

Entwicklung neuer Strategien für die
Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate
von *Escherichia coli*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Björn Beckmann, M. Sc.

(2018)

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 07.11.2017

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis April 2017 im Labor für Bioverfahrenstechnik der HAW Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Ernst A. Sanders angefertigt. Die ersten Zeilen möchte ich dazu nutzen, all denjenigen meinen Dank auszusprechen, die mich während meiner Zeit als Doktorand an der HAW Hamburg begleitet und einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Labors für Bioverfahrenstechnik, allen voran Prof. Dr. Ernst A. Sanders. Ernst, für die jahrelange partnerschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit sowie für die Bereitstellung der thematischen und prozesstechnischen Rahmenbedingungen gilt dir mein herzlichster Dank. Petra, dir möchte ich für deine fachliche Unterstützung im Labor danken und das du mir stets mit einem offenen Ohr zur Seite stands. Die Zeit mit euch hat einen wesentlichen Beitrag zu meiner fachlichen, wie persönlichen Entwicklung beigetragen und wird mir immer im Gedächtnis bleiben.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater an der Leibniz Universität Hannover, Prof. Dr. Thomas Scheper und bei meiner Promotionskommission Prof. Dr. Bernd Hitzmann, Prof. Dr. Ursula Rinas sowie Prof. Dr. Jürgen Alves bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei den Doktoranden der HAW Hamburg bedanken, insbesondere bei meinen lieben Freunden Jessi und Domme, die mich über meine gesamte Studienzzeit bis hin zur Promotion begleitet haben. Für eine unvergessliche Zeit danke ich euch von Herzen und wünsche euch alles erdenklich Gute für die Zukunft.

An der vorliegenden Arbeit haben insgesamt 15 Bachelor- und Masterstudenten mitgewirkt. Euch allen gilt mein Dank für euren absoluten Einsatz im Labor und eure Offenheit Neues erlernen zu wollen. Mit euren Ideen habt ihr stets neue Reize gesetzt, wodurch ihr mir bei der Einwicklung der Verfahrensstrategie eine große Hilfe gewesen seid. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir immer viel Freude bereitet. Auch euch wünsche ich auf eurem weiteren Weg alles Gute.

Des Weiteren möchte ich mich bei der HAW Hamburg für die finanzielle Unterstützung bedanken. Allen Professoren und Mitarbeitern des Studiengangs Biotechnologie, die mich während meiner studentischen Laufbahn begleitet haben. Ihre Lehre, Unterstützung und Förderung haben den Grundstein für meine Promotion gelegt. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Oliver Ullrich und Elisabeth für Ihre Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen und Arbeiten meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Mit eurem Zuspruch, der mentalen aber auch finanziellen Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit habt ihr einen bedeuteten Anteil zu dem Gelingen meiner Promotion beigetragen. Euch gilt meine Anerkennung und tiefster Dank.

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, daß dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

(Max Planck, 1858 - 1947)

Kurzfassung

Björn Beckmann

Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate von *Escherichia coli*

Fed-Batch-Prozesse werden häufig für die Hochzelldichte-Kultivierung (**HCDC**) verschiedener Mikroorganismen und Bioreaktormaßstäbe eingesetzt. Während anspruchsvolle Strategien besonders in der Forschung Anwendung finden, stehen robuste Prozesse im Fokus industrieller Vorhaben. Basierend auf dem HCDC-Verfahren für *E. coli* (Riesenberg et al. 1991) wurden verschiedene Nachfütterungsstrategien für die Herstellung rekombinanter Proteine entwickelt. Die initiale Batch-Phase einer typischen HCDC führt bei Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle häufig zur Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte, wie Acetat. Ursächlich hierfür ist das Wachstum mit maximaler spezifischer Wachstumsrate und der daraus resultierende Überflusmetabolismus. Bei hohen Wachstumsraten steigt darüber hinaus der Bedarf an Sauerstoff. In großen Reaktoren mit limitiertem spezifischen Leistungseintrag kann somit bereits frühzeitig die Zugabe von reinem Sauerstoff erforderlich sein. Zusätzlich ist die Verwendung einiger auxotropher Stämme in der klassischen HCDC begrenzt. Darunter fällt beispielsweise der Leucin-auxotrophe *E. coli* K12 ER2507, bei dem bereits eine geringe Konzentration der erforderlichen Aminosäure zu einer deutlichen Reduktion der spezifischen Wachstumsrate führt. Beeinflusst wird das Wachstumsverhalten und der Leucinausbeutekoeffizient zudem von der Glucosekonzentration in der Suspension. Zusätzlich spielt im Hinblick auf die Mitarbeiter- und Konsumentensicherheit die Unbedenklichkeit der Medienkomponenten eine wichtige Rolle. Kritisch ist hier insbesondere der Einsatz von besonders besorgniserregenden Stoffen, wie Cobaltchlorid und Borsäure. Somit sollte bei der Entwicklung neuer Ansätze für die Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli* ein Augenmerk auf die Medienformulierung und die Probleme in der Batch-Phase gelegt werden. In dieser Arbeit gelang es mit dem iHCDC-Prozess, welcher durch eine Sequenz von ausschließlich Fed-Batch-Phasen gekennzeichnet ist, die Acetatbildung in der frühen Wachstumsphase zu unterbinden. Durch eine spezielle Variante der iHCDC konnte der Leucin-auxotrophe Stamm K12 ER2507 der Hochzelldichte-Kultivierung zugänglich gemacht werden. In einem weiteren Optimierungsschritt, als i²HCDC bezeichnet, wurde das Medium drastisch vereinfacht. Mit Ausnahme von KH_2PO_4 und Zusätzen für auxotrophe Stämme wurden alle Substanzen aus dem Startmedium entfernt und die Versorgung mit den wachstumsrelevanten Nährstoffen durch die Zugabe der Nachfütterungslösung realisiert. Zudem konnten toxische Bestandteile aus dem Konzentrat eliminiert werden ohne die Produktivität zu beeinflussen. Der i²HCDC-Prozess vereint Einfachheit, Reproduzierbarkeit und exakte zeitliche Planbarkeit und wurde für diverse Derivate wie BL21 (DE3), BL21, K12 TG1, M15 und K12 ER2507 mit und ohne Fremdprotein-Expression getestet.

Schlüsselwörter: i²HCDC, *E. coli*, Medienoptimierung

Abstract

Björn Beckmann

Development of new strategies for High Cell Density Cultivation of different *Escherichia coli* derivatives

Fed-batch processes are commonly used for High Cell Density Cultivation (**HCDC**) of different microorganisms and bioreactor scales. Whereas highly sophisticated cultivation strategies are part of research efforts, simple and robust methods are in focus of industrial purposes. Based on the HCDC-process for *E. coli* (Riesenberg et al. 1991) various feeding strategies for the production of recombinant proteins have been developed. The initial batch-phase of a typical HCDC frequently leads to accumulation of undesirable byproducts like acetate, especially if glucose is used as carbon source. This is attributed to the growth with maximum specific growth rate resulting in an overflow metabolism. Furthermore, the oxygen uptake increases with high growth rates. Thus, the addition of pure oxygen can be required already at an early growth phase in pilot- or production-scale reactors with limited specific power input. Additionally, the use of some auxotrophic strains is difficult in the established HCDC. As an example, this includes the leucine-auxotrophic *E. coli* K12 ER2507. Even a low concentration of the required amino acid leads to a significant reduction of the specific growth rate. Moreover, the growth rate and the leucine yield coefficient is affected by the glucose concentration in the suspension. With regards to employee and consumer safety the innocuousness of all media components is of high importance. Especially, the usage of particularly harmful substances such as cobalt chloride and boric acid is critical. Hence, the formulation of the media and the problems linked to the batch-phase are crucial in the development of new High Cell Density Cultivation strategies for *E. coli*. In this thesis the iHCDC which is characterized by a sequence of fed-batch phases with reduced specific growth rates enables a robust process, eliminating the formation of acetate during the early growth phases. By using a special variant of the iHCDC-process it was possible to apply the leucine-auxotrophic strain K12 ER2507 in High Cell Density Cultivation. A subsequent optimization, called i²HCDC, significantly simplifies the media composition. All substances except for KH_2PO_4 and additives for auxotrophic strains were removed from the starting media. The supply with nutrients which are growth relevant was realized by the addition of the feeding solution. In addition, the toxic components were eliminated from the feeding solution without losing productivity. This new strategy was successfully tested with various derivatives like BL21 (DE3), BL21, K12 TG1, M15, and K12 ER2507 for the expression of various gene products and biomass formation under non-induced conditions. In conclusion, the i²HCDC combines convenience, reproducibility, and exact temporal predictability.

Keywords: i²HCDC, *E. coli*, Media optimization

Inhalt

Vorwort.....	I
Kurzfassung	III
Abstract.....	IV
Inhalt	V
Abkürzungen	IX
Variablen	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung.....	3
3 Theoretische Grundlagen	4
3.1 <i>Escherichia coli</i> als Hostorganismus für die Produktion rekombinanter Proteine	4
3.2 Eingesetzte Markerproteine.....	6
3.2.1 Eigenschaften und Funktionen von Rab11a	6
3.2.2 Grün fluoreszierendes Protein – GFP	8
3.3 Hochzelldichte-Kultivierung von <i>E. coli</i>	9
3.3.1 Berechnung der Nachfütterungsrate für exponentielles Feeding	18
3.4 Zusammensetzung des definierten Mediums	20
3.4.1 Makroelemente	21
3.4.1.1 Glucose als Kohlenstoffquelle	21
3.4.1.2 Ammonium als Stickstoffquelle.....	22
3.4.1.3 Phosphor, Kalium, Magnesium, Schwefel und Eisen	23
3.4.2 Spurenelemente.....	23
3.4.2.1 Toxizität von Cobalt(II)-chlorid, Borsäure und Mangan(II)-chlorid	24
3.5 Entwicklungspotenzial neuer Hochzelldichte-Kultivierungsstrategien.....	25
3.5.1 Acetatbildung infolge des Glucoseüberflussmetabolismus	27
4 Material und Methoden	31
4.1 Medien und Medienansatz.....	31
4.1.1 LB-Medium auf Sojabasis (LBS-Medium)	31
4.1.2 Synthetisches Medium für Schüttelkulturen	31
4.1.3 Synthetische Medien für Kultivierungen im Bioreaktor.....	33
4.2 Stämme und Stammhaltung	34

4.2.1	Vektoren	34
4.2.1.1	pGLO Vektor zur Expression von GFP	34
4.2.1.2	Herstellung der Vektoren pET-28a::Rab11a und pQE-30::Rab11a	35
4.2.2	Transformation und Kryokonservierung	36
4.3	Prozessführung	37
4.3.1	Schüttelkulturen	37
4.3.2	Kultivierungsprozesse in unterschiedlichen Bioreaktoren	37
4.3.2.1	5 l Laborversuchsanlage	38
4.3.2.2	Prozessführung	39
4.4	Analytik	40
4.4.1	Zellwachstum	40
4.4.1.1	Biotrocken- und Biofeuchtmassekonzentration	40
4.4.1.2	Optische Dichte und <i>on-line</i> Trübungsmessung	41
4.4.1.3	Lebendkeimzahlkonzentration und Anteil plasmidhaltiger Zellen	41
4.4.2	Bestimmung von Glucose, Acetat, Leucin, Ammonium und Phosphat im Medium	42
4.4.2.1	HPICE zur Quantifizierung von Glucose und Acetat	42
4.4.2.2	Leucinbestimmung nach Vorsäulenderivatisierung mittels HPICE	42
4.4.2.3	Quantifizierung von Leucin mittels HILIC	43
4.4.2.4	Ammoniumnachweis	43
4.4.2.5	Phosphatnachweis	43
4.4.3	<i>On-line</i> Analytik im Bioreaktor	44
4.4.3.1	Temperaturmessung	44
4.4.3.2	Gelöstsauerstoffkonzentration	44
4.4.3.3	pH-Wert	44
4.4.3.4	Schaumdetektion	44
4.4.3.5	Abgasanalyse	44
4.4.4	Gelelektrophoretische Bestimmung der Produktkonzentration	45
4.4.4.1	Lösliches und unlösliches Zielprotein in Biomasseproben	46
4.4.4.2	Rab11a-Konzentration	46
4.4.4.3	GFP-Analyse	48

4.5	Statistische Versuchsplanung (SVP) mit MODDE®	48
4.5.1	Grundlagen der SVP	48
4.5.2	Rohdatenanalyse	49
4.5.3	Regressionsanalyse, Modellbildung und -interpretation.....	50
4.6	Berechnungsgrundlagen.....	51
4.6.1	Zeitliche Prozesssteuerung.....	51
4.6.1.1	HCDC-Prozess mit Batch-Phase.....	52
4.6.1.2	iHCDC und i ² HCDC mit sofortiger Nachfütterung nach Inokulation	52
4.6.2	Berechnung der Sauerstoffaufnahme, Kohlenstoffdioxidbildungsrate und des Respirationsquotienten.....	54
4.6.3	Berechnung der Produktkonzentration nach gelelektrophoretischer Quantifizierung	55
4.6.3.1	Gesamtproduktkonzentration aus Kultivierungsproben	55
4.6.3.2	Berechnung der Konzentration der löslichen und unlöslichen Zielproteinfraktion in Biomasseproben	56
4.6.3.3	Berechnung der zellspezifischen Produktbildungsrate	56
4.6.4	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate	57
4.6.5	Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten und spezifischen Reaktionsraten verschiedener Substrate und Metabolite	57
5	Ergebnisse und Diskussion.....	58
5.1	Optimierung der Startphase der Hochzelldichte-Kultivierung – iHCDC	58
5.1.1	Vergleich der klassischen Hochzelldichte-Kultivierung mit der iHCDC	59
5.1.1.1	Wachstumsverhalten und Plasmidstabilität von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-28a	59
5.1.1.2	Glucose-, Stickstoff und Phosphatverbrauch von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-28a im HCDC- und iHCDC-Prozess.....	64
5.1.2	Einsatz des iHCDC-Prozesses für die Produktion von HTT-Rab11a ...	69
5.1.2.1	Wachstumsverhalten und HTT-Rab11a Ausbeute	69
5.1.2.2	Auswirkung der Produktbildung auf die Biomasseausbeute aus Stickstoff, Phosphor und Glucose	72
5.1.2.3	Einfluss der Prozessvarianten auf die HTT-Rab11a Produktbildung	74
5.1.3	Einsatz des iHCDC-Prozesses für die Kultivierung des Leucin- auxotrophen <i>E. coli</i> K12 ER2507 pGLO.....	78

5.1.3.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>E. coli</i> K12 ER2507 pGLO in Abhängigkeit der Leucinkonzentration in Batch Kultivierungen	78
5.1.3.2	Untersuchung des Leucinausbeutekoeffizienten als Funktion der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP	79
5.1.3.3	Entwicklung einer Hochzelldichte-Kultivierungsstrategie für <i>E. coli</i> K12 ER2507 pGLO.....	82
5.1.3.4	Einsatz der iHCDC-Prozessvariante zur Produktion von GFP mit <i>E. coli</i> K12 ER2507 pGLO.....	86
5.2	Entwicklung eines neuen Mediums zur Erhöhung von Prozessrobustheit und Einsetzbarkeit im Pharmabereich – i ² HCDC.....	89
5.2.1	Auswirkung auf die Endzelldichte im Hochzelldichte-Kultivierungsprozess	91
5.2.2	Produktivitätsvergleich der i ² HCDC mit den Vorgängervarianten anhand der Herstellung von HTT-Rab11a	99
5.2.2.1	Medienoptimierung mittels SVP	99
5.2.2.2	Prüfung der Prozesssicherheit des i ² HCDC-Prozesses bei Verzicht auf toxische Spurensalze	101
5.2.3	Anwendung des i ² HCDC-Prozesses auf unterschiedliche Derivate von <i>Escherichia coli</i>	106
5.2.3.1	Herstellung von GFP mit <i>E. coli</i> K12 ER2507 pGLO.....	106
5.2.3.2	Expression von H-Rab11a mit <i>E. coli</i> M15 pQE-30.....	107
5.2.3.3	H-Rab11a Produktion mit <i>E. coli</i> K12 TG1 pQE-30.....	108
6	Zusammenfassung	110
	Literaturverzeichnis	115
	Anhang A	131
	Anhang B	133
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.1	133
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.2	134
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.3	135
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.1	138
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.2	139
	Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.3	140
	Lebenslauf	142

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen

α -KG	=	α -Ketoglutarat
ACKA	=	Acetat-Kinase
ACS	=	Acetyl-CoA-Synthetase
AMPA	=	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
BTM/Biomasse	=	Biotrockenmasse
CoA	=	Coenzym A
CP	=	<i>Center point</i>
DCU	=	<i>Digital Control Unit</i> (dt. Digitale Kontrolleinheit)
DsbC	=	Disulfid-Isomerase
ECHA	=	Europäische Chemikalienagentur
EV	=	Endozytotische Vesikel
EZ	=	Extrazellulär
FE	=	Frühe Endosomen
Feed	=	Synthetisches Nachfütterungsmedium
FIP	=	<i>Family interacting protein</i>
Fru-1,6-BP	=	Fructose-1,6-Bisphosphat
Fru-6-P	=	Fructose-6-Phosphat
GAP	=	<i>GTPase-activating proteins</i> (dt. GTPase-aktivierende Proteine)
GEF	=	<i>GTP exchange factor</i> (dt. GTP-Austauschfaktor)
GESTIS	=	Gefahrstoffinformationssystem (Datenbank chem. Verbindungen)
Glc-6-P	=	Glucose-6-Phosphat
Gly-3-P	=	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
HCDC	=	<i>High Cell Density Cultivation</i> (dt. Hochzelldichte-Kultivierung)
HILIC	=	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> (dt. hydrophile Interaktionschromatographie)
HPICE	=	<i>High performance ion chromatography exclusion</i> (dt. Ionenausschluss-Chromatographie)
IB	=	<i>Inclusion bodies</i>
IFA	=	Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
iHCDC	=	<i>Improved HCDC</i> (1. Entwicklungsstufe)
i ² HCDC	=	2. Entwicklungsstufe der HCDC
IZ	=	Intrazellulär
IQR	=	Interquartilsabstand
LBS-Medium	=	<i>Lysogeny broth</i> Medium auf Sojabasis
LP	=	Lysepuffer
LPP	=	Laemmli-Probenpuffer
MCS	=	<i>Multiple cloning site</i>
MFC	=	<i>Mass flow controller</i>
MFCs/win	=	<i>Multi-Fermentor Control System for Windows</i>
MVK	=	Multivesikuläre Körperchen
NPP	=	Natriumphosphatpuffer
NV	=	Normalverteilung
OA	=	Oxalacetat
OD	=	Optische Dichte
OTR	=	Sauerstofftransferrate
OUR	=	Sauerstoffaufnahme
PAT	=	<i>Process analytical technology</i> (dt. Prozessanalysetechnik)
PDHC	=	<i>Pyruvate dehydrogenase complex</i> (dt. Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex)
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
pO ₂	=	Gelöstsauerstoffpartialdruck

Abkürzungen

POXB	=	Pyruvat-Oxidase
PP	=	Periplasma
PTA	=	Phosphotransacetylase
PTS	=	Phosphotransferasesystem
Rab	=	<i>Ras-related in brain</i>
RE	=	Recycling Endosomen
REACH	=	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
RQ	=	Respirationsquotient
RSM	=	<i>Response surface methodology</i>
SVHC	=	<i>Substances of Very High Concern</i>
SE	=	Spätes Endosom
SRP	=	<i>Signal recognition particle</i>
SVP	=	Statistische Versuchsplanung
TGN	=	trans-Golgi-Netzwerk
TGX	=	<i>Tris-Glycine eXtended</i>
Wasser	=	Wasser der Qualität „vollentsalzt“

Chemikalien und Medienkomponenten

Cobaltchlorid	=	Cobalt(II)-chlorid
He	=	Hefeextrakt
Sp	=	Sojapepton
Glc	=	Glucose
Gly	=	Glycerin
Manganchlorid	=	Mangan(II)-chlorid
Pep	=	Pepton
Try	=	Trypton
Sac	=	Saccharose

Chemikalienhersteller

M	=	Merck
O	=	Omikron
R	=	Carl Roth
RdH	=	Riedel-de Haën
S	=	Serva
SA	=	Sigma-Aldrich

Exprimierte Produkte

GFP	=	Grün fluoreszierendes Protein
H-Rab11a	=	His ₆ -Rab11a
HTT-Rab11a	=	His ₆ -T7-Thrombin-Rab11a

Variablen

c_{Ac^-}	=	Acetatkonzentration im Medium	/ $g\ l^{-1}$
c_{FM}	=	Molare Fließmittelkonzentration	/ $mmol\ l^{-1}$
c_{Glc}	=	Glucosekonzentration im Medium	/ $g\ l^{-1}$
c_{GlcR}	=	Glucosekonzentration im Reservoir	/ $g\ l^{-1}$
c_{IPTG}	=	Molare IPTG-Konzentration	/ $mmol\ l^{-1}$
c_{Leu}	=	Leucinkonzentration im Medium	/ $g\ l^{-1}$
c_N	=	Stickstoffkonzentration im Medium	/ $g\ l^{-1}$
c_P	=	Phosphorkonzentration im Medium	/ $g\ l^{-1}$
c_{Prod}	=	Produktkonzentration	/ $g\ l^{-1}$
c_X	=	Biomassekonzentration	/ $g\ l^{-1}$
C_X	=	Lebendkeimzahlkonzentration	/ $KBE\ ml^{-1}$
C_{X+}	=	Lebendkeimzahlkonzentration, plasmidhaltige Zellen	/ $KBE\ ml^{-1}$
F	=	Verdünnungsfaktor	/ -
F_{air}	=	Druckluftbegasungsrate	/ $l\ min^{-1}$
f_B	=	Verhältnis dosierter Base zu Feed	/ -
F_B	=	Basevolumenstrom	/ $l\ h^{-1}$
F_{FM}	=	Fließmittelgeschwindigkeit	/ $ml\ min^{-1}$
F_{Gin}	=	Gesamtbegasungsrate am Reaktoreingang	/ $l\ min^{-1}$
F_{O_2}	=	Sauerstoffbegasungsrate	/ $l\ min^{-1}$
F_R	=	Nachfütterungsrate aus dem Reservoir	/ $l\ h^{-1}$
$f_{X/OD}$	=	Umrechnungsfaktor zwischen c_X und ΔOD_{600}	/ $g\ l^{-1}$
$f_{X+/X}$	=	Anteil plasmidhaltiger Zellen	/ %
IQR	=	Interquartilsabstand	
K_{Glc}	=	Glucoseaffinitätskonstante	/ $mg\ l^{-1}$
LD_{50Ra}	=	Mittlere letale Dosis für Ratten	/ $mg\ kg^{-1}$
m_{CO_2}	=	Kohlenstoffdioxidmasse bzw. durch Zellen produzierte Menge an Kohlenstoffdioxid	/ g
M_{CO_2}	=	Molare Masse von Kohlenstoffdioxid	/ $g\ mol^{-1}$
m_{Glc}	=	Glucosemasse bzw. durch Zellen verbrauchte Glucosemenge	/ g
\dot{m}_{GlcR}	=	Glucosemassenstrom in den Reaktor	/ $g\ h^{-1}$
m_{LeuB}	=	Verbrauchte Leucinmasse aus Base	/ g
m_{NB}	=	Verbrauchte Stickstoffmasse aus Base	/ g
m_{O_2}	=	Sauerstoffmasse bzw. durch Zellen verbrauchte Menge an Sauerstoff	/ g
M_{O_2}	=	Molare Masse von Sauerstoff	/ $g\ mol^{-1}$
m_P	=	Phosphormasse bzw. durch Zellen verbrauchte Menge an Phosphor	/ g
m_{Prod}	=	Produktmasse	/ g
m_{ProdW}	=	Produktmasse in der Zielbande	/ ng
m_X	=	Biotrockenmasse	/ g
$m_{X\Delta OD_{600}}$	=	Biotrockenmasse berechnet aus ΔOD_{600}	/ g
N_{St}	=	Rührerdrehzahl	/ min^{-1}

