

Quality by Design und Process Analytical Technology zur Herstellung bioaktiver Proteine

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried
Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
Benjamin Gola, M. Sc.

geboren am 28.03.1985 in Lutherstadt Wittenberg

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Korreferent Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann
Tag der Promotion: 02.12.2016

Zusammenfassung

Botulinum Toxin A findet Anwendung bei unterschiedlichen Indikationen (z. B. Tremor, Faltenreduzierung etc.) beim Menschen. Dieser Wirkstoff (Active Pharmaceutical Ingredient, API) wird biotechnologisch durch die anaerobe Kultivierung von *Clostridium botulinum* hergestellt. Das Toxin ist eine Zink-abhängige Protease EC 3.4.24.69 und wirkt innerhalb von Neuronen.

Die kommerzielle, biotechnologische Herstellung dieser Protease unterliegt prozessbedingten Schwankungen. Diese Schwankungen führen zu Abweichungen der Produktkonzentration zwischen unterschiedlichen Batchfermentationen.

In dieser Arbeit werden unterschiedliche Einflussgrößen als Ursache für die beobachtete Prozessvariabilität untersucht, identifiziert und charakterisiert. Es werden Hilfsmittel der Quality by Design Initiative der Food and Drug Administration (FDA, amerikanische Gesundheitsbehörde) verwendet, um die Prozessvariabilität zu reduzieren. Zu diesen Hilfsmitteln gehören die statistische Versuchsplanung sowie die Process Analytical Technology (PAT, Prozessanalytik). Bei der Prozessanalytik wird in dieser Arbeit die mittlere Infrarotspektroskopie (mIR) verwendet. Zur Auswertung und dem Vergleich von unterschiedlichen Spektren kommt die multivariate Datenanalyse zum Einsatz (PCA, Hauptkomponentenanalyse).

Es wurden zwei Haupteinflussfaktoren auf die Produktkonzentration und Variabilität identifiziert. Diese sind das Inokulum, welches zum Animpfen der Fermenter genutzt wird, sowie das Fermentationsmedium selbst. Die Wachstumsphase, Zellmenge und Methode wie das Inokulum in den Fermenter eingebracht wird, hat einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration. Einen weiteren wesentlichen Einfluss auf die Produktkonzentration zeigt das verwendete Fermentationsmedium. Die DoE Methodik identifiziert die Konzentration der Kohlenstoff (C)-, Stickstoff (N)- und Vitaminquelle (V-) sowie die unterschiedlichen Charge der N- und V-Quelle als wesentliche Einflussfaktoren auf die Toxinkonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass sich die V- und N-Quelle von Charge zu Charge unterscheiden und dieser Unterschied zum Teil für OOS Batche verantwortlich ist. Durch die Erstellung von empirischen Fermentationsmodellen mithilfe von DoE können Fermentationsmedien (Rohstoffchargen) die OOS Ergebnisse liefern, so eingesetzt werden, dass spezifikationskonforme Produktkonzentrationen erzielt werden.

Durch mIR Spektroskopie und multivariate Datenanalyse ist es möglich eine Unterscheidung zwischen Rohstoffklassen (V-/N-Quelle) und unterschiedlichen Chargen innerhalb einer Klasse durchzuführen.

Process Analytical Technology, Quality by Design, industrielle Enzymproduktion

Abstract

Botulinum Toxin A is applied at different indications (e. g. Tremor, wrinkle reduction etc.) in humans. This active pharmaceutical ingredient (API) is produced by anaerobic cultivation of *Clostridium botulinum*. The toxin is a zinc dependent protease EC 3.4.24.69 and acts inside of neurons.

The commercial biotechnological production process for this protease is subjected to variability. This variability leads to deviations in product concentration between subsequent batches.

In this work different influential parameters as source for the observed process variability will be examined, identified and characterized. Certain tools from Food and Drug Administrations (FDA) Quality by Design initiative will be used to minimize the observed process variability. The herein included tools are Design of Experiments (DoE) and Process Analytical Technology (PAT). The application of PAT will be conducted via middle infrared spectroscopy. To evaluate and compare different spectra, multivariate data analysis is used (PCA, principal component analysis)

Two major influential factors on product concentration and its variability were identified. The first factor is the inocula used for inoculation of fermenters, the second is the fermentation media itself. The growth phase, cell mass and method how the inocula is transferred into the fermenter has a significant influence on the height of product concentration. Another significant influence on the product concentration showed the utilized fermentation broth. The DoE methodology identified the concentration of carbon (C)-, nitrogen (N)- and vitamin (V)- source as well as different lots of N- and V- sources as significant parameters on the toxin concentration. It could be shown, that the V- and N-Source differ from lot to lot and that this difference can partial be hold accountable for OOS fermentations. Through empirical fermentation models, derived from DoE methodology it became possible to use raw material lots which originally lead to OOS fermentations, to create fermentation broths which had a specification compliant outcome.

Middle infrared spectroscopy combined with multivariate data analysis allowed for distinguishing between raw material classes (V-/N-Source) as well as discriminating between different lots inside a raw material class.

Process Analytical Technology, Quality by Design, industrial enzyme production

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis Mai 2015 in Teilen am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper und Frau Dr. Dörte Solle angefertigt. Ihnen möchte ich für die fachliche Unterstützung und die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten danken, sowie die sehr intensive Korrektur dieser Arbeit.

Der überwiegende Teil der praktischen Arbeit wurde bei der Merz Pharma GmbH & Co. Kg a. A. Werk Dessau angefertigt. Für die mir gebotenen Möglichkeiten sowie ertragreichen Diskussionen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Torsten Wagner, Herrn Dr. Thomas Stibora sowie Herrn Dr. Klaas Wulfetange.

Ein besonderer Dank geht an meine Kollegen, zu vielzählig um alle namentlich zu erwähnen, doch in Vertretung Dipl.-Ing. (FH) Christian Krawczyk und B. Sc. Mathias Reitz, die nicht nur ein angenehmes Arbeitsumfeld geschaffen haben, sondern auch den Großteil meiner Einarbeitung und Unterstützung übernahmen.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Frank Weiler sowie Frau Dr. Julia Wiesner für die Benutzung von neuem Equipment bevor die eigenen Mitarbeiter damit arbeiten konnten.

Weiterhin möchte ich mich bei all denen Bedanken die hier nicht namentlich erwähnt wurden- Studenten, Kommilitonen und Kollegen bei Merz sowie an der Universität Hannover.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, möchte ich für ihre Hilfe, Unterstützung und ihr Verständnis bei allen meinen Vorhaben danken.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Zielstellung der Arbeit.....	2
2. Theoretische Vorbetrachtungen	2
2.1 Process Analytical Technology und Quality by Design (PAT/QbD) zur Entwicklung von robusten Prozessen.....	2
2.2 Problembeschreibung des Botulium Toxin Produktions-Prozesses	6
2.3 Produkt	7
2.3.1 Struktur	7
2.3.2 Wirkmechanismus.....	8
2.3.3 Biosynthese und Freisetzung	8
2.4 Organismus	9
2.4.1 Regulation der Toxinsynthese	11
2.4.2 Zellmetabolismus und äußere Faktoren, die die Toxinkonzentration beeinflussen	14
2.5 Statistische Versuchsplanung/ Design of Experiments (DoE)	17
2.6 Mittlere Infrarot Spektroskopie (mIRS).....	20
2.7 Multivariate Datenanalyse/Chemometrie	21
3. Material und Methoden	22
3.1 5L Batchfermentation von <i>Clostridium botulinum</i>	23
3.2 Statistische Versuchsplanung	25
3.3 Analytik	25
3.4 mIR Spektroskopie	27
4. Ergebnisse und Diskussion	27
4.1 Beschreibung der Variabilität der Toxinkonzentration und deren Ursachen	28
4.2 Stoffstrom des Inokulums	30
4.2.1 Variabilität der Produktkonzentration durch das Zellbankalter	31
4.2.2 Auswirkungen der Inokulationsmenge und Animpfmethode auf die Produktkonzentration	33
4.2.3 Auswirkung der Wachstumsphase des Inokulums auf die Produktkonzentration .	41

4.3	Standardisierte Batchfermentation	47
4.4	Stoffstrom des Fermentationsmediums	51
4.4.1	Variabilität der Produktkonzentration durch die Rohstoffchargen	51
4.4.2	Beeinflussung der Endproduktkonzentration durch die eingesetzten Rohstoffkonzentrationen und unterschiedlichen Chargen der N-Quelle (DoE 1)	54
4.4.3	Validierung der Ergebnisse aus dem DoE 1 Model im 5 L Maßstab.....	60
4.4.4	Überprüfung der Modellgrenzen des DoE 1 und Übertragung der optimalen Einwaagen auf andere Rohstoffchargen.....	63
4.4.5	Empirisches Fermentationsmodel für andere Rohstoffchargen (DoE 2, DoE 3).....	66
4.4.6	Validierung der Ergebnisse aus dem DoE 3 Model im 5 L Maßstab.....	72
4.4.7	Analytik der V- und N-Chargen.....	73
4.4.8	Einfluss der Sterilisation des Mediums auf die Produktkonzentration	75
4.5	Infrarotspektroskopie	77
4.5.1	Chargenunterschiede innerhalb einer Rohstoffgruppe	78
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	85
Anhang	1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Design- und Control Space für 3 Parameter.....	4
Abb. 2: Struktur von Botulinum Toxin A, modifiziert, rot-Bindungsdomäne, grün-Translokationsdomäne, blau-Protease (Lacy, Tepp, Cohen, DasGupta, & Stevens, 1998)	8
Abb. 3: proteolytische Prozessierung der Polypeptideinzelkette zum aktiven Toxin, nach Melling et al., 1988	9
Abb. 4: phylogenetische Einordnung von <i>Clostridium botulinum</i> ATCC 3502 aus Gupta & Gao, 2009, modifiziert. Die dargestellten Zahlenwerte beschreiben das Maß für die Ähnlichkeit (100-sehr ähnlich, 1- nicht ähnlich), berechnet durch 3 verschiedene Algorithmen	10
Abb. 5: vereinfachte schematische Übersicht über das Stimuli-Reaktionsnetzwerk bedingt durch das Environom	11
Abb. 6: vereinfachte schematische Darstellung eines Versuchssystems mit Einfluss-, Stör- und Zielgrößen.....	18
Abb. 7: grafische Darstellung eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans für 3 Einflussgrößen (Faktoren) mit 2 Stufen (Level) für jede Einflussgröße	19
Abb. 8: schematische Darstellung des Upstreamings und der Fermentation im Technikums- und Produktionsmaßstabs	24
Abb. 9: Kalibrierfunktion, Glukosekonzentration über Optischer Dichte	27
Abb. 10 schematische Darstellung der Variabilität beinhaltenden Stoffströme in und aus dem Fermenter	29
Abb. 11: erreichte Endproduktkonzentrationen nach 72 h Fermentation in Abhängigkeit der gewählten Animpfmethode (Pellet, Liquid) und der verwendeten Zellmasse.....	35
Abb. 12: stichprobenartige Überprüfung der optischen Dichte der IC2 Kultur direkt vor dem Animpfen der Hauptkultur, Mittelwert im 2 seitigen 95% Vertrauensintervall.....	37
Abb. 13: Produktkonzentration nach 72h Fermentation im Fermenterüberstand in Abhängigkeit der verwendeten Inokulationsmethode (Liquid, Pellet).	39
Abb. 14: Verlauf der optischen Dichte bei einer Fermentation	42
Abb. 15: grafische Darstellung der erreichten Produktkonzentrationen für die Gruppen A _{Roh} in Abhängigkeit der räumlichen Anordnung bei der Bearbeitung der Versuchsansätze (a), in Abhängigkeit der Bearbeitungsreihfolge (c) sowie für die Gruppe B _{Roh} (b, d)	46
Abb. 16: charakteristischer Verlauf einer Batchkultivierung im Technikum, optische Dichte in FTU-Formazin turbidity units	48

Abb. 17: Verlauf der <i>C. botulinum</i> Kultur mit 1/10 der Standard C-Quellenkonzentration....	50
Abb. 18: zeitlicher Verlauf der erreichten Produktkonzentrationen am Ende der Fermentation im 5 Jahre Zeitfenster in der Produktion. Datenpunkte gleicher Farbe entsprechen gleichen V/N-Chargen.....	52
Abb. 19: erreichte Produktkonzentrationen mit 2 unterschiedlichen Chargenkombinationen: schwarz-V4N5, grau-V3N6	54
Abb. 20: Ergebnisse des DoE 1, Abb. c zeigt die Response Surface bei 20 g·L ⁻¹ N2 Charge..	58
Abb. 21: erreichte Produktkonzentration für 3 biologische Replikate optimierter Medienkomposition (hellgrau, a, b, c) und Standardansätze (dunkelgrau, e, f, g) ...	62
Abb. 22: grafische Darstellung der Erweiterung des Versuchsgebietes von DoE 2 im Versuch DoE 3.....	68
Abb. 23: Darstellung der Faktoreffekte (a: C-Quelle, b: V-Quelle, c: N-Quelle) auf die Zielgröße (Produktkonzentration) im DoE 3	69
Abb. 24: Response Surface der Produktkonzentration des DoE 3, schwarzer Rahmen-Response Surface des DoE 2 mit prozentualen Konzentrationsabweichungen zu DoE 3, blaues Kreuz- höchste erreichte Produktkonzentration und Medienzusammensetzung die für die Bestätigungsversuche im 5L Fermentermaßstab genutzt wurde	70
Abb. 25: biologische Replikatversuche mit optimierten Rohstoffeinwaagen basierend auf den Ergebnissen des DoE 3 (hellgrau, a, b, c) sowie der Standardfermentation nach MBR (dunkelgrau, d, e, f)	72
Abb. 26: erreichte Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Sterilisationsart des Fermentationsmediums	76
Abb. 27: a) Rohdaten der mIR Messung der N-Quelle, b) mittels der 1. Ableitung vorverarbeitete Daten	79
Abb. 28: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse innerhalb der Gruppe der N-Quelle, mit den Gruppen Q3 (gute Charge), Q1/2 (mittelmäßige Charge) und Q4 (schlechte Charge)	80
Abb. 29: Loadings Plot für die 1. HK zur Trennung zwischen guter, mittlerer und schlechter N-Quellen Charge.....	82
Abb. 30: Analysenzertifikat des Herstellers für einen in der Fermentation eingesetzten Rohstoff	Anhang 1
Abb. 31: schematische Darstellung eines FT-IRs, Erläuterungen siehe Text	Anhang 2
Abb. 32: schematische Darstellung des ATR Messprinzips	Anhang 4
Abb. 33: exemplarische Darstellung eines ATR mIR Spektrums.....	Anhang 6

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: zusammengefasste Batch-Daten, +++/----sehr gute/schlechte Produktkonzentration, T- im Technikum erstellte Ansätze	31
Tab. 2: statistische Parameter der Toxinkonzentration der Gruppe A und B	43
Tab. 3: zusammengefasste Batch-Daten, +++/----sehr gute/schlechte Produktkonzentration .	53
Tab. 4: CCD Versuchsplan 1	55
Tab. 5: Vergleich zwischen vorausgesagten (Soll) und tatsächlich erreichten (Ist) Produktkonzentrationen an den Modelgrenzen für die Mediumzusammensetzung (C-, V- und N3-Quelle: 10,0; 20,0; 20,0 g·L ⁻¹) der höchsten und niedrigsten (C-, V- und N3- Quelle: 10,0; 5,0; 10,0 g·L ⁻¹) Produktkonzentration	64
Tab. 6: Zusammenfassung der Wellenzahlen, die einen signifikanten Einfluss auf die Trennung zwischen der N-Quelle haben. Die assoziierten Gruppenschwinkungen sind u.U. hypothetischer Natur, da es bei Stoffgemischen (wie die hier gemessenen) zu Gruppenschwingungsüberlagerung und Verschiebungen kommen kann.	84
Tab. 7: DoE 1 Kombinationsschema.....	Anhang 7
Tab. 8: charakteristische mIR Molekülschwingungen bei deffinierten Wellenzahlen	Anhang 8

Abkürzungen

API	Active Pharmaceutical Ingredient, Wirkstoff
ATCC	American Type culture Collection, Institut zur Sammlung und Bereitstellung von Mikroorganismen
BoNT	Botulinum Neurotoxin
Bot/R	alternativer Sigmafaktor der DNA Polymerase Untereinheit
BTX	Botulinum Toxin, auch BoNT
cAmp	cyclisches Adenosin Monophosphat
<i>Cb</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
CCD	Central Composite Design, Central zusammengesetzter Versuchsplan
cGMP	current Good Manufacturing Practice, Gute Herstellungspraxis
CPP	Critical Process Parameter, kritische Prozessparameter
CQA	Critical Quality Attributes, Qualitätsmerkmale
DoE	Design of Experiments, statistische Versuchsplanung
DTGS	deuteriertes Triglycinsulphat, Detektormaterial in der mIR Spektroskopie
EC	Enzym Commission, Nomenklatur von Enzymklassen
EMA	European Medicines Agency, europäische Gesundheitsbehörde
FDA	Food and Drug Administration, US-amerikanische Gesundheitsbehörde
HK	Hauptkomponenten
kDa	kilo Dalton, Molekulare Masse
LD ₅₀	Lethal Dose 50%, Konzentration bei der die Hälfte der Testpopulation stirbt
MBR	Master Batch Record, Urdokument mit Herstellanweisungen nach cGMP
MCT	Mercury-Cadmium-Telluride, Detektormaterial in der mIR Spektroskopie
mIR/nIR/UV/Vis	mittleres/nahes Infrarot, Ultraviolett, Visible- Licht

NTNH	nicht toxische nicht Hämagglutinine, Proteinkomplex
OD	optische Dichte
OOS	Out Of Specification, außerhalb der Spezifikationen
Pat	Process Analytical Technology, Methodensammlung zur Prozessüberwachung
PCA	Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCR	Principal Component Regression, Hauptkomponentenregression
PLS	Partial Least Square Regression, Regressionsmethode
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis, Gruppierungsmethode
QbD	Quality by Design, Initiative/Guideline der FDA zur Herstellung von Pharmaceutica
RR	Response Regulator, Bestandteil eines TCS
SHK	Sensor Histidin Kinase, Bestandteil eines TCS
SOP	Standard Operating Procedure, Standardisierte Arbeitsanweisung
TCS	Two Component System, Zweikomponentensystem, Umweltsensoren von Mikroorganismen
Symbole	
s^2	Stichprobenvarianz
t	Korrekturwert aus student t-Tabelle
μ [h^{-1}]	spezifische Wachstumsrate in 1/h

1. Einleitung

Botulinum Toxin A ist das zurzeit potenteste bekannte Nervengift. Es kann zu Lähmungserscheinung der Muskulatur und in letzter Instanz zum Tod führen (Botulismus). Der Name Botulinum leitet sich vom lateinischen Wort botulus, Wurst ab, worin es im 19. Jhd. entdeckt wurde. In unzureichend konserviertem Fleisch kann sich der Organismus *Clostridium botulinum* vermehren und das Toxin synthetisieren.

Neben den zerstörerischen Eigenschaften weisen Botulinum Toxine auch einen therapeutischen Nutzen auf und sind nicht mehr aus der Schulmedizin wegzudenken. Neben ästhetischen Aspekten, zur Verringerung bzw. Vorbeugung von Gesichtsfalten, wird es auch bei medizinischen Indikationen eingesetzt. So erhöht BoNT/A (Botulinum Neurotoxin A) z.B. die Lebensqualität von Schlaganfallpatienten die unter einem Tremor der Gliedmaßen leiden. Auch eine krankhafte, übermäßige Schweißproduktion kann mit Botulinum Toxin behandelt werden. Weiterhin wird BoNT/A u. a. bei Patienten mit multipler Sklerose eingesetzt. Diese Patienten verlieren mit der Zeit die Fähigkeit sich zu bewegen. Dennoch können durch Verkrampfen der Muskulatur Schmerzen auftreten, zu deren Linderung BoNT verabreicht wird um die betreffenden Muskel zu relaxieren.

Die Herstellung des Toxins erfolgt durch diskontinuierliche (Batch), anaerobe Kultivierung des Organismus auf komplexen Substraten. Diese Substrate, die zur Herstellung des Fermentationsmediums verwendet werden, sind chemisch nicht definiert und werden durch eine Hydrolyse von pro- und eukaryotischen Zellen gewonnen.

Nach der Fermentation liegt das Produkt (Toxin) extrazellulär im Fermentationsmedium vor. Durch eine mehrstufige Reinigung des Wertprodukts durch unterschiedliche chromatografische Techniken (Downstream Processing, DSP) wird eine hochreine und aufkonzentrierte Toxinlösung (API) erhalten. Das API wird anschließend verdünnt und mit stabilisierenden Substanzen zum Fertigprodukt formuliert.

Für die Anwendung von APIs beim Menschen ist besondere Sorgfalt bei der Herstellung vorgeschrieben. Die staatlichen Gesundheitsbehörden verlangen eine lückenlose Überwachung sowie minimale Abweichung von qualitätsrelevanten Parametern des Herstellungsprozesses zum Schutz der Patienten. Mit der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Technik ergeben sich neue Herausforderungen und Möglichkeiten diese Prozesse noch sicherer und effizienter zu gestalten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erarbeitung eines optimierten Herstellungsprozesses. Der optimierte Herstellungsprozess soll verringerte Produktkonzentrationschwankungen besitzen. Dazu werden unterschiedliche Methoden der Prozessanalyse (Process Analytical Technology, PAT) sowie der Quality by Design Initiative der FDA angewendet (u. a. statistische Versuchsplanung, DoE).

1.1 Zielstellung der Arbeit

Der Herstellungsprozess von Botulinum Neurotoxin A verwendet einen unmodifizierten, wenig charakterisierten Wildtyp-Stamm und ist durch eine hohe natürliche Variabilität in der Produktkonzentration nach 72 h Batchfermentation gekennzeichnet.

Das Ziel dieser Arbeit ist die beobachtete Variabilität zu beschreiben und Ursachen für die auftretende Variabilität zu identifizieren. Im Anschluss erfolgt die Erarbeitung und Umsetzung eines Konzepts wie die Produktvariabilität verringert werden kann. Im betrachteten Zeitraum von 2012 - 2015 kam es vermehrt zu starken Abweichungen der Produktkonzentrationen. Diese lagen außerhalb der spezifizierten Grenzen des Prozesses (zu geringe Produktkonzentrationen, OOS Batche). Es wird in dieser Arbeit untersucht, welche Faktoren zu diesen OOS Batchen führten und wie diese Faktoren beeinflusst werden können, damit keine OOS Batche mehr hergestellt werden.

2. Theoretische Vorbetrachtungen

2.1 Process Analytical Technology und Quality by Design (PAT/QbD) zur Entwicklung von robusten Prozessen

Vor mehr als 70 Jahren begann die Prozessanalyse in der chemischen und petrochemischen Industrie und fand daraufhin ihren Einzug in weitere Herstellungsprozesse. Heute ist sie integraler Bestandteil in nahezu jedem Industriezweig. Durch die entwickelten Methoden und zur Verfügung stehenden Analysegeräte werden kritische Parameter identifiziert, überwacht und hierdurch eine Prozessregelung ermöglicht. (Barkeev, 2005)

Die Process Analytical Technology (PAT) dient als Werkzeug zur Qualitätssicherung bei der Herstellung von Produkten. Die Herstellung von Wirkstoffen (API) für die parenterale Anwendung am Menschen bedarf einer stringenten Überwachung des Produktionsprozesses. Die Aufsichtsbehörden (FDA, EMA und lokale Behörden) empfehlen daher den Einsatz von PAT bei der biotechnologischen Herstellung von Wirkstoffen.

Quality by Design (QbD) ist dabei eine Evolutionsstufe in der Prozessanalyse. Es beschreibt Methoden zur Planung und Implementierung von Qualität in spezifische Produkte (Juran,

1992). Dabei wird Qualität abhängig von den relevanten Produkteigenschaften definiert und spezifische Parameter zu deren Überwachung abgeleitet. Ziel des QbD-Ansatzes ist es, ein besseres und tieferes Verständnis für den ablaufenden Produktionsprozess zu erlangen. Durch das vertiefte Prozessverständnis kann eine geeignete Prozesssteuerung implementiert werden. Aufgrund dessen können Variabilitäten eingegrenzt und eine gleichbleibende Produktqualität und Quantität gewährleistet werden (Batch Konsistenz).

Im Jahr 2000 entschied sich die US-amerikanische Gesundheitsbehörde FDA für einen konzeptionell neuen Ansatz wie Arzneimittel entwickelt, zugelassen und hergestellt werden sollten. Mit der im Jahr 2002 ausgerufenen Initiative „cGMP for the 21st century“ bündelt die FDA zusammen mit anderen Gesundheitsbehörden (z.B. EMA-European Medicines Agency) ihre Anstrengungen zur Erreichung der Ziele (Rathore & Winkle, 2009). Die von der FDA dazu herausgegebenen Dokumente (US Food and Drug Administration, 2004, 2009) beschreiben die Methodik wie Arzneimittel und Herstellungsprozesse entwickelt, hergestellt und überwacht werden sollen. Dabei wird dem Hersteller, abhängig von der Tiefe und Vollständigkeit der übermittelten Forschungsergebnisse, ein Freiraum eingeräumt, innerhalb dessen er die Prozessparameter variieren kann um entstehenden Abweichungen der Produktqualität entgegen zu wirken. Anstelle eines rigiden Betriebspunktes (eine feste Parameter-Einstellung) können durch die QbD Anwendung mehrere unterschiedliche Parametereinstellungen je nach Eignung angewendet werden. So wird in Abhängigkeit der vorliegenden Ausgangsqualität der Edukte der Prozess so eingestellt (Begasungsrate, Temperatur usw.) um kontinuierlich eine gleichbleibende Qualität des Produkts zu gewährleisten.

Diese variablen Betriebspunkte des Prozesses werden vom sog. Design Space umschlossen (Abb.1). Alle Prozessparameterkombinationen (auch Konzentrationsbereich von Edukten z.B. $5\text{-}155\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ A, $10\text{-}50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ B) in diesem Design Space sind zulässig um eine gewünschte Produktqualität zu erhalten. Der Control Space stellt eine gewöhnliche Standardparameter-Kombination dar (z.B. $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ A, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ B). In Extremfällen, z.B. bei hoher Verunreinigung von Edukt A, können Parameterkombinationen innerhalb des Design Space gewählt werden, die trotz der Verunreinigung von A das gleiche Ergebnis wie Edukte ohne Verunreinigung ergeben. Da der Design Space eine bei den Aufsichtsbehörden eingereichte und bewilligte Sammlung an zulässigen Parameterkombination ist, wird das Arbeiten innerhalb dieses Design Space nicht als Abweichung von den spezifizierten Prozessparametern angesehen (Satendra, 2011). Somit muss das etablierte Qualitätsmanagement-System dieses Vorkommnis nicht als Abweichung behandeln.

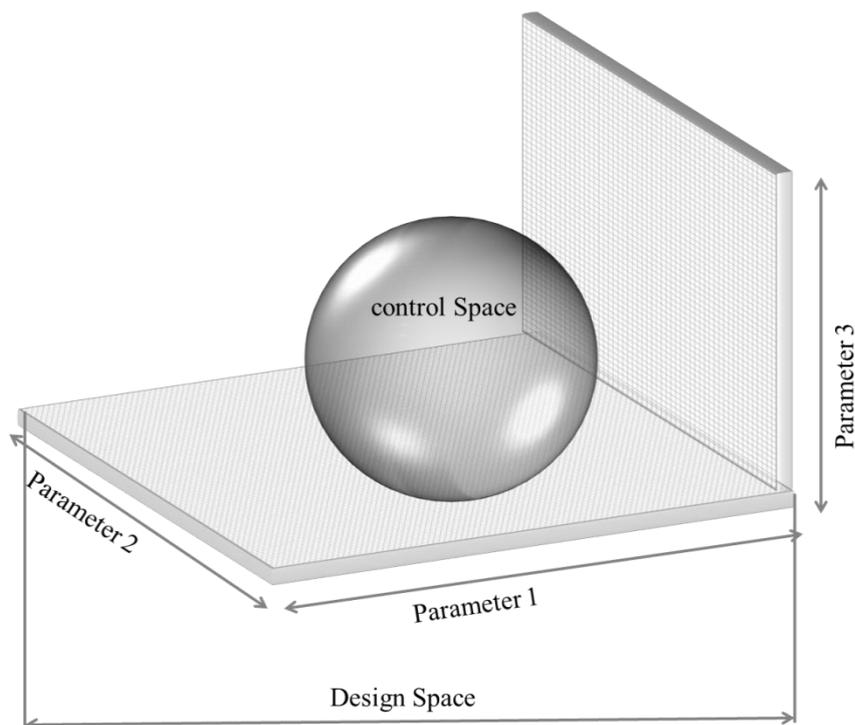


Abb. 1: Darstellung des Design- und Control Space für 3 Parameter

Zur Evaluierung des Prozessverhaltens bei unterschiedlichen Parameterkombinationen ist die statistische Versuchsplanung die Kernmethodik. Bei der Zulassung für Arzneimittel werden Kriterien mit einer erlaubten Abweichung definiert, die für eine erfolgreiche Herstellung des Produktes sprechen (z. B. Konzentration an nicht reagiertem Edukt A im Fertigprodukt $<0,001$ % (w/w)). Wenn bei der Herstellung ein oder mehrere solcher Kriterien nicht erfüllt werden, kann das API aus diesem Batch für den Verkauf gesperrt werden. Diese Abweichungen können gerade bei biotechnologisch hergestellten Produkten häufiger auftreten (Rathore & Winkle, 2009), da die Komplexität und inhärente Variabilität bei biologischen Prozessen (eingesetzte Eduktqualität, biologische Komponente etc.) oft größer ist als bei rein chemischen Prozessen. Das *Office for Biotechnology Products* (OBP) bestätigt, dass QbD für biotechnologische Produkte aus den oben genannten Gründen schwieriger zu implementieren ist als für chemische Prozesse (Rathore & Winkle, 2009).

Das Ziel von QbD ist es, die Parameter zu identifizieren (CPP, critical process parameter), die kritisch für die Produktqualität sind (CQA, critical quality attributes, wie Reinheit, Identität usw.). Durch die Kenntnis der Wirkungsbeziehung zwischen CPP und CQA, kann der Herstellungsprozess optimal durchlaufen werden. Es kann dadurch z.B. auf unterschiedliche Qualitäten an Ausgangsstoffen reagiert werden. So ist unter anderem die erreichte Produktkonzentration am Ende der Fermentation ein CQA. Ein entsprechender CPP ist z.B. die ideale Kombination von unterschiedlichen Rohstoffchargen zur Herstellung des

Fermentationsmediums. Dadurch wird das CQA durch Änderung des CPPs in einem gewünschten Konzentrationsbereich gelenkt.

Neben den beeinflussenden Prozessparametern einer Fermentation ist auch die Überwachung des laufenden Prozesses von entscheidender Bedeutung (PAT). Dadurch können frühzeitig Abweichungen erkannt werden und es kann ggf. regulierend eingegriffen werden.

Die bevorzugten Sensoren für eine Prozessüberwachung sind Echtzeit-Sensoren (Barkeev, 2005), die Informationen zum Prozessverlauf unmittelbar bereitstellen. Viele Sensoren, besonders spektroskopische Sensoren liefern innerhalb kürzester Zeit eine große Menge an Daten. Durch die Chemometrie werden diese nicht- oder nur schwer vom Menschen interpretierbaren multivariaten Daten in eine verständliche und verwertbare Form überführt. Nur so ist es möglich, in Echtzeit kritische Prozessparameter zu überwachen, die anders nicht zugänglich wären (Barkeev, 2005).

Die zur Auswahl stehenden Methoden der PAT sind u.a. spektroskopische Verfahren (nIR, mIR, Raman, Fluoreszenz und UV/Vis- Spektroskopie) in der in-, on- oder atline Betriebsweise. Prinzipiell können jegliche Analysemethoden (Flüssigkeitschromatografie, Abluftanalyse oder z.B. Enzym-Assays usw.), die zu einem besseren Prozessverständnis beitragen, genutzt werden. Die inline Messung (direkt im Fermentationsmedium, am laufenden Prozess) von charakteristischen Kenngrößen wird aufgrund der schnellen Zugänglichkeit und der kontinuierlichen Verfügbarkeit der Messwerte jedoch bevorzugt. So ist es möglich, in Echtzeit die ablaufenden Prozesse zu beobachten und darauf Einfluss zu nehmen. Beim ersten Anzeichen einer Abweichung vom vorgegeben Fermentationsprofil (charakteristische Entwicklung von Schlüsselparametern), kann versucht werden, den Prozess in seine zulässigen oder zukünftigen Grenzen zu navigieren.

Der QbD/PAT-Ansatz soll auch dazu verhelfen, dass bei der Herstellung der Arzneistoffe möglichst effektiv und dadurch kosteneinsparend produziert werden kann. Der erhöhte analytische Aufwand führt zu einem tieferen Prozessverständnis und dient einer erhöhten Produkt- und damit Patientensicherheit. Ein weiterer Vorteil des QbD-Ansatzes ist, dass Produkte in Echtzeit zum Verkauf freigegeben werden können (parametrische Freigabe). Eine Verzögerung der Freigabe durch eine ausstehende Freigabeanalytik und dadurch bedingte Lagerhaltung entfällt bei einer vollständigen QbD Implementierung.

2.2 Problembeschreibung des Botulium Toxin Produktions-Prozesses

Bei der Fermentation von *Clostridium botulinum* werden unterschiedlich hohe Produktkonzentrationen nach 72 h Fermentation zwischen Batchen erhalten. Die Reduzierung dieser schwankenden Endproduktkonzentration im Fermentationsmedium ist Gegenstand dieser Arbeit. Dazu werden mögliche Einflussfaktoren auf diese Variabilität des biotechnologischen API-Herstellungsprozesses von Botulinum Neurotoxin A (BoNT/A) untersucht. Der spezifizierte, zugelassene Konzentrationsbereich liegt bei $3,5 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produkt. Die Toxinkonzentration variiert in den historischen Daten (Kulturüberstand nach 72h Fermentation) zwischen verschiedenen Ansätzen zum Teil so stark, dass der zulässige Konzentrationsbereich unter- aber auch überschritten wird. (OOS). Das API aus Batchen, die nicht die spezifizierte Produktkonzentration liefern, kann nicht zur Herstellung von Fertigprodukten verwendet werden. Diese Variabilität in der Produktkonzentration ist für einen unregelmäßigen Wildtyp-Prozess nicht unüblich (Bradshaw, Dineen, Maks, & Johnson, 2004), man ist jedoch bestrebt sie möglichst zu beherrschen und zu reduzieren, wie es für einen pharmazeutischen Prozess gefordert wird.

Der Herstellungsprozess verwendet einen unmodifizierten, wenig charakterisierten Wildtyp-Stamm der u. U. die beobachtete Konzentrationsvariabilität verursacht. Durch den Einsatz von QbD/PAT soll eine Vertiefung des Prozess-Verständnisses erreicht und die beschriebene Prozess-Variabilität reduziert werden. Das erhöhte Prozess-Verständnis stärkt das Vertrauen in den zugelassenen Prozess – auch seitens der Aufsichtsbehörden.

Alle Bestandteile des Prozesses müssen charakteristische Merkmale besitzen um ein definiertes Ergebnis zu erzielen. Zu diesen Prozessbestandteilen gehört neben den Parametern der Fermentation (Temperatur, Begasung etc.) auch das eingesetzte Fermentationsmedium und das Inokulum. So müssen zunächst die Prozessbestandteile identifiziert werden, die einen signifikanten Einfluss auf die Produktkonzentration ausüben. Im Anschluss muss Wissen über das Zusammenspiel der identifizierten Prozessbestandteile erlangt werden. Das erlangte und vertiefte Prozessverständnis ermöglicht es, Aussagen über den weiteren Prozessverlauf bei einem gegebenen Ausgangspunkt (z.B. Rohstoffqualität) zu treffen. Dadurch entsteht die Möglichkeit, z.B. anschließende Verfahrens- bzw. Prozessschritte (downstreaming) besser zu planen.

Ein weiteres, durch den QbD/PAT-Ansatz verfolgtes Ziel ist es, schon am Anfang des Downstreamprozesses einen möglichst fixen und stabilen Ausgangspunkt zu schaffen. Dazu zählt eine gleichbleibende Toxinkonzentration im Fermenterüberstand zwischen unterschiedlichen Batches. Dieser stabile Ausgangspunkt liefert die Grundlage für stabile Toxinkonzentrationen nach den jeweiligen Aufarbeitungsschritten.

2.3 Produkt

2.3.1 Struktur

Botulinum Toxin des Serotypes A (Zink-abhängige Endopeptidase EC 3.4.24.69) ist das Produkt des Herstellungsprozesses. Die proteinogenen Toxine der Spezies *Clostridium botulinum* umfassen acht Serotypen (A-G). Botulinum Toxin A ist derzeit das potenteste bekannte Gift mit einem LD₅₀ intravenös von 0,2 ng·kg⁻¹.

Der native Komplex besteht aus dem Toxin (150 kDa) und assoziiertem nicht-toxischen-nicht-Hämagglutinin (NTNH) und Hämagglutininen unterschiedlicher Molekülmassen (L. Zhang, Lin, Li, & Aoki, 2003). Diese Komplexproteine schützen das Toxin vor der sauren Hydrolyse und dem proteolytischen Verdau nach oraler Aufnahme, sodass es auf dem natürlichen Weg zum eigentlichen Wirkort, den peripheren Nervenzellen, nicht abgebaut wird. Weiter dienen die verschiedenen Komponenten der Komplexproteine als Adhesin, um sich an die Mikrovilli des Darms zu heften und somit das Toxin in den Blutkreislauf zu schleusen. (Nakamura et al., 2007, Bradshaw, Dineen, Maks, & Johnson, 2004)

Die Abbildung 2 zeigt die Struktur des 150 kDa Neurotoxins. Die Bindungsdomäne (rot, 50 kDa) dient der Kopplung des Toxins an die Gangliosiden und den Toxinrezeptor SV2 von Nervenzellmembranen und aktiviert die Endozytose des Toxins in die Nervenzelle. Die Translokationsdomäne (grün, 50 kDa) formt einen Kanal in die phospholipid-Doppelschicht des endozytierten Vesikels, durch die die proteolytische Domäne (blau, 50 kDa~“Leichte Kette“) nach Spaltung der Disulfidbrücke ins synaptische Zytosol gelangt. (Turton, Chaddock, & Acharya, 2002)

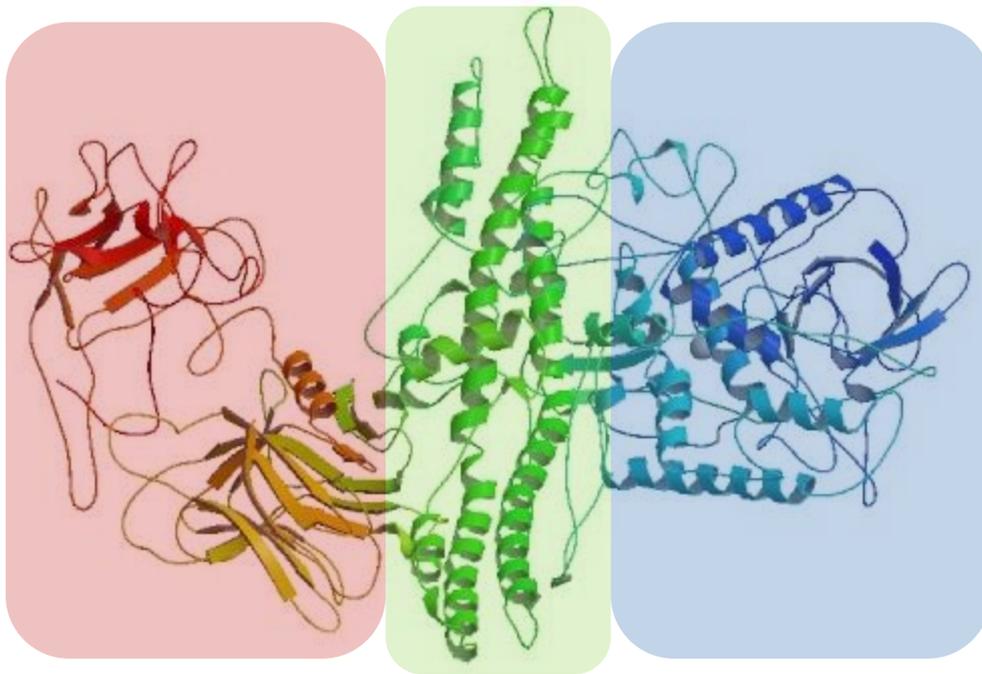


Abb. 2: Struktur von Botulinum Toxin A, modifiziert, rot-Bindungsdomäne, grün-Translokationsdomäne, blau-Protease (Lacy, Tepp, Cohen, DasGupta, & Stevens, 1998)

2.3.2 Wirkmechanismus

Nach Internalisierung des Toxins ins synaptische Zytosol wirkt die Toxin-Protease spezifisch an SNARE-Proteinen (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor, SNAP25, VAMP, Syntaxin). Diese SNARE Proteine dienen der Fusion von biologischen Membranen, es fusionieren Vesikel beladen mit Acetylcholin (Botenstoff) mit der präsynaptischen Membran der Nervenzelle über SNARE Proteine. Nach der Fusionierung erfolgt die Exozytose des Acetylcholins und damit die Signalübertragung von der Nervenzelle an den Muskel. Durch die proteolytische Spaltung der SNARE-Proteine (abhängig vom Serotyp) durch das Toxin kann kein Vesikel mehr mit der Nervenzellmembran fusionieren. Die Ausschüttung von Acetylcholin in die neuromuskuläre Endplatte wird dadurch unterbunden und somit die Reizweiterleitung und Muskelkontraktion verhindert (Turton et al., 2002).

