



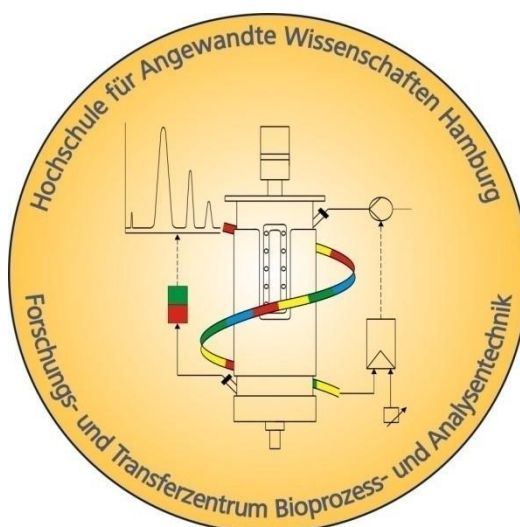
Fakultät Life Science

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

**Untersuchung und Automatisierung der Expressionsphase
einer dreistufigen Fed Batch Kultivierung von *Pichia pastoris*
zur Herstellung von eGFP**



Alexander Thoma

28. Februar 2019

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan 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

Danksagung

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.

Vorab möchte ich mich daher bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Bereitstellung des Themas, sowie für das unterstützende Feedback bedanken. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Noll für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ein besonderer Dank geht an Herrn Dipl. -Ing. Ulrich Scheffler und Dipl.-Ing. Hans-Peter Bertelsen, die mir bei technischen Fragen im Labor stets zur Seite standen. Des Weiteren möchte ich mich bei Florian Schiffler für die bereitwillige Unterstützung bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und allen Kollegen im Labor für die motivierenden Worte bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

AOX1	Alkoholoxidase 1
AOX2	Alkoholoxidase 2
AU	arbitrary units
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
DCU	digital control unit
E.coli	Escherichia coli
eGFP	enhanced green fluorescent protein
GFP	green fluorescent protein
IR-Strahlung	Infrarotstrahlung
MCB	master cell bank
MFC	mass flow controller
MFCS/win	multi fermentor control system for Windows
Mut-	Methanol utilization minus phenotype
MUT	methanol utilization pathway
Mut+	methanol utilization plus phenotyp
MutS	Methanol utilization slow phenotype
NTC	negative temperature coefficient
OD	optische Dichte
OTR	oxygen uptakte rate
OUR	oxygen uptake rate
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pAOX1	Promotor der Alkoholoxidase 1
rpm	rounds per minute
S1	Substrat 1, Glycerin
S2	Substrat 2, Methanol
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VE	demineralisiertes Wasser
WCB	working cell bank

Nomenklatur

A_P	: volumenbezogenes Fluoreszenzsignal (Medium)	[RFU l ⁻¹]
\dot{A}_P	: Änderung des volumenbezogenes Fluoreszenzsignals	[RFU l ⁻¹ h ⁻¹]
c_{S1R1}	: Substratkonzentration im Reservoir	[g l ⁻¹]
c_{S2M}	: Methanol Konzentration im Medium	[g l ⁻¹]
c_{S2R}	: Methanol Konzentration im Reservoir	[g l ⁻¹]
c_{XL}	: Zellkonzentration	[g l ⁻¹]
$c_{XL,start}$: Zellkonzentration zu Beginn der Fed Batch-Phase	[g l ⁻¹]
f	: Verdünnungsfaktor	[-]
$F_{in/out}$: Gesamter Zufluss/Abgang in/aus dem Reaktor	[g l ⁻¹]
F_{S1R1}	: Zufütterungsrate des Glycerins aus dem Reservoir	[l h ⁻¹]
$F_{S1R1,start}$: Start-Zufütterungsrate zu Beginn der Fed Batch-Phase	[l h ⁻¹]
F_Z	: Änderung der Biofeuchtphase	[l h ⁻¹]
$K_{P/A}$: Proportionalitätsfaktor Emission/Konzentration von eGFP	[g RFU ⁻¹]
$K_{X/OD}$: Umrechnungsfaktor c_{XL} zur optischen Dichte	[g l ⁻¹ AU ⁻¹]
M_{CO2}	: Molare Masse von CO ₂	[g mol ⁻¹]
M_{O2}	: Molare Masse von O ₂	[g mol ⁻¹]
m_0	: Leergewicht des Reaktionsgefäßes	[g]
m_{S2R}	: Methanol-Masse aus dem Reservoir	[g]
m_X	: Gewicht des Reaktionsgefäßes mit getrocknetem Pellet	[g]
m_{ZX}	: Gesamtgewicht des Reaktionsgefäßes mit feuchtem Pellet	[g ⁻¹]
\dot{m}_{PM}	: Änderung der Produktmasse im Medium	[g h ⁻¹]
\dot{m}_{S1M}	: Änderung der Substratmasse im Medium	[g h ⁻¹]
\dot{m}_{XL}	: Änderung der Biomasse	[g h ⁻¹]
ΔOD	: optische Dichte der Probe	[AU]
ΔOD_{probe}	: optische Dichte der verdünnten Probe	[AU]
t	: Prozesszeit	[h]
Q_{CO2}	: CO ₂ Produktionsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{O2}	: Sauerstoffeintragsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_P	: Prozessspezifisches Fluoreszenzsignal	[RFU g _X ⁻¹ ml ⁻¹]
$q_{P/X}$: spezifische Produktbildungsrate	[h ⁻¹]
$q_{PA/X}$: transformierte Produktbildungsrate (Emission)	[RFU g _P ⁻¹ h ⁻¹]
$q_{S1/X}$: zellspezifische Glycerinaufnahmerate	[h ⁻¹]

$q_{S1/Xm}$: Erhaltungskoeffizient für Glycerin	[h ⁻¹]
$q_{X/X}$: zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
$q_{X/XGr}$: echte fiktive zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
$q_{X/Xm}$: fiktive Sterberate (Erhaltungsstoffwechsel)	[h ⁻¹]
RQ	: Respirationskoeffizient	[-]
V_L	: Gesamtvolumen der flüssigen Phase im Reaktor	[l]
$V_{L,P}$: In Reaktionsgefäß pipettiertes Volumen	[l]
V_M	: Volumen des zellfreien Mediums	[l]
V_{nM}	: Normvolumen idealer Gase	[l mol ⁻¹]
$V_{L,Z}$: Volumen des Zellpellets nach Zentrifugation	[l]
V_{S2}	: Volumen von Methanol	[l]
V_{S2R}	: Volumen vom Methanol im Reservoir	[l]
$V_{S2}\%$: Volumenprozent des Methanols im Medium	[%]
V_Z	: Volumen der Biofeuchtphase	[l]
$x_{O2,in/out}$: Anteil von O ₂ in der Zuluft/Abluft	[-]
$x_{CO2,in/out}$: Anteil von CO ₂ in der Zuluft/Abluft	[-]
a_{ZX}	: Verhältnis zwischen BFM und BTM	[-]
ρ_{S2}	: Dichte von Methanol	[g l ⁻¹]
ρ_{ZX}	: Dichte der feuchten Hefezellen	[g l ⁻¹]
$Y_{X/S1}$: beobachteter Biomassen-Glycerin Ausbeutekoeffizient	[g _X g _S ⁻¹]
$Y_{X/S1Gr}$: fiktiver konstanter Ausbeutekoeffizient	[g _X g _S ⁻¹]
μ_{max}	: maximale spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{set}	: eingestellter Sollwert der spezifische Zellwachstumsrate	[h ⁻¹]

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Nomenklatur	III
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretische Grundlagen	3
3.1 Das Expressionssystem <i>Pichia Pastoris</i>	3
3.1.1 Methylophilie	3
3.1.2 Der Produktionsstamm <i>Pichia pastoris</i> BSYBG11	5
3.2 Das fluoreszierende Protein eGFP	7
3.3 Der dreistufige Kultivierungsprozess.....	9
3.3.1 Die Batchphase	10
3.3.2 Die Fed Batch-Phase.....	11
3.3.3 Die Produktionsphase.....	13
4 Methoden.....	15
4.1 Der Bioreaktor BIOSTAT® Aplus.....	15
4.1.1 Die Grundeinheit.....	16
4.1.2 Instrumentierung.....	16
4.1.2.1 Temperierung	16
4.1.2.2 Begasung	17
4.1.2.3 Durchmischung.....	17
4.1.2.4 Sonden und Elektroden	18
4.1.2.5 Abgasanalytik	19
4.1.2.6 Substrat-/Induktions-/Korrekturmittelzufuhr	21
4.1.2.7 Probenahme	21
4.2 Das Prozessleitsystem MFCS/win	21
4.2.1 Allgemeines und Funktionen.....	21
4.2.2 Kurzbeschreibung des verwendeten Rezepts	23

4.3	Vorbereitung der Kultivierung von <i>P. pastoris</i> Stamm BSYBG11	26
4.3.1	Erstellung einer <i>Working Cell Bank</i>	26
4.3.2	Anzucht der Vorkultur im Schüttelkolben	27
4.3.3	Vorbereitung des BIOSTAT® Aplus.....	27
4.4	Offline Analytik.....	28
4.4.1	Messung der optischen Dichte.....	28
4.4.2	Bestimmung der Biotrocken-/Biofeuchtmasse.....	28
4.4.3	Messung der Fluoreszenz.....	30
4.4.4	Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	30
5	Automatisierung der Produktionsphase	33
5.1	Aufgaben der Automatisierung.....	33
5.2	Bilanzierung der Flüssigkeitsphase nach dem Dreiphasenmodell.....	34
5.3	Berechnung des Induktionsvolumens	36
5.4	Umsetzung in MFCS/win	38
5.5	Ergebnisse der automatisierten Methanol-Zugabe.....	42
6	Untersuchung der Genexpression.....	44
6.1	Mathematische Beschreibung der Produktbildung	44
6.2	Vorzeitige Genexpression in Abwesenheit von Methanol.....	46
6.3	Abhängigkeit der Methanol-Konzentration auf die Genexpression	51
6.3.1	Genexpression bei 2 % Methanol-Konzentration	51
6.3.2	Genexpression bei 0,5 % Methanol-Konzentration	53
6.3.3	Vergleich der Expressionsverläufe.....	57
7	Fazit.....	59
8	Zusammenfassung	60
9	Ausblick	62
	Abbildungsverzeichnis	VIII
	Tabellenverzeichnis	X
	Literatur	XI
	Geräteliste	XIV

Chemikalienliste.....	XVI
Anhang.....	XVII

1 Einleitung

Der Markt von rekombinanten Proteinpharmazeutika kennzeichnet sich durch stetiges Wachstum [1]. Neu entwickelte Methoden der Gentechnik, sowie ein immer größer werdendes Verständnis der Genexpression in rekombinanten Systemen erweiterten die Möglichkeit der Herstellung von rekombinanten Proteinen [2].

Soll ein neues Pharmazeutikum, oder generell Produkt, auf dem Markt etabliert werden, so stellt die Qualität und die Raum-Zeit-Ausbeute des Produktes im verwendeten System einen entscheidenden Faktor dar. Bakterielle Zellen weisen zwar ein schnelles Wachstum auf, verfügen aber über keine komplexen posttranslationalen Modifikationen und neigen bei hohen Expressionsraten zu Proteinaggregation, wodurch weitere Kosten für einen anschließenden Faltungsschritt anfallen könnten [3]. Eukaryotische Expressionssysteme stellen daher eine vielversprechende Alternative dar.

Ein sehr erfolgreiches und beliebtes Expressionssystem für die Forschung und die Industrie ist die methylo trope Hefe *Pichia pastoris* (von hieran *P. pastoris*). Hierbei lassen sich mehrere ausschlaggebende Gründe aufführen:

- 1) Das Genom ist leicht durch gentechnische Methoden zugänglich
- 2) *P. pastoris* besitzt einen sehr gut regulierbaren Promotor
- 3) Es ist intrazelluläre und extrazelluläre Expression möglich
- 4) Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation (Bsp. Glycolisierung u. Disulfidbrücken-Bildung)

Des Weiteren sind Hochzelldichtekultivierungen >100 g/L möglich. Außerdem kann *P. pastoris* unter aeroben Bedingungen kultiviert werden. Dies ist daher von Vorteil, da die Bildung von Ethanol und Essigsäure in fermentativen Hochzelldichtekultivierungen zu toxischen Nebenwirkungen führen kann [4]. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen, wird *P. pastoris* in einem dreistufigen Kultivierungsprozess aufgezogen. Dies beinhaltet eine Batch-Phase, gefolgt von einer Fed-Batch Phase mit anschließender Induktion der Produktbildung.

Neben dem verwendeten Expressionssystem hängt der Erfolg (Kinetik) des Prozesses von der verwendeten Bioreaktortechnik und dem eingesetzten Medium ab [5]. Der Prozess sollte dabei kontrollierbar und stabil sein. Bei Wiederholung des Prozesses, sollte dieser möglichst reproduzierbar sein und möglichst ohne manuelle Eingriffe erfolgen. Daher stellt die Automatisierung eine weitere notwendige Aufgabe dar.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Automatisierung und Untersuchung der Expressionsphase des Expressionssystems *Pichia pastoris* zur Herstellung von eGFP. In einer vorrangigen Bachelorarbeit, durchgeführt von Christina Kirschnick, wurde der hier verwendete dreistufige Kultivierungsprozess etabliert. Zur Optimierung dieses Prozesses soll die Induktion der Genexpression automatisiert über eine Pumpe erfolgen, sodass die manuelle Induktion über ein Septum nicht länger erforderlich ist.

Weiterhin wurden in der erwähnten Arbeit verschiedene Klone des *P. pastoris* Stammes BSYBG11 kultiviert und dessen Wachstumskinetik und eGFP Expression miteinander verglichen. Die Genexpression des erfolgreichsten Klons soll hier nun weiter untersucht werden.

Der ausgewählte Klon wird zunächst über ein substratunlimitiertes Wachstum in ein exponentielles, substratlimitierendes Fed Batch Profil geführt. Nachdem eine Zelldichte von 50 g/L erreicht ist, wird Methanol, abhängig von der eingestellten Methanol-Startkonzentration, hinzugegeben. Der Verlauf der Genexpression kann im Anschluss über Messung der Fluoreszenz verfolgt werden. Die Einstellung der Methanol-Startkonzentration soll hierbei Aufschluss über eine mögliche Toxizität und den Einfluss auf die Produktbildung geben. Dafür wird eine Methanol-Konzentration von 0,5 % und 2 % (v/v) eingestellt.

Für eine korrekte Einstellung der Methanol-Startkonzentration, müssen formabhängige Parameter des Organismus mitberücksichtigt werden, die während der Fed Batch-Phase bestimmt werden. Zur Kontrolle der korrekten vorgegebenen Dosierung steht eine Waage zur Verfügung, dessen Signal elektronisch erfasst werden kann.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Das Expressionssystem *Pichia Pastoris*

Der Erfolg des Expressionssystems von *P. pastoris* beruht auf den stark regulierbaren Promotor *pAOX1*, welcher für das Protein Alkohol Oxidase 1 (AOX1) codiert. AOX1 katalysiert die Umwandlung von Methanol zu Formaldehyd, wodurch die Hefe in der Lage ist Biomasse aufzubauen und somit Methanol als einziges Substrat (C-Quelle) zu verwenden [6]. Zur Produktion von heterologen rekombinanten Proteinen, erfolgt die Kultivierung von *P. pastoris* auf Glukose oder Glycerin. Zum einen kann dadurch eine hohe Zelldichte erreicht werden [7] und zum anderen fungieren beide Substrate als eine Art Repressor des AOX1 Promotors, wobei Glukose den weitaus stärkeren Repressor-Charakter aufweist [8]. Zum weiteren Verständnis des Expressionssystems, wird nachfolgend der Methanol-Metabolismus bzw. *methanol utilization pathway* (MUT) von *P. pastoris* erläutert. Anschließend erfolgt die Vorstellung des *P. pastoris* Stamm BSYBG11, welcher hier zur Expression von eGFP verwendet wurde.

3.1.1 Methylothropie

Methylothropie beschreibt die Fähigkeit reduzierte Kohlenwasser, bestehend aus einem oder mehreren C-Atomen, jedoch ohne C-C Bindungen, als Substratquelle zu verwenden und somit Zellwachstum zu ermöglichen [9]. Die methylothrophe Hefe *P. pastoris* ist in der Lage Methanol zu entgiften und hieraus Biomasse aufzubauen. Der erste Schritt in dem Methanol-Metabolismus, besteht in der Expression der Alkoholoxidasen AOX1 und AOX2, welche die Umwandlung von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid katalysieren. Beide Gene stehen unter der Kontrolle von stark regulierten Promotoren, welcher sich nur durch Methanol induzieren lassen. Der gesamte Methanol-Abbauprozess ist in Abbildung 1 dargestellt. Es wird sich hierbei auf das wesentliche beschränkt.

Bei der Umwandlung von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid wird Sauerstoff benötigt. Die geringe O₂-Affinität der Alkoholoxidasen wird durch die Expression von großen Mengen von AOX1 und AOX2 kompensiert. Dem entsprechend stark ist der Promotor. Die Alkoholoxidasen können bei Wachstum auf Methanol bis zu 30% aller löslicher Proteine ausmachen, wobei AOX1 viel stärker exprimiert wird als AOX2. [10]

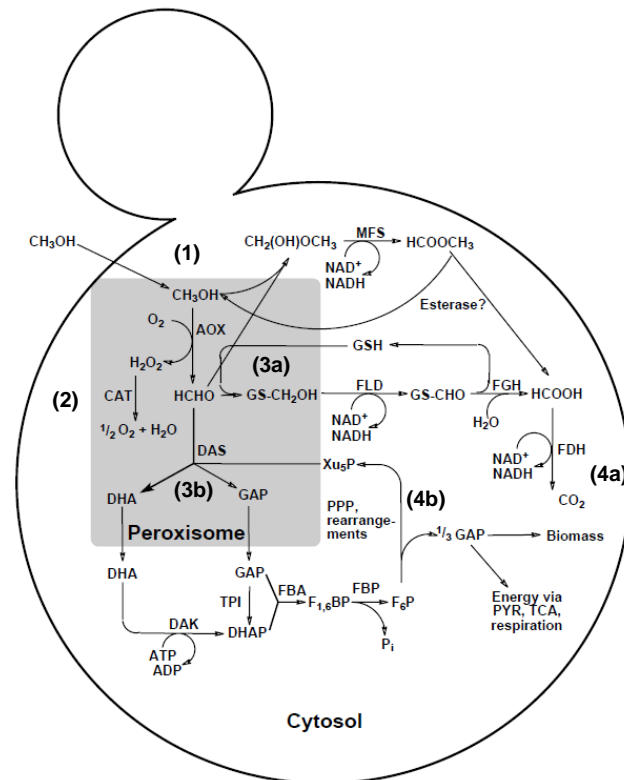


Abbildung 1: Darstellung des Methanol-Metabolismus bei methylotrophen Hefen mit: AOX: Alkoholoxidase, CAT: Katalase, FLD: Formaldehyd Dehydrogenase, FGH: S-Formylglutathion Hydrolase, FDH: Formiat Dehydrogenase, DAS: Dihydroxyacetonsynthase, TPI: Triosephosphatisomerase, DAK: Dihydroxyacetonkinase, FBA: Fructose 1,6-bisphosphataldolase, FBP: Fructose 1,6-bisphosphatase, MFS: Methylformiatsynthase; DHA: Dihydroxyaceton, GAP: Glycerinaldehyd 3-Phosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, F_{1,6}BP: Fructose 1,6-bisphosphat, F6P: Fructose 6-phosphat, Pi: Phosphat-Rest, Xu5P: Xylulose 5-phosphat, GSH: Glutathion, PYR: Pyruvat; PPP: Pentosephosphatweg, TCA: Citratcyclus. [8]

Der Abbau von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid durch AOX1 & AOX2 findet in den Peroxisomen statt **(1)**. Formaldehyd und Wasserstoffperoxid stellen giftige Substanzen dar, welche die Zellen schädigen können. Durch das Enzym Katalase, wird das Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser gespalten **(2)** und stellt somit keine Gefahr mehr für die Zelle dar. Die Entgiftung von Formaldehyd kann auf mehrere Arten erfolgen, wobei zwei kurz erwähnt werden sollen. Formaldehyd kann ohne enzymatische Reaktion mit Glutathion reagieren wodurch S-Formylglutathion entsteht **(3a)**. Über eine Reihe von enzymatischen Prozessen im Cytosol, entsteht am Ende CO₂ **(4a)** und zwei Einheiten von NADH, welche beispielsweise bei der oxidativen Phosphorylierung zur Herstellung von ATP verwendet werden können. Der zweite Weg startet durch die Verbindung von Formaldehyd mit Xylulose-5-Phosphat durch das Enzym Dihydroxyacetonsynthase (DAS). Das dadurch entstandene Glycerinaldehyd-3-Phosphat **(3b)** kann, nach weiteren Umwandlungen, die hier nicht weiter erläutert werden sollen, weiterverwendet werden, um Xylulose-5-Phosphat zu regenerieren, Biomasse aufzubauen oder Energiestoffwechsel zu betreiben **(4b)**. [11]

Bei der Entwicklung von *P. pastoris* Produktionsstämmen unterscheidet man drei Phänotypen. Solche, bei denen beide AOX Gene vorhanden sind (Mut⁺), bei denen das AOX1 Gen aus dem Genom entfernt wurde und Methanol-Methabolismus ausschließlich durch Transkription des AOX2 Gens erfolgt (Mut^S) und solche, bei welchen AOX1 und AOX2 entfernt wurde (Mut⁻) [6].

Mut⁺ : *Methanol utilization plus phenotype*

Mut^S : *Methanol utilization slow phenotype*

Mut⁻ : *Methanol utilization minus phenotype*

3.1.2 Der Produktionsstamm *Pichia pastoris* BSYBG11

Die Herstellung des verwendeten *P. pastoris* Stammes wurde nicht selbst durchgeführt, sondern erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Noll im Labor für angewandte Mikrobiologie. Der entwickelte Stamm verfügt über ein Codon-optimiertes *eGFP* Gen, welches unter Kontrolle des AOX1 Promotor (pAOX1) steht. Der Abbau von Methanol erfolgt daher lediglich durch Expression von AOX2. Somit handelt es sich bei BSYBG11 um einen Mut^S-Stamm. Der verwendete Expressionsplasmid entsteht durch Golden Gate Klonierung von Plasmid pBSY2Z (enthält pAOX1) und des *eGFP* haltigen Plasmids. Anschließend wird der Expressionsplasmid in *E.coli* transformiert und repliziert. Dieser wird linearisiert und durch Elektroporation in kompetente *P. pastoris* BSYBG11 Zellen transformiert. Dort erfolgt die Integration der DNA in das Genom durch homologe Rekombination [12].

Die Golden Gate Klonierung ist eine Methode der Gentechnik, um effizient DNA Fragmente in einen Vektor einzubauen. Das besondere dieser Methode ist hierbei der Einsatz von Typ II's Restriktionsenzymen, welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, wodurch diese nicht mit eingebaut werden [13]. Das so hergestellte Plasmid ist stabil, da durch fehlende Erkennungssequenzen nicht mehr durch Restriktionsenzyme geschnitten werden kann.

Das Expressionsplasmid wird in Abbildung 2 dargestellt.

