1,5 Stunden weiter bis auf 53 % ab. Es folgte ein fast linearer Anstieg des  $pO_2$ -Wertes, bis zur nächsten Zugabe von Methanol nach fast 7 Stunden in der Produktionsphase. Es wurden 10 mL hinzugegeben, worauf der  $pO_2$ -Wert sofort steil absank und bei ca. 60 % für 30 Minuten unverändert bleibt. Danach veranlasste eine leichte Zunahme im  $pO_2$  zu einer dritten Methanolzugabe von 5 mL bereits 50 Minuten nach der letzten. Der  $pO_2$ -Wert fiel wieder ab für ungefähr eine 1 Stunde, dann wurden 20 mL Methanol zugegeben und die Kultivierung über Nacht laufen gelassen. In der Zeit sank der Sauerstoffpartialdruck kurz auf 53 %, stieg auf 61 %, sank wieder kurz und stieg im Anschluss für Stunden steil an. Während des  $pO_2$ -Anstiegs kam es zu einem *Peak* im pH-Wert, ähnlich dem *Peak* zum Zeitpunkt des Batch-Endes. Der  $pO_2$ -Wert erzielte ein Maximum von 86 %, wo es zur fünften Zugabe an Methanol (10 mL) und einem signifikantem Absinken kam. Es schlossen sich, in einem zeitlichen Abstand von fast einer Stunde und andert-

halb Stunden, zwei weitere Zugaben von 10 mL Methanol an. Dies geschah immer als Reaktion auf einen leicht zunehmenden  $pO_2$ -Wert. Zu Zellwachstum kam es in der Produktionsphase nicht. Die ermittelten Werte zeigen, dass eine mittlere Zellkonzentration von ca. 72 g/L aufrechterhalten wurde.

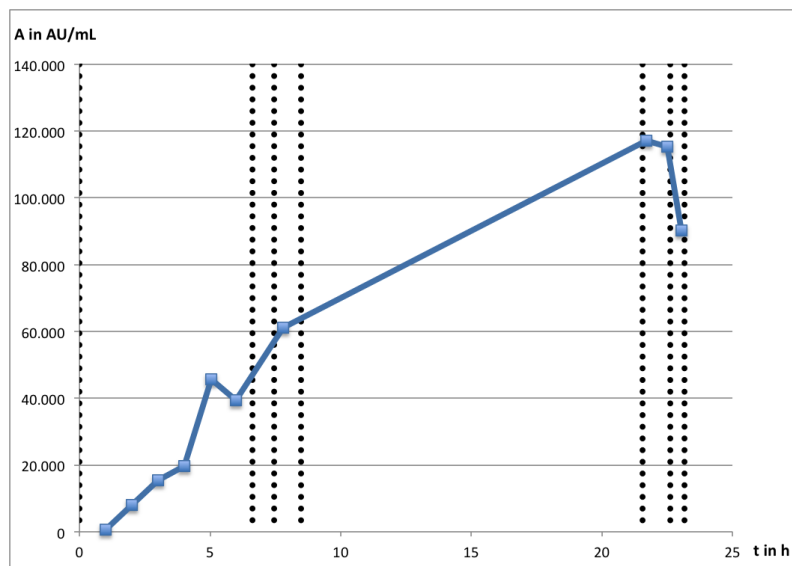
Die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate verzeichnete vorwiegend geringe, jedoch hauptsächlich positive Werte und startete mit einem Wert von 0,1 AU/(g · h), knapp 2 Stunden nach Methanolzugabe. Für die nächsten zwei Stunden kam es zu einer leichten Abnahme, bis ungefähr 5 Stunden nach Methanolzugabe der Maximalwert von 0,35 AU/(g · h) erreicht wurde. Im Anschluss sank der Wert stark und stieg wieder bis zur zweiten Zugabe an Methanol. Über die Nacht nahm die Produktbildungsrate stetig bis in den Minusbereich ab.

In der Fermentation von Klon 3 wurden in der Batch- und Fed-Batchphase die gesetzten Ziele, eines exponentiellen Zellwachstums und in der Bereich hoher Zelldichten zu gelangen, erreicht. Lediglich der anfängliche Zeitraum der Fed-Batchphase verlief nicht optimal. Der zweite  $pO_2$ -*Peak* gleicht einem zweiten Batch-Ende und weist auf einen Substratmangel in den ersten 2,5 Stunden hin. Dies könnte an einer zu geringen Pumprate zu Beginn liegen und mit einer geringeren konzentrierten Glycerinlösung im *Feed* behoben werden. Die Pumpe begann mit einer relativen Pumprate von 3,9 % und ist bei einer so niedrigen Rate nicht verlässlich. Bei einer Substratkonzentration von 300 g/L, statt 400 g/L, ergibt sich eine theoretische relative Startfütterungsrate von 5,8 %. Diese Pumprate wäre schon ausreichend, um eine bessere Leistung der Pumpe zu erhalten.