2.3.3 Biosynthese und Freisetzung

Das Toxin wird zunächst in seiner inaktiven Form als einzelsträngige Polypeptidkette vom Mikroorganismus synthetisiert, beginnend in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Zusammen mit den parallel exprimierten Komplexproteinen besitzt der native Toxinkomplex für Botulinum Toxin A eine Größe von ca. 900 kDa. Der Mechanismus der Freisetzung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das am weitesten akzeptierte Modell ist das der Autolyse. Nach dem Verbrauch der Medienbestandteile geht die Kultur nach der stationären Phase in eine

Lysephase über. Dabei wird die Zellwand abgebaut und die in der Zelle befindlichen Stoffe werden in das Medium freigesetzt. Eine weitere diskutierte Theorie ist die der Zellwand-, ‚Schuppung‘ (Call, Cooke, & Miller, 1995). Bei dieser bindet sich das Toxinmolekül an die innere Zellwand. Beim Wachsen der Zelle muss sich die Zellwand vergrößern. So wandern die einst an der inneren Membran gebundenen Moleküle durch kontinuierliche ‚Zellwandausstülpungen‘ nach außen.

Nach der Freisetzung erfolgt die Aktivierung der Polypeptideinzelkette bei proteolytischen Stämmen durch eine organismeneigene Protease (L. Dekleva & Dasgupta, 1989). Die proteolytische Aktivierung erfolgt durch Exzision eines 10 Aminosäurereste umfassenden Peptids durch eine Trypsin-ähnliche, clostridien-eigene Protease und der Ausbildung einer Disulfidbrücke, welche die leichte (Toxin-Protease) mit der schweren Kette (Bindungs- und Translokationsdomäne) verbindet (Abb.3). (Call, Cooke, & Miller, 1995, Dasgupta & Sugiyama, 1976, Melling, Hambleton, & Shone, 1988)

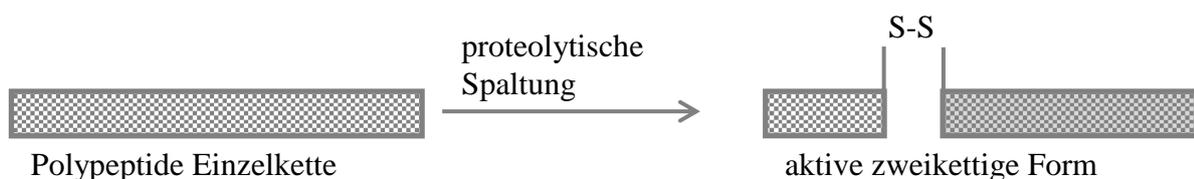


Abb. 3: proteolytische Prozessierung der Polypeptideinzelkette zum aktiven Toxin, nach Melling et al., 1988

Das von der Merz Pharma hergestellte Toxin beinhaltet ausschließlich das reine Neurotoxin, die 50 kDa leichte Kette (Abb. 2, blau) mit Zink-abhängiger Proteaseaktivität sowie die 100 kDa schwere Kette (Abb. 2 grün und rot) über die das Toxinmolekül von der Nervenzelle durch Endozytose aufgenommen wird. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Die Abtrennung der Komplexproteine erfolgt durch die Downstream Prozessierung, da sie für die parenterale Administration nicht notwendig sind.

2.4 Organismus

Zur Herstellung von Botulinum Toxin A wird der Mikroorganismus *Clostridium botulinum* (*Cb*) ATCC 3502 eingesetzt. Die Abbildung 4 zeigt seine relative Einordnung in die Gruppe der Clostridien. Durch 16s RNA Sequenzierung wird eine Unterscheidung von *Cb* allein aufgrund der Expression bestimmter Toxin-Serotypen nicht mehr durchgeführt. So besitzen die Organismen der Gruppe I (proteolytische *Cb*, Serotypen A, B, F, in Abb. 4 nicht näher spezifiziert) eine Sequenzhomologie zwischen 99,6-100 %. Weiterhin zeigt die Toxin-Aminosäuresequenz-Homologie von 70 % für die leichte Kette und 60 % für die schwere Kette eine hohe Ähnlichkeit mit dem Tetanus Toxin (Gough, Karplus, Hughey, & Chothia, 2001).

Dieser Sachverhalt illustriert, dass, obwohl vergleichsweise wenig Literatur zu *Cb* 3502 existiert, sich u. U. die zur Verfügung stehende Literatur für die hier erwähnten Organismen aufgrund der hohen strukturellen Homologie zunutze gemacht werden kann, um grundlegende Organismeneigenschaften zu beschreiben.

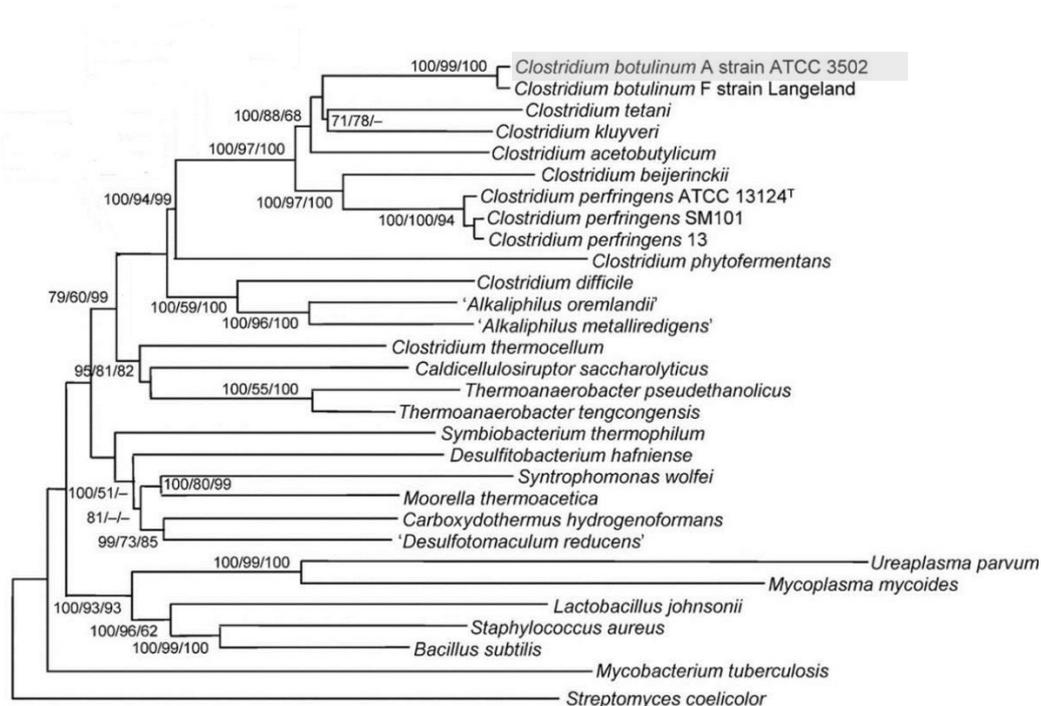


Abb. 4: phylogenetische Einordnung von *Clostridium botulinum* ATCC 3502 aus Gupta & Gao, 2009, modifiziert. Die dargestellten Zahlenwerte beschreiben das Maß für die Ähnlichkeit (100-sehr ähnlich, 1- nicht ähnlich), berechnet durch 3 verschiedene Algorithmen

Das hier verwendete gram-positive Bakterium gehört zur Gruppe 1 und somit zu den proteolytischen Toxinbildnern. Das heißt, dass der Mikroorganismus Proteasen sezerniert, um sich Nahrungsquellen zu erschließen. Somit folgt er einem saprophytischen Lebensstil. Neben einer Vielzahl von Genen, die für Enzyme eines extensiven Aminosäuremetabolismus kodieren, besitzt der Organismus einen Abbauweg für Chitin, welches eine Besonderheit darstellt.

Als stäbchenförmiger, Endosporen bildender Vertreter der Clostridiaceae sind die Toxin-Serotypen A, B, E und F humanpathogen und der Verursacher des potentiell fatalen Botulismus. Das Genom besitzt eine Größe von 3,89Mb mit einem GC-Gehalt von lediglich ca. 28 %. Der überwiegende Anteil der Virulenzfaktoren (Toxin Gene usw.) liegt kodiert auf den Chromosomen vor. Wichtige Gene für die Replikation liegen kodiert auf einem Plasmid (z.B. alpha-Untereinheit der DNA Polymerase III). Die Plasmid-kodierten Gene besitzen ebenso wie das chromosomale Genom einen geringen GC-Gehalt und zeigen dadurch, dass dieses Genom konserviert ist. (Shukla & Sharma, 2005)

2.4.1 Regulation der Toxinsynthese

Die Toxinexpression des Organismus erfolgt durch ein fein abgestimmtes Netzwerk enzymatischer Reaktionen. Dabei ist nur sehr wenig über die Stimuli bekannt, die eine Toxinexpression begünstigen oder auslösen. Es wird ein gemeinsamer molekularer Mechanismus für die Synthese von Toxinen in der Gruppe der Clostridien vermutet (Connan, Denève, Mazuet, & Popoff, 2013).

Bei der Regulation der Toxinsynthese sind derzeit fünf Einflussgrößen bekannt. Das Regulationsnetzwerk beinhaltet die Einflüsse aus dem Environom, Zwei-Komponentensysteme (TCS), Quorum Sensing Mechanismen, alternativen Sigma Faktor sowie small regulatory RNAs (sRNA). Das Zusammenwirken dieser Mechanismen ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Weiterhin ist auch nicht bekannt, welche Stoffe oder Umwelteinflüsse direkt auf diese Mechanismen wirken. (Connan et al., 2013)

Die Abbildung 5 zeigt schematisch das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren welche auf die Zellen wirken, die dann wiederum organismenspezifisch auf diese Stimuli reagieren. Es ist für eine Fermentationscharakterisierung notwendig, signifikante Eingangssignale zu identifizieren und diese zu der entsprechenden Zellantwort zu korrelieren. So ist der beobachtete Phänotyp der Kultur das Resultat von Wechselwirkungen des Organismus mit seiner Umwelt und mit der Gesamtpopulation.

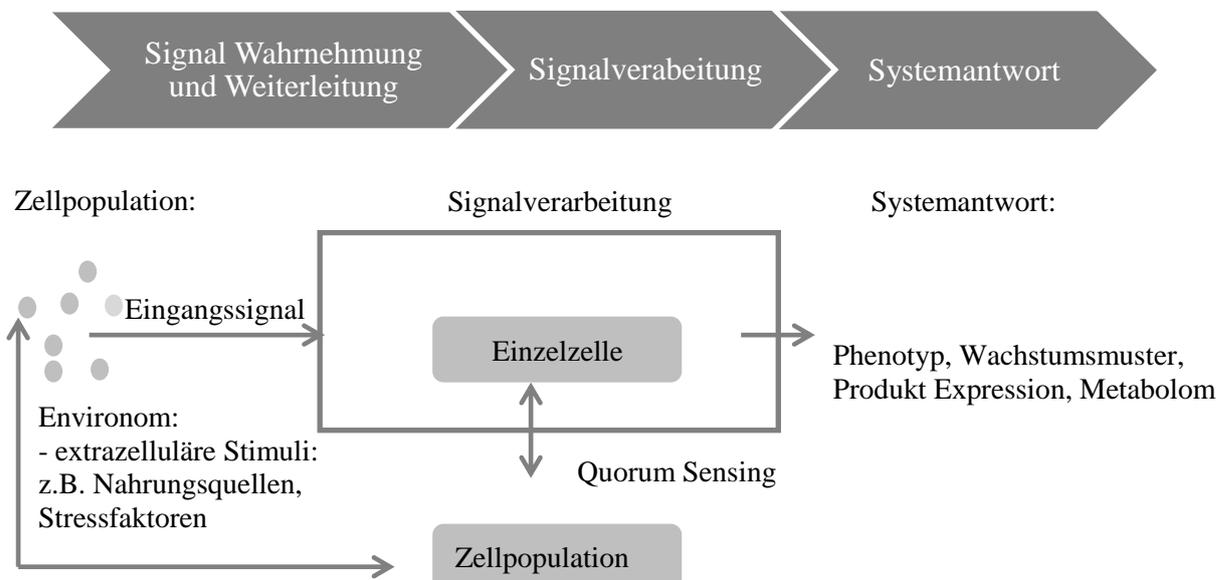


Abb. 5: vereinfachte schematische Übersicht über das Stimuli-Reaktionsnetzwerk bedingt durch das Environom

Environom

Unter dem Environom versteht man jegliche von außen auf den Organismus wirkende Einflüsse, wie Osmolarität, pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen, Temperatur usw. (Deckwer, Hempel, Zeng, & Jahn, 2006).

Zwei-Komponenten-Systeme (TCS)

Die TCS Systeme eines Organismus dienen der Wahrnehmung seiner Umwelt. Ein typisches TCS besteht aus einem Response Regulator (RR) und einer Sensor Histidin Kinase (SHK), die extrazelluläre Stimuli wahrnehmen und die Zelle dadurch in die Lage versetzen auf Umwelteinflüsse zu reagieren. In Connan et al., 2012 wurden mehrere Zwei-Komponentensysteme (TCS) identifiziert. Durch Ausschalten dieser spezifischen TCS in entsprechenden Mutanten von *C. botulinum* konnte eine verringerte Toxinkonzentration nachgewiesen werden. Es ist wichtig jene Signalmoleküle zu identifizieren, die auf diese TCS reagieren um somit auf die Toxinproduktion Einfluss zu nehmen (Z. Zhang et al., 2013).

Quorum-Sensing

Beim Quorum Sensing werden abhängig von der Populationsdichte der Kultur spezifische Sensor Histidin Kinasen aktiviert (TCS), die dann weitere zelluläre Veränderungen bewirken (Antunes, Ferreira, Buckner, & Finlay, 2010).

In der Veröffentlichung von Zhao et al (Zhao, Montville, & Schaffner, 2006) wurden für *C. botulinum* 56 A erste eindeutige Hinweise auf ein Quorum Sensing System nachgewiesen. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine inter-Spezies-Kommunikation stattfindet.

In 2010 zeigte Cooksley (Cooksley, Davis, Winzer, Weng, et al., 2010), dass *C. botulinum* ATCC 3502 über das gut untersuchte *S. aureus* AGR Quorum Sensing System verfügt, welches auch die Toxinregulation in *C. perfringens* kontrolliert. Mittels eines transmembranen Proteins (ArgB) wird ein selbstinduzierendes Peptid (AIP) in das umgebende Medium abgegeben. Dabei wird angenommen, dass die Konzentration des AIP ein Signal für die Zelle darstellt, das bei Überschreiten einer Grenzkonzentration die gesamte Kultur beeinflusst und so zu einer abgestimmten Zellantwort führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des AIP in der späten exponentiellen Phase stattfindet und mit Eintreten in die stationäre Phase wieder geringer wurde (wie auch in *S. aureus*). In knockout Mutanten von AgrD konnte gezeigt werden, dass die Toxinkonzentration signifikant reduziert war. (Cooksley, Davis, Winzer, Chan, et al., 2010; Dupuy, Govind, Antunes, & Matamouros, 2008; Ohtani et al., 2009) Somit kann u. U. eine spektroskopische Konzentrationsverfolgung dieser Moleküle zur mechanistischen Prozessbeschreibung genutzt werden (Batch Trajektorien). Aus dem hier beschriebenen

Verhalten (Quorumsensing) zeigt sich, dass die Populationsdichte bzw. die AIP-Konzentration signifikante Einflussfaktoren auf die Toxinkonzentration sind.

Alternativer Sigmafaktor

Sigmafaktoren sind RNA Polymerase-Untereinheiten, die die RNA Polymerase Promotorspezifität ändern. Das Produkt des Gens *botR/A* (alternativer Sigma 70 Faktor) ist ein 22 kDa großes Protein. Für *botR* wird ein pleiotropischer Effekt postuliert. Eine Überexpression von *botR* führt zu einer erhöhten mRNA Konzentration von *bont/A* und somit auch an Produkt *BoNT/A* (Toxin). Eine Antisense Inhibierung von *botR/A* hat den gegenteiligen Effekt und führt weiter zu einer Reduzierung unterschiedlicher Enzyme, Transporter usw. (Connan et al., 2013; Marvaud et al., 1998; Raffestin, Dupuy, Marvaud, & Popoff, 2005)

Die Produkte *bont/A* und *botR/A* werden in der Übergangsphase von exponentieller zur stationären Phase überexprimiert (Faktor 100), im Vergleich zur exponentiellen Phase. (Couesnon, Raffestin, & Popoff, 2006). Die höchste Toxinkonzentration wird 24 h nach Inokulation erreicht. Dies ist 12 h nach der maximalen Genexpression von *bont/A* (höchsten Produkt RNA Konzentration) (Couesnon et al., 2006).

regulatorische RNAs

In den letzten Jahren rückten immer mehr small regulatory RNAs (sRNA) in den Fokus der Forschung über regulatorische Netzwerke (Venkataramanan et al., 2013). In *Cb* wurden mehr als 200 putative sRNAs identifiziert (Chen, Indurthi, Jones, & Papoutsakis, 2011).

Diese RNAs sind nicht kodierend, können jedoch die Stabilität kodierender RNAs beeinflussen oder auch als antisense RNA fungieren. sRNAs beeinflussen zum Beispiel den Metabolismus (Schwefel- und Aminosäuremetabolismus (Even et al., 2008; Mraheil et al., 2010), Virulenz, Membran- und Eisenhomeostase sowie Quorum Sensing (Papenfort & Vogel, 2014).

Auch Riboswitche (Untergruppe von sRNAs) reagieren auf sich ändernde intrazelluläre Konzentrationen von Metaboliten und Metallionen. Dabei ist die Glukosehomeostase ein wichtiger Faktor, da gesteigerte intrazelluläre Konzentrationen an Phosphatzuckern (z.B. G6P) mRNAs destabilisieren können. sRNAs dienen der posttranskriptionellen Verknüpfung zwischen Metabolismus und Virulenz (Papenfort & Vogel, 2014).

Dies zeigt, dass die Beobachtung des Metaboloms (auch Transkriptom) eine Schlüsselmethode in der Überwachung von Bioprozessen darstellt. Das Medium, welches zur Kultivierung des Organismus genutzt wird, wirkt direkt auf das Metabolom und hat dadurch einen signifikanten Einfluss auf das Prozessergebnis.

2.4.2 Zellmetabolismus und äußere Faktoren, die die Toxinkonzentration beeinflussen

Clostridium botulinum (*Cb*) wächst optimal bei einem pH-Wert zwischen 5-7 und einer Glukosekonzentration von 0-1 % (w/w) in komplexen Medien während der Fermentation. Dabei ist für *Cb* Glukose eine Voraussetzung für hohe Toxinkonzentrationen. Durch das Fehlen von Kohlenhydraten im Medium reduzierte sich die BoNT Konzentration um einen Faktor zwischen 100-1000.

Ein niedrigerer pH-Wert reduziert die proteolytische Enzymaktivität um den Faktor 5-500 (Montville, 1983) und führt zu einer geringeren Produktkonzentration. Es konnte eine Variation in der Toxinkonzentration beobachtet werden, die u.U. durch Medienunterschiede verursacht wurden (Siegel & Metzger, 1979, 1980). Das Begasen mit CO₂ hat keine negativen Auswirkungen auf *C. botulinum* ATCC 3502. Bei einer CO₂ Konzentration von 10 % (v/v) wurde jedoch die höchste Wachstumsrate erreicht.

Die Toxinexpression ist wachstumsphasenabhängig und zeigt spezifische Toxin-Genaktivitäten in der späten exponentiellen Kulturphase (Artin et al., 2010). Es wird postuliert, dass die Toxinsynthese in Clostridien stark durch Nährstoffe und Umwelteinflüsse reguliert wird.

Bei der Herstellung von Botulinum Toxin treten variable Toxinkonzentrationen auf, obwohl sämtliche bekannten Prozessparameter auf einem konstanten Wert gehalten werden. So berichtet Johnson (Johnson & Bradshaw, 2001), dass unterschiedliche Chargen des gleichen komplexen Fermentationsmediums unterschiedliche Toxinkonzentrationen lieferten. Dieses Phänomen, der unzureichenden Batch-zu-Batch-Konsistenz, wurde auch für andere Clostridientoxine beobachtet. (Bonventre & Kempe, 1959; Bradshaw et al., 2004; Grossowicz, Kindler, & Mager, 1956; Johnson & Bradshaw, 2001; Patterson-Curtis & Johnson, 1992; Schantz & Johnson, 1992; Whitmer & Johnson, 1988)

Dabei wird vermutet, dass Aminosäuren und Peptide die Haupteinflussfaktoren auf die Toxinexpression sind (Bradshaw et al., 2004; Latham et al., 1961; Miller & Mueller, 1956; Porfírio et al., 1997).

Das Genom von ATCC 3502 kodiert für eine Vielzahl von Metalloproteasen und Peptidasen mit N-terminaler Signalsequenz. Dies ist ein Indiz für extrazellulär sezernierte Proteasen. Die von der Zelle benötigte Energie in Form von ATP kommt bei *C. botulinum* zum überwiegenden Teil aus dem Aminosäuremetabolismus, bzw. dem proteolytischen Verdau von Proteinen (Bader, Rauschenbach, & Simon, 1982; Sebahia et al., 2007). Hierbei dient eine Aminosäure (AS) als Elektronendonator und eine andere als Elektronenakzeptor (Stickland Reaktion). Die bevorzugten Aminosäuren zur Energiegewinnung für ATCC 3502 sind Prolin, Glycin,

Phenylalanin und Leucin (Sebahia et al., 2007). Die Stickstoff-/ Kohlenstoffkonzentration hat einen Einfluss auf die Toxinexpression (Johnson & Bradshaw, 2001). Dabei führt ein Überschuss an Arginin und Tryptophan zu einer reduzierten Toxin- expression.

C. botulinum verfügt über den vollständigen Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg (Glykolyse), jedoch nicht über einen vollständigen Krebszyklus (Trikarbonsäurezyklus) und ist in der Lage Acetat, Butyrat, Butanol und Ethanol zu produzieren (Azidogenese und Solvatogenese) (Sebahia et al., 2007). Dabei wird Glukose hauptsächlich durch die Glykolyse metabolisiert, (Serotypen A) mit Laktat als weiteren Metaboliten (Simmons, & Costilow, 1962). Die Zuckerphosphorelierung erfolgt durch das Phosphoenolpyruvate (PEP)-abhängige Phosphotransferasesystems (PTS). Dabei reguliert das PTS eine Vielzahl von Genexpressionen, so auch die Kohlenstoffkatabolit-Repression, welche auf die Proteinexpression des Produkts wirkt (You et al., 2013).

Die Toxinproduktion in *C. difficile* (hoch artverwandt mit *Cb*, vgl. Abb. 4) hängt stark von den Medienbestandteilen ab. So erhöhen schwefelhaltige Aminosäuren, Butyrat, Butanol, Arginin, Glutamin, Carbonat und geringe Konzentrationen an Biotin die Toxinexpression (Connan et al., 2013; Karlsson, Burman, & Akerlund, 2008; Yamakawa, Karasawa, Ohta, & Nakamura, 1998). Cystein und Prolin blockieren in *C. difficile* die Toxinexpression, wodurch Enzyme für die Energiegewinnung hochreguliert werden (Karlsson et al., 2008). Die Verbindung zwischen Krebszyklus (Energiegewinnung) und Aminosäure/ Kohlenstoffmetabolismus besitzt somit einen Einfluss auf die Toxinexpression.

Bei der Toxinexpression (*C. difficile*) sind ATP generierende Enzyme im Butyrat/Succinate Stoffwechselweg hochreguliert. Die Toxingene sind zusätzlich durch einen Faktor kontrolliert, der auf den Nährstoffgehalt des Mediums reagiert. Das Stickstoffregulon CodY ist ein Sensor für den intrazellulären Energiegehalt. Weiterhin wurde beobachtet, dass Isoleucin, nicht jedoch Cystein die Toxinexpression auslöst. Die Aminosäuren Glutamat/Glutamin besitzen eine Schlüsselrolle, da sie den N- mit dem C-Stoffwechsel verknüpfen. Eine verbrauchter Aminosäurepool stellt ein putatives Signal für die Toxinexpression dar (Karlsson et al., 2008).

Es wurde keine Laktatdehydrogenase-Aktivität in *Cb* nachgewiesen (Montville, 1983; Simmons, & Costilow, 1962). Danach ist es unwahrscheinlich, dass Laktat zu Pyruvate und umgekehrt reduziert/ oxidiert wird. Somit kann Laktat oder Pyruvat mitunter essentiell für den Organismus sein und eine ausreichend vorhandene Konzentration dieser Stoffe die Fermentation beeinflusst. In Typ E *Cb* sind die bevorzugten C-Quellen: Glukose > Butyrat > Acetat > Pyruvat und die Addition von Cholin, Acetylcholin, Lecethin sowie N,N-Dimethylethanolamin führt zu gutem Zellwachstum (Gullmar & Molin, 1967). Somit kann

u.U. eine Supplementierung mit einer der oben genannten Stoffe dazu beitragen, die Produktkonzentration soweit zu steigern, dass keine OOS Batche mehr aufgrund zu geringer Toxinkonzentrationen hergestellt werden.

In ATCC 3502 (W. Zhang, Ma, Zang, Song, & Liu, 2011) sowie in *C. diffizile* (Karlsson et al., 2008) ist Eisen und dessen Regulation ein wichtiger Parameter zur Steuerung und Induktion der Virulenz. Das Fur Regulon ist für die Eisenhomeostase verantwortlich. Eine zu hohe Eisenkonzentration führt zu einer autokatalysierten Entstehung von Sauerstoffradikalen und kann fatal für die Zelle sein. Besonders für anaerobe Organismen, da diese meist über eine begrenzte Anzahl von Sauerstoffentgiftungsmechanismen verfügen (Dismutasen etc.). Dagegen wirkt eine zu geringe Eisenkonzentration negativ auf die Replikation.

Metabolite als spektroskopisch detektierbare Markersubstanzen

Eine Vielzahl von Clostridien produzieren während der Fermentation organische Säuren. In Typ A *Cb* konnte mittels gaschromatographischer Analysen Acetat, Propionat, iso-Butyrat, Butyrat, iso-Valerat, iso-Caproat, Succinat, Phenylelessigsäure und Hydrophenylelessigsäure nachgewiesen werden (Elsden & Hilton, 1978; Moss, Hatheway, Lambert, & McCroskey, 1980; Emeruwa & Hawirko, 1974). Die Konzentrationen der einzelnen Analyte waren abhängig von der Wachstumsphase, dem Medium und den Kulturbedingungen. Die sezernierte Pyruvatkonzentration blieb bei diesen Versuchen konstant bei 2 mM. Somit sind extrazelluläre Metabolite aufgrund ihrer geringen Konzentrationen u.U. nur schwer oder gar nicht mIR spektroskopisch zu detektieren.

Die Gruppe I der proteolytischen Bakterien von *C. botulinum* sind die 2. Organismen (neben *L. lactis*) von derzeit allen sequenzierten Genomen, die für eine N⁵-(Carboxyethyl) Ornithin Synthase kodieren. Dieses Enzym kondensiert Pyruvat mit Ornithine und Lysin, wobei anstelle von Pyruvat noch 7 weitere α -Ketosäuren als Substrat dienen können und so ein spezifisches und einzigartiges sekretorisches Aminosäureprofil entstehen kann (Thompson, Hill, Smith, & Pikis, 2010). Dadurch kann eine chromatografische Analyse dieser AS Konzentrationen bzw. dieser spezifischen Kondensationsprodukte weitere interessante Marker zur Prozesscharakterisierung liefern.

Toxinfreisetzung

Es zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse über den Mechanismus der Produktfreisetzung in der Literatur. Unterschiedliche Autoren berichten von und gegen die Notwendigkeit einer

Zellyse. So zeigen Brizzo et. al (Briozzo, Lagarde, Chirife, & Parada, 1983) dass niedrige Toxinkonzentrationen bei konstant gehaltenem pH-Wert erreicht werden, sowie dass eine Zellyse, ausgelöst von niedrigen pH-Werten, zur Produktfreisetzung notwendig ist. Hingegen berichtet Siegel et. al (Siegel & Metzger, 1979, 1980) dass eine Zellyse für eine maximale BoNT Konzentration nicht notwendig ist. Als eine weitere Möglichkeit der Freisetzung des Toxins ist die Diffusion durch die Zellwand erwähnt.

Medienbestandteile werden bei der Kultivierung verbraucht und es kommt dadurch zur Autolyse der Zellen. Die Autolyse wird durch ein zelleigenes Lysesystem hervorgerufen und nicht durch das Absinken des pH-Wertes während der Fermentation (Bonventre & Kempe, 1959). Das intrazelluläre Toxin wird durch die Autolyse der Zellen verstärkt in das umgebene Medium freigesetzt.

Es ist belegt, dass eine Proteaseprozessierung des Toxins notwendig ist, um dessen vollständige Aktivität zu erreichen. Es wird vermutet, dass diese Prozessierung (,nicking'-Exzision eines 10 AS Restes aus der Einzelstrang-Polypeptidkette) und Disulfidverbrückung extrazellulär bzw. während des Toxinexports erfolgen müssen, da im Zytoplasma reduzierende Bedingungen herrschen und die Disulfidverbrückung eines oxidierenden Milieus bedarf (Johnson & Bradshaw, 2001). Das Redoxpotential ist somit entscheidend für die Herstellung von aktivem Neurotoxin.

Im Fermentationsmedium befindet sich Natriumthioglycolat, um anaerobe Bedingungen zu schaffen. So zeigte Kaufmann, dass Thioglycolate das Redoxpotential absenkt und dass mit längeren Autoklavierzeiten des Fermentationsmediums das Redoxpotential immer weiter sank (Kaufmann & Marshall, 1965). Ein geringes Redoxpotential zeigte in dieser Studie eine verkürzte Lag-Phase. Ebenso wurde festgestellt, dass eine Autoreduktion des Mediums bei der Kultivierung von *Cb* 62a einen Einfluss auf die Kultur hat. Hier wurde ein ideales Redoxpotential von 156mV bei einem pH-Wert von 6,2 ermittelt. Je länger ein Medium autoklaviert wurde (18-30min), desto besser konnte dieses das Wachstum der Kultur unterstützen.

2.5 Statistische Versuchsplanung/ Design of Experiments (DoE)

Zur Identifikation von Einflussgrößen (Faktoren) auf ein beobachtetes System wird die statistische Versuchsplanung genutzt. Durch die systematische Änderung von Faktoren wird der Effekt auf eine gewählte Zielgröße (Systemantwort), z.B. die Konzentration eines bestimmten Stoffes, beobachtet und kann dann dieser geänderten Einflussgröße (z.B. Faktor Stoffkonzentration) zugeordnet werden. Die statistische Versuchsplanung (DoE) beschäftigt

sich damit aus einer minimalen Anzahl an Versuchen ein Maximum an Informationen zu gewinnen (Montgomery, 2001). Diese Informationen werden in einem empirischen mathematischen Modell zusammengefasst (Regression).

Es gibt kontrollierbare und nicht kontrollierbare Faktoren und verschiedene Systemantworten (Produktkonzentration, Zelldichte etc., Abb. 6). Zu den kontrollierbaren Faktoren zählen z.B. die Stoffkonzentration, Inkubationstemperatur oder der pH-Wert. Zu den nicht kontrollierbaren Faktoren zählt meist z.B. der Luftdruck oder die Jahreszeit (Montgomery, 2001).

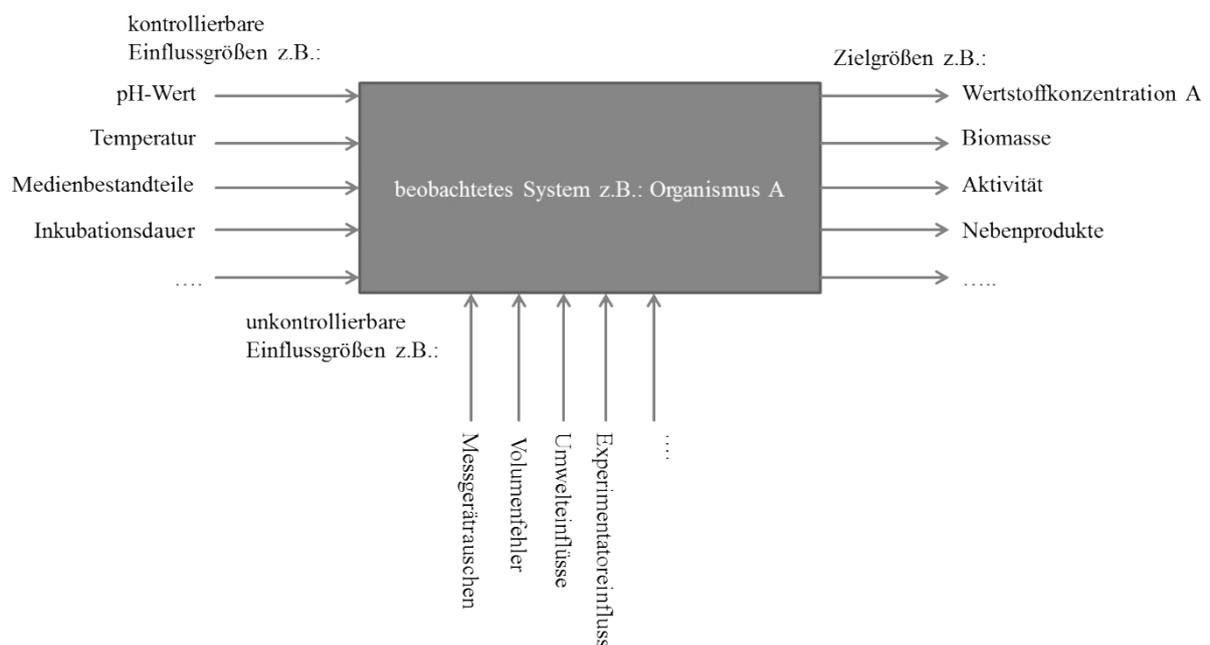


Abb. 6: vereinfachte schematische Darstellung eines Versuchssystems mit Einfluss-, Stör- und Zielgrößen

Die DoE Methodik liefert einfache visuell zu inspizierende mathematische Modelle einer Ursache-Wirkungsbeziehung mit einer minimalen Anzahl an durchzuführenden Experimenten. Dabei können Systemantworten (Effekte) beobachtet werden, die mit keiner anderen derzeit vorhandenen Methode in Erfahrung gebracht werden können.

Beim DoE gibt es eine Vielzahl von Versuchsplänen, die zur Bearbeitung von unterschiedlichen Problemstellungen bestimmte Vor- und Nachteile besitzen (Screeningpläne, Mischungspläne, voll- und teilfaktorielle Pläne usw.), (Gemperline, 2006; Montgomery, 2001).

Ein vollfaktorieller Versuchsplan (VFV) bietet das beste statistische (orthogonal, balanciert und rotierbar) Verhalten sowie den höchsten Informationsgehalt. Es wird jede mögliche Kombination von Faktoreinstellungen untersucht. Aufgrund dieser Kombinatorik steigt die Versuchsanzahl, abhängig von der Anzahl der untersuchten Faktoren und gewünschten Levelzahl, schnell stark an. Für z. B. zwei Konzentrationsstufen (Level 5 und $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) und 3

Faktoren (Konzentration des Bestandteils A, B, C) ergeben sich nach Gleichung 2a bei einem vollfaktoriellen Versuchsplan 8 Experimente. Bei 3 Faktoren auf drei Level steigt die Anzahl auf 27 Einzelexperimente (Gl. 2b).

$$N_{\text{Versuche}} = 2^n \quad (\text{Gl.2a})$$

$$N_{\text{Versuche}} = 3^n \quad (\text{Gl.2b})$$

Innerhalb der gewählten Faktorengrenzen (Design Space) wird ein generalisiertes Verhalten des untersuchten Systems (Kombination aus Faktoren und Level) durch das mathematische Modell beschrieben.

Die Abbildung 7 zeigt einen zentral zusammengesetzten Versuchsplan (central composite design, CCD) Versuchsplan, bestehend aus den Eckpunkten eines Körpers (Würfel) sowie eines zentrierten Sterns. Für 2 Faktoren (n) ist der Versuchsplan eine Fläche, für 3 Faktoren ein Körper und für $n > 3$ ein Hyperkubus bei dem eine grafische Darstellung nicht mehr möglich ist. Der CCD für 3 Faktoren besteht aus einem vollfaktoriellen Plan (Eckpunkte des Würfels), sowie einem Stern, dessen Versuchspunkte über den eigentlichen Versuchsraum hinausgehen. Die axialen Sternpunkte ($\pm\alpha$) erweitern das Versuchsgebiet über die Extrempunkte des Körpers hinaus und lassen so eine Beurteilung des umliegenden Gebiets zu. Jede Einstellgröße wird auf 5 Stufen (Faktorausprägung/Level) während des Versuchs überprüft. Die beiden Einstellung -1, +1 aus dem Würfel, dem Mittelpunkt 0 sowie die beiden Extremwerte $-\alpha$, $+\alpha$ aus dem Stern. Für einen CCD ergeben sich insgesamt 15 Versuche. Somit reduziert ein CCD Versuch die Versuchsanzahl um nahezu die Hälfte bei einer gleichbleibenden Aussagefähigkeit und Modelgüte im Vergleich zu z.B. 3^k Plänen.

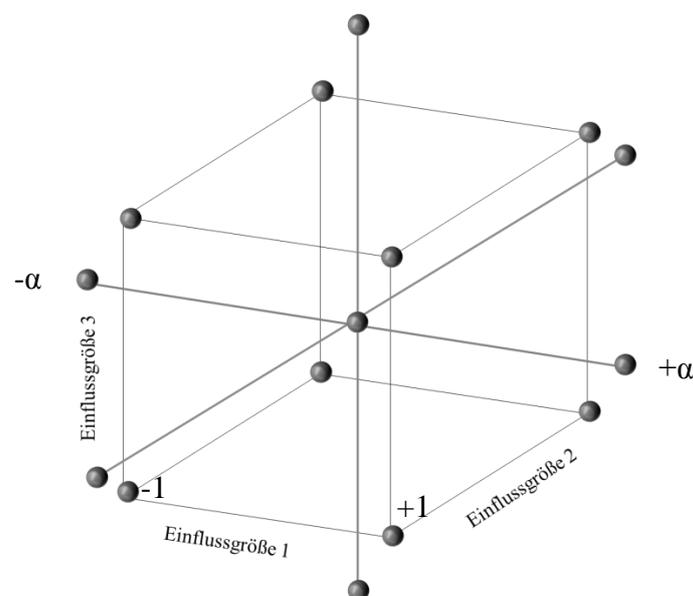


Abb. 7: grafische Darstellung eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans für 3 Einflussgrößen (Faktoren) mit 2 Stufen (Level) für jede Einflussgröße

Die Orthogonalität von statistischen Versuchsplänen ist entscheidend dafür, dass jeder Effekt der Einzelfaktoren auf die Zielgröße sowie höhere Wechselwirkungen (Effekte auf die Zielgröße durch Kombination zwischen Faktoren) unabhängig von den übrigen Faktoren bestimmt werden können. Weiterhin ist der CCD balanciert, d.h. alle Versuchspunkte haben das gleiche Gewicht bei der Berechnung der Effekte auf die Zielgröße. DoE Pläne sind rotationssymmetrisch, damit die Größe des für die Effekte bestimmten Vertrauensintervalls nicht vom Winkel der Betrachtung des Körpers abhängen, sondern allein vom Abstand zum Mittelpunkt. Durch die fünf untersuchten Level kann der beobachtete Effekt auf Linearität überprüft werden. Es sind mehr als zwei Level notwendig um zu erkennen, ob ein beobachteter Effekt auf die Zielgröße linear oder nichtlinear (z.B. quadratisch verläuft). Bei einer Levelanzahl von zwei wie bei vollfaktoriellen Plänen kann keine Aussage darüber getroffen werden wie die Systemantwort zwischen den beiden Punkten ausfällt. Dazu bedarf es mindestens eines 3. Punktes um ein nichtlineares Verhalten, eine Krümmung der Geraden zu beobachten. Vollfaktorielle Pläne können einen 3. Zentrumspunkt erhalten. Bei drei untersuchten Faktoren ergibt sich für einen VFV mit drei Level nach Gleichung 2.b eine wesentlich höhere Versuchsanzahl als bei CCD Versuchen mit fünf Level.

Weiterhin wird der Versuchsmittelpunkt zur Bestimmung der Präzision, bzw. der allgemeinen Versuchsvarianz verwendet, indem dass er mindestens als Triplikat randomisiert über den gesamten Versuchsplan durchgeführt wird.

Die statistische Versuchsplanung ermöglicht somit eine kontinuierliche, rationale und methodisch überlegende Untersuchung von Einflussgrößen auf Zielgrößen zum Zweck eines vollständigen Prozessverständnisses im betrachteten Versuchsgebiet.

2.6 Mittlere Infrarot Spektroskopie (mIRS)

Viele verschiedene chemische Verbindungen absorbieren Strahlungsenergie. Die mittlere Infrarotspektroskopie beschäftigt sich mit Untersuchung der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung (Licht) im Bereich von 2500-25000 nm bzw. $4.000-400\text{ cm}^{-1}$ (Wellenzahlen) auf Moleküle. Das dabei erhaltene IR Spektrum stellt die absorbierten Strahlungsintensitäten über den betreffenden Wellenlängen (Wellenzahlen) dar und liefert abhängig vom Analyten eine charakteristische Intensitätsverteilung. (Smith, 2011)

Die Molekülstruktur und insbesondere die funktionellen Gruppen bestimmen die Peakposition der Absorption im Spektrum. Die Peakhöhe, bzw. Absorptionsstärke kann zur quantitativen Bestimmung von Substanzen genutzt werden. Das Gesetz von Lambert-Beer beschreibt die Abhängigkeit der Analytkonzentration c bei durchstrahlter Schichtdicke L , mit dem analyt-

spezifischen Extinktionskoeffizient ε zur absorbierten Strahlung A bei einer spezifischen Wellenlänge (Gl.3). Die gemessene Absorbanz ist somit proportional zur Analytkonzentration. Die Peakhöhe sowie die Peakfläche (A) in einem Spektrum ist ein direktes Maß für die Stoffkonzentration (c). Es sind Analytkonzentration bei der mIR-Messung von ca. 0,1 % (w/w) bzw. $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ für ein gutes Signal zu Rauschverhältnis (S/N) empfehlenswert.

$$\lg\left(\frac{i_0}{i}\right) = A = \varepsilon Lc \quad (\text{Gl.3})$$

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der mIR Spektroskopie sind die um den Faktor 10 geringeren Anschaffungskosten im Vergleich zu anderen Analysegeräten (z.B. GC/LC-MS Systeme). Die wesentlichen Nachteile der mIR Spektroskopie liegen in der Schwierigkeit der Peakzuordnung und Peak-Überlagerungen bei Stoffgemischen, sowie der vergleichsweise hohen benötigten Analytkonzentration. Außerdem können keine monoatomischen sowie homoatomischen Dinukleare wie z.B. O_2 detektiert werden. Das IR aktive Molekül muss über einen Dipol verfügen (polare Atombindung). So zeigt z.B. H_2O und CO_2 ein sehr starkes oft störendes Signal im mIR Absorptionsspektrum.