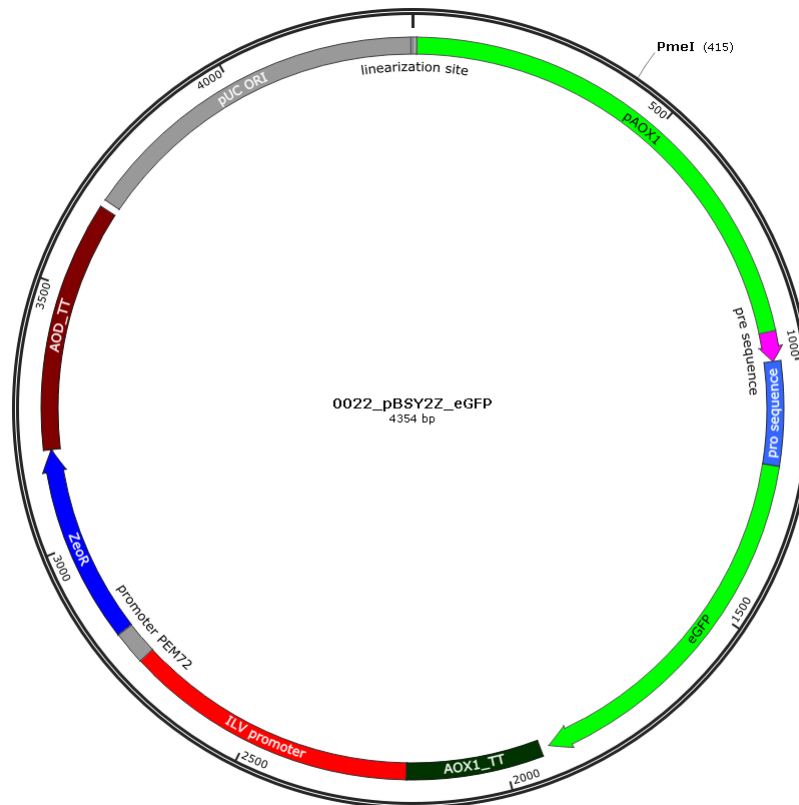


Abbildung 2: Darstellung des in *P. pastoris* Stamm BSYBG11 transformierten Expressionsvektors pBSY2Z mit Codon-optimierten eGFP Gen. Das gezeigte Plasmid wurde mit der Software SnapGene® Viewer 4.3 erstellt. Für die Aminosäuresequenz des eGFP's, der Prä- und Propeptidsequenz siehe Anhang S.XVIII.

Mit den dort gezeigten Genabschnitten:

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 <i>ZeoR</i> -Gen
Promotor PEM72	: Promotor in <i>E. coli</i> für <i>ZeoR</i> -Gen
AOD_TT	: Terminator in <i>P. pastoris</i> für <i>ZeoR</i> -Gen

Die Prä- und Propeptidsequenz codieren für Signalpeptide und sorgen für die Translation im Endoplasmatischen Retikulum. Dies ist gerade für die Sekretion ins Medium von Bedeutung. Die Proteinbiosynthese und anschließende Sekretion werden schematisch in Abbildung 3 verdeutlicht.

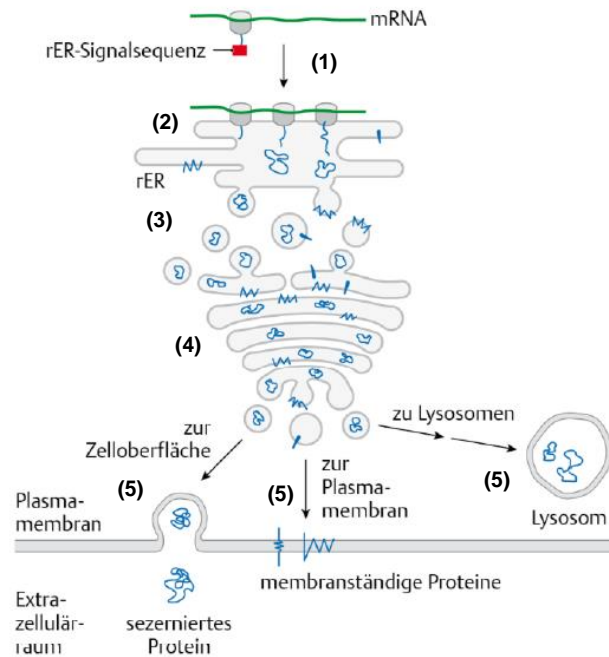


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Translation im rauen Endoplasmatischen Retikulums mit anschließender Sekretion in den extrazellulären Raum [12].

Wird die Signalsequenz erkannt, so wandert die mRNA zum rauen endoplasmatischen Retikulum (1). Die Signalsequenz wird dort durch Peptidasen abgebaut. Es erfolgt die Proteinexpression, Faltung, sowie Modifikationen am Protein (2). Eingeschlossen in Vesikeln, wandern die Protein zum Golgi-Apparat (3), in welchem weitere posttranslationale Modifikation stattfinden (4) und das Protein an sein Zielort transportiert wird (5) [14].

3.2 Das fluoreszierende Protein eGFP

Das grün fluoreszierende Protein GFP wurde erstmals von Osamu Shimomura aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert [15]. Das besondere dieser Qualle war, dass diese grünes Licht ausstrahlt, obwohl das Photoprotein Aequorin im gleichen Organismus blaues Licht emittiert [16]. Die Entdeckung des GFPs revolutionierte die Zellbiologie. Durch Herstellung von Fusionsproteinen war es möglich, Zellstrukturen und in vivo Prozesse in lebenden Zellen zu visualisieren, ohne dass es die Funktion oder den Wirkort des zu erforschenden Proteins zu verändern scheint [15, 17].

Insgesamt ist das GFP aus 238 Aminosäuren zusammengesetzt. Das Protein besitzt eine zylindrische Struktur, welche durch elf β -Faltblattstrukturen gebildet wird (Dargestellt in Abbildung 4). Innerhalb des Zylinders befindet sich eine α -Helix Struktur welche mit dem

Chromophor verbunden ist [18]. Die Bildung des Chromophors geschieht spontan, ohne den Einsatz von Proteinen oder Cofaktoren. Hierbei sind drei Aminosäuren beteiligt: Serin⁶⁵, Tyrosin⁶⁶ und Glycin⁶⁷. Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der Amidgruppe von Glycin⁶⁷ auf die Carbonylgruppe von Serin⁶⁵, wodurch ein Imidazolring gebildet wird. Nach anschließender Dehydrierung von Serin⁶⁵ erfolgt nach Oxidation der C α - und C β -Bindung der Aminosäure Tyrosin⁶⁶ die endgültige Formation des Chromophors [19]. Das Chromophor weist eine Absorption bei ungefähr 400nm auf und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 510 nm [20].

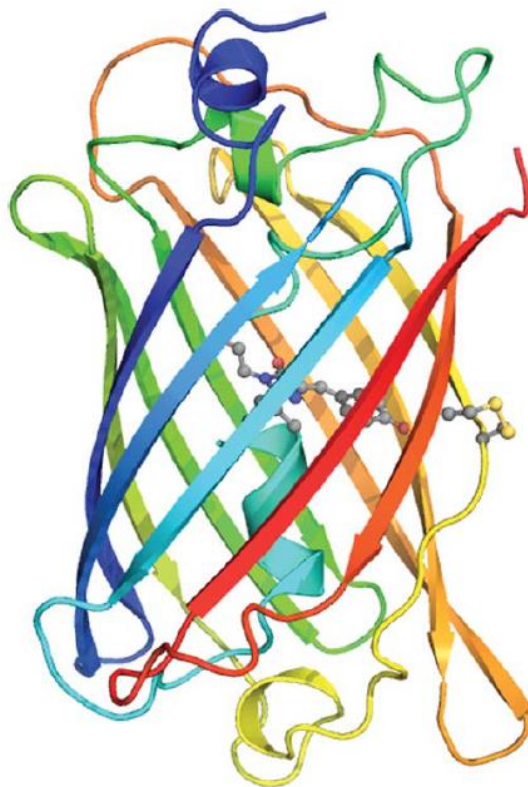


Abbildung 4: Schematische Struktur des GFP's. Dargestellt ist die Fasstruktur mit den 11 β Faltblättern (außen) und die α -Helix Struktur mit Chromophor im inneren [21].

Um die Intensität des emittierten Lichts zu verstärken und die Effizienz des Faltungsmechanismus zu verbessern, wurden beim GFP Wildtypen einige Mutationen vorgenommen. Das sogenannte eGFP (*enhanced GFP*) emittiert verstärkt Licht einer Wellenlänge von 510 nm. Es entsteht durch den Austausch von Serin⁶⁵ durch Tyrosin und von Phenylalanin⁶⁴ durch Leucin und besitzt eine molare Masse von 26,9 kDa [22].

3.3 Der dreistufige Kultivierungsprozess

Um eine hohe Produktausbeute zu erhalten, wird *P. pastoris* in einem dreistufigen Produktionsprozess kultiviert [4]. Der Prozess ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

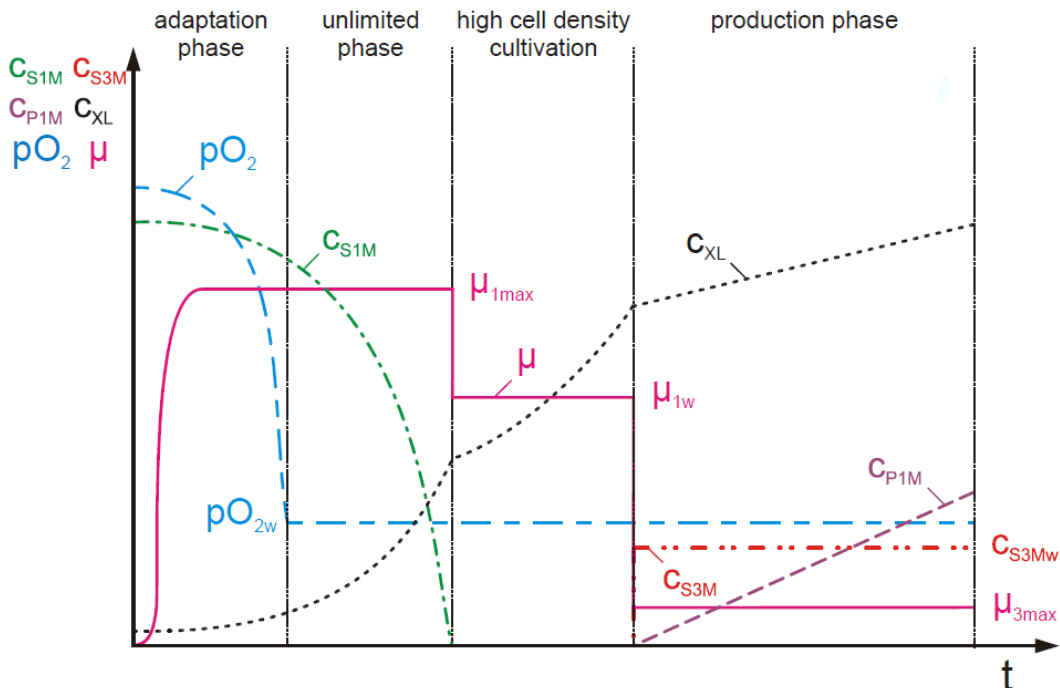


Abbildung 5: Schematische Darstellung des dreistufigen Kultivierungsprozesses [23]. Mit den hier verwendeten Bezeichnungen: c_{S1M} = Glycerin, c_{S3M} = Methanol. Methanol wird in dieser Arbeit durch den Index S2 beschrieben.

Dieser Prozess beginnt mit einer Adaptionsphase, in der sich die Zellen an die neue Umgebung im Bioreaktor anpasst. Anschließend folgt die Anzuchtphase, bei welcher die Hefezellen unlimitiert auf Glycerin wachsen. Diese Phase bezeichnet man als *batch*-phase. Der steigende Bedarf an Sauerstoff wird durch eine Regelung der Rührerdrehzahl erreicht. Anschließend wird in der *fed-batch* Phase durch Substratmittelzufuhr eine hohe Zelldichte generiert, bei welcher durch Steuerung der Wachstumsrate ein kontrolliertes Wachstum erfolgt. In der Produktphase erfolgt die Produktbildung durch Zugabe von Methanol. Im Folgenden werden die einzelnen Phasen aufgeführt und mathematisch beschrieben.

3.3.1 Die Batchphase

Das Wachstum der Mikroorganismen kann im Allgemeinen durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\dot{m}_{XL} = q_{X/X}(t) \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (3.1)$$

Mit:

\dot{m}_{XL}	: Änderung der Biomasse	[g h ⁻¹]
$c_{XL}(t)$: Zellkonzentration	[g l ⁻¹]
$q_{X/X}(t)$: zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
$V_L(t)$: Gesamtvolumen der flüssigen Phase im Reaktor	[l]

Unter Berücksichtigung der Volumenänderung des Reaktorvolumens, ergibt sich durch Produktregel und Umstellung:

$$\frac{dc_{XL}}{dt} = \left(-\frac{F_{in}(t) - F_{out}(t)}{V_L(t)} + q_{X/X}(t) \right) \cdot c_{XL}(t) \quad (3.2)$$

Mit:

$F_{in/out}(t)$: Gesamter Zufluss/Abgang in/aus dem Reaktor	[g l ⁻¹]
-----------------	--	----------------------

Verläuft die Kinetik des Zellwachstums nach Monod, so erreicht die zellspezifische Wachstumsrate, bei genügend hoher Substratkonzentration, ihren maximalen Wert μ_{max} . Vernachlässigt man die Volumenänderung durch Probenahme oder Korrekturmittelzufuhr, so kann Gleichung (3.1) integriert werden. Dadurch ergibt sich der Verlauf der Zellkonzentration bei unlimitiertem Wachstum:

$$c_{XL}(t_{j+i}) = c_{XL}(t_j) \cdot e^{\mu_{max}(t_{j+i}-t_j)} \quad (3.3)$$

Neben der Zellkonzentration kann das Zellwachstum ebenfalls über die optische Dichte beschrieben werden. Der Zusammenhang ergibt sich durch:

$$c_{XL}(t) = \Delta OD(t) \cdot K_{X/OD} \quad (3.4)$$

Mit:

$\Delta OD(t)$: optische Dichte der Probe	[AU]
$K_{X/OD}$: Umrechnungsfaktor c_{XL} zur optischen Dichte	[g l ⁻¹ AU ⁻¹]

3.3.2 Die Fed Batch-Phase

In der Fed Batch-Phase erfolgt ein kontrolliertes Wachstum der Hefezellen, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Das Wachstum wird durch die Zufütterung von Glycerin auf ein bestimmtes μ_{set} gesetzt. Die erforderliche Pumprate lässt sich durch Bilanzierung der Substratmenge herleiten. Für das Substrat gilt:

$$\dot{m}_{S1M} = -q_{S1/X}(t) \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) + F_{S1R1}(t) \cdot c_{S1R1} \quad (3.5)$$

Mit:

\dot{m}_{S1M}	: Änderung der Substratmasse im Medium	[g h ⁻¹]
c_{S1R1}	: Substratkonzentration im Reservoir	[g l ⁻¹]
$q_{S1/X}(t)$: zellspezifische Glycerinaufnahmerate	[h ⁻¹]
$F_{S1R1}(t)$: Zufütterungsrate des Glycerins aus dem Reservoir	[l h ⁻¹]

Während der Fed Batch-Phase sollen die Zellen das Substrat in der Geschwindigkeit verstoffwechseln, sowie das Substrat nachgeliefert wird. Dadurch kann kein Substrat im Medium akkumulieren. Unter der Annahme das die Substratkonzentration demnach stets 0 g l⁻¹ betragen müsste, entfällt der Ableitungsterm aus Gleichung (3.5), wodurch sich folgende Zufütterungsrate ergibt:

$$F_{R1}(t) = \frac{q_{S1/X}(t)}{c_{S1R1}} \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (3.6)$$

Für eine genauere Beschreibung der Zufütterungsrate, muss der Erhaltungsstoffwechsel der Zelle mitberücksichtigt werden. Neben dem Zellwachstum, benötigt die Zelle Energie, um die Zellintegrität aufrechtzuerhalten. Daher ist die beobachtete zellspezifische

Wachstumsrate geringer als eine fiktive echte Wachstumsrate [23]. Bei geringen Wachstumsraten ist es daher möglich, das Substrat in die Zelle aufgenommen werden kann, ohne das Wachstum erfolgt. Hiernach gilt:

$$q_{X/X}(t) = q_{X/XGr}(t) - q_{X/Xm} \quad (3.7)$$

Mit:

$$q_{X/XGr} : \text{echte fiktive zellspezifische Wachstumsrate} \quad [h^{-1}]$$

$$q_{X/Xm} : \text{fiktive Sterberate (Erhaltungsstoffwechsel)} \quad [h^{-1}]$$

Unter der Annahme, dass die Aufnahme des Substrates zunächst zu einem Wachstum führt, ergibt sich die Substrataufnahmerate durch die echte fiktive Wachstumsrate und einem konstanten Ausbeutekoeffizienten

$$q_{S/X}(t) = \frac{q_{X/XGr}(t)}{Y_{X/S1Gr}} \quad (3.8)$$

$$q_{X/Xm} = Y_{X/S1Gr} \cdot q_{S1/Xm} \quad (3.9)$$

Mit:

$$q_{S1/Xm} : \text{Erhaltungskoeffizient für Glycerin} \quad [h^{-1}]$$

$$Y_{X/S1Gr} : \text{fiktiver konstanter Ausbeutekoeffizient} \quad [g_x g_s^{-1}]$$

Hierbei ist der fiktive Ausbeutekoeffizient nicht zu verwechseln mit dem wachstumsabhängigen beobachteten Ausbeutekoeffizient:

$$Y_{X/S1}(t) = \frac{q_{X/X}(t)}{q_{S1/X}(t)} \quad (3.10)$$

Mit:

$$Y_{X/S1}(t) : \text{beobachteter Biomassen-Glycerin Ausbeutekoeffizient} \quad [g_x g_s^{-1}]$$

Da der tatsächliche Substratverbrauch größer ist, als der Verbrauch, der nur für das Wachstum benötigt wird, gilt $Y_{X/S1}(t) < Y_{X/S1Gr}$. Durch Umstellen der Gleichungen (3.8) und (3.9) in (3.7) ergibt sich die Substrataufnahmerate durch:

$$q_{S1/X}(t) = \frac{(q_{X/X}(t) + Y_{X/SGr} \cdot q_{S1/Xm})}{Y_{X/SGr}} \quad (3.11)$$

Und damit die Zufütterungsrate:

$$F_{R1}(t) = \frac{(q_{X/X}(t) + Y_{X/SGr} \cdot q_{S1/Xm})}{Y_{X/SGr} \cdot c_{S1R1}} \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (3.12)$$

Gleichung (3.12) beschreibt die Zufütterungsrate eines gesteuerten Wachstums. Für den Startwert muss die Zellkonzentration und das Volumen des Reaktorinhaltes vor Beginn der Fed Batch-Phase bekannt sein. Das exponentielle Profil ergibt sich dann durch

$$F_{S1R1}(t) = F_{S1R1,start} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (3.13)$$

Mit:

$F_{S1R1,start}$: Start-Zufütterungsrate	[l h ⁻¹]
μ_{set}	: eingestellter Sollwert der spezifische Zellwachstumsrate	[h ⁻¹]

3.3.3 Die Produktionsphase

Zur Beschreibung der Produktbildung kann folgender Ansatz gewählt werden:

$$\dot{m}_{PM} = q_{P/X}(t) \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (3.14)$$

Mit:

\dot{m}_{PM}	: Änderung der Produktmasse im Medium	[g h ⁻¹]
$q_{P/X}(t)$: spezifische Produktbildungsrate	[h ⁻¹]

Die spezifische Produktbildungsrate lässt sich in einen wachstumsabhängigen und einen wachstumsunabhängigen Teil zerlegen. Nach dem Model von Luedeking und Piret [24] gilt:

$$q_{P/X}(t) = Y_{P/X} \cdot q_{X/X}(t) + q_{P/X,nGr} \quad (3.15)$$

Mit:

$Y_{P/X}$: wachstumsabhängiger Produktausbeutekoeffizient	$[g_P g_X^{-1}]$
$q_{P/X,nGr}$: wachstumsunabhängige Produktbildungsrate	$[h^{-1}]$

Für eine genaue Berechnung der Produktbildung muss der Anteil des Zellvolumens im Reaktor mitberücksichtigt werden. Eine genauere Beschreibung der Produktbildung erfolgt im Kapitel 6.

4 Methoden

4.1 Der Bioreaktor BIOSTAT® Aplus

Die Kultivierung von *P. pastoris*, wurde in dem Bioreaktor BIOSTAT® Aplus der Firma Sartorius Stedim durchgeführt. Daher soll der Aufbau die dazugehörigen Komponenten kurz erläutert werden. Der Aufbau ist in Abbildung 6 dargestellt, wobei der Umlaufkühler und das Methanol-Reservoir nicht gezeigt wird. Das Methanol wurde über die rote Schlauchpumpe hinzugegeben. Im Anschluss werden die Funktionen der gezeigten Komponenten erklärt.

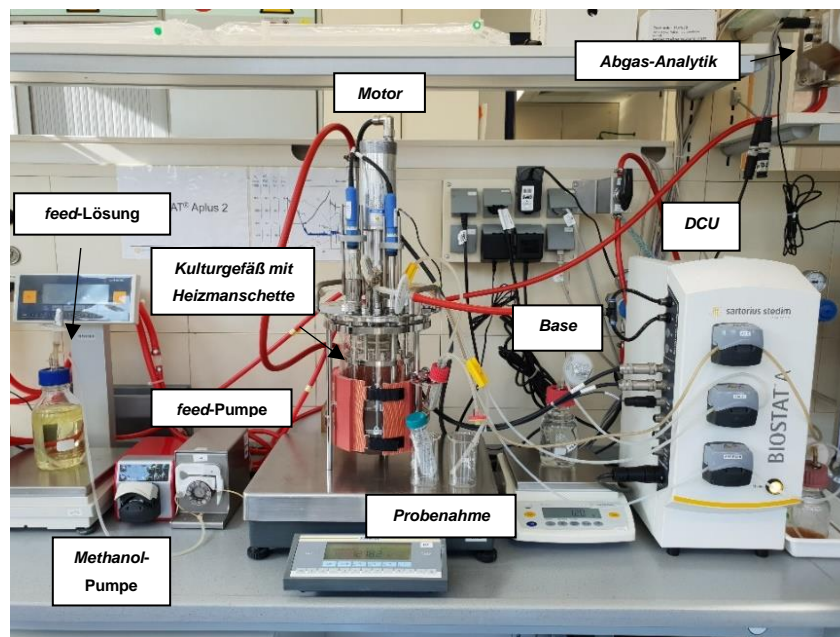


Abbildung 6: Teil-Aufbau des verwendeten Kultivierungssystem. Dargestellt wird der Bioreaktor BIOSTAT® Aplus mit angeschlossener Instrumentierung und Probenahmeeinrichtung. Nicht auf dem Bild zu sehen: Umlaufkühler, Methanol-Flasche und Schaumfalle.