Die Produktionsphase zeigte, wie bei Klon 5 kein Zellwachstum. Aufgrund dessen wurden bei Klon 3 mit unterschiedlichen Volumina bei der Substratzugabe gearbeitet. Begonnen wurde gleichermaßen mit 1,5 % des Reaktorvolumens, da die Zellen ihren Stoffwechsel umstellen müssen und eine hohe Methanolkonzentration förderlich wirken soll. Durch das Festsetzen der Rührerdrehzahl konnte, anhand eines steigenden  $pO_2$ -Wertes, auf einen beginnenden Substratmangel geschlossen werden. Darauf wurde meist mit der Zugabe von Methanol reagiert. Dazu könnte ein pH-*Peak* ein weiteres Anzeichen sein, da die Hefe bei Wachstum saure Stoffwechselprodukte herstellt. Dennoch blieben erwartete  $pO_2$ -*Peaks* aus und es gab keine genaue Aussage, ob eine weitere Methanolzugabe zu einer toxischen Konzentration im Medium führen könnte. Stattdessen zeigte sich, dass die kurzzeitig nacheinander

folgende dreimalige Substartzugabe einen positiven Effekt auf die eGFP-Bildung (s. Abb. 15) und negativen auf die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate, da die Zellkonzentration unverändert blieb, hatte. Dies könnte wie bei Klon 5 auf einen gespaltenen Stoffwechsel, bezüglich der Bildung von Biomasse und eGFP, hindeuten. Die mehrfache Methanolzugabe am nächsten Morgen änderte am Zellwachstum nichts mehr.

### 5.3.2 Fluoreszenzmessung



**Abbildung 15:** Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 3. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar.

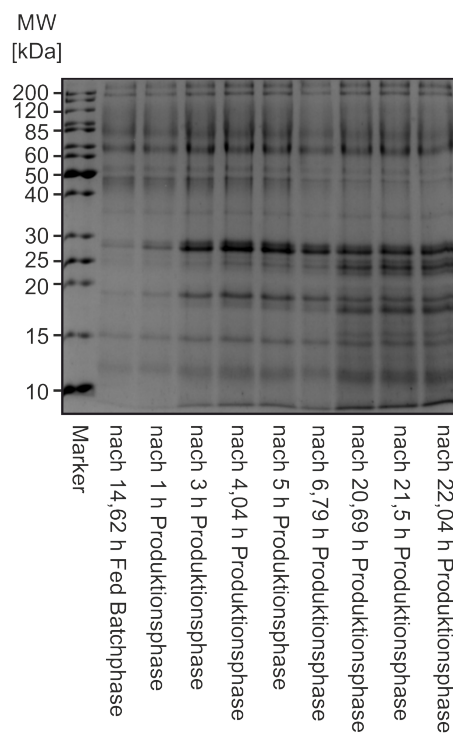
Die Fluoreszenz im Medium nahm, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, durchgehend zu. Für die ersten vier Stunden ist ein Anstieg mit einer starken Steigung zu erkennen. Passend zum Verlauf des  $pO_2$  kam es nach 5 Stunden zu einer kurzzeitigen Abnahme. Die Zugabe an Methanol sorgte für eine erneute hingegen schwächere Zunahme der Fluoreszenz. Die leichte Abnahme der Produktivität nach der zweiten Methanolzugabe (s. Abb. 14) ist in der Fluoreszenz nicht direkt zu erkennen. Jedoch ist die Steigung niedriger als zuvor und lässt die Vermutung nahe,



das Proteasen in der Phase der Substratlimitierung (der Nacht) in gleicher Weise eGFP wie abgestorbene Zellen abgebaut haben. Folgend wäre die gemessene Fluoreszenz nach 21,6 Stunden nur ein bestimmter Teil, dessen was bis dahin gebildet wurde. Erneutes Hinzufügen von Methanol am Morgen, hatte womöglich einen kontraproduktiven Effekt auf die bereits angeschlagenen Zellen, sodass es zu keiner eGFP-Bildung mehr kam und vorhandenes weiter abgebaut wurde.

### 5.3.3 SDS-PAGE

Abbildung 16 zeigt, die Überstände der Proben aus der Produktionsphase, sowie der Überstand der letzten Probe im Fed-Batch im SDS-Gel.



**Abbildung 16:** SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 3. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen.

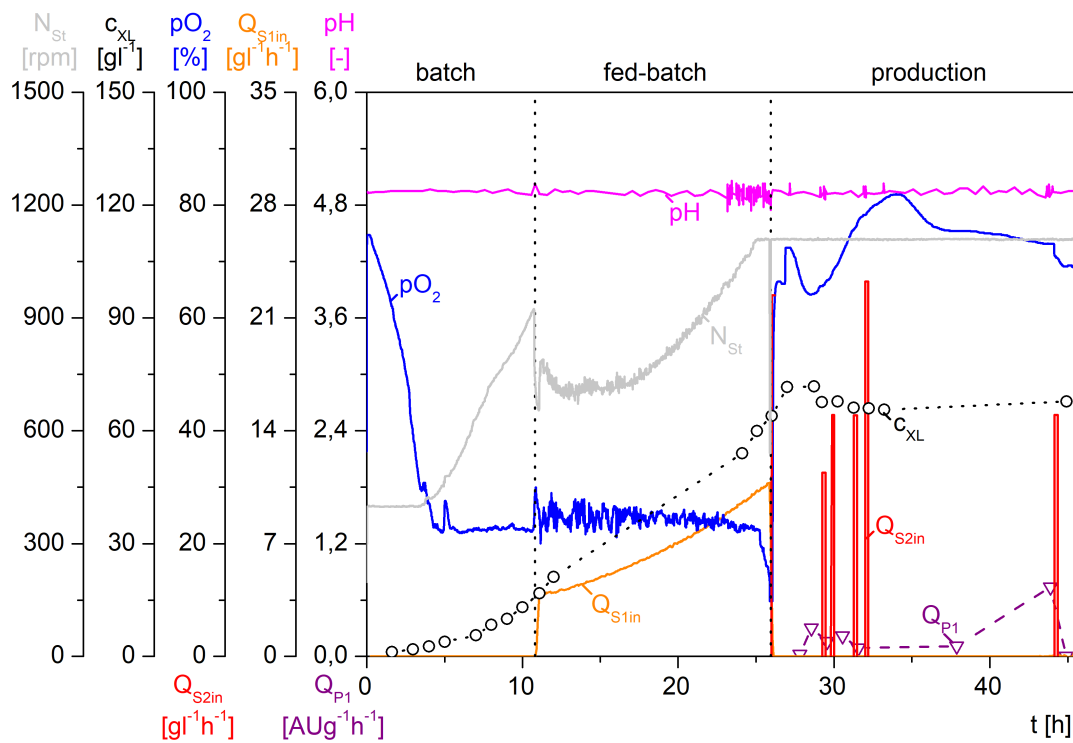
Die eGFP spezifische Bande ist in allen Proben vorhanden. Sie nimmt bis zur 5.