2.7 Multivariate Datenanalyse/Chemometrie

Die Chemometrie ist ein interdisziplinäres Fachgebiet, das sich mit der Analyse von chemischen und/oder physikalischen Daten - oft in mehrdimensionaler (multivariater) Ausprägung- beschäftigt. Dabei werden unterschiedliche mathematische Methoden sowie statistische Prinzipien genutzt, um explorativ eine latente Information oder Zusammenhänge zwischen Variablen zu identifizieren, die sonst aufgrund der Datenkomplexität (Dimensionalität) meist unerkannt bleiben.

Die Informationsextraktion wird durch die Reduzierung der Datendimensionalität erreicht, ohne einen wesentlichen Verlust von relevanten Informationen zu verursachen. Eine weit verbreitete Methode hierfür ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA- principal component analysis). Bei der Hauptkomponentenanalyse wird ein realer Messwert in einen künstlichen Score- und Loadingwert umgerechnet. Der Score- und Loading-Wert des Messwerts wird im Score- und Loadingplot entlang der Hauptkomponenten abgetragen. Die Hauptkomponenten (HK, PC) sind *in silico* gebildete abstrakte Variablen (reale Variablen wie Beschleunigung, Masse, daraus abstrakte Variable z.B. Kraft $F = a \cdot m$). Die erste HK ist die abstrakte Variable bei der die größten Unterschiede der realen Messwerte beobachtet werden. In den darauffolgenden HK nehmen die beobachteten Unterschiede (Varianz) der Messwerte subsequent ab. Durch die korrekte Wahl der Anzahl der Hauptkomponenten können Messrauschen sowie redundante Informationen aus den Beobachtungen entfernt werden. Die

dargestellten Daten beinhalten dann nur noch die wesentlichen Informationen aus den Messdaten. (Jolliffe, 2002)

Für jedes betrachtete mIR Spektrum (Intensitäten bei 4000-400 cm^{-1}) wird ein Scorewert und eine Vielzahl an Loadingwerten berechnet. Somit entspricht ein gesamtes mIR Spektrum einem einzigen Punkt innerhalb des Score-Plots. Der geometrische Abstand zwischen zwei betrachteten Scorewerten - Punkten im Score-Plot, ist ein Maß für die Ähnlichkeit der enthaltenen Informationen. Scorewerte die nahe beieinander liegen haben ein ähnlicheres Spektrum als Scorewerte die weiter entfernt von einander liegen.

Der Loadingsplot ist eine grafische Repräsentation der betrachteten Hauptkomponente (der abstrakten Variablen) und dient dessen näheren Beschreibung dieser.

Die Hauptkomponenten sind orthogonal und varianzmaximierend. Das heißt, dass die Informationen, die entlang der Hauptkomponente 1 (HK 1) aufgetragen sind, nicht in anderen HK vorkommen (orthogonal) und dass der Informationsgehalt von HK 1 nach HK_n abnimmt. Somit ist jede weitere HK unkorreliert mit der vorausgehenden bzw. liegt mathematisch betrachtet rechtwinklig (orthogonal) zur vorhergehenden HK. Dies gilt für die ursprünglichen Variablen nicht, da hier linear abhängige, redundante Informationen vorliegen.

Eine Hauptkomponente der PCA repräsentiert oft eine Vermischung unterschiedlicher Effekte und die Bestimmung eines reinen Effekts wird dadurch oft verhindert. Es kann zwar angegeben werden, welche spektralen Bereiche des Rohspektrums relevant für die einzelnen Hauptkomponenten sind, aber eine kausale Interpretation ist meistens nicht möglich.

Eines der Ziele der multivariaten Datenanalyse im Anwendungsbereich von PAT und QbD besteht darin, einen eher unspezifischen Echtzeitanalysator in einen spezifischen zu verwandeln, um anhand der so durchgeführten Analytik Aussagen über den bevorstehenden Prozessverlauf machen zu können. (Barkeev, 2005)

Einer der wichtigsten Punkte bei jeder Datenanalyse ist die Qualität der Daten. Diese Datengüte hängt in erster Linie von der Qualität des verwendeten Messgerätes als auch den Messparametern und Messaufbau ab. Eine Datenvorverarbeitung kann bestehende Unterschiede in den Spektren betonen und so besser herausarbeiten, sowie bei der Messung unvermeidliche Phänomene kompensieren (Basisliniendrift usw.), dies ersetzt jedoch nicht eine ausreichende Qualität der Rohdaten (Barkeev, 2005).

3. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien für die Analytik waren analytischer Reinheit und wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bzw. VWR International (Radnor, USA) bezogen. Das

Fermentationsmedium bestand aus zwei komplexen und einem chemisch definierten Anteil. Der komplexe Anteil besteht aus einem Hydrolysat welcher als Vitamin-Quelle (V-Quelle) und Stickstoffquelle (N-Quelle) dient. Für die V- und die N-Quelle kamen in dieser Arbeit unterschiedliche Chargen zum Einsatz.

Chargen der komplexen Bestandteile

Vitaminquelle (Hersteller Chargen Nr.)	Stickstoffquelle (Hersteller Chargen Nr.)
V1 (8169160)	N1 (8044434)
V2 (1186281)	N2 (1243184)
V3 (3021050)	N3 (2103105)
V4 (3267131)	N4 (2164396)
	N5 (4090306)
	N6 (3154413)

Die Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mittels Microsoft Excel 2003, (Microsoft Inc, Albuquerque, USA) mit dem Add on RealStatistics (www.real-statistics.com, Stand März 2016). Die Erstellung und Auswertung von DoE Versuchsplänen erfolgte durch UnscramblerX (Camo Inc., Oslo, Schweden) sowie DesignExpert (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Zur Erstellung von Hauptkomponentenanalysen (PCA) wurde UnscramblerX sowie Matlab mit der PLS_Toolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, USA) verwendet.

3.1 5L Batchfermentation von *Clostridium botulinum*

Die Abbildung 8 zeigt schematisch den Prozess zur Herstellung von Botulinum Toxin A im 5 L Maßstab. Dieser orientiert sich an dem von Melling et al. (Melling et al., 1988; Schantz & Johnson, 1992) beschriebenen Prozess. Die Schritte bis zur Fermentation beinhalten das Upstreaming vom Cryovial bis zur IC 2 Vorkultur, welche zur Inokulation des Bioreaktors genutzt wird.

Aus einer in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagerten Zellbank von *Clostridium botulinum* ATCC 3502, wurde eine Vorkultur mit komplexem Fermentationsmedium (C-, N- und V-Quelle mit 10,0; 10,0 und 30 g·L⁻¹) angesetzt. Dazu werden 450 µl Zellbank Aliquot in 10 ml Medium suspendiert. Nach 24 h Inkubation wird das Zellmaterial weiter expandiert. Dazu wird das Medium mit unterschiedlichen Volumina aus der vorhergehenden Kulturstufe beimpft und für weitere 24 h inkubiert. Nach ca. 150 h Upstreaming wird die optische Dichte der

Vorkultur (siehe 3.4) bestimmt und das Volumen zum Animpfen der Hauptkultur mit Gleichung 8 berechnet.

$$Volumen_{entnahme\ IC2} = \frac{OD_{Soll,Hauptversuch} \cdot Volumen_{Hauptversuch}}{OD_{IC2,ist}} \quad (Gl. 8)$$

Das berechnete Volumen aus der IC2 Vorkultur wird in sterile Zentrifugenbecher überführt und bei 25°C, 10000 x g für 5 min. zentrifugiert. Das Biomassepellet wird in 50 ml Fermentationsmedium resuspendiert und der Bioreaktor damit inokuliert.

Das Fermentationsmedium wird bei 121°C für 15 min. autoklaviert und die separat sterilisierte C-Quelle in einer Konzentration von 10 g·L⁻¹ hinzugegeben. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgt bei 33,5°C ohne pH-Wert Regelung. Nach ca. 80 h ist die Fermentation beendet und eine finale Probe wird genommen. Diese Probe wird bei 4°C für 10 min. bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Aus dieser Probe werden die Parameter Toxinkonzentration und C-Quellenkonzentration bestimmt und dienen dem Vergleich zwischen den verschiedenen Kultivierungen.

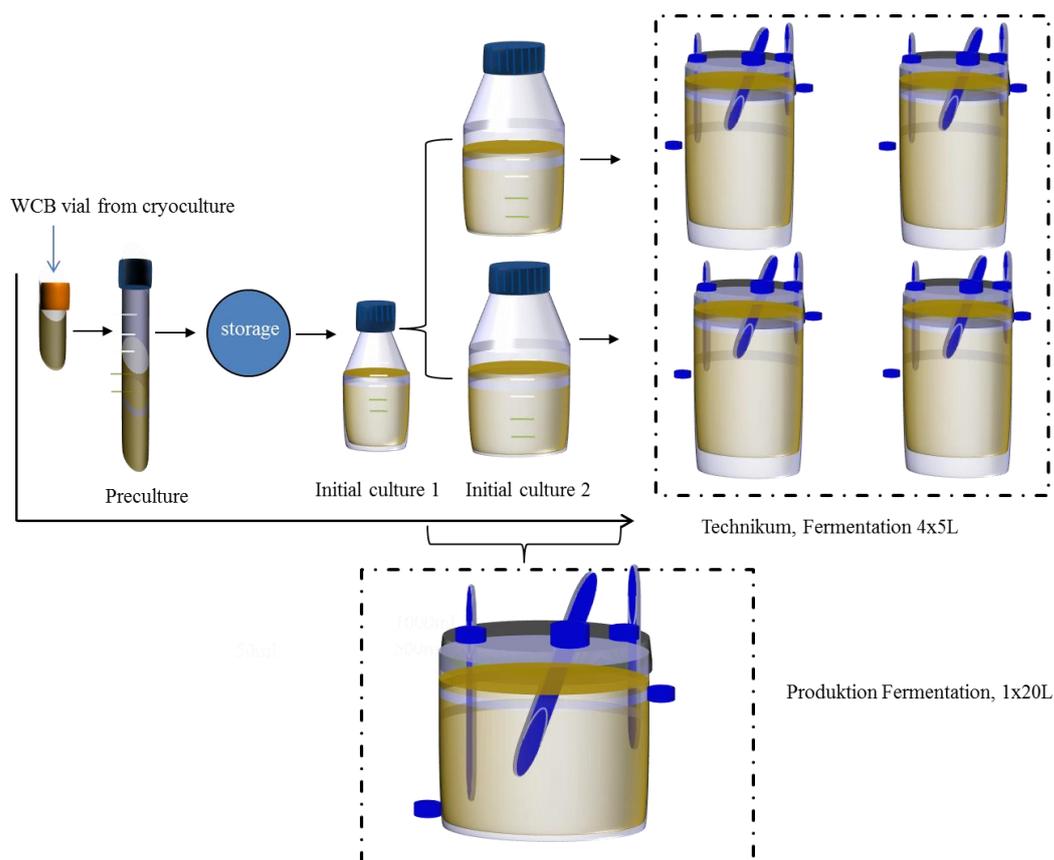


Abb. 8: schematische Darstellung des Upstreamings und der Fermentation im Technikums- und Produktionsmaßstabs

Die GMP konforme Herstellung von BoNT/A erfolgt in eigens dafür vorgesehenen Räumlichkeiten mit dezidierten Anlagen und Materialien. Die Experimente für diese Arbeit wurden auf F&E Anlagen im Biotechnikum durchgeführt. Die Fermentationszeiten, Volumina, verwendete Geräte und Materialien, Temperaturen, usw. sind für die Produktion und das Technikum identisch. Im Technikum erhält jeder Reaktor nach Standardverfahren (nach Master Batch Record, MBR) 400 ml IC2 Kultur zur Inokulation, dabei werden jeweils 2 Fermenter aus der gleichen IC2 Kulturflasche angeimpft. In der Produktion wird der Inhalt beider Flaschen zur Inokulation des 20L Fermenters genutzt. Die in dieser Arbeit verwendete, angepasste Inokulationsmethode (Pelletmethode) verwendet statt einem festen Volumen der IC2 Vorkultur (400 ml) ein Biomassepellet. Die IC2 Vorkulturflüssigkeit wird nicht mit in den Fermenter übertragen- alleinig das Biomassepellet wird transferiert.

3.2 Statistische Versuchsplanung

Bei der statistischen Versuchsplanung werden die Fermentationsmedium- Zusammensetzungen an C-, V- und N-Quelle/Charge variiert und die dadurch erreichte Höhe der Produktkonzentration verglichen. Für diese Versuche erfolgt das Upstreaming wie unter 3.1 beschrieben. Die Hauptfermentation wird anders als unter 3.1 in 50 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen durchgeführt. Das Arbeitsvolumen beträgt 30 ml. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgt bei 33,5 °C im Brutschrank für 72h. Die Kombination der einzelnen Medienbestandteile wird durch einen DoE Versuchsplan (siehe Anhang) bestimmt. Dieser Versuchsplan wird mithilfe des Programms UnscramblerX aufgestellt. Es werden 20 %-ige Stammlösungen der Medienbestandteile (C-, N- und V-Quelle) hergestellt. Anhand des erstellten Versuchsplans werden unterschiedliche Volumina dieser Stammlösungen in die Reaktionsansätze pipettiert. Anschließend erfolgt die Sterilisation des Mediums bei 121 °C für 15 min. Nach Temperierung der Reaktionsansätze auf 33,5 °C erfolgt die Inokulation der Ansätze aus der IC2 Vorkultur.

3.3 Analytik

Die Toxinanalytik wurde mittels Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) von Merz Pharma, Potsdam, Deutschland durchgeführt.

Die optische Dichte der Kulturen wurde extern mittels UV/Vis Spektroskopie bei 578nm ermittelt (Helios Gamma, Thermo Scientific, Waldborn, Deutschland). Bei Absorptionswerten größer 0,5 erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Probe mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Messung der Probe erfolgte gegen phys. Kochsalzlösung als Nullwert (Blank). Die OD-Werte ergeben sich aus der Differenz von Messwert und Blank.

Die Analytik des Fermenterüberstandes auf organische Säuren erfolgte durch Ionenausschlusschromatografie (Rezex ROH, 150 x7,8 mm mit Vorsäule, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Die isokratische Trennung wurde mit einem Volumenstrom von $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 25°C durchgeführt. Als mobile Phase wurde $0,05 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ verwendet.

Die Methodenentwicklung und Auswahl der stationären Phase für die Ionenausschlusschromatografie erfolgte auf einem UHPLC System, Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waldborn, Deutschland) mit einem online Laufmittelentgaser, quaternärer Laufmittelpumpe, Autosampler, Säulenofen und Festwellenlängen UV/Vis Detektor. Die Detektion der Analyte erfolgte bei 210 nm.

Die LC-MS, LC-MS-MS sowie GC-MS Analysen wurden extern durchgeführt (Analytical Services, Aachen, Deutschland).

Die Messung der Glukoskonzentration in den V- und N-Quellen der unterschiedlichen Rohstoffchargen erfolgte automatisiert mittels Glukoseoxidase/Peroxidase Test (YSI 2300, YSI Inc. Yellow Springs, USA). Dazu wurden 10 %-ige Lösungen (w/w) der V- und N-Quelle hergestellt und diese vermessen.

Für die Messung von reduzierenden Zuckern wurden 3 ml DNS Reagenz mit 3 ml Probe gemischt und bei 90°C im Wasserbad für 15 min. inkubiert. Im Anschluss wurde 1 ml 40 %-ige (w/v) Kalium-Natrium-Tartratlösung dazugegeben und die Proben auf Eis gelagert. Die Absorption wurde bei 575 nm gemessen. Von den Messwerten wurde der Wert des Blindwerts (3 ml Wasser) abgezogen.

DNS Reagenz

Substanz	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
Dinitrosalicylsäure	10,0
Phenol	2,0
Natriumsulfit	0,5
Natriumhydroxid	10,0
ad. 1L WFI	

Die Konzentration der reduzierenden Zucker wurde als Glukoseäquivalente berechnet. Dazu wurde eine Kalibration mit Glukosestandards erstellt. Es wurden 18 %-ige (w/v) Lösungen der Rohstoffe unterschiedlicher Chargen (Proben) hergestellt und dies unverdünnt gemessen. Die Messwerte befanden sich in der Mitte der Kalibrierfunktion.

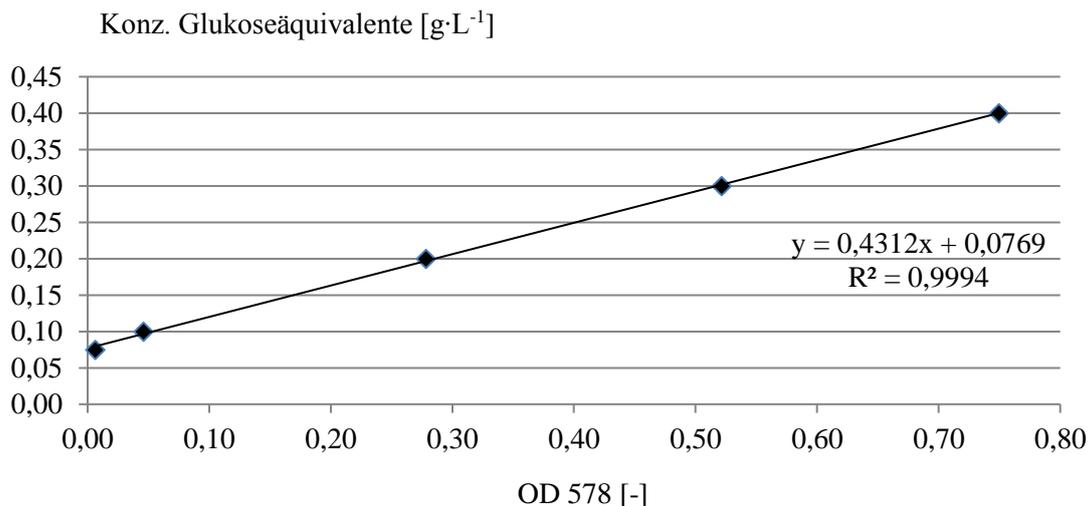


Abb. 9: Kalibrierfunktion, Auftragung der Glukosekonzentration über der optischen Dichte

3.4 mIR Spektroskopie

Die mIR Messung von Feststoffen erfolgte mittels Diamant-ATR-Kristall im Bereich von 600-4000 cm⁻¹. Der ATR Kristall wurde mit dem Probenfeststoff vollständig bedeckt und durch einen Sporn auf den Kristall gedrückt. Für eine Rohstoffprobe wurden 128 Spektren innerhalb von 3,5 min. mit 4 nm Auflösung mit einem Nicolet IS 5 FTIR (Thermo Scientific, Waldborn, Deutschland) aufgenommen. Die dargestellten Spektren sind Mittelwertspektren aus diesen 128 Einzelmessungen. Der ATR Messaufsatz wurde mit 30ml·min⁻¹ Stickstoff mit einer Reinheit von 99,9999 Vol% beginnend einen Tag vor der Messung gespült (H₂O < 0,5 ppm-mol, CO₂ < 0,1 ppm-mol). Zusätzlich wurde der geräteinterne Algorithmus der automatischen Atmosphärenkompensation verwendet. Dadurch wird die Darstellung von Wasserdampf und CO₂ Banden im Spektrum minimiert. Das Gerät wurde zur Basislinienstabilisierung 1 Tag vor der Messung eingeschaltet.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentration des bei der Merz Pharma GmbH hergestellten Botulinum Toxin A nach 72h Fermentation schwankt teilweise über den spezifizierten Bereich von $3,5 \pm 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hinaus. Ziel dieser Arbeit ist es die Ursachen für die beobachtete Prozessvariabilität in der Toxinkonzentration zu finden sowie Maßnahmen zu entwickeln um auf diese Ursachen Einfluss nehmen zu können. Verschiedene Faktoren werden auf ihre Auswirkungen hinsichtlich der Toxinkonzentration untersucht und Möglichkeiten zu deren Überwachung und Änderung getestet. So soll es durch rechtzeitig erkannte Abweichungen von idealen Prozessbedingungen

möglich werden, Variationen in der Toxinkonzentration zu verringern und außerhalb der Spezifikation liegende Batchergebnisse zu verhindern.

Die Fermentation zur Herstellung des Toxins wird nicht geregelt. Es werden unterschiedliche Stoffströme im Fermenter miteinander kombiniert und für 72 h inkubiert. Da während der Fermentation kein Einfluss auf die Kultivierung durch andere Prozessparameter (Begasung, Rührung, Feed etc.) genommen wird, ist die beobachtete Variabilität der Toxinkonzentration ein Resultat der Eigenschaften der kombinierten Stoffströme. Zu den im Fermenter zusammengebrachten Stoffströmen zählen die Fermentationsmediumbestandteile sowie das Inokulum.

Es werden Methoden des „Quality by Design“ (QbD) und der „Process Analytical Technology“ (PAT) genutzt, um Einflussfaktoren auf die Toxinkonzentration zu identifizieren. Durch entsprechende Anpassung dieser Faktoren kann mehr Prozesskontrolle ausgeübt werden. Zu den Methoden des QbD gehört die statistische Versuchsplanung. Sie wird zur Prozessbeschreibung verwendet und liefert ein empirisches Ursache-Wirkungsmodell. Durch Interpretation dieser Modelle können Maßnahmen abgeleitet werden wie ein optimaler Prozess durchzuführen ist. Zur Überwachung und Analyse der Fermentationsmedium-Rohstoffe wird die Spektroskopie angewendet. Die Spektroskopie ist das Mittel der Wahl beim PAT. Durch spektroskopische Methoden ist es in kürzester Zeit möglich, charakteristische chemische Eigenschaften einer Probe zu messen. Durch die Auswertung der spektroskopischen Daten mithilfe multivariater Analysemethoden ist es möglich, die spektroskopischen Daten der unterschiedlichen Proben miteinander zu vergleichen und wichtige Informationen zu extrahieren.

Durch die Anwendung der Erkenntnisse, die auf Grundlage von QbD/PAT Methoden erarbeitet wurden, sollen Schwankungen in der Produktkonzentration verringert werden. Anschließend ist es möglich die spezifizierten Prozessgrenzen enger zu definieren. Mit dem erlangten vertieften Prozessverständnis geht eine Optimierung der Prozessbeherrschung einher.

4.1 Beschreibung der Variabilität der Toxinkonzentration und deren Ursachen

Die Herstellung des Toxins erfolgt bei der Merz Pharma GmbH & Co. KGaA (im ffolgendem als Merz bezeichnet) im Produktionsmaßstab von 20 L. Die zulässige Produktkonzentration am Ende der Fermentation liegt im Bereich von 1,5 – 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die tatsächlich erreichten Produktkonzentrationen auf den Produktionsanlagen in der Zeit von 2010 bis 2014 schwankten zwischen 0,9 – 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Somit lagen die Produktkonzentrationen teilweise außerhalb des zulässigen Bereiches und das Toxin konnte nicht zur Formulierung des Fertigprodukts verwendet werden.

Es wurde eine stetige Abnahme der Produktkonzentration ab 2011 beobachtet, die im Jahr 2013 in mehreren OOS (engl.: out of specification, außerhalb der zulässigen Spezifikation) Batches mündete. Im Rahmen der betriebsinternen Ursachenanalyse zeigte sich, dass die Toxinkonzentration beding durch die organismen-inhärente biologische Variabilität zwar variiert, jedoch nie zuvor so stark schwankte. Da die zu Grunde liegenden Ursachen für die Variabilität in der Toxinherstellung nicht bekannt sind, müssen diese identifiziert werden. Dadurch kann im Anschluss gezielt auf die identifizierten Ursachen eingegangen werden, um in Zukunft die Variabilität in der Endproduktkonzentration zu minimieren und somit OOS Batche möglichst zu verhindern.

Es wird angenommen, dass die beobachtete Variabilität in der Produktkonzentration nicht durch die Fermentation selbst verursacht wird, sondern durch die eintretenden Stoffströme im Fermenter. Während der Fermentation wird alleinig die Temperatur geregelt. Sonst erfolgt keine weitere Einflussnahme auf die Batche während der Fermentation. Es wird weder begast, gerührt noch der pH-Wert eingestellt oder anderweitig der Prozess geregelt. Daher kann die beobachtete Variabilität nur durch die in den Fermenter eintretenden Stoffströme verursacht werden. Diese Stoffströme sind zum einen das Inokulum, die biologische aktive Komponente für die Toxinproduktion, und zum anderen das Fermentationsmedium, welches die Fermentationsbedingungen festlegt.

Die Abbildung 10 zeigt die für den hier untersuchten Prozess relevanten Stoffströme. Die Variabilität im austretenden Stoffstrom des Fermenters (Höhe der Produktkonzentration) wird durch die eintretenden Stoffströme erzeugt. Die konstant gehaltenen Fermentationsparameter beeinflussen die Variation des Ergebnisses nicht.

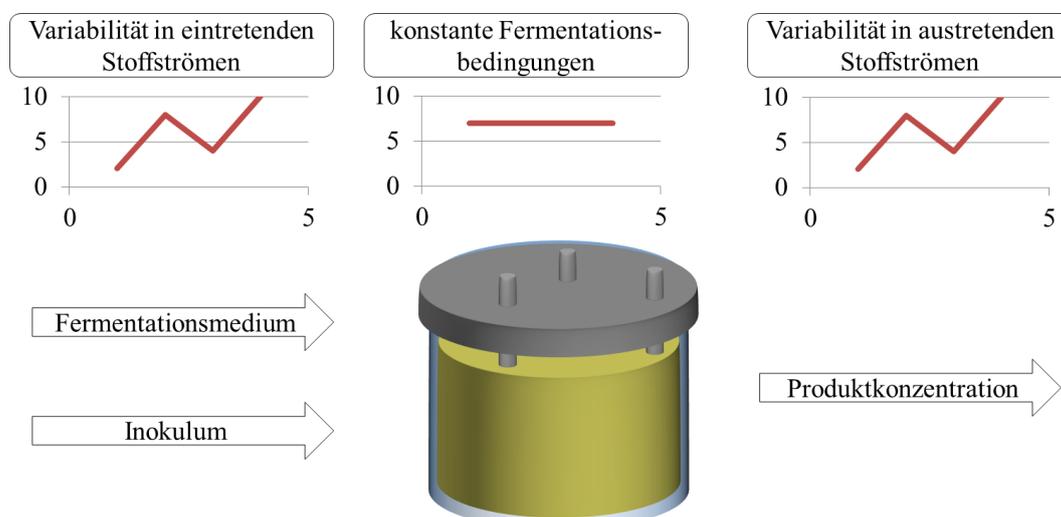


Abb. 10: schematische Darstellung der Variabilität beinhaltenden Stoffströme in und aus dem Fermenter

Die Schwankung der Produktkonzentration wird von den zwei Stoffströmen, die in den Fermenter eintreten, verursacht. Jeder dieser Stoffströme besitzt unterschiedliche Eigenschaften. Beim Stoffstrom des Fermentationsmediums sind diese durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der verschiedenen Rohstoffchargen und die Medienvorbehandlung gegeben. Die Rohstoffchargen zur Herstellung des Fermentationsmediums unterliegen Schwankungen in den Konzentrationen der einzelnen Bestandteile, da es sich zum Teil um nicht chemisch definierte komplexe Mischungen handelt. Einen weiteren Einfluss auf die Qualität des Fermentationsmediums kann die Vorbehandlung haben, da sich durch die Sterilisation Medienbestandteile verändern können.

Der 2. kritische Stoffstrom im Fermenter ist das Inokulum. Die Menge und der Zustand der Zellen im Inokulum beeinflussen den Verlauf der Fermentation und damit die Endproduktkonzentration. Das Inokulum kann sich durch die Art der Bereitstellung der Zellen, die Qualität der Zellen, sowie die verwendete Zellmenge unterscheiden.

Die Produktkonzentration kann aus den oben genannten Gründen nur durch zwei wesentliche, in den Fermenter eintretende Faktoren beeinflusst werden (Stoffstrom des Mediums und des Inokulums). Beide Stoffströme werden auf ihre Eigenschaften untersucht und deren Einfluss auf die Toxinkonzentration bestimmt.

4.2 Stoffstrom des Inokulums

Das Inokulum für die Fermentation wird durch Kultivierung von *Clostridium botulinum* ATCC 3502 hergestellt (siehe Kap. 3.1, Abb. 8). Dabei wird in mehreren Schritten die Zellmenge erhöht. Dies geschieht durch den Transfer der Zellen ins Fermentationsmedium mit steigendem Volumina und Inkubation der Zellen über einen definierten Zeitraum von 24 h. Dieser Prozess der kontinuierlichen Erhöhung der Zellmasse (Zellexpansion) wird als Upstream Processing (upstreaming) bezeichnet. Am Ende des Upstream Processings steht eine Mikroorganismenkultur in Suspension (Initial Culture 2, IC2). Das Fermenter-Inokulum besteht aus den Zellen dieser IC2 Kultur. Die Fermentation wird in dieser Arbeit nicht mit zum Upstreaming gezählt. Jeder Schritt bis zur Fermentation ist als Upstreaming zusammengefasst. Jeder Schritt im Anschluss an die Fermentation wird als Downstreaming bezeichnet.

Der Zustand des Inokulums wird durch das Upstreaming beeinflusst. Dabei stellt die verwendete Zellbank mit ihren spezifischen Eigenschaften den Ausgangspunkt für die spätere Qualität des Inokulums dar.

4.2.1 Variabilität der Produktkonzentration durch das Zellbankalter

Es besteht die Möglichkeit des Zellbankalters, je älter die Zellbank wird, desto geringer ist die Anzahl an zu revitalisieren Zellen. Dies wurde durch Merz interne Untersuchungen nachgewiesen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Zellen über die Zeit der Lagerung ihre ursprüngliche Produktivität verlieren. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, sind in Tabelle 1 die erreichten Produktkonzentrationen nach 72 h Fermentation aus der Produktion (20 L) und dem Technikum (5 L) dargestellt. Die jeweils verwendete Zellbank sowie dessen Alter bei Verwendung sind mit aufgeführt.

Tab. 1: zusammengefasste Batch-Daten, +++/----sehr gute/schlechte Produktkonzentration, T- im Technikum erstellte Ansätze

Batch	Zellbank	Zellbankalter [Monaten]	Produktkonzentration
2011.1	z1	6	+++
2011.2	z1	8	+++
2011.3	z1	9	+++
2011.4	z1	10	++
2012.1	z1	21	++
2012.2	z1	23	---
2012.T1-T4	z2	5-18	++
2013.T1	z2	19	++
2013.1	z2	13	---
2013.2	z1	39	---
2013.3	z2	20	---
2013/14.T1-T4	z2	20-25	---
2014.T5	z2	27	+++
2014.T6	z2	27	--
2014.T7	z2	29	+++
2014.1	z3	2	+++
2014.2	z3	3	+++
2014.3	z3	4	+++
2014.4	z3	6	+++
2015.T1-T3	z2	34	---
2015.T4	z2	34	+++

Die Zellbank z1 wurde im Juli 2010 hergestellt und war bei ihrem Einsatz beim 1. Batch in 2011 6 Monate alt. Für das Technikum wurde nach der gleichen Methode wie für die Produktion im März 2012 eine eigene Zellbank (z2) erstellt. Diese ist bei ihrem Einsatz im 1. Technikumsbatch 2012 5 Monate alt. Die Zellbank z3 wurde im April 2014 erstellt und ist bei ihrem 1. Einsatz im Batch 2014.1 2 Monate alt. Die Zellbänke wurden gemeinsam in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Im dargestellten Zeitraum der Tab. 1 von 2011 bis 2015 wurden drei verschiedene Zellbänke mit unterschiedlichem Alter an ihrem Verwendungszeitpunkt eingesetzt. Die Zellbank z1 zeigt von Batch 2011.1 - 2012.1 (Alter Zellbank: 6 - 21 Monate) ausreichend hohe Produktkonzentrationen ($3,8 - 2,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In dem darauffolgenden Batch 2012.2 fällt die Produktkonzentration stark ab, von $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 2012.1 auf $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 2012.2 (OOS bei einem Zellbankalter von 23 Monaten). Anhand der Zellbank z1, die ausschließlich in der Produktion genutzt wurde, ist zu erkennen, dass mit zunehmenden Alter der Zellbank die erreichte Toxinkonzentration sogar bis hin zu OOS Batches sinkt.

Die Technikumszellbank z2 im Alter von 5 - 19 Monaten liefert in Technikums-fermentationen $3,0 - 2,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produkt. Aufgrund dieser guten Ergebnisse wurde die Technikumszellbank z2 in dem Produktionsbatch 2013.1 verwendet. Die Zellbank z2 war zu diesem Zeitpunkt 13 Monate alt und brachte entgegen den Erwartungen ein OOS Ergebnis von $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produkt. Es konnte im Jahr 2013 kein Batch mit Zellbank z1 oder z2 in der Produktion erstellt werden, welcher innerhalb der Spezifikationen lag.

Im Jahr 2014 wurde eine neue Zellbank (z3) für die Produktion erstellt und mit einem Alter zwischen 2 – 7 Monaten erfolgreich in der Produktion eingesetzt ($3,6 - 2,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Mit der vergleichsweise jungen Zellbank z3 wurden ausschließlich erfolgreiche Batches in der Produktion hergestellt.

Die Zellbank z2 brachte bis zu einem Alter von 34 Monaten im Technikum variierende Fermentationsergebnisse ($3,0 - 2,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), während diese Zellbank schon im Alter von 13 Monaten OOS Batches in der Produktion lieferte ($0,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Im Alter zwischen 20 – 25 Monaten brachte die Zellbank z2 bei Technikumsfermentation geringe Toxinkonzentrationen bis hin zu OOS Konzentrationen ($1,9 - 1,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) hervor. Mit der z2 Zellbank im Alter von 27 Monaten wurde jedoch ein sehr gutes Batchergebnis ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) erreicht, welches die höchste beobachtete Produktkonzentration mit dieser Zellbank darstellt.

Es wurde mit der z2 Zellbank bis zu einem Alter von 34 Monaten spezifikationskonforme Batches im Technikum erstellt. Durch das Alternieren zwischen guten und schlechten Batchergebnissen mit der gleichen Zellbank (z2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigt sich, dass das Alter der Zellbank keinen starken negativen Einfluss im hier untersuchten Zeitraum auf die Produktkonzentration hat. Die Betrachtung zeigt, dass für die beobachtete, geringe Toxinkonzentration im Zeitraum 2011-2015 ein oder mehrere andere Faktoren verantwortlich

gewesen sein müssen. Diese weiteren, möglichen Faktoren werden auf ihren Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration untersucht.

4.2.2 Auswirkungen der Inokulationsmenge und Animpfmethode auf die Produktkonzentration

Der in den Fermenter eintretende Stoffstrom des Inokulums ist durch unterschiedliche Eigenschaften charakterisiert, die einen Einfluss auf die Endproduktkonzentration nehmen können. Im Kapitel 4.2.1 wurde der Einfluss des Zellbankalters auf die Produktkonzentration ausgeschlossen. Es konnten spezifikationsgerechte Fermentation im Technikum mit z2 bis zu einem Zellbankalter von 34 Monaten durchgeführt werden. Da das Zellbankalter nicht für die beobachtete Produktkonzentrationsvariabilität verantwortlich gemacht werden konnte, werden weitere Parameter untersucht. Dazu gehört die zur Inokulation des Fermenters verwendete Zellmenge.

Je höher die Startkonzentration von Zellen ist, desto kürzer ist die beobachtete Lag-Phase. Aufgrund des exponentiellen Wachstums wird die stationäre Phase bei höherer Startzellzahl zu einem früheren Zeitpunkt erreicht. Der Organismus beginnt mit der Toxinproduktion im Übergang zur stationären Phase (Artin et al., 2010). Das synthetisierte Toxin ist jedoch zunächst inaktiv und muss durch zelleigene extrazelluläre Proteasen in seine aktive Form umgewandelt werden. Somit ist neben der synthetisierten Menge an Toxin auch die Verweilzeit des Toxins im Fermentationsmedium für die Höhe der Produktkonzentration verantwortlich. Es wird Zeit zur proteolytischen Aktivierung des Toxins benötigt. Die Toxinkonzentration erhöht sich mit Verlängerung der Fermentationszeit. Werden Toxinkonzentrationen nach 72 h Fermentation und 96 h Fermentation gemessen, so ergibt die längere Kultivierung immer höhere Toxinkonzentrationen. Die Fermentationszeit ist allerdings zulassungsbedingt auf 72 h festgelegt und dadurch ist die zu Verfügung stehende Zeit für die Synthese und Aktivierung des Toxins begrenzt.

Eine Fermentation mit geringer Startkonzentration an Zellen braucht mehr Zeit um in die Phase der Toxinsynthese zu gelangen. Somit wird die maximale Konzentration des inaktiven Toxins zu einem späteren Fermentationszeitpunkt im Medium erreicht. Bei Fermentationen mit hoher Animpfkonzentration stellt sich die maximale Konzentration des inaktiven Toxins zu einem früheren Zeitpunkt ein. Dadurch steht mehr Fermentationszeit zur Aktivierung des Toxins für Batche zur Verfügung, die mit einer höheren Zellmenge angeimpft wurden. Aufgrund der konstanten Fermentationszeit kann nur über die zur Inokulation genutzte Zellmenge die Verweilzeit des inaktiven Toxins im Fermentationsmedium beeinflusst werden. Die zur Inokulation genutzte Zellmenge hat somit einen Einfluss auf die Toxinkonzentration. Eine

Variabilität in der Zellmenge des Inokulums kann zu der beobachteten Variabilität in der Produktkonzentration führen.

Eine Variabilität in der Zellmenge des Inokulums wird durch die Animpfmethode verursacht. Die Inokulation der Produktionsbatche erfolgt immer mit 1600 ml IC2 Kultur. Dabei findet die tatsächliche Zellmenge in diesem Volumen keine Beachtung. Sie wird nicht für jeden Batch auf einen konstanten OD-Wert eingestellt. Unter 3.1 Abb. 8 sind die vier Stufen des upstreamings (Vorkulturen) gezeigt, die zur Herstellung des Inokulums (IC2) für den Fermenter durchlaufen werden. Das Upstreaming bis zur IC2 Kultur wird durch die Kultivierungsdauer der einzelnen Vorkulturen gesteuert. Dabei wird jeder einzelne Vorkulturschritt (Preculture→Storage→IC1→IC2) beendet bzw. der darauffolgende Schritt begonnen, wenn die dafür definierte Inkubationszeit (24h) erreicht wird, unabhängig von der, in dieser Zeit erreichten Zellmenge. Dadurch, dass der Fermenter mit einem festen Volumen und Kulturalter eines Inokulums angeimpft wird, anstatt mit einer definierten Zellmenge, wird so durch diesen Stoffstrom eine Variabilität in die Fermentation eingebracht, die zu unterschiedlichen Produktkonzentrationen führt.

Um den Einfluss der Inokulation auf die Toxinkonzentration zu überprüfen, wurde das Fermentationsmedium mit unterschiedlichen Zellmengen beimpft. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Die erste Methode beruht auf dem in der Produktion verwendeten Verfahren, bei dem ein festes Volumen aus einer IC2 Kultur mit definiertem Kulturalter (24 h) in das Fermentationsmedium überimpft (Liquid-Methode) wird. Um die Zellkonzentration zu steigern, muss somit das überimpfte Volumen aus der IC2 Kultur steigen. Bei der zweiten Methode wurden aus der gleichen IC2 Kultur wie für die Liquid-Methode, steigende Volumina entnommen um höhere Zellmengen zu erhalten. Die entnommenen IC2 Volumina wurden jedoch anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltende Biomassepellet daraufhin im Fermentationsmedium resuspendiert. Hierdurch wurde die Fermentation mit identischem Volumen, aber unterschiedlicher Zellzahl angeimpft.

Der Versuch bestand aus der parallelen Inkubation von 30 Reaktionsgefäßen. In diesen Reaktionsgefäßen wurden 15 ml Fermentationsmedium vorgelegt. Es wurde 500 ml Fermentationsmedium hergestellt und auf die Reaktionsgefäße aliquotiert, um den Einfluss inhomogener Mediumzusammensetzung entgegenzuwirken. Die zur Inokulation des aliquotierten Fermentationsmediums verwendete IC2 Vorkultur hatte eine optische Dichte von 4,35. Für jede der zwei Animpfmethoden (Liquid, Pellet) wurden drei Reaktionsansätze mit jeweils einer OD von 0,1; 0,3; 0,6; 1,2; 2,5 inokuliert (15 Reaktionsansätze pro

Animpfmethode). Bei der Liquidmethode muss mehr Volumen an IC2 Vorkultur in die Reaktionsansätze pipettiert werden um die Animpfkonzentration bis auf OD 2,5 zu erhöhen. Bei der Pelletmethode bleibt das Arbeitsvolumen konstant. Dadurch ist die Volumenabweichung zwischen Reaktionsansatz OD 2,5 Pellet und Reaktionsansatz OD 2,5 Liquid maximal 8 % (0,35 – 8 % Volumenabweichung). Diese Volumenabweichung wurde in der Analyse der Ergebnisse durch Betrachtung der absoluten Produktmasse, anstelle der Konzentration berücksichtigt.

In diesem Versuch wurde die Methode des Animpfens verglichen. Der Einfluss der Wachstumsphase in der sich die Inokulums-Kultur befand, wurde vernachlässigt, indem das Inokulum aus einer Vorkultur in der späten exponentiellen Phase verwendet wurde.

Die Abb. 11 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Mit steigender Animpf-OD (Zellmenge) steigt die Toxinkonzentration für beide Animpfmethoden nach 72 h Fermentation. Die erreichte Produktkonzentration ist für die Liquidmethode um den Faktor 1,15 höher als für die Pelletmethode. Die Produktkonzentration bei der Liquidmethode verläuft mit steigender Inokulumsmenge asymptotisch. Dagegen ist ein exponentieller Verlauf für die Pelletmethode zu erkennen.