Das Kultivierungsgefäß besteht aus Glas und besitzt ein Volumen von insgesamt drei Litern, wobei vom Hersteller ein Arbeitsvolumen zwischen 0,6 l – 2 l empfohlen wird. Zur Beheizung, wird eine Heizmanschette um das Kulturgefäß befestigt. Das Gefäß wird in das dreibeinige Edelstahlstativ eingehängt, welches eine Vorrichtung für die Probenahme, sowie drei Bohrungen zur Befestigung des Deckels besitzt. Der Deckel besteht ebenfalls aus Edelstahl und besitzt insgesamt 12 Öffnungen. Die Rührerwelle verläuft durch den Deckel hindurch und wird mittels einer einfachen Gleitringdichtung abgedichtet. Weiterhin wird im Deckel der Schikanenkorb, Begasungsring, Kühlfinger, Abluftkühler, pH-/DO-/Niveausonde, Probenahmerohr, ein Vierfachanschluss für

Korrekturmittelflaschen (Base, Säure, Anti-Schaummittel), *feed*-Lösung, sowie eine Sterilkupplung für das Inokulum und ein Anschluss für die Zugabe von Methanol angeschlossen. Nicht benutzte Öffnungen werden mit einem Blindstopfen versehen. Zur Kühlung steht ein Umlaufkühler sowie eine Kühlwasserversorgung des Labors zur Verfügung.

Der BIOSTAT® Aplus, die *feed*-Lösung, das Methanol-Reservoir, sowie die Base werden auf Wagen gestellt, um die Gewichtsveränderung und damit die Volumenzufuhr ins Medium zu erfassen.

4.1.1 Die Grundeinheit

Die Grundeinheit, oder DCU (*digital control unit*), stellt das Kontrollsystem der Anlage dar. Hierbei wird der Prozess über die Regelung der Prozessparameter gesteuert. Weiterhin erfolgt an der Grundeinheit der Anschluss der Sensoren. Dies beinhaltet Anschlüsse der Signalwandler für pH, den Sauerstoffpartialdruck pO_2 , sowie der Niveausonde. Ein MFC (*mass flow controller*) für Luft und Stickstoff, gewährleisten die Gasversorgung. Über ein Ventil außerhalb der Grundeinheit, lässt sich zwischen Luft- und Stickstoffbegasung wechseln. Je nach Stellung des Ventils an der Laborwand, strömt entweder Luft oder Stickstoff durch den MFC. Weiterhin sind drei Schlauchpumpen verbaut, welche zur Förderung von Säure, Base und Anti-Schaummittel dienen [25].

4.1.2 Instrumentierung

4.1.2.1 Temperierung

Die Hefe Zellen sollen bei einer Temperatur von 30°C kultiviert werden. Um die Temperatur den gesamten Prozess über konstant zu halten, wird der Kühlfinger, die Heizmanschette, sowie der in der pH Elektrode integrierte Temperaturfühler verwendet. Die Heizmanschette ist mit der DCU verbunden und wird hierüber elektrisch beheizt. Der Kühlfinger besitzt zwei Anschlüsse, welcher mit dem Umlaufkühler verbunden werden. Der Temperaturfühler der pH-Elektrode liefert den aktuellen Wert der Temperatur im Medium. Der Temperaturfühler bestimmt die Temperatur im Medium auf Basis des eingebauten NTC 30K Sensors. NTC steht für *negative temperature coefficient* und stellt somit einen sogenannten Heißleiter dar. Hierbei handelt es sich um ein Halbleiterelement, welches bei einer Bezugstemperatur von 25°C einen Widerstand von 30 kΩ aufweist. Steigt nun die Temperatur, so werden Elektronen aus der Kristallstruktur des Halbleiters gerissen, wodurch der fließende Strom steigt und der Widerstand geringer wird. Durch eine geeignete Schaltung lässt sich hieraus die Temperatur bestimmen.

4.1.2.2 Begasung

Da die Kultivierung unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden soll, muss eine konstante Begasung mit Luft und damit ein Sauerstoffeintrag ins Medium gewährleistet sein. Für die Kultivierung wird eine spezifische Begasungsrate von 2 vvm eingestellt. Die einzustellende Begasungsrate errechnet sich durch das Volumen im Bioreaktor nach dem Animpfen des Inokulums.

$$F_{G,Air} = f_G \cdot V_L \quad (4.1)$$

Mit:

$F_{G,Air}$: Begasungsrate (Luft) [l min⁻¹]

f_G : spezifische Begasungsrate [min⁻¹]

V_L : Gesamtvolumen der flüssigen Phase im Reaktor [l]

Die Begasungsrate wird einmalig eingestellt und bleibt den gesamten Prozess über konstant. In dieser Arbeit wurde eine Begasungsrate von 2,8 l min⁻¹ eingestellt. Die konstante Begasung erfolgt durch den MFC in der DCU, welcher nach der kalorimetrischen Messung arbeitet. Der Luftstrom kühlt dabei ein Thermoelement ab, wodurch sich aus der aufgenommenen Wärme der Volumenstrom errechnen lässt [25]. Der Gasstrom aus der DCU wird über einen autoklavierbaren Sterilfilter (Midisart 2000, Porengröße 0,2 µm) in den Begasungsring geleitet, dessen Kopf unter dem Rührer platziert wird. Durch kleine Bohrungen am Begasungsring gelangt das filtrierte Gas in das Medium. Dort wird das Gas durch den Rührer in kleinere Blasen zerschlagen und im Medium verteilt. In der Abluftstrecke ist ein weiterer Sterilfilter angebracht. Dieser befindet sich hinter der Schaumfalle und vor der Abgasanalytik. Der Abluftkühler sorgt für die Kondensation des verdunstetem Wassers aus dem Medium. Dadurch wird der Volumenverlust des Mediums reduziert und der Filter bleibt frei von Feuchtigkeit. Hierdurch wird eine Blockierung des Filters und damit ein Druckaufbau verhindert.

4.1.2.3 Durchmischung

Die Durchmischung wird mittels zwei 6-Blatt-Scheibenrührer erreicht. Weiterhin befindet sich ein Schikanenkorb mit im Reaktorgefäß der am Reaktordeckel verschraubt ist. Dieser fungiert als Strömungswiderstand und sorgt für ein turbulenteres Strömungsprofil. Es soll eine homogene Suspension entstehen, sodass jede Zelle unter gleichen Bedingungen wachsen kann. Daher ist es wichtig, dass überall im Medium die gleiche gelöste

Sauerstoffkonzentration und Mediumzusammensetzung vorhanden ist. Kurz unterhalb des Deckels ist außerdem noch ein Schaumzerstörer angebracht, der zusammen mit dem Rührer rotiert.

4.1.2.4 Sonden und Elektroden

Verwendet wurde eine Niveausonde, eine pH-Elektrode und ein pO_2 Sonde, welche nun nacheinander vorgestellt werden. Alle werden an der DCU angeschlossen.

Die Niveausonde dient zur Steuerung der Antischaum-Pumpe. Im Laufe des Prozesses ändert sich der Volumenstand und der Schaumgehalt im Reaktor. Damit der Schaum nicht in die Abluftstrecke eindringt und den dort angebrachten Sterilfilter blockiert, sendet die Niveausonde bei Kontakt mit dem Schaum ein Alarmsignal, welches die Antischaum-Pumpe aktiviert. Die Messung basiert auf der Änderung der Konduktivität. Die Sonde ist über den Schaumzerstörer angebracht und ist somit in ständigen Kontakt zur Luft. Sollte nun Schaum aufsteigen und die Sonde berühren, so fließt ein Strom. Die DCU gibt darauf hin ein Alarmsignal aus und die Antischaumpumpe startet.

Die pH-Elektrode der Firma Endress + Hauser® mit Memosens Technologie ist sterilisierbar und besitzt einen integrierten Temperaturfühler. Der pH-Wert einer Lösung wird dabei durch Messung von Potentialdifferenzen ermittelt. Die Glaselektrode besteht aus einem inneren Rohr mit einer Ion-sensitiven Glaskugel. Das System ist mit einer auf pH 7 gepufferten Kalium-Chlorid-Lösung gefüllt und enthält ein Silber-Silberchlorid-Draht. Das äußere Rohr enthält ebenfalls eine auf pH 7 gepufferte Kalium-Chlorid-Lösung mit einem Silber-Silberchlorid-Draht und stellt die Referenzelektrode dar. Das äußere System ist über ein Diaphragma von der zu messenden Lösung getrennt, steht jedoch im elektrischen Kontakt mit dem inneren Silber-Silberchlorid-Draht. Wird die Elektrode nun in die Messlösung getaucht, so können die Hydroniumionen in die sogenannte äußere Quellschicht der Glaskugel eindringen. Auf der Innenseite der Glaskugel geschieht genau das gleiche. Herrscht nun eine unterschiedliche Hydroniumionenkonzentration in den Quellschichten, so kann eine Potentialdifferenz gemessen werden. Mit Hilfe dieser Potentialdifferenz, lässt sich der pH-Wert der Lösung bestimmen.

Die pH-Elektrode wird vor dem Sterilisieren im Autoklav mittels im Labor stehenden Kalibrierlösungen kalibriert. Es wird eine zwei-Punkt Kalibrierung zwischen pH 7 und pH 4 durchgeführt, da die Kultivierung bei pH 5 durchgeführt werden soll. Nach dem Autoklavieren wird eine Probe genommen und dessen pH-Wert überprüft, da das Autoklavieren einen Shift der pH-Elektrode bewirken kann. Falls der gemessene pH-Wert ungleich dem der DCU ist, kann der pH-Wert im Programm manuell auf den extern gemessenen pH-Wert korrigiert werden.

Die pO₂-Sonde des BIOSTAT® Aplus ist ebenfalls von der Firma Endress + Hauser®, besitzt Memosens-Technologie und ist sterilisierbar. Sie dient der Messung des gelösten-Sauerstoffgehalts in der Hefesuspension. Durch die Erfassung des Sauerstoffgehalts im Medium, lässt sich das Wachstum der Zellen beobachten. Die pO₂-Sonde arbeitet nach dem amperometrischen Messprinzip, welches kurz erläutert werden soll. Durch eine Membran, die ins Medium eintaucht, können nur gelöste Gase, entsprechend ihres Partialdrucks, hineindiffundieren. Gelöste Substanzen wie Ionen können die Membran nicht passieren, wodurch die Leitfähigkeit des Mediums keinen Einfluss auf die Messung hat. Im inneren der Sonde befindet sich eine Gold-Kathode und eine Silber-Anode. Der Raum ist hierbei mit einem Elektrolyten gefüllt. An der Kathode werden die Sauerstoffmoleküle zu Hydroxid-Ionen reduziert. Auf der Gegenseite, der Anode, werden Silberionen zu Ag⁺ oxidiert. Durch dieses Redoxsystem entsteht ein Stromfluss, welcher proportional zur gelösten Sauerstoffkonzentration im Medium verläuft. Durch einen Messumformer, wird der gemessene Strom in einen Sauerstoffgehalt in Prozent umgerechnet [26].

Die Kalibrierung erfolgt nach dem der Bioreaktor autoklaviert wurde. Es erfolgt, wie bei der Kalibrierung der pH-Elektrode, eine zwei-Punktkalibrierung. Im Prozess soll der Sauerstoffgehalt in Prozent angegeben werden, daher wird der vorhandene Sauerstoff im Medium durch Begasung von Stickstoff entfernt. Dies stellt den Nullpunkt dar, und steht für 0% Sauerstoffgehalt im Medium. Anschließend wird mit Sauerstoff begast, um eine 100 %ige Sättigung zu erreichen.

4.1.2.5 Abgasanalytik

Die Abgasanalytik ist ein weiterer wichtiger Bestandteil zur Erfassung des momentanen Zustands der Hefe-Zellen. Aus dem Metabolismus der Zellen geht CO₂ hervor, welches durch geeignete Sensoren erfasst werden kann. Es kann zwar ohne weiteres keine exakten Aussagen über den Zustand der Zellen getroffen werden, dennoch bietet es einen gewissen Interpretationsraum. Die für diese Arbeit interessanten Größen stellen die Sauerstoffeintragsrate Q_{O₂}, die CO₂ Produktionsrate Q_{CO₂}, sowie das Verhältnis von eingetragenen Sauerstoff O₂ zum Produzierten CO₂ dar. Dieser wird als Respirationskoeffizient RQ bezeichnet.

$$Q_{O_2}(t) = \frac{F_{G,Air}M_{O_2}}{V_{nM}V_L(t)} \left(\frac{x_{CO_2,out}(t) \cdot [1 - x_{O_2,in}(t)] - x_{CO_2,in}(t) \cdot [1 - x_{O_2,out}(t)]}{1 - x_{O_2,out}(t) - x_{CO_2,out}(t)} \right) \quad (4.2)$$

$$Q_{CO_2}(t) = \frac{F_{G,Air}M_{CO_2}}{V_{nM}V_L(t)} \left(\frac{x_{CO_2,out}(t) \cdot [1 - x_{O_2,in}(t)] - x_{CO_2,in}(t) \cdot [1 - x_{O_2,out}(t)]}{1 - x_{O_2,out}(t) - x_{CO_2,out}(t)} \right) \quad (4.3)$$

$$RQ(t) = \frac{Q_{CO_2}(t) \cdot M_{O_2}}{Q_{O_2}(t) \cdot M_{CO_2}} \quad (4.4)$$

Mit:

$Q_{O_2}(t)$: Sauerstoffeintragsrate zum Zeitpunkt t	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
$Q_{CO_2}(t)$: CO ₂ Produktionsrate zum Zeitpunkt t	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
$RQ(t)$: Respirationskoeffizient	[-]
M_{O_2}	: Molare Masse von O ₂	[g mol ⁻¹]
M_{CO_2}	: Molare Masse von CO ₂	[g mol ⁻¹]
V_{nM}	: Normvolumen idealer Gase	[l mol ⁻¹]
$x_{O_2,in/out}(t)$: Anteil von O ₂ in der Zuluft/Abluft	[-]
$x_{CO_2,in/out}(t)$: Anteil von CO ₂ in der Zuluft/Abluft	[-]

Die Berechnung der Größen erfolgt nach den Formeln (4.2) - (4.4), wobei man lediglich die Anteile von O₂ und CO₂ in der Zuluft- und Abluftstrecke benötigt [23]. Hierfür wird der Abgassensor der Firma BlueSens gas sensor GmbH verwendet, welche den Gehalt an CO₂ und O₂ parallel messen kann.

Die Messung des CO₂ Anteils basiert auf der Abschwächung von IR-Strahlung durch die vorhandenen CO₂ Moleküle. Der CO₂ Sensor besteht aus einer IR-Strahlungsquelle, einem Detektor und einer Reflektionsmesszelle, in der sich das CO₂ Gas befindet. Die Strahlungsquelle sendet einen IR-Strahl in die Messzelle und wird dort auf den Detektor reflektiert. Die CO₂ Moleküle absorbieren einen Teil der Strahlung, wodurch der Detektor ein geschwächtes Signal empfängt. Durch eine vorher durchgeführte Kalibrierung mit Druckluft, welche im Gassensor als Referenzgas gespeichert wird, lässt sich daraus der CO₂ Gehalt des Gases bestimmen.

Der Sauerstoffgehalt erfolgt durch amperometrische Messung und erfordert kein Referenzgas. In einer Sauerstoffpumpzelle befinden sich zwei beschichtete Zirkoniumoxid-Platten. Die Beschichtung stellt die Elektrode dar. Bei hohen Temperaturen gibt das Zirkoniumoxid seinen Sauerstoff ab und wird zum Festkörperelektrolyt. Durch Anlegen einer Spannung, diffundiert der Sauerstoff im Gas durch diese Elektrolytplatte. Hierdurch ergibt sich ein Strom, welcher ein Maß für den Sauerstoffgehalt der Abluft ist [27].

4.1.2.6 Substrat-/Induktions-/Korrekturmittelzufuhr

Um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten, sowie die Fed-Batchphase und die Induktion einzuleiten, müssen externe Flüssigkeiten dem Medium hinzugefügt werden. Hierzu stehen insgesamt fünf Pumpen zur Verfügung. Drei Pumpen sind in der DCU integriert und fördern Säure, Base und Antischaummittel. Zwei weitere Pumpen werden benötigt, um die *feed*-Lösung (S1, Glycerin) und das Induktionsmittel Methanol (S2) hin zu zugeben. Bei den Pumpen handelt es sich um Schlauchpumpen, an welchen sich Rollen befinden. Der Schlauch wird in die Pumpen eingelegt und arretiert. Durch Rotation der Rollen wird das Volumen in dem Schlauch verdrängt. Dadurch entsteht ein Unterdruck, welcher dafür sorgt, dass Flüssigkeit nachgezogen wird.

Die Base, die *feed*-Lösung und das Methanol stehen auf Wagen, um den Verbrauch zu dokumentieren.

4.1.2.7 Probenahme

Um den Verlauf der Zellkonzentration sowie die Fluoreszenz des Mediums zu bestimmen, werden stündlich Proben genommen. Die Probenahme erfolgt manuell durch das eingebaute Probenahmerohr, welches mit dem Reaktordeckel verschraubt ist. Das gesamte System besteht aus dem Probenahmrohr, einem Auffanggefäß (Röhrchen) mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) und einem Probenauslassschlauch, mit dem die Probe aus dem Auffanggefäß in ein 15 ml Falkonröhrchen gefüllt werden kann. Die Verbindung vom Probenahmerohr zum Auffanggefäß und vom Auffanggefäß zum Abfüllen ist jeweils mit Schlauchklemmen versehen.

Mittels einer Spritze wird über den Filter ein Unterdruck im Auffanggefäß erzeugt. Dadurch gelangt der Reaktorinhalt bei offener Schlauchklemme in das Auffanggefäß. Nun wird über den Filter sterile Luft in das Auffanggefäß gedrückt, wodurch die Probe in das Falkonröhrchen überführt wird. Bei der Probenahme wird stets 5 ml Vorlauf zum Spülen der Schläuche entnommen und verworfen. Anschließend werden ca. 8 ml Probe entnommen.

4.2 Das Prozessleitsystem MFCS/win

4.2.1 Allgemeines und Funktionen

Damit der Prozess automatisiert und kontrolliert ablaufen kann, wird ein Datenerfassungs- und Steuerungssystem benötigt. Dies wird durch das Prozessleitsystem MFCS/win (*eng. Multi Fermentor Control System for Windows*) ermöglicht. Entwickelt wurde dieses System von der Firma Sartorius Stedim System GmbH und stellt ein Server/Client-PC-Leitrechnersystem dar. Zusammen mit der DCU werden in dem Prozessleitsystem eingestellte/entwickelte Abläufe umgesetzt [23].

Es folgt eine kurze Darstellung und Beschreibung des Prozessleitsystems MFCS/win mit anschließender Darstellung des verwendeten Rezeptes/Ablauf für die Kultivierung.

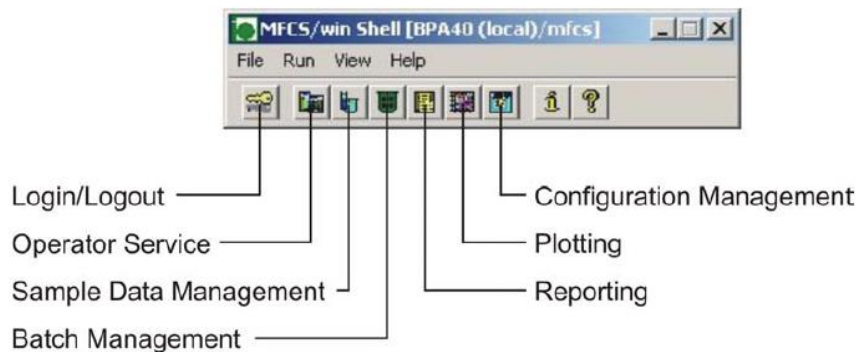


Abbildung 7: Darstellung der MFCS/win Shell und den dazugehörigen Icons [23].

Über die *Shell* (dargestellt in Abbildung 7) erhält man den Zugriff zu allen Funktionen von MFCS/win.

Operator Service:

Über den Operator Service erlangt der Anwender Zugriff über die Prozesskontrolle. Hier werden alle on-line Variablen aus dem laufenden Prozess angezeigt. Beispielsweise können momentane Pumpraten, die Rührerdrehzahl, der pH-Wert und den weiteren Ablauf der Kultivierung abgerufen werden. Hier können auch manuelle Einstellungen vorgenommen werden.

Sample Data Management:

Hier werden die off-line Daten verwaltet. Dies beinhaltet beispielsweise die Eintragung der gemessenen optische Dichte nach der Probenahme.

Batch Management:

Im Batch Management lassen sich neue Kultivierungen definieren. Hier wird des Weiteren festgelegt, ob die anstehende Kultivierung nach einem bestimmten Rezept verlaufen soll. Neben den anstehenden Kultivierungen, werden auch bereits abgeschlossene Kultivierungen angezeigt.

Reporting:

Im Report können im Prozess aufgenommene Daten bereits durchgeführter Kultivierungen zu weiteren Arbeiten exportiert werden.

Plotting:

Hier erfolgt die visuelle Darstellung ausgewählter Prozessparameter des laufenden Prozesses

Configuration Management:

Das Configuration Management bietet die Möglichkeit neue Rezepte zu erstellen, zu modifizieren, zu löschen oder neue Variablen zu definieren. Diese Rezepte stellen die zeitlichen Abläufe im Prozess dar und können im Batch Management ausgewählt werden.

4.2.2 Kurzbeschreibung des verwendeten Rezepts

Damit die Kultivierung von *P. pastoris* automatisiert ablaufen kann, wird im Configuration Management ein Regelungs- und Ablaufplan erstellt. Die Kultivierung wird hier in fünf Phasen unterteilt.

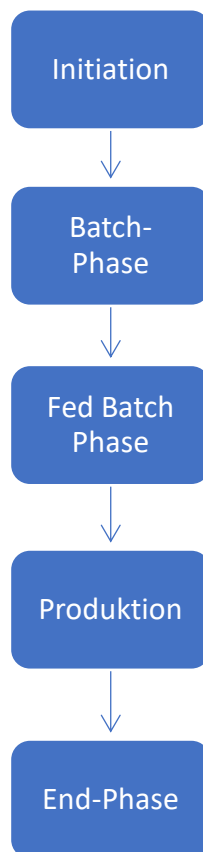


Abbildung 8: Schematischer Ablauf des automatisierten Kultivierungsprozesses.

Initiation:

In der Initiation erfolgt die Einstellung der Regelparameter und der Kultivierungsbedingungen. Dies beinhaltet, Temperatur, pH-Wert des Mediums, Rührerdrehzahl und die Begasungsrate. Die Berechnung der im Configuration Management definierten Variablen wird gestartet. Hier werden das Reaktorvolumen und weitere Größen wie Q_{O_2} , Q_{CO_2} usw., aus den Messdaten berechnet. Im Laufe des Prozesses werden externe Programme benötigt, um Phasenübergänge einzuleiten. Die Schaltpunkte für die Aktivierung dieser Programme, werden hier vorerst ausgeschaltet. Hierbei handelt es sich um die Batch End Detektion und das Zufütterungsprofil für die Fed-Batch Phase. Mehr dazu in den entsprechenden Phasen, sowie im Kapitel 4.3. Hiernach erfolgt der Übergang in die Batch-Phase.