Stunde in der Produktionsphase zu und wird in den folgenden Proben etwas geringer. Die Probe nach ca. 7 Stunden Produktion ist besonders blass. Dies ist auf einen möglichen Fehler bei der Probenvorbereitung zurückzuführen und spricht für eine eigentlich dickere Bande, entsprechend der vorherigen Proben. Andererseits könnte die Tatsache, dass die Probenahme kurz nach einer Methanolzugabe erfolgte, auch eine Auswirkung gehabt haben. Die letzten drei *Lanes* besitzen, genauso wie bei Klon 5, stärkere Banden im Bereich von 10 – 20 kDa. Dies kann ebenfalls auf Zellbruchstücke abgestorbener Zellen hindeuten und in Verbindung mit der Fluoreszenz und der wachstumgekoppelten Produktbildungsrate, könnte es sich möglicherweise um abgebautes eGFP handeln. Ebenso kam es bei Klon 3 zur Autoinduktion, da schon eine leichte Bande in *Lane 2* zu erkennen ist.

## 5.4 Klon 1

### 5.4.1 Kultivierung

Die Kultivierung von Klon 1 verlief grundsätzlich erfolgreich, war dennoch von Zwischenfällen durch den Rührer geprägt. Aufgrund dessen ergaben sich stark ausschlagende  $pO_2$ -Werte, die mit Hilfe einer Mittelwertberechnung in MATLAB<sup>®</sup> geglättet wurden. Darüberhinaus wurde bei konstanter Temperatur und etwas unruhigerem pH-Wert als erwartet kultiviert.



**Abbildung 17:** Kultivierungsverlauf von Klon 1 im BIOSTAT® Aplus2. Die Wert für die Zellkonzentration wurden eine Stunde zu weit eingetragen.

Die Batchphase wurde mit einer niedrigen OD von 4,46 AU angeimpft und verlief wie erwartet. Im Zellwachstum wurde eine Zellkonzentration von 21,2 g/L mit einem  $\mu_{max}$  von 0,2271 1/h erreicht. Zum Batch-Ende kam es nach 11 Stunden. In der Fed-Batchphase nahm die Messstörung im  $pO_2$ -Signal durch den fehlerhaften Rührer zu. Zu Beginn nimmt die Rührerdrehzahl in den ersten 3 Stunden ab. Erst nach ca. 6 Stunden in der Fed-Batchphase startet eine exponentielle Zunahme der Drehzahl. Dazu erreichte der Rührer in der 25. Prozessstunde seine maximale Rührerdrehzahl von 1.1089 rpm, wodurch der  $pO_2$ -Wert auf 9,8 % sank. Dies wurde eine Stunde später erst bemerkt und unmittelbar in die Produktion gewechselt. Das Zellwachstum erreichte trotzdem ein  $\mu_w$  von 0,0927 1/h und eine Zellkonzentration von 71,6 g/L am Ende der knapp 15 stündigen Fütterungsphase. In der Produktionsphase von Klon 1 wurde, in gleicher Weise wie bei Klon 3, die  $pO_2$ -Regelung

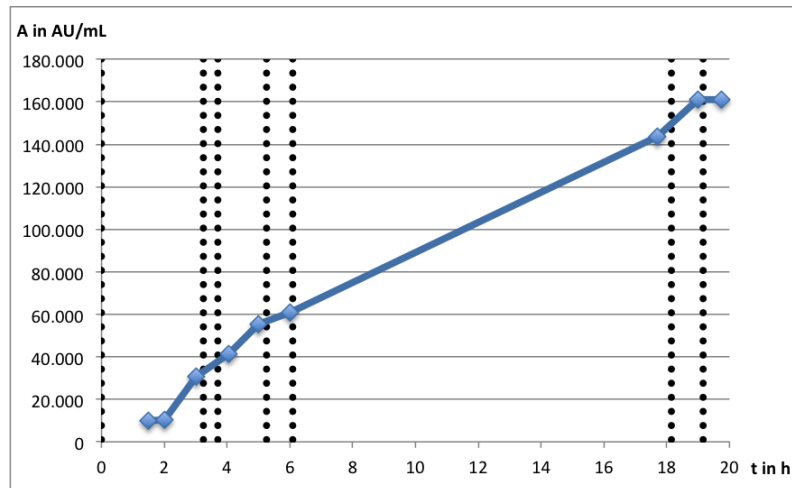
ausgeschaltet und die letzte Rührerdrehzahl der Fed-Batchphase gehalten. Dazu wurde gleichermaßen auf einen sinkenden  $pO_2$ -Wert mit der Zugabe von Substrat reagiert. Die Produktion begann mit der direkten Zugabe von 20 mL Methanol. Der  $pO_2$ -Wert stieg signifikant auf 66 % an, stagnierte dort kurz und erreichte danach unmittelbar 72 %. Von dort aus sank der Wert, einem Batch-Anfang ähnlich, kurzweilig ab. Es folgten weitere Zugaben von Methanol (3x 10 mL, 20 mL) in kurzen Abständen, worauf der  $pO_2$ -Wert weiter zunahm. Die Zugabe von 20 mL Methanol fand als letzte, vor der weiteren Kultivierung über Nacht, statt. In der 8. Produktionsstunde, ca. 6 Stunden nach der letzten Substratzugabe, fing der  $pO_2$ -Wert an zu sinken. Erst etwas stärker und nach ungefähr anderthalb Stunden sehr langsam. Am Morgen wurden 10 mL Methanol hinzugegeben, weswegen der  $pO_2$ -Wert für einen Moment wieder stark abnahm.