Variablen

OD_{med}	=	OD des Kulturüberstands bei 600 nm	/ -
OD_{susp}	=	OD der Suspension bei 600 nm	/ -
ΔOD_{600}	=	Differenz aus OD_{susp} und OD_{med}	/ -
pH	=	pH-Wert	/ -
$pO_2\%$	=	Relativer Sauerstoffpartialdruck	/ %
Q^2	=	Güte der Vorhersagbarkeit eines Regressionsmodells	/ -
$q_{Ac^-/X}$	=	Spezifische Acetatbildungsrate	/ $g(g\ h)^{-1}$
Q_{CO_2}	=	Kohlenstoffdioxidbildungsrate	/ $g(l\ h)^{-1}$
$q_{Glc/X}$	=	Spezifische Glucoseverbrauchsrate	/ $g(g\ h)^{-1}$
$q_{Glc/Xm}$	=	Spezifische Glucoseverbrauchsrate für Erhaltungsstoffwechsel	/ $g(g\ h)^{-1}$
Q_{Glc}	=	Glucoseverbrauchsrate	/ $g(l\ h)^{-1}$
$q_{O_2/X}$	=	Spezifische Sauerstoffverbrauchsrate	/ $g(g\ h)^{-1}$
Q_{O_2}	=	Sauerstoffverbrauchsrate	/ $g(l\ h)^{-1}$
$q_{Prod/X}$	=	Spezifische Produktbildungsrate	/ $g(g\ h)^{-1}$
R^2	=	Bestimmtheitsmaß	/ -
RQ	=	Respirationsquotient	/ -
t	=	Prozesszeit	/ h
$t_{F,i}$	=	Startzeitpunkt der Nachfütterung in der Phase i	/ h
t_{ind}	=	Induktionszeitpunkt	/ h
V_{inoc}	=	Volumen des Inokulums	/ l
V_L	=	Volumen der Suspension im Reaktor	/ l
V_{LP}	=	Volumen des Lysepuffers	/ μ l
V_{LLP}	=	Volumen des 2×SDS-Laemmli-Probenpuffers	/ μ l
V_{NPP}	=	Volumen des Natriumphosphatpuffers	/ μ l
V_s	=	Probenvolumen	/ μ l
$y_{X/Glc}$	=	Glucoseausbeutekoeffizient	/ $g\ g^{-1}$
$y_{X/Glcg}$	=	Wachstumsbezogener Glucoseausbeutekoeffizient	/ $g\ g^{-1}$
$y_{X/Leu}$	=	Leucinausbeutekoeffizient	/ $g\ g^{-1}$
$y_{X/N}$	=	Stickstoffausbeutekoeffizient	/ $g\ g^{-1}$
$y_{X/P}$	=	Phosphorausbeutekoeffizient	/ $g\ g^{-1}$
x_{CO_2in}	=	Kohlenstoffdioxidstoffmengenanteil in der Zuluft	/ -
x_{CO_2out}	=	Kohlenstoffdioxidstoffmengenanteil in der Abluft	/ -
x_{O_2in}	=	Sauerstoffstoffmengenanteil in der Zuluft	/ -
x_{O_2out}	=	Sauerstoffstoffmengenanteil in der Abluft	/ -
ϑ	=	Temperatur der Suspension im Reaktor	/ °C
ϑ_{co}	=	Temperatur im Säulenofen	/ °C
μ	=	Spezifische Wachstumsrate	/ h^{-1}

Indices

0	=	Startwert
0, <i>i</i>	=	Startwert der Phase <i>i</i>
Ac ⁻	=	Acetat
air	=	Druckluft
B	=	Base
calc	=	Kalkuliert
crit	=	Kritischer Wert für Acetatbildung
CO ₂	=	Kohlenstoffdioxid
end	=	Wert am Prozessende
F	=	<i>Feeding</i>
FM	=	Fließmittel
g	=	<i>Growth</i>
G	=	Gesamt
Glc	=	Glucose
<i>i</i>	=	Laufindex
in	=	Reaktoreingang
Ind	=	Induktion
inoc	=	Inokulum
IPTG	=	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>j</i>	=	Laufindex für Substrate und Metabolite
L	=	Flüssigphase
Leu	=	Leucin
LP	=	Lysepuffer
LPP	=	Laemmli-Probenpuffer
m	=	<i>Maintenance</i> (für Erhaltungsstoffwechsel)
max	=	Maximalwert
med	=	Medium
N	=	Stickstoff
NPP	=	Natriumphosphatpuffer
O ₂	=	Sauerstoff
OD	=	Optische Dichte
out	=	Reaktorausgang
P	=	Phosphor
Prod	=	Produkte GFP, H-Rab11a oder HTT-Rab11a
R	=	Reservoir der Feedlösung
Ra	=	Ratte
s	=	Probe
set	=	Sollwert
co	=	Säulenofen
St	=	Rührer
susp	=	Suspension
w	=	Produktbande
X	=	Biomasse

1 Einleitung

Seit der Markteinführung von Humulin® im Jahr 1982 als erstem biopharmazeutischen Wirkstoff hat die biotechnologische Herstellung von Medikamenten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese Humaninsulin-Variante wurde von Eli Lilly & Co entwickelt und in *E. coli* exprimiert. Bis Ende 2015 wurden seither über 400 Biopharmazeutika (Peptide und Proteine) zugelassen und weltweit vertrieben. Mit schätzungsweise 1300 weiteren Substanzen in den Entwicklungspipelines der Pharmakonzerne – Verteilungsschlüssel: 14 % Entwicklung, 50 % präklinische Studien, 33 % klinische Studien, 3 % Registrierungsphase – zeigt sich die Dynamik und das Potential der biopharmazeutischen Industrie. (Sanchez-Garcia et al. 2016)

Zu Beginn der biopharmazeutischen Revolution in den 1980er Jahren war *E. coli* die entscheidende Plattform zur Produktion rekombinanter Pharmaproteine. Die Vielschichtigkeit des Organismus kombiniert mit den genetischen Manipulationsmöglichkeiten erlaubt die Anpassung an die unterschiedlichsten Bedürfnisse einzelner Produkte und Herstellungsarten. Trotz des Verlusts seiner Vorherrschaft als Expressionssystem Nr. 1 zu Gunsten von Säugetierzelllinien (hauptsächlich CHO), welche heutzutage aufgrund der Fähigkeit zur Ausführung posttranslationaler Modifikationen bevorzugt werden (Sanchez-Garcia et al. 2016), gilt *E. coli* mit einem aktuellen Marktanteil von circa 30 % weiterhin als wichtigster prokaryotischer Vertreter (Baeschen et al. 2015). Dies basiert nicht zuletzt auf der hervorragenden Kultivierbarkeit, den geringen Ansprüchen an das Kulturmedium sowie der stetig voranschreitenden Stamm- und Vektorentwicklung, welche in Zukunft sogar die Zulassung funktionaler Antikörper oder Antikörperfragmente aus *E. coli* möglich erscheinen lässt (Gaciarz et al. 2016; Robinson et al. 2015).

Um eine ausreichende globale Versorgung mit Biopharmazeutika zu gewährleisten, bedarf es geeigneter Kultivierungsstrategien, welche die Bereitstellung von Bulk-Produkten aus Großproduktionen oder hoch spezifischer Wirkstoffe im Bereich der personalisierten Medizin und zur Behandlung von *Orphan Diseases* sicherstellt. Die in den 1990ern etablierte Hochzelldichte-Kultivierung (**HCDC**) von *E. coli* (Riesenberg et al. 1991) ist eine vielversprechende Variante, um diesen Bedarf decken zu können. Diese Prozessführung vereint Vorteile wie das Erreichen sehr hoher Biomassekonzentrationen von mehr als 100 g l^{-1} und gleichzeitig hohe Produktausbeuten mit deutlich über 10 g l^{-1} (Riesenberg und Guthke 1999). Während anspruchsvolle, hoch automatisierte Prozesse besonders im Labormaßstab sowie in der Forschung Anwendung finden, stehen einfache und robuste Prozesse, die effizient und zugleich sicher sind, im Fokus industrieller Vorhaben. Basierend auf dem klassischen HCDC-Verfahren wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten verschiedene Varianten für rekombinante therapeutische und industrielle Proteine entwickelt und eingesetzt. Das HCDC-Verfahren sieht eine Unterteilung in eine Batch-Phase zu Prozessbeginn gefolgt von einer oder mehreren Fed-Batch-Phasen vor. Begleitet wird die Batch-Phase allerdings von uner-

wünschten Effekten, wie der Akkumulation von Acetat, bedingt durch den Überflussmetabolismus beim Wachstum mit maximaler spezifischer Wachstumsrate oder einem vergleichsweise hohen Sauerstoffbedarf. In großen Reaktoren mit begrenztem spezifischen Leistungseintrag kann somit bereits frühzeitig die Zugabe von Sauerstoff erforderlich sein. Ein meist auch begrenzter Gasdurchsatz erschwert gleichzeitig das CO₂-Stripping, weshalb die Carbonatkonzentration in der Flüssigphase steigt und die Nebenproduktbildung begünstigt wird. In Abhängigkeit der Menge an gebildeten Nebenprodukten wird die Länge der Übergangsphase zwischen der Batch- und Fed-Batch-Phase zum Abbau der Metabolite oft angepasst. Prozessrobustheit und Reproduzierbarkeit leiden dabei.

Im Hinblick auf die Mitarbeiter- und die Konsumentensicherheit, spielt neben einer robusten Kultivierungsstrategie auch die Unbedenklichkeit zu verwendender Medienbestandteile eine zentrale Rolle bei der Prozessentwicklung. Seit Inkrafttretens der *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH)-Verordnung am 1. Juni 2007 durch die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) werden die Zulassung und Beschränkung von Chemikalien im europäischen Raum strenger reguliert. Die ECHA charakterisiert seither chemische Verbindungen neu und listet die nach heutigem Wissensstand „besonders besorgniserregenden Stoffe“ (SVHC) auf. Das auf Korz et al. (1995) basierende synthetische Medium für die Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli* beinhaltet nach aktuellem Kenntnisstand einige SVHC, welche mit Borsäure und Cobalt(II)-chlorid als reproduktionstoxisch und kanzerogen eingestuft werden. Darüber hinaus enthaltenes Mangan(II)-chlorid ist nach GHS-Gefahrstoffkennzeichnung als giftig sowie umweltgefährlich charakterisiert, wodurch zumindest in Bezug auf die Arbeitssicherheit Handlungsbedarf gesehen wird.

Die stetig voranschreitende Optimierung von *E. coli* als Expressionssystem, der Bedarf an verbesserten Kultivierungsstrategien sowie die Notwendigkeit sicherer Medienformulierungen zeigen die Notwendigkeit weiterer Forschungs- und Entwicklungsanstrengungen auf dem Gebiet der Hochzelldichte-Kultivierung mit *E. coli*. Die Verfolgung systematischer Ansätze zur Prozessoptimierung erfreut sich dabei steigender Beliebtheit.

2 Zielsetzung

Aus den beschriebenen Gründen wird mit der vorliegenden Arbeit das Ziel verfolgt, den zu Beginn der 90er Jahre entwickelten und seitdem etablierten HCD-Process für *E. coli* auf Basis des von Korz et al. (1995) vorgestellten synthetischen Mediums zu optimieren. Angelehnt an die Bedürfnisse industrieller Prozessstrategien steht die Entwicklung einer einfacheren Kultivierungsstrategie im Fokus der Arbeit. Dabei soll durch Aufwandsminimierung bei der Medien- und Prozessvorbereitung sowie durch eine geeignete Prozessführung die Robustheit erhöht und die Fehleranfälligkeit reduziert werden. Mithilfe der statistischen Versuchsplanung (SVP) wird ein systematischer Ansatz zur Medienoptimierung verfolgt, welcher primär die Komponenten, die ein besonders hohes Gefährdungspotential aufweisen, aus dem Medienansatz eliminieren oder zumindest reduzieren soll. Dabei wird das Augenmerk auf eine breite Anwendbarkeit der Kultivierungsstrategie sowie des Mediums gelegt. Zur Realisierung soll die wesentliche Prozessentwicklung mit einem rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a, der IPTG-induzierbar die Expression von H-TT-Rab11a als Markerprotein erlaubt, sowie mit BL21 erfolgen. Zusätzlich wird der Leucin-auxotrophe Stamm K12 ER2507 für die Entwicklung einer speziellen Kultivierungsstrategie für Aminosäure-auxotrophe Stämme eingesetzt und für die Expression von GFP verwendet. Ferner soll die letzte Entwicklungsstufe auf die Expression von H-Rab11a mit *E. coli* M15 und *E. coli* K12 TG1 übertragen werden können.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 *Escherichia coli* als Hostorganismus für die Produktion rekombinanter Proteine

Das gramnegative, fakultativ anaerobe Darmbakterium *E. coli* ist einer der am häufigsten verwendeten prokaryotischen Organismen zur Produktion pharmazeutisch aktiver und kommerziell relevanter Proteine (Casali 2003). Gründe hierfür liegen vor allem in der vergleichsweise einfachen Handhabung von *E. coli*, dem schnellen Wachstum auf günstigen, chemisch definierten Medien zu hohen Zellkonzentrationen und dem über Jahrzehnte andauernden Wissenszuwachs über genetische und biochemische Eigenschaften des Organismus (Terpe 2006; Sørensen und Mortensen 2005).

Viele pharmazeutisch interessante Proteine sind komplex aufgebaut. Sie bestehen oft aus mehreren Untereinheiten, benötigen Cofaktoren und weisen eine hohe Anzahl an Disulfidbrücken sowie posttranslationalen Modifikationen auf, welche für die vollständige biologische Funktion und Aktivität sorgen (Weickert et al. 1996). Üblicherweise ist die heterologe Proteinexpression in *E. coli* im Cytoplasma lokalisiert. Diese Variante ist unkompliziert, allerdings wird die Zielproteinisolation aus dem Cytoplasma durch die Anwesenheit einer Vielzahl wirtseigener Proteine und Endotoxine erschwert. Hinzu kommt die mögliche Proteindegradation durch wirtseigene Proteasen (Berlec und Štrukelj 2013). Die reduzierenden Eigenschaften des Cytoplasmas erlauben außerdem keine Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen. Fehlende oder fehlerhafte Disulfidbrücken in Kombination mit hohen Expressionsraten führen somit häufig zur Agglomeration des Zielproteins. Diese Agglomerate sind oft biologisch inaktiv und fallen letztlich als unlösliche *Inclusion bodies* (IB) an (Ferrer-Miralles et al. 2009; Swartz 2001). Die Fülle an Wissen über den Organismus sowie das umfassende Angebot an molekularbiologischen Werkzeugen eröffnen heute jedoch Strategien, die selbst die Expression komplexerer Proteine in aktiver Form in *E. coli* erlauben (Gopal und Kumar 2013).

Für industrielle Zwecke werden bevorzugt *E. coli* K12- und B- Derivate eingesetzt (Tripathi 2016). Durch gezielte Stammmutationen können mit dem Herstellungsprozess assoziierte Probleme überwunden werden. Ein wesentlicher Aspekt ist die Acetatbildung unter aeroben Kulturbedingungen bei der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle, welche in 3.5.1 näher erläutert wird. Neben der geringeren Acetatbildung zeichnen sich B-Derivate durch die Defizienz an wirtseigenen Proteasen aus (Daegelen et al. 2009). In BL21 und dem lysogenen BL21 (DE3), beschrieben durch Studier und Moffatt (1986), sind beispielsweise die Gene *OmpT* und *Lon* deletiert, so dass die entsprechenden Proteasen nicht exprimiert werden. Sie sind verantwortlich für die Degradation vieler extrazellulärer sowie Fremdproteine (Gottesman 1996).

Die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen kann durch gezielte Mutation der Gene für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) sowie der Glutaredoxin-Reduktase (*gor*) verbessert werden. Eine erhebliche Steigerung der Ausbeute an aktivem Protein kann durch Co-Expression der Disulfid-Isomerase (DsbC) erreicht werden, wie Bessette et al.

(1999) am Beispiel von gewebespezifischem Plasminogenaktivator (tPA) zeigen konnten. Alternativ können Zielproteine durch Fusion mit einer Signalsequenz direkt ins Periplasma sekretiert werden, wo Proteine der Dsb-Familie die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysieren (Schlegel et al. 2013).

Neben dem Wirtsstamm ist die Wahl eines geeigneten Vektors unerlässlich. Heutzutage sind kommerzielle Expressionsvektoren in großer Vielfalt erhältlich, welche eine Palette von Replikons, Promotoren, Selektionsmarkern, Polylinkern und Fusionspartnern sowie Fusionspartnerentfernungsstrategien beinhalten (Tripathi 2016; Rosano und Ceccarelli 2014). Dabei sollte die Plasmidanzahl in der Zelle ausbalanciert sein. Eine zu hohe Kopienzahl führt häufig zu Plasmidverlust und reduzierter Wachstumsrate. Umgekehrt ist eine reduzierte Ausbeute zu erwarten, wenn die Kopienzahl in der Zelle gering ist (Baneyx 1999). Der Einsatz von Antibiotika kann den Plasmidverlust unterbinden, jedoch versucht die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) deren Verwendung in der Medikamentenherstellung zu verhindern (Huang et al. 2012). Der Promotor sollte eine effiziente Transkription erlauben und gleichzeitig eine strikte Regulation aufweisen, wodurch Ausbeuten erhöht und die Basalexpression vor Induktion minimiert werden können (Weickert et al. 1996). Industriell und in der Grundlagenforschung haben sich der *lac*-Promotor sowie seine Derivate *tac* und *trc* etabliert. Des Weiteren werden Plasmide, welche unter der Kontrolle des T7 Promotors aus T7 Bakteriophagen stehen, gerne aufgrund der hohen Produktivität eingesetzt. Die Induktion erfolgt hierbei über das vergleichsweise kostenintensive und teilweise zelltoxische Lactoseanalogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die Expressionsstärke kann durch Variation der IPTG-Konzentration reguliert werden. Wahlweise wird der relativ starke Arabinose-induzierbare *araB* Promotor und der *araC* Repressor verwendet. Er zeichnet sich durch starke Reprimierung und die Induzierbarkeit über einen weiten Arabinosekonzentrationsbereich aus (Weickert et al. 1996). Viele der kommerziell erhältlichen Vektoren bieten die Möglichkeit der Expression zusammen mit einem Fusionspartner, wie einem Hexahistidinrest (His₆-Tag), Maltosebindungsprotein oder der Glutathion-S-Transferase, wodurch die Löslichkeit des Proteins gesteigert werden kann (Kamionka 2011).

Obwohl *E. coli* nicht über die erforderlichen Zellmaschinerien zur Ausführung posttranslationaler Modifikationen verfügt (Tripathi 2016), gelang Wacker et al. (2002) erstmals die Anheftung von *N*-Glykosylierungsmustern. Dazu transferierten sie das *pgl* Glykosylierungssystem von *Campylobacter jejuni* in *E. coli*. Dadurch wurde der Weg geebnet, auch komplexere Therapeutika humanen Ursprungs, wie *N*-glykosylierte Antikörperfragmente, in *E. coli* zu exprimieren (Lizak et al. 2011).

Nicht zuletzt aufgrund dieser stetigen Weiterentwicklungen stellt *E. coli* das wichtigste prokaryotische Expressionssystem dar und manifestiert seine Stellung als Plattform für die Erzeugung von Biopharmazeutika im Vergleich zu eukaryotischen Systemen. Seit der Zulassung von rh Insulin (Humulin[®], Eli Lilly & Co) im Jahr 1982 bis zum Jahr 2014 betrug der Anteil der in *E. coli* produzierten Biopharmazeutika 19 %. Bei den 54 Neuzulassungen zwischen 2010 und 2014 entfiel sogar knapp ein Drittel auf *E. coli*

(Abb. 3-1). Darunter sind Produkte vertreten, wie Hormone (diverse Insulin-, humane Wachstumshormon- und andere Hormonpräparate), Wachstumsfaktoren (diverse rekombinante humane Kolonie-stimulierende Faktoren und andere Wachstumsfaktoren), Interferone, Vakzine, rekombinante Enzyme und sogar Antikörperfragmente. (Sanchez-Garcia et al. 2016; Walsh 2014; Baeshen et al. 2014)

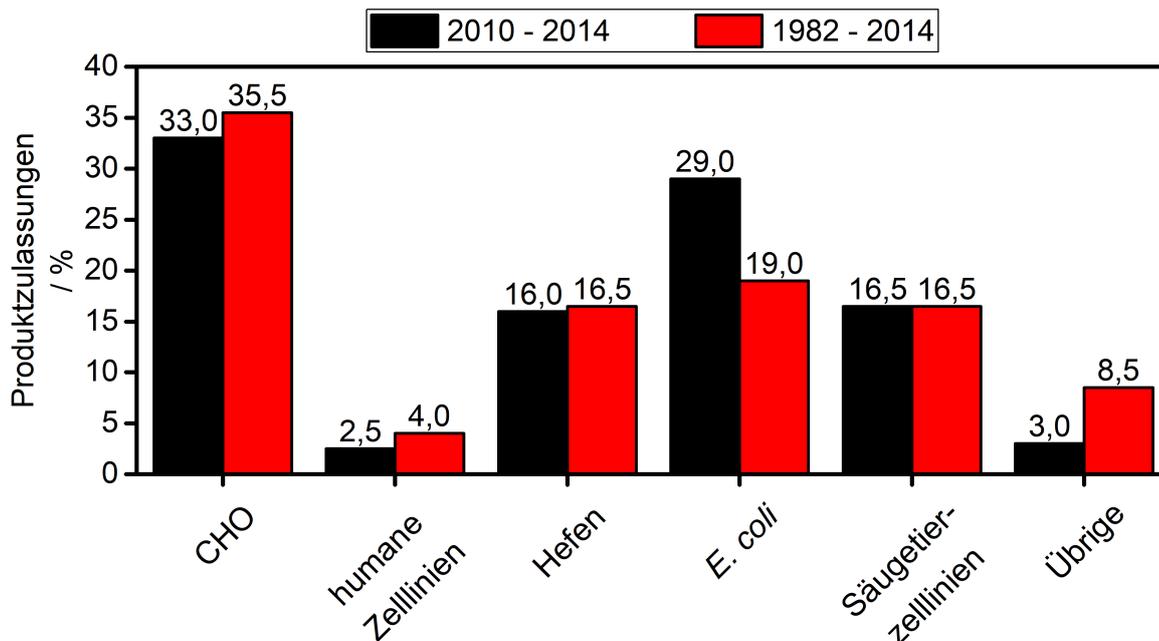


Abb. 3-1: Expressionssysteme zur Herstellung von Biopharmazeutika. Produktzulassungen im Zeitraum 1982 – 2014 sowie 2010 – 2014. Die Datensätze sind als prozentualer Anteil an allen biopharmazeutischen Produktzulassungen in der jeweiligen Periode angegeben (modifiziert nach Walsh (2014)).

3.2 Eingesetzte Markerproteine

3.2.1 Eigenschaften und Funktionen von Rab11a

Ras-related in brain (Rab) Proteine stellen mit über 60 Vertretern die größte Familie der kleinen Ras-ähnlichen GTPasen im menschlichen Organismus dar und bilden damit die größte Gruppe der Ras-Superfamilie (Hutagalung und Novick 2011). Ihnen wird eine zentrale regulatorische Funktion beim vesikulären Membranverkehr in eukaryotischen Zellen zugesprochen. Dabei wird jedes Mitglied dieser Proteinfamilie mit einem bestimmten Teiltransportschritt assoziiert (Chen et al. 1998). Durch die Interaktion mit Effektorproteinen erwerben sie in ihrer GTP-gebundenen Konformation ihre biologische Funktionalität.

Rab11 bildet eine Subfamilie bestehend aus den drei Isoformen Rab11a, Rab11b und Rab25. Sie gelten als Masterregulatoren des intrazellulären Proteintransports (Welz et al. 2014).