Batch-Phase:

In der Batch Phase erfolgt das Animpfen mit dem Inokulum. Vorab wird vom System über *Message Boxen* abgefragt, ob sämtliche Schläuche (Base, Säure, Antischaummittel, *feed*, und Methanol) gefüllt sind. Über die manuelle Eingabe „OK“, erscheint eine weitere Abfrage, welche das Animpfen mit Inokulum anzeigt. Nach dem Animpfen und Bestätigung im System, beginnt die Kultivierung. Nun wird die pO_2 Regelung aktiviert. Fällt der $PO_2\%$ Wert unter einen Wert von 25% so wird die Drehzahl erhöht, sodass über die gesamte Dauer des Batches und Fed-Batch Betriebs, ein $PO_2\%$ von 25% aufrechterhalten wird. Steigt der Wert über 25% so wird die Drehzahl wieder verringert.

Nun wird die sogenannte Batch End Detektion aktiviert. Diese soll das Ende der Batch-Phase erkennen und den Übergang in die Fed-Batch Phase einleiten. Ist das gesamte Glycerin im Medium von den Zellen aufgenommen und metabolisiert worden, so verbrauchen die Zellen kein Sauerstoff mehr (abgesehen vom Erhaltungsstoffwechsel) und der gemessene $PO_2\%$ steigt. Gleichzeitig sinkt die Rührerdrehzahl auf Grund der aktiven Regelung. Steigt der Mittelwert des $PO_2\%$ Wertes auf über 35% und fällt die Rührerdrehzahl innerhalb von vier Zeitintervallen (insgesamt 60 Sekunden) um 60 rpm, so setzt das externe Programm die Variable für die Batch End Detektion auf den Wert 1. Anschließend wird die Fed Batch Phase eingeleitet.

Fed-Batch-Phase:

In der Fed-Batch Phase wird weiterhin die pO_2 Regelung fortgesetzt. Da das Wachstum der Zellen durch die vorgeschriebene Wachstumsrate μ_{set} von $0,1 \text{ h}^{-1}$ erfolgen soll, wird ein exponentielles Pumpprofil nach Gleichung (3.12) gefahren. Die erforderliche Pumpe wird über ein externes Programm gestartet und in MFCS/win integriert. Zur Bestimmung der

Startpumprate wird Gleichung (4.5) verwendet. Die dazugehörigen Werte können aus Tabelle 1 entnommen werden.

$$F_{S1R1,start} = \frac{(\mu_{set} + q_{S1/X_m} \cdot y_{X/S1gr}) \cdot V_{Lj}(t) \cdot c_{XL,start}}{y_{X/S1gr} \cdot c_{S1R}} \quad (4.5)$$

Tabelle 1: Verwendete Parameter zur Bestimmung der Start-Zufütterungsrate in der Fed-Batch Phase.

Parameter	Wert	Einheit
μ_{set}	0,1	[h ⁻¹]
q_{S/X_m}	0,013	[h ⁻¹]
$y_{X/Sgr}$	0,6	[g _x g _{s1} ⁻¹]
$c_{XL,start}$	18,84	[g l ⁻¹]
c_{S1R}	300	[g l ⁻¹]

Zu Beginn der Fed-Batch Phase werden diese Parameter dem externen Programm übergeben und die Variable *switch_fedBatch*, die die Zufütterung einleitet, auf den Wert 1 gesetzt. Dieser Wert aktiviert die Berechnung des exponentiellen Zufütterungsprofils im externen Programm nach Gleichung (3.13). Hierbei wird die spezifische Wachstumsrate μ_{set} auf den Wert 0,1 h⁻¹ gesetzt. Die Dauer der Zufütterung kann selbst gewählt werden und wird in dieser Arbeit auf zehn Stunden festgesetzt. Nach der vorgegebenen Wartezeit wird die Variable *switch_fedBatch* wieder auf den Wert 0 gesetzt und die Pumpe stoppt. Hiernach wird die Induktion durch Methanol vorbereitet.

Produktion:

In der Produktionsphase wird die pO₂ Regelung ausgestellt, um über den Sauerstoffgehalt ein Bild über den O₂-Bedarf zu erhalten. Anschließend erfolgt der Start der Induktion durch Methanol. Die Komplette Beschreibung der Induktion und die dazugehörige Umsetzung in MFCS/win wird in Kapitel 5.2 behandelt. Die Dauer kann ebenfalls selbst gewählt werden. Anschließend erfolgt End-Phase

End-Phase:

Die End-Phase schaltet alle Pumpen und die Regelung aus. Die Rührerdrehzahl wird anschließend auf 0 gesetzt. Der Prozess muss dann im Operator Service manuell

beendet werden, wodurch die erfassten Daten gespeichert werden und über den Report abgerufen werden können.

4.3 Vorbereitung der Kultivierung von *P. pastoris* Stamm BSYBG11

In den nächsten drei Abschnitten soll die gesamte Vorbereitung, von Erstellung einer *Working Cell Bank* (WCB), über die Anzucht einer Vorkultur bis hin zur Kultivierung im Bioreaktor erläutert werden. Verwendet wird hierbei der Organismus *P. pastoris* Stamm BSYBG11 Klon I, da sich dieser aus der voran gegangenen Bachelorarbeit von Christina Kirschnick als ertragreichster Produzent herausstellte [28]. Die dort entwickelte Kultivierungsstrategie wird hier übernommen wobei die Fed-Batchphase von 15h auf 10h gekürzt wird. Dadurch wird eine längere Probenahme möglich und es wird dennoch eine Zelldichte von 50 g l^{-1} erreicht.

4.3.1 Erstellung einer *Working Cell Bank*

Eine *Working Cell Bank* wird aus einer *Master Cell Bank* (MCB) hergestellt, um eine Vielzahl an Klonen zu generieren, welche dann für viele Produktionszyklen verwendet werden können [29].

Mit einem Kryoröhrchen einer MCB werden zwei Schüttelkolben angeimpft, wobei einer zur Überprüfung des Wachstums und einer für die eigentliche Erstellung einer WCB genutzt wird. Um die Zellen der MCB im Schüttelkolben zu kultivieren, wird ein definiertes Minimalmedium verwendet (s. Anhang S. XVII). Die Glycerin-Konzentration beträgt hierbei 10 g l^{-1} . Autoklaviert wird anschließend:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| - 60 ml Medium | - 15 Kryoröhrchen |
| - 250 ml Flasche mit 15 ml Glycerin | - 100 ml Messzylinder |
| - 2 x 300 ml Schüttelkolben | - 30 ml Messzylinder |

Nach dem das Medium abgekühlt wird, werden die thermolabilen Tracer (Spurenelemente) PTM4 und Biotin (Ansatz s. Anhang S. XVII) unter der Sterilwerkbank hinzugegeben. Je 30 ml des Mediums wird nun in die Schüttelkolben überführt und mit je 1 ml der MCB angeimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 30°C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Besitzt die Kultur eine OD von 2-3 AU, wird der Inhalt des Schüttelkolben für die WCB unter der Sterilwerkbank in die Flasche mit Glycerin überführt. Anschließend werden je 2 ml der Hefe-Suspension in die Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

4.3.2 Anzucht der Vorkultur im Schüttelkolben

Da die Menge von 2 ml der WCB zu klein ist um damit den Bioreaktor anzupfen, wird hieraus eine Vorkultur mit höherem Volumen erstellt. Bei zu kleinen Volumina wachsen die Zellkulturen nicht, oder nur sehr langsam.

Insgesamt soll 200 ml Vorkultur erhalten werden. Für die Kultivierung im Schüttelinkubator werden zwei ein Liter Schüttelkolben verwendet, welche vor dem Animpfen zusammen mit 196 ml Vorkulturmedium (s. Anhang S. XVII) autoklaviert werden. Unter der Sterilwerkbank wird das Medium durch Hinzugabe der Tracer komplementiert und anschließend je 98 ml in die Schüttelkolben überführt. Es werden je 2 ml der WCB zum Animpfen verwendet sodass zwei Schüttelkolben mit je 100 ml zur Verfügung stehen. Diese werden dann im Schüttelinkubator bei 30°C bei 150 rpm bis zu einer OD von 5 - 6 AU kultiviert (Dauer ca. 19 h).

4.3.3 Vorbereitung des BIOSTAT® Aplus

Während die Vorkultur im Schüttelinkubator heranwächst, wird der BIOSTAT® Aplus vorbereitet. Das Nährmedium soll nach dem Animpfen mit der Vorkultur ein Gesamtvolumen von 1,4l aufweisen, daher wird 1,2 l Medium hergestellt (s. Anhang Seite XVII). Das Medium soll nach dem Animpfen der Vorkultur eine Glycerinkonzentration von 30 g l⁻¹ betragen. Um Schaumbildung während des Prozesses entgegenzuwirken, werden 2-3 Tropfen Anitschaummittel hinzugegeben. Für die Fed-Batch Phase wird eine 500 ml 300 g l⁻¹ Glycerin feed-Lösung hergestellt. Anschließend erfolgt die Zwei-Punkt Kalibrierung der pH-Elektrode zwischen pH 4 – 7. Alle Korrekturmittel bis auf Ammoniak (12,5%) als Base und das Methanol (792 g l⁻¹) werden angeschlossen. Für Base und Methanol werden vorerst Flaschen gefüllt mit VE-Wasser angeschlossen, da das Methanol und das Ammoniak während der Sterilisation im Autoklaven verdampfen würde. Nach dem Autoklavieren werden nach Abkühlung des Mediums und der feed-Lösung, diese mit Tracer komplementiert und die Base und das Methanol unter der Sterilwerkbank mit den angeschlossenen VE-Wasserflaschen ausgetauscht. Das Methanol und die Ammoniaklösung wird hier als autosteril angenommen. Base, feed-Lösung und Methanol werden auf Wagen gestellt, um den Verbrauch zu dokumentieren. Es wird eine Probe des Mediums entnommen, um die Fluoreszenz des Mediums zu messen und den pH-Wert zu kontrollieren. Nun wird der Abgassensor und die pO₂ Sonde kalibriert. Besitzt die Vorkultur eine OD von 5-6 AU, so wird diese in eine Inokulumflasche überführt und über eine Sterilkopplung in den Reaktor gefüllt. Anschließend startet die Batch-Phase und die Probenahme.

4.4 Offline Analytik

4.4.1 Messung der optischen Dichte

Um das Wachstum der Hefen im laufenden Prozess zu erfassen, kann die optische Dichte (OD) der Kultur gemessen werden. Hierbei wird ein Photometer verwendet, welches die Abschwächung der Lichtintensität bei einer Wellenlänge von 600 nm erfasst. Das Photometer arbeitet hierbei nach dem Durchlichtverfahren, wobei das Licht durch die Mikroorganismen gestreut oder absorbiert wird. Je nach Zellkonzentration, wird das Licht mehr oder weniger geschwächt. Die physikalische Basis stellt hierbei das Lambert Beer'sche Gesetz, welches die Abschwächung des Lichts in Abhängigkeit von der Schichtdicke, der Konzentration, sowie einem molaren Extinktionskoeffizienten beschreibt. Hier von geht ein linearer Zusammenhang bis einer OD von 0,6 hervor. Für genaue Messungen sollte demnach ein Wert zwischen 0,1 – 0,6 AU angestrebt werden.

Es wird 1 ml der Probe in eine Halbmikroküvette pipettiert und im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Blindwert bzw. Referenzwert wurde VE-Wasser verwendet. Wird ein Verdünnungsfaktor berücksichtigt, so ergibt sich die optische Dichte durch:

$$\Delta OD = f \cdot \Delta OD_{Probe} \quad (4.6)$$

Mit:

ΔOD	: optische Dichte der Probe	[AU]
ΔOD_{Probe}	: optische Dichte der verdünnten Probe	[AU]
f	: Verdünnungsfaktor	[-]

4.4.2 Bestimmung der Biotrocken-/Biofeuchtmasse

Neben der Bestimmung der optischen Dichte, ist die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM [g]) eine weitere Methode, um das Zellwachstum zu beobachten. Des Weiteren liefert die BTM Bestimmung eine genauere Aussage über die Zellkonzentration zum Zeitpunkt der Probennahme als die Bestimmung der optischen Dicht. Hierbei gilt die Voraussetzung einer homogenen Suspension im System.

Die Biofeuchtmasse (BFM [g]) kann ebenfalls wie die Biotrockenmasse dazu verwendet werden das Wachstum der Zellen zu beobachten. In dieser Arbeit dient die BFM zur

Berechnung zweier, für die Automatisierung der Produktphase, wichtigen zellspezifischen Parameter. Hierzu zählt der Koeffizient a_{ZX} , welcher das Verhältnis von Biotrocken- zu Biofeuchtmasse, sowie die Dichte ρ_{ZX} [gl⁻¹] der Hefe Zellen.

Nach dem die Probennahme erfolgte, werden 2 ml der Suspension in ein vorab gewogenes 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wird die Probe bei 14000 g für 5 Minuten mittels einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert, dessen Volumen bestimmt und bei -20°C eingefroren. Es kann anschließend zur Messung der Fluoreszenz verwendet werden. Das erhaltene Zell-Pellet wird nun zur Bestimmung der BFM ausgewogen. und anschließend bei offenem Deckel über Nacht bei 70°C im Trockenschrank inkubiert. Nachdem die getrockneten Proben aus dem Trockenschrank entnommen wurden, lässt man diese abkühlen. Anschließend werden die Proben nochmals ausgewogen und mittels nachfolgender Formel in eine Zellkonzentration umgerechnet:

$$c_{XL} = \frac{m_X - m_0}{V_{L,P}} \quad (4.7)$$

Mit:

m_X	: Gewicht des Reaktionsgefäßes mit getrocknetem Pellet	[g]
m_0	: Leergewicht des Reaktionsgefäßes	[g]
$V_{L,P}$: In Reaktionsgefäß pipettiertes Volumen	[l]

Die Differenz im Zähler des Bruches ist hierbei definiert als Biotrockenmasse.

$$BTM = m_X - m_0 \quad (4.8)$$

Für die BFM gilt daher analog:

$$BFM = m_{ZX} - m_0 \quad (4.9)$$

Mit:

m_{ZX}	: Gesamtgewicht des Reaktionsgefäßes mit feuchtem Pellet	[gl ⁻¹]
----------	--	---------------------

Für die zellspezifischen Parameter a_{ZX} und ρ_{ZX} können nun folgende Formeln zur Berechnung verwendet werden:

$$a_{ZX} = \frac{BFM}{BTM} \quad (4.10)$$

$$\rho_{ZX} = \frac{BFM}{V_{L,Z}} \quad (4.11)$$

Mit:

- $V_{L,Z}$: Volumen des Zellpellets nach Zentrifugation [l]
- a_{ZX} : Verhältnis zwischen BFM und BTM
- ρ_{ZX} : Dichte der feuchten Hefezellen

4.4.3 Messung der Fluoreszenz

Um den Verlauf der exprimierten Menge an eGFP zu verfolgen, wird die Fluoreszenz gemessen. Hierfür wird der Platten-Reader GENios der Firma TECAN Trading GmbH verwendet. 200 μ l der Proben-Überstände werden unverdünnt in eine schwarze 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Das rundum schwarze Design der Mikrotiterplatte soll hierbei die eventuelle Einwirkung der Messumgebung weitestgehend unterdrücken. Anschließend werden die Proben mit Hilfe des Platten-Reader's bei einer Wellenlänge von 400 nm von einem sich über den Proben befindenden Sender angeregt und das emittierte Signal bei 510 nm gemessen.

4.4.4 Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine sind neben ihren Eigenschaften/katalytischen Funktionen ebenfalls durch ihre Form und Masse gekennzeichnet. Da die Fähigkeit zur Fluoreszenz kein Alleinstellungsmerkmal von eGFP darstellt, kann es sinnvoll sein, weitere Analysetechniken zu verwenden, um den Expressionsverlauf beziehungsweise die Anreicherung des Zielproteins im Medium zu verfolgen. Dadurch könnten sich Rückschlüsse in bestimmten Phasen/Abschnitten bezüglich der Expression des Prozesses ziehen lassen.

Eine aussagekräftige Analyse­methode stellt hierbei die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Proben (in diesem Fall Proteine), wandern durch eine Gelmatrix aus Polyacrylamid und werden je nach Größe des Proteins unterschiedlich stark retardiert. Hierdurch kann also ein Proteingemisch der Größe nach getrennt und anschließend farblich sichtbar gemacht werden. Das Gel besteht dabei aus einem Polymer aus Acrylamid Monomeren und N,N'-methylenbisacrylamid als cross-linker. Initialisiert wird die Reaktion durch die Erzeugung von freien Radikalen durch Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin (TEMED) Hierbei wird das Trennsystem nach Laemmli angewendet. Das Gel besteht aus einem Sammelgel, auf welchem die Proben aufgetragen werden und einem Trenngel, in welchem der eigentliche Trennprozess abläuft. Die Gele weisen ein diskontinuierliches Puffersystem auf, bei welchem der pH und die Ionische Stärke in beiden Gelen unterschiedlich sind. Durch die geringere Ionenstärke im Sammelgel werden die Proben zu scharfen Banden aufkonzentriert. Die Gele unterscheidet sich durch ihren Anteil an Acrylamid. Je höher der Vernetzungsgrad, umso geringer die Porengröße. Daher besitzt das Trenngel einen höheren Acrylamid Anteil als das Sammelgel [30]. Um den Trennprozess hauptsächlich auf die Länge der Polypeptidketten zu beschränken, werden die Proteine mit Hilfe eines anionischen Detergens (Natriumdodecylsulfat -SDS) denaturiert. Das SDS bindet hierbei mit einer großen Affinität an Proteinen und zerstört somit die Proteinstruktur. Stöchiometrisch bindet ein SDS Molekül an etwa zwei Aminosäurereste. Des Weiteren erhalten die Proteine durch das SDS eine negative Nettoladung, welche die ursprüngliche Eigenladung des Proteins bedeckt. Disulfidbrücken werden durch β -Mercaptoethanol aufgebrochen, sodass eine vollständige Denaturierung erfolgt [31, 32].

Der Ansatz der Gele erfolgt nach Tabelle 2.

Tabelle 2: Ansätze zur Herstellung eines SDS-PAGE Gels. Ansatz reicht für vier Gele [33].

Chemikalien	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)	Einheit
30% Acrylamidlösung	8,0	3,4	ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	-	2,5	ml
3M Tris-HCl, pH 8,8	2,5	-	ml
10% SDS-Lösung	0,2	0,2	ml
VE-H ₂ O	6,8	11,4	ml
TEMED	10	20	μ l
10% APS	130	130	μ l

Zu beachten ist, dass nach Zugabe von 10% APS die Polymerisation katalysiert wird. Nachdem das Trenngel gegossen wurde, werden Luftblasen auf der Oberfläche durch Hinzugabe von etwas Wasser entfernt. Ist das Trenngel auspolymerisiert (ca. 45 min), so wird das hinzugegebene Wasser entfernt und das Sammelgel aufgetragen. Gleichzeitig wird der Kamm eingesetzt, der die Probenaschen formt.

Die Probenvorbereitung erfolgt während der Polymerisierung. Hierfür wird 24 µl Probe mit 8 µl Probenpuffer-Mercaptoethanol-Lösung gemischt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Das Gel wird anschließend in die Elektrophoresekammer gestellt und der Laufpuffer hinzugegeben.

Anschließend werden die denaturierten Proteinproben sowie ein Marker (10 kDa – 200 kDa) in die Probenaschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 200V durchgeführt und endet, wenn die Lauffront ca. 1 - 2 cm vor Ende des Gels verläuft. Anschließend wird das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für eine Stunde in einer Fixierlösung geschwenkt. Danach kann das Gel über Nacht in Färbelösung (2-15h) und ständigen Schwenken gelegt werden. Gewaschen wird das Gel mit einer 25% Methanol Lösung.

5 Automatisierung der Produktionsphase

5.1 Aufgaben der Automatisierung

Die eGFP Produktion wird durch das Hinzugeben von Methanol induziert. Die Zugabe kann hierbei manuell oder automatisiert erfolgen. Die manuelle Induktion im Bioreaktor wird meistens über ein Septum realisiert. Das Induktionsmittel befindet sich in einer sterilen Spritze. Mittels einer Kanüle wird das Septum durchstoßen und das Methanol in den Reaktor gegeben. Hierbei sind drei kritische Aspekte zu beachten:

- 1) Gefahr der Personen Stichverletzungen
- 2) Genauigkeit der Dosierung
- 3) Sterilität

Der erste Punkt stellt hierbei einen Faktor des Personenschutzes dar. Durch unvorsichtiges Arbeiten sind Verletzungen nicht auszuschließen, zumal Methanol generell eine gesundheitsschädliche Eigenschaft besitzt. Da die Spritze aufgezogen werden muss, bestimmt die Volumenanzeige der Spritze und das Augenmaß das Volumen. Die Reproduzierbarkeit ist demnach schwer einzuhalten. Der letzte Punkt stellt die Sterilität der Zugabe dar. Da Methanol ein Zellgift darstellt, kann das Aufziehen der Spritze unter der Sterilwerkbank als autosteril betrachtet werden. Die Kanüle wird anschließend durch das Septum gestochen. Da die Kanüle kurzzeitig an der Luft ist, könnten demnach Keime aus der Luft durch den Vorgang der Induktion in den Reaktor gelangen. Durch den Restgehalt des Methanols an der Kanüle und der Silikonmembran des Septums, sollte diese jedoch auch bei kurzer Aufenthaltszeit an der Luft, keine allzu große Sterilitätsprobleme hervorrufen.

Die Automatisierung soll die oben aufgeführten Punkte weitestgehend reduzieren. In der hier durchgeführten Arbeit wird die Automatisierung mittels einer Pumpe realisiert. Eine Methanol Reservoirflasche wird über einen 3x5 mm Silikonschlauch an den Reaktordeckel angeschlossen. Durch eine Schlauchpumpe gelangt das Methanol ins Medium.

Die Induktion über ein prozessintegriertes System bietet viele Vorteile. Abgesehen von dem Austausch der Wasserflasche gegen die Methanolf flasche nach der Sterilisation, besteht keine weitere Gefahr im Umgang und der Induktion mit Methanol. Des Weiteren ist die Verbindung zwischen Flasche und Schlauch durch die Sterilisation steril. Um die genaue Dosierung zu garantieren, steht die Flasche auf einer Waage, um die Massenänderung zu erfassen.

Die kontrollierte Methanol-Zugabe erfolgt durch Kommunikation mit der DCU und MFCS/win. Es muss ein möglichst genaues Model der Flüssigkeitsphase aufgestellt werden, sodass eine bestimmte Methanol-Konzentration im Medium eingestellt werden kann. Daher muss der Zustand des Reaktorsystems erfasst und beschrieben werden. Da die Hefezellen nach der Fed Batch-Phase einen relevanten Teil des Gesamtvolumens ausmachen können, muss das Volumen des zellfreien Mediums erfasst werden. Im nachfolgenden soll das sogenannte Dreiphasenmodel vorgestellt werden, woraus sich im Anschluss eine Formel für die benötigte Menge an Methanol herleiten lässt.

5.2 Bilanzierung der Flüssigkeitsphase nach dem Dreiphasenmodell

Der Prozess einer Kultivierung im Bioreaktor kann zunächst in zwei Phasen unterteilt werden. Eine Gas-Phase und eine Flüssig-Phase. Im Laufe der Kultivierung, insbesondere einer Fed Batch-Kultivierung, erreichen die Hefezellen eine hohe Zelldichte und bilden somit einen nicht zu vernachlässigbaren Anteil am Gesamtflüssigkeitsvolumen. Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit teilt sich somit in zellfreies Medium und den Anteil, den die Mikroorganismen bilden [23]. Daher gilt:

$$V_L(t) = V_M(t) + V_Z(t) \quad (5.1)$$

Mit:

V_M	: Volumen des zellfreien Mediums	[l]
V_Z	: Volumen der Biofeuchtphase	[l]

Somit lässt sich das System in den drei Phasen: Gas-Phase, Medium-Phase und Biofeuchtphase unterteilen. Das Dreiphasenmodell ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Dieses soll nun vorgestellt werden.