Bei Klon 1 gab es, wie bei den anderen beiden Klonen, in der Produktionsphase kein Zellwachstum, sondern eine minimale Abnahme. Für die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate wurden nur Ergebnisse im positiven Wertebereich erzielt. Sie startete mit einer Zunahme von fast Null auf 0,3 AU/(g · h) innerhalb von 1,75 Stunden. Es kam zu einem Abfall zwischen zwei weiteren Methanolzugaben. Gleiches passierte bei den zwei weiteren zeitnahen Zugaben. In den anderthalb Stunden dazwischen nahm die Produktbildungsrate ein wenig zu. Während der Nacht stieg die Rate für die ersten 6 Stunden um 10 % und für die folgenden 6 Stunden um 86 % auf ihren Höchstwert von 0,74 AU/(g · h). Nach der letzte Zugabe an Methanol am nächsten Morgen, nahm die wachstumgekoppelte Produktbildungsrate auf Null ab.

Die Fermentation von Klon 1, ergab einen Batchverlauf den Erwartungen entsprechend. In der Fed-Batchphase erfuhren die Zellen, ebenfalls wie bei Klon 5 und 3, zu Beginn eine Substratlimitierung, durch eine zu geringe Startzufütterungsrate. Ebenso zeigt sich ein ähnliches Verhalten beim nicht vorhandenen Zellwachstum in der Produktionsphase. Die Produktbildungsrate nimmt hauptsächlich zu, sodass in diesem Fall bei einem sinkenden  $pO_2$ -Wert wirklich von einer eGFP-Bildung ausgegangen werden kann, aber von keinem Zellwachstum.

### 5.4.2 Fluoreszenzmessung

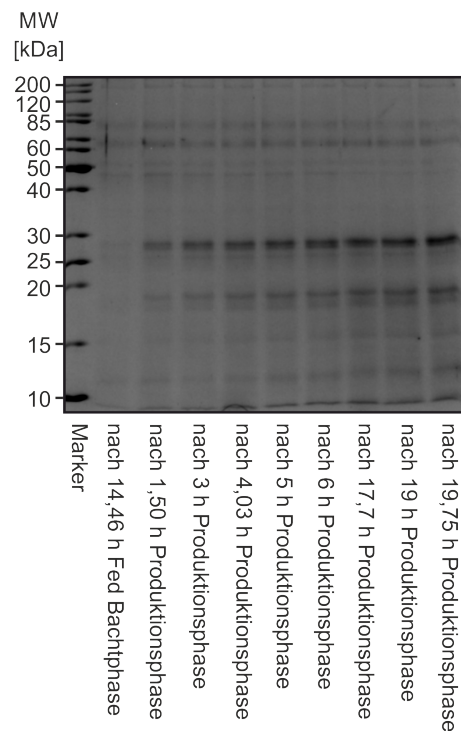
Für Klon 1 ergibt sich in der Fluoreszenz eine konstante lineare Zunahme im Laufe der Produktion.



**Abbildung 18:** Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 1. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar

Es zeigt sich, dass die vermehrten Zugaben von Methanol in einem kurzen Zeitraum vorteilhaft auf die eGFP-Bildung ausgewirkt haben und nicht zu einer toxischen Konzentration geführt haben. Aufgrund von Abbildung 17 lässt sich, für die kritische Phase der Nacht, keine Substratlimitierung erkennen. Es wäre möglich, dass bei fortführender Kultivierung eine weitere Bildung von eGFP festzustellen gewesen wäre. Die Produktbildung ist auch bei Klon 1 zu Lasten des Zellwachstums. Es scheint jedoch zu keinem starken energetischen Defizit in den Zellen zu kommen, welches sich auf die Bildung von eGFP auswirkt. Bezüglich Klon 1 ist zu sehen, dass die Bildung von eGFP mit einer gleichmäßigen Fütterung von Methanol funktionieren würde. Dazu ist deutlich, dass kein Zellwachstum zu erwarten wäre.

## 5.4.3 SDS-PAGE



**Abbildung 19:** SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 1. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen.

Die Abbildung 16 zeigt in der zweiten *Lane* den Überstand der letzten Probe aus der Fed-Batchphase. In *Lane* 3 bis 10 sind die Überstände aus der Produktion aufgetragen. Es ist deutlich die Bande, des eGFP und deren gleichmäßige Zunahme über die Zeit, zu erkennen. Generell weisen die *Lanes* weniger starke Banden im Bereich von 10 – 20 kDa und 60 – 85 kDa auf. Gerade der Bereich von 10 – 20 kDa deutet auf weniger Zellbruchstücke, gegen Ende der Kultivierung, hin. Allerdings nicht im gleichen Ausmaß wie bei Klon 3 und Klon 1. Dadurch, dass diese Banden erst mit Start der Produktionsphase auftreten und sich verstärken, spricht dies für ein leichtes Absterben von Zellen zu den Zeiten des steigenden  $pO_2$ -Wertes in Abbildung 17 auf Seite 44.