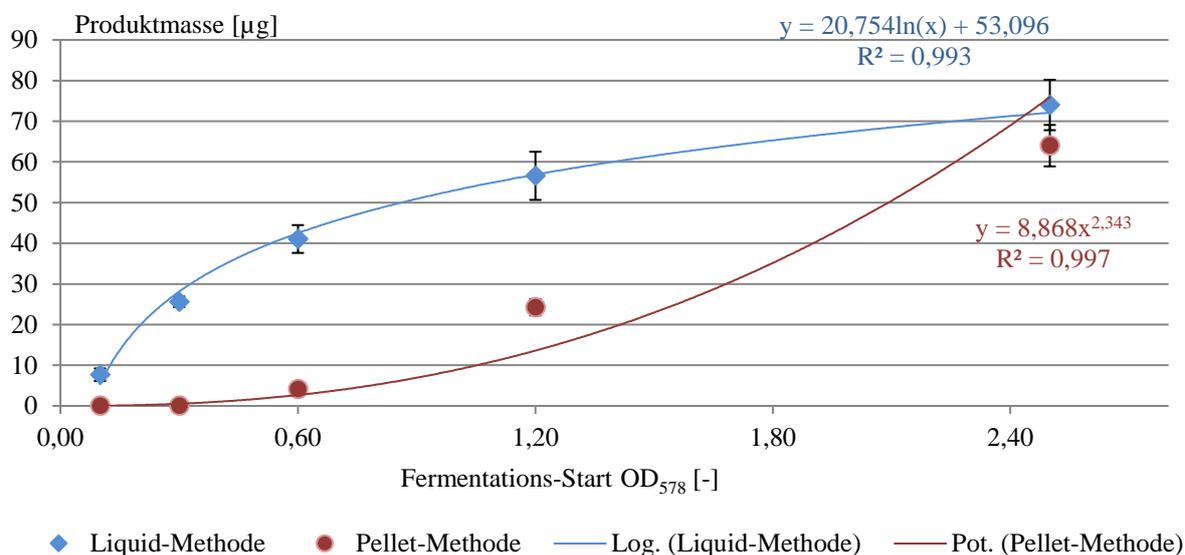


Abb. 11: erreichte Endproduktkonzentrationen nach 72 h Fermentation in Abhängigkeit der gewählten Animpfmethode (Pellet, Liquid) und der verwendeten Zellmasse

Die Ergebnisse aus Abb. 11 zeigen, dass die zur Inokulation verwendete Zellmenge einen signifikanten Einfluss auf die Produktkonzentration hat. Mit steigender Animpf OD (Zellmenge) steigt die Endproduktkonzentration. Dabei werden ab einer Inokulums OD von 0,6 bei der Liquidmethode spezifikationskonforme Endproduktkonzentrationen erreicht. Die

Liquidmethode führt zu höheren Produktmengen als die Pelletmethode. Die Ursache für dieses Verhalten ist in den unterschiedlichen Stressfaktoren, die die Zellen während der Inokulation bei den unterschiedlichen Animpfmethoden ausgesetzt sind, zu finden. Bei der Pelletmethode werden die Zellen durch Zentrifugation sowie durch anschließende Resuspendierung des Zellpellets im Fermentationsmedium stark mechanisch beansprucht (Scherung). Dadurch werden Zellen zerstört. Somit wird das Fermentationsmedium bei der Pelletmethode mit weniger vitalen Zellen angeimpft als bei der Liquidmethode bei gleicher OD Entnahme. Das Animpfen mithilfe der Liquidmethode ist schonender für die Zellen als die Pelletmethode.

Durch die notwendigen Arbeitsschritte bei der Pelletmethode kühlen die Zellen von 37 °C auf ca. 25 °C ab. Die flüssige IC2 Vorkultur muss bei Raumtemperatur (RT) in geeignete Zentrifugengefäße überführt werden. Danach müssen diese Gefäße zur Zentrifuge gebracht werden (RT). Die Zentrifugation mit dem vorhandenen Equipment war bei maximal 25 °C möglich. Der Transfer aus der Zentrifuge zurück an den Standort der Reaktionsgefäße sowie die Dauer des Resuspendierens des Pellets im Fermentationsmedium bei RT führen dazu, dass die Zellen ca. 30 min. lang zu kalt prozessiert werden. Es ist aus der Literatur (Dahlsten, Kirk, Lindström, & Korkeala, 2013) bekannt, dass *C. botulinum* ATCC 3502 sensibel auf niedrige Temperaturen reagiert. So wurde bereits nach Verbleib einer *C. botulinum* Kultur für 1 min. bei 15-18°C eine Kältestressantwort im Transkriptom nachgewiesen. Diese Kältestressantwort kann eine weitere Ursache dafür sein, weshalb die Produktkonzentrationen bei den Fermentationen die mit der Pelletmethode angeimpft wurden, geringer ausfielen als bei der Liquidmethode.

Die Abbildung 11 zeigt für das Animpfen mittels Liquidmethode einen asymptotischen Verlauf für die Zunahme der Produktkonzentration. Dieser Verlauf ist durch das Transferieren eines steigenden Volumens an IC2 Medium bedingt. Damit ein Reaktionsansatz mit mehr Zellen inokuliert werden kann, muss das überführte Volumen von der IC2 Vorkultur in das Fermentationsmedium steigen. Dadurch werden nicht nur mehr Zellen überführt, sondern auch steigende Stoffmengen an Metaboliten die während der Inkubation der IC2 entstanden sind. Die Medienbestandteile im IC2 Medium sind aufgrund des bereits erfolgten Wachstums der Mikroorganismen erschöpft. Somit wird durch die Überführung von steigenden Volumen an IC2 Kultur das Fermentationsmedium mit ‚erschöpftem‘ Medium verdünnt. Gleichzeitig nimmt die Stoffmenge an Wachstum inhibierenden Metaboliten aus der IC2 im Fermentationsmedium zu. Dies geschieht nicht bei der Verwendung der Pelletmethode zur Inokulation. Das erschöpfte IC2 Medium zusammen mit inhibitorischen Metaboliten wird abgetrennt und verworfen. Das Fermentationsvolumen (15 ml) bleibt bei der Pelletmethode konstant, unabhängig wie hoch die

eingebraachte Zellmenge ist. Somit findet die Produktsynthese durch Zellen, eingebracht mit der Pelletmethode ungehindert statt. Dagegen wird bei der Produktsynthese durch Zellen, eingebracht durch die Liquidmethode ein zunehmend stärker werdender inhibitorischer Effekt beobachtet.

Bei einer Fermentation im Produktionsmaßstab wird standardmäßig die Liquidmethode zur Inokulation verwendet. Dazu wird ein immer gleichbleibendes Volumen der IC2 Vorkultur zum Animpfen verwendet. Die Abbildung 12 zeigt, dass die Biomassekonzentration in unterschiedlichen IC2 Vorkulturen variiert. Da stets ein konstantes Volumen zur Inokulation genutzt wird, wird somit von Batch zu Batch eine unterschiedliche Zellmenge inokuliert.

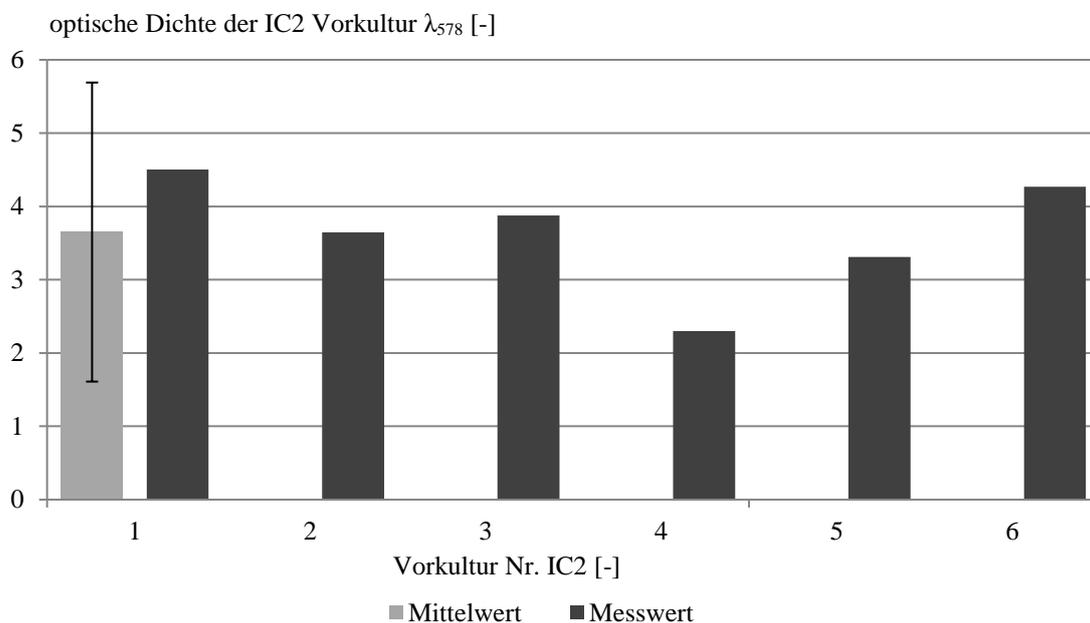


Abb. 12: stichprobenartige Überprüfung der optischen Dichte der IC2 Kultur direkt vor dem Animpfen der Hauptkultur, Mittelwert im 2 seitigen 95% Vertrauensintervall

Wie in Abb. 11 gezeigt, hat die zur Inokulation verwendete Zellmenge einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration. Der in Abb. 12 dargestellte OD Mittelwert von $3,65 \pm 2,02$ zeigt die breite Streuung der zur Inokulation verwendeten Vorkultur. Durch dieses Schwanken der OD-Werte (Zellmenge) der Vorkultur wird bei der Verwendung eines festen Animpfvolumens wie z. B. in der Produktion von 1,6 L der Fermenter mit ca. einer OD zwischen 0,16 – 0,32 abhängig von der erreichten Vorkultur OD angeimpft. Dadurch kann wie in Abb. 11 gezeigt, die Produktkonzentration um ca. den Faktor 2,5 schwanken. Durch unterschiedlich hohe IC2 ODs - eingebrachten Zellmenge in die Fermentation kann es zur beobachteten Variabilität in der Produktkonzentration kommen.

Die hohe Standardabweichung (OD-Variabilität) in Abb. 12 lässt sich durch die Einflüsse der Stoffströme des Inokulums und des Fermentationsmediums erklären. Diese Einflussfaktoren wirken nicht nur auf die 20 L (bzw. 5 L) Batche sondern auch auf das Upstreaming der Vorkulturen, da das Upstreaming aus Batchen kleineren Volums besteht. Die der IC2 Vorkultur vorausgehende IC1 Vorkultur wies ebenfalls schwankende ODs auf (stichprobenartige Überprüfung). Da beim Animpfen der IC2 mit IC1 Vorkultur wieder ein festes Volumen anstelle einer spezifischen Biomassekonzentration verwendet wird, lassen sich dadurch die IC2 OD Schwankungen erklären. Somit zieht sich eine unterschiedliche Animpfkonzentration (auch Mitschleppen von Inhibitoren und Verdünnen des Kultivierungsmediums mit verbrauchtem Vorkulturmedium) subsequent durch alle Stufen des Upstreamings.

Die Überprüfung der Gültigkeit der im 15 ml Maßstab beobachteten Ergebnisse: Einfluss der absoluten Animpfzellmenge, OD Variabilität der IC2 Vorkultur sowie die Animpfmethode als Verursacher für die Produktkonzentrationsvariabilität, erfolgte im 5 L Maßstab. Dazu wurden zwei Versuchsreihen mit je vier Fermentern durchgeführt. Eine Versuchsreihe bestand darin, eine IC2 Vorkultur herzustellen und mit dieser zwei Fermenter mit der Liquidmethode und zwei Fermenter mit der Pelletmethode anzuimpfen. Dabei wurde bei der Liquidmethode standardgerecht das Fermentationsmedium mit einem festen Volumen aus der 24 h inkubierten IC2 Kultur angeimpft. Bei der Pelletmethode wurde das IC2 Medium durch Zentrifugation abgetrennt und ausschließlich das Biomassepellet in konstanter Menge im Fermentationsmedium resuspendiert.

Die Abbildung 13 zeigt den Mittelwert mit der Standardabweichung der Produktkonzentration nach 72 h Fermentation für die zwei unterschiedlichen Animpfmethoden. Die Produktkonzentration in Fermentationsmedien welche mit der Pelletmethode angeimpft wurden, liegt um den Faktor 1,9 höher als bei Fermentationsmedien die mit der Liquidmethode angeimpft wurden ($2,2 \pm 0,27$ vs. $4,2 \pm 0,08 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Toxinkonzentrationen die mit der Pelletmethode erreicht wurden, zeigen weiterhin eine Reduzierung der Streuung um den Faktor 3,6 gegenüber der Liquidmethode.

Die OD der IC2 bei der 1. Versuchsreihe lag bei 3,46, bei der 2. Versuchsreihe lag sie bei 4,21. So wurde durch die Liquidmethode das Fermentationsmedium mit einer OD von 0,28 (Versuchsreihe 1) bzw. 0,34 (Versuchsreihe 2) angeimpft. Bei der Pellet-Animpfmethode wurde das Medium stets mit einer OD von 0,31 angeimpft. Die Toxinkonzentration für die Liquidmethode bei einer Animpf OD von ca. 0,3 zeigt im 15 ml (Abb. 11) wie auch im 5 L

Maßstab eine vergleichbare Höhe (1,8 vs. 2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die erreichte Toxinkonzentration bei der Verwendung der Pelletmethode ist im 5 L Maßstab um den Faktor 21 höher als im 15 ml Maßstab (Abb. 11).

Der im 15 ml Maßstab beobachtete Effekt der geringen Toxinkonzentration für die Pelletmethode stellt sich nicht im 5 L Maßstab ein. Die extreme Steigerung (Faktor 21) der Produktkonzentration durch die Pelletmethode zwischen 15 ml und 5 L Ansätzen bei gleicher inokulierter optischer Dichte (OD 0,3) hat physikochemische Ursachen. Der Effekt wird dem größeren verwendeten IC2 Volumen sowie der höheren Gesamtzellmenge in diesem Inokulum im 5 L Maßstab zugeschrieben.

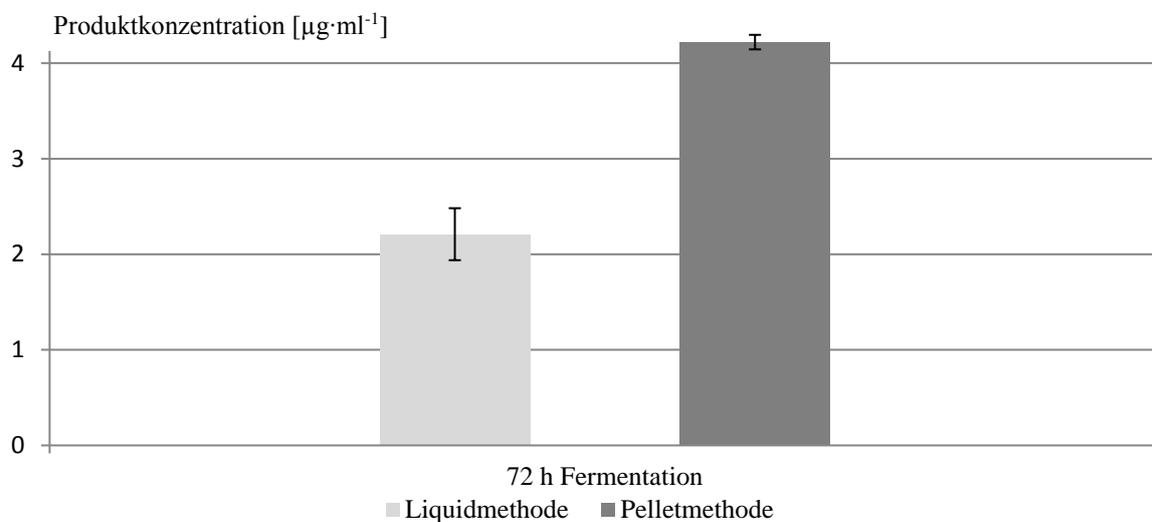


Abb. 13: Produktkonzentration nach 72h Fermentation im Fermenterüberstand in Abhängigkeit der verwendeten Inokulationsmethode (Liquid, Pellet).

Um im 15 ml Maßstab die Fermentation mit einer OD von 0,3 anzupflanzen, wird in Abhängigkeit der IC2 Vorkultur OD ca. 1 ml Medium prozessiert (Transport, Zentrifugation usw.). Im 5 L Maßstab werden dagegen ca. 400 ml prozessiert. Das größere IC2 Volumen (400 ml) besitzt einen höheren Wärmeinhalt ($Q=\rho\cdot V\cdot c_p$). Dadurch kühlt bei einer gleichbleibenden Prozessierungszeit von ca. 30 min bei RT das Inokulum nicht so stark ab wie im 15 ml Maßstab. Der im 15 ml Maßstab beobachtete Kältestress relativiert sich.

Weiterhin ist die Zellmenge des Pellets nach der Zentrifugation von 1 ml IC2 Kultur wesentlich geringer als bei 400 ml IC2 Medium. *Clostridium botulinum* ist ein anaerober Organismus und Sauerstoff ist für ihn toxisch. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgekippt und frisches Medium in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Dabei ist das Pellet eine kurze Zeit dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Das Zellpellet ist durch den Stand-Winkel der Zentrifugationsgefäße im Rotor eher ein Streifen entlang des Röhrchens als ein rundes, kompaktes Pellet. Somit ist das Verhältnis von Gesamtzellen zu Zellen im obersten Layer des Pellets die mit Luftsauerstoff in Berührung kommen bei geringen zentrifugierten Volumina höher als bei größeren

zentrifugierten Volumina. Dadurch erfährt das zentrifugierte Inokulum im 15 ml Maßstab einen stärkeren Sauerstoff bedingten Stress als das Inokulum im 5 L Maßstab. Im Inokulum des 5 L Maßstabs werden verhältnismäßig zur Gesamtzellmenge weniger Zellen durch Sauerstoff geschädigt als im 15 ml Maßstab. Die in das Fermentationsmedium relative eingebrachte vitale Zellmenge im 5 L Maßstab ist somit höher als im 15 ml Maßstab. Durch die Verringerung der Stressbelastung bei der Prozessierung der Zellen im 5 L Maßstab, wird dadurch eine höhere Produktkonzentration als beim gleichen Versuch im 15 ml Maßstab erreicht.

Bei einer Animpf OD von ca. 0,3 wird im 15 ml wie auch im 5 L Maßstab mit der Liquid Methode die gleiche Produktkonzentration (ca. $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) erreicht. Dahingegen zeigt sich bei einer identischen Animpfkonzentration (OD 0,3) bei der Pelletmethode eine Verdopplung der Toxinkonzentration im 5 L Maßstab verglichen mit der Liquidmethode im 5 L Maßstab. Der Unterschied beider Animpf-Methoden liegt vereinfacht in der Gegebenheit, dass die Liquidmethode Metabolite aus der IC2 mitschleppt und dadurch das Fermentationsmedium durch verbrauchtes IC2 Medium verdünnt wird. Die Liquidmethode zeigt im 5 L Maßstab deutlich den im 15 ml Maßstab beschriebenen Effekt der Inhibierung durch das mitgeschleppte IC2 Medium. Durch die Verwendung der Pelletmethode konnte die Produktkonzentration im 5 L Maßstab gesteigert werden.

Die Reduzierung der Variabilität (Streuung) der Endproduktkonzentration bei der Pelletmethode in Abb. 13 ist durch die konstante Animpfzellmenge bedingt. In diesem Versuch wick die optische Dichte der beiden IC2 Vorkulturen nur um 17,8 % voneinander ab. Diese geringe OD Variabilität in der IC2 Vorkultur resultierte in einer um den Faktor 3,6 höheren Variabilität der Endproduktkonzentration. Die Abb. 12 zeigt, dass OD Streuungen der IC2 Kultur von bis zu 80 % beobachtet wurden. Somit wird deutlich, dass die Endproduktvariabilität zwischen verschiedenen Batches durch diese OD Variabilität in der Vorkultur mitbedingt wird.

Die Pelletmethode zum Animpfen des Fermentationsmediums in der Produktion erscheint als ungeeignet. Es wird verglichen mit der Liquidmethode viel Zeit für die Prozessierung des Inokulums benötigt. Zudem erhöhte sich die Gefahr von Kontaminationen durch die unterschiedlichen Arbeitsschritte. Sollten jedoch die in der Produktion erreichten Toxinkonzentrationen kontinuierlich auf OOS Niveau verbleiben, ist eine Abtrennung des verbrauchten IC2 Mediums zu empfehlen, um die Produktkonzentration zu steigern. Das Animpfen des Fermentationsmediums sollte jedoch immer mit einer gleichbleibenden Zellmenge (Parameter: optische Dichte) erfolgen. Dadurch wird die Variabilität der Produktkonzentration zwischen den Batches reduziert. Es wäre prinzipiell möglich entweder

mehrere IC2 Kulturen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten anzupflanzen oder die IC2 Inkubationszeit variabel (20 - 36 h) zu gestalten. In beiden Fällen wird dadurch erreicht, dass mit der Liquidmethode immer konstante Zellmengen und eine entsprechende Zellhöhe zur Inokulation des Fermentationsmediums bereitstehen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit steigender Animpfkonzentration die Produktkonzentration steigt. Außerdem liefert die Pelletmethode im 5 L Maßstab eine höhere Endproduktkonzentration als die Liquidmethode. Die beobachtete Produktvariabilität kann der Variabilität der optischen Dichte der IC2 Kultur zugeschrieben werden. Somit sind die zur Inokulation verwendete Zellmenge und die Methode des Animpfens signifikante Prozessparameter (CPP, critical process parameter) im Sinne von QbD.

4.2.3 Auswirkung der Wachstumsphase des Inokulums auf die Produktkonzentration

Unter 4.2.1 und 4.2.2 wurde gezeigt, dass nicht das Zellbankalter, sondern andere Eigenschaften der zur Inokulation genutzten IC2 Vorkultur (Inokulationsmenge und Animpfmethode) einen wesentlichen Einfluss auf die Produktkonzentration ausüben. Neben der Zellmenge, wie in 4.2.2 gezeigt, könnte auch die Wachstumsphase der Vorkultur ein weiterer Einflussparameter auf die Produktkonzentration sein. Die Zellmenge (OD Höhe) korreliert mit der Wachstumsphase. Im Abschnitt 4.2.2 wurde der Wachstumsphaseneinfluss der Vorkultur auf die Produktkonzentration vernachlässigt, da das Inokulum aus der gleichen IC2 Kulturphase stammt. Hier wird nun der Einfluss der IC2 Wachstumsphase auf die Toxinkonzentration überprüft. Die Abb. 12 zeigt, dass die IC2 Vorkultur bei der Inokulation eine OD von 2,5 – 4,5 aufweisen kann. Somit wird eine Fermentation nicht nur mit einer unterschiedlichen Zellmenge angeimpft (bei konstant bleibenden Inokulum-Volumen) sondern auch mit Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen der IC2. Die Abb. 14 zeigt, dass eine OD von 2,5 in der Mitte der exponentiellen Phase und eine OD von 4,5 in der späten exponentiellen Phase bzw. im Übergang zur stationären Phase liegt. Diese Übergangsphase wird in der Literatur als die Phase beschrieben, in der die Toxinproduktion induziert ist.

Zur Überprüfung des Einflusses der Wachstumsphase aus der das Inokulum stammt, auf die Endproduktkonzentration wurde eine Versuchsreihe mit 40 Fermentationen im 15 mL Maßstab durchgeführt. Hiervon wurden 20 Reaktionsgefäße mit einer optischen Dichte OD_{578} von 0,31 aus einer IC2 Vorkultur angeimpft, welche eine OD von 4,63 hatte (Gruppe A). Die anderen 20 Reaktionsgefäße wurden mit einer OD von 0,31 aus einer IC2 Vorkultur angeimpft, die eine

OD von 2,78 hatte (Gruppe B). Die beiden Gruppen unterscheiden sich somit nicht in der Zellmenge, jedoch in der Wachstumsphase der Vorkultur. Die Abbildung 14 zeigt, dass Gruppe A mit dem Inokulum aus der späteren exponentiellen Phase und Gruppe B mit dem Inokulum aus der Mitte der exponentiellen Phase angeimpft wurde. Nach 72 h Inkubation wurde die Produktkonzentration bestimmt.

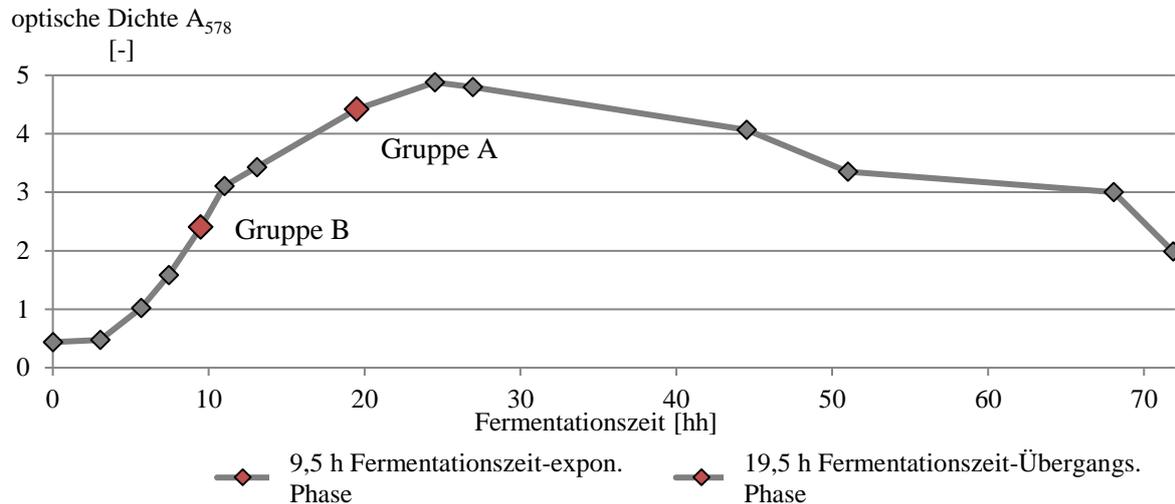


Abb. 14: Verlauf der optischen Dichte bei einer Fermentation

Die statistischen Kenngrößen der Produktkonzentrationen für die einzelnen Gruppen A und B sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Gruppe A_{Roh} , die mit einer IC2 Vorkultur aus der späten exponentiellen Phase angeimpft wurde, zeigt mit $3,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ eine um 55% höhere Produktkonzentration als Gruppe B_{Roh} mit $2,08 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (IC2 aus der Mitte der exponentiellen Phase). Da das verwendete Fermentationsmedium, die Animpfkonzentration, die Zellbank sowie die Animpfmethode identisch zwischen den Gruppen waren, wird die gesteigerte Produktkonzentration der Gruppe A der Wachstumsphase aus der das Inokulum stammt, zugeschrieben. Somit bringt ein Inokulum, welches aus der späten exponentiellen Phase stammt, höhere Produktkonzentrationen als Inokula aus den früheren Wachstumsphasen.

Wie unter 4.2.2 beschrieben, hat die Zellmenge die zur Inokulation verwendet wird, einen signifikanten Einfluss auf die Produktkonzentration. Dabei zeigen verringerte Inokulationsmengen auch verringerte Produktkonzentrationen. Die geringen Inokulationsmengen kommen bei der Verwendung der Liquidmethode dann vor, wenn die IC2 Kultur selbst eine geringe OD hat. Eine geringere OD der Vorkultur geht mit einer anderen Wachstumsphase einher. Somit kombinieren sich die beiden negativen Effekte, der geringeren

Zellmenge und der ungünstigeren Wachstumsphase und führen zu einer Verringerung der Produktkonzentration.

Tab. 2: statistische Parameter der Toxinkonzentration der Gruppe A und B

statistisches Moment	Gruppe A _{Roh}	Gruppe B _{Roh}	Gruppe A _{Out}	Gruppe B _{Out}
Mittelwert	3,24 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2,08 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2,74 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,78 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Median	2,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2,7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Standardabweichung	0,94 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,69 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,23 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Schiefe	1,22	2,03	-0,03	-0,6
Wölbung	0,25	5,02	-0,80	-0,34
Normalverteilung	nein	nein	ja	ja

Die Ursache für die höhere Produktkonzentration, die mit Inokula aus späten Wachstumsphasen erreicht wird, wird im metabolischen Zustand der Mikroorganismen gesehen. Wenn Kulturen aus späten Wachstumsphasen zur Inokulation genutzt werden, ist die Toxinproduktion bereits induziert. Es befinden sich im Vergleich zu Inokula aus frühen Wachstumsphasen mehr induzierte, Produkt bildende Zellen im Inokulum. Somit beginnt ab dem Inokulieren des Fermentationsmediums bereits die Synthese des Produkts. Dieses Verhalten wird durch die beobachtete proportionale Zunahme der extrazellulären Produktkonzentration bestätigt (Kap. 4.2.4, Abb. 19). Beim Animpfen mit Zellen aus der Mitte der exponentiellen Phase startet die Produktsynthese, wie in der Literatur (Artin et al., 2010) beschrieben, erst beim Übergang der Kultur in die stationäre Phase. Eine Zellpopulation welche aus der späten exponentiellen Phase stammt, muss nicht erst die toxin- produzierende Phase erreichen, bevor die Toxinexpression induziert wird. Somit steht dieser Kultur mehr Zeit zur Synthese und Prozessierung des Toxins zur Verfügung und liefert dadurch höhere Produktkonzentrationen. Die Wachstumsphase aus der das Inokulum stammt, ist ein kritischer Prozessparameter im Sinne von QbD (CPP, critical process parameter)

Die entscheidenden Einflussfaktoren zur Verringerung der Produktkonzentrationsvariabilität und Erhöhung der Toxinkonzentration nach 72 h Fermentation finden sich somit zu Beginn der Fermentation (in den Fermenter eingebrachten Stoffstrom des Inokulums). Zur Minimierung der Konzentrationsvariabilität sollte die Inokulation des Fermentationsmediums mit einer festen, gleichbleibenden optischen Dichte erfolgen. Weiterhin sollte die zur Inokulation verwendete Vorkultur (IC2) eine optische Dichte von $>3,5$ aufweisen. Ein IC2 OD Wert von $>3,5$ stellt sicher, dass sich genügend Zellen aus der IC2 in der produktiven späten

exponentiellen Phase befinden. Die Animpfmethode (Liquid oder Pellet) wird zusätzlich für die beobachtete Streuung sowie die absolute Höhe der Produktkonzentration mit verantwortlich gemacht (Überschleppen von verbrauchtem Medium). Jedoch ist die Pelletmethode aufgrund des Aufwands und der Kontaminationsgefahr durch die Handhabung für GMP-Batche eher ungeeignet.

Die hohe Versuchsanzahl bei der Untersuchung der Wachstumsphase erlaubt eine statistische Bewertung der Ergebnisse. Die Tabelle 2 zeigt, dass die Rohdaten (Gruppe A_{Roh} , Gruppe B_{Roh}) dieser Versuchsreihen nicht normalverteilt sind. Normalverteilte Daten (symmetrische Streuung um den Mittelwert) würden eine Schiefe nahe 0 aufweisen. Die statistischen Momente für die Schiefe und Wölbung der Rohdaten in diesen Versuchsreihen weichen von denen einer Normalverteilung ab. Die positive Schiefe der Gruppen A_{Roh} und B_{Roh} ergeben eine rechtsschiefe Verteilung. Bei rechtsschiefen Verteilungen kommen Werte, die kleiner als der Mittelwert sind, sehr häufig vor. Weiterhin treten extreme Werte, die wesentlich größer als der Mittelwert sind, sehr selten auf. Das Maß für eine gleichmäßige Streuung um den Mittelwert ist die Wölbung. Die Wölbung in Gruppe B_{Roh} ist wesentlich höher als in Gruppe A_{Roh} . Die Gruppe B_{Roh} zeigt dadurch eine wesentlich stärkere ungleichmäßige Streuung der Toxinkonzentration als Gruppe A_{Roh} . Die Untersuchung der getrennten Stichproben (Gruppe A_{Roh} gegen Gruppe B_{Roh}) auf Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests bestätigte für beide Gruppen eine Nicht-Normalverteilung.

Durch Ausreißerelementierung mithilfe des Grubbs Test (extreme studentized deviate test) wird eine Normalverteilung der Daten (Gruppe A_{Out} , Gruppe B_{Out}) erreicht. Durch Eliminierung von Extremwerten durch den Grubbs Test wird die beobachtete rechtsschiefe Verteilung normalverteilt gemacht. Der Grubbs Test entfernte die höchsten erreichten Toxinkonzentrationen im Bereich von 5,4 - 4,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Reaktionsgefäß 4, 5, 15, 17, 19 für Gruppe A und 2, 6, 20 für Gruppe B). Die normalverteilten Daten lassen den gleichen Schluss wie die nicht-normalverteilten Daten zu. Der Mittelwert der Produktkonzentration der Reaktionsansätze, die mit einem Inokulum aus der späten exponentiellen Phase angeimpft wurden, ist höher (+ 54%) als bei Reaktionsansätzen, beimpft mit Inokulum aus früheren Wachstumsphasen.

Eine Nicht-Normalverteilung kann einen Hinweis auf einen methodischen Fehler geben. Das Inokulum für eine Gruppe (A/B) stammt jeweils aus einer IC2 Vorkultur. Das Fermentationsmedium für die Reaktionsansätze in den Gruppen wurde durch Aliquotieren einer

Stammlösung bereitgestellt. Dadurch wurde die Variabilität, die durch die Versuchsdurchführung (ggf. methodischer Fehler) entsteht, minimiert.

Die Säulendiagramme in Abb. 15 a (Gruppe A), b (Gruppe B) zeigen die Toxinkonzentrationen in den Reaktionsansätzen in ihrer räumlichen Anordnung bei der Versuchsdurchführung (Inokulation, Inkubation, Probenentnahme). Die Punktwolke in Abb. 15 c (Gruppe A), d (Gruppe B) zeigt die Toxinkonzentration der Reaktionsansätze aufgetragen über die Reihenfolge ihrer Bearbeitung. Der Ansatz Nr. 1 wurde als erster angeimpft und als erster beprobt, Ansatz 20 als letzter. Dabei zeigt sich in der Gruppe A und B, dass die Ansätze, die hohe Toxinkonzentrationen aufweisen, keinem distinkten Muster (Trend) folgen. Aufgrund dessen kann ein systematischer Fehler bis zur Probennahme ausgeschlossen werden. Die beobachtete Streuung und dadurch bedingte Nicht-Normalverteilung der Rohdaten kann nur durch die anschließende Toxinanalytik bedingt sein. Die Analytik wird in einem externen Labor durchgeführt. Dazu müssen die Proben versendet werden. Die Priorität der Analytik liegt auf Proben die aus der Produktion von GMP Fermentationen stammen. Sind GMP Proben zu analysieren, geschieht dies bevor Technikumsproben analysiert werden. Je nach Auslastung des Labors dauerte eine Analytik teilweise länger als 4 Wochen. Die bei einigen Versuchen im Technikum entstandene Probenmenge (bis zu 40 Stück) werden an unterschiedlichen Tagen gemessen. Wie oft und wie lange dabei Proben bei Raumtemperatur stehen oder andere Parameter Einfluss auf die Messung nehmen können, ist nicht bekannt.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete breite Streuung der Toxinkonzentrationen bzw. die Abweichung von einer Verteilungsform durch die Analytik beeinflusst worden ist, wurden Blindtests durchgeführt. Bei diesem Test wurden aus einem Reaktionsgefäß fünf Proben genommen. Der ELISA-Assay ergab für diese Proben einen normalverteilten Mittelwert von $1,72 \pm 0,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dabei lagen die min/max Werte zwischen $1,5\text{-}2,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Anzahl von fünf Proben reicht nicht aus, um den Effekt der Streuung durch verzögerte Messung zu bestätigen. Es zeigt sich jedoch, dass die Analytik eine hohe Standardabweichung liefert. Die ELISA Messung selbst ist aufgrund der erfolgreichen Methodvalidierung nicht für die breite Streuung ($\pm 40\%$ vom Mittelwert) verantwortlich. Die Ursache der Streuung wird in dem Probentransport und –vorbereitung, bzw. –lagerung vermutet. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Produktkonzentration ändert, wenn einzelne Probengefäße wärmer gelagert werden als andere. Die in den Proben enthaltenen Proteasen aktivieren vorhandenes noch inaktives Toxin, können jedoch auch aktives Toxin hydrolisieren. Nur die aktive Form des Toxins wird bei der von Merz etablierten Analytik bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine intensivere Betrachtung dieser Fehlerquelle nicht möglich. Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe von Proteaseinhibitoren zu einer Verringerung der Mittelwertstreuung in den Proben führt und die ELISA-Messung nicht stört.

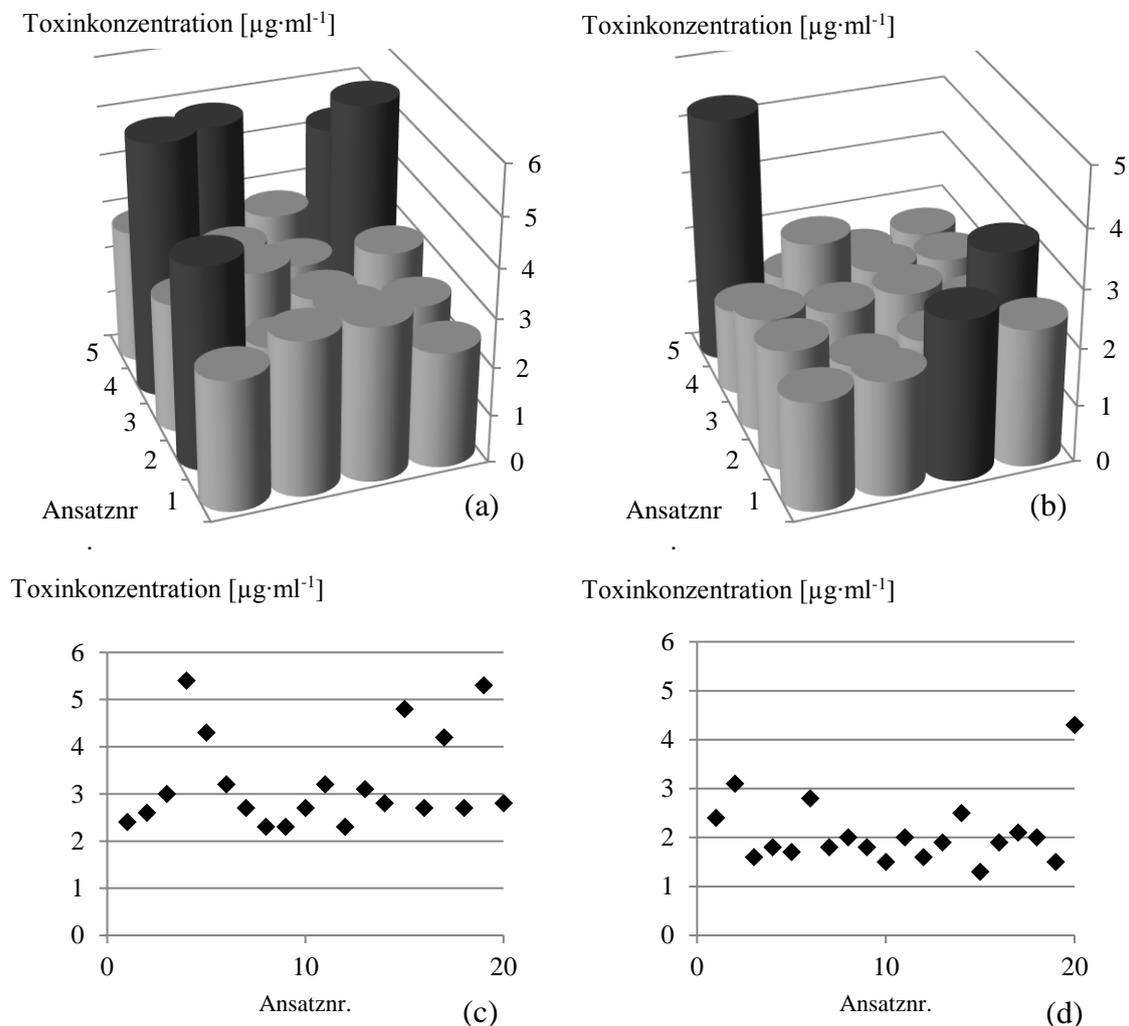


Abb. 15: grafische Darstellung der erreichten Produktkonzentrationen für die Gruppen A_{Roh} in Abhängigkeit der räumlichen Anordnung bei der Bearbeitung der Versuchsansätze (a), in Abhängigkeit der Bearbeitungsreihfolge (c) sowie für die Gruppe B_{Roh} (b, d)

Es wurde gezeigt, dass die Phase aus der die Zellen zur Inokulation des Fermentationsmediums stammen, einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration ausübt. Somit ist die hohe beobachtete Toxin-Konzentrationsvariabilität von Prozessbedingungen abhängig. Die Prozessbedingungen entscheiden darüber, wie sich die Qualität des Inokulums (OD Höhe, Wachstumsphase) ausprägt. Durch die Diskussion der Ergebnisse wurde ein mögliches Vorgehen zur Reduzierung der Produktkonzentrations-variabilität gezeigt. Die IC2 Vorkultur sollte eine OD zwischen 3,5 – 4,5 aufweisen. Somit ist gewährleistet, dass das Inokulum aus

einer für die Produktkonzentrations-Höhe günstigen Wachstumsphase stammt. Weiterhin ist die bei dieser OD übertragene Zellmasse in den Fermenter ausreichend hoch, um die Herstellung spezifikationskonformer Batche zu gewährleisten. Durch die Eingrenzung der zulässigen IC2 Vorkultur OD wird eine mögliche Streuung aufgrund von unterschiedlichen Zellmengen im Inokulum verringert.

Da das Standard-Animpfverfahren jedoch vor dem Jahr 2012 nicht so viele OOS Batche erzeugt hat, müssen noch weitere Faktoren auf die Höhe der Produktkonzentration wirken. Es wurden Testfermentationen unter Anwendung der hier gezeigten Erkenntnisse im 5 L Maßstab durchgeführt

4.3 Standardisierte Batchfermentation

Mit den gewonnenen Erkenntnissen aus 4.2.1 – 4.2.3: gleiche Animpf OD (0,31) aus später exponentieller Kulturphase der IC2 Vorkultur (OD 4,5) und dem Animpfen mittels Pelletmethode, ist hier eine exemplarische Fermentation im 5 L Maßstab dargestellt. Ziel war es, das Zusammenspiel aller bisher identifizierten Einflussparameter auf die Höhe der Produktkonzentration zu beobachten.