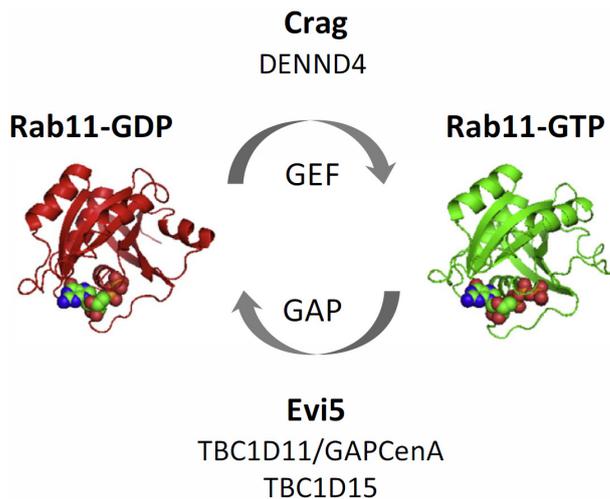


Abb. 3-2: Rab11 GDP/GTP-Zyklus. Rab11 in seiner typischen Faltung mit sechssträngigem β -Faltblatt flankiert von fünf α -helikalen Strukturen in seiner GDP- (links) und GTP gebundenen Form (Welz et al. 2014).

Während Rab11a praktisch in allen Gewebeformen von Säugetieren vorzufinden ist (Goldenring et al. 1994), taucht Rab11b vornehmlich im Gehirn, Hoden sowie Herz (Lai et al. 1994) und Rab25 in Lunge, Nieren und Gastrointestinaltrakt (Goldenring et al. 1993) auf. Wie alle Mitglieder der Rab Proteinfamilie weist Rab11 eine für GTPasen typische Struktur auf, bestehend aus einem sechssträngigen β -Faltblatt flankiert von fünf α -Helices (Abb. 3-2) (Jagoe et al. 2006).

Die Aktivität von Rab11 wird über die Bindung von GDP und GTP reguliert. Dabei durchlaufen Rab Proteine einen

GDP/GTP-Zyklus, wie in Abb. 3-2 dargestellt, deren Steuerung durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) einerseits und GTP-Austauschfaktoren (GEF) andererseits erfolgt. Dabei initiieren die derweil noch unzureichend charakterisierten GEF der humanen Rab Proteine die Freisetzung von GDP und ermöglichen die Bindung von GTP. Die Bindung von GTP bewirkt nachfolgend eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch Rab11 mit seinen Effektorproteinen (z. B. Motorproteine) interagieren kann. Die drei bislang bekannten Rab11 GAP (TBC1D11, TBC1D15 und GAPCenA) wiederum sorgen durch GTP-Hydrolyse für die Inaktivierung von Rab11. (Welz et al. 2014)

Abb. 3-3 gibt einen Überblick über die Beteiligung von Rab11 an Vesikeltransportprozessen innerhalb unterschiedlicher Zelltypen. Dazu zählen das Recycling des AMPA-Rezeptors in dendritischen Fortsätzen (Wang et al. 2008), Transferrin-Rezeptor Transport zur Plasmamembran (Ullrich et al. 1996) sowie der E-Cadherin Transport zur Ausbildung und Erhaltung der Polarität von Epithelzellen (Desclozeaux et al. 2008). Weiterhin sind Rab11 Proteine entlang des sekretorischen Weges am TNG und post-Golgi Vesikeln lokalisiert. Ihre Transportfunktion ist dort eng mit dem Exocyst-Komplex verbunden (Zhang et al. 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Rab11 Proteine den Transport von weiteren Rezeptoren und Adhäsionsproteinen wie Rhodopsin, $\alpha 5\beta 1$ Integrin, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor sowie den Toll-ähnlichen Rezeptor regulieren und zelluläre Abläufe wie die Zilio-, Cyto-, Oo- sowie die Neurogenese beeinflussen (Welz et al. 2014).

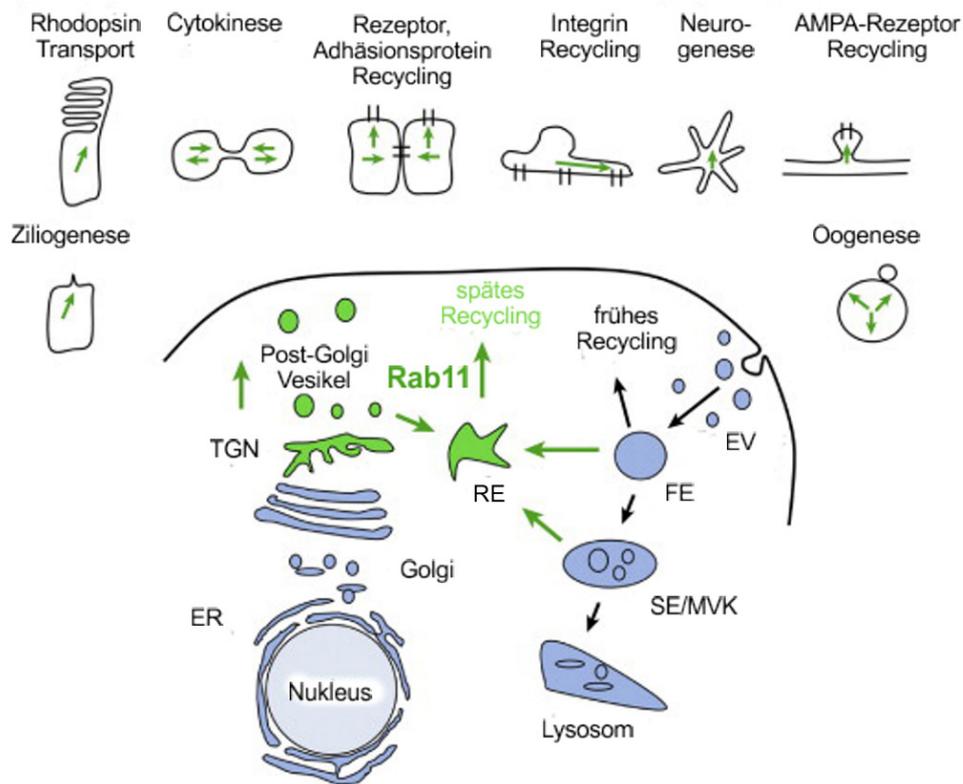


Abb. 3-3: Übersicht von Rab11-regulierten Vesikeltransportprozessen. Am sekretorischen Transportweg sind sie am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Post-Golgi Vesikeln lokalisiert. Bei Recyclingprozessen von Membranproteinen ist Rab11 lediglich an späten Transportschritten von den frühen Endosomen (FE) sowie den späten Endosomen (SE) und den multivesikulären Körperchen (MVK) in Richtung des perizentriolaren Recycling Endosoms (RE) und zurück zur Plasmamembran (spätes Recycling) beteiligt. Die Lokalisierung von Rab11 an intrazellulären Membrankompartimenten ist grün gekennzeichnet. Zusätzlich symbolisieren die grünen Pfeile die Transportrichtung in den unterschiedlichen Zelltypen. Modifiziert nach Welz et al. (2014)

3.2.2 Grün fluoreszierendes Protein – GFP

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde erstmals von Shimomura et al. (1962) beschrieben. Die Existenz von GFP in der im nordwestlichen Pazifik vorkommenden Quallenart *Aequorea victoria* ist eng mit dem Protein Aequorin verbunden (Shimomura 2005). GFP dient in der Biolumineszenzreaktion der Qualle als Lichtemitter. Die dafür erforderliche Energie wird in einer Ca^{2+} -abhängigen Reaktion durch Aequorin generiert und nachfolgend durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) übertragen (Shimomura und Johnson 1978).

Die *gfp10* cDNA kodiert ein aus 238 Aminosäureresten bestehendes Polypeptid mit einer kalkulierten Molmasse von 26,9 kDa und bildet die Primärstruktur des *Aequorea victoria* GFPs (Prasher et al. 1992). Das Chromophor 4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolin-5-on wird autokatalytisch aus der Peptidsequenz Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ gebildet. Über einen nukleophilen Angriff der Amidgruppe des Gly⁶⁷ auf die Carbonylgruppe von Ser⁶⁵ und anschließender Dehydrierung entsteht Imidazolinon. Die Oxidation der α - β -Bindung von Tyr⁶⁶ sorgt abschließend für die Konjugation der aromatischen Gruppe mit Imidazolinon und das Chromophor erlangt seine Funktion (Tsien 1998).

Die Kristallstruktur von GFP wurde erstmals 1996 durch Ormö et al. sowie Yang et al. unabhängig voneinander aufgeklärt. Es besteht aus einem elfsträngigem β -Fass, welches um eine einzelne zentrale α -Helix gewunden ist. Dabei umfasst jedes β -Faltblatt

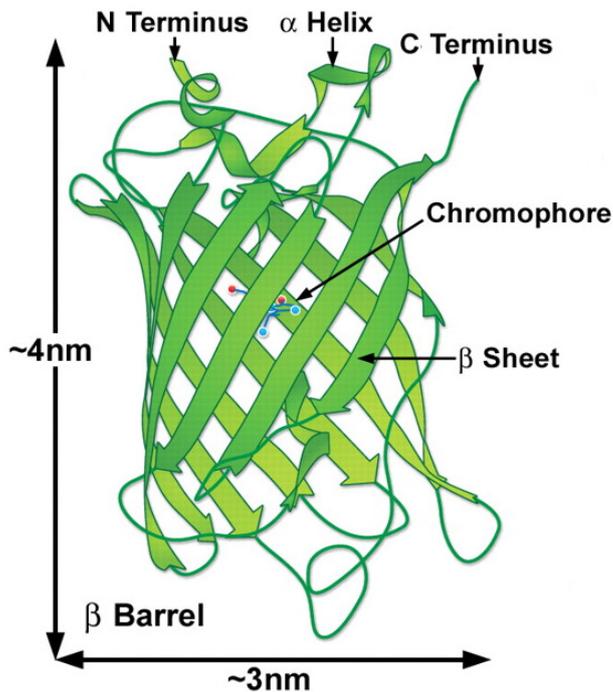


Abb. 3-4: Struktur und Dimensionierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). GFP ist als kompaktes elfsträngiges β -Fass aufgebaut, welches eine zentralliegende α -Helix umgibt. Das Chromophor ist mit der α -Helix verbunden und in der Mitte des Zylinders positioniert (Rizzo et al. 2009).

9 bis 13 Aminosäurereste. Das Fass ist nahezu perfekt zylindrisch mit einem Durchmesser von (24 - 30) Å und einer Länge von (40 - 42) Å aufgebaut (siehe Abb. 3-4). Das Chromophor ist zentral im Inneren des Moleküls lokalisiert und damit vollständig geschützt. Diese außergewöhnliche Struktur verleiht dem Protein eine besondere Stabilität gegenüber Denaturierung und Proteolyseaktivität (Ormö et al. 1996; Yang et al. 1996). Der Wildtyp-GFP-Chromophor weist zwei Anregungszustände mit einem Hauptabsorptionsmaximum bei 395 nm und einem in der Amplitude dreifach geringeren Peakmaximum bei 475 nm auf (Yang et al. 1996). Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda_{\text{max}} = 509$ nm (Shimomura 1979).

Die Familie der GFP-ähnlichen Proteine, welche ein breites Farbspektrum von blau über grün bis rot abdecken (Mishin et al. 2015), erlauben bislang unsichtbare Prozesse sichtbar zu machen

(Hoffman 2015) und sind daher zentraler Bestandteil der gegenwärtigen medizinischen, molekularbiologischen und zellbiologischen Forschung (Wachter 2006).

3.3 Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli*

Die Kombination aus biologischem Verständnis des Expressionssystems, rekombinanter DNA-Technologie sowie effizienten Kultivierungsstrategien bietet theoretisch eine unerschöpfliche Quelle an humanen Proteinen zur Behandlung diverser Krankheiten, welche sonst kaum in ausreichender Menge aus natürlichen Ressourcen gewonnen werden können (Choi et al. 2006).

Die Gesamtproduktivität kann als Funktion der Zelldichte sowie der zellspezifischen Produktivität beschrieben werden. Soll diese optimiert werden, steht die Erhöhung der Zellkonzentration bei gleichzeitiger Maximierung der zellspezifischen Produktivität im Fokus der Prozessentwicklung. Aus diesem Grund werden Fed-Batch-Verfahren in Industrie und Forschung favorisiert (Riesenberg und Guthke 1999). Anfang der 1990er

Jahre haben Riesenberg et al. (1991) den Begriff der *High Cell Density Cultivation* (HCDC) geprägt. Dieser aus einer initialen Batch-Phase mit maximaler spezifischer Wachstumsrate, gefolgt von einer oder mehreren Fed-Batch-Phasen bestehende Kultivierungsprozess, ermöglicht das Erreichen sehr hoher Zellkonzentrationen. Für die Verwendung des HCDC Begriffs erfolgt keine strikte Abgrenzung nach der zu erreichenden Mindestzellichte. Für Biotrockenmassekonzentrationen von circa 25 g l^{-1} (Fernández-Castané et al. 2012; Chen et al. 2009) sowie für $> 120 \text{ g l}^{-1}$ (Bordeaux et al. 2014; Horta et al. 2012; Biener et al. 2010) wird der Begriff gleichermaßen verwendet. Schätzungen zufolge liegt die maximal erreichbare Zellkonzentration bei etwa 200 g l^{-1} (Shiloach und Fass 2005). Mori et al. (1979) nennen einen Wert von 220 g l^{-1} bis es zum Verlust der Fluidität der Kultursuspension kommt. Mit der Verwendung von Dialysereaktoren scheint diese Zellkonzentration auch praktisch erreichbar zu sein. Nakano et al. (1997) berichten von 190 g l^{-1} *E. coli* K12, was insbesondere auf die kontinuierliche Abführung von inhibierend wirkenden Metaboliten, wie Acetat, zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ergeben sich nachfolgende Vorteile für die HCDC:

- Steigerung der Kosteneffizienz durch erhöhte volumetrische Produktivität,
- Reduktion des Reaktionsvolumens,
- Vereinfachung des Aufarbeitungsprozesses,
- reduzierter Investitionsaufwand für das Equipment,
- Reduktion des Abwasseraufkommens (Shojaosadati et al. 2008).

Die Substratversorgung ist ein wichtiger Aspekt bei der HCDC von *E. coli*, da sie die erreichbare Zellkonzentration, die spezifische Produktbildung und Erzeugung von Nebenprodukten beeinflusst (Choi et al. 2006). Eine Unterteilung der möglichen Nachfütterungsstrategien erfolgt grob in Varianten mit und ohne Feedback (Lee et al. 1999). Zu den häufig verwendeten Strategien ohne Feedback zählen vordefinierte Profile mit konstanter Nachfütterung (Jensen und Carlsen 1990; Jung et al. 1988) oder linear (Dreher et al. 2012), stufenweise (Jae-Ho et al. 1989; Pan et al. 1987) beziehungsweise exponentiell ansteigender Nachfütterung. Letztere bietet die Möglichkeit Wachstum bei einer gewünschten spezifischen Wachstumsrate μ_{set} zu gewährleisten. Durch Unterschreiten der für Acetatbildung kritischen spezifischen Wachstumsrate μ_{crit} kann dabei die Bildung von Acetat vermieden beziehungsweise minimiert werden. In Abhängigkeit des verwendeten Stamms liegt die kritische spezifische Wachstumsrate im Bereich von $0,17$ bis $0,35 \text{ h}^{-1}$ (Korz et al. 1995; Luli und Strohl 1990; Paalme et al. 1990; El-Mansi und Holms 1989; Meyer et al. 1984). Die Konzentration des limitierenden Substrats wird praktisch bei Null gehalten und beeinträchtigt somit den zellulären Kohlenstoffmetabolismus nur minimal (Choi et al. 2006). Die exponentielle Nachfütterungsstrategie ist einfach, trotzdem wirkungsvoll und wird daher vielfach eingesetzt (s. Tab. 3-1). Allerdings besteht bei der Nachfütterung ohne Feedback die Gefahr der Überfütterung.

Um letzteres zu vermeiden, bieten sich Strategien mit integrierter Rückkopplung an. Indirekte Feedback-Systeme verknüpfen die Substratzufuhr mit diversen physikalischen Parametern wie beispielsweise bei pH-stat und DO-stat Strategien. Bei Erschöpfung der primären Kohlenstoffquelle kommt es zum Anstieg des pH-Wertes beziehungsweise der Gelöstsauerstoffkonzentration. Wird ein vorgegebener Sollwert überschritten, kommt es zur Dosierung einer vorbestimmten Substratmenge. Alternativ haben sich Methoden zur Regelung der spezifischen Wachstumsrate bewährt. Die Abschätzung der Regelgröße kann beispielsweise aus Abgasanalysendaten (Levisauskas et al. 1996) oder *on-line*-Trübungsdaten (Yamane et al. 1992) erfolgen und zur Adaption der Nachfütterungsrate genutzt werden. Als direktes Feedback-System kann die *on-line*-Messung der Glucosekonzentration genutzt werden, um durch automatische Anpassung der Nachfütterungsrate die Substratkonzentration konstant zu halten (Tripathi et al. 2009).

Jenzsch et al. (2006) berichten von einer Strategie, welche der hier vorgestellten iHDCD ähnelt. Auf die anfängliche Batch-Phase wird verzichtet. Da scheinbar geringfügige Variationen in der Prozessdurchführung die therapeutische Wirksamkeit von Biopharmazeutika beeinträchtigen kann, wurde das Ziel verfolgt die Batch-zu-Batch Variabilität durch diese Strategie zu minimieren und somit eine reproduzierbar hohe Produktqualität zu gewährleisten. Die Autoren führen an, dass gemäß der PAT-Initiative (FDA) zwei Ansätze existieren die Batch-zu-Batch Reproduzierbarkeit zu verbessern. Einerseits könne dies durch Steigerung der Robustheit des Produktionsverfahrens (z. B. durch Erlangen eines besseren Prozessverständnisses, um Verfahren weniger fehleranfällig zu machen) und andererseits durch den Einsatz von Kontrollmechanismen mit Feedback erreicht werden. Durch Feedback-Systeme können Abweichungen vom gewünschten Kultivierungsverlauf detektiert und automatisiert korrigiert werden, allerdings sind sie insbesondere zu Beginn der Kultivierung aufgrund inakkurater Messergebnisse (z. B. der Biomasse) nicht praktikabel. Deshalb konzentrierten sich die Autoren auf eine exponentielle *open-loop* Nachfütterungsstrategie, die unmittelbar nach Inokulation mit $\mu_{\text{set}} = \mu_{\text{max}} = 0,67 \text{ h}^{-1}$ oder $\mu_{\text{set}} = 0,5 \text{ h}^{-1}$ gestartet und bis zum Prozessende beibehalten wurde. Mittels numerischer Simulation und anschließenden Validierungsläufen konnten sie zeigen, dass durch Vorgabe der spezifischen Wachstumsrate mit $\mu_{\text{set}} < \mu_{\text{max}}$ der Prozess deutlich robuster wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn die tatsächliche Animpfzeldichte nicht der zur Berechnung der Nachfütterraten vorgegebenen Zelldichte (basierend auf experimentellen Daten oder berechnet aus dem Ausbeutekoeffizienten für das eingesetzte Substrat) entspricht. Die Zellen zeigen dann ein selbst-regulierendes Verhalten, wodurch bis zum Induktionszeitpunkt mit einer stabilen Biomassekonzentration und spezifischen Wachstumsrate zu rechnen ist. Mit dieser Strategie erreichen Jenzsch et al. (2006) reproduzierbar 35 g kg^{-1} Biomasse und $1,6 \text{ g kg}^{-1}$ Produkt.

Tab. 3-1 gibt einen Überblick über den Einsatz der HDCD mit unterschiedlichen Nachfütterungsstrategien im Zeitraum von 2007 bis 2016 für die Herstellung von Biopharmazeutika, technisch relevanten Enzymen und Markerproteinen.

Tab. 3-1: Einsatz diverser Hochzelllichte-Kultivierungsstrategien zur Herstellung unterschiedlicher Biomoleküle mit *Escherichia coli* im Zeitraum 2007 bis 2016.

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$c_X / \Delta OD_{600}$ CP	Referenz
BL21 (DE3)	pET-28a / MaSp2 (Major ampullate spidroin 2)	Batch-Medium: synthetisch mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ ; man. pH-stat Feedingstrategie (Feedzugabe bei pH > 6,8); O ₂ -Anreicherung; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 40$ mit 1 mM IPTG; Temperaturshift zur Induktion von 30 °C auf 16 °C	≈ 37 g l ⁻¹ 2,9 g l ⁻¹	Yang et al. (2016)
BL21 (DE3)	pET-29a / Glucosyltransferase VvGT14a	Batch-Medium: synthetisch (gemäß Riesenberg et al. (1991) mit 2 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie mit $\lambda_{set} = 0,20$ h ⁻¹ für 18 h, anschließend konstante Fütterrate; keine O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 100 μ M IPTG, Temperaturshift zur Induktion von 37 °C auf 20 °C, Reduktion der konstanten Fütterrate	$(67,6 \pm 1,2)$ g l ⁻¹ $(2,7 \pm 0,1)$ g l ⁻¹	Schmieder et al. (2016)
YJ003	pDLPH + pBAD33ffh/dsbC / human full-length IgG	Batch-Medium: synthetisch (R/2 nach Lee et al. (2013)) mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glucose, MgSO ₄ , He; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 6,86); O ₂ -Anreicherung; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 60$ mit 1 mM IPTG und 0,2 % L-Arabinose, Temperaturshift zur Induktion von 37 °C auf 25 °C; IgG Expression über SRP-abhängigen sekretorischen Weg	157,2 165,4 mg l ⁻¹ (PP) 236,5 mg l ⁻¹ (EZ)	Lee et al. (2016)
BL21 (DE3)	pET-28a / TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 2 g Gly l ⁻¹ , 10 g Try l ⁻¹ , 5 g He l ⁻¹ ; Feed: Gly, Try, He, MgSO ₄ ; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 7,2); keine O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 0,1 mM IPTG und 0,5 mM ZnSO ₄ , Temperaturshift zur Induktion von 37 °C auf 28 °C	$83,1 \pm 3,7$ $(4,14 \pm 0,19)$ g l ⁻¹	Li et al. (2016)
BL21 (DE3)	pGST / opt. HPV L1	Batch-Medium: synthetisch (R/2 nach Jeong und Lee (2003) mit 20 g Glc l ⁻¹ , Feed: Glc, He, MgSO ₄ ; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 6,86); O ₂ -Anreicherung; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 80$ mit 1 mM IPTG	159,6 4,6 g l ⁻¹	Bang et al. (2016)
BL21 $\Delta fadD$	pE-A1 tesA + pA-acc / hydroxy/free fatty acids (HFAs/FFAs)	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 20 g Try l ⁻¹ , 10 g He l ⁻¹ ; Feed: Glc; Nachfütterrate angemessen gewählt um c_{Glc} auf geringem Level zu halten; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 12$ mit 0,5 mM IPTG, Temperaturshift bei Induktion von 37 °C auf 30 °C	70 2,81 g FFAs l ⁻¹ 0,548 g HFAs l ⁻¹	Cao et al. (2016)
W3110	pTTODA33 / Fab Fragment	Kultivierungsprotokoll nach Balasundaram et al. (2009); synthetisches Medium nach Nesbeth et al. (2012); am Ende der Trophophase erfolgt Induktion mit IPTG; Vergleich der Expression mit P_{tac} und P_{tic} Promoter basierendem System	P_{tac} -Stamm: ≈ 140 / 0,32 mg Fab (g h) ⁻¹ (IZ) P_{tic} -Stamm: ≈ 120 / 0,23 mg Fab (g h) ⁻¹	Schofield et al. (2016)