Des Weiteren kam es zu keiner Autoinduktion im Fed-Batch, was eine Erklärung für die gleichmäßigere Bildung an eGFP sein könnte und auf eine wahrscheinlich bessere Fähigkeit der Verarbeitung von Methanol schließen lässt.

## 6 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Bachelorarbeit sollte eine Kultivierungsstrategie zur Expression von eGFP, für einen zuvor klonierten Stamm der Hefe *Pichia pastoris*, aufgestellt werden. Zielführend wurde der, für die Produktion von remobinanten Proteinen, typische dreistufige Prozess der Hochzelldichtekultivierung aufgestellt. Dieser wurde mit drei Klonen (1, 3, 5) der Hefe durchgeführt und auf deren Expressionsverhalten hin analysiert.

Das Protein eGFP spielt eine wichtige Rolle als biologischer Marker in der Forschung. Die Fusionierung mit einem anderen Protein, ohne Benachteiligung beider Proteine, hat eGFP zu einem essentiellen Werkzeug der Zellbildgebung werden lassen. [10]

Für die Arbeit standen zwei Bioreaktoren des Modells BIOSTAT® Aplus zur Verfügung, mit denen der Prozess zum Großteil automatisiert werden konnte. Der dreistufige Kultivierungsprozess wurde in das Softwareleitsystem MFCS/win eingearbeitet und stets optimiert. Der Fermentationsprozess besteht aus einer Zellanzucht durch eine wachstumsunlimitierte Batchphase und einer wachstumslimitierenden Fed-Batchphase. In beiden Phasen wird mit Glycerin als Substrat gearbeitet. In der Batchphase wurden stets 30 g/L und für die Fütterung ein Reservoir mit 400 g/L verwendet. Ebefalls wurden alle Kultivierungen mit einer 15 stündigen Fed-Batchphase betrieben. Es folgt eine Produktionsphase mit Methanol als Substrat und Induktor für die Expression.

Der verwendete rekombinante Stamm von *Pichia pastoris* wurde zuvor in der AG Noll an der HAW kloniert. Daher gab es noch keine Kenntnisse über Wachstumscharakteristika des Stammes und Vorversuche im Schüttelkolben wurden durchgeführt.

Die Fermentationen der Klone 1, 3 und 5 verliefen mehrheitlich ohne Komplikationen und führten jedes Mal zu einer messbaren und unter UV-Licht sichtbaren eGFP-Bildung. Alle Kultivierungen erreichten eine hohe Zelldichte von um die 76 g/L. Dennoch zeigte sich bei den Klonen, in den jeweiligen Produktionsphasen, bezüglich der Verarbeitung des Methanols kein eindeutiges Verhalten. Dazu kam es bei keinem der Klone zu einem Zellwachstum in dieser Phase. Klon 5 weist, aufgrund einer schwankenden Zellkonzentration, eine alternierende wachstumge-

koppelte Produktbildungsrate auf. Klon 3 wiederum erreicht in der Produktbildungsrate knapp Werte, die über Null liegen und besitzt in der volumenspezifischen Fluoreszenz die schwächsten Werte. Etwas bessere Werte sind bei Klon 1 zu vernehmen. Dieser hat im Vergleich mit den anderen Klonen die höchste volumenspezifische Fluoreszenz und auch eine gleichmäßige eGFP-Bildung.

Alle Klone sind fähig überwiegend konstant eGFP zu bilden, dennoch ist die Produktion rekombinanter Proteine auf metabolischer Ebene ein kostspieliger Prozess. Es führt zu einer Abweichung vieler zellulärer Prozesse von ihrem evolutiven Ziel des Zellwachstums und -Erhaltung und kann zu einer energetischen Insuffizienz im Metabolismus führen. [6] Dies ist deutlich bei den Klonen zu sehen und der Grund, weshalb Klon 1 im Gesamten als ertragreichster Produzent abschneidet. Der AOX1 Promotor dieses Klons ist nicht durch andere Komponenten im Medium induzierbar, sodass es nur beim Vorhandensein von Methanol zur Bildung von eGFP unter einem Zellerhaltungsstoffwechsel kommt. Dies weist auch bei Klon 1 auf einen energetischen Konflikt in den Zellen hin, dennoch nicht so ausgeprägt wie beiden anderen.

Das Ziel eine Kultivierungsstrategie für die Expression von eGFP aufzustellen, wurde mehrheitlich erreicht. Lediglich die Produktionsphase bedarf einer weiteren Bearbeitung in Bezug auf eine kontinuierliche Methanolzufuhr. Fernerhin kann, durch den Vergleich der Klone, eine Festlegung auf Klon 1 als günstigster Produzent für Folgeversuche erfolgen.



## 7 Ausblick

Unter der Voraussetzung, dass mit Klon 1 weitergearbeitet wird, sollte für die Durchführung weiterer Versuche einige Punkte berücksichtigt werden.

In der Fed-Batchphase kam es zur Substratlimitierung zu Beginn, daher empfiehlt sich mit einem geringer konzentrierten *Feed* zu arbeiten, um mit einer verlässlicheren Pumprate zu starten. Dadurch wird sich das hinzukommende Volumen in den Reaktor erhöhen und das Startvolumen der Batchphase sollte reduziert werden. Einer Verkürzung der Fed-Batchphase widerspricht, der dadurch entstehende Verlust an möglicher Zellmasse. Diese ist ausschlaggebend in der Produktionsphase, falls es dort erneut zu keinem Zellwachstum kommt. Zur Vermeidung einer Schaumbildung, sollten die oberen Rührerblätter entsprechen adjustiert werden.