Bei dieser Versuchsreihe hatten beide Fermenter die gleiche Medienzusammensetzung – nämlich Charge und Konzentration der eingesetzten Rohstoffe- und wurden aus derselben IC2 Vorkultur angeimpft. Die Produktkonzentration für den Fermenter der mit der Pelletmethode angeimpft wurde, war $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Der mit der Liquidmethode angeimpfte Fermenter erreichte eine Toxinkonzentration von $2,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Abb. 16 zeigt den typischen zeitlichen Verlauf der optischen Dichte sowie der Temperatur, pH-Wert und Toxinkonzentration für den Fermenter der mit der Pellet Methode (rot) und der Liquid Methode (blau) angeimpft wurde. Es ist zu erkennen, dass der pH-Wert in den ersten 10 h für beide Fermentationen von ca. 6,5 auf 5,5 fällt und danach unverändert bleibt. Das Sinken des pH-Werts kann auf die Exkretion von sauren Stoffwechselmetaboliten, besonders organische Säuren wie Acetat, Pyruvat usw. zurückgeführt werden, bzw. auf den Verbrauch von basischen Medienkomponenten. Der Verlauf der optischen Dichte ist charakteristisch für den Organismus und das verwendete Fermentationsmedium auf dem dieser wächst. Es zeigt sich ein Wachstum ohne erkennbare lag Phase. Nach ca. 10 h Fermentation verringert sich die anfängliche Wachstumsrate μ von $0,25 \text{ h}^{-1}$ auf nur noch $0,04 \text{ h}^{-1}$. Die Reduzierung der Wachstumsrate (siehe Pfeil) deutet auf eine erschöpfte Nährstoffquelle hin. Der Organismus muss ähnlich einem diauxischen Wachstums, auf andere, weniger effiziente Medienbestandteile als Nährstoffquelle ausweichen und kann dadurch nicht die ursprüngliche Wachstumsrate beibehalten.

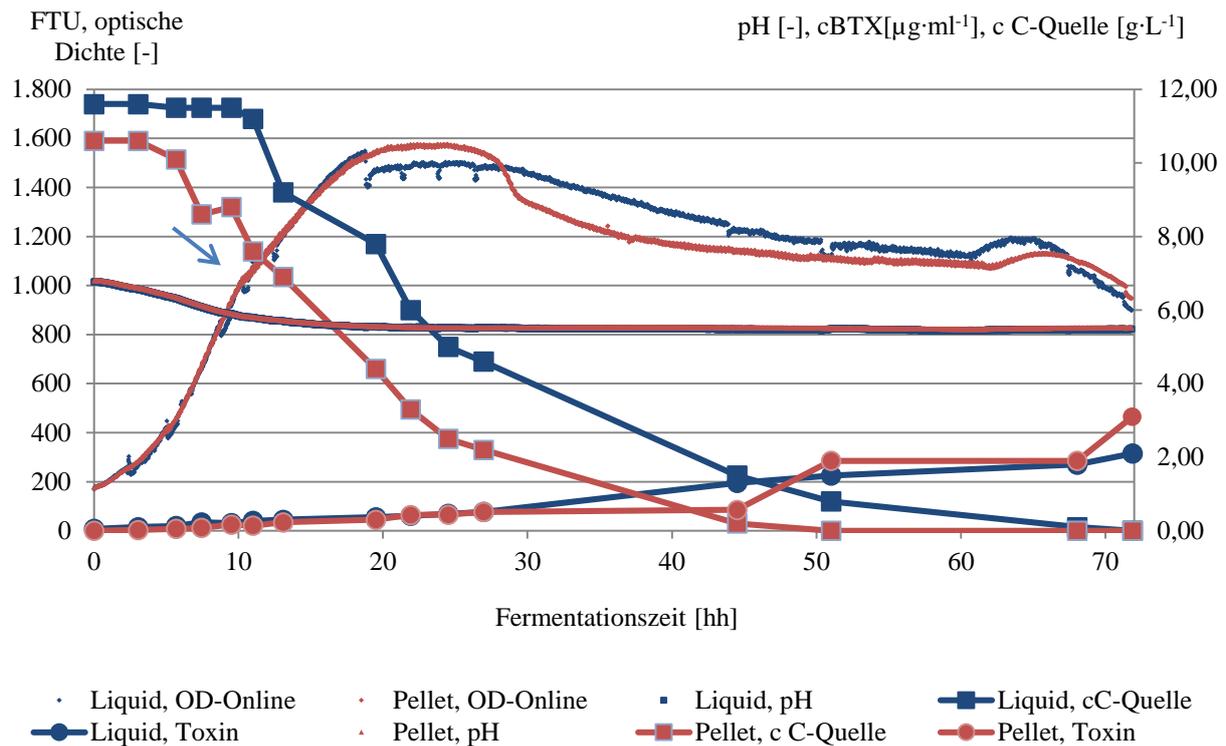


Abb. 16: charakteristischer Verlauf einer Batchkultivierung im Technikum, optische Dichte in FTU-Formazin turbidity units

Ein diauxisches Wachstum, die Beobachtung der Verringerung der Wachstumsrate aufgrund eines limitierten Nährstoffs im Fermentationsmedium, würde zwischen unterschiedlichen Batches zu unterschiedlich hohen optischen Dichten erfolgen, da die Rohstoffchargen des Fermentationsmediums sich teilweise in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Untersuchungsergebnisse des Rohstoff-Herstellers). Da jedoch die Verringerung der Wachstumsrate, also ein Abknicken der OD Kurve bei jedem Batch zur gleichen optischen Dichte von 1000 FTU, beobachtet wird (unterschiedliches Fermentationsmedium, Daten nicht gezeigt), ist die Verringerung der Wachstumsrate nicht durch Diauxie zu erklären. Das geringer werdende Wachstum wird vielmehr mit der beginnenden intrazellulären Toxinsynthese in Verbindung gebracht. Wie unter den theoretischen Vorbetrachtungen beschrieben, synthetisiert *C. botulinum* sein Toxin in der späten exponentiellen Phase mit Übergang in die stationäre Phase. Das Absinken der Wachstumsrate zeigt u. U. den Eintritt in diese Synthesephase.

Zunächst wächst der Organismus bis zu einer Zelldichte, die vermutlich als Auslösesignal (Quorum sensing) für die Toxinsynthese dient (siehe 2.3.1, 2.4.1). Die beginnende Toxinsynthese ist für die Zelle mit hohen Kosten an Energie und Precursor verbunden. Der Energiebedarf in Form von ATP, wird am effektivsten bei der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten im EMP-Weg (Glykolyse) gedeckt. Der Anstieg der extrazellulär gemessenen Toxinkonzentration ist nicht unmittelbar bemerkbar, sondern verzögert sich bis in die stationäre

Phase. Es dauert eine gewisse Zeit, bis das inaktive Toxin in detektierbaren Mengen durch die extrazellulären Proteasen in die aktive Form prozessiert wird (M. L. Dekleva & Dasgupta, 1990). Nur diese Form ist durch den bei Merz etablierten ELISA Assay detektierbar.

Ab ca. 20 h gehen die Zellen in die stationäre Phase über, obwohl noch 75 % der C-Quelle vorhanden sind. Es ist aus Abb.16 zu erkennen, dass ab ca. 28 h die OD absinkt. Es erfolgt eine erste Zelllyse. Ab diesem Punkt wird eine Zunahme der extrazellulären Produktkonzentration beobachtet.

Die C-Quelle ist erst nach ca. 51 h verbraucht. Der Verbrauch der C-Quelle führt nicht zu einer verstärkten Lyse, sondern es ist ab 60 h eine kurze Phase des kryptischen Wachstums zu erkennen. Das kryptische Wachstum ist dadurch beschrieben, dass Zellen lysieren und die dadurch in das Fermentationsmedium abgegebenen intrazellulären Bestandteile der lysierten Zellen als Nährstoffe für die vitalen Zellen dienen. Dies führt zu einer erhöhten Zellteilung. So ist ab ca. 60 h Fermentationszeit ein geringer Anstieg in der optischen Dichte zu erkennen.

Weiterhin erkennt man aus Abb. 16, dass die C-Quellenkonzentration im Fermentationsmedium, welches mit der Liquid Methode angeimpft wurde, höher ist als beim Medium inokuliert mit der Pellet Methode. Da die IC2 Vorkultur nur ca. 24 h inkubiert wird, ist in dieser noch ein Restgehalt an C-Quellen vorhanden. Durch die Übertragung eines definierten Volumens in das Fermentationsmedium zur Inokulation des Fermenters, wird auch ein Anteil dieser C-Quelle mit übertragen. Aus diesem Grund ist die C-Quellen-Startkonzentration bei Fermentationen, die mit der Liquidmethode inokuliert werden, höher als bei der Pellet Inokulations-Methode.

Durch die Verwendung der Pellet-Methode zum Inokulieren von Fermentationsmedien aus Vorkulturen in der späten exponentiellen Phase konnte die Produktkonzentration gegenüber der Liquidmethode gesteigert werden. Dies ist dadurch bedingt, dass kein IC2 Vorkulturmedium ins Fermentationsmedium eingebracht wird. Das Fermentationsmedium wird nicht durch verbrauchtes IC2 Medium verdünnt. Es werden auch keine u. U. inhibitorischen Metabolite aus der IC2 Vorkultur mitgeschleppt.

Die Abb. 17 zeigt eine Fermentation, bei der, im Gegensatz zu der Fermentation in Abb. 16 nur 1/10 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) der C-Quellenkonzentration verwendet wurde. Die Erschöpfung der C-Quelle fällt auf den Zeitpunkt, bei dem für gewöhnlich die Verringerung der Wachstumsrate beobachtet wird (ca. 1000 FTU). Die Zellen gehen direkt in die stationäre Phase über, ohne eine späte exponentielle Phase zu durchlaufen. Die Produktkonzentration ist mit $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bei dem Versuch mit der reduzierten Konzentration an C-Quelle um ca. den Faktor 2,7 geringer als bei

der in Abb. 16 gezeigten Fermentation mit $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hier zeigt sich, dass der Medienbestandteil der C-Quelle einen signifikanten Einfluss auf die Toxinendkonzentration hat.

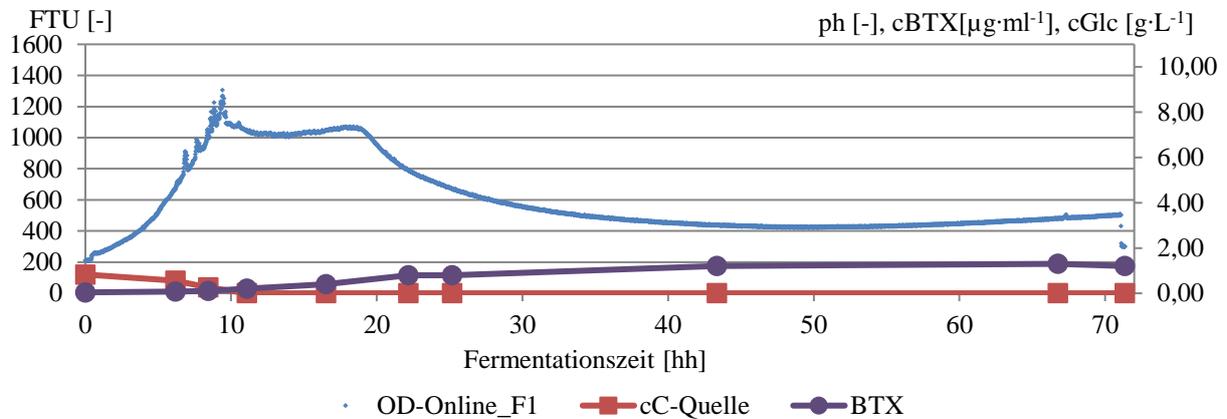


Abb. 17: Verlauf der *C. botulinum* Kultur mit 1/10 der Standard C-Quellenkonzentration

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Übergangsphase zur stationären Phase (FTU 1000-1500) sowie die verwendete C-Quellenkonzentration kritisch für die Höhe der Produktkonzentration sind. Wie unter 2.2 beschrieben, sind die Gene für die Neurotoxinbildung in der späten exponentiellen Phase hochreguliert und kehren in der stationären Phase wieder auf basale Ausprägungen zurück. Somit ist neben der Lysephase, die das Wertprodukt freisetzt, die späte exponentielle Phase bzw. ihr Verlauf während der Batchfermentation kritisch für die Höhe der Endproduktkonzentration. Ein charakteristischer Biomassewachstumsverlauf während der ersten 30 h Fermentation ist somit Voraussetzung, um ab ca. 30 h Fermentationszeit das bis dahin generierte Toxin freizusetzen und zu prozessieren.

Das Vorhandensein von Toxin bei beiden Fermentation (Abb. 16, 17) vor der eigentlichen Toxinsynthesephase (ab 1000 FTU) wird dem verwendeten Inokulum zugeschrieben. Es wurde ein Inokulum verwendet, welches aus der Toxinsynthesephase (späte exponentielle Phase, $OD > 3,5$) stammt. Dadurch ist die Toxinsynthese bereits im Inokulum induziert. Es kann unmittelbar nach dem Animpfen des Fermentationsmediums Produkt synthetisiert werden. Jedoch reichen die vorhandenen Medienbestandteile (C-Quelle, Abb. 17) nicht aus um eine spezifikationskonforme Toxinkonzentration zu erreichen. Somit wird dem Stoffstrom des Fermentationsmediums ein weiterer signifikanter Einfluss auf die Produktkonzentration zugeschrieben.

Für eine hohe Produktkonzentration muss die C-Quelle im Fermentationsmedium so eingestellt werden, dass sie ein ausreichendes Zellwachstum und Produktbildung ermöglicht. Eine Überschussdosierung der C-Quelle, wie z.B. bei der Liquid Methode in Abb. 16 kann u. U. mitverantwortlich für die verringerte Produktkonzentration sein. Aus diesen Gründen wird der

Einfluss der Rohstoffe zur Erstellung des Fermentationsmediums auf die Produktkonzentration untersucht.

4.4 Stoffstrom des Fermentationsmediums

Zur Herstellung von Botulinum Toxin wird Fermentationsmedium mit Zellen von *Clostridium botulinum* in einem Fermenter inokuliert und über einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Dabei ist neben dem Stoffstrom des Inokulums, das verwendete Fermentationsmedium der einzige weitere Stoffstrom, der in den Fermenter eingebracht wird.

Es konnte unter 4.2 gezeigt werden, dass Eigenschaften des Inokulums die Fermentation signifikant beeinflussen. Durch gezielte Standardisierung des Inokulums kann die Variabilität in der Endproduktkonzentration verringert werden. Ein beobachteter Nebeneffekt war, dass die Produktkonzentration durch Optimierung der Eigenschaften des Inokulums gesteigert werden konnte.

Unter 4.3 wurde gezeigt, dass durch Änderung des Fermentationsmediums ein Einfluss auf die Produktkonzentration genommen werden kann. Der Effekt des verwendeten Fermentationsmediums auf die Produktkonzentration soll daher untersucht werden und die Parameter des Fermentationsmediums identifiziert werden, die eine Einflussnahme auf das Batchergebnis ermöglichen.

Das Fermentationsmedium besteht aus einer Mischung von komplexen Bestandteilen. Es wird eine komplexe V-Quelle (Hydrolysat, Vitaminquelle) mit einer komplexen N-Quelle (Hydrolysat, Stickstoffquelle) und einer chemisch definierten C-Quelle (Kohlenstoffquelle) vermischt. Die V- und N-Quellen werden vom Medienhersteller in Chargen auf den Markt gebracht. Eine Untersuchung der Medienchargen auf Veranlassung von Merz ergab, dass es zum Teil erhebliche Abweichungen in der Konzentration einzelner analysierter Stoffgruppen (Aminosäuren, Spurenelemente usw.) gibt.

4.4.1 Variabilität der Produktkonzentration durch die Rohstoffchargen

In der Zeit von 2011 bis 2013 wurde beobachtet, dass die Toxinkonzentration nach 72 h Fermentation immer weiter abnahm (Abb. 18). Im Jahr 2013 fiel die Produktkonzentration so stark ab, dass keine spezifikationskonformen Batche mehr auf den Produktionsanlagen hergestellt werden konnten. Die Zellbankalterung als Ursache für diese Beobachtung ist nicht dafür verantwortlich (Kap. 4.2.1). Es wurde keine prozesstechnische Änderung an dem zugelassenen Herstellverfahren vorgenommen – dadurch entfällt diese Möglichkeit der negativen Einflussnahme auf den Prozess. Ein derart starker Einfluss (regelmäßige OOS) auf die Produktkonzentration alleinig durch das verwendete Inokulum bzw. der

organismenspezifischen inhärenten biologischen Variabilität ist auszuschließen (siehe Kap. 4.2.2 - 4.2.3), da die Inokulation der Fermentation mit der Liquidmethode bis zum Jahr 2013 funktionierte. Der einzige weitere Stoffstrom in dem Fermenter ist das Fermentationsmedium. Die beobachtete Produktkonzentrationsabnahme könnte daher durch das Fermentationsmedium bedingt sein.

Die Abbildung 18 zeigt den Verlauf der erreichten Produktkonzentrationen auf den Produktionsanlagen im Zeitraum von 2010 -2014. Die horizontalen Linien bei 5,5 und 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in Abb. 18 zeigen die zulässigen Spezifikations-Grenzen für die Produktkonzentration. Werden Produktkonzentrationen erreicht, die außerhalb dieser Spezifikation liegen, kann dieses Toxin nicht zur Formulierung des Fertigprodukts verwendet werden. Es handelt sich dabei um einen OOS Batch (out of specification). Zunächst ist vor 2011 eine uniforme Streuung der Endproduktkonzentrationen zu erkennen. Ab dem Jahr 2011 wird eine stetige Abnahme der Produktkonzentration beobachtet, die im Jahr 2013 OOS Niveau erreicht (unterhalb der gestrichelten Linie). Ab 2014 konnten wieder Produktionsprozesse durchgeführt werden, die innerhalb der Spezifikationen lagen.

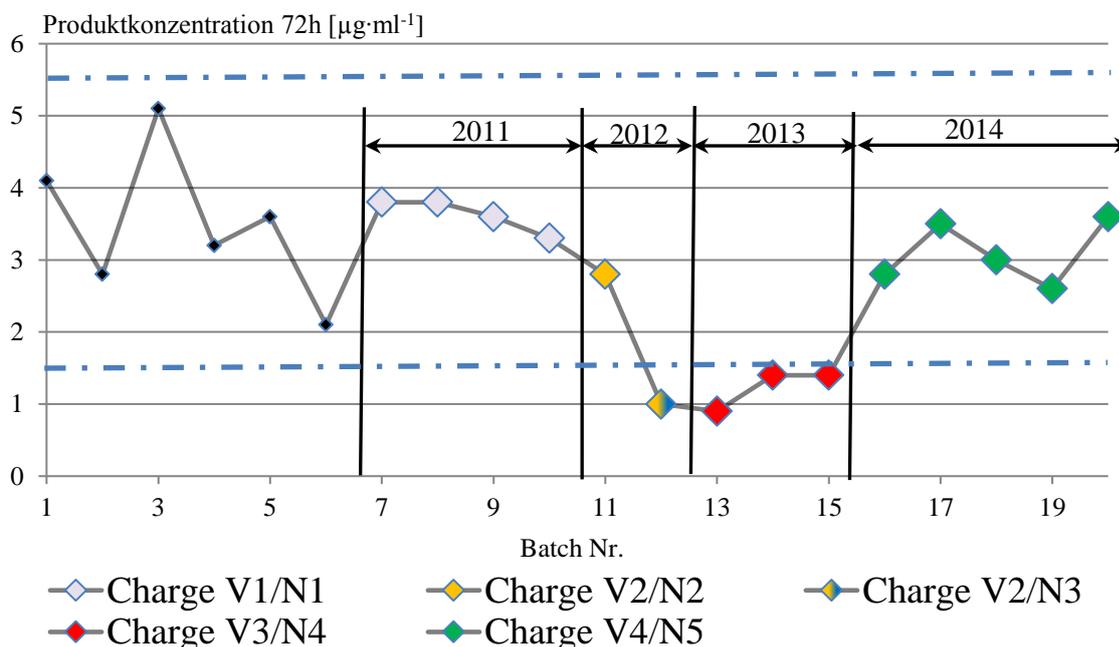


Abb. 18: zeitlicher Verlauf der erreichten Produktkonzentrationen am Ende der Fermentation im 5 Jahre Zeitfenster in der Produktion. Datenpunkte gleicher Farbe entsprechen gleichen V/N-Chargen

Die Datenpunkte in Abb. 18, die die gleiche Farbe zeigen, wurden mit V- und N-Quellen einer gleichen Charge hergestellt. Die Batche die innerhalb der Spezifikation lagen, lassen sich auf die Chargenkombinationen der Rohstoffe V1/N1, V2/N2 und V4/N5 zurückführen (vgl. Tab. 3). Die anderen Chargenkombinationen der Rohstoffe der V- und N-Quelle (V2/N3, V3/N4) liefern OOS Ergebnisse. Im Jahr 2012 wird besonders deutlich, dass die Charge der N-Quelle

einen Einfluss auf die Produktkonzentration hat. Der starke Abfall der Toxinkonzentration von Batch 1 2012 zu Batch 2 2012 zeigt, dass sich die verwendete N-Charge bei identischer V-Charge negativ auf die Höhe der Produktkonzentration auswirkt.

Tab. 3: zusammengefasste Batch-Daten, +++/----sehr gute/schlechte Produktkonzentration

Batch	V-Charge	N-Charge	Produktkonzentration
2011.1	V1	N1	+++
2011.2	V1	N1	+++
2011.3	V1	N1	+++
2011.4	V1	N1	++
2012.1	V2	N2	++
2012.2	V2	N3	---
2013.1	V3	N4	---
2013.2	V3	N4	---
2013.3	V3	N4	---
2014.1	V4	N5	+++
2014.2	V4	N5	+++
2014.3	V4	N5	+++
2014.4	V4	N5	+++
2014.5	V4	N5	+++

Die Abbildung 19 zeigt Produktkonzentrationen von Fermentationen die im Technikum durchgeführt wurden. Es wurden Batche produziert, die sowohl innerhalb als auch außerhalb der Spezifikation lagen (Grenze von $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ unterschritten, Abb. 19). Die niedrigen Produktkonzentrationen (graue Punkte) sind mit einer Kombination an V- und N-Quelle (V3/N6) hergestellt worden. Die V3-Charge lieferte in Kombination mit N4 bei den Fermentationen auf Produktionsanlagen OOS Ergebnisse für die Produktkonzentration im Jahr 2013 (Tab. 3). Die schwarzen Punkte in Abb. 19 zeigen spezifikationskonforme Produktkonzentrationen. Diese Ergebnisse wurden mit einer anderen Chargenkombination (V4/N5) erreicht. Diese V-, N-Chargen wurden im Jahr 2014 auf den Produktionsanlagen eingesetzt und führten ebenfalls zu spezifikationskonformen Batchen.

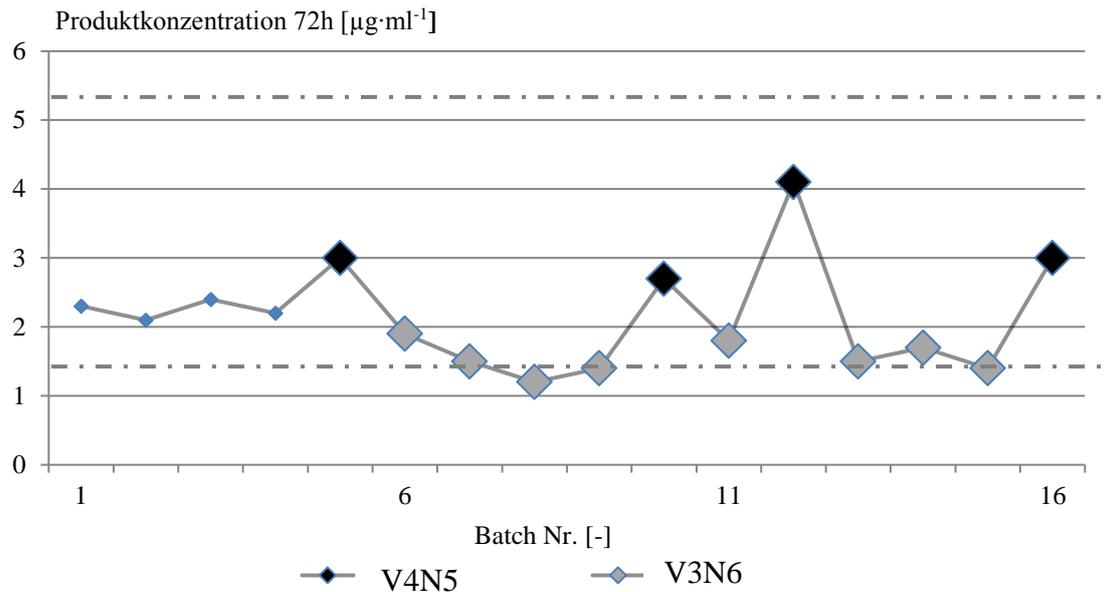


Abb. 19: erreichte Produktkonzentrationen mit 2 unterschiedlichen Chargenkombinationen: schwarz-V4N5, grau-V3N6

Durch das Alternieren der V- und N-Quellen Chargen Kombination (V3/N6 : V4/N5) zeigt die Abb. 19, dass der Effekt der schwankenden Toxinkonzentration bzw. das Auftreten von OOS Ergebnissen in Abhängigkeit der verwendeten Chargen der N- und V-Quelle erfolgt. Die verwendete V/N-Charge hat einen wesentlichen Einfluss auf die Produktkonzentration. Somit kann die V- und N-Charge als critical process parameter (CPP) definiert werden, da diese Prozessgröße einen direkten Einfluss auf Produktkonzentration hat.

Die bei der Fermentation verwendeten V- und N-Rohstoffchargen können nicht beliebig gewählt werden. Es gibt meist nur eine Charge auf dem Markt für Zeiträume von einem Jahr und länger. Somit müssen Möglichkeiten gefunden werden mit ‚schlechten‘ Rohstoffchargen spezifikationskonforme Batche herzustellen.

4.4.2 Beeinflussung der Endproduktkonzentration durch die eingesetzten Rohstoffkonzentrationen und unterschiedlichen Chargen der N-Quelle (DoE 1)

Unter 4.4.1 wurde der Einfluss der zur Fermentation verwendeten V- und N-Charge auf die Produktkonzentration beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass es qualitativ unzureichende Rohstoffchargen gibt, mit denen, aufgrund von fehlenden Alternativen, gearbeitet werden muss. Unter 4.3 wurde beobachtet, dass die Kohlenstoffquellenkonzentration einen Einfluss auf die Produktkonzentration hat. Dieses Zusammenspiel zwischen Medienkomponenten und Produktkonzentration soll mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung zur empirischen Prozessbeschreibung näher untersucht werden. Weiterhin soll durch diese QbD Methode ein

zulässiges Verfahren etabliert werden, welches zu weniger OOS-Batches führt und eine gleichbleibende Produktkonzentration ermöglicht.

In 50 ml Reaktionsgefäßen wurden 30 ml Fermentationsmedium aliquotiert. Die Zusammensetzung des Fermentationsmediums wurde mithilfe eines statistischen Versuchsplans (Tab.: 7 Anhang) bestimmt. Der Aufbau des Versuchsplans entsprach einem Central Composit Design (CCD, Kap. 2.5, Abb. 7). Der CCD Versuchsplan bestand aus 3 kontinuierlichen (Konzentrationen der C-, V- und N-Quelle) und einer kategorischen Variable (2 unterschiedliche Chargen der N-Quelle), die systematisch variiert und kombiniert wurden (siehe Tabelle 4).

Es wurden in diesem Versuch 40 Versuchsansätze inokuliert (20 pro N-Charge). Die 20 inokulierten Reaktionsansätze bestanden jeweils aus acht Ansätzen für die acht Eckpunkte des Würfels (Kap. 2.5, Abb. 7), sechs Ansätzen für die sechs Sternpunkte sowie jeweils sechs Replikaten des Zentralpunktes. Dieser DoE Versuch wurde mit der N-Quellen Charge N2 und N3 sowie mit der V-Quellen Charge V2 hergestellt. Die Kombination aus V2/N2 brachte in der Produktion 2012 eine spezifikationskonforme Produktkonzentration von $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Abb. 18). Die Kombination V2/N3 brachte 2012 in der Produktion nur $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Somit wird N-Charge N3 mit ‚schlecht‘ und N2 mit ‚gut‘ deklariert.

Tab. 4: CCD Versuchsplan 1

untersuchte Hauptfaktoren	Konzentrationsbereich [g·L⁻¹]	Charge
C-Quellen Konzentration	5-10	/
N-Quellen Konzentration	10-20	N2/N3
V-Quellen Konzentration	5-10	V2

Nach erfolgter Versuchsdurchführung und Bestimmung der Endproduktkonzentration wurden die Ergebnisse durch die Anpassung eines Modells an diese Versuchsdaten analysiert (Regression). Bei der Modelanpassung wird mithilfe von Gleichungen unterschiedlicher Form (linear, quadratisch) die Produktkonzentration *in silico* berechnet und mit den gemessenen Werten verglichen. Im Anschluss muss durch den Anwender das Modell gewählt werden, welches die kleinste Abweichung zwischen den berechneten und realen Daten aufweist. Zur Einschätzung dieser Modelabweichung dient u. a. die Residuensumme. Eine kleine Residuensumme zeigt, dass das verwendete Modell die realen Daten bzw. die zugrundeliegenden Zusammenhänge der untersuchten Faktoren gut beschreibt.

In diesem Versuch wurden durch ein lineares Modell die Versuchsdaten am besten beschrieben. Die Residuensumme war für die lineare Regression am kleinsten. Die Residuen der Daten der einzelnen Versuchsansätze nach der Modellanpassung streuen gleichmäßig. Es konnte keine Abweichung der Residuenstreuung von einer Normalverteilung beobachtet werden. Das verwendete lineare Modell ist signifikant ($p < 0,05$). Die Höhe der Änderung der Produktkonzentration durch die untersuchten Faktoren, beschrieben durch das lineare Modell, ist größer als das dem Versuch zugrundeliegende Hintergrundrauschen (Signal/Noise ratio). Das lineare Modell ist für die Beschreibung der Versuchsdaten geeignet.

Die Ergebnisse des linearen Modells zeigen, dass die Faktoren der Konzentration der C- und V-Quelle (im Bereich von 5-10 g·L⁻¹) sowie der verwendeten N-Charge einen signifikanten ($p < 0,05$) Einfluss auf die Produktkonzentration ausüben. Der Faktor der N-Quellenkonzentration war in diesem Versuch nicht signifikant ($p = 0,48$). Die Konzentration der N-Quelle im Fermentationsmedium im untersuchten Konzentrationsbereich von 10 - 20 g·L⁻¹ übt somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktkonzentration aus.

Es ist aus Abb. 20 a zu erkennen, dass bei einer Verringerung der C-Quellen Konzentration bis auf 5 g·L⁻¹ die Produktkonzentration um ca. den Faktor 2 zunimmt (1,5 vs. 3,0 µg·ml⁻¹). Die Steigerung der Produktkonzentration durch Reduzierung von Konzentrationen an Medienbestandteilen wird dem Effekt der Proteom-Partitionierung zugeschrieben.

In You et al., 2013 zeigen die Autoren, dass der limitierende Faktor für das Zellwachstum bzw. die Produktsynthese, die Proteinsynthese an den Ribosomen ist – Verteilung der Proteinsynthesekapazität der Zelle entsprechend der Dringlichkeit: Proteom Partitionierung.

Zur Erklärung muss vereinfacht angenommen werden, dass die Anzahl der Ribosomen zunächst fix ist. Die Proteinsyntheseplätze der Ribosomen sind besetzt – sie translatieren katabole Proteine um einen entsprechenden Eintrag an C-, N-, V-Quellen in die Zelle sicherzustellen. Da sich z.B. die C-Quelle kontinuierlich durch Verstoffwechslung reduziert, muss durch eine verstärkte Expression der entsprechenden Enzyme gegengesteuert werden, um die Rate des Kohlenstoffzustroms in die Zelle konstant zu halten (stabiler Betriebspunkt). Gleiches gilt auch für jegliche anderen Elemente oder Precursor (Aminosäuren etc.). Somit ist ein bestimmter Anteil der verfügbaren Ribosomen mit Housekeeping, Expression kataboler-/anaboler Proteine und der Synthese von neuen Ribosomen beschäftigt. Da das Toxin für den Organismus unter den herrschenden Fermentationsbedingungen nicht essentiell zum Überleben

ist, hat dessen Synthese nur eine geringe „Priorität“ gegenüber dem Gewährleisten eines stabilen Betriebspunktes.

Der Organismus ist einem kontinuierlichen Optimierungsproblem mit mehreren Zielen ausgesetzt (Pareto-Optimierung). Es muss ein optimaler, stabiler Betriebspunkt durch die Synthese unterschiedlicher Proteinfractionen zur Homöostase intrazellulärer Metabolitflüsse erreicht werden. Erst nach Einstellung dieses quasi-steady-state stehen freie Ribosom-„Ressourcen“ für andere Aufgaben z.B. die Toxinsynthese bereit

Ein ungünstiges Mischungsverhältnis von z. B. C- und N-Quelle aufgrund unterschiedlicher Rohstoffchargen führt zu einer verstärkten Beanspruchung des Translations-/Transkriptionsapparates. Der Stoffwechsel des Organismus besteht aus enzymatischen Reaktionskaskaden. Die Abläufe dieser chemischen Reaktionen sind konzentrationsgebunden und kontinuierlich. Wesentliche Energie (ATP) generierende Reaktionen beginnen mit Kondensationsreaktionen. Dabei werden zwei Edukte zu einem Produkt zusammengefügt. Der Stoffwechsel hat keine wesentlichen Speichermöglichkeiten für diese reaktiven (z. B. phosphorylierten) Edukte. Die Edukte müssen zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem stöchiometrischen Verhältnis zueinander zusammentreffen um den Ablauf der Reaktion zu gewährleisten. Aufgrund von unbalanciertem Fermentationsmedium würde ein stöchiometrisches Ungleichgewicht in diesen Reaktionskaskaden bestehen, wenn der Organismus nicht seine Proteommaschinerie zum Ausgleich verwenden würde. Das führt dazu, dass der Translationsapparat zunächst dafür verwendet wird, das Wachstum und die Zellteilung zu ‚stabilisieren‘. Dadurch bleiben jedoch nicht die Ressourcen (Ribosomen, freie Proteinsyntheseplätze) erhalten, wie es bei einem balancierten Medium der Fall ist. Es werden Proteine, die nicht essentiell für das Wachstum/Erreichen des steady-state sind, z. B. das Toxin, weniger stark exprimiert. Aus den in diesem Versuch ermittelten Daten ergibt sich, dass ein C:N Verhältnis (C:N-Quelle) von 1:4 für ein balanciertes Medium (spezifikationskonforme Fermentation) notwendig ist ($C:N=1:3 \rightarrow 1,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $C:N=1:4 \rightarrow 4,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). (You et al., 2013)

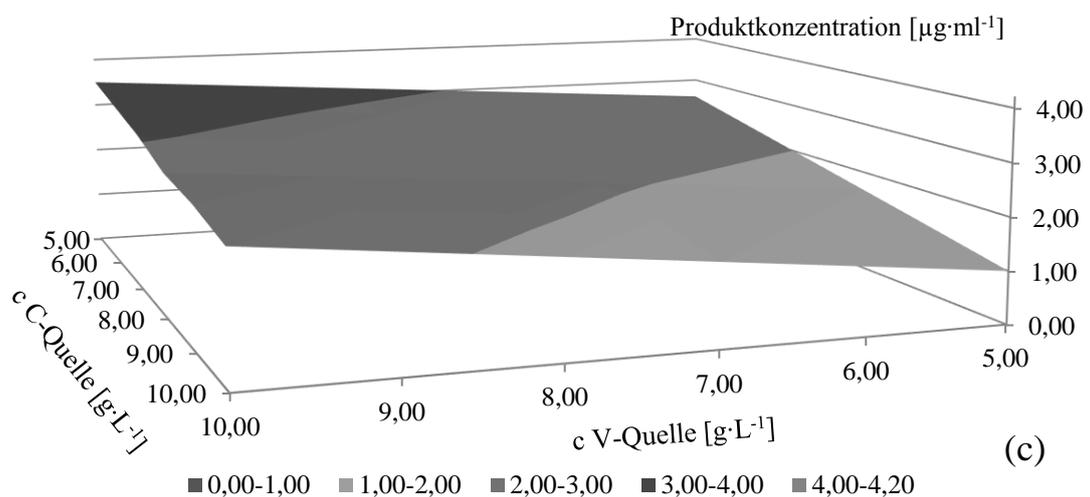
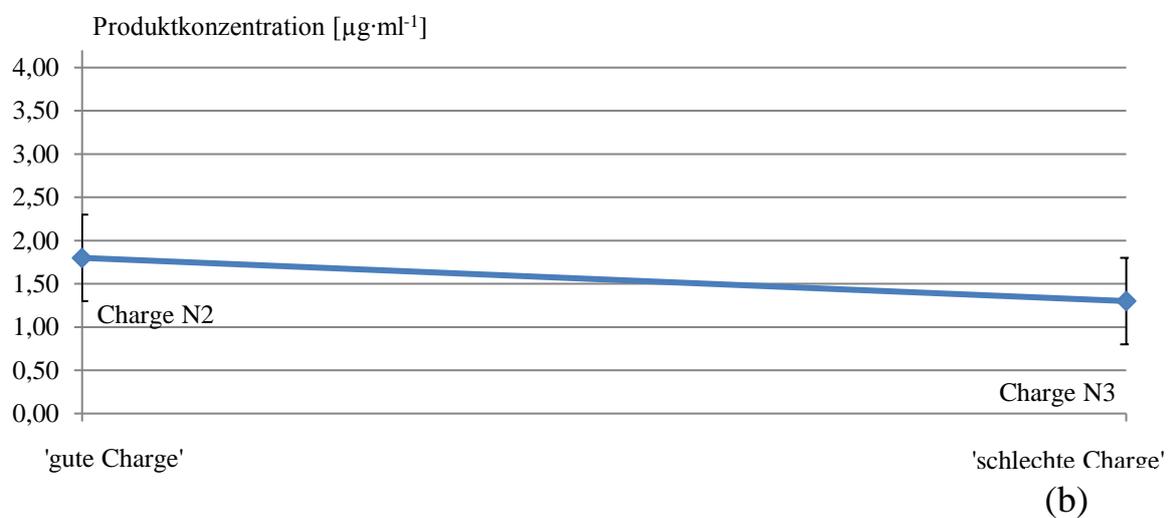
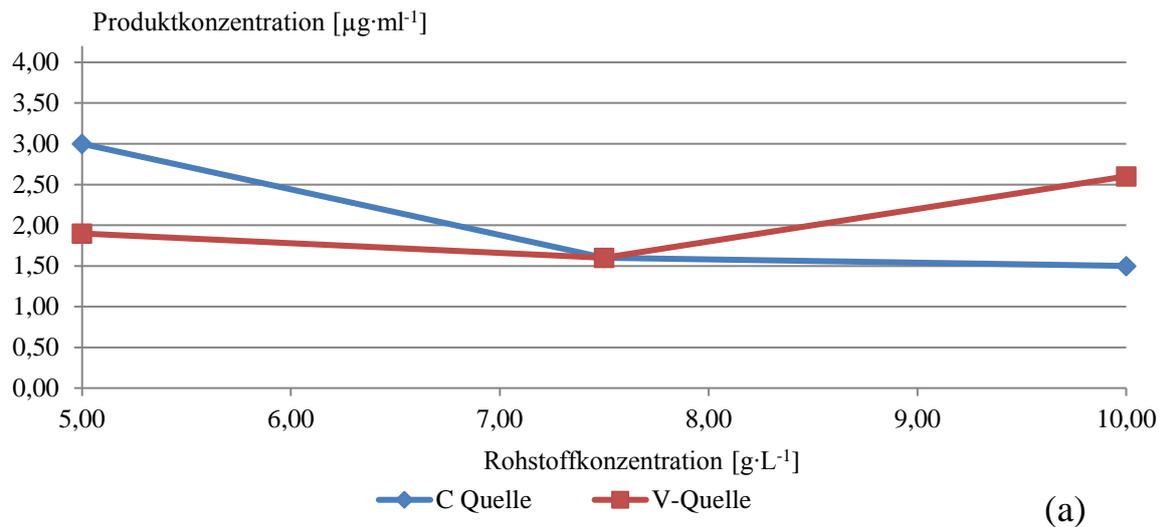


Abb. 20: Ergebnisse des DoE 1, Abb. c zeigt die Response Surface (gemitteltes Modell) bei 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ N2 Charge

Die Produktkonzentration ist bei einer V-Quellen Konzentration von 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ am höchsten (Abb. 20 a). Die in Abbildung 20 c dargestellte Response Surface vereinigt die Ergebnisse aus Abb. 20 a. Dabei ist zu erkennen, dass die höchste gemittelte Produktkonzentration mit der

geringsten C-Quellenkonzentration bei höchster V-Quellenkonzentration auftritt. Dieser Graph zeigt nur die als signifikant identifizierten Parameter (Konzentration der C-, V-Quelle) bei einer N-Quellen Konzentration von $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ der Charge N2.