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$c_x / \Delta OD_{600}$ Cp	Referenz
BL21 star (DE3)	pET-26b-P-D5-CalB / <i>Candida antarctica</i> Lipase B (CalB)	Batch-Medium: synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ ; pH-stat Feedingstrategie; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 120$ mit 0,2 mM IPTG; Temperaturshift bei Induktion von 37 °C auf 20 °C; extrazelluläre Sekretion	95,6 g l ⁻¹ 1,9 g l ⁻¹ (EZ)	Kim et al. (2015)
BL21 (DE3)	p6xHTMK119 / <i>thermostable Thermus maltogenic amylase</i> (ThMA)	Batch-Medium: synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ Inositol, Pantothensäure, Pyridoxin, Folsäure; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; pH-stat (pH = 6,8 - 6,9 durch Zugabe von Feed und Ammoniak); 300 l scale-up Reaktor zur Simulation industrieller Bedingungen (Sauerstoffversorgung); Deletion der Gene für Acetatkinase, Phosphotransacetylase und Lactatdehydrogenase zur Reduktion der Acetat- und Lactatbildung	31 g l ⁻¹ 372 KU l ⁻¹	Kim et al. (2015)
BL21 (DE3) Δ ackA-pta-ldh			51,6 g l ⁻¹ 884 KU l ⁻¹	
L3	pMH1 + pFZ81 + <i>idi</i> Gen in <i>high copy</i> Plasmid / Lycopin	Batch-Medium: synthetisch (M9 Medium) mit 40 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Gly, MgSO ₄ ; konstante Nachfütterungsrate; 150 l scale-up Reaktor; Reaktorüberdruck bei 0,5 bar; Induktion bei $\Delta OD_{600} \approx 46$ mit 0,25 mM IPTG; Stämme enthalten synthetischen Mevalonat (MVA) Stoffwechselweg zur Lycopin-Biosynthese	36 g l ⁻¹ 1,23 g l ⁻¹	Zhu et al.(2015)
BJJ01	pCTUT7-Vim1 (Valinomy- cin Synthetase 1) + pKS01-Vim2 (Valinomy- cin Synthetase 2) / Valinomycin	Batch-Medium: synthetisch (EnPresso B mit Glc freisetzendem Polymer); Feed: Glc, Batch-weise Zugabe von Salzen, Spurenelementen, Thiamin; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ für 12 h, anschließend stufenweise Reduktion der Fütterrate (wenn $pO_2\% < 20 \%$) bis 0,45 ml min ⁻¹	≈ 120 $\approx 2 \text{ mg l}^{-1}$	Li et al. (2015)
SHuffle T7	pET-28a / <i>giant grouper growth hormone</i> (ggGH)	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ , 20 g He l ⁻¹ , 30 g Pep l ⁻¹ ; Feed: Glc, He, Pep; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 7,1); Temperaturshift im Fed-Batch von 37 auf 30 °C; Induktion mit 0,1 mM IPTG zu unterschiedlichen Zeitpunkten	41,1 g l ⁻¹ (uninduziert) 4 g l ⁻¹	Chung et al. (2015)
BL21 (DE3)	pET-15b / ProKaDo	Batch-Medium: synthetisch wie Riesenberg et al. (1991) mit 25 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ wie Riesenberg et al. (1991); exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$; Induktion mit 0,1 mM IPTG bei $t = 26 \text{ h}$ für 6 h; O ₂ -Anreicherung; Einsatz eines <i>Single-Use STR</i> (BIOSTAT® STR 50, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)	60,8 g l ⁻¹ k. A.	Dreher et al. (2014)
BL21 (DE3) pLysS	pET-SUMO / sfGFP	Batch-Medium: synthetisch, keine C-Quelle; Feed: Glc; exponentielles Feeding mit $\mu_{set} = 0,5 \text{ h}^{-1}$ für 7 h bei 30 °C, anschließend Feedmodulation mit Tracking-Verfahren entlang der kritischen spezifischen Substrataufnahmerate; keine O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 1 mM IPTG	$\approx 60 \text{ g kg}^{-1}$ $\approx 40 \text{ AU}$	Schaepe et al. (2014)

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$c_x / \Delta OD_{600}$ Cp	Referenz
BL21 (DE3)	pET-20b / rPullulanase	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 30 g Try l ⁻¹ , 20 g He l ⁻¹ , 8 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Try, He, Gly, MgSO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie; Induktion bei $c_x = 30 \text{ g l}^{-1}$ durch konstantes Feeding ($0,4 \text{ g (l h)}^{-1}$ von Lactose (200 g l^{-1}); Temperaturshift bei Induktion von 30 °C auf 25 °C	103,5 g l ⁻¹ 2731,1 U ml ⁻¹	Zou et al. (2014)
BL21 Star (DE3)	pETA13-Red / A13-Red	Batch-Medium: synthetisch nach Riesenberg et al. (1990) mit 30 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Gly; zwei Batch-Phasen auf Gly mit maximaler spezifischer Wachstumsrate, exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$, nach Induktion pH-stat Feedingstrategie (Zugabe von Feed bei pH > 7,5 bis pH 7,1 erreicht wird); Induktion bei $c_x = 112 \text{ g l}^{-1}$ mit 5 mM IPTG; Temperaturshift bei Induktion von 37 °C auf 25 °C	147 g l ⁻¹ 455 mg l ⁻¹	Bordeaux et al. (2014)
XL1-Blue	pDLPH + pBAD33ffh/dsbC / full-length IgG	Batch-Medium: synthetisch (R/2 Medium) mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, He, MgSO ₄ ; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 6,86); O ₂ -Anreicherung; Induktion bei $\Delta OD_{600} = 120$ mit 1 mM IPTG und 0,2 % L-Arabinose, Temperaturshift bei Induktion von 37 °C auf 25 °C; IgG Expression ins PP über SRP- und Sec-abhängigen Sekretionsweg in Kombination mit der Coexpression von Ffh und DsbC	187 62 mg l ⁻¹	Lee et al. (2013)
JM109	pMFvpt / Tyrosinase	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 20 g Gly l ⁻¹ , 5 g NZ-Amine l ⁻¹ ; Feed: Gly, NZ-Amine, MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,3 \text{ h}^{-1}$; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 1,25 mM bei $\Delta OD_{600} = 30 - 40$	37 g l ⁻¹ $\approx 3 \text{ g l}^{-1}$	Ren et al. (2013)
M15	pTCO46-Bgal / β -Galactosidase	Batch-Medium: synthetisch mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , Thiamin, FeCl ₃ , Amp, Spurenelemente; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = (0,10 - 0,13) \text{ h}^{-1}$; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 0,03 mmol IPTG (g X) ⁻¹ bei $c_x = 25 \text{ g l}^{-1}$ (wiederholte Zugabe von IPTG)	$\approx 64 \text{ g l}^{-1}$ $1,95 \cdot 10^5 \text{ AU ml}^{-1}$	Lecina et al. (2013)
TRTH0709	pMEL03 / L-Tryptophan	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ , 1 g He l ⁻¹ ; Feed: Glc; Kombination aus pseudo-exponentieller und Glc-stat Feedingstrategie; Mutation des TRTH0709 Stammes mit Δpta , Δmtr und Überexpression von <i>yddG</i> zur Reduktion der Acetatakkumulation und Erhöhung der extrazellulären L-Tryptophanproduktion	50,53 g l ⁻¹ 48,68 g l ⁻¹ (EZ)	Wang et al. (2013)
BL21 (DE3)	pET-15b / ProKaDo	Batch-Medium: synthetisch nach Riesenberg et al. (1991) mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ ; lineare Feedingstrategie ($F_R(t) = 0,9 \text{ g h}^{-2} \cdot t + 26 \text{ g h}^{-1}$); O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 0,1 mM IPTG bei $c_x = 38 \text{ g l}^{-1}$; Einsatz eines <i>Single-Use Rocking Motion</i> (RM) Bioreaktors (BIOSTAT® CultiBag RM 10 l, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)	51,7 g l ⁻¹ k. A.	Dreher et al. (2012)

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$c_X / \Delta OD_{600}$ Cp	Referenz
BL21 (DE3)	pET-28a / Botulinum Neurotoxin A heavy chain (BoNT/A-Hc)	Batch-Medium: synthetisch (modifiziertes M9) mit 15 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$; Induktion mit 1 mM IPTG bei $\Delta OD_{600} = 90$	100 486 mg l ⁻¹	Yari et al. (2012)
M15 $\Delta glyA$ $\Delta lacY$	pQE β rham / Rhamnose-1-P-Aldolase (RhuA)	Batch-Medium: synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , FeCl ₃ ; Thiamin, Spurenelemente, pulsweise Zugabe von K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,22 \text{ h}^{-1}$; Induktion mit 0,2 mM bei $c_X = 20 \text{ g l}^{-1}$; Herstellung eines Lactosepermease defizienten Stamms zur Untersuchung der IPTG Verteilung und heterologen Proteinexpression	$\approx 29 \text{ g l}^{-1}$ 75 mg gX ⁻¹	Fernández-Castané et al. (2012)
BL21 (DE3)	pET-37b / Fragment of <i>Pneumococcal surface protein A</i> (PspA)	Batch-Medium: synthetisch mit 40 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Gly, Salze, Phosphate, Spurenelemente, Thiamin, Antibiotika; exponentielle Feedingstrategie basierend auf aktueller spezifischer Wachstumsrate bestimmt durch gefiltertes Permittivitätssignal (Berechnung der aktuellen Nachfütterungsrate alle 10 min); Induktion mit IPTG; O ₂ -Anreicherung	154 g l ⁻¹ 26,1 g l ⁻¹	Horta et al. (2012)
BL21(DE3)	pET-20b / α -Cyclodextrin Glycosyltransferase (α -CGTase)	Batch-Medium: synthetisch mit 8 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Gly, MgSO ₄ ; Pep; He; Kombination aus exponentieller Feedingstrategie ($\mu_{set} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ bis zur Induktion) und stufenweise Reduktion der Nachfütterungsrate; Induktion mit Lactose (0,8 g (l h) ⁻¹ , Lactosestammlösung mit 200 g l ⁻¹) bei $c_X = 30 \text{ g l}^{-1}$; Temperaturshift bei Induktion von 37 °C auf 25 °C	$\approx 87 \text{ g l}^{-1}$ 275,3 U ml ⁻¹ (EZ)	Cheng et al. (2011)
VH33	pHN / Plasmidvaksin	Batch-Medium: synthetisch mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; Thiamin, Ampicillin; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; O ₂ -Anreicherung; Stamm VH33 weist ein modifiziertes Glucosetransportsystem zur Reduktion der Acetatbildung im Vergleich zum Ursprungsstamm W3110 auf	(41 \pm 4) g l ⁻¹ (50 \pm 6) mg l ⁻¹	Soto et al. (2011)
XL1-Blue	pMcpPac16Cys_M18 / M18 scAb	Batch-Medium: synthetisch (R/2 Medium) mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ vor Induktion, Glc, He, MgSO ₄ nach Induktion; pH-stat (Feedzugabe bei pH > 6,88); Induktion mit 1 mM IPTG bei $\Delta OD_{600} = 150$; Temperaturshift zur Induktion von 30 °C auf 25 °C; O ₂ -Anreicherung	186 374 mg l ⁻¹	Jeong und Rani (2011)
W $\Delta cscR$	pAeT41 / PHB	Batch-Medium: synthetisch (R/2 Medium) mit 20 g Sac l ⁻¹ ; Feed: Sac, MgSO ₄ , Antischaummittel; pH-stat (7 ml Feedzugabe mit $F_R = 1,4 \text{ ml min}^{-1}$) bei pH > 6,9); O ₂ -Anreicherung; <i>cscR</i> Gen <i>knockout</i> zum besseren Sucroseverbrauch bei geringen Saccharosekonzentrationen	(56,4 \pm 4,5) g l ⁻¹ (47,7 \pm 3,1) g l ⁻¹	Arifin et al. (2011)

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$C_x / \Delta OD_{600}$ Cp	Referenz
VH33		Batch-Medium: synthetisch mit 5 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, Spurenelemente, Thiamin; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,17 \text{ h}^{-1}$; Überdruckfermentation; <i>on-line</i> Biomassebestimmung durch Kapazitätsmessung	83 g l ⁻¹	Knabben et al. (2011)
K12 TB1	pGLO / GFP	Batch-Medium: synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente, Thiamin, Prolin; exponentielle <i>open-loop</i> Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ für 1 h, anschließend mit adaptivem μ -Regler durch Berechnung der spezifischen Wachstumsrate aus dem zellbedingten Wärmefluss; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 0,2 % L-Arabinose	120 g l ⁻¹ 0,9 g l ⁻¹	Biener et al. (2010)
BL21	pNWCP31 / human like collagen	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 30 g Glc l ⁻¹ , 50 g He l ⁻¹ ; Feed: Glc, He, Phosphate, MgSO ₄ , Spurenelemente; pseudo-exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} \approx 0,15 \text{ h}^{-1}$, Nachfütterungsrate stündlich angepasst; O ₂ -Anreicherung; thermische Induktion bei $C_x \approx 45 \text{ g l}^{-1}$ durch Temperaturerhöhung von 32 °C auf 42 °C für 3 h, anschließende Reduktion auf 39 °C	(64,1 ± 1,6) g l ⁻¹ (13,2 ± 0,2) g l ⁻¹	Xue et al. (2010)
Top10	p(Microdiesel) / Fettsäurethylester (FAEE)	Batch-Medium: synthetisch mit 38 g Gly l ⁻¹ ; Feed: Gly, Glc, Ölsäure; zunächst Zugabe von Gly, nach 32 h Glc und Ölsäure; Fed-Batch-Phase mit $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$; Induktion mit IPTG;	(61,0 ± 3,1) g l ⁻¹ $\approx 14,8 \text{ g l}^{-1}$	Elbahloul und Steinbüchel (2010)
BL21(DE3)	pE10C2 / Phytase	Batch-Medium: synthetisch mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; Fed-Batch gestartet beim Unterschreiten von 3 g Glc l ⁻¹ ; kontinuierliche Feedingstrategie zur Aufrechterhaltung von (2 - 3) g Glc l ⁻¹ ; Induktion mit 1 mM IPTG und 10 mM CaCl ₂ bei Konzentration an anorg. Phosphat < 1 mM ($C_x = 33,7 \text{ g l}^{-1}$);	49,6 g l ⁻¹ 327 U ml ⁻¹	Tran et al. (2010)
SCS1-L	pLL14 / Plasmid DNA	Batch-Medium: synthetisch mit 5 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Antischaummittel; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,28 \text{ h}^{-1}$, bei $\Delta OD_{662} = 60 - 70$; Temperaturshift von 37 °C auf 42 °C und konstante Nachfütterungsrate (10 % kleiner als letzter Wert); O ₂ -Anreicherung	$\Delta OD_{662} = 91$ 599 mg l ⁻¹	Singer et al. (2009)
TRFC	pTHR101 / L-Threonin	Batch-Medium: synthetisch mit 70 g Suc l ⁻¹ ; Feed: Glc; DO-kontrollierte Pulsfeedingstrategie mit diskontinuierlicher Feedzugabe, wenn $C_{suc} < 5 \text{ g l}^{-1}$	27,4 g l ⁻¹ 118 g l ⁻¹	Chen et al. (2009)
B86	pAM52, pMBIS, pADS / Amorpha-4,11-dien (Artemisinin Vorstufe)	Batch-Medium: synthetisch mit 15 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; Prozess mit Ammoniumrestriktion zur Steigerung der Produktausbeute; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ bis 31 g Glc h ⁻¹ (maximale Pumprate), anschließend konstant 11,7 g Glc h ⁻¹ ; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 1 mM IPTG und 10 % (v/v) Dodecan bei $\Delta OD_{600} \approx 30$; Kultivierung über 6 bis 7 Tage	$\approx 90 \text{ g l}^{-1}$ (27,4 ± 2,1) g l ⁻¹	Tsuruta et al. (2009)

Stamm <i>E. coli</i>	Vektor / Produkt	Prozessführung / Besonderheiten	$c_x / \Delta OD_{600}$ Cp	Referenz
JM109	pMTAKHV1 / fused HV1	Batch-Medium: synthetisch (TK-10P) mit 40 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc; diskontinuierliche Zugabe von Glucosepulver zur Aufrechterhaltung von $c_{Glc} = (1 - 40) \text{ g Glc l}^{-1}$; O ₂ -Anreicherung; konstitutive Expression des Zielproteins; Temperaturshift von 33 °C auf 37 °C bei $c_x = 7,0 \text{ g l}^{-1}$	44,1 g l ⁻¹ 4763 mg l ⁻¹	Matsui et al. (2008)
BL21 (DE3)	pYG87 / rIFN-β	Batch-Medium: synthetisch mit 15 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; lineare Feedingstrategie; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 1,29 mM IPTG bei $c_x = 70 \text{ g l}^{-1}$ ermittelt durch RSM;	≈ 80 g l ⁻¹ 2,2 g l ⁻¹	Tabandeh et al. (2008)
BL21 (DE3)	pET-3a / rIFN-γ	Batch-Medium: synthetisch (mod. M9) mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente; exponentielle Feedingstrategie mit kubischem μ -Zeitprofil zum Erreichen der maximalen spezifischen Wachstumsrate während des gesamten Prozesses; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 3 mM IPTG bei $\Delta OD_{600} = 120$	105 g l ⁻¹ 34,5 g l ⁻¹	Babaeipour et al. (2008)
BL21 (DE3)	pET-23a / hG-CSF	Batch-Medium: synthetisch (mod. M9) mit Glc; Feed: Glc, MgSO ₄ ; exponentielle Feedingstrategie mit quadratisch abnehmendem μ -Zeitprofil ($0,12 \text{ h}^{-1} < \mu < 0,52 \text{ h}^{-1}$); O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 3 mM IPTG bei $c_x \approx 48 \text{ g l}^{-1}$	≈ 64 g l ⁻¹ ≈ 14 g l ⁻¹	Khalilzadeh et al. (2008)
Top 10F'	pGLO / GFP	Batch-Medium: synthetisch mit 20 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , Spurenelemente; exponentielle Feedingstrategie mit Aktualisierung der Fütterrate alle (13 - 15) min, alle 30 min Fütterrate für 2 min um 50 % reduziert, konstante Fütterrate ab Sauerstofftransferlimitierung; Feedingstrategie um Überfütterung zu vermeiden	93 g l ⁻¹ k. A.	Henes und Sonleitner (2007)
Rosetta (DE3)	pRARE + pET-28a / GOX (Glycinoxidase)	Batch-Medium: synthetisch mit 10 g Glc l ⁻¹ ; Feed: Glc, MgSO ₄ , Spurenelemente, Thiamin, Kan, Cam; exponentielle Feedingstrategie mit $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$; O ₂ -Anreicherung; Induktion mit 0,5 mM IPTG bei $c_x \approx 40 \text{ g l}^{-1}$, Temperaturshift zur Induktion von 37 °C auf 30 °C	(60 ± 5) g l ⁻¹ 1154 U l ⁻¹	Martínez-Martínez et al. (2007)
JM109	pPT-MRpi / humanes Präproinsulin	Batch-Medium: semi-synthetisch mit 6 g Glc l ⁻¹ und 4 g He l ⁻¹ ; Feed I: Glc, Feed II: He, MgSO ₄ , Antischaummittel, Spurenelemente; Zugabe beider Feedlösungen für $c_{Glc} = 0,005 \text{ g Glc l}^{-1}$; Druckerhöhung; Induktion durch Temperaturshift von 30 °C auf 37 °C in drei Schritten bei $\Delta OD_{600} = 40$; 300 l Reaktor	43,1 g l ⁻¹ 33,3 %	Son et al. (2007)

3.3.1 Berechnung der Nachfütterungsrate für exponentielles Feeding

Wie bei Korz et al. (1995) und Hellmuth et al. (1994) kann bei der Betrachtung von Glucose als einzigem limitierendem Substrat die zeitabhängige Nachfütterungsrate $F_R(t)$ auf Basis exponentiellen Wachstums mit konstanter spezifischer Wachstumsrate aus der Substratmassenbilanz berechnet werden, wobei die Nomenklatur hier allgemeiner gehalten wird. Die zeitliche Änderung der Glucosemasse im Reaktor ist gegeben durch den Massenstrom \dot{m}_{GlcR} mit dem Zulauf in den Reaktor und dem Verbrauch durch die Zellen $Q_{\text{Glc}} V_L$

$$\frac{dm_{\text{Glc}}(t)}{dt} = \dot{m}_{\text{GlcR}} - Q_{\text{Glc}} V_L \quad (3.1)$$

Unter Berücksichtigung des auf das Biomassewachstum bezogenen Ausbeutekoeffizienten $y_{X/\text{Glcg}}$ und den Mehrverbrauch an Glucose für den Erhaltungsstoffwechsel $q_{\text{Glc}/Xm}$ folgt für die volumetrische Glucoseverbrauchsrate Q_{Glc}

$$Q_{\text{Glc}} = \left(\frac{\mu}{y_{X/\text{Glcg}}} + q_{\text{Glc}/Xm} \right) c_X \quad (3.2)$$

Bei substratlimitiertem Wachstum ($c_{\text{Glc}} \approx 0 \text{ g l}^{-1}$) vereinfacht sich Gleichung (3.1) zu

$$\dot{m}_{\text{GlcR}} = Q_{\text{Glc}} V_L, \quad (3.3)$$

das heißt, dass der Zulaufstrom vollständig von den Zellen verstoffwechselt wird. Als Wachstum wird, wegen der Volumenänderung des Systems, die zeitliche Biomassezunahme angesehen, also

$$\frac{dm_X(t)}{dt} = \mu m_X \quad (3.4)$$

Integration von Gleichung (3.4) liefert für die exponentiell wachsende Kultur

$$m_X(t) = m_{X0} e^{\mu(t-t_0)} \quad (3.5)$$

Aus den Gleichung (3.2), (3.3) und (3.5) folgt für den Glucosemassenstrom in den Reaktor in der Phase i , die bei $t_{F,i}$ und $m_{X0,i}$ mit dem Kulturvolumen $V_{L0,i}$ beginnt, mit einer konstanten spezifischen Wachstumsrate $\mu_{\text{set},i}$

$$\dot{m}_{\text{GlcR}}(t_{F,i} \leq t \leq t_{F,i+1}) = \left(\frac{\mu_{\text{set},i}}{y_{X/\text{Glcg},i}} + q_{\text{Glc}/Xm,i} \right) m_{X0,i} e^{\mu_{\text{set},i}(t-t_{F,i})} \quad (3.6)$$

Mit der Glucosekonzentration im Reservoir c_{GlcR} ergibt sich somit die Nachfütterungsrate F_R

$$F_R(t_{F,i} \leq t \leq t_{F,i+1}) = \frac{1}{c_{\text{GlcR}}} \left(\frac{\mu_{\text{set},i}}{y_{\text{X/Glc},i}} + q_{\text{Glc/Xm},i} \right) m_{\text{X0},i} e^{\mu_{\text{set},i}(t-t_{F,i})} \quad (3.7)$$

Die zeitliche Volumenänderung im Reaktor

$$V_L(t_{F,i} \leq t \leq t_{F,i+1}) = V_{L0,i} + (1 + f_{B,i}) \int_{t_{F,i}}^{t_{F,i+1}} F_R(t) dt - \sum_{i=0}^n V_S \quad (3.8)$$

wird aus Feed- und Ammoniakvolumenstrom sowie den entnommenen Probenvolumina berechnet. Verdampfungsverluste und Antischaummittelzugabe bleiben unberücksichtigt. Die zu Beginn einer Fed-Batch-Phase im Reaktor befindliche Biomasse $m_{\text{X0}}(t_{F,i})$ wird aus der gemessenen optischen Dichte (OD) unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Biomassekonzentration und der OD sowie dem berechneten Flüssigvolumen bestimmt.

Während einer Nachfütterungsphase kann zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 aus den Signalen der Base- und Feedwaage ein Faktor $f_{B,i}$ für Werte aus dieser Phase berechnet werden. Er ist als das Verhältnis von Baseverbrauch zu Feedeinsatz definiert und damit

$$f_{B,i} = \frac{V_B(\Delta t)}{V_{\text{Feed}}(\Delta t)} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} F_B dt}{\int_{t_1}^{t_2} F_R dt} = \frac{\left(\frac{m_{B,2} - m_{B,1}}{\rho_B} \right)}{\left(\frac{m_{\text{Feed},2} - m_{\text{Feed},1}}{\rho_{\text{Feed}}} \right)} \quad (3.9)$$

Alternativ kann der Faktor $f_{B,i}$ aus bekannten Konzentrationen in den Vorlagen und den Ausbeutekoeffizienten berechnet werden. Mit der Stickstoffkonzentration c_{NB} in der Base NH_3 und der Glucosekonzentration c_{GlcR} im Feed wird dann

$$f_{B,i} = \frac{V_B(\Delta t)}{V_{\text{Feed}}(\Delta t)} = \frac{\frac{m_X(\Delta t)}{y_{\text{X/NB}}} / c_{\text{NB}}}{\frac{m_X(\Delta t)}{y_{\text{X/Glc}}} / c_{\text{GlcR}}} = \frac{y_{\text{X/Glc}} c_{\text{GlcR}}}{y_{\text{X/NB}} c_{\text{NB}}} = \frac{1}{\frac{1}{y_{\text{X/Glc},i}} + \frac{q_{\text{Glc/Xm},i}}{\mu_{\text{set},i}}} \frac{1}{y_{\text{X/NB}}} \frac{c_{\text{GlcR}}}{c_{\text{NB}}} \quad (3.10)$$

oder

$$f_{B,i} = \frac{y_{\text{X/Glc},i} \mu_{\text{set},i}}{\mu_{\text{set},i} + q_{\text{Glc/Xm},i} y_{\text{X/Glc},i}} \frac{1}{y_{\text{X/NB}}} \frac{c_{\text{GlcR}}}{c_{\text{NB}}} \quad (3.11)$$

Da die Feedlösung im Gegensatz zur Base auch für Erhaltungsstoffwechsel verbraucht wird, geht in (3.10) auch die spezifische Wachstumsrate ein und der auf den Feedverbrauch bezogene Basebedarf wird phasenabhängig.