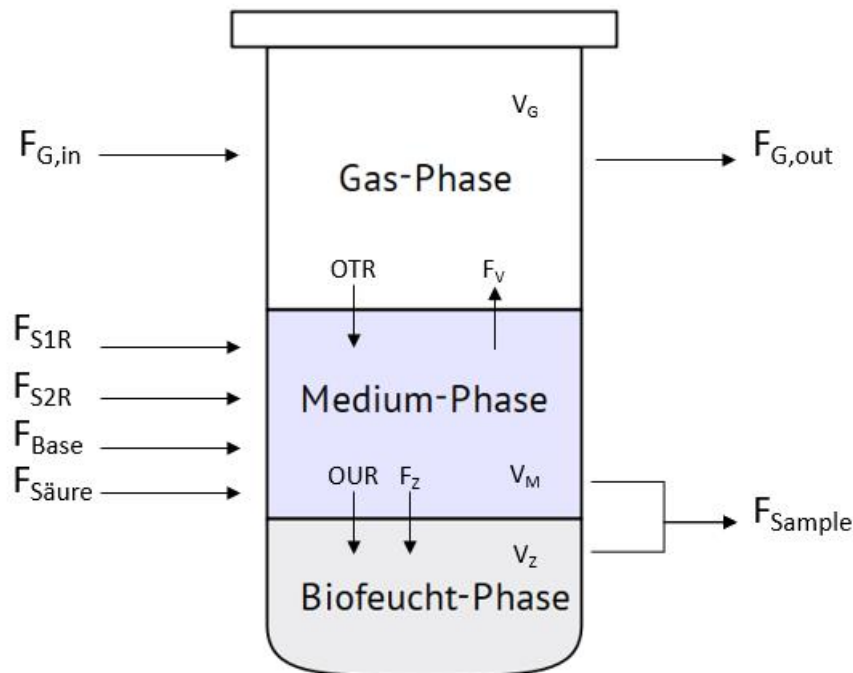


Abbildung 9: Darstellung des Dreiphasenmodells im Bioreaktor.

Durch die Begasung $F_{G,in}$ wird Sauerstoff in die Medium-Phase eingetragen. Dies wird über die Sauerstofftransferrate OTR (oxygen transfer rate) beschrieben. Anschließend verlässt das Gas den Reaktor mit $F_{G,out}$. Die Medium-Phase verändert sich durch externe Zugaben wie Korrekturmittelzufuhr durch Säure $F_{Säure}$ und Base F_{Base} , Glycerin Zugabe während der Fed Batch-Phase F_{S1R} und durch die Zugabe des Induktionsmittels Methanol F_{S2R} . Reduziert wird das zellfreie Medium durch Verdunstung von Wasser F_V und Probenahmen F_{Sample} . Des Weiteren wird das Medium durch Wachstum der Mikroorganismen reduziert F_Z , da diese Wasser und sonstige Bestandteile des Mediums in sich aufnehmen. Die Zellen nehmen den gelösten Sauerstoff aus dem Medium, beschrieben durch die Sauerstoffaufnahme OUR (oxygen uptake rate), auf.

Um das Volumen der Biofeuchtphase zu berechnen, wird die Gesamtmasse und die Dichte der Zellen benötigt. Die Masse der Zellen lässt sich durch die Zellkonzentration aus der Biotrockenmasse und dem Verhältnis aus BFM und BTM berechnen. Für das Volumen gilt:

$$V_Z(t) = \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (5.2)$$

$$F_Z(t) = q_{X/X} \cdot V_Z(t) \quad (5.3)$$

Durch Umformung von Gleichung (5.1) und Einsatz von Gleichung (5.2) ergibt sich das Volumen des zellfreien Mediums durch:

$$V_M(t) = V_L(t) \cdot \left(1 - \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t) \right) \quad (5.4)$$

5.3 Berechnung des Induktionsvolumens

Soll nun eine bestimmte Methanol-Konzentration im Medium eingestellt werden, so stellt die Medium-Phase das Bezugsvolumen dar. Der Anteil des Methanols, wird in der Literatur stets in Volumenprozent angegeben. Hierbei gilt:

$$V_{S2}\% = \frac{V_{S2}}{V_M(t) + V_{S2}} \quad (5.5)$$

Mit:

$V_{S2}\%$: Volumenprozent des Methanols im Medium [%]
 V_{S2} : Volumen von Methanol [l]

Die Zugabe von Methanol und die daraus resultierende Volumenänderung der Medium-Phase wurde dabei durch den Term im Nenner der Gleichung (5.5) berücksichtigt. Durch Vergleich der Masse an Methanol, lässt sich Gleichung (5.5) ebenfalls durch Konzentrationen darstellen:

$$\frac{V_{S2}}{V_M(t) + V_{S2}} = \frac{c_{S2M}}{\rho_{S2}} \quad (5.6)$$

Mit:

c_{S2M} : Methanol Konzentration im Medium [g l⁻¹]
 ρ_{S2} : Dichte von Methanol [g l⁻¹]

Dem entsprechend lässt sich die Methanol-Konzentration einer x% Methanol-Lösung berechnen durch:

$$c_{S2M} = V_{S2\%} \cdot \rho_{S2} \quad (5.7)$$

Hieraus lässt sich nun eine allgemeine Gleichung zur Ermittlung des Induktionsvolumen herleiten:

$$c_{S2R} \cdot V_{S2R}(t) = c_{S2M} \cdot (V_M(t) + V_{S2R}) \quad (5.8)$$

Mit:

c_{S2R}	: Methanol Konzentration im Reservoir	[g l ⁻¹]
V_{S2R}	: Volumen vom Methanol im Reservoir	[l]

Durch Umstellen von Gleichung (5.8) errechnet sich das benötigte Volumen aus dem Reservoir durch:

$$V_{S2R}(t) = V_M(t) \cdot \frac{1}{\left(\frac{c_{S2R}}{c_{S2M}} - 1\right)} \quad (5.9)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (5.4) und (5.7) in (5.9) ergibt sich:

$$V_{S2R}(t) = V_L(t) \cdot \left(\frac{1 - \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t)}{\frac{c_{S2R}}{V_{S2\%} \cdot \rho_{S2}} - 1} \right) \quad (5.10)$$

Gleichung (5.10) beschreibt die zuzugebende Menge aus dem Methanol-Reservoir, um ein bestimmtes Methanol-Verhältnis im Medium aufzubauen. Sind die zellspezifischen Parameter α_{ZX} und ρ_{ZX} bekannt, so ist die zuzugebende Menge nur noch abhängig von dem momentanen Volumen der Gesamtflüssigkeit V_L und der Zellkonzentration c_{XL} .

5.4 Umsetzung in MFCS/win

Das Rezept, nach dem der Prozess gefahren wird, muss vor der Kultivierung festgelegt werden. Daher muss das Induktionsvolumen vorab als Variable in MFCS/win angelegt und dessen Berechnung dort gespeichert werden. Im Folgenden soll der Rezeptabschnitt „Produktionsphase“ aufgezeigt und erläutert werden.

Um die korrekte Menge an Methanol hinzuzugeben, wurde die Methanol-Reservoirflasche auf eine Waage gestellt, sodass der Entzug des Methanols über die Masse erfasst werden kann. Da die Konzentration des Methanols im Reservoir bekannt ist, lässt sich durch das errechnete Volumen aus Gleichung (5.10) die benötigte Masse an Methanol leicht bestimmen.

$$m_{S2R} = c_{S2R} \cdot V_{S2R} \quad (5.11)$$

Mit:

m_{S2R} : Masse von Methanol [g]

Der Rezeptabschnitt der Produktionsphase ist in Abbildung 10 auf Seite 39 dargestellt.

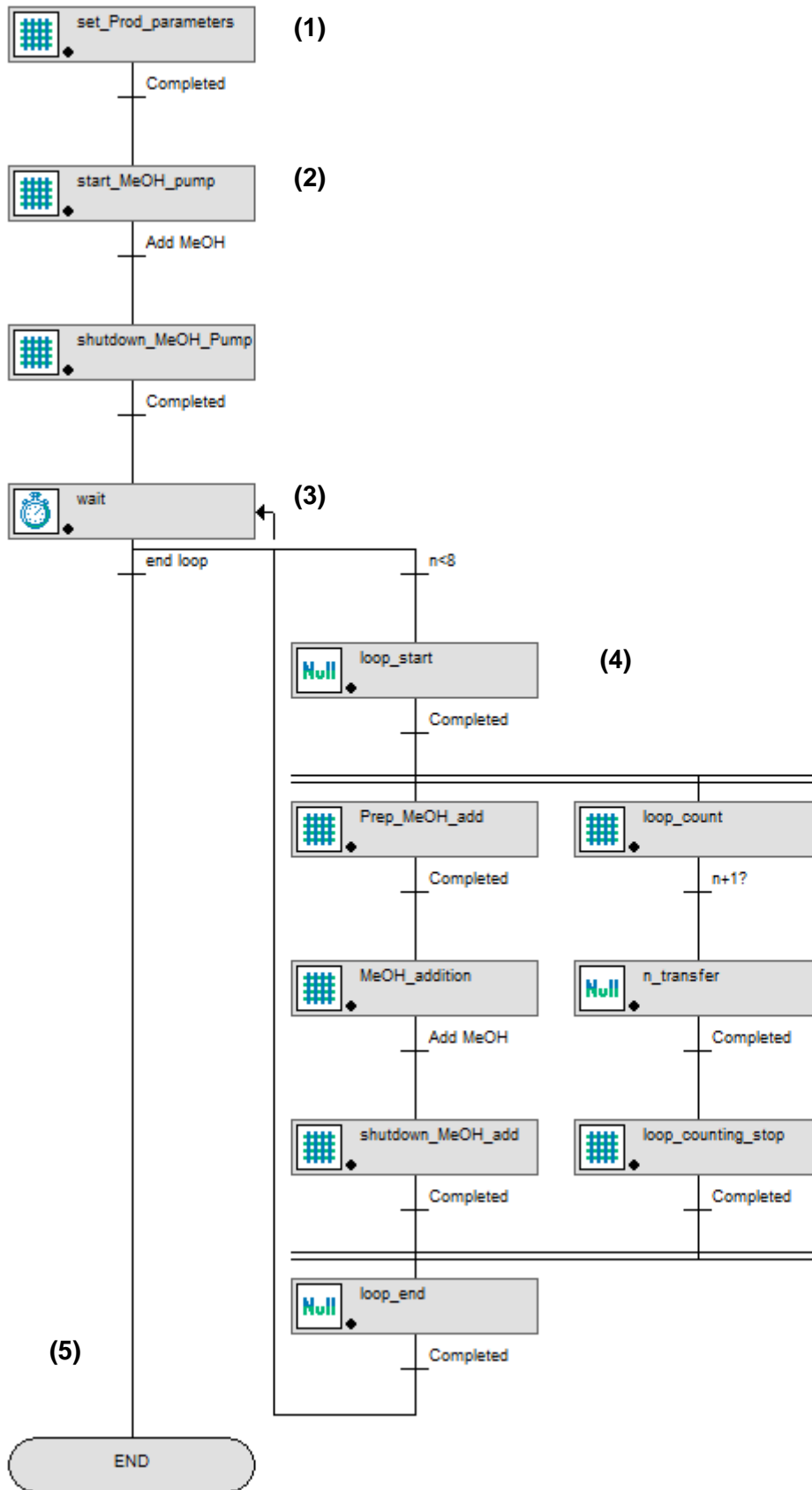


Abbildung 10: Rezeptabschnitt der Produktphase dargestellt im Rezept-Editor von MFCS/win

Im ersten Schritt werden die Vorbereitungen für die Induktion abgeschlossen **(1)**. Anschließend erfolgt die erste Zugabe von Methanol **(2)**, wobei eine definierte Startkonzentration im Medium eingestellt wird. Nach einer Wartezeit **(3)**, die frei wählbar ist, erfolgt die weitere Methanol-Zugabe über eine Schleife **(4)**. Nach dem das Kriterium der Schleife nicht mehr erfüllt ist, bricht die Schleife ab und gelangt über den Punkt „End“ **(5)** in die End-Phase. Das Methanol wird nicht kontinuierlich über eine konstante Pumprate, sondern impulsartig hinzugefügt. Dies liegt daran, da die Änderung der Methanol-Konzentration im Medium nicht online verfolgt werden konnte, und weil die verwendete Pumpe (Watson Marlow 120 Series) die dafür notwendige Pumprate nicht realisieren kann.

(1) Die Berechnung der Variable für das Induktionsvolumen V_{S2R} wird am Beginn des Prozesses gestartet. Dadurch, dass das Gesamtflüssigkeitsvolumen V_L kontinuierlich durch die Waage, auf welche der Bioreaktor steht, berechnet wird, verändert sich die Variable V_{S2R} ebenfalls kontinuierlich. Für die in Gleichung (5.10) aufgeführten Parameter wurden folgende Werte verwendet und in *set_Prod_parameters* eingegeben:

Tabelle 3: Verwendete Parameter zur Berechnung des Methanol-Induktionsvolumen.

Parameter	Wert	Einheit
ρ_{S2}	792	[g l ⁻¹]
c_{S2R}	792	[g l ⁻¹]
c_{S2M}	0,5% - 2% (c_{S2R})	[g l ⁻¹]
c_{XL}	50	[g l ⁻¹]
α_{ZX}	4,55	[g _{ZX} g _X ⁻¹]
ρ_{ZX}	1,09	[g l ⁻¹]

Die zellspezifischen Parameter α_{ZX} und ρ_{ZX} wurden durch Probenahmen aus der Fed Batch-Phase und anschließender Berechnung in Matlab® mittels der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt.

Weiterhin wurden folgende Hilfsvariablen initialisiert:

Tabelle 4: Initialisierte Hilfsvariablen für die Methanol-Zugabe und den Schleifendurchlauf.

Hilfsvariable	Funktion	Berechnung in MFCS/win
$m_{R2,0}$	Kopie des Waagensignals	$m_{R2,0} = m_{R2}(t)$
n	Zählervariable für die Schleife	$n = n + 1$
n_0	Kopie der Zählervariable	$n_0 = n$

Das Waagensignal m_{R2} verändert sich durch den Abzug von Methanol. Die Hilfsvariable $m_{R2,0}$ dient hierbei als Referenzwert, um die bereits gepumpte Menge zu erfassen

In Schritt **(2)** wird das nach Gleichung (5.10) berechnete Volumen aus dem Reservoir gepumpt. Die Pumpe stoppt, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$m_{R2,0} - m_{R2}(t) \geq V_{S2R} \cdot c_{S2R}$$

Da das Massensignal durch das Entfernen von Flüssigkeit stets verringert wird, ergibt die Differenz $m_{R2,0} - m_{R2}(t)$ einen positiven Wert. Ist die Differenz gleich, oder größer als die berechnete Methanolmenge, stoppt die Pumpe.

Nach der Wartezeit *wait* **(3)** folgt der Beginn der Schleife **(4)**, welche über die Hilfsvariablen n und n_0 realisiert wird. Der Schleifenabschnitt wird solange durchlaufen, bis der Wert von n ein bestimmtes Limit überschreitet (in Abbildung 10 $n < 8$). In der Schleife erfolgt die Schleifenzählung und die Methanol-Zugabe parallel. Hierbei wird stets 5 ml Methanol hinzugegeben. Die Pumpe stoppt, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$m_{R2,0} - m_{R2}(t) \geq c_{S2R} \cdot 0,005 \text{ l}$$

Die Schleifenzählung erfolgt folgendermaßen. In der Phase *loop_count* wird die Berechnung von n_0 ausgeschaltet und die von n gestartet. Ist nun

$$n > n_0$$

so ist n um den Wert 1 gestiegen. In *loop_counting_stop* wird die Berechnung von n , sobald n größer geworden ist, gestoppt und die Berechnung von n_0 gestartet. So wird n_0 auf den aktuellen Wert von n gesetzt. Sind beide Schleifenstränge durchlaufen, beginnt erneut die Wartephase *wait*. Ist der Wert n nun größer als die Schleifenbedingung, kann die Schleife nicht mehr durchlaufen werden. Anschließend gelangt der Prozess über den Weg *End* in die End-Phase. Damit der Prozess nicht vorzeitig in die Endphase übergeht, wird der Ausgang mit der Schleifenbedingung gekoppelt. Für die Bedingung *end loop* gilt daher:

$$n \geq \text{Schleifenbedingung}$$

5.5 Ergebnisse der automatisierten Methanol-Zugabe

Aus den gefahrenen Prozessen soll nun die Effizienz des entwickelten Automatisierungsschrittes gezeigt werden:

Aus dem Massensignal der Waage lässt sich die tatsächlich gemessene Menge an Methanol erfassen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ergebnisse der automatisierten Methanol-Zugabe aus den Prozessen KlonI_01 und KlonI_04.

Prozess	Phase	Ist-Wert [ml]	Soll-Wert [ml]	Abweichung
KlonI_01	Induktion (2%)	22,85	23,6	-3,18%
	Schleife 1	5,43	5	8,59%
	Schleife 2	5,30	5	6,06%
	Schleife 3	5,18	5	3,54%
KlonI_04	Induktion (0,5%)	7,54	6,45	16,92%
	Schleife 1	4,92	5	-1,52%
	Schleife 2	5,18	5	3,54%

In den Versuchen sollten folgende Methanol-Konzentrationen eingestellt werden:

2 % (v/v Methanol) : 15,84 g l⁻¹

0,5 % (v/v Methanol) : 3,96 g l⁻¹

Die Methanol-Zugabe in den Schleifen zeigen alle eine relativ genaue Zugabe von Methanol, wobei hier Schwankungen zwischen 80-430 µl auftreten. Bei den Induktionen sind Abweichungen von 0,8-1 ml zu vermerken. Die Ungenauigkeiten sind im Wesentlichen durch drei Faktoren zu erklären. Zum einem misst die Waage auf 0,1 g genau. Bezogen auf das Volumen von Methanol, kann die Waage schrittartige Änderungen von 126 µl erfassen. Jegliche Werte darunter sind daher nicht zu messen. Zweitens ist die Kommunikation zwischen Waage und Pumpe durch eine Totzeit gegeben. Bis demnach der aktuelle Wert der Waage in MFCS/win registriert wurde, muss nach Überprüfung der Stopp-Bedingung, die Pumpe angehalten werden. In dieser Totzeit wird weiterhin Methanol gepumpt. Letztens stellt die verwendete Pumpe einen bedeutenden Faktor dar. Trotz Einklemmen des Schlauches, floss ein Teil des Methanols bereits zurück in die Reservoir Flasche. Das Schlauchvolumen zwischen Reservoir und Reaktor beträgt ungefähr 3 ml wodurch mehr Methanol gepumpt werden müsste, um das Totvolumen des Schlauches zu füllen.

Die Volumina in den Schleifenphasen können als genau genug betrachtet werden. Die Abweichungen von 1 ml in den Induktionsphasen ist jedoch ein größerer Fehler. Zur Untersuchung der methanolabhängigen eGFP Expression, stellt dies jedoch kein großes Problem dar. Es sollte dennoch auf eine andere Schlauchpumpe zurückgegriffen werden, welche das Methanol besser fördern kann. Durch eine geringere Pumprate könnten genauere Ergebnisse erzielt werden.

Dennoch zeigt die hier entwickelte Automatisierungsstruktur eine zufriedenstellende Funktionalität und kann bei impulsartigen Induktionszyklus sehr gut verwendet werden.

6 Untersuchung der Genexpression

In diesem Kapitel werden die eGFP Expression bei unterschiedlicher Methanol Startkonzentration gezeigt und verglichen. Aus vorherigen Versuchen ging hervor, dass die Genexpression bereits vor der eigentlichen Induktion stattfindet. Daher soll die Batch- und Fed Batch-Phase ebenfalls untersucht werden, um vorzeitige Induktoren zu identifizieren. Vorab soll die mathematische Beschreibung der eGFP-Bildung aufgezeigt werden.

6.1 Mathematische Beschreibung der Produktbildung

Wie bereits in Kapitel 3 erwähnt, kann die Produktbildung der Hefezellen durch Gleichung (3.14) beschrieben werden. Unter Berücksichtigung der Änderung des Mediums ergibt sich:

$$\frac{dc_{PM}}{dt} V_M + \frac{dV_M}{dt} c_{PM} = q_{P/X}(t) \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (6.1)$$

Die spezifische Produktbildungsrate ergibt sich durch Umstellung und Umformung durch:

$$q_{P/X}(t) = \frac{dc_{PM}}{dt} \frac{1}{c_{XL}(t)} \cdot \left(1 - \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t) \right) + \frac{dV_M}{dt} \frac{c_{PM}}{c_{XL}(t) \cdot V_L(t)} \quad (6.2)$$

Für die Änderung des Medienvolumens gilt unter Vernachlässigung der Säure-/Basezugabe und der Probenahme der stark vereinfachte Ansatz:

$$\frac{dV_M}{dt} = -F_Z(t) = -q_{X/X}(t) \cdot \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t) \cdot V_L(t) \quad (6.3)$$

Da die eGFP Expression durch Beobachtung des Fluoreszenzsignals erfolgt, wird die Produktkonzentration und dessen Ableitung über die Fluoreszenz beschrieben

$$c_{PM}(t) = K_{P/A} \cdot A_P(t) \quad (6.4)$$

Mit:

$K_{P/A}$: Proportionalitätsfaktor Emission/Konzentration von eGFP [g RFU⁻¹]
 A_P : volumenbezogenes Fluoreszenzsignal (Medium) [RFU l⁻¹]

Zur Berechnung der zeitlichen Änderung der Fluoreszenz wird folgender Ansatz verwendet:

$$\dot{A}_P \sim \frac{A_P(t_{j+1}) - A_P(t_{j-1})}{t_{j+1} - t_{j-1}} \quad (6.5)$$

Einsetzen der Gleichungen (6.3), (6.4) in (6.2) gibt die Gleichung zur Bestimmung der spezifischen Produktbildungsrate:

$$q_{PA/X}(t_j) = \dot{A}_P \frac{1}{c_{XL}(t_j)} \cdot \left(1 - \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} \cdot c_{XL}(t_j) \right) - q_{X/X}(t_j) \cdot \frac{\alpha_{ZX}}{\rho_{ZX}} A_{PM}(t_j) \quad (6.6)$$

Mit:

$q_{PA/X}$: transformierte Produktbildungsrate (Emission) [RFU g_P⁻¹h⁻¹]

Der Wert des Proportionalitätsfaktor ist nicht bekannt und muss daher mit der Produktbildungsrate verrechnet werden. Um die Fluoreszenzbildung der verschiedenen Kultivierungen vergleichbar darzustellen, muss das volumenbezogene Fluoreszenzsignal auf die Zellmasse bezogen werden. Die hierfür verwendete Größe wird als prozessspezifisches Fluoreszenzsignal bezeichnet und berechnet sich durch:

$$Q_P = \frac{A_P}{c_{XL}(t) \cdot V_L(t)} \quad (6.7)$$

Mit:

Q_P : Prozessspezifisches Fluoreszenzsignal [RFU g_X⁻¹ml⁻¹]

6.2 Vorzeitige Genexpression in Abwesenheit von Methanol

Wie bereits erwähnt, findet die Genexpression bereits vor der Induktion durch Methanol statt. Aus den vorherigen Arbeiten von Frau Kirschnick wurde hierbei die Autoinduktion als Ursache angenommen. Eine Untersuchung der Batch- und Fed Batch-Phase soll aufklären, ob die Induktion zu einem bestimmten Zeitpunkt auslöst wird, oder ob die Expression permanent erfolgt.