Für die Produktionsphase wäre das Arbeiten mit einer Methanol-Sonde, um Aufschluss über den Verbrauch an Methanol pro Stunde zu bekommen, hilfreich. Im Anschluss könnte eine Pumpe für die Methanolzufuhr etabliert werden, sodass eine Substratlimitierung bei Kultivierungen über Nacht vermieden werden kann. Falls es dabei zu einem Wachstum der Zellen kommen sollte, wäre ein exponentielles Pumpprofil empfehlenswert. Ist dies nicht der Fall, könnte mit einem konstanten Profil und stark verdünnten Methanollösung gearbeitet werden.

Dazu könnte ein Aufschluss der Zellen Kenntnis darüber bringen, wie viel eGFP von den Zellen noch nicht in das Medium sekretiert wurde.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AG</b>	Arbeitsgruppe
<b>AOX1</b>	Gen für die Alkoholoxidase 1
<b>AOX2</b>	Gen für die Alkoholoxidase 2
<b>Aox1</b>	Alkoholoxidase 1
<b>Aox2</b>	Alkoholoxidase 2
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>AU</b>	<i>arbitrary unit</i>
<b>DCU</b>	<i>Digital Controlling Unit</i>
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>eGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>IR</b>	Infrarot
<b>MFC</b>	<i>Mass-Flow-Controller</i>
<b>MFCS/win</b>	<i>Multi Fermentor Control System for Windows™</i>
<b>MUT<sup>+</sup></b>	<i>Methanol utilization plus phenotype</i>
<b>MUT<sup>S</sup></b>	<i>Methanol utilization slow phenotype</i>
<b>MUT<sup>-</sup></b>	<i>Methanol utilization minus phenotype</i>
<b>MW</b>	<i>Molecular Weight</i>
<b>NTC</b>	<i>Negativ Temperatur Coefficient</i>
<b>pAOX1</b>	Promtor des AOX1 Gens
<b>P. pastoris</b>	<i>Pichia pastoris</i>
<b>Pt</b>	Platin
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
<b>S1</b>	Substrat 1 (Glycerin)

<b>S2</b>	Substrat 2 (Methanol)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## Nomenklatur

$\dot{A}_{eGFP}$ :	Geschwindigkeit der Fluoreszenzbildung	[AU/h]
$c_{S0}$ :	Substratkonzentration zu Beginn der Batchphase	[g/L]
$c_{S1L}$ :	Zellanzucht-Substratkonzentration (Glycerin)	[g/L]
$c_{S2L}$ :	Induktor-Substratkonzentration (Methanol)	[g/L]
$c_{S1R}$ :	Substratkonzentration im Reservoir (Glycerin)	[g/L]
$c_{P1L}$ :	Produktkonzentration	[g/L]
$c_{XL0}$ :	Startzellkonzentration	[g/L]
$c_{XL}$ :	Zellkonzentration	[g/L]
$c_{XLj}$ :	Zellkonzentration zum Zeitpunkt $t_j$	[g/L]
F:	Verdünnungsfaktor	[-]
$F_R$ :	Pumprate	[L/h]
$F_{Rj}$ :	Startsubstratzufütterungsrate	[L/h]
$F_{Rw}$ :	Sollsubstratzufütterungsrate	[L/h]
$K_{X/OD}$ :	Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zur Zellkonzentration	[-]
$m_L$ :	Reaktorvolumen	[g]
$\dot{m}_{R1}$ :	Substratmassenstrom in den Reaktor	[g/h]
$\dot{m}_{S1in}$ :	Substrateintragsrate	[l/h]
$N_{St}$ :	Rührerdrehzahl	[rpm]
OD:	optische Dichte	[-]
$OD_{VK}$ :	optische Dichte der Vorkultur	[-]
pH:	pH-Wert	[-]
$pO_2$ :	relativer Sauerstoffpartialdruck	[%]
$Q_{P1}$ :	wachstumgekoppelte Produktbildungsrate	[AU/g·h]
$Q_{S1in}$ :	Substrateintragsrate (Glycerin)	[g/L·h]

---

$q_{S1/Xm}$ :	zellspezifische Maintenance-Substrataufnahmerate	[1/h]
$\rho_{S1}$ :	Dichte des Substratreservoirs	[g/l]
t:	Prozesszeit	[h]
$t_j$ :	Start der Fütterung	[h]
$t_{exp}$ :	Ende der exponentiellen Wachstumsphase	[h]
$t_0$ :	Beginn exponentiellen Wachstumsphase	[h]
$V_L$ :	Reaktorvolumen	[L]
$V_{Lj}$ :	Kulturvolumen im Reaktor zum Zeitpunkt $t_j$	[L]
$V_{LB}$ :	Gesamtvolumen des Kulturmediums im Biotreaktor	[L]
$V_{LVK}$ :	Gesamtvolumen der Vorkultur	[L]
$y_{X/S}$ :	Substratausbeutekoeffizient	[g/g]
$\mu_{max}$ :	maximale spezifische Wachstumsrate	[1/h]