Angenommen, dass die Monod-Gleichung

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_{\text{Glc}}}{c_{\text{Glc}} + K_{\text{Glc}}} \quad (3.12)$$

hier Gültigkeit besitzt, muss sich bei einer sehr kleinen Sättigungskonstanten K_{Glc} eine niedrige Glucosekonzentration im Medium einstellen, um $\mu(t) = \mu_{\text{set}}(t) < \mu_{\max}$ zu erreichen.

3.4 Zusammensetzung des definierten Mediums

Die Wahl eines geeigneten Mediums stellt einen wesentlichen Aspekt bei der Hochzell-dichte-Kultivierung von *E. coli* dar. Es kann neben dem Zellwachstum auch die Zielproteinproduktion signifikant beeinflussen. Bei der Verwendung nicht-definierter Medienbestandteile werden oft höhere Wachstumsgeschwindigkeiten und Produkttiter erreicht (Zanette et al. 1998). Allerdings kann eine unerwünschte Variabilität der Produktivität die Folge sein und in seltenen Fällen sogar das Produkt selbst beeinträchtigt werden. Eine Möglichkeit die Variabilität insbesondere in kommerziellen Kultivierungsprozessen zu reduzieren, ist der Einsatz chemisch definierter Medien. Sie gewährleisten reproduzierbarere Prozesse mit konsistenteren Produktausbeuten (Zhang und Greasham 1999). Definierte Medien sollen die Versorgung mit allen für das Wachstum erforderlichen Makro- und Spurenelementen gewährleisten. Gleichzeitig ist eine Wachstumsinhibierung durch sie zu vermeiden. Riesenberg (1991) gibt für die in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Komponenten Konzentrationen an, bei denen eine Wachstumsinhibierung beobachtet wird (siehe Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Bestandteile definierter Kulturmedien für *E. coli* unter Angabe der wachstumsinhibierenden Konzentration, nach Riesenberg (1991).

Komponente	Konzentration
Glucose	> 50 g l ⁻¹
Ammonium	> 3 g l ⁻¹
Phosphor	> 10 g l ⁻¹
Magnesium	> 8,7 g l ⁻¹
Molybdän	> 0,8 g l ⁻¹
Bor	> 44 mg l ⁻¹
Kupfer	> 4,2 mg l ⁻¹
Mangan	> 68 mg l ⁻¹
Cobalt	> 0,5 mg l ⁻¹
Zink	> 38 mg l ⁻¹
Eisen	> 1,15 g l ⁻¹

Für Elemente/Substanzen mit kleinen Ausbeutekoeffizienten sind die für sehr hohe Zellkonzentrationen benötigten großen Mengen nur mit stark konzentrierter Nachfütterlösung zuzugeben (Shiloach und Fass 2005). Dabei sollte das Kulturmedium so einfach wie möglich gestaltet sein und die Nährstoffzugabe idealerweise entsprechend der Metabolisierungsrate erfolgen.

3.4.1 Makroelemente

Prokaryoten bestehen beim Blick auf die Elemente im Wesentlichen aus C, O, H, N, S und P sowie den vier Metallen K, Mg, Fe und Ca. Durchschnittlich machen sie 98 % der Trockenmasse aus und werden deshalb in hohen Konzentrationen im Medium gebraucht (Overmann 2013). Die Medienzusammensetzung nach Korz et al. (1995) dient als Basis für das in dieser Arbeit entwickelte synthetische Medium. Es enthält Glucose als einzige Kohlenstoffquelle, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und Fe(III)-citrat Hydrat als Komponenten zur Versorgung mit weiteren Makroelementen.

3.4.1.1 Glucose als Kohlenstoffquelle

In den meisten Fällen ist Glucose die beste Energiequelle für den Stoffwechsel von *E. coli*. Durch die Katabolitrepression wird in Anwesenheit multipler Zuckerquellen Glucose als primäre Kohlenstoffquelle bevorzugt metabolisiert. Ein System rund um den Transkriptionsfaktor Crp reguliert die Expressionskaskaden für den Transport und die Metabolisierung von nicht-präferierten Substraten. Crp wird durch das Reportermolekül cAMP aktiviert, welches wiederum durch eine Komponente (EIIA) des für die Glucoseaufnahme verantwortlichen Phosphotransferasesystems (PTS) reguliert wird. In der dephosphorylierten Form während der Glucoseaufnahme inhibiert EIIA den Transport alternativer Zucker, bekannt als Induktorausschluss. Ist EIIA in Abwesenheit von Glucose hingegen phosphoryliert, bewirkt es die Aktivierung von cAMP und andere Zucker können umgesetzt werden. (Bren et al. 2016; Chubukov et al. 2014)

Unter aeroben Kultivierungsbedingungen wird Glucose nach folgender Reaktionsgleichung vollständig zu CO_2 , H_2O und Energie oxidiert:



Glucose wird in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. Eine oxidative Decarboxylierungsreaktion dient als Linker zwischen Glykolyse und Citratzyklus. Pyruvat wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches als Intermediat in den Citratzyklus eingeht und vollständig zu CO_2 metabolisiert wird. Pro Mol Glucose ergibt sich folgende Energiebilanz

Glykolyse:	2 Pyruvat + 2 ATP + 2 NADH
Oxidative Decarboxylierung:	2 Acetyl-CoA + 2 NADH
Citratzyklus:	2 GTP + 6 NADH + 2 FADH_2

Der Beitrag zur Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung (z. B. in Glykolyse) ist vergleichsweise gering. Die oxidative Phosphorylierung liefert den Hauptanteil zum Energieertrag aus der Oxidation von Glucose. Dabei werden die an den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH_2 gebundenen Wasserstoffatome über Proteinkomplexe in der Cytoplasmamembran auf den Elektronenakzeptor Sauerstoff

übertragen. Am Elektronentransportprozess beteiligte Enzyme verwenden die bei der Oxidation frei gewordene Energie, um Protonen entlang der Cytoplasmamembran zu pumpen. Die reverse Protonenbewegung über den daraus resultierenden Gradienten bewirkt die ATP-Generierung (Dashty 2013). Da *E. coli* kein Cytochrom c und keinen Cytochrom-bc₁-Komplex besitzt, beträgt die theoretische ATP Ausbeute aus Substratkettenphosphorylierung und oxidativer Phosphorylierung 26 ATP pro 1 Mol Glucose (Fuchs 2014; Eikmanns und Eikmanns 2008).

Die aus dem Glucose-Abbau gewonnene Biotrockenmasse kann zum Ausbeutekoeffizienten $y_{X/Glc}$ umgerechnet werden. Er setzt sich aus einem wachstumsabhängigen Term $y_{X/Glcg}$ und dem metabolischen Quotienten für Erhaltungsstoffwechsel $q_{Glc/Xm}$ zusammen und berechnet sich nach

$$\frac{1}{y_{X/Glc}} = \frac{1}{y_{X/Glcg}} + q_{Glc/Xm} \frac{1}{\mu} \tag{3.13}$$

In Tab. 3-3 sind Daten für den Biotrockenmasseertrag aus Glucose für *E. coli* aufgeführt. Für die Kultivierungen in dieser Arbeit wurde $y_{X/Glcg} = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ und $q_{Glc/Xm} = 0,01 \text{ g (g h)}^{-1}$ (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) gewählt.

Tab. 3-3: Referenzwerte für den Biomasseertrag aus Glucose.

Stamm <i>E. coli</i>	$y_{X/Glc}$ /g g ⁻¹	$y_{X/Glcg}$ /g g ⁻¹	$q_{Glc/Xm}$ /g (g h) ⁻¹	Literatur
k. A.	0,36 - 0,44			Shiloach und Bauer (1975), Bauer und Shiloach (1974)
K12 TG1	0,423	0,5 - 0,57	0,02 - 0,025	Kayser et al (2005), Korz et al. (1995), Riesenberg et al. (1991)
BL21 (DE3)	0,45 - 0,51		0,06	Åkesson et al. (1999), Shiloach et al. (1996)
X90		0,42	0	Yee und Blanch (1993)

3.4.1.2 Ammonium als Stickstoffquelle

Die bedeutendste Stickstoffquelle für *E. coli* ist Ammonium. Als Hauptprodukt der Ammoniumassimilation entsteht Glutamin, das als N-Donor für viele anabolische Stoffwechselprozesse dient (Chubukov et al. 2014). Im Zellstoffwechsel wird Stickstoff insbesondere für den Aufbau von Proteinen, Nukleinsäuren und Coenzymen benötigt (Overmann 2013). Riesenberg et al. (1991) nennen einen Ausbeutekoeffizienten für Stickstoff von $y_{X/N} = (7,88 \pm 0,25) \text{ g X (g N)}^{-1}$. Ausgehend von einer Elementarzusammensetzung für *E. coli* von CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24} (Najafpour 2007), folgt ein Ausbeutekoeffizient von $7,44 \text{ g X (g N)}^{-1}$.

3.4.1.3 Phosphor, Kalium, Magnesium, Schwefel und Eisen

Die Elemente P, K, Mg, S und Fe übernehmen viele Aufgaben im Stoffwechsel von Mikroorganismen. Wichtige zelluläre Funktionen sind in Tab. 3-4 aufgeführt.

Tab. 3-4: Makroelemente und deren Funktion in der Zelle von Prokaryoten (Overmann 2013).

Element	Funktion / Vorkommen
P	Nukleinsäuren, Nukleotide, Phospholipide, Teichonsäure, Coenzyme
K	Überwiegendes einwertiges Kation im Cytoplasma, Erhaltung der Zellosmolarität, Cofaktor einiger Enzyme (z. B.: Pyruvatkinase, Peptidyltransferase, L-Malat Dehydrogenase)
Mg	Überwiegendes zweiwertiges intrazelluläres Kation; Cofaktor vieler Enzyme (z. B.: Kinasen), in Phosphatester (koordiniert Phosphorylsauerstoffatome), Ribosomen, Membranen, Zellwand
S	Cysteine, Methionin in Proteinen, Coenzyme Thiaminpyrophosphat; Coenzym A, Biotin, α -Liponsäure
Fe	Vertreten in Cytochromen, Ferredoxinen und anderen Fe-S-Proteinen, Cofaktor in Enzymen (beispielsweise einigen Dehydratasen)
Ca	Bestandteil von Exoenzymen (α -Amylase und Proteasen) und der Zellwand; Spielt eine Rolle bei der Transformation, Möglicherweise in vielen Calciumbindenden (Ca^{2+}) Proteinen mit EF-Hand Strukturmotiv wie Calsymin vorhanden
Na	Bakterielles Oxalacetat, Glutaconyl-CoA und Methylmalonyl-CoA Decarboxylasen, Transportschritte
Cl	Essentiell für aktive Aufnahme gelöster Stoffe

Die im Medium verwendeten Phosphorsalze übernehmen neben ihrer zellulären Funktion auch die als Puffersubstanzen. Der Ausbeutekoeffizient für Phosphor liegt in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von $y_{X/P} = (26,0 - 41,5) \text{ g X (g P)}^{-1}$ (Yee und Blanch 1993; Shiloach und Bauer 1975). Für Magnesium, Schwefel und Kalium geben Yee und Blanch (1993) Ausbeutekoeffizienten von $278 \text{ g X (g Mg)}^{-1}$, $163 \text{ g X (g S)}^{-1}$ und $53 \text{ g X (g K)}^{-1}$ an.

3.4.2 Spurenelemente

Neben den mengenmäßig überwiegenden Makroelementen, werden für den Aufbau zellulärer Bestandteile wie Proteine, DNA und RNA auch diverse Spurenelemente benötigt. In dieser Arbeit werden die Komponenten $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zur Versorgung mit den Spurenelementen Co, Mn, Cu, B, Mo und Zn verwendet. Additiv enthält das Medium EDTA, was die Verfügbarkeit von Fe(III)-Ionen und die Geschwindigkeit mikrobieller Reduktion signifikant erhöht (Lovley et al. 1996) sowie die Bildung von unlöslichen Hydroxiden und Phosphaten bei pH-Werten im neutralen bis alkalischen Bereich vermindert. Ein Überblick über die physiologische Funktion von den eingesetzten Spurenelementen in Mikroorganismen ist in Tab. 3-5 gegeben.

Tab. 3-5: Ausgewählte Spurenelemente und ihre zelluläre Funktion (Overmann 2013).

Element	Quelle	Funktion / Vorkommen
Co	Co ²⁺	Coenzym B12-enhaltende Enzyme (Glutamat-Mutase und Methylmalonyl-CoA Mutase)
Mn	Mn ²⁺	Superoxiddismutase, Photosystem II, einige Enzyme (z. B.: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Citrat-Synthase)
Cu	Cu ²⁺	Cytochrom-Oxidase, Nitritreduktase, Oxygenase, Superoxiddismutase
B	H ₃ BO ₃	Bildung von Heterocysten, gegebenenfalls Vernetzung von Pyranosen in zellulären Hüllen und Autoinducer-2 (zyklischer Furanosyl-Borat-Diester)
Mo	MoO ₄ ²⁻	Nitratreduktase, Nitrogenase, Xanthinoxidase und Formiatdehydrogenase
Zn	Zn ²⁺	Carboanhydrase, Alkoholdehydrogenase, Alkalische Phosphatase, Aldolase, RNA und DNA Polymerase, Proteinase

3.4.2.1 Toxizität von Cobalt(II)-chlorid, Borsäure und Mangan(II)-chlorid

Cobalt(II)-chlorid und Borsäure sind auf der Liste der SVHC aufgeführt. Nach der REACH-Verordnung sind sie als Substanzen mit besonders gefährlichen Eigenschaften identifiziert. Die Klassifizierung erfolgt durch die ECHA.

Cobaltchlorid, als karzinogen eingestuft, wurde im Oktober 2008 in die Liste aufgenommen und im Juni 2011 auch als reproduktionstoxisch eingestuft. Die letale Dosis für Ratten bei oraler Aufnahme liegt bei $LD_{50Ra} = 80 \text{ mg kg}^{-1}$ für die wasserfreie Substanz. Primär wird Cobaltchlorid am Arbeitsplatz über den Atemtrakt aufgenommen. Gefährdung bei akuter Exposition besteht für die Schleimhäute. Hinzu kommt die sensibilisierende Wirkung auf Haut und Atemwege. Als chronische Schäden sind allergisch bedingte Atemwegs- und Hautreaktionen, Fibrose sowie bei ausreichend hoher Intoxikation Herzerkrankungen, Beeinträchtigung der Blutbildung und Schilddrüsenfunktion bekannt. Nach Studien an Nagetieren muss auf eine Beeinträchtigung der Reproduktionsfähigkeit geschlossen werden. Nach jetzigem Kenntnisstand kann keine Aussage über das Potential, Entwicklungsschäden zu verursachen, getroffen werden. Durch *in-vitro* und *in-vivo* Testreihen wurde eine schwach mutagene Wirkung der löslichen Cobaltsalze festgestellt. Ein Risiko für den Menschen ist daraus aktuell noch nicht abzuleiten. Jedoch kann der Stoff als kanzerogen für den Menschen angesehen werden, nachdem die Wirkung in Inhalationsstudien an Nagern nachgewiesen und das Cobaltion in mechanistischen Studien als wirksames Agens identifiziert wurde. (GESTIS-Stoffdatenbank 2016)

Borsäure wurde im Juni 2010 in die Liste der SVHC als reproduktionstoxisch aufgenommen. Bei oraler Einnahme liegt die LD_{50Ra} bei 2660 mg kg^{-1} . Die Hauptaufnahme- wege für Borsäure sind die Atemwege sowie die dermale Aufnahme des Feststoffes oder konzentrierter Lösung bei verletzter Haut. Bei akuter Exposition kann es zu schwacher Reizung der Dermis kommen. Darüber hinaus sind Störungen des Gastrointestinaltrakts und des Zentralnervensystems sowie Hautschädigung bei massiver Intoxikation bekannt. Chronisch belastet Borsäure die Schleimhäute bei inhalativem

Kontakt und den Gastrointestinaltrakt sowie das Zentralnervensystem. Nach mehreren Studien mit unterschiedlichen Spezies, scheint die Reproduktionstoxizität der kritische Effekt zu sein. Als tolerabel gilt beim Menschen die tägliche Aufnahme von 19,2 mg Bor. In Tierversuchen wurden neben der Entwicklungsstörung insbesondere Hodenschäden und Fertilitätsstörungen beobachtet. Nach bisherigen Erkenntnissen ist nicht von einer Mutagenität oder Kanzerogenität auszugehen. (GESTIS-Stoffdatenbank 2016)

Mangan(II)-chlorid wird nach GHS-Verordnung als giftig (Gefahrenpiktogramm GHS 06) mit akuter Toxizität der Kategorie 3 sowie umweltgefährlich (Gefahrenpiktogramm GHS 09) klassifiziert. Von diesem Stoff geht eine akute oder chronische Gesundheitsgefährdung aus. Für die wasserfreie Verbindung ist ein toxikologischer Wert bei oraler Einnahme von $LD_{50Ra} = 250 \text{ mg kg}^{-1}$ definiert. Die primäre Aufnahme der Substanz erfolgt über den Atemtrakt. Die chronische Gesundheitsgefährdung betrifft die Schädigung des Zentralnervensystems sowie die Entzündung der Atemwege. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration¹ (MAK) ist auf $0,2 \text{ mg m}^{-3}$, angegeben als inhalativer Aerosolanteil, festgesetzt. Bei Einhaltung der maximalen Arbeitsplatzkonzentration ist nicht von einer Reproduktionstoxizität auszugehen. Eine Aussage über Mutagenität sowie Kanzerogenität für den Menschen kann nicht getroffen werden. (GESTIS-Stoffdatenbank 2016)

3.5 Entwicklungspotenzial neuer Hochzelldichte-Kultivierungsstrategien

Obwohl die HCDC von *E. coli* bereits seit Jahrzehnten erfolgreich angewandt wird, bietet sie noch einiges Entwicklungspotential. Besonderes Augenmerk verdienen die Batch-Phase und die Zeiten mit bereits hohen Zelldichten. Darüber hinaus liefert das Medium Ansatzpunkte für weitere Verfahrensoptimierung.

Der Sauerstoffbedarf einer Kultur ist direkt an die Wachstumsgeschwindigkeit gekoppelt. Aus einem überschüssigen Nährstoffangebot in der Batch-Phase resultiert die Zellvermehrung mit maximaler zellspezifischer Wachstumsrate. Diese steigt mit zunehmender Temperatur sowie durch den Einsatz von nährstoffreichen Medien, wodurch es in Bioreaktoren mit vergleichsweise geringer Sauerstoffeintragsrate bereits früh zur Sauerstofftransportlimitierung kommen kann (Lee 1996). Die limitierte Verfügbarkeit von Sauerstoff als Elektronenakzeptor während einer Sauerstofftransportlimitierung verursacht die Herabregulation des Citratzyklus, wodurch die Energieausbeute aus der Umsetzung von Glucose signifikant sinkt. Da die Replikation und der Erhalt von Plasmid-DNA in der Zelle sowie die heterologe Proteinexpression von der Bereitstellung energiereicher Verbindungen durch den Organismus abhängen, kann

¹ Mangels neuer Daten wird hier der alte MAK genannt.

eine Sauerstofftransportlimitierung einen erheblichen Produktivitätsverlust bewirken (Li et al. 1992). Selbst bei der Rückkehr zu aeroben Bedingungen ist die Kultur nicht dazu in der Lage ihre normale Aktivität wieder zu erreichen (Holms 1996), was eine dauerhafte Versorgung mit ausreichend Sauerstoff umso wichtiger macht.

Der Übergang von Batch- zur Fed-Batch-Phase ist für gewöhnlich durch eine Periode ohne Substratversorgung gekennzeichnet. Diese wird genutzt, um Nebenprodukte, wie niedere Carbonsäuren, durch die Zelle metabolisieren zu lassen. Diese im Zuge des Überflusmetabolismus, insbesondere bei der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle, anfallenden Produkte variieren in Konzentration und Zusammensetzung mit dem eingesetzten Stamm sowie der initialen Substratmenge (Luli und Strohl 1990). Die Dauer, dieser für die Zellen nicht optimalen Prozessphase, unterliegt somit einer relativ weiten Schwankungsbreite und verursacht eine kohlenstoffbasierte Stressantwort, abhängig vom Sigmafaktor RpoS. Das Alarmon (p)ppGpp (Guanosin-5',3'-Pentaphosphat) ist der Haupteffektor für die Stressantwort in *E. coli*, deren Akkumulation bei Substratverbrauch die stabile RNA Biosynthese, den Wachstumsstopp sowie die Aktivierung von Genen zur Bewältigung der Stresssituation initiiert (Battesti et al. 2011).

Die Verwendung einiger auxotropher Stämme ist bei der herkömmlichen Prozessführung begrenzt. Darunter fällt zum Beispiel der Leucin-auxotrophe Stamm *E. coli* K12 ER2507. Es ist bekannt, dass bereits eine geringe Konzentration der notwendigen Aminosäure das Wachstumsverhalten des Stammes negativ beeinflusst. Zudem besteht eine reziproke Proportionalität zwischen der Glucosekonzentration und dem Leucinausbeutekoeffizienten, sodass eine Batch-Phase selbst mit nicht-inhibierenden Glucosekonzentrationen bis 50 g l^{-1} nicht sinnvoll für derartige Stämme ist (Rothen et al. 1998). Bedingt durch die *leuB6* Mutation, kann *E. coli* K12 ER2507 die 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase, welche einen Schritt der Leucinbiosynthese katalysiert (Somers et al. 1973), nicht synthetisieren. Leucin zählt zu den Haupteffektormolekülen des *leucine-responsive regulatory protein* (Lrp). Dabei können Operons des Leucin-Lrp Regulons sowohl positiv als auch negativ reguliert werden (Ernsting et al. 1992). Mehr als 400 Gene ($\approx 10 \%$) innerhalb des *E. coli* Genoms werden in Abwesenheit von Lrp beeinträchtigt, davon stehen mindestens 123 Gene unter direkter Kontrolle von Lrp. Sie sind involviert in verschiedene zelluläre Abläufe wie dem Metabolismus und Transport von Aminosäuren, die Biosynthese und Degradation verschiedener Metabolite sowie die Fimbriensynthese (Shimada et al. 2015). Somit hat Leucin einen starken Einfluss auf den Zellmetabolismus von *E. coli*. Zudem kann Leucin nicht aus anderen importierten Aminosäuren synthetisiert werden (Gschaedler und Boudrant 1994).