Der Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 11 dargestellt. Im Allgemeinen verlief die Kultivierung wie erwartet, mit Ausnahme der sehr stark schwankenden Werte des pO_2 - und des Rührer Signals, sowie eines kurzen Wachstumsstopps der Hefezellen beim Übergang in die Fed Batch-Phase. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Werte pO_2 und N_{St} mittels Matlab® geglättet. Der Übergang zur Fed Batch-Phase ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

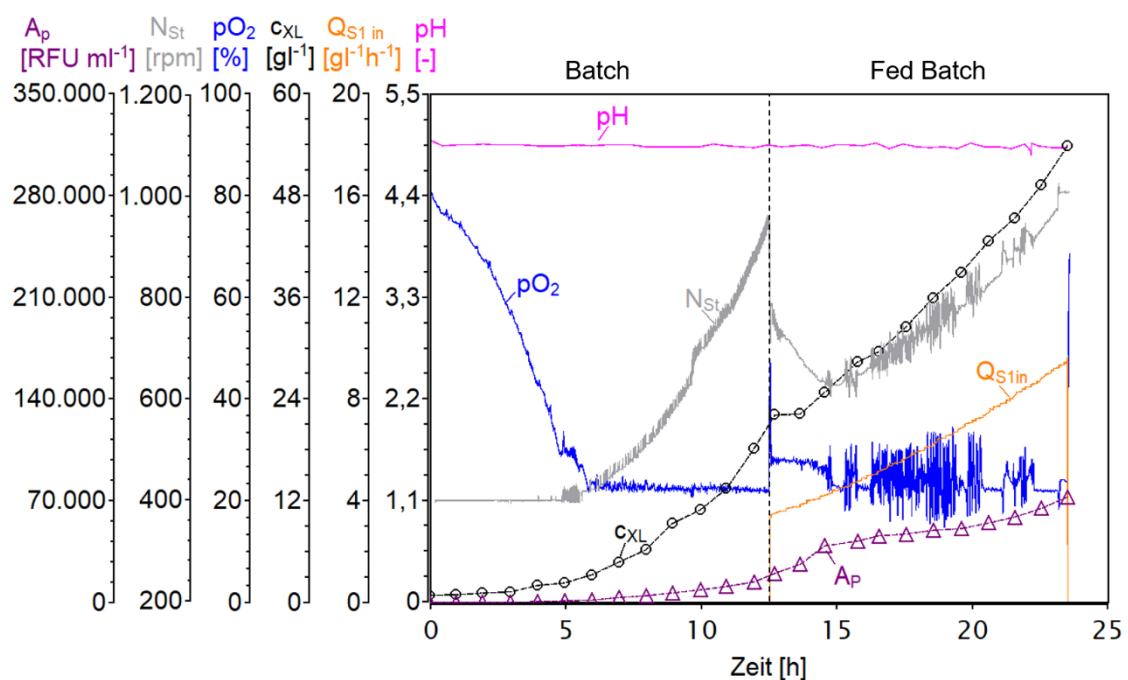


Abbildung 11: Kultivierungsverlauf von *P. pastoris* BSYBG11 am BIOSTAT Aplus zur Untersuchung der eGFP Expression in der Batch- und Fed Batch-Phase. $c_{S1R} = 300 \text{ g l}^{-1}$. Erstellt mit QtiPlot. Kultivierung: KlonI_05.

Nachdem die Vorkultur aus dem Schüttelkolben eine ΔOD von 5,95 AU aufwies, wurde der Bioreaktor angeimpft. Dies sorgte für eine Reduzierung des pO_2 Signals auf 80%. Die Rührerdrehzahl startete bei 400 rpm. Die Zellen c_{XL} begannen nach ca. einer Stunde mit der exponentiellen Phase, welches sehr gut durch das sinkende pO_2 -Signal gezeigt wird. Nach fünf Stunden startete die pO_2 -Regelung, wodurch der pO_2 -Wert konstant bei 25%

gehalten wurde. Daher stieg zu diesem Zeitpunkt die Rührerdrehzahl exponentiell an, wobei nach ca. neun Stunden ein Sprung in der Rührerdrehzahl zu vermerken ist. Nach 12,7 h wurde das Batch-Ende durch einen starken Anstieg des pO_2 -Signals und einer stark sinkenden Rührerdrehzahl detektiert. Die Zellen wuchsen bis dahin exponentiell mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,2634 \text{ h}^{-1}$ auf eine Zellkonzentration von $22,1 \text{ g l}^{-1}$. Das Fluoreszenzsignal A_P stieg während der Batch-Phase nach einem scheinbar exponentiellen Profil an. Durch das Erkennen des Batch-Endes wurde die Zufütterung der *feed* Pumpe gestartet. Hierbei wird Glycerin mit einer Reservoir-Konzentration von 300 g l^{-1} in den Reaktor gepumpt, dargestellt durch die Substrateintragsrate Q_{S1in} . Trotz Start der *feed*-Pumpe, bleibt die Zellkonzentration einer Stunde nach Beginn der Fed Batch-Phase bei $22,1 \text{ g l}^{-1}$. Dies würde erklären, warum die Rührerdrehzahl nach Abfall durch das Batch-Ende, nicht direkt angestiegen ist. Es wurde jedoch Glycerin aus dem Reservoir dazugegeben, was sich aus dem Massensignal der Waage ergibt (Ergebnis hier nicht gezeigt). Nach zwei Stunden Fed Batch-Phase steigt die Rührerdrehzahl wieder an und nimmt den erwarteten Verlauf an. Generell schwankten die Werte der Rührerdrehzahl und der pO_2 -Werte sehr stark in der Fed Batch-Phase. Nach zwei Stunden Fed Batch-Phase wachsen die Hefezellen nun wieder mit einer Wachstumsrate von $0,1078 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$). Hier ist nun eine Änderung des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Nachdem die Zellen mit einer geringeren Wachstumsrate wachsen, ist ebenso eine Reduzierung der Steigung des Fluoreszenzsignals zu erkennen. Die Änderung ist jedoch erst nach zwei Stunden Fed Batch zu erkennen. Nach 23,5 h ist die Fed Batch-Phase mit einer Gesamtdauer von 10,8 h beendet. Hierbei wurde eine Zelldichte von $53,75 \text{ g l}^{-1}$ erreicht. Das pH-Signal lag im Laufe des Prozesses in beiden Phasen relativ konstant bei einem Wert von 4,95.

Eine andere Darstellung des Zellwachstums, kann durch die ermittelten Werte RQ , Q_{O_2} und Q_{CO_2} aus der Abgasanalytik generiert werden. Gerade durch den Respirationskoeffizienten kann der Aufschluss über eine Änderung des Metabolismus gedeutet werden. Der Verlauf der Abgasanalytik ist in Abbildung 12. dargestellt. Von Beginn des Prozesses bis zur Erkennung des Batch-Endes (12,7 h), lässt sich ein exponentieller Verlauf von Q_{O_2} (durchgezogene Linie) und Q_{CO_2} (gestrichelte Linie) sehen. Der Wert des Respirationskoeffizienten schwankt zu Beginn, auf Grund der Adaption der Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen sehr stark. Nach fünf Stunden bleibt RQ bis zum Batch-Ende konstant bei 0,7. Sobald es in die Fed Batch-Phase übergeht, sinken Q_{O_2} und Q_{CO_2} . Dies ist durch den geringeren Sauerstoffbedarf der Zellen bei geringerer Wachstumsrate, auf Grund von fehlendem Wachstum zu erklären. In diesem Abschnitt steigt der Wert des Respirationskoeffizienten von 0,7 auf 0,8.

Dies liegt daran, da bei gleichzeitiger Reduzierung von Q_{O_2} und Q_{CO_2} , kurzzeitig mehr CO_2 ausgestoßen wird. Hieraus könnte eine kurzzeitige Änderung des Metabolismus in Abwesenheit von Glycerin abgeleitet werden.

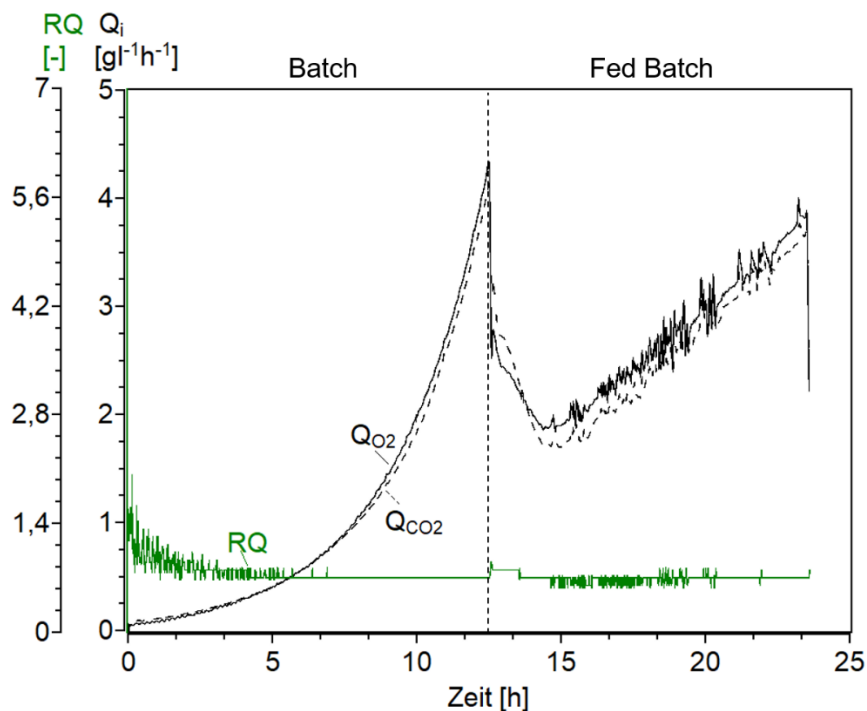


Abbildung 12: Verlauf der aus der Abgasanalytik abgeleiteten Werte der Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} , der CO_2 -Bildungsrate Q_{CO_2} und dem daraus berechneten Respirationskoeffizient RQ . Erstellt mit QtiPlot. Kultivierung: Klonl_05.

Zwar ist die Fluoreszenzmessung relativ eGFP spezifisch, jedoch sollte ein zweite Messmethode zur weiteren Analytik eingesetzt werden. Daher wurden mit ausgewählten Proben-Überständen eine SDS-PAGE durchgeführt, um den Expressionszeitpunkt des eGFPs zu erfassen. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 13 dargestellt. Hierbei wurde der Übergang zur Fed Batch-Phase genauer untersucht, da angenommen wurde, dass die Genexpression dort verstärkt erfolgt. Die Annahme beruht auf der Änderung des RQ -Wertes von 0,7 auf 0,8 und der vermeintlichen Lag-Phase.

Betrachtet man die Probestaschen der Batch-Proben, so ist keine Bande zwischen 25 kDa und 30 kDa zu erkennen. Nach 13,65 h des Prozesses bzw. eine Stunde nach Beginn der Fed Batch-Phase, ist eine leichte Bande zu erkennen, welche gegen Ende der Fed Batch-Phase nun immer intensiver wird. Ob die Genexpression nun in der Fed Batch-Phase gestartet wurde, ist dennoch nicht zu sagen. Die Nachweisgrenze liegt bei der verwendeten Färbemethode zwischen $0,3 \mu g$ – $2 \mu g$ Protein. Ist demnach nicht

genügend produziert wurden, kann es auch nicht sichtbar gemacht werden, zumal die Intensität der Bande sehr schwach ist.

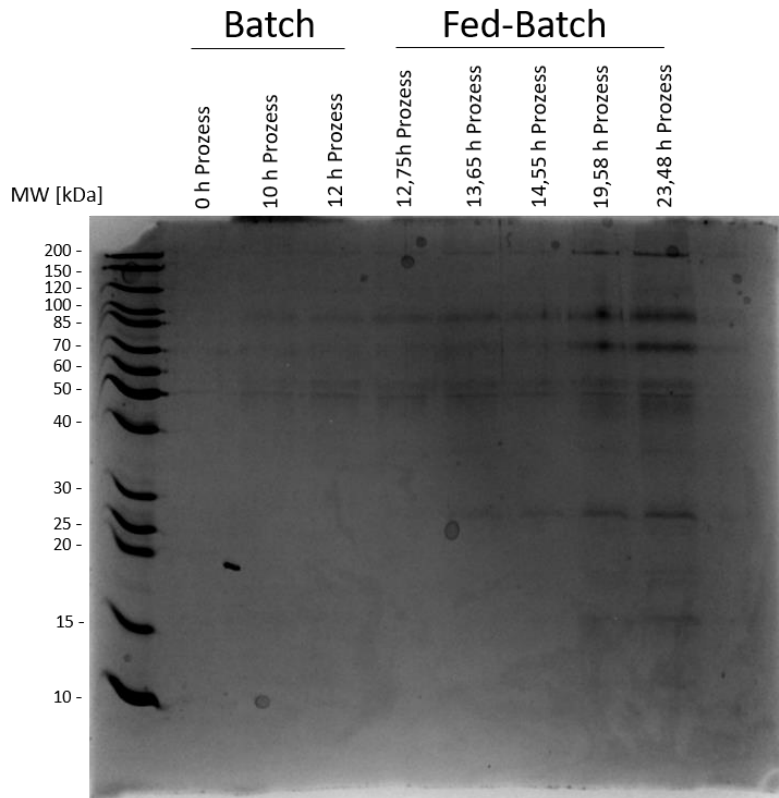


Abbildung 13: Darstellung des SDS-PAGE Gels zur Untersuchung der Genexpression in den Proben-Überständen.

Nimmt man jedoch an, dass die Produktbildung permanent erfolgt, so sollte ein Übergang der Bandenintensität im SDS-PAGE Gel ersichtlich sein, da die Intensität der Banden mit steigendem Prozessalter zunehmen sollte. Hier scheint es, als ob das eGFP erst nach Beginn der Fed Batch-Phase exprimiert wird. Bis zur Prozesszeit 12,75 h ist keine Bande erkennbar. Erst danach lässt sich eine Bande identifizieren. Die folgende Bande (14,55 h) ist von der Intensität nur minimal höher, was bedeutend würde, dass die Produktbildung nicht allzu schnell geschieht. Daher müsste die vorherige Proben tasche (12,75 h) ebenfalls eine Proteinbande aufweisen. Vergleicht man jedoch die Proteinbanden zwischen 50 – 100 kDa, so erkennt man, dass die Banden der Probe 13,65 h Prozesszeit, leicht intensiver sind. Dies würde bedeuten, dass in dieser Tasche ein größeres Probevolumina pipettiert wurde, da die Intensität steigen müsste.

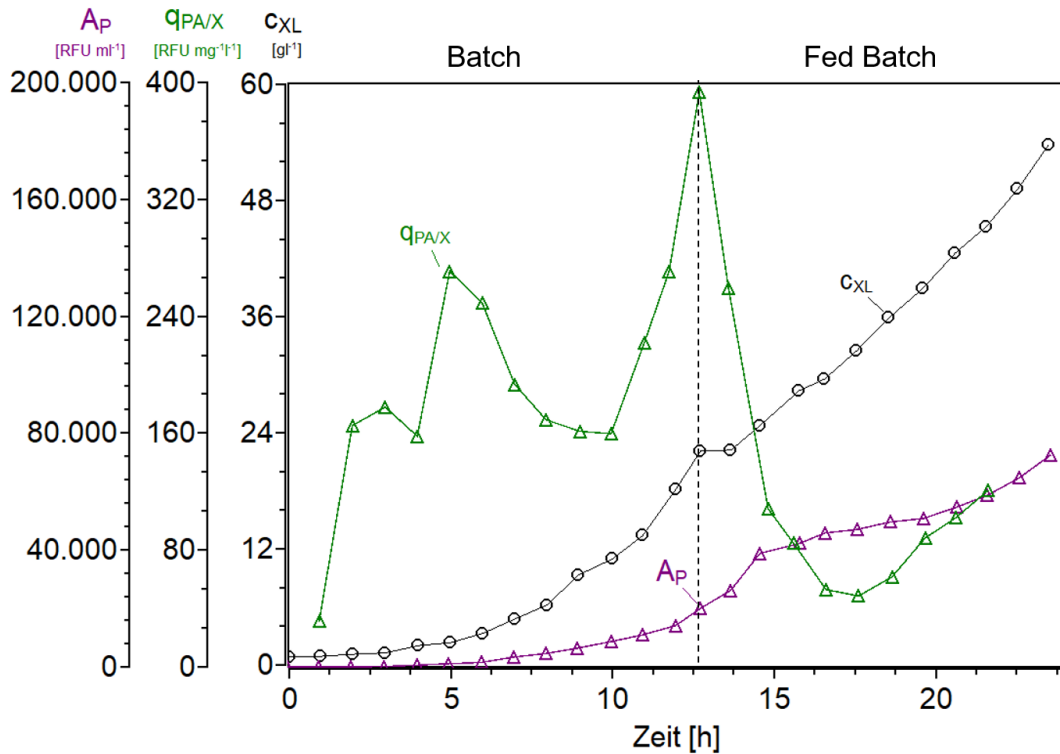


Abbildung 14: Darstellung der spezifischen Produktrate, der Zellkonzentration sowie das gemessene Fluoreszenzsignal in der Batch- und Fed Batch-Phase.

Betrachtet man den Verlauf der transformierten spezifischen Produktbildungsrate in Abbildung 14, so ist die Bildung eines großen Peaks beim Übergang in die Fed Batch-Phase zu erkennen. In dieser Darstellung zeigt sich nun auch ein leichter Anstieg des Fluoreszenzsignals, was als verstärkte Induktion des der eGFP Expression gedeutet werden kann. Dies würde auf Grund des Substratmangels auf eine stressbedingte Induktion hindeuten. Des Weiteren erkennt man ein stark wachstumsabhängiges Produktbildungsprofil. Dies ist dadurch ersichtlich, da die Steigung der Fluoreszenzbildung mit der Änderung der spezifischen Wachstumsrate einhergeht. Da das eGFP sehr stark fluoresziert, ist es gut möglich, dass ein messbares Fluoreszenzsignal erfasst werden kann, ohne dass diese geringen Mengen durch die SDS-PAGE sichtbar werden.

Anhand der Ergebnisse wird angenommen, dass die eGFP Expression wachstumsgekoppelt erfolgt. Des Weiteren scheint die Expression durch Substratmangel induziert zu werden. Da das Glycerin repressiv auf die GFP Expression wirkt, führt die Abwesenheit der Substratquelle dem entsprechend stressbedingt zur Aktivierung des Promotors. Das wachstumsabhängige Fluoreszenzprofil kann jedoch auch durch andere Substanzen wie Riboflavin verursacht werden. Dieses wird ebenfalls in *P. pastoris*

produziert und besitzt die Fähigkeit zur Auto-Fluoreszenz. Es besitzt ein ähnliches Emissionsmaximum wie das GFP (Riboflavin 450/530 nm, GFP 470/510 nm), wodurch ein Teil des Fluoreszenzsignals hierdurch hinzukommen könnte [34]. Hierbei müsste jedoch die Stärke des Emissionsgrades von Riboflavin gemessen werden, um festzustellen, ob sich ein relevanter Anteil ergibt.

6.3 Abhängigkeit der Methanol-Konzentration auf die Genexpression

Im Folgenden werden die eGFP Expression bei unterschiedlicher Methanol-Startkonzentration gezeigt und verglichen. In der Literatur wird zur Induktion eine Methanol-Konzentration zwischen 0,5% - 2% empfohlen. Daher dienen diese beiden Induktionskonzentrationen als Basis der folgenden Versuche.

6.3.1 Genexpression bei 2 % Methanol-Konzentration

Der Verlauf der Kultivierung KlonI_01, bei 2% Methanol-Induktionskonzentration, ist in Abbildung 15 dargestellt. Neben den stark schwankenden pO_2 - und N_{St} -Werte verlief die Kultivierung problemlos. Die pO_2 - und N_{St} -Werte wurden mittels der Software Matlab® geglättet. Hier wurde ein Glycerin-Reservoirkonzentration von 400 g l^{-1} und reines Methanol als Induktionsmittel verwendet.

Der Bioreaktor wurde mit einer ΔOD von 5,3 AU aus der Vorkultur angeimpft. Nach dem Animpfen sinkt der pO_2 erwartungsgemäß und erreicht nach ca. vier Stunden einen Wert von 25%, wodurch die pO_2 Regelung startet. Die Rührerdrehzahl lag bis dahin konstant bei 400 rpm. Ohne eine vernehmbare Lag-Phase wuchsen die Hefezellen exponentiell mit einer Wachstumsrate von $0,2544 \text{ h}^{-1}$. Nach ca. 9,5 h sank der pO_2 kurzzeitig unter 20% worauf die Drehzahl sprunghaft anstieg. Das pO_2 Signal wurde dann bis zum Erreichen des Batch-Endes bei 12,4 h konstant bei 25% gehalten. Nun startet die *feed*-Pumpe und beginnt das Glycerin aus einer 400 g l^{-1} Glycerin-Lösung in den Reaktor zu befördern. In der gesamten Fed Batch-Phase sind starke Schwankungen des pO_2 und daher auch stark schwankende N_{St} Werte zu erkennen. Zu Beginn der Fed Batch-Phase sinkt die Rührerdrehzahl und beginnt erst nach 1,5 h Stunden wieder zu steigen.

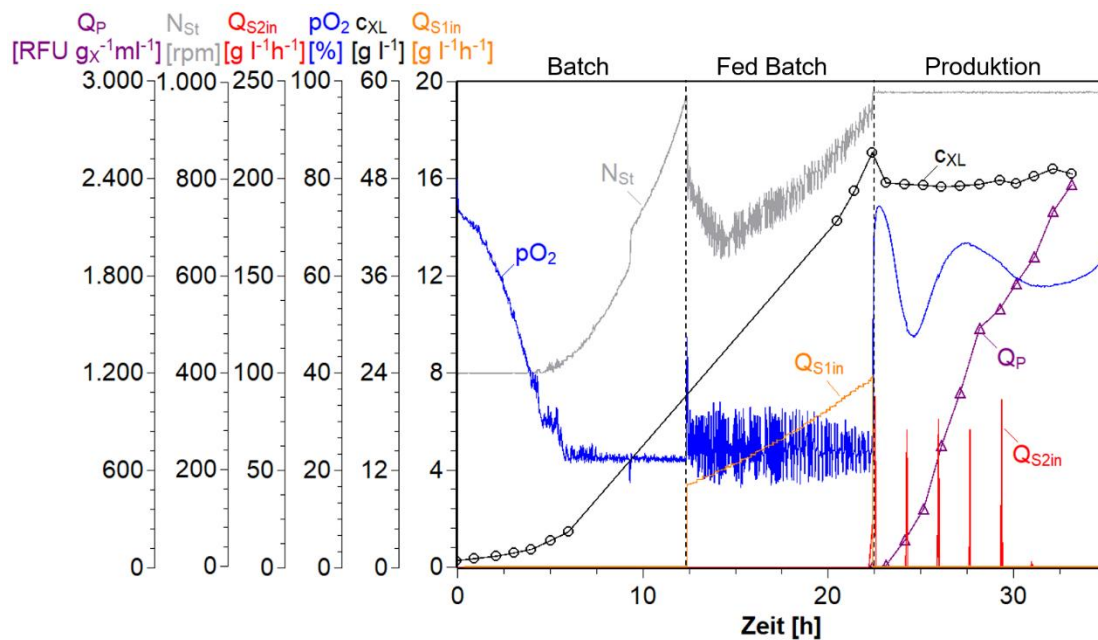


Abbildung 15: Kultivierungsverlauf von *P. pastoris* mit 2% Methanol-Induktionskonzentration. $C_{S1R} = 400 \text{ g l}^{-1}$. Erstellt mittels der Software QtiPlot.