## Literaturverzeichnis

- [1] AHMAD, Mudassar ; HIRZ, Melanie ; PICHLER, Harald ; SCHWAB, Helmut: Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* (2014). <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>. – DOI 10.1007/s00253-014-5732-5. – ISSN 0175-7598, 1432-0614
- [2] CORNELISSEN, Gesine: *Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologischer wirksamer Proteine mit Pichia pastoris*, Universität Hannover, Diss., 2004
- [3] CEREGHINO, Joan L. ; CREGG, James M.: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: *FEMS Microbiology Reviews* (2000). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>. – DOI 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. – ISSN 1574-6976
- [4] LOOSER, V. ; BRUHLMANN, B. ; BUMBAK, F. ; STENGER, C. ; COSTA, M. ; CAMATTARI, A. ; FOTIADIS, D. ; KOVAR, K.: Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. In: *Biotechnology Advances* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008. – ISSN 07349750
- [5] CORNELISSEN, Gesine: *Pharmaceutical Biochemical Engineering*. Hamburg, 2014
- [6] PEÑA, David A. ; GASSER, Brigitte ; ZANGHELLINI, Jürgen ; STEIGER, Matthias G. ; MATTANOVICH, Diethard: Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. In: *Metabolic Engineering* (2018). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017>. – DOI 10.1016/j.ymben.2018.04.017. – ISSN 10967176
- [7] ZHANG, W. ; BEVINS, M. A. ; PLANTZ, B. A. ; SMITH, L. A. ; MEAGHER, M. M.: Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. In: *Biotechnology and Bioengineering* (2000). – ISSN 0006-3592

- [8] TSIEN, Roger Y.: THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. In: *Annual Review of Biochemistry* 67 (1998). <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.509. – ISSN 0066–4154, 1545–4509
- [9] ZIMMER, Marc: Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. In: *Chemical Reviews* (2002). – ISSN 0009–2665
- [10] ARPINO, James A. J. ; RIZKALLAH, Pierre J. ; JONES, D. D.: Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 Å Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222. In: *PLoS ONE* 7 (2012). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047132>. – DOI 10.1371/journal.pone.0047132. – ISSN 1932–6203
- [11] DAY, Richard N. ; DAVIDSON, Michael W.: The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. In: *Chemical Society Reviews* (2009). <http://dx.doi.org/10.1039/b901966a>. – DOI 10.1039/b901966a. – ISSN 0306–0012, 1460–4744
- [12] HIRSCH, Janet: *Einsatz einer Multibioreaktoranlage zur Optimierung von Bioprozessen über Variation von Medienbestandteilen und Operatonsparametern mittels Design of Experiments*. 2015
- [13] AG, Endress + Hauser M.: *Sauerstoffsensoren und -messumformer*. <https://www.de.endress.com/de/messgeraete-fuer-die-prozesstechnik/fluessigkeitsanalyse-produktuebersicht/sauerstoff-sensoren-messumformer>. Version: 2018
- [14] SAEIDI, Mohammad J.: *Etablierung einer dreistufigen Kultivierung der Hefe Pichia pastoris in einem Laborfermenter*. 2017
- [15] METTLER TOLEDO GMBH: *InPro 6850i, 6900i & 6950i Series O2 Sensors, Bedienungsanleitung*. [https://www.mt.com/de/de/home/library/tips-and-tricks/lab-analytical-instruments/Guide\\_pH\\_meas/jcr:content/download/file/file.res/51300058\\_pH-Guide\\_D.pdf](https://www.mt.com/de/de/home/library/tips-and-tricks/lab-analytical-instruments/Guide_pH_meas/jcr:content/download/file/file.res/51300058_pH-Guide_D.pdf). Version: 2018

- [16] MÜLLER, Holger: *BlueInOne FERM*. 2015
- [17] DEMMER, Jan ; KLEINDIENST, Birte: *Site Acceptance Test eines BIOSTAT Aplus Prototypen*. 2014
- [18] STUDIER, F. W.: Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. In: *Protein Expression and Purification* (2005). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>. – DOI 10.1016/j.pep.2005.01.016. – ISSN 10465928

## Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des Abbaus von Methanol in <i>Pichia pastoris</i> . 1 Alkoholoxidase; 2 Katalase; 3 Formaldehyd-Dehydrogenase; 4 Formiat-Dehydrogenase 5 Dihydroxyaceton-Synthase; 6 Dihydroxyaceton-Kinase; 7 Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase; 8 Fructose-1,6-bisphosphatase [3] . . . . .	4
2	Eine dreidimensionale Darstellung der Kristallstruktur von GFP. Gezeigt werden die 11 $\beta$ -Faltblätter in der tertiären b-Fass-Struktur, durch dessen zylindrischen Hohlraum eine $\alpha$ -Helix Struktur führt, welche das Chromophor trägt. [11] . . . . .	6
3	Dargestellt wird der prinzipielle Verlauf einer dreiphasigen Fermentation, welcher mit der Grafiksoftware Origin erstellt wurde. [12] .	7
4	Aufbau der gesamten Anlage zur Kultivierung am BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus1. . . . .	10
5	Foto der Probenahmeeinheit am BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus2. . . . .	16
6	Dargestellt ist ein Screenshot der Client-Module des MFCS/win Shell. [2] . . . . .	18
7	Das Plasmid <i>pBSY2z_eGFP</i> des rekombinanten Stammes <i>BSYBG11</i> , dargestellt mit Hilfe der Software SnapGene. . . . .	21
8	Wachstumskurven der Klone, mit 1 mL Animpfvolumen auf 99 mL Vorkulturmedium, im Schüttelkolben. Angezeigt wird dazu die mittels Excel eingefügte exponentielle Trendlinie und deren Richtigkeit ( $R^2$ ). . . . .	31
9	Wachstumskurve der Arbeitszellbank von Klon 5, mit 2 mL Animpfvolumen auf 98 mL Vorkulturmedium, im Schüttelkolben. Angezeigt wird dazu die mittels Excel eingefügte exponentielle Trendlinie und deren Richtigkeit ( $R^2$ ). . . . .	32
10	Kultivierungsverlauf von Klon 5 im BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus1. . . . .	33
11	Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 5. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar. . . . .	35