Zentrale Aspekte beim Erreichen hoher Zellkonzentrationen sind der Bedarf an Sauerstoff, die stoffwechselbedingte Wärme- und Kohlenstoffdioxidproduktion sowie eine zunehmende Viskosität der Kultursuspension. Dabei ist besonders die steigende Gelöstkohlenstoffdioxidkonzentration kritisch, welche gemäß Henry-Gesetz abhängig vom Kohlenstoffdioxidpartialdruck ist. Castan et al. (2002) berichten beispielsweise

von der Kohlenstoffdioxid-bedingten Wachstumsinhibierung und erhöhten Acetatbildung. Steigt bei höheren Zellkonzentrationen die Viskosität an, können insbesondere in großen Reaktorsystemen, infolge der abnehmenden Durchmischungseffizienz, lokale Inhomogenitäten auftauchen. Diese Zonen können durch die Unter- oder Überversorgung mit Substrat und Sauerstoff gekennzeichnet sein und entsprechend negative Auswirkungen auf die Kultur haben (Shojaosadati et al. 2008). Darüber hinaus ist die Kühlkapazität industrieller Prozessanlagen zu berücksichtigen. Bedingt durch eine hohe Zellkonzentration in Kombination mit einer hohen Zellaktivität, kann in Fed-Batch-Prozessen der Wärmetransport aus dem Reaktionssystem zu einem limitierenden Faktor werden (Sandén et al. 2003). Diese mit der hohen Zellkonzentration verknüpften Probleme lassen sich teils durch Variation der Prozessstrategie beeinflussen und sollten generell bei der Entwicklung und Optimierung von Hochzelldicht-Kultivierungsstrategien berücksichtigt werden.

Weiteres Entwicklungspotential birgt die Zusammensetzung des hier verwendeten synthetischen Mediums. Wie in 3.4.2.1 erläutert, beinhaltet es toxische Komponenten, welche idealerweise aus dem Medienansatz entfernt werden können. Zudem können dem Batch-Medium die erforderlichen Bestandteile nicht in beliebiger Menge zugesetzt werden, da sie, wie bereits erläutert, wachstumsinhibierend wirken können (Riesenberg 1991). Eingesetztes Ammoniumhydrogenphosphat erweist sich insbesondere in *in-situ* sterilisierbaren Reaktoren als nachteilig, weil es sich teilweise zersetzt und das frei gewordene Ammoniakgas Anlagenkomponenten aus Metallen wie Kupfer, Zink und Eisen korrodieren kann (Briehl 2014). Darüber hinaus erschwert der Substanzverlust die Bilanzierung der Komponente. Zusätzlich bietet es sich an, die Herstellungsprozedur des Mediums zu verbessern und darüber die Gesamtprozessstabilität zu steigern.

3.5.1 Acetatbildung infolge des Glucoseüberflussmetabolismus

Die Akkumulation von Acetat bei unlimitiertem Wachstum auf Glucose stellt eine große Herausforderung beim Erreichen hoher Zellkonzentrationen mit hohen Produktausbeuten dar, selbst wenn eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Bereits geringe Acetatkonzentrationen von $0,5 \text{ g l}^{-1}$ führen zu einer Reduktion der spezifischen Wachstumsrate, wie von Nakano et al. (1997) für *E. coli* K12 gezeigt. Als Erklärungsansatz für die Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit dient die Reprimierung der Synthese von DNA, RNA, Proteinen, Lipiden und Peptidoglycan durch Acetat (Blankenhorn et al. 1999; Cherrington et al. 1990). Darüber hinaus ist bekannt, dass Essigsäure über die Plasmamembran diffundiert und im Cytoplasma zu Acetat dissoziiert. Durch Abspaltung eines Protons ist eine Reduktion des Membranpotentials die Folge, was die ATP-Synthese in der Atmungskette beeinträchtigt (Veit et al. 2007). Wichtige zelluläre Abläufe werden also durch Acetat beeinflusst, wodurch sich die zu erreichende Zell- und Produktkonzentration reduziert. Das Ausmaß der Acetatbildung ist dabei abhängig von dem verwendeten Stamm. In einem Vergleich von diversen *E. coli* Derivaten konnten Luli und Strohl (1990) zeigen, dass in Glucose-Feedback-

kontrollierten Fed-Batch Kultivierungen mit *E. coli* MC1060 unter identischen Bedingungen eine vierfach höhere Acetatkonzentration erreicht wird als mit *E. coli* B. Gleichzeitig ist die Biomasseausbeute um zwei Drittel reduziert. Generell sekretieren B-Stämme bei hohen Glucosekonzentrationen weniger Acetat als K-Stämme. Verschiedene Einflussfaktoren, wie

- ein reduzierter Glucosetransport in die Zelle,
- eine erhöhte Zellatmung/Sauerstofftransferrate,
- ein reduzierter Durchsatz von Pyruvat zu Acetat,
- ein erhöhter anaplerotischer Reaktionsdurchsatz von PEP zu OA,
- ein erhöhter Durchsatz durch den Glyoxylatzyklus
- oder ein erhöhter Citratzyklusdurchsatz,

können dabei für die Unterschiede zwischen K- und B-Stämmen verantwortlich sein (Shiloach und Rinas 2009). Aufgrund der geringeren Acetatbildung können B-Stämme in der HCDC für die Expression rekombinanter Proteine im Vorteil sein. Allerdings kann die Ausbeute in K-Stämmen durch genetische Manipulationen gesteigert werden. Beispielsweise durch die Deaktivierung des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-systems (PEP-PTS) mittels Deletion des *ptsHI*-Operons in *E. coli* GJT001 (K-Derivat, näher beschrieben bei Lin et al. (2005) und Ferenci et al. (2009)) gelang es Wong et al. (2008) die Acetatproduktion durch Reduktion der Glucoseaufnahme fast vollständig zu unterdrücken. Dadurch konnte die volumetrische Produktivität hinsichtlich der Expression von GFP und β -Galactosidase sowie die Biomasseausbeute signifikant gesteigert werden. Neben dem verwendeten Stamm beeinflusst auch die Medienzusammensetzung sowie die spezifische Wachstumsrate die Acetatbildung. Im Vergleich zu definierten Medien beginnt die Acetatbildung bei Wachstum auf komplexen Medien bei geringeren spezifischen Wachstumsraten (Han et al. 1992; Meyer et al. 1984).

Shiloach und Rinas (2009) geben einen ausführlichen Überblick über die Zusammenhänge der verschiedenen, miteinander verbundenen Stoffwechselwege des Glucose- und Acetatmetabolismus. Wie in 3.4.1.1 beschrieben, bilden Glykolyse, Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung die Hauptstoffwechselwege zur Energiegewinnung aus Glucose. Ausgehend von der Glucoseaufnahme über das PTS (Abb. 3-5), wodurch Glucose die Zelle letztlich als Glucose-6-Phosphat (Glc-6-P) erreicht und anschließend über mehrere enzymatische Schritte umgewandelt wird, beginnt die aerobe Acetatbildung bei Pyruvat – dem finalen Intermediat der Glykolyse. Die Konzentration resultiert dabei aus der Bilanz von gebildetem und verbrauchtem Acetat. Wie in Abb. 3-5 zu sehen, sind zwei Wege bekannt, die die Reaktion von Pyruvat zu Acetat enzymatisch katalysieren. Der Hauptstoffwechselweg wandelt Acetyl-CoA über Acetyl-Phosphat zu Acetat um. Die beiden Reaktionsschritte werden durch die Enzyme Phosphotransacetylase (PTA) und Acetat-Kinase (ACKA) katalysiert, wobei zunächst

Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC) zu Acetyl-CoA umgewandelt wird.

Der zweite Stoffwechselweg führt von Pyruvat durch die Pyruvat-Oxidase (POXB) direkt zu Acetat. Obwohl die Funktion von POXB nicht vollständig verstanden ist, konnten Abdel-Hamid et al. (2001) zeigen, dass POXB einen wichtigen Beitrag zur aeroben Wachstumseffizienz beiträgt. Sie vermuten, dass es als „Sicherheitsventil“ fungiert und überschüssiges Pyruvat bevorzugt zu Acetat und nicht zu Acetyl-CoA umwandelt. Dadurch wird der CoA Pool für andere metabolische Funktionen aufrechterhalten. Der POXB Stoffwechselweg ist vermehrt im Übergang zwischen später exponentieller und stationärer Phase aktiv (Dittrich et al. 2005). Die Assimilation von Acetat erfolgt entwe-

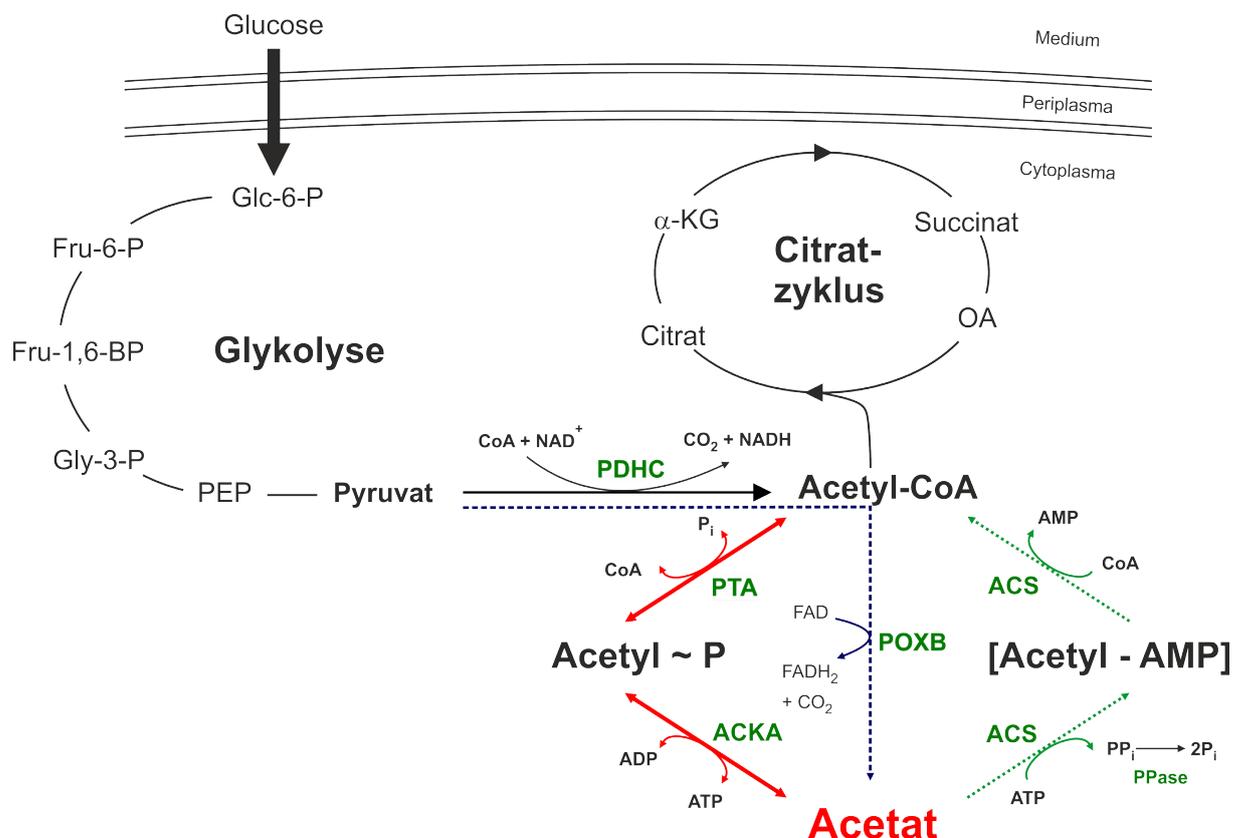


Abb. 3-5: Überflussmetabolismus und Acetat Aktivierungsweg in *E. coli*. Glucose wird aus dem Medium bevorzugt über das PTS bei simultaner Umwandlung zu Glucose-6-Phosphat (Glc-6-P) in die Zelle aufgenommen und in der Glykolyse (hier nur einige Teilschritte dargestellt) zu Pyruvat umgewandelt. Die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation zu Acetyl-CoA, welches zur nachfolgenden Energiegewinnung in den Citratzyklus eingeht. Im Hauptstoffwechselweg zur Produktion von Acetat katalysiert die Phosphotransacetylase (PTA) reversibel die Umwandlung von Acetyl-CoA und anorganischem Phosphat zu Acetyl-Phosphat, welches durch die Acetat-Kinase (ACKA) mit ADP reversibel zu Acetat und ATP umgesetzt wird. Alternativ katalysiert die Pyruvat-Oxidase die direkte Decarboxylierungsreaktion von Pyruvat, Ubichinon und Wasser zu Acetat, Ubichinol und Kohlenstoffdioxid. Die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) katalysiert die Assimilation von Acetat zurück zu Acetyl-CoA über Acetyl-AMP. Dabei wird im ersten Schritt ATP zu AMP und Pyrophosphat umgewandelt. Modifiziert nach Wolfe (2005).

der über den ACKA-PTA Weg oder wird durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) katalysiert. Letzterer Stoffwechselweg wird verwendet, wenn Acetat die Kohlenstoffquelle ist (Wolfe 2005).

Eine schlecht regulierte Substrataufnahme bei überschüssigem Glucoseangebot (Doelle et al. 1982), enzymatische Limitierung des Citratzyklus (Majewski und Domach 1990) oder die Kapazitätslimitierung der Elektronentransportkette beziehungsweise eine Kombination aus diesen Mechanismen (Holms 1996; Han et al. 1992) werden als mögliche Ursachen für die aerobe Acetatbildung vermutet. Reling et al. (1985) führen die Acetatausschleusung auf eine Sättigung der Atmungskette bei hohen Wachstumsraten zurück. Beim Erreichen von μ_{crit} wird bei submaximaler spezifischer Wachstumsrate die maximale spezifische Sauerstoffaufnahme q_{O_2} erreicht, wie in Abb. 3-6 zu sehen ist. Bei spezifischen Wachstumsraten größer μ_{crit} nimmt die Acetatbildungsrate dann mit der Wachstumsrate zu.

Die Acetatbildung ist außerdem vom NADH/NAD⁺ Verhältnis in der Zelle abhängig. Sie beginnt ab einem Redox-Verhältnis von 0,06 (Vemuri et al. 2006). Um Glucose zu katabolisieren, wird NAD⁺ benötigt. Die Regeneration von NAD⁺ durch Oxidation mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette ist dazu erforderlich

(Berríos-Rivera et al. 2002). Sobald die Substratverbrauchsrate trotz Anwesenheit von Sauerstoff die Regenerationskapazität von NAD⁺ übersteigt, gerät der Stoffwechsel außer Balance.

Andererseits wird vermutet, dass eine zu geringe Enzymaktivität im Citratzyklus die Umsetzung von Glucose limitiert. Beispielsweise durch Erhöhung der spezifischen Aktivität der drei Enzyme Succinat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase kann die Kapazität des oxidativen Teils des Citratzyklus gesteigert werden, wodurch weniger Acetat gebildet und mehr Kohlenstoff in Richtung CO₂ gelenkt wird (Veit et al. 2007).

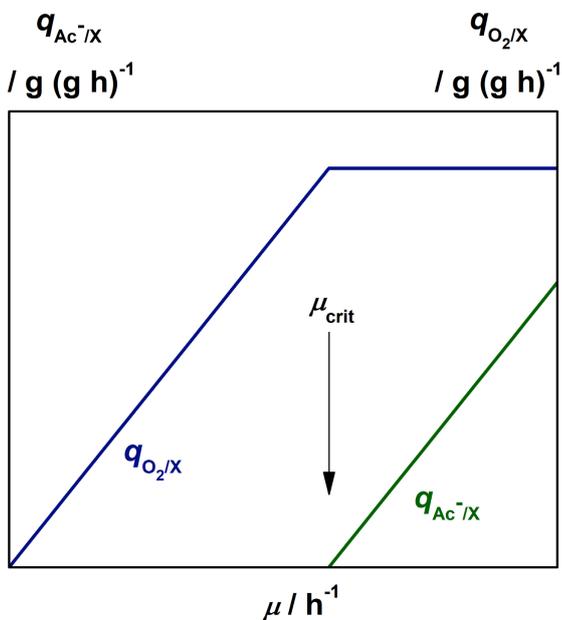


Abb. 3-6: Abhängigkeit der spezifischen Acetatbildungsrate $q_{Ac^-/X}$ von der spezifischen Wachstumsrate μ und Sauerstoffverbrauchsrate $q_{O_2/X}$ bei Wachstum auf Glucose. Modifiziert nach Eiteman und Altman (2006).

4 Material und Methoden

4.1 Medien und Medienansatz

4.1.1 LB-Medium auf Sojabasis (LBS-Medium)

Ein LB-Medium auf Sojabasis (LBS-Medium) wird als Flüssigmedium und Festmedium in Petrischalen zur Herstellung von Kryokulturen sowie zur Bestimmung der Lebendkeimzahlkonzentration verwendet. Bevor das Medium autoklaviert wird, erfolgt die Einstellung des pH-Wertes auf $7,0 \pm 0,1$ mit 4 M NaOH (R 6771, Karlsruhe).

Tab. 4-1: Zusammensetzung des LB-Flüssig-/Festmediums auf Sojabasis, LBS-Medium.

Komponente	Hersteller	Konzentration / g l^{-1}
Hefeextrakt	R 2365 / R 2904	5
Sojapepton	R 2365	10
NaCl	R 3957	10
Agar-Agar (bei Festmedium)	R 5210	10
Kanamycin und/oder Ampicillin	R T832 / R K029	(0,03 - 0,1) / 0,1

Das Agar-haltige LBS-Medium wird nach dem Autoklavieren homogenisiert und bis zur Herstellung des Festmediums bei 45 °C flüssig gelagert. Die Antibiotikazugabe für Selektivfestmedien erfolgt unmittelbar vor dem Plattenguss.

4.1.2 Synthetisches Medium für Schüttelkulturen

Zur Herstellung der synthetischen Medien – für Schüttelkulturen und Kultivierungen im Bioreaktor – werden unterschiedliche Konzentrate verwendet. Magnesiumsulfat-Hepthahydrat liegt als Stammlösung mit einer Konzentration von 500 g l^{-1} vor. Die Komponenten Kaliumdihydrogenphosphat und Diammoniumhydrogenphosphat liegen als 10-fach Konzentrat vor, dessen pH-Wert mit NaOH auf 6,7 eingestellt wird. Die Spurenelemente werden zusammen mit Citronensäure und EDTA als 100-fach Konzentrat eingesetzt. Abweichend davon werden zur Durchführung der einzelnen Experimente der Medienoptimierung mittels SVP 1000-fach Konzentrate der einzelnen Spurenelemente sowie EDTA verwendet. Nach Abschluss der Optimierungsversuche wird für weitere Kultivierungen wieder auf ein 100-fach Konzentrat mit allen erforderlichen Spuren zurückgegriffen.

Die in Tab. 4-2 aufgeführten Medien werden zur Herstellung der Vorkultur in Schüttelkolben verwendet. Zur Vermeidung von Maillard- und Fällungsreaktionen werden die Glucoselösung, der Phosphatpuffer (KH_2PO_4 und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,7) sowie die Spurenelemente zusammen mit Magnesiumsulfat und Citronensäure separat autoklaviert und anschließend unter aseptischen Bedingungen vereint. Vor der Sterilisation wird

4 Material und Methoden

der pH-Wert des Phosphatpuffers mit 4 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Thiamin und Antibiotika (bei Verwendung rekombinanter Stämme) werden anschließend sterilfiltriert hinzugegeben.

Tab. 4-2: Synthetisches Medium zur Vorkulturherstellung für HCDC-, iHCDC- und i²HCDC-Prozesse.

Komponente	Hersteller	Konzentration		
		HCDC iHCDC	i ² HCDC ¹	
Glucose	O	8,0	8,0	g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	R 3904	13,3	17,42	g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	R P736	4,0	-	g l ⁻¹
NH ₃ , 25 %	R 5460	-	2,0	g l ⁻¹
L-Leucin ²	R3984	0,3	0,3	g l ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	R 8283	1,2	0,2134	g l ⁻¹
Citronensäure · 1 H ₂ O	R 3958	1,7	-	g l ⁻¹
Titriplex III	M 8418	8,4	0,2081	mg l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	RdH 12914	2,5	-	mg l ⁻¹
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	RdH 31286	1,5	0,0400	mg l ⁻¹
H ₃ BO ₃	RdH 11606	3,0	-	mg l ⁻¹
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	RdH 31422	15,0	-	mg l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	RdH 31439	2,5	0,0640	mg l ⁻¹
Zn(CH ₃ -COO) ₂ · 2 H ₂ O	M 1.08802	13,0	0,2561	mg l ⁻¹
Fe(III)-citrat Hydrat	M 1.03862	100,0	2,6675	mg l ⁻¹
Thiamin · HCl	R T911	4,5	4,5	mg l ⁻¹
Kanamycinsulfat ³	R T832	30	30	mg l ⁻¹
Ampicillin Natriumsalz ⁴	R K029	100	100	mg l ⁻¹

Zur Herstellung des Vorkulturmediums für den i²HCDC-Prozess wird KH₂PO₄ autoklaviert und mit 10,67 ml l⁻¹ der Feedlösung für die Hochzelldichte-Kultivierung, 8,8 ml l⁻¹ NH₃ (25 % w/w), Thiamin und vektorspezifischem Antibiotikum (bei Verwendung von *E. coli* M15 Kanamycin und Ampicillin) ergänzt.

¹ Finale Medienzusammensetzung für rekombinante Stämme

² Bei Kultivierungen mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO

³ Für rekombinante Stämme mit den Vektoren pET-28a und pREP4

⁴ Für rekombinante Stämme mit den Vektoren pQE-30 und pGLO

4.1.3 Synthetische Medien für Kultivierungen im Bioreaktor

Für die Kultivierungen im Bioreaktor werden die in Tab. 4-3 aufgeführten Medienkomponenten in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

Tab. 4-3: Zusammensetzung der synthetischen Medien für die Kultivierung von verschiedenen *E. coli* Derivaten.

Komponente	Hersteller	Konzentration						
		Startmedium			Feed			
		HCDC	iHCDC	i ² HCDC	HCDC	iHCDC	i ² HCDC	
Glucose	O	25,0	-	-	700	750	750	g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	R 3904	13,3	13,3	17,42	-	-	-	g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	R P736	4,0	4,0	-	-	-	-	g l ⁻¹
L-Leucin ¹	R 3984	0,3	0,3	0,3	-	-	-	g l ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	R 8283	1,2	1,2	-	20,0	20,0	20,0	g l ⁻¹
Citronensäure · 1 H ₂ O	R 3958	1,7	1,7	-	-	-	-	g l ⁻¹
Titriplex III	M 8418	8,4	8,4	-	13,0	13,0	19,5	mg l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	RdH 12914	2,5	2,5	-	4,0	4,0	-	mg l ⁻¹
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	RdH 31286	1,5	1,5	-	2,5	2,5	3,75	mg l ⁻¹
H ₃ BO ₃	RdH 11606	3,0	3,0	-	5,0	5,0	-	mg l ⁻¹
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	RdH 31422	15,0	15,0	-	23,5	23,5	-	mg l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	RdH 31439	2,5	2,5	-	4,0	4,0	6,0	mg l ⁻¹
Zn(CH ₃ -COO) ₂ · 2 H ₂ O	M 1.08802	13,0	13,0	-	16,0	16,0	24,0	mg l ⁻¹
Fe(III)-citrat Hydrat	M 1.03862	100,0	100,0	-	40,0	40,0	250,0	mg l ⁻¹
Thiamin · HCl	R T911	4,5	4,5	4,5	-	-	-	mg l ⁻¹

Die Sterilisation des Phosphatpuffers (HCDC/iHCDC) beziehungsweise von KH₂PO₄ (i²HCDC) erfolgt *in-situ* im Bioreaktor. Beim Einsatz von *E. coli* K12 ER2507 pGLO wird dem Puffer L-Leucin zugesetzt. Zur Vermeidung von Maillard- und Ausfällungsreaktionen werden die übrigen Komponenten (Glucoselösung und MgSO₄-/Citronensäure-/Spurenelementlösung) getrennt autoklaviert. Die Thiaminlösung wird sterilfiltriert und nachfolgend das vollständige Startmedium unter aseptischen Bedingungen über STT-Sterilverbindungen im Reaktor komplettiert. Die hochkonzentrierte Glucoselösung der Feedlösung wird aus den genannten Gründen ebenfalls getrennt von der Spurenelement-/MgSO₄-Lösung autoklaviert, unter aseptischen Bedingungen mit letzterer nach dem Abkühlen vereint und mittels Magnetrührer (RH basic 2, IKA®-Werke, Staufen) homogenisiert.

¹ Bei Kultivierungen mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO

4.2 Stämme und Stammhaltung

Die hier eingesetzten *E. coli* Derivate sind in Tab. 4-4 aufgelistet. Mit Ausnahme von BL21 handelt es sich um rekombinante Stämme zur Expression verschiedener Gene. Nicht-kompetent erworbene Stämme werden mittels CaCl_2 -Methode (Dagert und Ehrlich 1979) transformiert oder für die Transformation vorbereitet.