Das exponentielle Zufütterungsprofil wurde zehn Stunden beibehalten, sodass eine Zellkonzentration von $51,1 \text{ g l}^{-1}$ am Ende der Fed Batch-Phase erreicht wurde. Aus den gemessenen Werten der Zellkonzentrationen gegen Ende der Fed-Batch-Phase, wurde eine spezifische Wachstumsrate von $0,284 \text{ h}^{-1}$ berechnet, wobei für einen genaueren Wert ein deutlich größerer Zeitabschnitt berücksichtigt werden müsste. Nach dem die *feed*-Pumpe stoppte, stieg das pO_2 Signal direkt auf 70 %. Die Induktion startete automatisiert nach 22,4 h durch die Zugabe von 22,85 ml Methanol wodurch eine Methanol-Konzentration von ca. 2 % (genau 1,95 %) im Medium eingestellt wurde. Die Rührerdrehzahl wird in der Produktionsphase konstant gehalten. Nach Zugabe des Methanols stieg das pO_2 Signal kurzzeitig an, da sich die Zellen wahrscheinlich erst an die Umstellung des Substrates gewöhnen müssen. Nach 40 Minuten sank das pO_2 Signal über 1,6 h auf 47 %. Es nimmt daraufhin einen schwingenden Verlauf an.

In MFCS/win wurde eine Schleife von vier Durchläufen eingestellt, welche nach je 1 h 40 min weitere 5 ml Methanol dazu gibt. Dies ist durch das rote Signal Q_{S2in} gegeben. Der dargestellte Verlauf der Fluoreszenz wird über das prozessspezifische Fluoreszenzsignal Q_p dargestellt. Zur Ermittlung von Q_p wurde der letzte Fluoreszenzwert der Fed Batch-Phase als Referenzwert genommen. Nach Induktion beginnen die Hefezellen eGFP zu produzieren. Der Anstieg scheint hierbei exponentiell zu verlaufen. Nach fünf Stunden Produktionsphase reduziert sich die Steigung der eGFP Bildung. Dies geschieht ab dem Zeitpunkt, an dem das pO_2 Signal seinen zweiten Hochpunkt erreicht.

Die Hefezellen zeigen ein geringes Wachstum wobei sich die Zelldichte von 47 g l^{-1} auf 49 g l^{-1} erhöht.

Insgesamt wurden ca. 43 ml Methanol hinzugegeben, was einer Masse von 34 g entspricht. Die Hefezellen konnten trotz 2 % Methanol-Induktionskonzentration eGFP exprimieren und zeigten sogar ein geringes Wachstum. Demnach konnten keine toxischen Effekte durch das Methanol beobachtet werden.

6.3.2 Genexpression bei 0,5 % Methanol-Konzentration

Im folgenden Experiment KlonI_04, sollte eine 0,5 %ige Methanol-Konzentration im Medium zur Induktion der eGFP Produktion eingestellt werden. Es sollte über den Prozess nur eine geringe Menge an Methanol hinzugegeben werden, sodass das Expressionsende erreicht wird. Hier wurde ein Glycerin-Reservoirkonzentration von 300 g l^{-1} und reines Methanol als Induktionsmittel verwendet.

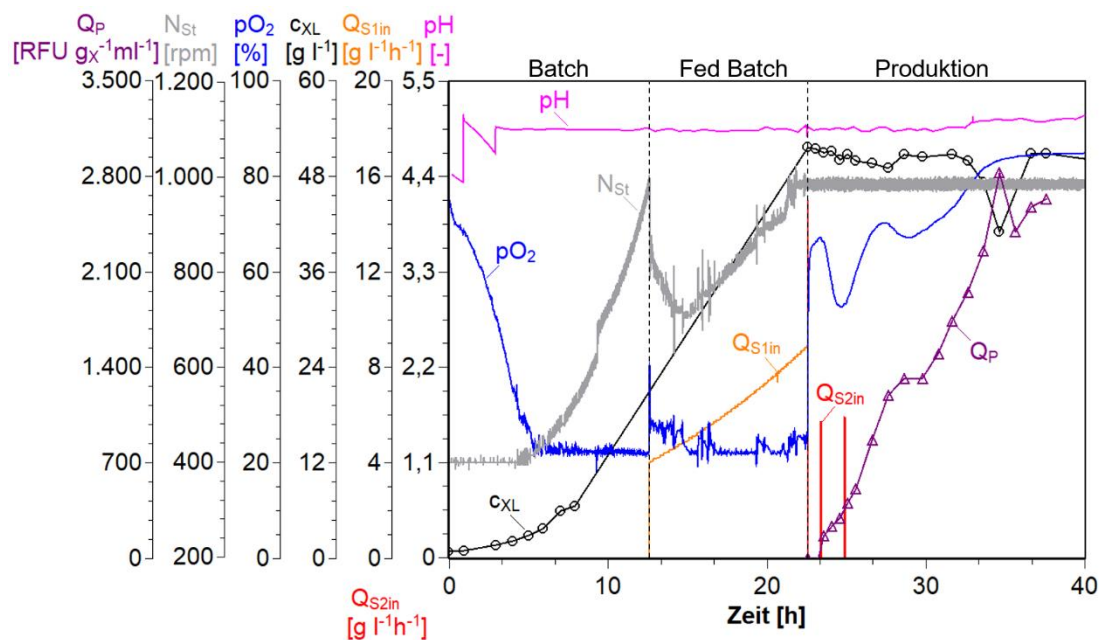


Abbildung 16: Kultivierungsverlauf von *P. pastoris* mit 0,5% Methanol-Induktionskonzentration.

Die pO_2 und N_{st} Werte schwankten während der Fed Batch-Phase. Daher wurden diese zur besseren Darstellung mittels Matlab[®] geglättet.

Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 16 dargestellt. Angeimpft wurde mit einer ΔOD von 6 AU aus der Vorkultur. Zu Beginn, funktionierte die pH Regelung nicht korrekt, wodurch der pH-Wert nach dem Animpfen stetig sank. Durch manuelle Zugabe über die Basenpumpe, wurde dies vorerst geregelt. Nach ca. 2,5 h war die pH Regelung wiederhergestellt. Die Zellen scheinen dadurch keinen Schaden genommen zu haben, da

die Zellen, nach einer kurzen Lag-Phase von einer Stunde, wie erwartet in die exponentielle Phase übergangen. Der pO_2 Wert nimmt stetig ab und erreicht nach drei Stunden den Wert 25 %, worauf die pO_2 Regelung startete. Während der pO_2 Regelung blieb der pH-Wert weiterhin konstant und die Rührerdrehzahl stieg ebenfalls stetig an. Nach neun Stunden konnte wieder ein Sprung der Rührerdrehzahl vermerkt werden. Die Zellen wuchsen in der Anfangsphase des Batchs mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,263 \text{ h}^{-1}$.

Nach 12,6 h wurde das Batch-Ende detektiert, worauf die Zufütterung aus dem 300 g l^{-1} Glycerin-Reservoirkonzentration startete. Wieder sank die Rührerdrehzahl zu Beginn der Fed Batch-Phase. Nach 1,5 h stieg die Rührerdrehzahl wieder an, sodass das pO_2 Signal über die gesamte Fed Batch-Phase bei 25 % lag. Nach zehn Stunden Fed Batch-Phase erreichten die Hefezellen eine Zellkonzentration von $51,7 \text{ g l}^{-1}$.

Induziert wurde anschließend über die Pumpe durch Zugabe von 7,5 ml Methanol. Es wurde ca. 1 ml zu viel gepumpt, wodurch die Methanol-Konzentration im Medium 0,58 % statt 0,5 % betrug. Es folgen zwei weitere Zugaben von Methanol. Die Erste Zugabe erfolgte manuell nach einer Stunde und die zweite bedingt durch die Schleife nach 2,4 h. Demnach wurden insgesamt ca. 17 ml Methanol hinzugefügt. Durch die Induktion startete die Genexpression. Zunächst stieg das Fluoreszenzsignal, dargestellt durch Q_P , stark an und erreichte nach ca. 29 h Prozesszeit mit $1315 \text{ RFU g}_X^{-1}\text{ml}^{-1}$ einen Hochpunkt. Wie bereits bei der vorher beschriebenen Kultivierung, ist auch hier das schwingende Verhalten des pO_2 -Wertes zu erkennen, jedoch etwas geringer. Bis 24 h Prozesszeit, ist eine stetige Reduzierung der Zellkonzentration von $51,55 \text{ g l}^{-1}$ auf 49 g l^{-1} erkennbar. Anschließend sinkt der pO_2 Wert kurzzeitig wieder ab, worauf das Fluoreszenzsignal und die Zellkonzentration wieder ansteigen. Die Zellkonzentration bleibt anschließend für 3,5 h relativ konstant bei $50,5 \text{ g l}^{-1}$. Der pO_2 -Wert steigt nun bis auf 82 %, was auf Substratmangel hindeutet. Hier steigt der pH-Wert an, was auf eine Zellyse deuten lässt. Durch die Zellyse, könnte intrazelluläres eGFP ins Medium gelangen, wodurch das Fluoreszenzsignal weiterhin ansteigen würde. Tatsächlich fällt die Zellkonzentration nun rapide ab, wobei der Spitzenwert von 40 g l^{-1} als Ausreißer angenommen wird. Dem entsprechend auch der korrespondierende Messwert der Fluoreszenz bei 34,6 h Prozesszeit. Die Steigung der Fluoreszenzbildung nimmt zu diesem Zeitpunkt langsam ab. Trotz des sehr hohen pO_2 Werte scheinen die Zellen weiterhin eGFP zu produzieren. Ein weiterer Verlauf des Prozesses ist in Abbildung 17 dargestellt. Hier werden die aus der Abgasanalytik berechneten Werte Q_{O_2} , Q_{CO_2} und RQ gezeigt.

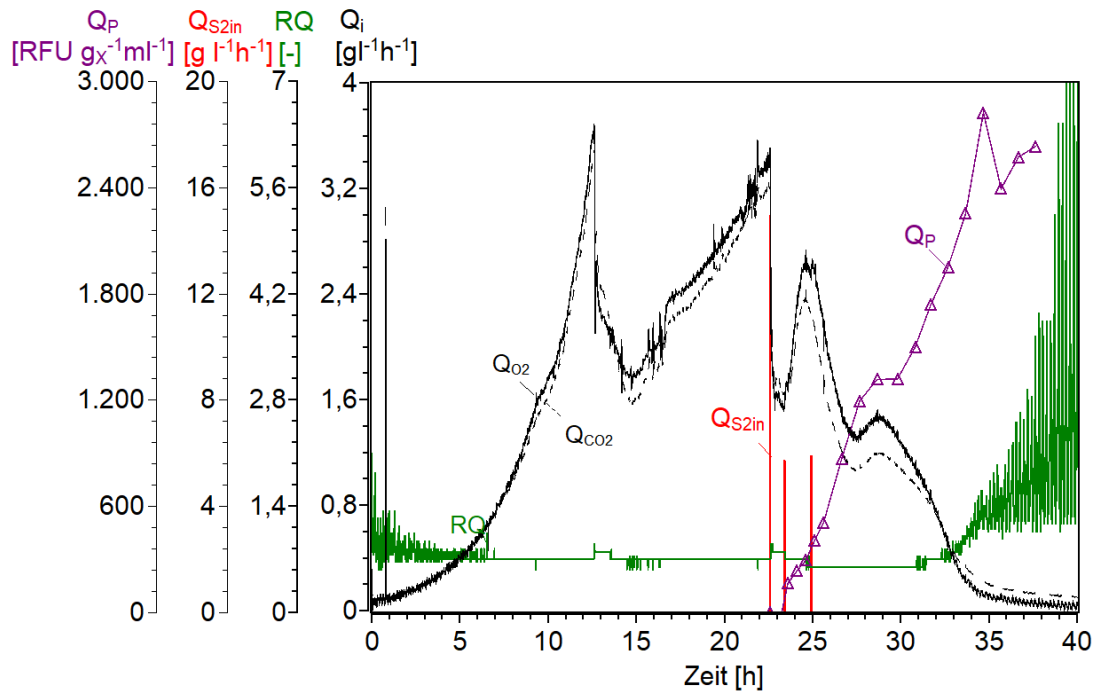


Abbildung 17: Darstellung der Abgasanalytik während der eGFP Expression bei 0,5% Methanol-Induktionskonzentration.

Interessant hierbei ist die Produktphase. Der Beginn wird durch Q_{S2in} signalisiert. Wie auch beim Übergang von der Batch- zur Fed Batch-Phase ist hier ebenfalls beim Übergang in die Produktphase eine kurzzeitige Änderung des RQ -Wertes auf den Wert 0,8 zu erkennen. Der Sauerstoffeintrag sowie der CO_2 Ausstoß steigt hierbei nach Induktion wieder stark an. Auffällig ist die Reduzierung des RQ -Wertes von 0,7 auf 0,6 in der Induktionsphase, welcher bis 31 h Prozesszeit konstant bleibt. Bis dahin ist deutlich zu erkennen, dass mehr Sauerstoff eingetragen als CO_2 abgegeben wird. Die Differenz dieser Werte ist in der Induktionsphase wesentlich höher als in der Batch- und Fed Batch-Phase. Die Steigung der Fluoreszenzbildung erreicht ihr Hochpunkt zur gleichen Zeit wie Q_{O_2} , und Q_{CO_2} . Nachdem die Fluoreszenzwerte ab Prozesszeit 31 h wieder steigen, sinken gleichzeitig Q_{O_2} , und Q_{CO_2} , wobei der RQ -Wert kurzzeitig wieder auf 0,7 steigt. Ab diesem Zeitpunkt laufen Q_{O_2} , und Q_{CO_2} gegen Null.

Zur weiteren Untersuchung der Genexpression wurde eine SDS PAGE durchgeführt, welche in Abbildung 18 zu sehen ist.

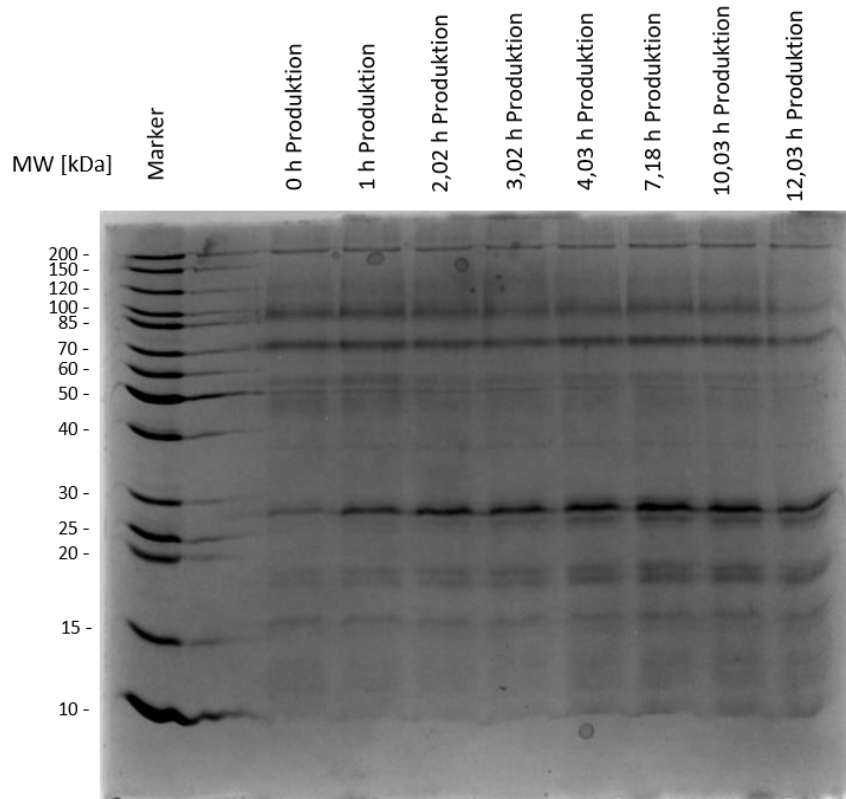


Abbildung 18: Darstellung des SDS-PAGE Gels zur Untersuchung der Genexpression in den Proben-Überständen der Produktphase des Versuches: Klonl_04.

Zu Beginn der Produktphase ist bereits eGFP im Medium aus der Batch- und Fed Batch-Phase vorhanden. Bereits nach 1 h, zeigt sich eine starke Expression durch eine deutlich intensivere Bande, welche nun im Verlauf von links nach rechts, stetig zunimmt. Nach 7 h Expression, ist der erste Hochpunkt der Fluoreszenzbildung erreicht, was sich in Abbildung 18 durch eine intensive Bande bemerkbar macht. Der anschließende Anstieg des Fluoreszenzsignals ist hier nicht mehr beobachtbar. Der Wert des Hochpunkts beträgt ca. $1300 \text{ RFU g}_x^{-1}\text{ml}^{-1}$. Nach 10 h Produktionszeit, wurde ein Wert von ungefähr $1900 \text{ RFU g}_x^{-1}\text{ml}^{-1}$ gemessen, was sich auf jeden Fall in der Intensität der Bande widerspiegeln müsste. Das eGFP könnte durch Proteasen, oder durch sonstigen Zerfall mit der Zeit abgebaut worden sein, wodurch zwar neues eGFP gebildet wird, jedoch nicht als Bande bei 26,9 kDa erkenntlich wird. Hierbei darf das Chromophor jedoch nicht beschädigt werden. Mit der Zeit bildet sich eine Bande unterhalb der eGFP Bande, dessen Intensität ab Produktionszeit 3,02 h stark zunimmt, was auf eventuellem Abbau von eGFP deuten könnte.

Es besteht weiterhin die Annahme, dass das Fluoreszenzsignal, ebenfalls durch andere Substanzen hervorgerufen wird.

6.3.3 Vergleich der Expressionsverläufe

Die Expressionsphasen der Versuche KlonI_01 und KlonI_04 werden in Abbildung 19 verglichen. Hierbei wird sich auf die spezifische Fluoreszenzbildung der Zellen und die Reaktionskinetik bezogen.

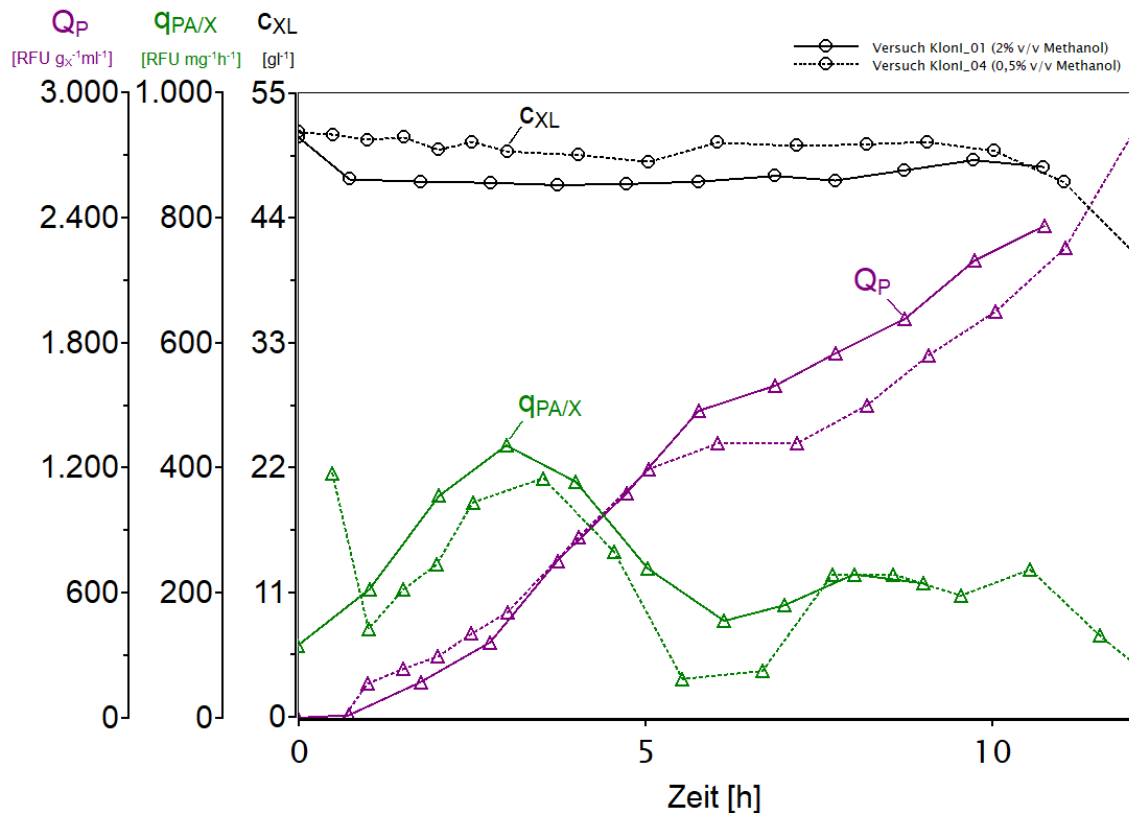


Abbildung 19: Vergleich der Reaktionskinetik und Produktivität bei 0,5% und 2% Methanol-Induktionskonzentration.

Generell wurde in der Kultivierung KlonI_04 (gestrichelte Linie) eine höhere Zelldichte als beim Versuch KlonI_01 (durchgezogene Linie) erreicht. Betrachtet man den Verlauf der Fluoreszenz (Q_P), so zeigen beide Kultivierungen einen sehr ähnlichen Verlauf. Beide Verläufe zeigen bei ca. 6 h Produktionszeit eine Reduzierung der Produktbildung, was sehr gut anhand der Reaktionsrate $q_{PA/X}$ ersichtlich wird. Die Maxima der Produktbildungsraten beider Kultivierungen liegen zeitlich sehr nahe beieinander. Bei der 0,5%igen Methanol Induktionskonzentration erreicht die Produktbildungsrate ihr Maximum nach 3,5 h Produktionsphase mit einem Wert von 383 RFU mg⁻¹h⁻¹. Bei der 2%igen Methanol Induktionskonzentration erfolgt dies nach 3 h und beträgt 435 RFU mg⁻¹h⁻¹. Die vierfach höhere Startkonzentration zeigt somit nur eine geringfügig höhere Produktbildung. Hierbei ist eine Hemmung der Genexpression auf Grund der hohen Methanol-Konzentration nicht auszuschließen. Es ist interessant, dass die

Produktbildungsraten beider Kultivierungen nach ca. 7,5 h den gleichen Wert von ca. 230 RFU mg⁻¹h⁻¹ annehmen, obwohl im Versuch KlonI_01 deutlich mehr Methanol hinzugegeben wurde.