12	Foto der Kultivierung von Klon 5 nach über 8 Stunden in der Produktionsphase. . . . .	36
13	SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 5. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen. . . . .	37
14	Kultivierungsverlauf von Klon 3 im BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus1. . . . .	38
15	Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 3. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar. . . . .	41
16	SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 3. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen. . . . .	42
17	Kultivierungsverlauf von Klon 1 im BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus2. Die Wert für die Zellkonzentration wurden eine Stunde zu weit eingetragen. . . . .	44
18	Die volumenspezifische Fluoreszenz im Laufe der Produktionsphase von Klon 1. Die gestrichelten Geraden stellen die Zeitpunkte der Methanolzugabe dar . . . . .	46
19	SDS-Gel der Probenüberstände aus der Kultivierung von Klon 1. Die letzte Probe der Fed-Batchphase und ausgewählte Proben aus der Produktionsphase wurden aufgetragen. . . . .	47

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht der angenommenen Wachstumskriterien für <i>Pichia pastoris</i> BSYBG11. Die Nomenklatur befindet sich auf Seite 53. . . . .	19
2	Die Zusammensetzung eines 12%igen Trenngels und eines 10%igen Sammelgels für insgesamt zwei Gele. . . . .	29
3	Übersicht der verwendeten Geräte für die Kultivierungen. . . . .	60
4	Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der Biotrockenmasse. . . . .	61
5	Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der optischen Dichte. . . . .	61
6	Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der Fluoreszenz. . . . .	61
7	Übersicht der verwendeten Geräte zur Herstellung der SDS-Gele. . . . .	61
8	Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Herstellung des Vorkultur- und Batchmediums. . . . .	62
9	Übersicht der verwendeten Chemikalien bei Kultivierung. . . . .	62
10	Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Herstellung der SDS-Gele. . . . .	62
11	Zusammensetzung des Batchmediums . . . . .	63
12	Ein-Buchstabencode für Aminosäuren . . . . .	64

## Geräteliste

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Geräte für die Kultivierungen.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Bioreaktor	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus1
Bioreaktor	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BIOSTAT <sup>®</sup> Aplus2
pH-Sonde	Mettler Toledo	InPro 3100/3100UD/3100i
pH-Sonde	Endress+Hauser	Memosens CPS171D
pO <sub>2</sub> -Sonde	Mettler Toledo	InPro 6900(i)
pO <sub>2</sub> -Sonde	Endress+Hauser	Memosens COS81D
Niveausonde	Sartorius Stedim Biotec GmbH	-
Niveausonde	Sartorius Stedim Biotec GmbH	-
O <sub>2</sub> Abgassensor	BlueSensgassensor GmbH	BCP-02
CO <sub>2</sub> Abgassensor	BlueSensgassensor GmbH	BCP-CO2
CO <sub>2</sub> & O <sub>2</sub> Abgas- sensor	BlueSensgassensor GmbH	BlueInOne FERM
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP6201
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	ED4202S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	FB12 CCE-S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	FB12CCE-S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP2202 S
Schlauchpumpe	Ismatec SA.	ISM796
Analysenwaage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BA110S
Analysenwaage	PAG OERILKON	240-9063 PRECISA 300M
Magnetrührer	Janke und Kunkel KG IKA Werk	IKA-COMBIMAG REO/RCO
pH-Meter	Sartorius Stedim Biotec GmbH	PB-20
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	HERA Safe
Autoklav	Systec GmbH	VX-150
Schüttelinkubator	Gesellschaft für Labortechnik mbH	3032

**Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der Biotrockenmasse.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5417R
Trockenschrank	Heraeus Instruments	vacutherm
Analysenwaage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BA110S

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der optischen Dichte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Photometer	Thermo Scientific	Genesys20
Vortexer	IKA Works Inc.	MS2 Minishaker

**Tabelle 6:** Übersicht der verwendeten Geräte für die Bestimmung der Fluoreszenz.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Platten-Reader	TECAN Trading AG	GENios

**Tabelle 7:** Übersicht der verwendeten Geräte zur Herstellung der SDS-Gele.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Heizblock	Eppendorf	Thermostat plus
Blotting Modul	Bio-Rad Laboratories GmbH	-
Versorgungseinheit	Bio-Rad Laboratories GmbH	PowerPac HC Power Supply
Kühlungseinheit	Contraves	Rheotherm 115

## Chemikalienliste

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Herstellung des Vorkultur- und Batchmediums.

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
$\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Carl Roth	3746.4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth	3904.3
$\text{K}_2\text{SO}_4$	Carl Roth	PO22.3
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	3580.2
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	T888.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	P741.2
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ 99,5%	Carl Roth	3783.5

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Chemikalien bei Kultivierung.

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 25%	Carl Roth	5460.2
$\text{H}_3\text{PO}_4$ 85%	Carl Roth	6366.2
$\text{H}_3\text{COH}$ 100%	VWR	20864.320

**Tabelle 10:** Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Herstellung der SDS-Gele.

Chemikalie	Hersteller
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific
4x XT Sample Buffer	Carl Roth
10x Tris Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Coomassie R350	Bio-Rad Laboratories GmbH

## Anhang

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Batchmediums

Chemikalie	Konzentration in g/L
$\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$	1,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6,43
$\text{K}_2\text{SO}_4$	2,15
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,47
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,35
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,10
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ 99,5%	30

thermolabile Stocklösungen	Konzentration in ml/L
Biotin	8,00
PTM4	4,00

**Tabelle 12:** Ein-Buchstabencode für Aminosäuren

Buchstabe	Aminosäure
A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin
U	Selenocystein
O	Pyrrolysin