Der in der Produktion beobachtete Effekt, dass unterschiedliche N-Quellen Chargen die Höhe der Produktkonzentration beeinflussen, konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Die Abb. 20 b zeigt, dass die N-Quellen Charge N3 um den Faktor 1,4 weniger Produkt liefert als die N2 Charge unter sonst gleichen Bedingungen. Diese Abweichung ist geringer als die zwischen den Batchen 2012.1 (N2) und 2012.2 (N3) mit einer beobachteten Abweichung um den Faktor 3,1. Der in Abb. 20 b dargestellte Unterschied der Produktkonzentration in Abhängigkeit der verwendeten N-Charge ist im erstellten Modell über das gesamte Versuchsgebiet gemittelt. Betrachtet man die erreichten Produktkonzentrationen an einem distinkten Punkt in den Rohdaten z. B. bei einer C-, V-, N-Quellenzusammensetzung von 10, 10 und $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, wird mit der N3 Charge $1,2 \pm 0,50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (OOS Niveau) und mit der N2 Charge $3,5 \pm 0,46 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erzielt. Diese C-, V-, N-Quellen Konzentration ist die Standardzusammensetzung bei Fermentationen, so auch für die Batche in 2012.1/2012.2 (Abb. 18/19). Der Unterschied zwischen den Produktkonzentrationen bei der Verwendung der N2 und N3 Charge mit den Standardkonzentrationen ($10, 10, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in diesem DOE Versuch, beträgt das 2,9-fache und ist mit dem Unterschied bei den Batchen 2012.1/2012.2 vergleichbar (3,1-fache). Der bestehende Unterschied in der N-Quellen Zusammensetzung hat einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration.

Durch eine Anpassung der Konzentration der Medienbestandteile auf 5, 10, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-, V- und N2-Charge konnten in diesem Experiment $4,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produkt hergestellt werden. Die Verwendung dieser angepassten Konzentration an Medienbestandteile lieferte für die N3 Charge $4,00 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produkt. Diese Toxinkonzentrationen gehen in das grafisch in Abb. 20 c dargestellte Modell mit ein. Da es sich jedoch dabei um Maximalwerte handelt, werden diese Konzentrationen an Produkt nicht im gemittelten Modell dargestellt.

Durch eine optimale Abstimmung der Konzentration der Medienbestandteile kann eine Steigerung der Produktkonzentration auch mit Rohstoffchargen erreicht werden, die für gewöhnlich OOS Ergebnisse liefert. Eine abgestimmte V-, N- und C-Quellen Einwaage führt zu einem definierten und stabilen Bereich der Produktkonzentration.

Aus den hier gezeigten Daten bestätigt sich die Annahme die aus den historischen Daten (4.4.1) getroffen wurde. Die verwendeten Konzentrationen der Rohstoffe sowie die unterschiedlichen Chargen der Rohstoffe haben einen Einfluss auf die Produktkonzentration und sind dadurch

kritische Prozessparameter im Sinne von QbD (CPPs). Somit kann durch eine geeignete Wahl der Rohstoffchargen oder durch Veränderung der Einwaagen die Produktkonzentration verändert und in den gewünschten Konzentrationsbereich gebracht werden.

Die N-Quelle ist eine komplexe Mischung nicht näher definierter Zusammensetzung unterschiedlicher Einzelkomponenten. Sie ist essentiell für das Zellwachstum und die Synthese des Zielprodukts. Das vom Hersteller bereitgestellte Zertifikat über die Spezifikation der N-Quelle (siehe Anhang) bzw. die darin enthaltenen Gütekriterien sind für eine Aussage über den Verlauf des Herstellungsprozesses unzureichend. Die vom Hersteller bereitgestellten Informationen reichen nicht aus für eine Einschätzung der Rohstofftauglichkeit für erfolgreiche Fermentationen. Dadurch wird es notwendig interne Prüfmethode zu erarbeiten, welche es ermöglichen Rohstoffchargen auf ihre Eignung zu überprüfen. Da bisher nicht bekannt ist, welcher Bestandteil der N-Quelle zu den Abweichungen im Prozess führt, kann nur mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung die beste Zusammensetzung der Medienbestandteile für einzelne Chargen bestimmt werden. Dabei kann mittels des QbD Vorgehensweise, wie unter 2.1 beschrieben, anstelle einer fixen Medieneinwaage (10, 10, 20 g·L⁻¹), eine variable Medienformulierung eingesetzt werden (Design Space). Somit können vor der eigentlichen Fermentation zur Generierung von Wirkstoff zunächst neue Medienchargen im DoE Versuch getestet werden. Das dabei erhaltene empirische Model zeigt dann dem Anwender, welche Konzentrationen an Einzelstoffen bereitgestellt werden müssen, um in einen stabilen Bereich der Produktexpression zu gelangen.

4.4.3 Validierung der Ergebnisse aus dem DoE 1 Model im 5 L Maßstab

In Kapitel 4.3.2 wurde ein empirisches Fermentationsmodel im 30 ml Maßstab erstellt. Dieses Model korreliert unterschiedliche Zusammensetzungen des Fermentationsmediums (Design Space, Konzentration an V-, C- N-Quelle) mit den erreichten Produktkonzentrationen. Wie unter 4.2.2 (Animpfmethode) gezeigt wurde, kann sich bei Volumenvergrößerung ein beobachteter Effekt anders ausprägen als zuvor im Model beobachtet. Daher muss die Gültigkeit des Models aus 4.4.2 in einem größeren Maßstab bestätigt werden.

Hierfür wird auf der Response Surface (Abb. 20 c) ein Bereich gesucht, bei dem eine bestimmte Produktkonzentration erreicht wird (z.B. 3,5 µg·ml⁻¹, Mitte der Spezifikation 1,5 – 5,5 µg·ml⁻¹). Die einzelnen Konzentrationen der zu dieser Produktkonzentration gehörenden Medienbestandteile werden dann von den Achsen abgelesen und ein 5 L Fermentationsmedium mit diesen Konzentrationen hergestellt.

Das Medium besteht aus drei Hauptkomponenten. Dabei sind zwei Medienkomponenten (V- und N-Quelle) komplexer Natur. Die C-Quelle ist chemisch definiert. Damit kann die Stoffidentität und Konzentration der C-Quelle zweifelsfrei und genau bestimmt werden. Im Fall der komplexen Bestandteile ist nicht bekannt welche Einzelbestandteile für die Variabilität der Toxinkonzentration verantwortlich sind. Da diese komplexen Einzelbestandteile von Charge zu Charge in ihrer Konzentration schwanken können, ist es besser den chemisch definierten Anteil des Fermentationsmediums zu variieren. So kann ein beobachteter Effekt zweifelsfrei zu einer chemischen Stoffgruppe (z. B. Kohlenhydrate) zugeordnet werden. Aus diesem Grund wird nur die Konzentration der definierten C-Quelle eingestellt, und für die V- und N-Quelle die Standardkonzentration beibehalten ($10, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der in DoE 1 erreichten Produktkonzentration ($3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), werden die spezifischen Einwaagen aus dem 30 ml Maßstab für die Bestandteile des Fermentationsmedium 1 zu 1 auf das 5 L Fermentationsmedium übertragen. Es soll mit der ‚schlechten‘ N-Quellen Charge N3, der V-Quellen Charge V2 und einer optimierten C-Quelleneinwaage von $6,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ überprüft werden, ob das vorausgesagte Ergebnis von $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ auch im größeren Maßstab (5 L) erreicht werden kann.

Die Abbildung 21 zeigt die Produktkonzentrationen von jeweils 3 Fermentern für die optimierte C-Quellen Einwaage nach DoE 1 mit $6,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-Quelle (hellgrau, a, b, c), sowie die parallel dazu angesetzten Referenzfermenter mit $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-Quelle (dunkelgrau, d, e, f).

Es wurden 3 mal 2 Fermentationen im 5 L Maßstab zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt (Abb. 21). Eine Fermentation bestand aus dem Upstreaming bis zur IC2 Kultur, gefolgt von der Inokulation eines Fermenters mit optimiertem Fermentationsmedium und einem Medium der Standardzusammensetzung in einem zweiten Fermenter. Die Vorkulturen (IC2) befanden sich in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Jeder Fermenter wurde mit einer definierten OD von 0,31 mit der Pelletmethode angeimpft. Die verwendeten Rohstoffchargen waren zwischen den Fermentern und den 3 Fermentationen identisch.

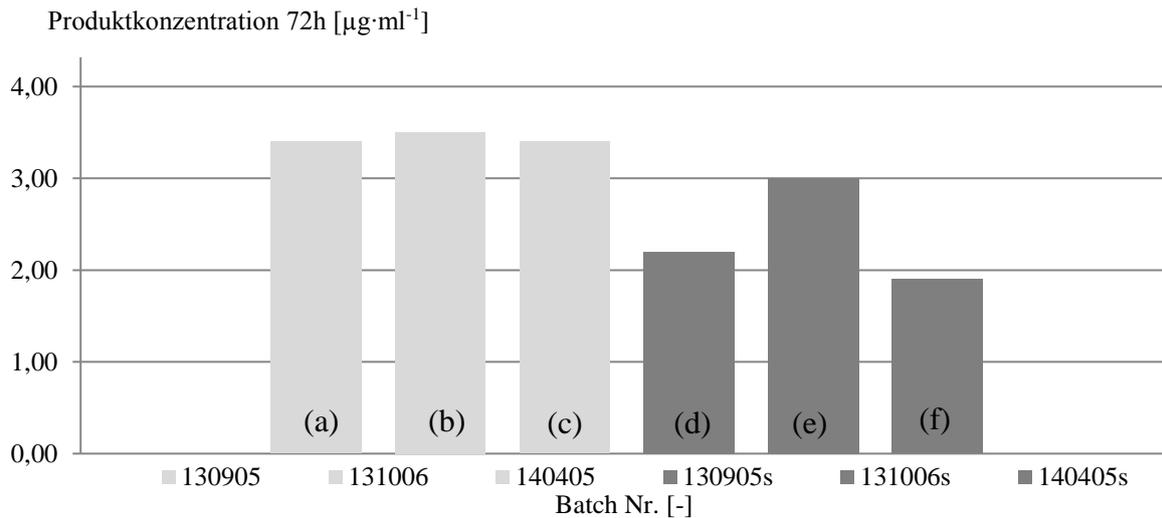


Abb. 21: erreichte Produktkonzentration für 3 biologische Replikate optimierter Medienkomposition (hellgrau, a, b, c) und Standardansätze (dunkelgrau, e, f, g)

Durch die optimierte C-Quellen Einwaage für das Fermentationsmedium war es möglich, eine zuvor bestimmte, gewünschte Produktkonzentration mit einer schlecht funktionierenden Charge (N3) zu erzielen. Die erreichte Produktkonzentration für die optimierte Einwaage betrug $3,4 \pm 0,18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, für die Standardeinwaage $2,4 \pm 1,81 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ohne Medienoptimierung sind die erreichten Produktkonzentrationen um den Faktor 1,4 geringer. Die Produktkonzentration der Referenzfermenter ist in diesem Versuch jedoch um ca. den Faktor 2 höher als unter 4.4.2 für die gleiche Zusammensetzung des Fermentationsmediums beobachtet ($1,2$ vs. $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Diese Erhöhung der Produktkonzentration wird, wie unter 4.2 gezeigt, der Animpfmethode (Pelletmethode) zugeschrieben. Durch die Kombination der optimierten Animpfmethode (Pelletmethode), des optimierten Fermentationsmediums ($6,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-Quelle statt $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie des optimalen Vorkulturregimes (Inokulum aus später exponentieller Phase) wurde es möglich die Streuung des Mittelwertes um den Faktor 10 gegenüber den Standardansätzen zu reduzieren.

Die Fermenter d, e, f wurden auch mit der Pelletmethode inokuliert, doch zeigt sich hier eine wesentlich stärkere Variabilität der Produktkonzentration. Die Standardansätze zeigen, dass auch durch die Verwendung einer suboptimalen Medienkomposition eine starke Variabilität in der Produktkonzentration auftreten kann.

Der DoE 1 ermöglichte die Identifizierung und Auswahl eines einfach zu kontrollierenden und einzustellenden Faktors (C-Quelle), der einen signifikanten Einfluss auf die Produktkonzentration hat. Durch diesen Faktor konnte in dem hier gezeigten Versuch die Produktkonzentration auf eine gewünschte Höhe eingestellt werden. Es wurde durch die DoE

Methodik in Kombination mit einer optimierten Animpfmethodik möglich, dass eine Rohstoffcharge die sonst OOS Ergebnisse liefert (N3) spezifikationskonforme Batche hervorbringt. Die durch das DoE Model prognostizierte Produktkonzentration von $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ wich nur gering von der tatsächlich erreichten Produktkonzentration ab ($3,4 \pm 0,18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Durch die DoE Methodik wurde erstmals bei dem hier untersuchten Prozess die Produktkonzentrationen willentlich verändert und auf einen im Voraus bestimmten Wert eingestellt. Trotz des Scale-Up von 30 ml auf 5 L traten keine negativen Skalierungseffekte auf. Wie unter 4.4.2 gezeigt, führt die Verringerung einer Medienkomponente (C-Quelle) zu einer Erhöhung der Produktkonzentration wie auch zu einer Variabilitätsreduktion. Durch ein Balancieren der C- und N-Quelle miteinander, konnte ein stabiler und optimaler Wert für die Produktkonzentration erreicht werden. Die Ursache für diese Beobachtung wird im beschriebenen Phänomen der Proteom Partionierung gesehen. Durch ein balanciertes Fermentationsmedium wird eine verbesserte Proteom Partionierung erreicht. Der Organismus kann Translationsressourcen von der Koordinierung intrazellulärer metabolischer Flüsse für die Produktsynthese verwenden. Dadurch wird das Produktsynthesepotential des Organismus erhöht.

Das Inokulum für den Hauptversuch entstammt einer 24 h alten Kultur. Der Organismus hat aufgrund der in dieser Kultur herrschenden Bedingungen einen bestimmten quasistationären Zustand (Expression von Enzymen, metabolische Flüsse durch die einzelnen Stoffwechselwege usw.) Diese Organismen werden in das Medium des Hauptversuches übertragen und adaptieren sich. Zum einen an die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (Vorkultur 37°C , Hauptkultur $33,5^\circ\text{C}$), zum anderen an höhere Konzentrationen an Bestandteile im unverbrauchten Fermentationsmedium. Diese Anpassung ist ein Aufwand für die Proteommaschinerie (Transkription, Translation). Durch, wie hier gezeigt, eines abgestimmten Mediums erscheint es, dass dieser zelluläre Aufwand reduziert werden kann und somit Ressourcen aus z.B. Housekeeping Prozesse oder ähnlichem frei werden für andere Aufgaben, z.B. die Produktsynthese (You et al., 2013).

4.4.4 Überprüfung der Modellgrenzen des DoE 1 und Übertragung der optimalen Einwaagen auf andere Rohstoffchargen

Für das empirische Fermentationsmodell aus DoE 1 wurde gezeigt, dass hierdurch spezifikationskonforme Batche auch mit ‚schlechten‘ Rohstoffchargen (OOS) hergestellt werden können. Für eine verlässliche Verwendung dieses Modells, ist es notwendig die Grenzen der Anwendbarkeit zu kennen. Dazu wurden die Faktorenkombinationen am Rande (Extremwerte) des Design Space erneut getestet und der vorausgesagte mit dem gemessenen

Wert der Produktkonzentration verglichen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Produktkonzentrations-Vorhersagen aus dem DoE 1 Model auch mit anderen Chargen der N- und V-Quellen gültig sind. Diese Überprüfungen erfolgten durch Fermentationen im 5 L Maßstab.

Die Tabelle 5 zeigt die erreichten Produktkonzentrationen für Medienzusammensetzungen die im Randbereich des Models (DoE 1, Abb. 20 d) liegen. Die geringste Toxinkonzentration wurde mit einer Zusammensetzung des Fermentationsmediums an C-, V- und N3-Quellenkonzentration von 10,0, 5,0, 10 g·L⁻¹ erreicht. Der Maximalwert der Toxinkonzentration wurde mit einer Konzentration an C-, V- und N3-Quelle von 10,0; 20,0; 20,0 g·L⁻¹ erreicht. Dabei betrug die Abweichung von der vorausgesagten zur gemessenen Produktkonzentration (Soll/Ist) maximal 20%. Die vom Modell vorausgesagte, höchste Toxinkonzentration wurde sogar um 12 % überstiegen. Die niedrigste Toxinkonzentration lag 20 % über der vorausgesagten Konzentration. Diese beobachteten Soll/Ist Abweichungen lagen innerhalb der ermittelten Streuung des DoE 1 Versuchs. Somit beschreibt das DoE 1 Modell das untersuchte Versuchsgebiet (Design Space) mit ausreichender Genauigkeit.

Tab. 5: Vergleich zwischen vorausgesagten (Soll) und tatsächlich erreichten (Ist) Produktkonzentrationen an den Modelgrenzen für die Mediumzusammensetzung (C-, V- und N3-Quelle: 10,0; 20,0; 20,0 g·L⁻¹) der höchsten und niedrigsten (C-, V- und N3-Quelle: 10,0; 5,0; 10,0 g·L⁻¹) Produktkonzentration

Produktkonzentration laut Modell DoE 1 [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Produktkonzentration nach 72 h Fermentation [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Abweichung zwischen Soll/Ist Wert [%]
4,2	4,7	+12
1,5	1,8	+20

Das unter 4.4.1 ermittelte Verhältnis zwischen C- und N-Quellenkonzentration von 1:4 für eine hohe Produktkonzentration wird dadurch bestätigt. Die N- und V-Quelle wird bei der Ermittlung des Verhältnisses zusammengefasst (x:4), da die Bestandteile dieser beiden Rohstoffe teilweise identisch sind. Der Organismus kann die V-Quelle bis zu einem gewissen Grad auch als N-Quelle verwenden. Diese ‚unsaubere‘ Trennung zwischen N- und V-Quelle ist der komplexen Natur der Rohstoffe geschuldet für die es keine ‚sauber‘ getrennte Alternative gibt.

Die Ergebnisse der Extremwertexperimente (Tab. 5, geringste und höchste Konzentration) weichen zwischen 12-20 % von den Hervorsagen ab. Der Variationskoeffizient (CV, Quotient

aus Standardabweichung und Mittelwert) ist 30 % im DoE 1 (Zentralpunktexperimente). Der CV entspricht einer normierten Varianz. Die Höhe des Mittelwerts beeinflusst nicht die Höhe der Varianz. Somit ist dieser Wert gut zur Beschreibung der Wiederholbarkeit und Präzision geeignet. Die hier gezeigten Abweichungen der Produktkonzentration für die Extrembereiche des DoEs liegen innerhalb des ermittelten Variationskoeffizienten. Dadurch wird bestätigt, dass das DoE 1 Modell innerhalb seiner Grenzen (Design Space) angewendet werden kann.

Mit dem DoE 1 Modell lässt sich die Produktkonzentration in Abhängigkeit der verwendeten Rohstoffeinwaagen für bestimmte Chargen voraussagen. Es wurde daher ebenfalls überprüft, ob dieses Modell auch geeignet ist, Produktkonzentrationen mit anderen Rohstoffchargen vorauszusagen. Die unter 4.4.3 verwendeten optimierten Einwaagen für das Fermentationsmedium (C-, V2- und N3-Quellekonzentration von 6,9, 10,0 und 20,0 g·L⁻¹) wurden verwendet um mit der V3/N6 Chargenkombination ein optimiertes Fermentationsmedium herzustellen. Die V3/N6 Chargenkombination führte bei den in Abb. 19 dargestellten Technikumsversuchen zu sehr geringen bzw. OOS Ergebnissen. Die V3 Charge wurde auf den Produktionsanlagen im Jahr 2013 (Abb.18) verwendet und führt mit der N4-Charge ausschließlich zu OOS Ergebnissen.

Die durchgeführten Fermentationen mit den optimierten Einwaagen, angewendet auf die V3/N6 Chargenkombination erreichten jedoch nicht den vorausgesagten Wert von 3,5 µg·ml⁻¹ ($\bar{x} = 2,2 \pm 1,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, nicht gezeigt). Die Produktkonzentrationen lagen 37 % unter dem gewünschten Wert, zuzüglich einer vergleichsweise hohen Mittelwertstreuung. Durch die Reduzierung der C-Quelle konnte zwar die Produktkonzentration soweit gesteigert werden, dass keine OOS Ergebnisse mehr auftreten, es zeigte sich jedoch das mit DoE 1 modellfremden Chargen keine genauen Vorhersagen möglich sind. Eine Übertragung der in DoE 1 bestimmten optimalen Einwaagen (C-Quelle 6,9 g·L⁻¹) auf andere Chargen der V- und N-Quelle zur Erreichung von 3,5 µg·ml⁻¹ ist nicht möglich. Für jede Chargenkombination sollte ein eigenes Optimum mittels DoE ermittelt werden.

Es wird nochmals deutlich, dass die Zusammensetzungen der komplexen Medienbestandteile zwischen einzelnen Chargen variieren. Andernfalls hätte das Modell seine Gültigkeit behalten. Eine gute Abstimmung zwischen C- und N-Quelle muss erfolgen, um optimale Produktkonzentrationen zu erreichen. Produktkonzentrations-Vorausagen aus einem DoE Modell (bestimmte Chargenkombination) lassen sich nicht auf andere Chargenkombinationen übertragen. Somit muss für jede neue/ unbekannte Rohstoffcharge ein eigenes DoE Modell erstellt werden.

4.4.5 Empirisches Fermentationsmodell für andere Rohstoffchargen (DoE 2, DoE 3)

Aufgrund der unter 4.4.4 festgestellten Nichtübertragbarkeit des DoE 1 Modells auf andere Rohstoffchargen wurde ein eigenes Modell für die V3/N6 Chargenkombination erstellt. Dieses Modell soll wie bereits DoE 1 den Zusammenhang zwischen spezifischer Rohstoffkombination und der Produktkonzentration beschreiben. Es wurde ein neuer CCD Versuchsplan erstellt, der unterschiedliche Mischungen der Rohstoffe enthält. In diesem CCD-Versuch (DoE 2) wurde die N- und V-Quellen Charge gegenüber DoE 1 zu V3 und N6 geändert. Es wurden identische Konzentrationen für die C-, V- und N-Quelleneinwaage wie im DoE 1 gewählt. Diese lagen bei 5-10, 5-10, 10-20 g·L⁻¹ für die C-, V3- und N6-Quelle.

Da in diesem Versuch nur eine N-Quelle genutzt wurde, entfällt im Versuchsplan der kategorische Faktor der N-Quellen Charge. Dadurch reduziert sich die Versuchsanzahl auf 14 Ansätze. Es lassen sich ca. 40 Reaktionsansätze gleichzeitig bearbeiten. Aufgrund der Reduzierung der Reaktionsansätze auf 14 Stück konnten die Versuche in einem Block in Doppelbestimmung durchgeführt werden (28 Ansätze). Die Gesamtanzahl der Reaktionsansätze lag bei 33 (Doppelbestimmung + 5 Zentralpunktreplikate).

Wie bereits im DoE 1 wird mit den experimentell ermittelten Daten der Toxinkonzentration ein *in silico* Modell berechnet (Regression). Diese Regression korreliert die Produktkonzentration zu unterschiedlichen Fermentationsmedium-Zusammensetzungen. Durch die Doppelbestimmung konnte die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten wesentlich verbessert werden. Eine signifikante ($p < 0,0001$) Korrelation der Medienzusammensetzung zur Produktkonzentration wurde mithilfe eines quadratischen Modells erreicht. Wie gut diese Korrelation ist, beschreibt die Anpassungsstatistik. Das Bestimmtheitsmaß R^2 adj. der Anpassung des Modells an die experimentellen Daten liegt bei 0,92 und damit um den Faktor 1,5 besser als bei DoE 1. Ebenso fiel der Variationskoeffizient um ca. 50 % auf 13 %. Weiterhin stieg die Vorhersagegüte des Modells auf R^2 pred. 0,89.

In DoE 2 haben die Faktoren der C-, N- und V-Quellen Konzentration einen signifikanten ($p < 0,00001$) Einfluss auf die Produktkonzentration. Die höchste erreichte Produktkonzentration im DoE 2 Design Space betrug 2,3 µg·ml⁻¹ bei einer C-, V-, und N-Quellenkonzentration von 5, 10 und 20 g·L⁻¹. Diese Zusammensetzung der Medienbestandteile sowie die Höhe der Produktkonzentration wurden für diese Chargen (V3, N6) auch unter 4.4.4 beobachtet. Es zeigt sich, dass der untersuchte Design Space in den Konzentrationsgrenzen von 5-10, 5-10, 10-20 g·L⁻¹ für die C-, V3- und N6-Quelle keine Produktkonzentration von 3,5 µg·ml⁻¹ ergab. Die

Produktkonzentration von $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ist unter den hier gegebenen Bedingungen (Konzentrationsbereich und Charge) die maximal mögliche. Die Optimierung der Medienzusammensetzung ist ausreichend, da sie keine OOS Batche zur Folge hat. Es wird jedoch angestrebt eine Medienzusammensetzung zu ermitteln, die eine Produktkonzentration von ca. $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ergibt.

Die Ergebnisse aus DoE Modellen können nicht extrapoliert werden. Somit ist es nicht möglich, aus diesem DoE 2 Modell Einwaagen zu bestimmen, die eine Produktkonzentration von $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ liefern, da dieser Wert nicht erreicht wurde. Um in einen Produktkonzentrationsbereich von $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zu gelangen, ist es notwendig, den Versuchsraum (die spezifizierten Einwaagen, Design Space) zu erweitern, so dass ein Bereich mit der gewünschten Produktkonzentration enthalten ist.

Die Erweiterung des Design Space erfolgte über die Durchführung eines 3. DoE's. Die Abb. 22 zeigt den Versuchsraum des DoE 2 in Relation zum erweiterten Versuchsraum des DoE 3. Die Konzentrationsbereiche der C-, V- und N-Quelle des DoE 3 lagen bei $0 - 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0 - 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0 - 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Der DoE 3 wurde wie der DoE 2 in Doppelbestimmung erstellt (33 Ansätze). Die Versuchsdaten des DoE 3 werden durch ein quadratisches Model am besten beschrieben. Die Modellanpassungs- und Vorhersageparameter $\text{adj. } R^2$ sowie $R^2 \text{ pred.}$ beliefen sich auf 0,93 sowie 0,89 und sind identisch mit den Vorhersageparametern aus DoE 2. Die signifikanten Einflussfaktoren auf die Produktkonzentration sind wie im DoE 2 die Konzentration der V-, N- und C-Quelle. Durch die Erweiterung des Versuchsgebiets im DoE 3 konnte die maximale Endproduktkonzentration um 30 % gesteigert werden. Die höchste im DoE 3 erreichte Produktkonzentration lag bei $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (vgl. DoE 2, $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

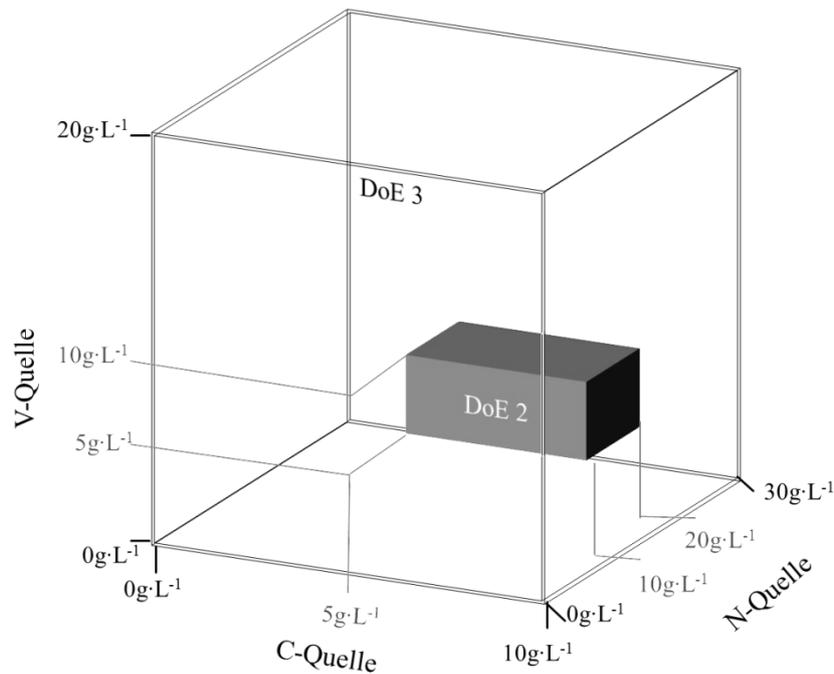


Abb. 22: grafische Darstellung der Erweiterung des Versuchsgebietes von DoE 2 im Versuch DoE 3

Die Abb. 23 zeigt den Verlauf der Produktkonzentration für die signifikanten Einflussparameter. Der Effekt der C-Quellenkonzentration auf die Produktkonzentration ist identisch mit denen in DoE 1 und 2. Die Erweiterung der C-Quellenkonzentrationen beim DoE 3 ist dafür verantwortlich, dass sich die C-Quellen Abhängigkeit in Abb. 23 anders darstellt als bei DoE 1. Es wird jedoch das gleiche Verhalten beschrieben. Durch den Vergleich des Mittelpunktes des C-Quellen Graphen in DoE 3 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit dem Minimumpunkt in DoE 1 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Abb. 20 a) erkennt man, dass die höchste Produktkonzentration bei allen durchgeführten DoEs durch Reduzierung der C-Quelle erreicht wurde. Wird die C-Quellenkonzentration bis auf $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht, führt das zu einer Abnahme der Produktkonzentration. Eine C-Quellenkonzentration von $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Standardeinwaage bei GMP-Batchen in der Produktion) erwies sich in jedem DoE Versuch als ungeeignet für maximale Produktkonzentrationen.

Der Faktor der V-Quellenkonzentration zeigt in Abb. 23, dass mit Zunahme der V-Quellenkonzentration eine höhere Produktkonzentration erreicht wird. Von 0 - $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ V-Quelle steigt die Produktkonzentration stärker als von 10 - $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Der Graph für die N-Quelle (Abb. 23) zeigt das gleiche Verhalten wie für die V-Quelle. Durch Erhöhung der N-Quellenkonzentration (0 - $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) steigt die Produktkonzentration. Jedoch ab 15 - $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nicht mehr so stark wie zwischen 0 - $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Der Effekt des Zugewinns an Produkt durch Erhöhung der V- und N-Quelle wird mit steigenden Konzentrationen der Rohstoffe kleiner.

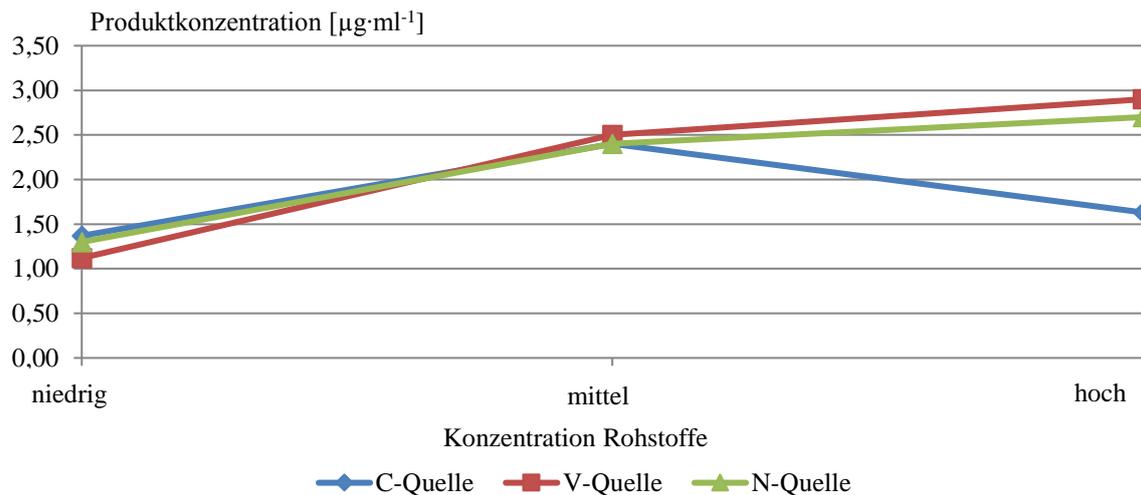


Abb. 23: Darstellung der Faktoreffekte (a: C-Quelle, b: V-Quelle, c: N-Quelle) auf die Zielgröße (Produktkonzentration) im DoE 3

Diese Beobachtung kann mehrere Ursachen haben, z. B. die Veränderung des Metabolismus des Organismus sowie die Änderung der physikochemischen Eigenschaften des Fermentationsmediums. Durch Erhöhung der V- und N-Quelle steigt die Viskosität des Mediums. Da das Fermentationsmedium nicht gerührt wird, verringert sich aufgrund der Viskositätserhöhung der Stoffübergangs-Koeffizient. Der diffusive Stofftransport (Nährstoffe diffundieren in die unmittelbare Umgebung der Zelle; Abfallstoffe weg von der Zelle) verringert sich. Auch ein Erreichen der Produktsynthesegrenzen erklärt das beobachtete Verhalten.

Die Abbildung 24 zeigt zusammengefasst in einer grafischen Darstellung das Zusammenspiel aller signifikanten Faktoren auf die Produktkonzentration (Response Surface). Die mit einem blauen Kreuz markierte Stelle zeigt die Medienkomposition, bei der die höchste Produktkonzentration im untersuchten Design Space vorausgesagt wird. Es wird bei einer C-, V3- und N6-Konzentration von 7,8; 20 und 20 g·L⁻¹ eine Produktkonzentration von 3,3 µg·ml⁻¹ erwartet. Durch eine Erhöhung der N-Quelle auf 30 g·L⁻¹ sinkt die Produktkonzentration um 7 % auf 3 µg·ml⁻¹. Somit stellt für die hier untersuchte Chargenkombination eine N-Quellenkonzentration von 20 g·L⁻¹ die optimale Einwaage dar.

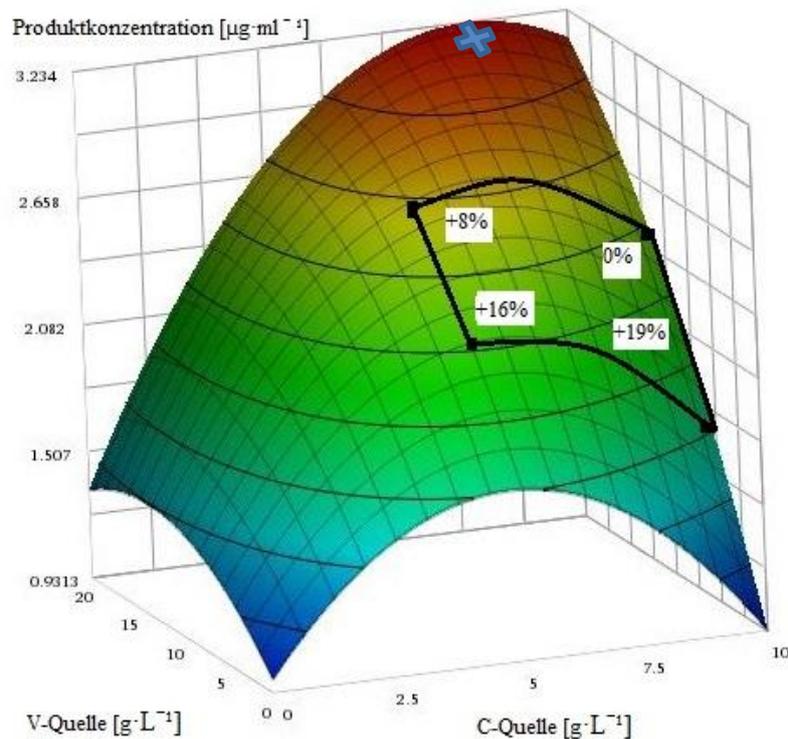


Abb. 24: Response Surface der Produktkonzentration des DoE 3, schwarzer Rahmen-Response Surface des DoE 2 mit prozentualen Konzentrationsabweichungen zu DoE 3, blaues Kreuz- höchste erreichte Produktkonzentration und Medienzusammensetzung die für die Bestätigungsversuche im 5L Fermentermaßstab genutzt wurde

Ohne Verdopplung der V-Quellenkonzentration (von 10 auf 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sind mit der V3/N6 Chargenkombination keine Produktkonzentrationen von $> 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erreichbar. Nur durch Verringerung der C-Quellenkonzentration von 10 auf 7,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (22 %) in Verbindung mit der Verdopplung der V-Quellenkonzentration werden Produktkonzentrationen nahe $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erreicht. Die für diese Fermentationsmedium-Zusammensetzung vorausgesagte Produktkonzentration beträgt $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Auch in diesem Versuch beinhaltete der Design Space keine Medienzusammensetzung für eine Produktkonzentration von $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Somit ist die dafür notwendige Medienzusammensetzung nicht bekannt. Es wird aufgrund des Verlaufs der Produktkonzentration in Abb. 24 angenommen, dass eine wesentliche Steigerung der Produktkonzentration mithilfe der Veränderung der Konzentrationen von Medienbestandteilen nicht mehr möglich ist. Bei einer Fermentationsmedium-Zusammensetzung von 7,8, 20 und 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ für die C-, V3- und N6-Quelle wird bereits am Maximum der Produktkonzentration gearbeitet. Durch weitere Erhöhungen von Medienbestandteilen kommen immer stärker werdende negative Einflüsse zum Tragen, die die Produktkonzentration weiter reduzieren (vgl. $C_{\text{Produkt, 20g/L N-Quelle}}$: $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $C_{\text{Produkt, 30g/L N-Quelle}}$: $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Eine weitere Erhöhung der Medienbestandteile ist auch deshalb nicht möglich, da bereits bei der höchsten Einwaage in diesem Versuch (20,0, 30,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

¹ V- und N-Quelle) keine vollständige Lösung der Einzelbestandteile erreicht werden konnte. Das Fermentationsmedium zeigte beim Rühren Schlieren, die sich nicht auflösten.

Zur Überprüfung des DoE 3 Modell wurde neben der Betrachtung der Standardgüteparameter (Verteilung der Residuen, die Anpassungsstatistik adj. R^2 und pred. R^2 etc.) die Ergebnisse des DoE 2 in den DoE 3 integriert (Abb. 24, schwarzer Rahmen). Da der DoE 3 eine Erweiterung des DoE 2 darstellt, sollten bei gleichen Einwaagen an Medienkomponenten die gleichen Ergebnisse bei der Produktkonzentration erreicht werden. Für eine C-, V-, N-Quelleneinwaage von 5, 10, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ wird in beiden Versuchen eine Produktkonzentration von $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vorausgesagt. Der DoE 3 Versuch mit dieser Medienkomposition zeigt real eine Produktkonzentration von $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und weicht somit um 8 % vom Ergebnis in DoE 2 ab. Es zeigt sich, dass die Produktkonzentrationen, die im DoE 2 unter bestimmten Einwaagen erreicht wurden, mit den gleichen Einwaagen im DoE 3 ähnliche Ergebnisse mit einer geringen Abweichung erreichen (0 - $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Abweichung in der vorhergesagten Produktkonzentration). Durch diese geringe Abweichung der Produktkonzentrationen zwischen gleichen Versuchspunkten des DoE 2 und 3, zeigt sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse. Das Modell ist zur Beschreibung der Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Fermentationsmediums geeignet und liefert reproduzierbare Aussagen.

Die notwendige Verdopplung der V-Quellenkonzentration zur Erreichung von Produktkonzentrationen $> 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ deutet darauf hin, dass die V-Quelle einen Mangel in der N-Quelle kompensieren muss und dieses auch möglich ist. Im DoE 1 war es nicht notwendig, die N- oder V-Quellenkonzentration zu ändern. Allein die Reduzierung der C-Quelle (aufgrund der Beschaffenheit der V- und N-Quelle) brachte den gewünschten Effekt der Produktkonzentrationssteigerung. Daraus wird geschlossen, dass die im DoE 1 verwendeten Chargen der V- und N-Quelle von besserer Qualität, d.h. höheren bzw. balancierten Konzentrationen an essentiellen Bestandteilen waren als die Chargen des DoE 2/3. Hierdurch wird bestätigt, dass unterschiedliche Rohstoffchargen, anders als vom Hersteller deklariert, signifikante Unterschiede in Ihrer Zusammensetzung besitzen. Diese Unterschiede in den Rohstoffchargen der komplexen Bestandteile führen dazu, dass die Produktkonzentration variiert bzw. im ungünstigen Fall zu OOS Batchen führt. Durch die hier gezeigte DoE Methodik ist es jedoch möglich diese Chargennachteile durch eine geeignete Einwaage der C-, V- und N-Quelle zu kompensieren und gleichbleibende, spezifikationskonforme Produktkonzentrationen in der Produktion zu erreichen.

4.4.6 Validierung der Ergebnisse aus dem DoE 3 Model im 5 L Maßstab

Zur Überprüfung des im DoE 3 - 30 ml Maßstab erzielten Ergebnisses ($3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produktkonzentration) wurden 3 Versuchsreihen im 5 L Maßstab durchgeführt. Eine Versuchsreihe bestand aus der Inokulation von 2 Fermentern aus der gleichen IC2 Vorkultur mit der Pelletmethode. Dabei wurde das Fermentationsmedium für jeweils einen Fermenter (Abb. 25, Fermenter a-c) nach der optimierten Zusammensetzung hergestellt. Das Medium für den Referenzfermenter beinhaltete die Standardzusammensetzung. Die im DoE 3 bestimmten optimalen Konzentrationen zum Erreichen von $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Produktkonzentration lagen bei 7,8; 20,0 und 20,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ für die C-, V3- und N6-Quelle. Für die Referenzfermenter (Abb. 25, d, e, f) wurde Fermentationsmedium entsprechend der Merz spezifischen Standardeinwaagen der C-, V3- und N6-Quelle von 10,0, 10,0 und 20,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ genutzt. Die Abbildung 25 zeigt die bei diesen Fermentationen erreichten Produktkonzentrationen.