Tab. 4-4: Verwendete Derivate von *E. coli* und Vektoren.

Wirtsstamm	Quelle	Genotyp	Vektor	Quelle
BL21	Merck Millipore, Darmstadt, 69449	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$	-	-
BL21 (DE3)	Merck Millipore, Darmstadt, 69450	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	pET-28a	Merck Millipore, Darmstadt, 69864
M15 pREP4	Qiagen, Hilden, 34210	$F^- \Phi 80 \Delta lacM15 thi lac- mtl-recA+ KmR$	pQE-30	Qiagen, Hilden, 32915
K12 TG1	DSMZ, Braunschweig, 6056	$\Delta(lac-pro) supE thi hsdD5 F^*traD36 proAB lacI^q lacZ\Delta taM15$	pQE-30	Qiagen, Hilden, 32915
K12 ER2507	New England BioLabs, Frankfurt am Main, E4121S	$F^- ara-14 leuB6 fhuA2 \Delta(argF-lac)U169 lacY1 glnV44 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-5 \Delta(malB) zjc::Tn5(Kan^R) \Delta(mcrC-mrr)_{HB101}$	pGLO	Bio-Rad, München, 1660003EDU

4.2.1 Vektoren

Die Arbeiten zur Herstellung der rekombinanten Stämme wurden teils selbst, teils vom Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik der HAW Hamburg durchgeführt. Nachfolgend soll die Vorgehensweise zur Herstellung der Konstrukte für die Expression von Rab11a und GFP beschrieben werden.

4.2.1.1 pGLO Vektor zur Expression von GFP

Der Expressionsvektor pGLO mit einer Größe von 5371 bp ist ein kommerziell erhältlicher Vektor, welcher die Gensequenz für das Protein GFP enthält. Die Expression von GFP steht im pGLO System unter der Kontrolle des pBAD Promotors und kann durch L-Arabinose induziert werden. Das Gen *araC* codiert für das Regulatorprotein AraC. In Abwesenheit von L-Arabinose reprimiert das AraC Proteindimer durch Bindung von *araI*₁ und *araO*₂ die Bindung der RNA Polymerase an den Promotor. Die Anwesenheit von L-Arabinose bewirkt durch Bindung an das AraC Proteine eine allosterische Konformationsänderung, wodurch die RNA Polymerase an den pBAD Promotor bindet und somit die Transkription des *GFP* Gens initiiert wird. Der Vektor vermittelt durch die Sequenz für das Enzym β -Lactamase (*bla*) eine Resistenz gegenüber Ampicillin. Soweit nicht anders angegeben, wird der rekombinante Stamm *E. coli* K12 ER2507 pGLO mit einer L-Arabinosekonzentration von 5 g l^{-1} , bezogen auf ein

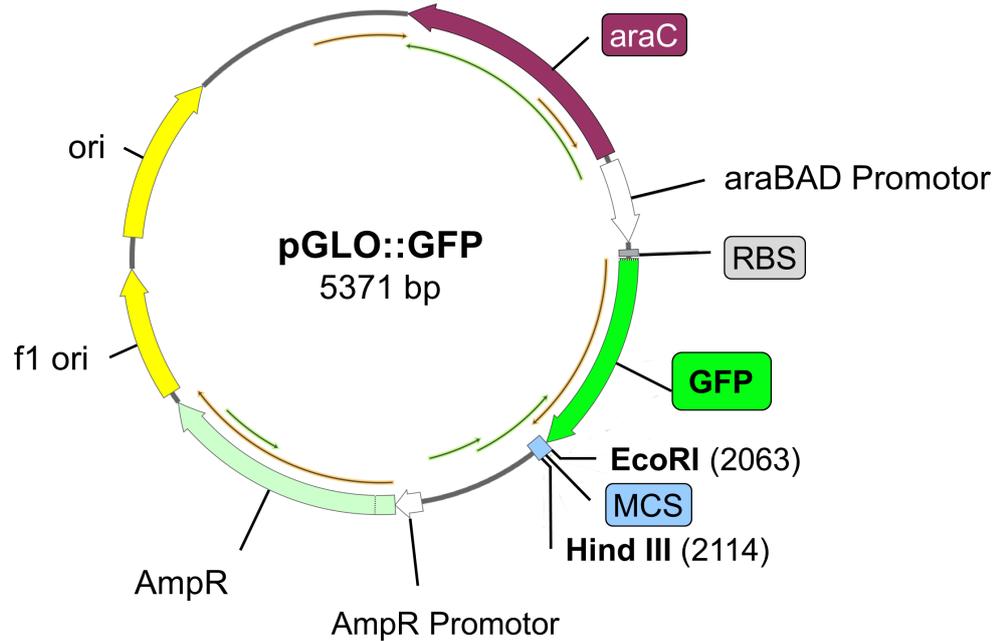


Abb. 4-1: pGLO::GFP Plasmidkarte. pGLO enthält verschiedene Sequenzen, welche die Replikation der Plasmid DNA und die Expression des Zielproteins (GFP) ermöglicht. GFP = Sequenz für GFP, AmpR enthält die Sequenz für β -Lactamase (*bla*), ori = Replikationsursprung, *araC* = Sequenz für das regulatorische Protein AraC, pBAD Promotor und eine MCS. Die Karte wurde mit SnapGene® (Vers. 3.2.1; GSL Biotech LLC, USA Chicago) erstellt.

Kulturvolumen von 4,5 l, welches bei Vernachlässigung von Probenahme und Basezugabe am Prozessende erreicht würde, induziert.

4.2.1.2 Herstellung der Vektoren pET-28a::Rab11a und pQE-30::Rab11a

Die kommerziellen Plasmid-Vektoren pET-28a und pQE-30 werden zur Herstellung der Konstrukte für die Expression von Rab11a verwendet. Die kodierende Sequenz für das Genprodukt mit einer Länge von 651 bp wurde aus der Hundenierenzelllinie MDCK isoliert (Chavrier et al. 1990). Die Insertion des Genabschnitts erfolgt in 5'-3' Richtung zwischen den beiden Schnittstellen BamHI und HindIII der jeweiligen *Multiple cloning site* (MCS) durch Schneiden mit den Restriktionsendonukleasen (BamHI ER0051; HindIII ER0501, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) sowie der anschließenden Ligation. Die resultierende Gesamtlänge beträgt 6000 bp (pET-28a::Rab11a) respektive 4076 bp (pQE-30::Rab11a).

Der pET-28a Vektor verfügt über eine N-terminale His₆-Tag/Thrombin/T7-Tag Konfiguration, sodass das resultierende Fusionsprotein His₆-Thrombin-T7-Rab11a, nachfolgend als HTT-Rab11a bezeichnet, mit einer Thrombinschnittstelle exprimiert wird. Die mit ExPASy kalkulierte Molmasse beträgt 27,9 kDa (Gasteiger et al. 2005). Die Expression steht unter der Kontrolle des T7 Promotors. Das Plasmid enthält die Sequenz für das Regulatorgen *lacI*, wodurch der Lac-Repressor die Expression des Zielproteins unterbindet. Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG. Der Selektionsmarker *KanR* verleiht dem Organismus die Resistenz gegenüber Kanamycin.

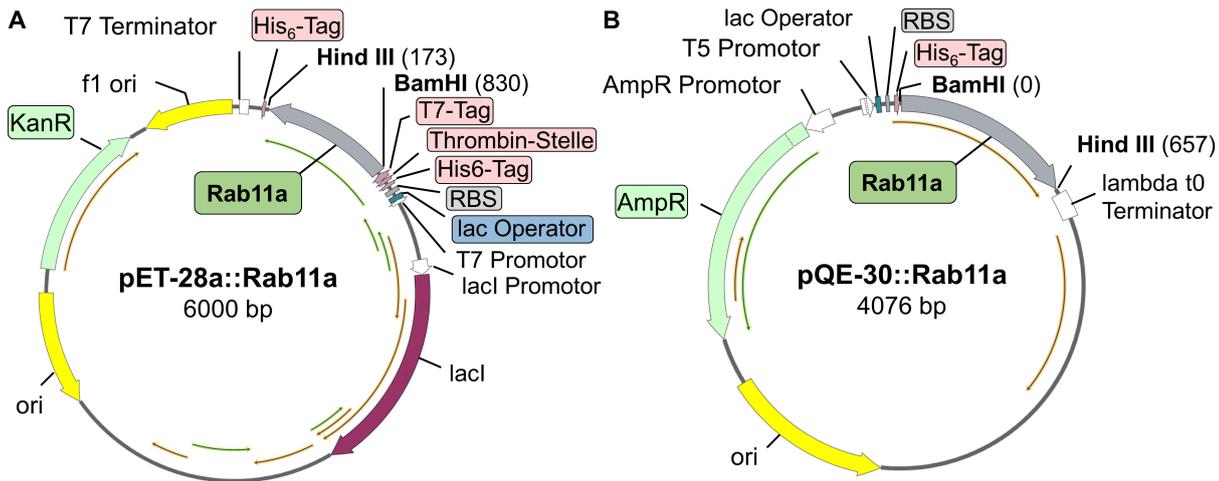


Abb. 4-2: pET-28a::Rab11a (A) und pQE-30::Rab11a (B) Vektorkarten. (A) Die Sequenznummerierung des pET-28a Vektors folgt der pBR322 Konvention, sodass die T7 Expressionsregion auf der Plasmidkarte in umgekehrter Reihenfolge dargestellt ist. Rab11a ist in 5'-3' Richtung zwischen BamHI (198) und HindIII (173) in der MCS inseriert. Neben den dargestellten Sequenzen für die N-terminale His₆-Tag/Thrombin/T7-Tag Konfiguration und der Kanamycinresistenz, enthält der Vektor die Sequenzen für den T7 Promotor, den T7 Transkriptionsstart, den T7 Terminator, das *lacI* Repressorgen, den pBR322 sowie den f1 Replikationsursprung. (B) Der pQE-30 Vektor enthält die Gensequenz für Rab11a, kloniert in 5'-3' Richtung zwischen BamHI und HindIII in der MCS (145 - 192). Hinzu kommen die Sequenzen für das N-terminale His₆-Tag, das *bla* Gen (AmpR), das T5 Promotor/*lac* Operator Element, eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS), der Transkriptionsterminator Lambda *t*₀ und der ColE1 Replikationsursprung (ori). Nicht dargestellt sind die Terminatorsequenz *rrmB* T1 sowie der T5 Transkriptionsstart. Die Karten wurden mit SnapGene® (Vers. 3.2.1; GSL Biotech LLC, USA Chicago) erstellt.

Das Plasmid pQE-30 enthält eine N-terminale His₆-Tag Sequenz zur Expression des Zielproteins als His₆-Rab11a Fusionsprotein, nachfolgend als H-Rab11a bezeichnet. Die mit ExpASy kalkulierte Molmasse beträgt 25,4 kDa (Gasteiger et al. 2005). Die Expression wird durch den T5 Promotor in Kombination mit einem doppelten *lac* Operator Repressionsmodul kontrolliert und durch IPTG Zugabe induziert. Der Vektor enthält das *bla* Gen und vermittelt somit eine Ampicillinresistenz.

Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens der rekombinanten Stämme mit den Plasmiden pET-28a beziehungsweise pQE-30 im HCDC-, iHCDC- oder i²HCDC-Prozess wird IPTG (R 2316, Karlsruhe) in einer Konzentration von $c_{\text{IPTG}} = 1 \text{ mmol l}^{-1}$, bezogen auf ein Kulturvolumen von 4,5 l, eingesetzt.

4.2.2 Transformation und Kryokonservierung

Zur Aufnahme der erzeugten Plasmide werden die kompetenten Zellen mit dem Ligationansatz versehen und 0,5 h bei (0 – 4) °C auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Der Transformationsansatz wird anschließend für 1 min auf Eis heruntergekühlt und nachfolgend im Inkubationsschüttler für 1 h bei 37 °C in LBS-Medium gelagert. Es folgt ein Zellausstrich auf LBS-Festmedium, welches das für den entsprechenden Vektor erforderliche Antibiotikum enthält. Zur Kolonienbildung wird die Petrischale bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Zur langfristigen Stammhaltung werden Einzelkolonien zur Herstellung von Kryokulturen (MCB, WCB) entnommen. Diese werden in 100 ml LBS-Medium unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks bei 30 °C und 120 min⁻¹ im Schüttelinkubator (Schüttelinkubator 3032, GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) kultiviert. Bei $\Delta OD_{600} \approx 2,1$ wird die exponentiell wachsenden Kultur für (0,25 – 0,5) h im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend mit circa 18 g sterilem Glycerin ($\geq 98\%$, R 7530; Karlsruhe) versetzt und in 1 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

4.3 Prozessführung

4.3.1 Schüttelkulturen

100 ml des Vorkulturmediums wird mit (50 – 100) μ l der jeweiligen Kryokultur beimpft. Die Vorkultivierung erfolgt in 1 l Schikanekolben bei 30 °C und 120 min⁻¹ im Schüttelinkubator.

Tab. 4-5: Vorkulturvolumen und Inkubationszeiten für die Vorkulturen mit unterschiedlichen *E. coli* Derivaten zur Beimpfung von 3 l Startkultur.

Stamm	V_{inoc} / l	c_{Glc0} / g l ⁻¹	t / h
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,3	8,0	18 – 20
<i>E. coli</i> BL21	0,2	6,0	17 – 19
<i>E. coli</i> K12 TG1	0,5	8,0	18 – 20
<i>E. coli</i> M15	0,5	8,0	18 – 20
<i>E. coli</i> K12 ER2507	0,5	8,0	22 – 24

Aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens der eingesetzten Stämme werden Animpfvolumen und Inkubationszeit variiert (siehe Tab. 4-5). Das Gesamtvolumen aus Vorkultur und Medium im Reaktor ergibt dabei immer 3 l Startkulturvolumen.

4.3.2 Kultivierungsprozesse in unterschiedlichen Bioreaktoren

Für die Kultivierung im Bioreaktor werden zwei Rührkesselreaktoren vom Typ BIOSTAT® CT (B. Braun Biotech International, Melsungen) verwendet. Wichtige Ausstattungsmerkmale und Unterschiede bezüglich der Instrumentierung sowie die übereinstimmenden geometrischen Abmessungen der verwendeten Reaktoren sind in Tab. 4-6 aufgeführt.

Tab. 4-6: Ausstattungsmerkmale und geometrische Kenndaten der eingesetzten Bioreaktoren.

Merkmals	CT (A)	CT (B)
Druckluftbegasung	MFC, (0 – 20) l min ⁻¹	MFC, (0 – 10) l min ⁻¹
Sauerstoffbegasung	MFC, (0 – 10) l min ⁻¹	Getaktetes Dreiwegeventil, Zugabe über Druckluft-MFC
Begasungsstrategie	Additive O ₂ -Dosierung	Gas flow ratio
Abgasanalysator	+	-
Trübungssonde	+	-
N_{St}	(20 – 1500) min ⁻¹	
Waagen	Feed, NH ₃	
Substratpumpe	Extern, (0 – 160) min ⁻¹	
V_T /l		6,9
V_{L0} /l		3
d_V /mm		164
h_V /mm		355
d_{St} /mm		64

4.3.2.1 5 I Laborversuchsanlage

Der BIOSTAT® CT (B. Braun Biotech International, Melsungen) besteht aus einem *in-situ* sterilisierbaren doppelwandigen Edelstahlkulturgefäß mit Glaszylinder und einer digitalen Kontrolleinheit (DCU). Die Rührwelle, bestückt mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern, wird durch den Edelstahldeckel geführt. Ferner enthält der Deckel Durchgänge für das Zuluftrohr zum Begasungsring, Abluftkühler, Tauchrohr, Sicherheitsventil, Antischaumsonde und Stutzen für Anstechgarnituren. Die pH-, pO₂-, Temperatur- und Trübungsmessung sowie die Probenahme erfolgt über Sonden und das Probenahmeventil im Stutzenkranz. Messstellen für Druck und Schaum (*Highfoam*) befinden sich in der Abluftstrecke oberhalb des Abluftkühlers. Zu- und Abluft werden über einen 0,2 µm PTFE Membranfilter (Sartofluor® Junior Cartridge, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) filtriert. Das Temperiersystem besteht aus einem geschlossenen Heißwasserdrucksystem mit Zirkulationspumpe, einer elektrischen Heizung mit 7,5 kW Leistung und einem Wärmetauscher für Kühlwasser. Die Rührwelle wird über einen bürstenlosen Gleichstrom-Servomotor mit einer Leistung von 200 W angetrieben.

Die Datenerfassung erfolgt über die DCU. Ferner sind Regelkreise für alle relevanten Prozessgrößen in ihr realisiert. Die Trübungssonde ist über einen separaten Messverstärker (BioPAT Fundalux II FC10, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) in die Kontrolleinheit eingebunden. Über eine serielle RS-422 Schnittstelle erfolgt der Datenaustausch mit dem Prozessleitreehner. Waagen (Talent TE6101, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) zur Erfassung des Substrat- und Ammoniakmassenstroms in den Reaktor, ebenso wie eine drehzahlgesteuerte Pumpe (REGLO Digital, Ismatec, Wertheim) und der Abgasanalysator (BlueInOne Ferm, Blue Sens gas sensor GmbH, Herthen) sind über einen RS-232/Ethernet Konverter mit dem Prozessrechner gekoppelt. Der schematische Aufbau der 5 I Versuchsanlage ist in Abb. 4-3 dargestellt.

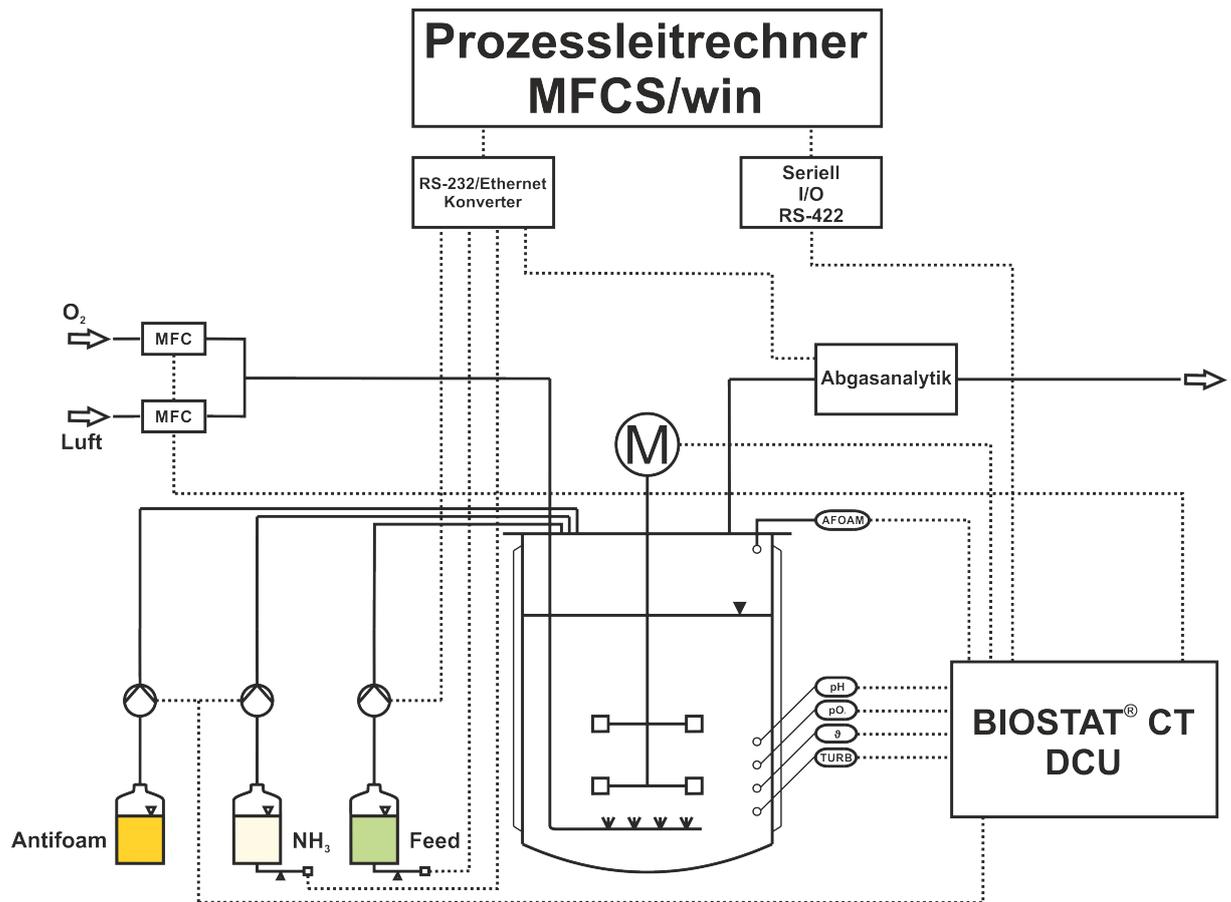


Abb. 4-3: Fließbild der BIOSTAT® CT(A) 5 l Laborversuchsanlage. 5 l Rührkesselreaktor mit der digitalen Kontrolleinheit (DCU), inklusive Regelkreise für Druckluft- und Sauerstoffbegasung, Temperatur-, pH-, pO_2 -, Antischaum- sowie *on-line* Trübungsmessung.

Zur kontinuierlichen Datenaufzeichnung wird das *Multi Fermentor Control System for Windows* MFCS/win (Version 3.0, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) verwendet. Über die ISA S88 konforme Rezeptstruktur ist die vollständige Prozesssteuerung in MFCS/win realisiert. Phasenabhängig erfolgt die kontinuierliche Berechnung der Nachfütterrate F_R nach Gleichung (3.7). Weitere berechnete Prozessgrößen sind das Reaktionsvolumen nach Gleichung (3.8) sowie die Reaktionsraten Q_{O_2} , Q_{CO_2} sowie RQ aus den abgasseitig gemessenen Größen $x_{O_2,out}$ und $x_{CO_2,out}$ nach den Gleichungen (4.23), (4.24) und (4.30).

4.3.2.2 Prozessführung

Abb. 4-4 zeigt den theoretischen Verlauf einer HCDC. Der dreiphasige Prozess besteht aus einer initialen Batch-Phase, gefolgt von zwei Fed-Batch-Phasen. Der Übergang in die erste Fed-Batch-Phase erfolgt automatisiert durch eine Batch-Ende-Detektion, welche in die Rezeptstruktur integriert ist. Die vollständige metabolische Umsetzung des Substrats sowie von zuvor gebildeten Carbonsäuren führt am Batch-Ende zu einem sprunghaften Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH-Wertes. Bei Erfüllung der Übergangskriterien von $pO_2\% \geq 25\%$, $pH \geq 6,67$, $N_{St} \leq 650 \text{ min}^{-1}$ sowie $t \geq 5 \text{ h}$ wird die Nachfütterung gestartet.