Vergleicht man jedoch lediglich die Kinetik zu Beginn der Induktion, so scheint die Induktionskonzentration keinen großen Einfluss auf die Produktbildung zu haben. Die Sättigung der Promotoren wird demnach bereits durch 0,5% (v/v) Methanol erreicht, wodurch überschüssiges Methanol durch AOX2 abgebaut werden kann.

Der Anstieg des pO₂-Wertes nach 29 h Prozesszeit (KlonI_04 – 0,5% (v/v) Methanol), deutet zwar auf Substratmangel hin, dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass Rest-Methanol im Medium vorhanden ist. Demnach könnte der Wiederanstieg der Fluoreszenz, hierdurch entstanden sein. Messfehler der Fluoreszenz sind nicht ausgeschlossen.

7 Fazit

Die automatisierte Induktion konnte erfolgreich etabliert werden. Durch die Einstellung der Wartezeit und Anzahl der Schleifendurchläufe kann eine pseudo-kontinuierliche Methanol-Zugabe erreicht werden. Dennoch sollte die Pumpe (Watson Marlow 120S) gegen eine andere Pumpe ausgetauscht werden, die geringere Pumpraten realisieren kann, wodurch die Genauigkeit der Dosierung erhöht wird. Trotz der geringen Ungenauigkeiten erfolgt die Induktion zuverlässig.

Im Allgemeinen zeigt sich eine starke Expressionsrate des eGFPs zu Beginn beider Produktionsphase. Bei der 2%igen Methanol-Konzentration konnte eine leicht höhere Produktbildungsrate beobachtet werden, wobei der Unterschied sehr gering ist. Weiterhin scheint die Einstellung einer 2%igen Methanol-Konzentration keine Auswirkungen auf die Zellpopulation zu haben, da weiterhin ein leichtes Wachstum und Genexpression beobachtet werden konnte. Da die Methanol-Konzentration im Medium nicht verfolgt und die Konzentration des eGFP nicht explizit gemessen werden konnte, lassen sich jedoch keine genauen Aussagen über den Metabolismus aufstellen.

Es scheint allerdings so, dass die eGFP Produktion wachstumsgekoppelt erfolgt. Dies wurde aus dem Fluoreszenzverlauf der Batch und Fed Batch-Phase deutlich. Die Steigung des Fluoreszenzsignals verlief in der Fed Batch-Phase deutlich flacher als in der Batch-Phase, bei welchem die Zellen unlimitiert mit μ_{\max} wachsen. Des Weiteren kann der AOX1 Promotor ebenfalls durch Substratmangel induziert werden. So konnte beim Übergang von der Batch-Phase in die Fed Batch-Phase ein Anstieg der Produktbildungsrate beobachtet werden. Des Weiteren wurde dies auch durch die Entwicklung einer Bande im SDS-PAGE Gel gezeigt.

Der erneute Anstieg des Fluoreszenzsignals bei Versuch KlonI_04 deutet eventuell auf eine stressbedingte Induktion hin, wobei eine Induktion durch Rest-Methanol nicht ausgeschlossen wird. Nimmt man eine stressbedingte Induktion an, so wäre das hinzugepumpte Methanol bereits nach sieben Stunden verstoffwechselt worden, wodurch anschließend eine Phase des Substratmangels gefolgt wäre. Da die Expression von AOX1 ursprünglich zur Entgiftung und Energiegewinnung der Zelle genutzt wurde, ist die stressbedingte Induktion ein Versuch der Zellen Energie zu gewinnen.

8 Zusammenfassung

Ziel dieser Bachelorarbeit war die Entwicklung einer automatisierten Expressionsphase und Untersuchung der Genexpression von eGFP in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*. Die Automatisierung hierbei sollte eine genaue Dosierung von Methanol im Medium bewerkstelligen und bei gewünschten Änderungen im Prozess benutzerfreundlich über MFCS/win gesteuert werden können.

Die Hefe *Pichia pastoris* ist in der Forschung und Industrie ein beliebtes Expressionssystem, da die Hefe kostengünstig kultiviert werden kann, das Genom leicht durch gentechnische Methoden zugänglich ist und es über komplexe posttranslationale Modifikationsmechanismen verfügt. Der hier verwendete Stamm *Pichia pastoris* BSYBG11 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Noll hergestellt, bei dem das *AOX1* Gen deletiert und durch eine Codon-optimierte eGFP-Sequenz ersetzt wurde. Dadurch besitzt der verwendete Stamm einen Mut^S Phänotyp.

Es wurde ein dreistufiger Kultivierungsprozess gefahren, bestehend aus einer Batch-Phase, bei der die Hefezellen bei einer Glycerin-Konzentration von 30 g l⁻¹ unlimitiert wachsen und im Anschluss in einer zehn-stündigen substratlimitierenden Fed Batch-Phase kontrolliert auf eine Zelldichte von 50 g l⁻¹ kultiviert werden. In der letzten Phase, der Produktphase, wird die Genexpression durch Methanol induziert, wobei die Produktbildung bei 0,5% und 2% (v/v) Methanol-Konzentration untersucht wurde.

Zur Kultivierung stand der Bioreaktor BIOSTAT® Aplus der Firma Sartorius Stedim mit einem Reaktor-Volumen von drei Litern zur Verfügung. Durch eingebaute pH- und pO₂-Sonden, sowie einer Abgasanalytik, konnte der Prozess online überwacht werden. Zur Datenerfassung und Prozesssteuerung wurde das Prozessleitsystem MFCS/win verwendet. Die Fluoreszenz der eGFP-haltigen Proben wurde offline gemessen.

Die Entwicklung der Automatisierungsstruktur erfolgte in MFCS/win. Hierbei wurde eine Formel zur Berechnung des notwendigen Methanol-Volumens entwickelt und in MFCS/win implementiert. Mit Hilfe eines Waagensignals und einer Pumpe, konnte die bereits gepumpte Menge an Methanol erfasst werden, sodass sich die gewünschte Konzentration im Medium einstellt. Im Laufe des Prozesses erfolgt die Methanol-Zugabe zyklisch über eine in MFCS/win programmierte Schleifenfunktion, welche nach einer benutzerdefinierten Zeit stets 5 ml Methanol hinzugibt. So kann eine pseudo-kontinuierliche Methanol-Versorgung generiert werden

Bei der Untersuchung der Expressionsphase stellte sich heraus, dass die Genexpression bereits in der Batch- und Fed Batch-Phase erfolgt. Die Steigung des gemessenen Fluoreszenzsignals korrelierte mit der Änderung der spezifischen Wachstumsrate der Zellen, was auf eine wachstumsgekoppelte Produktbildung deuten lässt. Weiterhin konnte bei Substratmangel die Induktion der eGFP Expression beobachtet werden. Der AOX1 Promotor wird daher auch stressbedingt induziert. Es wurde gezeigt, dass durch die 2%igen Methanol-Induktionskonzentration eine leicht höhere Produktbildungsrate erreicht werden konnte, als bei der 0,5%igen Induktionskonzentration, wobei der Unterschied sehr gering ist. Es konnten keine toxischen Effekte auf die Zellpopulation bei der 2%igen Methanol-Induktionskonzentration beobachtet werden. Daher kann die Genexpression bei nachfolgenden Kultivierungen problemlos durch 2% (v/v) Methanol induziert werden.

9 Ausblick

Zur weiteren Optimierung des Prozesses, sollte eine Vorrichtung zur Erfassung der Methanol-Konzentration im Medium etabliert werden. Hierdurch könnte der Methanol-Metabolismus erfasst werden und eine konstante Methanol-Konzentration im Medium aufrechterhalten werden. Dahingehend wird die Verwendung einer anderen Pumpe empfohlen. Die Pumpe muss in der Lage sein, auch geringe Mengen an Methanol fördern zu können, sodass eine genauere Dosierung ermöglicht wird.

Weiterhin könnte ein Aufreinigungsprotokoll für das eGFP erstellt werden. Die Fluoreszenz ist zwar ein spezifischer Messwert, jedoch fehlt die Umrechnung in eine Konzentration. Zum jetzigen Zeitpunkt kann das Produkt nicht bilanziert werden.

Abbildungsverzeichnis

1. Darstellung des Methanol-Metabolismus bei methylotrophen Hefen mit: AOX: Alkoholoxidase, CAT: Katalase, FLD: Formaldehyd Dehydrogenase, FGH: S-Formylglutathion Hydrolase, FDH: Formiat Dehydrogenase, DAS: Dihydroxyacetonsynthase, TPI: Triosephosphatisomerase, DAK: Dihydroxyacetonkinase, FBA: Fructose 1,6-bisphosphataldolase, FBP: Fructose 1,6-bisphosphatase, MFS: Methylformiatsynthase; DHA: Dihydroxyaceton, GAP: Glycerinaldehyd 3-Phosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, F_{1,6}BP: Fructose 1,6-bisphosphat, F6P: Fructose 6-phosphat, Pi: Phosphat-Rest, Xu5P: Xylulose 5-phosphat, GSH: Glutathion, PYR: Pyruvat; PPP: Pentosephosphatweg, TCA: Citratcyclus. [8] 4
2. Darstellungen des in *P. pastoris* Stamm BSYBG11 transformierter Expressionsvektor pBSY2Z mit Codon-optimierten eGFP Gen. Das gezeigte Plasmid wurde mit der Software SnapGene® Viewer 4.3 erstellt. Für die Aminosäuresequenz des eGFP's, der Prä- und Propeptidsequenz siehe Anhang S.XVIII. 6
3. Schematische Darstellung einer Translation im rauen Endoplasmatischen Retikulum mit anschließender Sekretion in den extrazellulären Raum [12]. 7
4. Schematische Struktur des GFP's. Dargestellt ist die Fasstruktur mit den 11β Faltblättern (außen) und die α-Helix Struktur mit Chromophor im inneren [21]. 8
5. Schematische Darstellung des dreistufigen Kultivierungsprozesses [23]. Mit den hier verwendeten Bezeichnungen: c_{S1M} = Glycerin, c_{S3M} = Methanol. Methanol wird in dieser Arbeit durch dem Index S2 beschrieben. 9
6. Teil-Aufbau des verwendeten Kultivierungssystem. Dargestellt wird der Bioreaktor BIOSTAT® Aplus mit angeschlossener Instrumentierung und Probennahmeinrichtung. Nicht auf dem Bild zu sehen: Umlaufkühler, Methanol-Flasche und Schaumfalle. 15
7. Darstellung der MFCS/win Shell und den dazugehörigen Icons [23]. 22
8. Schematischer Ablauf des automatisierten Kultivierungsprozesses. 23
9. Darstellung des Dreiphasenmodells im Bioreaktor. 35
10. Rezeptabschnitt der Produktphase dargestellt im Rezept-Editor von MFCS/win 39
11. Kultivierungsverlauf von *P. pastoris* BSYBG11 am BIOSTAT Aplus zur Untersuchung der eGFP Expression in der Batch- und Fed Batch-Phase. c_{S1R} = 300 g l⁻¹. Erstellt mit QtiPlot. Kultivierung: KlonI_05. 46
12. Verlauf der aus der Abgasanalytik abgeleiteten Werte der Sauerstoffeintragsrate Q_{O₂}, der CO₂-Bildungsrate Q_{CO₂} und dem daraus berechneten Respirationskoeffizient R_Q. Erstellt mit QtiPlot. Kultivierung: KlonI_05. 48

13. Darstellung des SDS-PAGE Gels zur Untersuchung der Genexpression in den Proben-Überständen.....	49
14. Darstellung der spezifischen Produktrate, der Zellkonzentration sowie das gemessene Fluoreszenzsignal in der Batch- und Fed Batch-Phase.	50
15. Kultivierungsverlauf von <i>P. pastoris</i> mit 2% Methanol-Induktionskonzentration. $C_{S1R} = 400 \text{ g l}^{-1}$. Erstellt mittels der Software QtiPlot.	52
16. Kultivierungsverlauf von <i>P. pastoris</i> mit 0,5% Methanol-Induktionskonzentration.	53
17. Darstellung der Abgasanalytik während der eGFP Expression bei 0,5% Methanol-Induktionskonzentration.	55
18. Darstellung des SDS-PAGE Gels zur Untersuchung der Genexpression in den Proben-Überständen der Produktphase des Versuches: KlonI_04.....	56
19. Vergleich der Reaktionskinetik und Produktivität bei 0,5% und 2% Methanol-Induktionskonzentration.	57

Tabellenverzeichnis

1. Verwendete Parameter zur Bestimmung der Start-Zufütterungsrate in der Fed-Batch Phase	25
2. Ansätze zur Herstellung eines SDS-PAGE Gels. Ansatz reicht für vier Gele [33].	31
3. Verwendete Parameter zur Berechnung des Methanol-Induktionsvolumen.....	40
4. Initialisierte Hilfsvariablen für die Methanol-Zugabe und den Schleifendurchlauf.....	40
5. Ergebnisse der automatisierten Methanol-Zugabe aus den Prozessen KlonI_01 und KlonI_04.....	42
6. Verwendete Geräte zur Durchführung der Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	XIV
7. Verwendete Geräte zur Bestimmung der Biotrocken- & Biofeuchtmasse	XIV
8. Verwendete Geräte zur Bestimmung der optischen Dichte	XV
9. Verwendete Geräte zur Messung der Fluoreszenz.....	XV
10. Verwendete Geräte zur Herstellung der SDS-PAGE Gele.....	XV
11. Verwendete Chemikalien zur Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	XVI
12. Verwendete Chemikalien/Produkte zur Färbung der SDS-PAGE Gele	XVI
13. Zusammensetzung des Minimalmediums zur Herstellung der (1) Vorkultur und (2) Hauptkultur im BIOSTAT® Aplus.	XVII
14. Zusammensetzung der PTM4 Stocklösung	XVII
15. Ansatz der Biotin Stocklösung.....	XVII
16. Ein-Buchstabencode zur Identifizierung von Aminosäuren.....	XVIII

Literatur

- [1] Voedisch, B.; Menzel, C.; Jordan, E. et al.: Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *In: Laborwelt 6* (2005).
- [2] Juturu, V.; Wu, J.C.: Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *In: Chembiochem : a European journal of chemical biology*, Vol. 19 (2018), Iss. 1, pp. 7-21.
- [3] Porro, D.; Gasser, B.; Fossati, T. et al.: Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *In: Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 89 (2011), Iss. 4, pp. 939-948.
- [4] Cereghino, G.P.L.; Cereghino, J.L.; Ilgen, C. et al.: Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *In: Current opinion in biotechnology* 13 (2002), Heft 4, S. 329-332.
- [5] Schügerl, K.; Bellgardt, K.-H. (eds.): Bioreaction engineering – Modeling and control ; with 70 tables. Springer, Berlin, 2000.
- [6] Cregg, J.M.; Cereghino, J.L.; Shi, J. et al.: Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *In: Molecular Biotechnology* 16 (2000), Heft 1, S. 23-52.
- [7] Peña, D.A.; Gasser, B.; Zanghellini, J. et al.: Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *In: Metabolic engineering*, Vol. 50 (2018), pp. 2-15.
- [8] Hartner, F.S.; Glieder, A.: Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *In: Microbial cell factories*, Vol. 5 (2006), p. 39.
- [9] Anthony, C.: The biochemistry of methylotrophs. Acad. Pr, London, 1982.
- [10] Cregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J. et al.: Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *In: Molecular and Cellular Biology* 9 (1989), Heft 3, S. 1316-1323.
- [11] YURIMOTO, H.: Molecular Basis of Methanol-Inducible Gene Expression and Its Application in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*. *In: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (2009), Heft 4, S. 793-800.
- [12] Brandt, M.; Pankewytch, M.: Klonierung von eGFP und seine sekretorische Expression in *Pichia pastoris*. Hamburg, HAW Hamburg, Projektarbeit, 2018.

- [13] Engler, C.; Kandzia, R.; Marillonnet, S.: A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *In: PloS one*, Vol. 3 (2008), Iss. 11, e3647.
- [14] Heiss, S.; Puxbaum, V.; Gruber, C. et al.: Multistep processing of the secretion leader of the extracellular protein Epx1 in *Pichia pastoris* and implications for protein localization. *In: Microbiology (Reading, England)*, Vol. 161 (2015), Iss. 7, pp. 1356-1368.
- [15] Ohba, Y.; Fujioka, Y.; Nakada, S. et al.: Fluorescent protein-based biosensors and their clinical applications. *In: Progress in molecular biology and translational science*, Vol. 113 (2013), pp. 313-348.
- [16] Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F.H. et al.: Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *In: Biochemistry* 13 (1974), Heft 12, S. 2656-2662.
- [17] Zimmer, M.: Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *In: Chemical Reviews* 102 (2002), Heft 3, S. 759-782.
- [18] Yang, F.; Moss, L.G.; Phillips, G.N.: The molecular structure of green fluorescent protein. *In: Nature biotechnology*, Vol. 14 (1996), Iss. 10, pp. 1246-1251.
- [19] Barondeau, D.P.; Putnam, C.D.; Kassmann, C.J. et al.: Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 100 (2003), Iss. 21, pp. 12111-12116.
- [20] Jung, G.; Wiehler, J.; Zumbusch, A.: The photophysics of green fluorescent protein: influence of the key amino acids at positions 65, 203, and 222. *In: Biophysical journal*, Vol. 88 (2005), Iss. 3, pp. 1932-1947.
- [21] Remington, S.J.: Green fluorescent protein: a perspective. *In: Protein science : a publication of the Protein Society*, Vol. 20 (2011), Iss. 9, pp. 1509-1519.
- [22] Royant, A.; Noirclerc-Savoye, M.: Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *In: Journal of structural biology*, Vol. 174 (2011), Iss. 2, pp. 385-390.
- [23] Cornelissen, G.: Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*. Hannover, Universität Hannover, Dissertation, 2004.

- [24] *Luedeking, R.; Piret, E.L.*: A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *In: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1 (1959), Heft 4, S. 393-412.
- [25] *Demmer, J.; Kleindienst, B.*: Site Acceptance Test eines BIOSTAT® Aplus Prototypen. HAW Hamburg, 2014.
- [26] Endres + Hauser: Betriebsanleitung Oxymax COS22D - Sensor für die Messung von gelöstem Sauerstoff mit Memosens-Technologie, 2014, <https://www.de.endress.com/de/messgeraete-fuer-die-prozesstechnik/fluessigkeitsanalyse-produktuebersicht/sauerstoff-amperometrisch-sensor-cos22d>.
- [27] BlueSens gas sensor GmbH: Betriebsanleitung BlueInOneFerm, <https://www.bluesens.de/produkte/alle-gassensoren/blueinone-ferm/>.
- [28] Christina Kirschnick: Etablierung einer Kultivierung von *Pichia pastoris* im Laborfermenter zur Expression von eGFP. Hamburg, HAW Hamburg, Bachelorarbeit, 2018.
- [29] *Storhas, W.*: Bioverfahrensentwicklung. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013.
- [30] *Burgess, R.R.; Deutscher, M.P.*: Guide to protein purification, *Methods in enzymology* no. 463, Elsevier Acad. Press, San Diego, Calif., 2009.
- [31] *Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Gatto jr., G.J. et al.*: Stryer Biochemie, Lehrbuch, Springer Spektrum, Berlin, 2018.
- [32] *Müller-Esterl, W.*: Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, Lehrbuch, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018.
- [33] Praktikumsskript der HAW Hamburg: Praktikum Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren, 2018.
- [34] *Hisiger, S.; Jolicoeur, M.*: A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *In: Journal of biotechnology*, Vol. 117 (2005), Iss. 4, pp. 325-336.

Geräteliste

Tabelle 6: Verwendete Geräte zur Durchführung der Kultivierung von *P. pastoris*

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Bioreaktor	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BIOSTAT® Aplus 2
pH-Sonde	Endres+Hauser	Memosens CPS171D
pO ₂ -Sonde	Endres+Hauser	Memosens COS81D
Niveausonde	Sartorius Stedim Biotec GmbH	-
Abgassensor (CO ₂ und O ₂)	BlueSensgassensor GmbH	BlueInOne FERM
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP6201
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	ED420S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	FB12 CCE-S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP2202 S
Schlauchpumpe (S1)	Ismatec SA.	ISM796
Schlauchpumpe (S2)	Watson Marlow	120S
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 7: Verwendete Geräte zur Bestimmung der Biotrocken- & Biofeuchtmasse

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

Geräteliste

Tabelle 8: Verwendete Geräte zur Bestimmung der optischen Dichte

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

Tabelle 9: Verwendete Geräte zur Messung der Fluoreszenz.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Platten-Reader	TECAN Trading AG	GENios

Tabelle 10: Verwendete Geräte zur Herstellung der SDS-PAGE 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

Chemikalienliste

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien zur Kultivierung von *P. pastoris*

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Carl Roth
Kalium-dihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth
Ammoniumsulfat	$(NH_4)_2SO_4$	Carl Roth
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Carl Roth
Calciumsulfat Dihydrat	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Carl Roth
Natriumcitrat Dihydrat	$Na_3(C_6H_5O_7)$	Carl Roth
Ammoniak (25%)	$NH_3 + H_2O$	Carl Roth
Phosphorsäure (85%)	H_3PO_4	Carl Roth
Methanol	CH_3OH	VWR

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien/Produkte zur Färbung der SDS-PAGE 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 13: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Herstellung der (1) Vorkultur und (2) Hauptkultur im BIOSTAT® Aplus.

Komponente	Summenformel	Konzentration, [g l ⁻¹]
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	10 ⁽¹⁾ , 30 ⁽²⁾
Kalium-dihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	6,43
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,25
Kaliumsulfat	K ₂ SO ₄	2,15
Calciumsulfat Dihydrat	CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,34
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4,10
Natriumcitrat Dihydrat	Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)	1,47

Tabelle 14: Zusammensetzung der PTM4 Stocklösung

Komponente	Summenformel	Konzentration, [g l ⁻¹]
Calciumsulfat Pentahydrat	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	2,00
Natriumiodid	NaI	0,08
Mangansulfat Dihydrat	MnSO ₄ · H ₂ O	3,00
Natriummolybdat Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,20
Borsäure	H ₃ BO ₃	0,02
Calciumsulfat Dihydrat	CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,50
Cobald(II)-chlorid Hexahydrat	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,50
Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	7,00
Eisensulfat Heptahydrat	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	22,00
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	1,00

Die PTM 4 Konzentration im Minimalmedium/feed-Medium beträgt 8 ml l⁻¹

Tabelle 15: Ansatz der Biotin Stocklösung

Komponente	Summenformel	Konzentration, [g l ⁻¹]
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,20

Die Biotin Konzentration im Minimalmedium/feed-Medium beträgt 4 ml l⁻¹

Tabelle 16: Ein-Buchstabencode zur Identifizierung von 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	Lysin
M Methionin	Methionin
F Phenylalanin	Phenylalanin
P Prolin	Prolin
S Serin	Serin
T Threonin	Threonin
W Tryptophan	Tryptophan
Y Tyrosin	Tyrosin
V Valin	Valin
U Selenocystein	Selenocystein
O Pyrrolysin	Pyrrolysin

eGFP:

VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTL
 VTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTL
 VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
 HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

Präpeptid Sequenz:

MRFPSIFTAVLFAASSALA

Propeptid Sequenz:

APVNTTTEDETAQIPAEAVIGTSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVS
 LELR