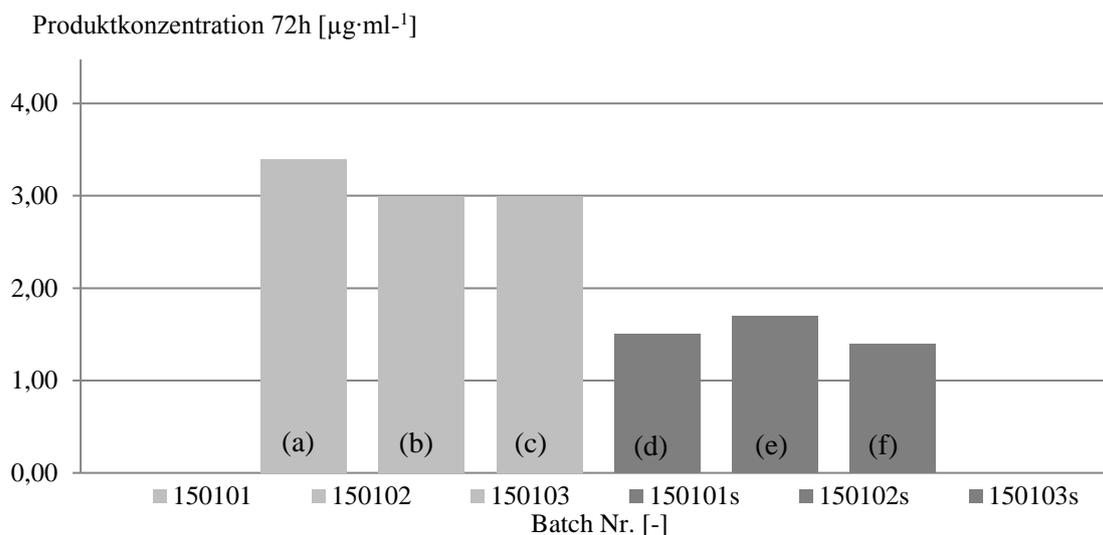


Abb. 25: biologische Replikatversuche mit optimierten Rohstoffeinwaagen basierend auf den Ergebnissen des DoE 3 (hellgrau, a, b, c) sowie der Standardfermentation nach MBR (dunkelgrau, d, e, f)

Für die nach DoE 3 optimierten Medieneinwaagen wurde ein Produktkonzentrations-mittelwert von $3,1 \pm 0,55 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erzielt. Dieser Wert entspricht einer Abweichung von ca. 6 % vom dem im DoE 3 vorausgesagten Wert. Durch diese geringe Abweichung zeigt sich, dass die Voraussage der Produktkonzentration mithilfe der DoE Methodik sehr genau und reproduzierbar ist. Die Standardfermentationen ergaben eine gemittelte Produktkonzentration von $1,5 \pm 0,49 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Sie liegen ca. 52 % unter der Produktkonzentration der Fermenter mit optimiertem Fermentationsmedium sowie direkt am OOS Schwellenwert von $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Die niedrige Produktkonzentration der Standardansätze zeigt, dass ohne eine Optimierung der Einwaage die verwendete N6- und V3-Charge zu OOS Batchen führen kann. Dies wurde im Jahr 2013 auch beobachtet. Fermentationen mit der V3-Charge führten zu OOS Batchen auf der Produktionsanlage (Tab. 3, Abb. 18).

In so einem Fall müsste die Fermentation in der Produktion so lange gestoppt werden, bis eine neue, geeignete Charge an Rohstoffen auf den Markt vorhanden ist (vgl. Abb. 18 und Tab. 3 Jahr 2014-V4N5). Dies ist für einen Produktionsbetrieb jedoch nicht akzeptabel. Durch die DoE Methodik besteht nun erstmals die Möglichkeit den Toxinherstellungsprozess kontinuierlich und unabhängig von der zur Verfügung stehenden Rohstoffchargen-Qualität durchzuführen. Der Produktionsbetrieb kann hierdurch spezifikationskonform aufrecht gehalten werden.

Die beobachtete Variabilität in der Toxinkonzentration ist auf die verwendeten Rohstoffchargen und deren Mischungsverhältnis zurück zu führen. Die verwendeten Rohstoffe sowie deren Konzentration zur Herstellung des Fermentationsmediums können für eine spezifikationskonforme Produktion durch die beschriebene DoE-Methodik optimiert werden. Durch die Methode des Animpfens (Pellet) und der Verwendung einer IC2 Vorkultur aus der späten exponentiellen Wachstumsphase kann die Variabilität der Produktkonzentration zwischen Batchen gleicher und ungleicher Rohstoffchargen weiter reduziert werden.

Es ist möglich die Toxinkonzentration zu erhöhen, wenn die C-Quelle reduziert wird. Abhängig von der N-Quellen Charge kann es vorkommen, dass die alleinige Reduzierung der C-Quellenkonzentration nicht ausreicht, um Produktkonzentrationen $> 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zu generieren. Die Erhöhung der V-Quellenkonzentration bis auf $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ermöglicht es, Produktkonzentrationen zu erreichen, die innerhalb der Spezifikationen liegen. Eine Modellerstellung mittels statistischer Versuchsplanung und dessen Nutzung zur Optimierung der Einwaage von Medienbestandteilen führt zu reproduzierbaren und erhöhten Toxinkonzentrationen im Vergleich zur Verwendung von rigiden, vordefinierten Medienbestandteils-Einwaagen.

4.4.7 Analytik der V- und N-Chargen

In DoE 2 und 3 reagierte die Produktkonzentration nicht so sensitiv auf die Kohlenstoffquellkonzentration wie im DoE 1. Um die Konzentration an diesem essentiellen Bestandteil zu bestimmen, wurden 4 Chargen der V- und 6 Chargen der N-Quelle (siehe Material und Methoden) auf ihren Kohlenhydratgehalt untersucht. Hierfür wurde zum einen die Glukosekonzentrationen in den betreffenden Chargen, sowie die Gesamtmenge an reduzierenden Zuckern bestimmt.

Die Kohlenhydratkonzentration (reduzierende Zucker) bei allen untersuchten Chargen lag zwischen 0,14 und 0,23 % (w/w). Das bedeutet, dass bei einem Gesamtvolumen von z.B. 20 L Fermentationsmedium ca. 0,7 g an Kohlenhydraten zusätzlich zu den 200 g an C-Quelle durch die V- und N-Quelle eingebracht wird. Diese Menge wird als zu gering eingeschätzt, als dass sie für den hier beobachteten Effekt der geringen C-Konzentrations sensitivität, verglichen mit DoE 1, verantwortlich gemacht werden kann. Somit ist der Effekt der geringen Produktkonzentration nicht in einer durch kohlenhydratreichen V3- und N6-Quelle zu finden. Durch Ausschluss dieser Möglichkeit wird die Produktkonzentrationsvariabilität zum überwiegenden Anteil durch die Variabilität an anderen Stoffklassen in der N- bzw. V-Quelle gesehen.

Bei der untersuchten Charge der N-Quelle (N6) stellt sich deutlich dar, dass diese ein stoffliches Defizit besitzt und die V-Quelle bis zu einem gewissen Grad in der Lage ist, dieses Defizit zu kompensieren. Die zu gering konzentrierten Stoffe in der N-Quelle müssen somit auch in der V-Quelle vorhanden sein, damit diese für die N-Quelle kompensieren kann.

Beide Rohstoffe (V- u. N-Quelle) stammen aus unterschiedlichen Organismen. Somit kann die Identifizierung der Schlüsselinhaltstoffe in der N- bzw. V-Quelle die zur Produktkonzentrationssteigerung führen, durch Vergleich dieser Chargen miteinander gefunden werden. Diese Arbeiten wurden durch GC- und LC-MS-MS Analysen begonnen (Daten nicht gezeigt), jedoch bedarf es einer wesentlich intensiveren chromatografischen Methodenoptimierung (Verbesserung der Peaktrennung) um verlässliche Aussagen treffen zu können.

Es wurden auch Rohstoffhersteller-interne Untersuchungen an den Chargen durchgeführt. Diese zeigten, dass Konzentrationsabweichung bis zu 100 % an einzelnen Bestandteilen (z. B. Spurenelemente, Aminosäuren etc.) vorlagen. Es wurden Fermentationen durchgeführt bei denen die analysierten Rohstoffchargen mit einigen der zu gering konzentrierten Bestandteile supplementiert wurden (andere Arbeitsgruppe, Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Supplementierung führte jedoch nicht zu gesteigerten Produktkonzentrationen. Dies ist u. U. dadurch bedingt, dass nicht alle, als zu gering identifizierten Stoffe supplementiert wurden (Arbeitsaufwand, Verfügbarkeit der Einzelbestandteile etc.). Auch standen nur die Stoffe zur Supplementierung zur Auswahl die identifiziert bzw. nach denen gezielt bei der Analytik gesucht wurde. Dadurch zeigt sich mitunter, dass die angewendete Analytik nicht alle Produktkonzentrations-signifikanten Stoffe enthält. Unter den theoretischen Vorbetrachtungen wurde beschrieben, dass z.B. Lysin-reiche Peptide die Toxinkonzentration steigern. Die durch den Chargenhersteller angewendete Analytik vernachlässigt jedoch Information hierüber.

Weiterhin kann die Art des Vorliegens des supplementierten Stoffs entscheidend sein, so kann u.U. Eisen nicht ohne die notwendigen Siderophore vom Organismus genutzt werden.

Ein entscheidender Beitrag in der Prozessführung würde die Verwendung eines chemisch vollständig definierten Fermentationsmediums darstellen. Durch die Verwendung dieses Fermentationsmediums erscheint eine wesentliche Reduzierung der Produktkonzentrationsvariabilität möglich. Es wird weltweit seit mehr als 60 Jahren an *Clostridium botulinum* durch unterschiedliche Gruppen geforscht. Bis heute ist es keiner dieser Gruppen gelungen ein chemisch vollständig definiertes Medium mit vergleichbaren Produktkonzentrationen zum komplexen Fermentationsmedium zu entwickeln.

4.4.8 Einfluss der Sterilisation des Mediums auf die Produktkonzentration

Alle Rohstoffchargen werden vor ihrer Verwendung in der Produktion auf ihre Eignung durch Testfermentationen im Technikum geprüft. Während des Untersuchungszeitraums zeigte sich, dass Testfermentationen im Technikum überwiegend höhere Toxinkonzentrationen liefern als in der Produktion.

Als Einflussfaktor hierfür könnte der Autoklaviervorgang in Frage kommen, da er sich zwischen Produktion und Technikum unterscheidet. In der Produktion wird bauart- und prozessbedingt das Fermentationsmedium nach der Sterilisation schneller abgekühlt als im Technikum. Um den Einfluss des Autoklavierens auf die Produktkonzentration zu bestimmen, wurden ein Fermentationsmedium mit den Chargen V4/N5 hergestellt. Die bei diesem Versuch verwendete Chargenkombination V4/N5 wurde auch in GMP Batchen des Jahres 2014 verwendet. Diese Chargen ergeben auch ohne DoE Optimierung spezifikationskonforme Batche.

Dieses Medium wurde einmal in der Produktion und einmal im Technikum sterilisiert. Die Sterilisationszeit von ca. 15 min bei 121°C ist bei beiden Autoklaven gleich lang, die Abkühlung des Mediums nach der Sterilisation in der Produktion erfolgte ca. 60 min schneller als im Technikum (1 h vs. 2 h). Zusätzlich wurde das gleiche Fermentationsmedium anstelle des Autoklavierens sterilfiltriert. Diese drei unterschiedlich sterilisierten Fermentationsmedien wurden im Technikum mit Zellen aus einer IC2 inokuliert und inkubiert. Insgesamt wurden 20 Reaktionsansätze pro Sterilisationsmethode inkubiert (insgesamt 60 Ansätze).

Die Abbildung 26 zeigt die Mittelwerte der Produktkonzentration mit Standardabweichung für die unterschiedlichen Sterilisationen. Jeder Mittelwert wurde aus den Toxinkonzentrationen von jeweils 20 Reaktionsansätzen berechnet. Die Rohdaten (60 Toxinkonzentrationswerte) zeigten anders als unter 4.2.3 auch ohne Ausreißereliminierung eine Normalverteilung. Dies

wird als weitere Bestätigung gesehen, dass die ELISA Messung bzw. die Handhabung von großen Probenanzahlen zu der unter 4.2.3 beobachteten Nicht-Normalverteilung geführt hat.

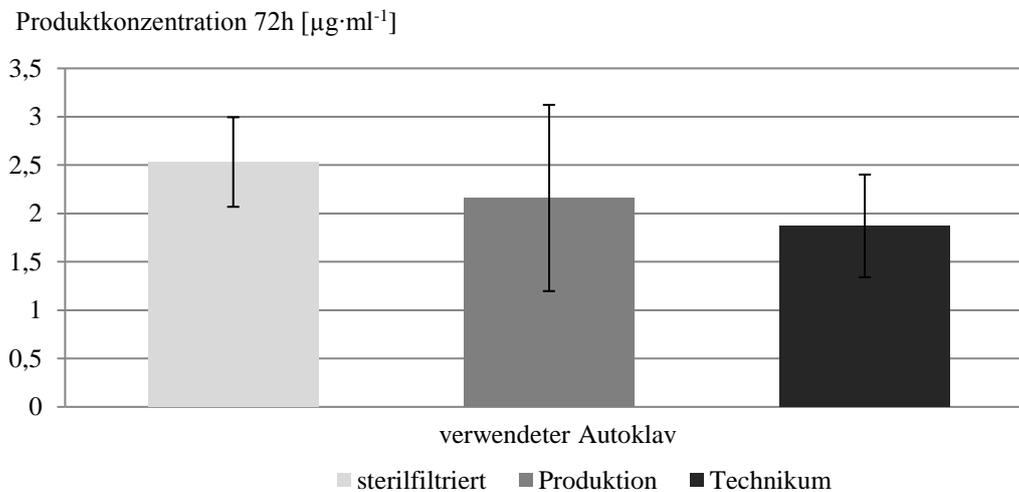


Abb. 26: erreichte Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Sterilisationsart des Fermentationsmediums

Das sterilfiltrierte Medium ermöglicht eine Produktkonzentration von $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Produktkonzentrationen für das Medium welches in der Produktion und im Technikum autoklaviert wurde, war $2,2$ und $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die höchste Produktkonzentration wurde bei dem Versuch erreicht, welcher der geringsten Hitze einwirkung ausgesetzt war (sterilfiltriert), gefolgt vom Medium welches auf Produktionsanlagen sterilisiert wurde, gefolgt vom Medium aus dem Technikumsautoklaven. Das Medium, welches im Technikumsautoklaven sterilisiert worden ist, zeigt eine $13,6 \%$ geringere Produktkonzentration als das Medium aus der Produktion. Durch die Hitze einwirkung bei der Mediensterilisation im Technikum verringert sich die Produktkonzentration um 24% gegenüber dem sterilfiltrierten Medium. Hier zeigt sich deutlich, dass Hitze einwirkung einen negativen Effekt auf das Fermentationsmedium ausübt. Je länger das Fermentationsmedium bei Temperaturen $> 80^\circ\text{C}$ verweilt, desto geringer ist die erreichbare Produktkonzentration. Bestandteile des Mediums, die für die Höhe der Produktkonzentration mitverantwortlich sind, reagieren negativ auf eine verlängerte Hitze einwirkung.

Es kann durch die beobachtete Temperaturbeeinflussbarkeit des Mediums bereits eine Stoffklasse von Inhaltsstoffen ausgeschlossen werden, die die Toxinkonzentration beeinflusst. Spurenelemente und Nährsalze z.B. in ionischer Form, reagieren nicht auf die hier vorkommenden Temperaturen. Organische Stoffe (z. B. Proteine, Vitamine etc.) sind bekannt dafür, dass sie sich bei höheren Temperaturen chemisch verändern, denaturieren können.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Produktkonzentration sinkt je länger das Fermentationsmedium einer hohen Temperatur ausgesetzt ist, werden diese organischen Einzelbestandteile des Fermentationsmediums als wesentliche Einflussfaktoren auf die Höhe der Produktkonzentration gesehen. Kürzere Aufheiz- und Abkühlungsphasen beim Autoklavieren führen zu höheren Produktkonzentrationen. Somit sind spezifische Konzentrationen an temperatursensitiven Stoffen (z.B. Vitamine) Schlüsselbestandteile der V- und N-Quelle für eine innerhalb der Spezifikation liegende Produktkonzentration.

4.5 Infrarotspektroskopie

In den Kapiteln 4.1-4.4 wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Produktkonzentration untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch eine erhöhte Standardisierung von Arbeitsmethoden sowie durch Anpassung der Fermentationsmedien-Zusammensetzung die Produktkonzentration gesteigert, bzw. das Auftreten von OOS Batchen verhindert sowie die Produktkonzentrations-Variabilität verringert werden kann. Durch die Anwendung der erarbeiteten Methoden kann bereits vor der Durchführung einer Fermentation Einfluss auf die Produktkonzentration genommen werden. Es ist nun möglich spezifikationskonforme Fermentationen durchzuführen, auch wenn Medienbestandteile eine unzureichende Qualität aufweisen. Dies ist das erste Mal im Produktlebenszyklus, dass eine gewünschte Produktkonzentration gezielt erreicht werden kann. Quantitative und qualitative Faktoren können durch das vertiefte Prozessverständnis so eingestellt werden, dass die Fermentation innerhalb des spezifizierten Konzentrationsbereichs liegt.

Die in Kapitel 4.4 beschriebene DoE Methodik ist essentiell für die Bewertung der Qualität einer Rohstoffcharge bzw. zur Einschätzung ob die verwendeten Chargen spezifikationskonforme Batche hervorbringt. Eine weitere Methode zur Charakterisierung von Rohstoffchargen ist die Spektroskopie.

Hierfür soll untersucht werden, ob durch die mIR Spektroskopie in Verbindung mit multivariater Datenanalyse eine Unterscheidung zwischen Rohstoffchargen möglich ist, die spezifikationskonforme und nicht-spezifikationskonforme Produktkonzentrationen liefern werden. Eine spektroskopische Messung ist innerhalb von einer Minute durchgeführt, die Ergebnisse stehen sofort zur Verfügung. Eine Entscheidung über die Verwendung der untersuchten Charge kann unmittelbar, bereits bei der Warenannahme getroffen werden. Der personelle Aufwand und die Belegung von Geräten und Laboren sind minimal.

4.5.1 Chargenunterschiede innerhalb einer Rohstoffgruppe

Wie unter 4.4 beschrieben, gibt es N- und V-Quellen Chargen die dafür verantwortlich sind, dass die Produktkonzentration außerhalb des spezifizierten Produktkonzentrations-Bereichs liegt. Um mehr über die Zusammensetzung der komplexen Medienchargen in Erfahrung zu bringen, wurde die mIR Spektroskopie eingesetzt.

Die mIR Spektroskopie eignet sich um Bestandteile, auch in einer komplexen Matrix quantitativ und in Echtzeit zu bestimmen. Ziel ist es, charakteristische Eigenschaften der komplexen Rohstoffmischung zu bestimmen und mit möglichst geringem instrumentellen, zeitlichen sowie personellen Aufwand Rohstoffchargen zu identifizieren, die eine erfolgreiche Fermentation liefern werden. Diese Rohstoffanalyse der Inhaltsstoffe stellt eine Alternative zur vergleichsweise aufwendigen DoE Methodik dar, um Chargen zu identifizieren, die erfolgreiche Batche auf Produktionsanlagen liefern.

N-Quelle

Die Abbildung 27 a zeigt die nicht vorverarbeiteten Spektren, der mittels ATR-mIR Methode gemessenen Rohstoffchargen der N-Quelle. Die Peakhöhen variieren in den einzelnen Spektren (Abb. 27 a). Weiterhin entsteht gerätebedingt eine Basisliniendrift der spektralen Daten. Diese Variationen sind zum einen durch die Konzentrationsunterschiede der strahlungsabsorbierenden Bestandteile in den Proben bedingt, zum anderen kommen sie durch die verwendete Messtechnik, Umgebungsbedingungen, Probenauftrag usw. zu Stande. Dadurch können absolute Peakhöhen ein fehleranfälliges Kriterium zum Vergleich von Spektren bei dieser Messtechnik sein.

Aus diesen Gründen wurde die 1. Ableitung der Spektren berechnet (Abb. 27 b). Bei den Daten der 1. Ableitung ist das Peakmaximum die Stelle in den Rohdaten, bei denen der Anstieg maximal ist. Somit ist das Peakmaximum bei den Rohdaten (höchste Konzentration) in Spektren der 1. Ableitung 0. Dadurch werden Konzentrations-Messfehler die aufgrund von durchstrahlter Schichtdicken-Inhomogenität entstehen, entfernt. Der Einfluss der absoluten Konzentrationshöhe als Parameter auf die spätere Probengruppierung verringert sich. Dennoch bleibt die Stoffkonzentrations-Information in den Spektren enthalten, da ein steiler Anstieg höhere Konzentrationen repräsentiert als ein flacher Anstieg. Der Anstieg ist auch ein geeigneter Parameter um kleine Peaks zu identifizieren.

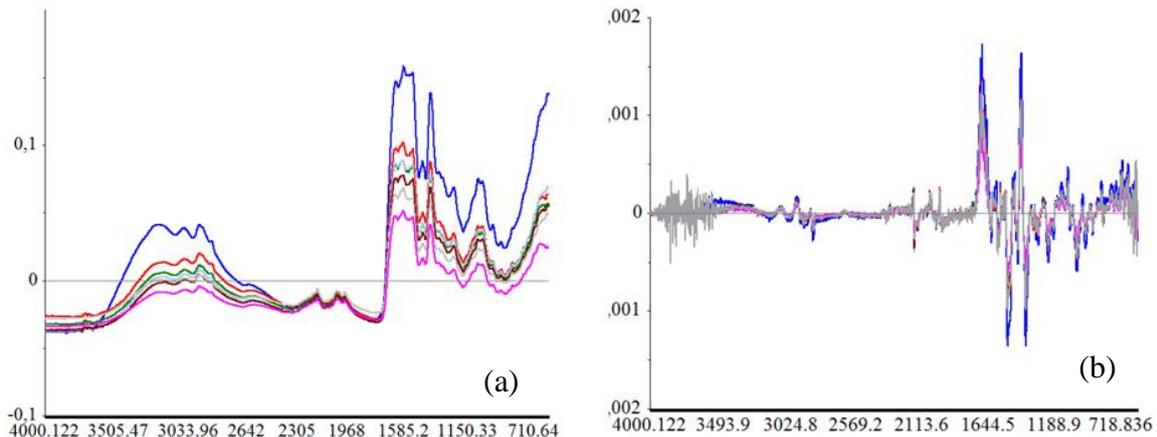


Abb. 27: a) Rohdaten der mIR Messung der N-Quelle, b) mittels der 1. Ableitung vorverarbeitete Daten

Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA) werden die vorverarbeiteten Spektren aus Abb. 27 b miteinander verglichen und die Varianzen im Spektrum betrachtet. Ist ein Peak an einer spezifischen Position, mit einer bestimmten Ausprägung im Spektrum vorhanden so ist ein bestimmter Analyt bzw. eine bestimmte funktionelle Gruppe in Molekülen der Probe vorhanden. Hierdurch werden Spektren mit Peaks an ähnlichen Positionen in ähnlicher Höhe, enger im Score-Plot der PCA zusammenliegen als Spektren die unterschiedlicher sind.

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse von Spektren unterschiedlicher Chargen der N-Quelle durchgeführt. Das Ergebnis der PCA ist in Abb. 28 als Score Plot dargestellt. Dabei beschreiben 2 Hauptkomponenten 94 % der in den Daten gefundenen Variabilität zwischen den Spektren. Jeder einzelne Punkt im Score Plot entspricht einem mit der 1. Ableitung vorverarbeitetem mIR Spektrum einer N-Quellen Chargen.

Es sind 3 Gruppen in Abb. 28 zu erkennen. Die erste Gruppe befindet sich im 3. Quadranten (Q3), die zweite Gruppe findet sich im 1. und 2. Quadranten und die dritte Gruppe liegt im 4. Quadranten des Scoreplots. Die Gruppe (Q3) besteht aus den N-Chargen, die im Technikum sowie in der Produktion gute Ergebnisse der Toxinkonzentration lieferten ($> 2,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In der 2. Gruppe (Q1/2) befinden sich N-Chargen die ‚mittelmäßige‘ Ergebnisse in der Produktion und dem Technikum brachten, u. a. auch die N-Charge aus dem DoE 2 die $2,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ergab. Die Gruppe (Q4) beinhaltet die N-Charge die in der Produktion $0,90 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ergab und somit als ‚schlecht‘ deklariert wird.

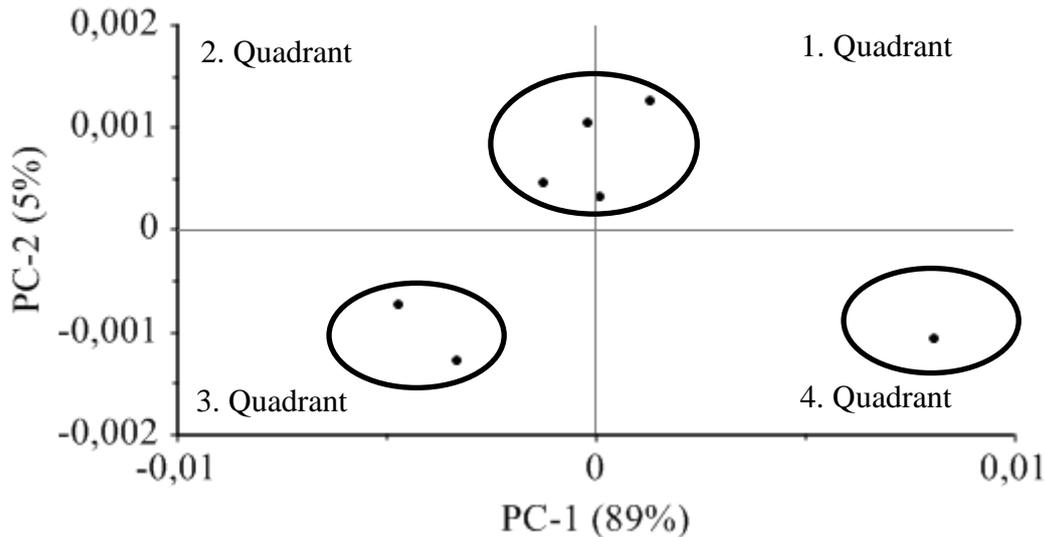


Abb. 28: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse (PC- principal components) innerhalb der Gruppe der N-Quelle, mit den Gruppen Q3 (gute Charge), Q1/2 (mittelmäßige Charge) und Q4 (schlechte Charge)

Es ist aus Abb. 28 zu erkennen, dass die Chargen entsprechend Ihrer Qualität entlang der ersten Hauptkomponente aufgespannt werden. Die Chargen geringster Qualität weisen einen positiven Score-Wert (+ 0,008) auf, die Chargen höchster Qualität haben einen negativen Score-Wert (- 0,005) auf der x-Achse des Score Plots. Zwischen den ‚Guten‘ und den ‚schlechten‘ Chargen liegen die ‚mittelmäßig‘ erfolgreichen Chargen. Durch den geometrischen Abstand sowie dem Gegenüberliegen der ‚guten‘ und ‚schlechten‘ Chargen im Scoreplot erkennt man, dass chemische, durch die mIR Spektroskopie detektierbare Unterschiede zwischen diesen Gruppen bestehen. Diese Unterschiede beruhen auf dem Vorhandensein bzw. Fehlen sowie auf unterschiedlich hohen Konzentrationen an funktionellen Gruppen in den gemessenen Proben.

Die guten Chargen (Q3) bedürfen keiner Anpassung der Fermentationsmedien-Zusammensetzung und können sofort für die Fermentation verwendet werden ($c_{\text{Toxin}} > 2,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Abb. 18 Charge N5). Bei der ‚schlechten‘ Charge führte die DoE Methode zu keiner Konzentrationen $c_{\text{Toxin}} > 3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Es war ausschließlich eine Steigerung von $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ auf $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ möglich (DoE Versuch). Die ‚mittelmäßige‘ Charge N6 ($c_{\text{Toxin}} < 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) brachte hohe Produktkonzentrationen ($c_{\text{Toxin}} > 3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) wenn die V-Quellen-Konzentration im Fermentationsmedium verdoppelt wurde (siehe DoE Versuche). Somit kann eine Rohstoffcharge, die unzureichend hohe Produktkonzentrationen liefert durch Addition von anderen Rohstoffen bzw. durch Erhöhung der Einzelbestandteile im Fermentationsmedium verbessert werden.

Durch die mIR Spektroskopie können die eingesetzten Rohstoffe eingruppiert und einfach vom Benutzer bewertet werden. Hierdurch ist es möglich, Rohstoffchargen entsprechend ihrer Qualität für die Herstellung von Fermentationsmedium freizugeben bzw. zu sperren. Die mIR Analytik kombiniert mit der Hauptkomponentenanalyse liefert mehr Information und ist ein besseres Werkzeug zur Beurteilung der Rohstoffchargen-Qualität als das derzeit vom Hersteller bereitgestellte Analysenzertifikat (siehe Anhang). Weiterhin ermöglicht ein Arbeitsaufwand von ca. 1 Tag (mIR Messung) Aussagen zu treffen, die sonst ca. 4 Wochen dauern (2 Wochen Testfermentation + 2 Wochen externe Analytik). Somit können durch die hier gezeigte mIR Methodik Kosten, Zeit und Aufwand eingespart werden, um die zu Verfügung stehenden Rohstoffchargen der N-Quelle auf ihr zukünftiges Ergebnis beim Einsatz als Fermentationsmedium-Bestandteil zu überprüfen.

Die mIR Methodik kann komplementär zur DoE Methodik verwendet werden. Sollte die Chargen-Gruppierungen einer neuen N-Charge zur Gruppe Q1/2 oder Q4 erfolgen, kann anschließend ein DoE Experiment durchgeführt werden um optimierte Einwaagen für diese distinkte Charge zu ermitteln die spezifikationskonforme Produktkonzentrationen liefern werden. Sollten Rohstoffe in die Gruppe Q3 fallen, kann die GMP-Fermentation unmittelbar mit diesen Chargen erfolgen, ohne weitere Untersuchungen durchzuführen.

Die hier gezeigten Ergebnisse beinhalten alle zur Verfügung gestandenen Chargen, von denen mIR Spektren aufgenommen wurden. Um eine ausreichende Verlässlichkeit der Vorhersage zu gewährleisten, muss über den gesamten Produktlebenszyklus eine kontinuierliche Chargenbeobachtung und Methodvalidierung erfolgen. So muss jede neue Charge mittels mIR vermessen und das Spektrum in die bestehende Hauptkomponentenanalyse integriert werden. Aufgrund der Gruppierung des neu eingefügten mIR Spektrums (Charge) in die PCA kann das weitere Vorgehen bei dieser spezifischen Charge geplant werden.

Charakteristische Eigenschaften der N-Quelle

Der in Abb. 28 dargestellte Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse zeigt die Ähnlichkeitsbeziehung der gemessenen ATR-Spektren für unterschiedliche N-Quellenchargen zueinander. Er zeigt eine Gruppierung von Spektren die ähnliche Eigenschaften besitzen und ordnet mIR Spektren, die stark verschieden voneinander sind, weiter entfernt an. Der in Abb. 29 dargestellte Loadings-Plot stellt die Wellenlängen dar, aufgrund derer die Gruppierung und Anordnung der Spektren im Score-Plot erfolgte. Er beschreibt die Eigenschaften des mIR-Spektrums aufgrund derer die Trennung der Proben im Score-Plot

durchgeführt wurden ist. Dabei ähnelt der Loading-Plot für spektrale Daten selbst einem Spektrum.

Die erste Hauptkomponente (Abb. 28) beschreibt die Unterschiede der N-Chargen, die mit der Höhe der Produktkonzentrationen korrelieren. Der Loadings-Plot der ersten Hauptkomponente (Abb. 29) zeigt die Wellenzahlen, die zur Trennung der Proben in Abb. 28 führte. Dabei sind Peaks verschiedener Höhe- positive und negative Loadingwerte bei spezifischen Wellenzahlen- für die Trennung zwischen guter, mittlerer und schlechter N-Charge verantwortlich. Die Loadings die nahe an der Nulllinie verlaufen, besitzen nur geringen Einflusscharakter auf die Gruppierung in Abb. 28.

Die Tabelle 6 listet die Wellenzahlen auf, die einen signifikanten Einfluss auf die Gruppierung und Trennung der N-Quelle besitzen (abgelesen aus dem Loadingsplot Abb. 29). Dabei stellen die in Tab. 6 gezeigten Wellenzahlen ausschließlich potentielle Gruppenschwingungen dar, da es sich bei den untersuchten Proben um Stoffgemische und keine Reinstoffe handelt. mIR Peaks von Substanzmischungen beinhalten eine Vielzahl von überlagernden Gruppenschwingungen, die sich verstärken, auslöschen und kombinieren können. Das charakteristische Spektrum in Abb. 29 stammt zudem aus den vorverarbeiteten Daten. Somit sind die dargestellten Peakmaxima in Abb. 29 die Stellen im Spektrum mit dem höchsten Anstieg. Es ist dennoch möglich, spezifische Gruppenschwingungen zu identifizieren, da Gruppenschwingungen sich über Bereiche im Spektrum erstrecken und bzw. nur vereinzelt als scharf getrennte Peaks erscheinen.

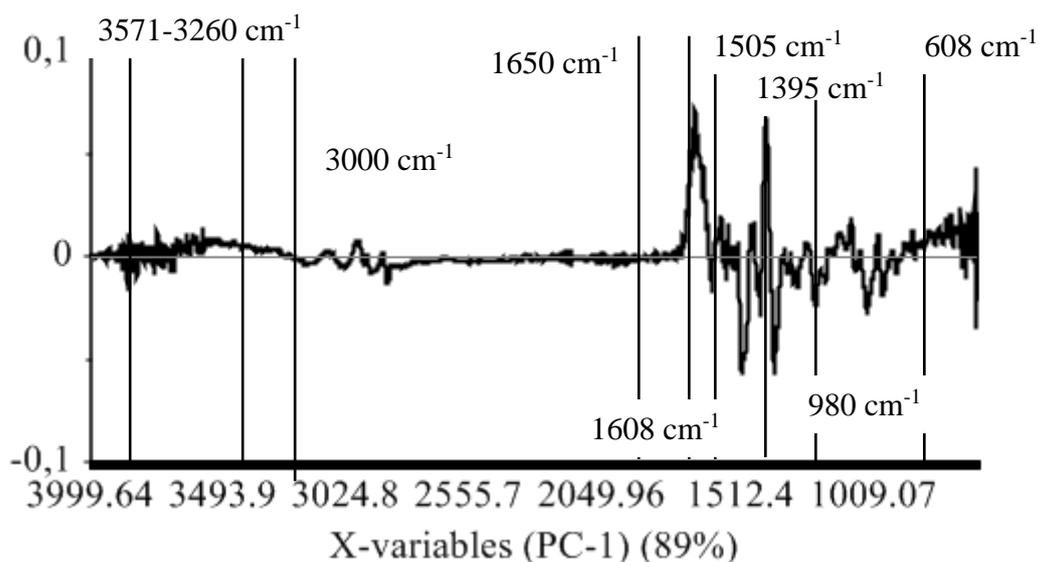


Abb. 29: Loadings Plot für die 1. HK zur Trennung zwischen guter, mittlerer und schlechter N-Quellen Charge

Die Spalte „Einfluss“ in Tab. 6 zeigt durch ‚+‘ ein positives Loading bei der Wellenzahl, durch ein ‚-‘ wird ein negatives Loading gekennzeichnet (Loading der 1. HK, Abb. 29). Dabei wird die beobachtete Stärke der Ausprägung der Variable durch ‚-, --, ---, +, ++, +++‘ beschrieben. Je größer eine Peakausprägung (positiv oder negativ) ist, desto stärker beeinflusst diese Variable die Trennung der Proben im Score-Plot.

Die guten N-Quellen Chargen befinden sich im Score-Plot auf der negativen Seite. Deshalb muss zur Interpretation der dargestellte Loadings-Plot invertiert werden. Unter Zuhilfenahme der in Tab. 6 dargestellten Gruppenschwingungen lassen sich folgende Unterschiede für gute N-Quellen Chargen beschreiben:

Für gute N-Quellen Chargen gilt:

- dass weniger organische Säuren und oder freie Aminosäuren gegenüber schlechten Chargen (3000 cm^{-1}) sowie weniger Wasserstoffbrückenbindungen ($3571 - 3260\text{ cm}^{-1}$) vorhanden sind.
- dass weniger primäre Amide vorkommen ($1653 - 1640\text{ cm}^{-1}$), u. u. ein Indiz dafür, dass bei guten Chargen die Amide I Bindung spektroskopisch schlechter zugänglich ist (ganze Proteine anstelle von vielen einzelnen Peptiden) → Hydrolysegrad der N-Quelle u. U. ein wichtiger Qualitätsparameter, Temperatureinfluss beim Sterilisieren des Fermentationsmediums zeigt, dass geringere Hitze Einwirkung - geringere Proteindenaturierung - zu höheren Produktkonzentrationen führt
- dass mehr sekundäre Amide vorkommen ($1630 - 1600\text{ cm}^{-1}$)
- dass die Konzentrationen an monosubstituierte Amidien und/oder Pyridienen (z. B. Nukleotiden) geringer ist als bei schlechten Chargen (Amide II Peak 1541 cm^{-1})
- enthalten bestimmte Arten von Aminosäuren oder Proteinen, da der Amid I Peak negativ aber Amid II Peak positiv bei guten Chargen ausgeprägt ist
- enthalten mehr aromatische Verbindungen (1505 cm^{-1})
- besitzen allgemein weniger Ester und/oder Laktone (1395 cm^{-1})
- enthalten mehr sekundäre Alkohole (980 cm^{-1})
- enthalten weniger aliphatische u. verzweigte Carbonsäuren (608 cm^{-1})

Tab. 6: Zusammenfassung der Wellenzahlen, die einen signifikanten Einfluss auf die Trennung zwischen der N-Quelle haben. Die assoziierten Gruppenschwingungen sind u.U. hypothetischer Natur, da es bei Stoffgemischen (wie die hier gemessenen) zu Gruppenschwingungsüberlagerung und Verschiebungen kommen kann.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Gruppenschwingung	Einfluss (Loadinghöhe)
3571-3260	O-H Brückenbindung	+
3000	O-H Karbonsäuren, freie Aminosäuren	+
1653-1640	konjugierte Doppelbindungen, Amide (I)	+++
1630-1600	Amide (II)	-
1505	Aromaten	+++
1458	-CH ₃	++
1378-1400	Ester, Alkohole, Laktone	+++
980	sek. Alkohole	-
608	aliphatische u. verzweigte Carbonsäuren	+++

Die hier angewendete ATR mIR Spektroskopie befindet sich von ihren Möglichkeiten bei dieser Untersuchung bereits am Limit des Messbaren. Die Messung erfolgte unter der Verwendung eines mIR Diamantkristalls, welcher über Spiegel mit mIR Strahlung versorgt wurde. Vorversuche (nicht gezeigt) haben ergeben, dass faseroptische ATR-Sonden zu viel Energie absorbieren, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Somit bewegt sich der messtechnische Versuchsaufbau bereits an den Grenzen des derzeit Machbaren. Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass andere spektroskopische Methoden (UV/Vis, Raman und 2D Fluoreszenz) eine bessere Sensitivität aufweisen können.

Trotz dieser Widrigkeiten ist es gelungen, gute N-Chargen von schlechten mittels Echtzeitspektroskopie zu unterscheiden. Es sollte nun möglich sein im Vorfeld einer Fermentation die verwendete N-Charge auf ihrer Eignung zu untersuchen ohne die definierte stoffliche Zusammensetzung zu kennen oder Testfermentationen durchführen zu müssen. Dadurch wird ein Maximum an personellem sowie zeitlichem und materiellem Aufwand eingespart. Durch die so erreichte Rohstoffcharakterisierung kann dem Auftreten von OOS Fermentationen entgegengewirkt werden. Es kann vor der Fermentation eine geeignete Rohstoffcharge –falls vorhanden- ausgewählt werden, die Produktkonzentrationen innerhalb des spezifizierten Bereichs liefern wird. Sollte keine bessere Rohstoffcharge zur Verfügung stehen, kann mithilfe der DoE Methodik eine optimale Einwaagemenge der Einzelbestandteile des Fermentationsmediums bestimmt werden, die Produktkonzentrationen innerhalb der Spezifikation liefern wird.

Für die V-Quellen Charge wurden die gleichen mIR spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Auch hier konnten die analysierten Chargen gruppiert und mit der Endproduktkonzentration korreliert werden. Da jedoch zu wenig unterschiedliche Chargen zur Verfügung standen, die gemessen werden konnten (3 Chargen), wurden diese Ergebnisse nicht dargestellt. Je mehr unterschiedliche Proben, die alle Eventualitäten abdecken, zur Verfügung stehen, desto verlässlicher ist die Aussage der Hauptkomponentenanalyse.

Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich folgern, dass die spektralen mIR Abweichungen (Absorptionen) innerhalb der Rohstoffgruppe der N-Quelle gering sind, da die Skala des Loadingsplot (y-Achse) sehr klein ist (Werte von $\pm 0,1$). Das heißt nicht, dass diese geringen Unterschiede von Charge zu Charge vernachlässigbar sind (siehe DoE Versuch), jedoch zeigt sich dadurch, dass die mIR-spektroskopisch zugänglichen Variablen nur eine geringe IR-Sensitivität besitzen. Mit fasergekoppelten Sonden konnte aufgrund der verringerten mIR Strahlungsintensität keine Unterscheidung durchgeführt werden. Es war notwendig den ATR Diamantkristall direkt über Spiegel in den Strahlengang einzukoppeln um den Energieverlust der bei Fasersonden auftritt, zu vermeiden und somit die Sensitivität zu erhöhen.

Aufgrund der geringen Signalintensität ist es besser, für die Unterscheidung innerhalb einer Rohstoffgruppe mit der hier gezeigten geringen Signalvarianz andere Messverfahren anzuwenden. Dafür werden nasschemische Methoden/ (Summen)-Parameter zur Testung empfohlen (HPLC-Analytik, Leitfähigkeit, Osmolarität usw.). Diese Parameter sind aufwendiger zu bestimmen, jedoch wesentlich robuster, verglichen mit mIR Spektren aus Stoffgemischen.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Produktkonzentration bei der Botulinium-Toxin-Herstellung identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die optische Dichte des Inokulums, und hier insbesondere die Wachstumsphase aus der die Vorkultur entnommen wird, einen großen Einfluss auf die Variabilität des Prozesses hat. Durch Änderung der Animpfmethode hin zur Pelletierung der Zellen kann der Prozess optimiert und die Variabilität reduziert werden (Methode 1). Da diese Methodik u.U. in der Produktion schwierig durchzuführen ist, sollte durch akribisches konstant halten der qualitativen und quantitativen Eigenschaften des Stoffstroms des Inokulums auch mittels der Liquid-Methode eine Reduzierung der beobachteten Produktkonzentrations-Variabilität möglich sein. Eine

Toxinkonzentrationssteigerung ist bei diesem Prozessschritt nur möglich, wenn das verbrauchte IC2 Vorkulturmedium vor der Inokulation der Fermenter abgetrennt wird.

Es wurde ein negativer Einfluss des Autoklavierens auf das Fermentationsmedium beobachtet. Dieser Einfluss ist jedoch stärker bei Medien die im Technikum autoklaviert werden als auf den Produktionsanlagen. Die Sterilfiltration des Fermentationsmediums ist unter Beibehaltung der derzeit verwendeten Rohstoffe eine geeignete Möglichkeit die Produktkonzentration zu erhöhen.

Einen erheblichen Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration haben die unterschiedlichen Rohstoffchargen aus denen das Fermentationsmedium hergestellt wird. Um die Qualität der zur Verfügung stehenden N-Quellen Charge zu beschreiben und deren Einfluss auf die Höhe der Produktkonzentration in Erfahrung zu bringen, ist die ATR-mIR-PCA ausreichend geeignet (Methode 2). Aufgrund der geringen Signalintensität bei der ATR Messung ist u.U. ein anderer Messaufbau (z.B. Transmissionszelle) besser geeignet um diese zu steigern. Sollte durch die mIR Messung gezeigt werden, dass die Rohstoffe keine ausreichende Qualität besitzen, können mittels DoE, Kombinationen der vorhandenen Chargen ermittelt werden, die ein spezifikationskonformes Produktionsergebnis liefern (Methode 3). Falls eine solche Kombination nicht gefunden werden kann, können einzelne Inhaltsstoffe hinzugesetzt werden, welche die Zusammensetzung der mangelhaften Rohstoffchargen verbessern (Methode 4, nicht dargestellt aufgrund einer beabsichtigten Patentanmeldung).

Es wurde in dieser Arbeit ein „modulares“ System entwickelt, um die Fragestellung der schwankenden Toxinkonzentration zu adressieren. Jede der drei beschriebenen Methoden (Animpfmethode, mIR-Methode, DoE-Methode) kann alleinstehend Anwendung finden. Sie können jedoch auch in beliebiger Kombination oder auch vollständig, gemeinsam implementiert werden und liefern nicht redundant verbesserte Ergebnisse in der Produktion.

Die beobachtete extreme Variabilität der Produktkonzentration kann nur durch die in den Fermenter eintretenden Ströme des Inokulums und des Fermentationsmediums bedingt sein. Neben dieser ist die organismen-spezifische, inhärente Variabilität nicht für die aufgetretenen OOS Ergebnisse der Produktkonzentration verantwortlich. Die Toxinkonzentration kann durch Anpassung der in den Fermenter eintretenden Stoffströme geändert werden bzw. auch durch die prozesstechnische Einflussnahme während der Fermentation (z. B. Rühren des Fermenters, keine Standardvorgehensweise, nicht gezeigt). Die hier erarbeiteten Methoden zeigen sehr gute Ergebnisse in Hinblick auf die Veränderung der Endproduktkonzentration und ermöglichen

eine große Freiheit in der Parameterwahl und Einstellung (Design Space) von Prozessgrößen. Sie stellen jedoch einen massiven Eingriff in den etablierten Prozess dar und sind deshalb nur mit hohem Aufwand in einem zugelassenen Prozess zu implementieren (GMP Change Control Verfahren, behördliche Einreichung einer Variation zur Genehmigung des veränderten Herstellungsverfahrens).

Der Technikumsmaßstab (5 L) zeigt, dass es durch die empirische Modellerstellung (DoE) möglich ist, unzureichende Medienchargen (V- und N-Quelle) so zu kombinieren, dass spezifizierte Produktkonzentrationen erreicht werden können. Dies gilt gerade auch für Medienchargen die nach dem Standardfermentationsverfahren OOS Ergebnisse liefern.

Die mIR spektroskopische Analyse von Rohstoffchargen erlaubt es, Medienchargen ohne Fermentationen zu charakterisieren bzw. in potentiell gute und schlechte Chargen zu gruppieren. Der Arbeitsaufwand ist gering und der Ablauf schnell und einfach vom Benutzer durchzuführen. Es bedarf jedoch einer geeigneten Datenbank, die aus vielen unterschiedlichen Medienspektren besteht, um robuste Voraussagen zu treffen.

Allein die Information über gute oder schlechte Medienchargen reicht nicht aus, um erfolgreiche Batche zu produzieren. So zeigt die DoE Methodik was geschehen muss, falls schlechte Chargen mittels mIR identifiziert worden sind. Falls mehrere unterschiedliche Medienchargen zur Verfügung stehen, kann auch versucht werden Chargen gegeneinander auszutauschen bzw. passend zu kombinieren.

Es wurde eine 4. Methode entwickelt und von 2 unabhängigen Gruppen erfolgreich getestet. Eine explizite Darstellung dieser Methode konnte in dieser Arbeit nicht erfolgen, da eine Patentanmeldung hierüber erfolgen wird. Die Methode beruht auf der Supplementierung von schlechten Rohstoffchargen mit geeigneten Komponenten. Diese Methodik stellt einen direkten Eingriff in die Fermentation dar und bedarf weder der DoE-, Animpf- oder mIR-Methode als Vorarbeit. Sie ist flexibel bei Bedarf einsetzbar und erscheint essentiell um die auftretende Produktkonzentrationsvariabilität signifikant zu reduzieren.

Die hier gezeigten Daten der Produktkonzentration-Steigerung durch optimale Rohstoffchargenkombination sind vielversprechend. Die DoE Methodik macht den Herstellungsprozess unabhängig von der Chargenqualität und gewährleistet Fermentation die kontinuierlich innerhalb der Spezifikationen liegt. Durch Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wird erwartet, dass es zu keinen OOS Ergebnissen aufgrund zu niedriger Toxinkonzentrationen kommt.

Ein kritischer Parameter der weiter untersucht werden sollte, ist die Messvariabilität der extern durchgeführten ELISA Methode, die bei der Analyse von 72 h Fermenterproben Anwendung findet. So erscheint es sinnvoll, Proteaseinhibitoren zu testen, die nach der Probennahme zu diesen zugegeben wird, um Toxinkonzentrations-Ergebnisse zu erhalten, die in Replikatmessungen weniger schwanken.

Parallel dazu erscheint die Anschaffung eines mIR Gerätes ratsam, wenn weiter auf diesem Gebiet gearbeitet werden soll. Das mIR Spektrometer wurde in dieser Arbeit für 3 Monate geliehen. Dieses Zeitintervall ist zu klein, um mehrere Replikatversuche durchzuführen. Weiterhin stehen unterschiedliche Medienchargen nur in bestimmten Zeitspannen zur Verfügung. Es ist jedoch essentiell, eine Spektrenbibliothek aufzubauen, die möglichst viele unterschiedliche Chargen enthält. Auch wenn eine Spektrometerintegration in den Fermentationsprozess (Online-Prozessverfolgung) nicht in absehbarer Zeit realisiert werden soll, so kann die Zeit bis dahin genutzt werden, die Bibliothek aufzubauen.

Die Notwendigkeit der Referenzbibliothek bei der Mediencharakterisierung gilt auch bei der Online-Überwachung des Fermentationsprozesses. Dabei sollen kontinuierlich spektrale Daten der Veränderung der Fermentationssuspension aufgenommen werden. Durch den Vergleich dieser Echtzeitdaten mit bereits vorhandenen Daten aus früheren Fermentationen, bei denen der Batchserfolg bekannt ist, lässt sich der Fermentationserfolg der gerade durchgeführten Fermentation besser einschätzen (golden batch trajectory). So sollte als nächster Schritt, im Produktionsfermenter, eine mIR Sonde verwendet werden, um eine Echtzeit Prozessverfolgung zu ermöglichen und Prozessdaten zu sammeln. Ein eventuell angeschafftes mIR Spektrometer kann auch dual genutzt werden. So erfolgt die Spektrenaufnahme in der Produktion, wenn GMP Batche durchgeführt werden (Erarbeitung von golden batch trajectories und dadurch erfolgende Echtzeitprozesskontrolle). In der übrigen Zeit kann das Spektrometer verwendet werden, um Rohstoffchargen zu katalogisieren und eine Bibliothek aufzubauen.

Eine Schlüsselaufgabe besteht in der Identifizierung von Markermetaboliten, die während der Fermentation sezerniert werden, um eine mechanistische Echtzeitprozessverfolgung zu ermöglichen und die spektroskopischen Daten mit diesen Metaboliten zu korrelieren. Bis jetzt gestaltete sich dieses Vorhaben als schwierig. Es wurden jedoch erste Ergebnisse mit GC- und LC-MS-MS Methoden erreicht (nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte ein Focus auf der Verbesserung der chromatografischen Trennung bzw. der Probenvorbereitung (Entfernung von Phospholipiden) und der Detektion gelegt werden (angemessenes Equipment, DAD-Detektor etc.).

Anhang

Certificate of Analysis

Product Name	:		Manufacture Date	:	2011/07/26
Catalog Number	:				
Batch Number	:	1243184			
Expiration Date	:	2013/07/31			

01. Dehydrated Appearance: Tan, free-flowing, granules.
02. Solubility: 1, 2 and 10% solutions, soluble in distilled or deionized water.
03. Solution Appearance 1%: Light to medium amber, clear.
04. Solution Appearance 2%: Medium amber, clear.
05. Solution Appearance 10%: Medium to dark amber, slightly opalescent to opalescent with a precipitate.
06. Cultural Response: This lot was tested and found satisfactory for fermentable carbohydrate (negative) and production of indole, acetylmethylcarbinol and hydrogen sulfide (all positive). In addition, the following growth response was obtained:

TEST ORGANISMS	ATCC®	RECOVERY
Escherichia coli	25922	good
Staphylococcus aureus	25923	good

07. Residual Solvents (CPMP/ICH/283/95): Typical Analysis indicates that there is less than 5000 ppm 1-Butanol, less than 3880 ppm Cyclohexane, less than 5000 ppm Pentane and less than 890 ppm Toluene. No other solvents were detected during analysis.

The test methods for characteristics listed below are:
Nitrogen (Kjeldahl)
Amino Nitrogen (Modified Sorenson)

Characteristic	Unit	Value	LowLimit	HighLimit
pH at 25°C :		7.3	7.2	7.6
Nitrogen :	%	13.2	10.0	50.0
Amino Nitrogen :	%	3.9	3.1	4.8
Loss on Drying :	%	3.0		5.0
Bulk Lot Number:	-			

Animal Source	Country of Origin	Tissue Category		
		BIC	SIC	ABC

The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label.

Abb. 30: Analysenzertifikat des Herstellers für einen in der Fermentation eingesetzten Rohstoff

Aufbau und Funktion des in dieser Arbeit verwendeten FT-IR Spektrometers

Das Kernstück eines FT-IRs ist das Interferometer z.B. nach Michelson (Abb. 32). Eine Quelle emittiert mIR Strahlung (Wellenlängen mit spezifischer Amplitude/Intensität) welche auf einen Strahlenteiler trifft. Dieser Strahlenteiler ist ein halbdurchlässiger Spiegel. An diesem wird ein Teil der Strahlung zum festen Spiegel durchgelassen ein anderer Teil zum beweglichen Spiegel reflektiert. Bis zu diesem Punkt besitzen die geteilten Strahlen die gleiche Amplitude und haben keine Phasenverschiebung. Die Wellentäler und Berge sind Deckungsgleich. Bei einem Messdurchlauf (Scan) wird die Position des beweglichen Spiegels verändert. Diese Wegstreckendifferenz bewirkt eine Phasenverschiebung des Lichts welches vom beweglichen Spiegel kommt. Im Strahlenteiler werden nun die beiden Strahlen (gleichgebliebene Phase vom festen Spiegel, u.U. veränderte Phase vom beweglichen Spiegel) rekombiniert. Je nach Größe der Phasenverschiebung kann es bei den beiden Extremfällen zur totalen Auslöschung (Nulllinie) oder Verstärkung kommen (Amplitude von 2). Bei einem Scan werden somit die Extrema wie auch jegliche Kombination aus diesen durchlaufen. Da die mIR Quelle den gesamten mIR Wellenlängenbereich gleichzeitig aussendet wird für jede Wellenlänge ein spezifisches Intensitätsmuster generiert, welches auf die Probe trifft. Diese gleichzeitige Aussendung aller Wellenlängen und spätere Zuordnung welche Wellenlänge wie stark absorbiert wurde ist deshalb möglich, da jede Wellenlänge eine einzigartige Frequenz hat. Je nach Molekül, dessen Bindungen und funktionellen Gruppen werden die Intensitäten unterschiedlicher Wellenlängen absorbiert, dem Strahl entzogen. Das durch die Probe tretende Licht im Anschluss von einem thermosensitiven Detektor registriert.

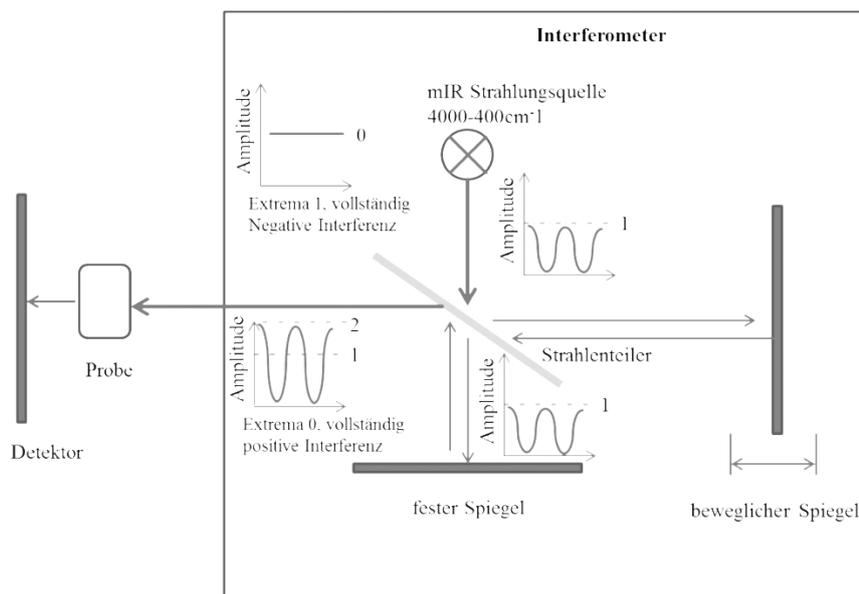


Abb. 31: schematische Darstellung eines FT-IRs, Erläuterungen siehe Text

Diese Detektoren generieren beim Auftreffen von Wärme einen Elektronenfluss der aufgezeichnet wird. Daraus wird ein charakteristisches Spektrum erzeugt (Interferogramm, Auftrag von allen Intensität (jeder Wellenlänge/Frequenz) über der optischen Wegstrecke). Die häufigsten Detektoren sind der günstige und bei Umgebungstemperatur betriebene DTGS-Detektor (deutiertes Triglycinsulfat, in dieser Arbeit verwendet). Sowie der mit flüssigen Stickstoff gekühlte und wesentlich sensitivere (Faktor 10), schnellere (Faktor 4) jedoch teurere, verringerte Wellenlängenbereich und aufwändiger zu operierende MCT (Quecksilber Cadmium Tellurite) Detektor.

Nach der Aufnahme des Interferograms (Interferenzmusters) muss dieses in einen für den Menschen interpretierbares Spektrum umgerechnet werden. Dabei bedient man sich der Fourier Transformation (FT). Die FT ist die Nachbildung des Interferograms durch entsprechende Kombination von Sinus- und Kosinus-Funktionen. Somit wird eine mathematische Funktion durch die Auswertesoftware bestimmt. Die grafische Repräsentation dieser Funktion ist das Spektrum. Die unterschiedlichen Analyte absorbieren bei spezifischen Wellenlängen unterschiedlich stark die mIR Strahlung. Diese aus dem Strahl entzogene Energie führt zu einer Molekülschwingung (vgl. UV-Bereich- Elektronenübergang). Dadurch ändert sich die Amplitude der unterschiedlichen Wellenlängen und ein charakteristisches Interferenzmuster entsteht. Wobei der Energieverlust (Reduzierung der Amplitude) als hohe Absorptionswerte im Spektrum sichtbar wird.

Messkonfiguration

Zur mIR Messung stehen unterschiedliche Sonden und Messprinzipien (Reflexion, Transmission, Transflexion) zur Verfügung. Diese sollen hier nicht näher erläutert werden und es wird auf die entsprechende Literatur verwiesen z.B. (Barkeev, 2005; Smith, 2011)

Das Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) soll hier näher beschrieben werden, da es in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die evaneszente Welle ist ein quantenmechanischer Effekt. Durch die unterschiedlichen Brechungsindizes zwischen ATR Kristall und Probe (z.B. Feststoff aber auch Flüssigkeit) und einem spezifischen Einfallswinkel der IR Strahlung, wird dieser vollständig reflektiert. An und hinter dieser Grenzfläche fällt jedoch die Amplitude der Strahlung nicht unmittelbar auf 0 sondern klingt exponentiell ab. Dies ist der sogenannte Hot Spot der evaneszenten Welle, mit derer man IR Spektroskopie betreiben kann. Es können, abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren (Wellenzahl, Brechungsindex, Einfallswinkel, Anzahl der Reflexionen)

eindringtiefen in die Probe von bis zu $10\mu\text{m}$ erreicht werden. Die gewöhnliche Eindringtiefe liegt bei ca. $1,6\mu\text{m}$. Diese Eindringtiefe ist zugleich die in Gleichung 3 erwähnte durchstrahlte Schichtdicke. Da die Schichtdicke in erster Näherung als konstant angesehen werden kann, ist obwohl die ATR Spektroskopie eine reflektive Messmethode ist, hervorragend für quantitative Bestimmungen geeignet.

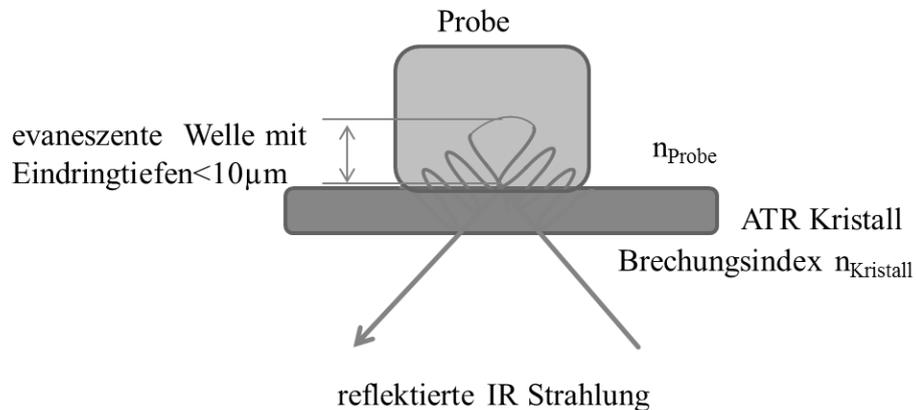


Abb. 32: schematische Darstellung des ATR Messprinzips

Aufgrund der guten physikalischen Eigenschaften sind Diamanten als ATR Kristall zurzeit die beste Wahl. Der höhere Anschaffungspreis im Vergleich zu z.B. Zink Selenit Kristallen ist dadurch gerechtfertigt, dass die höhere Härte und die damit einhergehende Reduzierung der Anfälligkeit für Kratzer die Arbeit wesentlich vereinfacht. Weiterhin sind Diamanten gegenüber Säure und Base angriffen inert, welches z.B. die Dekontamination des Kristalls vereinfacht. Andere Kristalle z.B. aus Kaliumbromid sind wasserlöslich und deshalb ungeeignet für die Spektroskopie in Lösungen. Je mehr Reflexionen der IR Strahl erfährt, desto größer ist die durchstrahlte Schichtdicke da diese sich aus den einzelnen Eindringtiefen summiert. Aufgrund des hohen Preises ist es jedoch zurzeit meistens so, dass Diamanten nur als ‚Single Bounce‘ Angeboten werden. Die Eindringtiefe ist bei niedrigeren Wellenzahlen größer z.B. bei 500cm^{-1} ist diese 4x tiefer als bei 2000cm^{-1} . Die Spektren werden intensiver je kleiner der Brechungsindex des Kristalls wird ($n_{\text{Diamant}} = 2,42$) da das Licht tiefer in die Probe eindringen kann. Abhängig von der Anwendung kann jedoch die Benutzung von Diamant ein Problem darstellen. Die Eigenabsorption des Diamanten liegt im Bereich zwischen $2200\text{-}2000\text{cm}^{-1}$. In diesem Bereich gelangt keine Strahlung in Wechselwirkung mit der Probe, da der Diamant jegliche Energie aufnimmt. In diesem Bereich absorbieren z.B. die Nitrile ($\text{R-C}\equiv\text{N}$), welche jedoch eher ungewöhnlich für biologische Systeme sind und somit keine wesentlichen Informationen verloren gehen. Die ATR Messung ist aufgrund ihrer Verlässlichkeit, einfachen Durchführung und Universalität heute Stand der Technik.

mIR Spektrum und charakteristische Banden

Über die Spektren Interpretation wurden eine Vielzahl von Büchern veröffentlicht. Eine detaillierte und vollständige Betrachtung dieses Themas ist an dieser Stelle nicht möglich. Weiterhin sollen nicht die grundlegende Erläuterung der verschiedenen Schwingungsarten (in Phase, out of Phase, Streck-, rocking-, Scher-, wagging und Deformationsschwingung, Fermi Resonanz etc.) erfolgen. Auf die Darstellung des grundlegenden Modells des harmonischen/ anharmonischen Oszillators soll zugunsten einer praktische Erläuterung verzichtet werden Die Informationen in diesem Abschnitt stammen aus (Larkin, 2011)

Die in Abbildung 34 dargestellten Banden im Spektrum zeigen Absorptionswerte verschieden von 0 bei spezifischen Wellenzahlen (Energie/Frequenz). Die Ursache dafür liegt am betrachteten Molekül und der umgebenen Matrix sowie aus Überlagerungen mit anderen in der Matrix befindlichen Stoffen. So ist die Kohlenstoffgrundstruktur und Art der Bindungsstärke (z.B. Alkane, Alkene etc.) wie auch die Masse der Atome, deren geometrische Anordnung und gegenseitige Behinderung für verschiedene Peaks und deren spezifische Form und breite verantwortlich.

Die mIR Spektroskopie liefert komplexe Informationen über die die Molekülstruktur und dessen Wechselwirkungen mit der Umgebung. Zur Vereinfachung der Spektreninterpretation kann man sich der funktionellen Gruppenanalyse (FGA) bedienen. Die FGA besagt, dass spezifische Gruppen eine charakteristische Schwingung zeigen, unabhängig von dem an ihnen gebundenen, restlichen Molekül (vgl. Tabelle 8).

Ein Molekül kann Raman und IR aktiv sein, dabei sind die Intensitäten der beobachteten Banden oft komplementär (stark im IR, schwach im Raman und umgekehrt). Die Anzahl der möglichen Schwingungstypen lässt sich durch die Anzahl der Freiheitsgrade abschätzen. Für lineare Moleküle nach Gleichung 11, für nichtlineare Moleküle nach Gleichung 10 mit n der Anzahl der Molekülatome.

$$F = 3n - 6 \quad (10)$$

$$F = 3n - 5 \quad (11)$$

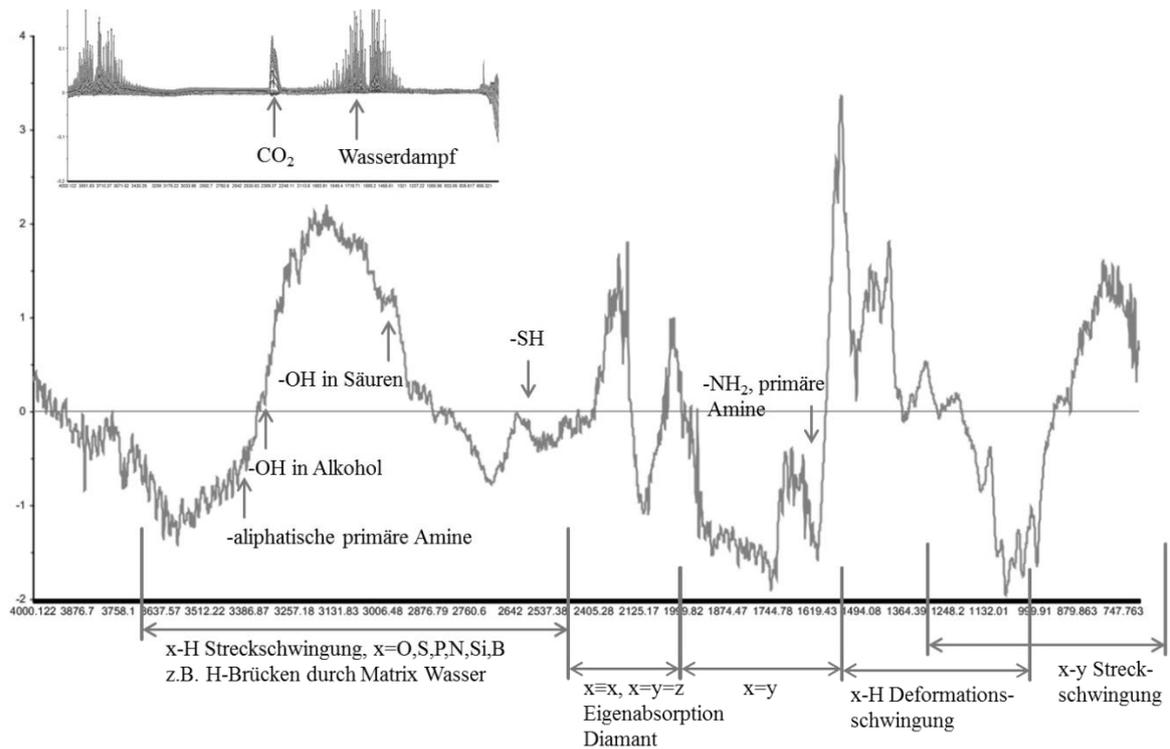


Abb. 33: exemplarische Darstellung eines ATR mIR Spektrums

Der entscheidende Parameter ob ein Molekül IR aktiv ist, hängt davon ab, ob es einen Dipol besitzt. Somit muss ein Dipol (unterschiedliche Elektronegativität, Elektronen haben eine häufigere Aufenthaltswahrscheinlichkeit an einem Molekülpol) vorhanden sein z.B. durch Heteroatome.

Tab. 7: DoE 1 Kombinationsschema

Ansatz Nr.	c C-Quelle [g·L ⁻¹]	c V-Quelle [g·L ⁻¹]	c N-Quelle [g·L ⁻¹]	Charge N-Quelle
1	5	5	20	1
2	7,5	7,5	15	1
3	10	5	10	1
4	7,5	7,5	6,6	1
5	7,5	7,5	15	2
6	7,5	7,5	15	1
7	7,5	7,5	15	1
8	7,5	3,3	15	1
9	3,3	7,5	15	2
10	11,7	7,5	15	2
11	10	10	10	1
12	7,5	7,5	23,4	1
13	3,3	7,5	15	1
14	10	10	20	2
15	10	5	10	2
16	7,5	7,5	15	2
17	7,5	11,7	15	2
18	10	10	10	2
19	10	10	20	1
20	5	5	10	2
21	5	10	10	2
22	7,5	7,5	15	1
23	10	5	20	1
24	7,5	7,5	15	2
25	5	10	20	2
26	5	10	10	1
27	7,5	7,5	15	1
28	5	5	10	1
29	7,5	7,5	6,6	2
30	7,5	7,5	15	2
31	5	10	20	1
32	5	5	20	2
33	7,5	3,3	15	2
34	11,7	7,5	15	1
35	10	5	20	2
36	7,5	11,7	15	1
37	7,5	7,5	15	2
38	7,5	7,5	23,4	2
39	7,5	7,5	15	1
40	7,5	7,5	15	2

Tab. 8: charakteristische mIR Molekülschwingungen bei definierten Wellenzahlen

Molekül	Erkennbare Gruppe	Wellenzahlbereich [cm ⁻¹]	Schwingungstyp
Kohlenstoffgrundgerüst	R-CH ₃	2975-2950	o.ph.str.
		2885-2860	i.ph.str.
		1470-1449	o.ph.bend
		1380-1320	i.ph.bend
	R-CH ₂ -R	2936-2915	o.ph.str.
		2865-2833	i.ph.str.
		1475-1445	bend
	(CH ₂) _{>3}	1305-1295	i.ph. twist
		726-720	i.ph.rock
	funktionelle Gruppen	Aromaten ohne betrachtung von Substituierungen	1620-1585
1590-1565			quadrant str.
1525-1470			Semicircle str.
1465-1400			Semicircle str.
Keton C=O		1715	str.
Aldehyd C=O		1730	str.
Ester C=O		1740	str.
Carbonsäure C=O		1715	str.
Carbonsäure C-OH		1420	str.
R-NH ₂		1750-1550	str.
C-N	1410	str.	
R-OH---O	3400-3200	str.	
COOH	3200-2600	str.	
	960-875	str.	
CH ₃ -OH	1090-1000	str.	
	900-800	str.	
Alkohol R ₂ CH-OH	1150-1075	str.	
R ₃ C-OH	1210-1100	str.	
	800-750	str.	
Ether C-O	900-800	str.	
Aryl-OH	1260-1180	str.	

anorganisch	CH ₃ -NH ₂	3500-3200	str.
		1630-1590	Bend
		900-600	Wag
	CH ₂ -NH-CH ₂	1150-1125	str.
	R-S-S-R	500	str.
	CH ₂ -S	1240	str.
	S-H	2590-2540	str.
	NH ₄ ⁺	3100, 1410	str.
	CO ₃ ⁻	1450,880,710	str.
	HCO ₃ ⁻	1650,1320	str.

Literaturverzeichnis

- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C., & Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 8), 2271–82.
- Artin, I., Mason, D. R., Pin, C., Schelin, J., Peck, M. W., Holst, E., ... Carter, A. T. (2010). Effects of Carbon Dioxide on Growth of Proteolytic *Clostridium botulinum*, Its Ability To Produce Neurotoxin, and Its Transcriptome, 76(4), 1168–1172.
- Bader, J., Rauschenbach, P., & Simon, H. (1982). ON A HITHERTO UNKNOWN FERMENTATION PATH OF SEVERAL AMINO ACIDS BY Proteolytic Clostridia. *FEBS Letters*, 140(1), 67–72.
- Barkeev, K. A. (2005). *Process Analytical Technology*. (K. A. Bakeev, Ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Bonventre, P. F., & Kempe, L. L. (1959). Physiology of Toxin Production by *Clostridium botulinum* Types A and B : II . Autolysis, and Toxin Production Physiology of Toxin Production by *Clostridium botulinum* Types A and B.
- BONVENTRE, P. F., & KEMPE, L. L. (1959). Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. II. Effect of carbohydrate source on growth, autolysis, and toxin production. *Applied Microbiology*, 7, 372–4.
- B, M., Simmons, R. J., & Costilow, R. N. (1962). Enzymes of glucose, 1274–1281.
- Bradshaw, M., Dineen, S. S., Maks, N. D., & Johnson, E. A. (2004). Regulation of neurotoxin complex expression in *Clostridium botulinum* strains 62A, Hall A-hyper, and NCTC 2916. *Anaerobe*, 10(6), 321–33.
- Briozzo, J., Lagarde, E. A. D. E., Chirife, J., & Parada, J. L. (1983). *Clostridium botulinum* Type A Growth and Toxin Production in Media and Process Cheese Spread, 45(3), 1150–1152.
- Call, J. E., Cooke, P. H., & Miller, a J. (1995). In situ characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. *The Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 257–63.
- Chen, Y., Indurthi, D. C., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2011). Small RNAs in the Genus *Clostridium*. *mBio*, 2(1), 1–11.
- Connan, C., Brueggemann, H., Mazuet, C., Raffestin, S., Cayet, N., & Popoff, M. R. (2012). Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A strain Hall. *PloS One*, 7(7), e41848.
- Connan, C., Denève, C., Mazuet, C., & Popoff, M. R. (2013). Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 75, 90–100.

- Cooksley, C. M., Davis, I. J., Winzer, K., Chan, W. C., Peck, M. W., & Minton, N. P. (2010). Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4448–60.
- Cooksley, C. M., Davis, I. J., Winzer, K., Weng, C., Peck, M. W., Minton, N. P., ... Minton, N. P. (2010). Regulation of Neurotoxin Production and Sporulation by a Putative agrBD Signaling System in Proteolytic *Clostridium botulinum* Regulation of Neurotoxin Production and Sporulation by a Putative agrBD Signaling System in Proteolytic *Clostridium botulinum* . *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4448–4460.
- Couesnon, A., Raffestin, S., & Popoff, M. R. (2006). Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 3), 759–70.
- Dahlsten, E., Kirk, D., Lindström, M., & Korkeala, H. (2013). Alternative Sigma Factor SigK Has a Role in Stress Tolerance of Group I *Clostridium botulinum* Strain ATCC 3502, 79(12), 3867–3869.
- Dasgupta, B. R., & Sugiyama, H. (1976). Molecular forms of neurotoxins in proteolytic *Clostridium botulinum* type B cultures. *Infection and Immunity*, 14(3), 680–6.
- Deckwer, W.-D., Hempel, D. C., Zeng, A.-P., & Jahn, D. (2006). Systembiotechnologische Ansätze zur Prozessentwicklung. *Chemie Ingenieur Technik*, 78(3), 193–208.
- Dekleva, L., & Dasgupta, R. (1989). Received June 15, 1989, 162(2).
- Dekleva, M. L., & Dasgupta, B. R. (1990). Purification and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type A that nicks single-chain type A botulinum neurotoxin into the di-chain form. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2498–503.
- Duda, J. J., Slack, J. M., & Virginia, W. (1969). Toxin Production in *Clostridium botulinum* as Demonstrated by Electron Microscopy Toxin Production in *Clostridium botulinum* Demonstrated by Electron Microscopy, 97(2).
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, a, & Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 6), 685–9.
- Elsden, S., & Hilton, M. (1978). Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Archives of Microbiology*, 117(2), 165–172.
- Emeruwa, A. C., & Hawirko, R. Z. (1974). Comparison of Butyric Type of Fermentation in Sporogenic and Asporogenic Mutants of *Clostridium botulinum* Comparison of Butyric Type of Fermentation in Sporogenic and Asporogenic Mutants of *Clostridium botulinum*.
- Even, S., Putzer, H., Burguie, P., Croux, C., Danchin, A., Martin-verstraete, I., & Soutourina, O. (2008). S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic Acids Research*, 36(18), 5955–5969.

- Gemperline, P. (2006). *Practical Guide to Chemometrics* (2.nd ed., p. 250FF). CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., & Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 903–919.
- Grossowicz, N., Kindler, S. H., & Mager, J. (1956). Nutritional studies with the *Clostridium botulinum* group. *Journal of General Microbiology*, 15(2), 386–93.
- Gullmar, B., & Molin, N. (1967). Effect of Choline on Cell Division of *Clostridium botulinum* Type E, 93(5), 1967.
- Gupta, R. S., & Gao, B. (2009). Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (2), 285–294.
- Johnson, E. a, & Bradshaw, M. (2001). *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(11), 1703–22.
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal Component Analysis* (2.ed. ed.). Springer-Verlag.
- Juran, J. M. (1992). *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality Into Goods and Services*. Free Press.
- Karlsson, S., Burman, L. G., & Akerlund, T. (2008). Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 11), 3430–6.
- Kaufmann, W., & Marshall, R. S. (1965). Factors Affecting the Development of *Clostridium botulinum* in Whole Milk, 13(4), 521–526.
- Larkin, P. J. (2011). *IR and Raman Spectroscopy-Principals and Spectral Interpretation*. Elsevier Inc.
- Latham, W. C., Bent, D. F., & Levine, L. E. O. (1961). Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein.
- Marvaud, J. C., Gibert, M., Inoue, K., Fujinaga, Y., Oguma, K., & Popoff, M. R. (1998). botR/A is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Molecular Microbiology*, 29(4), 1009–1018.
- Melling, J., Hambleton, P., & Shone, C. C. (1988). *Clostridium botulinum* toxins: nature and preparation for clinical use. *Eye (London, England)*, 2 (Pt 1)(1), 16–23.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

- MILLER, P. A., & MUELLER, J. H. (1956). Essential role of histidine peptides in tetanus toxin production. *The Journal of Biological Chemistry*, 223(1), 185–94.
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and Analysis of Experiments* (5th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Montville, T. J. (1983). Dependence of *Clostridium botulinum* Gas and Protease Production on Culture Conditions, 45(2), 571–575.
- Moss, C. W., Hatheway, C. L., Lambert, M. A., & McCroskey, L. M. (1980). Production of Phenylacetic and Hydroxyphenylacetic Acids by *Clostridium botulinum* Type G, 11(6), 743–745.
- Mraheil, M. A., Billion, A., Kuenne, C., Pischmarov, J., Kreikemeyer, B., Engelmann, S., ... Hain, T. (2010). Minireview Comparative genome-wide analysis of small RNAs of major Gram-positive pathogens : from identification to application. *Microbial Biotechnology*.
- Nakamura, T., Tonozuka, T., Kotani, M., Obata, K., Oguma, K., & Nishikawa, A. (2007). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the HA3 component of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(Pt 12), 1038–40.
- Ohtani, K., Yuan, Y., Hassan, S., Wang, R., Wang, Y., & Shimizu, T. (2009). Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 191(12), 3919–27.
- Papenfert, K., & Vogel, J. (2014). Small RNA functions in carbon metabolism and virulence of enteric pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(July), 1–12.
- Patterson-Curtis, S. I., & Johnson, E. a. (1992). Roles of arginine in growth of *Clostridium botulinum* Okra B. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2334–7.
- Porfírio, Z., Prado, S. M., Vancetto, M. D. C., Fratelli, F., Alves, E. W., Raw, I., ... Lebrun, I. (1997). Specific peptides of casein pancreatic digestion enhance the production of tetanus toxin. *Journal of Applied Microbiology*, 83(6), 678–684.
- Raffestin, S., Dupuy, B., Marvaud, J. C., & Popoff, M. R. (2005). BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Molecular Microbiology*, 55(1), 235–49.
- Rathore, A. S., & Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature*, 27(1).
- Satendra, K. V. (2011). Risk-Based Drug Quality System. In FDA & ICH JOINT PROPOSAL FOR DESIRED STATE (pp. 1–48).
- Schantz, E. J., & Johnson, E. a. (1992). Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiological Reviews*, 56(1), 80–99.

- Sebahia, M., Peck, M. W., Minton, N. P., Thomson, N. R., Holden, M. T. G., Mitchell, W. J., ... Parkhill, J. (2007). Genome sequence of a proteolytic (Group I) Clostridium botulinum strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes, (Group I), 1082–1092.
- Selby, K., Lindstro, M., Somervuo, P., Heap, J. T., Minton, N. P., Korkeala, H., & Al, S. E. T. (2011). Important Role of Class I Heat Shock Genes *hrcA* and *dnaK* in the Heat Shock Response and the Response to pH and NaCl Stress of Group I Clostridium botulinum Strain ATCC 3502 , 77(9), 2823–2830.
- Shukla, H. D., & Sharma, S. K. (2005). Clostridium botulinum: a bug with beauty and weapon. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(1), 11–8.
- Siegel, L. S., & Metzger, J. F. (1979). Toxin production by Clostridium botulinum type A under various fermentation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), 606–11.
- Siegel, L. S., & Metzger, J. F. (1980). Effect of fermentation conditions on toxin production by Clostridium botulinum type B. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(6), 1023–6.
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* (2.ed. ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Thompson, J., Hill, K. K., Smith, T. J., & Pikis, A. (2010). The Gene CBO0515 from Clostridium botulinum Strain Hall A Encodes the Rare Enzyme N 5 - (Carboxyethyl) Ornithine Synthase ,, 192(4), 1151–1155.
- Turton, K., Chaddock, J. A., & Acharya, K. R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins : structure , function and therapeutic utility, 27(11), 552–558.
- US Food and Drug Administration, F. (2004). *Guidance for Industry Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical*.
- US Food and Drug Administration, F. (2009). *Guidance for Industry Q8 (R2) Pharmaceutical Development (Vol. 8)*.
- Venkataramanan, K. P., Jones, S. W., McCormick, K. P., Kunjeti, S. G., Ralston, M. T., Meyers, B. C., & Papoutsakis, E. T. (2013). The Clostridium small RNome that responds to stress : the paradigm and importance of toxic metabolite stress in C . acetobutylicum. *BMC Genomics*, 14(849), 1471–2164.
- Whitmer, M. E., & Johnson, E. a. (1988). Development of improved defined media for Clostridium botulinum serotypes A, B, and E. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3), 753–9. Yamakawa, K., Karasawa, T., Ohta, T., & Nakamura, S. (1998). enhanced toxin production by, 47, 767–771.
- You, C., Okano, H., Hui, S., Zhang, Z., Kim, M., Gunderson, C. W., ... Hwa, T. (2013). Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature*, 500(7462), 301–6.

- Zhang, L., Lin, W., Li, S., & Aoki, K. R. (2003). Complete DNA sequences of the botulinum neurotoxin complex of *Clostridium botulinum* type A-Hall (Allergan) strain. *Gene*, 315, 21–32.
- Zhang, W., Ma, J., Zang, C., Song, Y., & Liu, P. (2011). The Fur Transcription Regulator and Fur-Regulated Genes in *Clostridium botulinum* A ATCC 3502. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(1-6).
- Zhang, Z., Korkeala, H., Dahlsten, E., Sahala, E., Heap, J. T., Minton, N. P., & Lindström, M. (2013). Two-component signal transduction system CBO0787/CBO0786 represses transcription from botulinum neurotoxin promoters in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003252.
- Zhao, L., Montville, T. J., & Schaffner, D. W. (2006). Evidence for quorum sensing in *Clostridium botulinum* 56A. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 54–8.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Benjamin Gola
Geburtsdatum/-ort: 28.03.1985, Luth. Wittenberg
Familienstand: ledig



Ausbildung:

09/1995-06/2001 Abschluss Realschule
08/2001-06/2004 Ausbildung zum Kaufmann im Einzelhandel, IKEA Leipzig
09/2004-06/2005 Fachoberschule Merseburg, Fachhochschulreife
08/2005-08/2006 Auslandsaufenthalt Australien und Süd-Ost Asien
09/2006-09/2009 Bachelorstudium Biotechnologie, Fachhochschule Köthen
10/2009-11/2011 Masterstudium Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig
03/2012- Industriepromotion Merz Pharma GmbH & Co. KGaA,
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie

Berufe:

02/2016- Prozessmanager humane virale Impfstoffe, IDT-Biologika GmbH