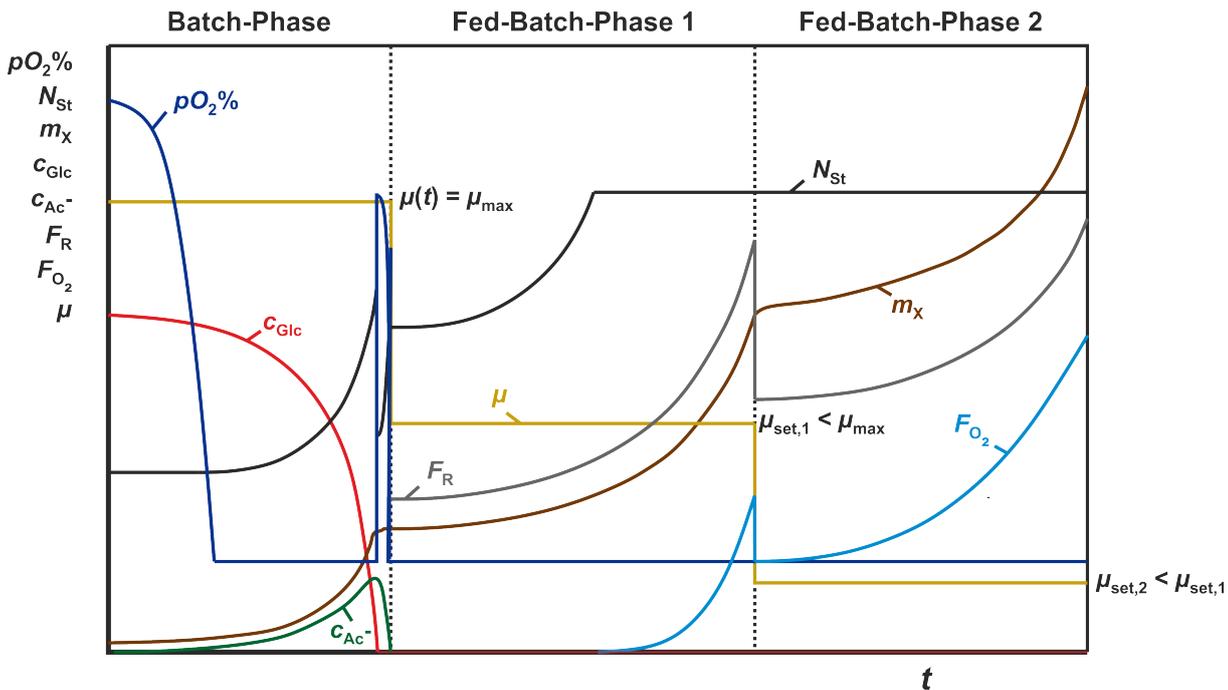


Abb. 4-4: Theoretischer Kultivierungsverlauf einer Hochzelldichte-Kultivierung (HCDC) mit drei Prozessphasen. Der Batch-Phase mit maximaler spezifischer Wachstumsrate μ_{\max} folgen Fed-Batch-Phase 1 mit $\mu_{\text{set},1} < \mu_{\text{crit}} < \mu_{\max}$ und Fed-Batch-Phase 2 mit $\mu_{\text{set},2} < \mu_{\text{set},1}$. Prozessgrößen: Gelöstsauerstoffkonzentration $pO_2\%$, Rührerdrehzahl N_{St} , Biomasse m_X , Glucosekonzentration c_{Glc} , Acetatkonzentration c_{Ac^-} , Nachfütterungsrate der Feedlösung F_R , Sauerstoffbegasungsrate F_{O_2} .

Nach maximaler zellspezifischer Wachstumsrate in der Batch-Phase wird eine submaximale spezifische Wachstumsrate mit $\mu_{\text{set}} < \mu_{\text{crit}} < \mu_{\max}$ in den Fed-Batch-Phasen eingestellt. Dazu wird eine exponentielle *open-loop* Nachfütterungsstrategie nach Gleichung (3.7) verwendet. Mit dem zeitlich gesteuerten Übergang (Berechnungsgrundlage siehe 4.6.1) zur zweiten Nachfütterungsphase bei $\Delta OD_{600} \approx 180$ erfolgt eine weitere Reduktion der spezifischen Wachstumsrate und reine Zellmassebildung oder die Induktion von rekombinanten Stämmen. Nach vollständigem Verbrauch der Feedlösung wird der Prozess beendet.

Die isotherme Kultivierung erfolgt bei 30 °C. Durch Zugabe von Ammoniak wird der pH-Wert auf 6,6 geregelt. Über einen pO_2 -Kaskadenregler wird die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 20 % gehalten. Bei konstanter Druckluftbegasung wird die Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} auf die maximale Drehzahl (1500 min^{-1}) erhöht und dann nach Bedarf durch additive Zugabe von reinem Sauerstoff in den Zuluftstrom konstant gehalten.

4.4 Analytik

4.4.1 Zellwachstum

4.4.1.1 Biotrocken- und Biofeuchtmassekonzentration

Die Biotrocken- und Biofeuchtmassekonzentration (BTM und BFM) in der Flüssigphase wird gravimetrisch (BP221S, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) ermittelt.

Zur BTM-Bestimmung wird 1 ml Zellsuspension in getrockneten, ausgewogenen Mikroreaktionsgefäßen 4 min bei 13000 min^{-1} zentrifugiert (Centrisart A-14, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen). Der Überstand wird zur Bestimmung von Metaboliten und Medienbestandteilen bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und das Zellpellet bei $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Druck von 0,4 bar im Vakuumtrockenschrank (Vacutherm, Heraeus Instruments, Hannau) für $(20 \pm 4) \text{ h}$ getrocknet.

In der vorliegenden Arbeit berücksichtigen die angegebenen Biomassewerte die durch Probenahme entnommene Biomasse.

4.4.1.2 Optische Dichte und *on-line* Trübungsmessung

Die Bestimmung der OD während der Kultivierung erfolgt bei 600 nm mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg), das mit Luft im Strahlengang genullt wird. Bei Überschreiten einer gemessenen Extinktion von 0,6 wird die Zellsuspension mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Aus der Extinktion des Mediums respektive Kulturüberstands OD_{med} sowie der Suspension OD_{susp} errechnet sich

$$\Delta OD_{600} = (OD_{\text{susp}} - OD_{\text{med}}) F \quad (4.1)$$

Zur *on-line* Überwachung des Zellwachstums wird eine sterilisierbare 1-Kanal-NIR-Absorptionssonde mit einer optischen Pfadlänge von 5 mm (Typ ASD25-BT-N, Optek, Essen) verwendet.

4.4.1.3 Lebendkeimzahlkonzentration und Anteil plasmidhaltiger Zellen

Die Gesamtlebendkeimzahlkonzentration C_X sowie die Konzentration plasmidhaltiger Zellen C_{X+} wird nach dem Kochschen Plattengußverfahren in Dreifach- oder Fünffachbestimmung ermittelt. Um eine Koloniezahl im Bereich von (30 – 300) KBE je Petrischale zu erhalten, werden die Proben mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt, in LBS-Agar eingegossen und für $(20 \pm 4) \text{ h}$ bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die benötigte Verdünnungsstufe wird über eine Korrelation zwischen ΔOD_{600} und der Lebendkeimzahlkonzentration C_X aus

$$C_{X\text{calc}} = 8,3 \cdot 10^8 \text{ KBE ml}^{-1} \Delta OD_{600} \quad (4.2)$$

abgeschätzt.

Durch Antibiotikumzusatz (Amp, Kan oder Amp und Kan bei *E. coli* M15 pQE-30) zum Nährmedium wird die Konzentration plasmidhaltiger Zellen bestimmt und

$$f_{X+/X} = \frac{C_{X+}}{C_X} \quad (4.3)$$

berechnet.

4.4.2 Bestimmung von Glucose, Acetat, Leucin, Ammonium und Phosphat im Medium

4.4.2.1 HPICE zur Quantifizierung von Glucose und Acetat

Zur Bestimmung von Glucose und Acetat wurden zwei Methoden mit und ohne Vorsäulenderivatisierung eingesetzt. Nachfolgend wird das überwiegend genutzte Verfahren dargestellt. Genutzt wird eine Ionenausschluss-Säule (Rezex ROA-Organic Acid (150 × 7,8) mm, Phenomenex, Aschaffenburg) und das chromatographische System (Primaide™, Hitachi High-Technologies, Düsseldorf) bestehend aus Niederdruckgradientenpumpe mit Entgasereinheit (PM1110), Säulenofen (PM1310), Autosampler (PM1210), Diodenarray- (PM1430) und Brechungsindexdetektor (Chromaster HPLC 5450, VWR Hitachi, Darmstadt).

Kulturüberstände werden zur Makromolekülpräzipitation (Luli und Strohl 1990) zunächst 1:10 mit 50 mM H₂SO₄ verdünnt und anschließend 2 min bei 13000 min⁻¹ zentrifugiert (Centrisart A-14, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen). Ferner folgt eine Filtration über einen hydrophilen 0,2 µm PVDF-Membranfilter (CHROMAFIL® PVDF Xtra, Macherey-Nagel, Düren). Die isokratische Trennung erfolgt mit 2,5 mM H₂SO₄ bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,6 ml min⁻¹ und einer Säulenofentemperatur von 60 °C. Sowohl Glucose als auch Acetat werden über das RI-Signal detektiert. Zur Datenerfassung und -auswertung wird der Primaide System Manager (Version 1.0, Hitachi High-Technologies, Düsseldorf) verwendet. Die Quantifizierung erfolgt über die Peakhöhe.

Mit der aus Standards mit bekanntem Analytgehalt gewonnenen Kalibrierfunktionen, kann die Konzentration im Kulturüberstand berechnet werden. Die Glucosestandards, angesetzt im HCDC/iHCDC- respektive i²HCDC-Startmedium, werden im Bereich von (0 – 30) g l⁻¹ hergestellt und vor der Vermessung im Verhältnis 1:10 mit 50 mM H₂SO₄ verdünnt und angesäuert. Für die Berechnung der Acetatkonzentration wird ein kommerziell erhältlicher Standard (TraceCERT® 1000 mg l⁻¹, SA 51791, München) verwendet. Die Aufnahme der Kalibrierfunktion erfolgt im Bereich von (15,625 – 1000) mg l⁻¹. Da der Standard in wässriger Lösung vorliegt, erfolgt die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration mit Wasser.

Messwerte, die unterhalb der Bestimmungsgrenze für Glucose und Acetat liegen, werden in der vorliegenden Arbeit gleich Null gesetzt.

4.4.2.2 Leucinbestimmung nach Vorsäulenderivatisierung mittels HPICE

Soll parallel zu Glucose und Acetat auch Leucin bestimmt werden, wird für Probenmaterial aus Fed-Batch-Kultivierungen mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO die HPICE nach Vorsäulenderivatisierung verwendet. Die Derivatisierung erfolgt, wie bei Pleissner et al. (2011) beschrieben. Zu 1 ml Kulturüberstand wird 0,2 ml 1 M KNO₂ sowie 0,04 ml 12 M HCl gegeben und für 90 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend werden

0,2 ml 2 M NaOH hinzugefügt und die Lösung über einen hydrophilen 0,2 μm PVDF-Membranfilter filtriert. Die Ionenausschlussssäule und das chromatographische System entspricht den in 4.4.2.1 beschriebenen Komponenten. Die isokratische Trennung mit $c_{\text{FM}} = 2,5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, $F_{\text{FM}} = 0,4 \text{ ml min}^{-1}$, $\varrho_{\text{co}} = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Detektion von Glucose und Acetat erfolgen analog zu 4.4.2.1. L-Leucin wird am Säulenausgang über den RI-Detektor detektiert. Die Berechnung der Analytkonzentration geschieht wieder über den Vergleich der Peakhöhe mit Standards bekannter Konzentration.

Standards von L-Leucin (0,15–1,0) g l^{-1} und Glucose (0,75–5,0) g l^{-1} werden in iHDCD-Startmedium angesetzt. Für die Berechnung der Acetatkonzentration wird ein kommerziell erhältlicher Standard im Bereich (15,625–250) mg l^{-1} eingesetzt.

4.4.2.3 Quantifizierung von Leucin mittels HILIC

Die hydrophile Interaktionschromatographie mit einer Normalphasensäule (LiChrosorb® Si-60 (125 \times 4) mm, Merck, Darmstadt) wird zur Leucinquantifizierung in Überstandsproben aus Batch-Kultivierungen mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO verwendet. Die Methode nach Bhandare et al. (2010) sieht keine Derivatisierung der Aminosäure vor. Die Proben werden über einen hydrophilen 0,2 μm PVDF-Membranfilter filtriert. Als Fließmittel dient 2,5 mM KH_2PO_4 , pH 2,85, (A) und Acetonitril (B). Die isokratische Trennung erfolgt bei 75 % B und 25 % A, $\varrho_{\text{co}} = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml min^{-1} . L-Leucin wird bei 200 nm detektiert und über die resultierende Peakhöhe quantifiziert. Dazu wird L-Leucin mit Konzentrationen im Bereich von (20–1000) mg l^{-1} in iHDCD-Startmedium angesetzt.

4.4.2.4 Ammoniumnachweis

Der Nachweis von Ammonium in Kultivierungsproben erfolgt mit einem Ammonium-Küvettest (Spectroquant® 1.00683.001, Merck, Darmstadt). Liegt eine stark alkalische Lösung vor, liegt das Reaktionsgleichgewicht zwischen Ammoniumionen und Ammoniak praktisch auf Seiten des Ammoniaks. Die Umsetzung erfolgt mit Hypochloritionen zu Monochloramin. Mit einem substituierten Phenol bildet das Monochloramin ein blaues Indophenol-Derivat, welches bei einer Wellenlänge von 690 nm photometrisch bestimmt wird. Mithilfe von Standards mit bekanntem Ammoniumgehalt im Bereich von (0–60) mg l^{-1} wird über eine lineare Korrelation die Konzentration in der unbekannt Probe berechnet.

4.4.2.5 Phosphatnachweis

Die Bestimmung von Phosphat wird mit einem Spectroquant® Phosphat-Test (1.14842.001, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Orthophosphationen reagieren in schwefelsaurer Umgebung in Anwesenheit von Ammoniumvanadat und Ammoniumheptamolybdat zu einer orangegelben Molybdatovanadatophosphorsäure, deren Ex-

tinktion bei 410 nm gemessen wird. Aus einer Kalibriergerade aus Standards bekannter Phosphatkonzentration im Bereich von $(0 - 90) \text{ mg l}^{-1}$, wird der Phosphatgehalt in der Kultivierungsprobe berechnet.

Als Standard zur Quantifizierung von Phosphat und Ammonium wird KH_2PO_4 und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ in iHDC-Startmedium mit $13,3 \text{ g l}^{-1}$ respektive $4,0 \text{ g l}^{-1}$ eingesetzt. Die Verdünnung der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergeraden sowie der Proben erfolgt mit Wasser.

4.4.3 *On-line* Analytik im Bioreaktor

4.4.3.1 Temperaturmessung

Die Temperatur in der Flüssigphase wird mittels Pt100 Sensor bestimmt.

4.4.3.2 Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Kultivierungsprozess wird mit einem sterilisierbaren Clark-Sensor (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz) durchgeführt. Die Nullpunktkalibrierung erfolgt während der Sterilisation bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Elektrodensteilheit wird bei $F_{\text{air}} = 3 \text{ l min}^{-1}$ und $N_{\text{St}} = 1000 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Der Messwert wird als prozentualer Anteil der Sauerstoffsättigungskonzentration ausgegeben.

4.4.3.3 pH-Wert

Der pH-Wert wird mit einer sterilisierbaren Einstabmesskette (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz) bestimmt. Die Zweipunktkalibrierung der Elektrode erfolgt vor der Sterilisation mit Pufferlösungen bekannten pH-Wertes (pH 4,01 und 7,00; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

4.4.3.4 Schaumdetektion

Die Schaumdetektion erfolgt mit einer Einstabsonde, die nach dem Leitfähigkeitsprinzip arbeitet.

4.4.3.5 Abgasanalyse

Der Stoffmengenanteil an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in der Reaktorabluft wird mit dem Abgasanalysator BlueInOne Ferm (Blue Sens gas sensor, Herten) gemessen. Der CO_2 -Sensor ist aus einer IR-Strahlungsquelle, einem Detektor und einer Reflektionsmesszelle aufgebaut. Die Messung basiert auf der Absorption von IR-Strahlen durch CO_2 . Die O_2 -Messung basiert auf der Fähigkeit von Zirkoniumoxid Sauerstoffionen ab $300 \text{ }^\circ\text{C}$ elektrolytisch leiten zu können, wodurch eine messbare Spannung

zwischen Elektroden entsteht. Mit Umgebungsluft als Referenzgas wird der Sauerstoffpartialdruck im Abgasstrom bestimmt.

Der Gasanalysator wird vor dem Kultivierungsbeginn durch eine 1-Punkt-Kalibrierung mit Druckluft kalibriert.

4.4.4 Gelelektrophoretische Bestimmung der Produktkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration an Rab11a und GFP als intrazelluläres Protein wird mit einer reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Als Laufpuffer kommt ein Tris-Glycin-SDS-Puffersystem (10×Tris/Glycin/SDS, 1610772, Bio-Rad, München) bestehend aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3 zum Einsatz. Zur Proteinauftrennung werden 18 % Criterion™ TGX (*Tris-Glycine eXtended shelf life*) Stain-Free Fertiggele (5678074, Bio-Rad, München) verwendet. Weist das zu untersuchende Protein in seiner AS-Sequenz mehr als einen Tryptophanrest auf, kann auf eine Coomassie-Brillantblau G250-Färbung verzichtet werden. Trihaloverbindungen in der Gelmatrix interagieren mit Tryptophanresten in einer UV-induzierten Reaktion, was eine schnelle Fluoreszenzdetektion von Proteinen ohne Färbung ermöglicht. Das Fluoreszenzsignal wird mithilfe des Gel Doc EZ Imagers und dem Stain-Free Sample Tray (1708270 und 1708274, Bio-Rad, München) erfasst und digitalisiert.

Ab dem Induktionszeitpunkt genommene Biomassepellets (Berechnung des Probevolumens siehe 4.6.3.1) werden in 50 µl Lysepuffer (LP, Tab. 4-7) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Es folgen die Zugabe von 50 µl 2×SDS-Laemmli-Probenpuffer (LPP, Tab. 4-7) und Denaturierung bei 95 °C für 5 min und 350 min⁻¹ (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg).

Tab. 4-7: Zusammensetzung des SDS-LPP bestehend aus LP und 2×SDS-LPP.

Komponente	Hersteller	Konzentration/Anteil
LP, pH 8,5:		
NaCl	R 3957	150 mM
Tris	AE15	50 mM
Natriumdesoxycholat	R 3484	0,05 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	SA M7154	0,05 % (v/v)
2×SDS-LPP:		
4×LPP	Bio-Rad 1610747	50 %
2-Mercaptoethanol	SA M7154	5 %
Wasser		45 %

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden (10 – 20) µl Probe, 5 µl Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Bio-Rad, München) und

10 μl Massenstandards auf das Gel appliziert. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgt bei konstant 200 V mit einer Stromstärkenbegrenzung auf 250 mA bis zum Ausreten der Bromphenolblaulauffront.

4.4.4.1 Lösliches und unlösliches Zielprotein in Biomasseproben

Die nachfolgend beschriebene Methode zur Isolation der löslichen und unlöslichen Zielproteinfraktion basiert auf der bei Hoffmann und Rinas (2000) und Seeger et al. (1995) genannten Vorgehensweise und wurde an die hier vorhandenen technischen Gegebenheiten adaptiert. Biomassepellets (Berechnung des Probevolumens siehe 4.6.3.2) werden in 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (NPP), pH 7, vollständig resuspendiert. Das Zellmaterial wird anschließend mittels Ultraschall (LABSONIC® P, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) unter Verwendung einer 3 mm Schwingsonde aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgt für 3 min bei einer Schalleistungsdichte von 460 W cm^{-2} und einem Puls-Pausenverhältnis von $75 \% \text{ s}^{-1}$ auf Eis. Zur Abtrennung der löslichen von der unlöslichen Fraktion wird das Lysat 45 min bei 4°C und 20200 g zentrifugiert (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wird vollständig entnommen und im Verhältnis 1:2 mit 2 \times SDS-LPP (Tab. 4-7) gemischt. Ferner wird das Pellet in 250 μl 50 mM NPP, pH 7, resuspendiert und 250 μl 2 \times SDS-LPP zugeetzt. Denaturierung, Probenapplikation und elektrophoretische Trennung erfolgt im Anschluss, wie in 4.4.4 beschrieben.

4.4.4.2 Rab11a-Konzentration

Die Quantifizierung der HTT-Rab11a- und H-Rab11a-Konzentration erfolgt durch Kalibrierung mit Standards bekannter HTT-Rab11a-Masse.

HTT-Rab11a wird selbst fermentativ hergestellt und nach dem nachfolgend dargestellten Verfahren aufgereinigt und quantifiziert. Das dazu verwendete HTT-Rab11a Material stammt aus dem Batch BL21DE3pET0515. 0,5 g Biofeuchtmasse wird in 1,6 ml LP (Tab. 4-8) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert.

Tab. 4-8: Lysepuffer für die HTT-Rab11a Aufreinigung.

Komponente	Hersteller	Konzentration
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	R 4984	50 mM
NaCl	R 9265	300 mM
Imidazol	S 26081	10 mM
Lysozym	R 8259	1 g l ⁻¹

Anschließend wird das Lysat 10 min bei 15000 min^{-1} , 4°C zentrifugiert (*Multifuge* 3 S-R, Heraeus Instruments, Hannau). Der Überstand wird mit 400 μl einer 50 %-igen

Ni²⁺-NTA-Agarose Suspension (30210, Qiagen, Hilden) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wird 10 s bei 1000 g (MiniSpin® plus, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und dreimal mit 8 ml Waschpuffer (Tab. 4-9) gewaschen.

Tab. 4-9: Waschpuffer für die HTT-Rab11a Aufreinigung.

Komponente	Hersteller	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	R 4984	50 mM
NaCl	R 9265	300 mM
Imidazol	S 26081	20 mM

Zur Elution wird die Ni²⁺-NTA-Agarose in je 160 µl Elutionspuffer (Tab. 4-10) aufgenommen und erneut 10 s bei 1000 g zentrifugiert. Die Elution erfolgt in drei Fraktionen. Nach Überprüfung der Reinheit mittels SDS-PAGE dient die reinste Fraktion als Standardmaterial. Zur Stabilisierung des Standards wird das Eluat über einen Dialyseschlauch (Spectrum Spectra/Por®, Roth 2717, Karlsruhe) bei 4 °C gegen PBS umgepuffert.

Tab. 4-10: Elutionspuffer für die HTT-Rab11a Aufreinigung.

Komponente	Hersteller	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	R 4984	50 mM
NaCl	R 9265	300 mM
Imidazol	S 26081	250 mM

Mithilfe der bekannten Aminosäuresequenz wurde mit ExPASy der Extinktionskoeffizient bei 280 nm berechnet. Der Extinktionskoeffizient beträgt sowohl für HTT-Rab11a als auch für H-Rab11a $\epsilon = 23045 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Konzentrationsbestimmung der in PBS gelagerten HTT-Rab11a Stammlösung erfolgt photometrisch mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

Zur Erstellung der Kalibrierfunktion werden Massenstandards mit 1000, 500 und 250 ng je 10 µl⁻¹ verwendet und auf das Gel aufgetragen. Zur densitometrischen Quantifizierung werden die Stain-Free Fertiggele für 5 min bei 302 nm angeregt und das entstehende Fluoreszenzsignal mit einem CCD Detektor im Gel Doc EZ Imager aufgenommen. Die Auswertung erfolgt mit der Software Image Lab (Version 5.2.1, Bio-Rad, München). Die Hintergrundsubtraktion wird mit der Methode einer hypothetisch rollenden Scheibe durchgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wird nach Begrenzung des auszuwertenden Bereichs auf das größte und kleinste sichtbare wirtseigene Protein (oberste und unterste Bande im Gel) stets mit einer Scheibengröße von 99,9 mm gearbeitet.

4.4.4.3 GFP-Analyse

Zur Bestimmung der GFP-Konzentration mittels SDS-PAGE wird ein kommerziell erhältlicher rekombinanter GFP-Standard (MB-0752, Vector Laboratories, USA Burlington) verwendet. Digitalisierung und Quantifizierung erfolgt nach kolloidaler Coomassie-Brillantblau G250-Färbung unter Verwendung des White Trays (170-8272, Bio-Rad, München) im Gel Doc EZ Imager. Dazu wird im Anschluss an die Elektrophorese das Gel bei Raumtemperatur für (15 ± 2) h auf einem Horizontalschüttler (Assistant® 348/1, Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim v. d. Rhön) mit Färbelösung (Tab. 4-11) gefärbt und dreimal für 30 min mit 25 % Ethanol entfärbt.

Tab. 4-11: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Brillantblau G250-Färbelösung.

Komponente	Hersteller	Anteil / %
Roti®-Blue (5×Konzentrat)	R A152	10
Ethanol	R K928	40
Wasser		50

4.5 Statistische Versuchsplanung (SVP) mit MODDE®

4.5.1 Grundlagen der SVP

Die SVP ermöglicht die Untersuchung von Qualitätsmerkmalen y_i , wobei der Einfluss möglicher Faktoren x_i nach dem Konzept der simultanen Variation bestimmt wird. Nach Definition des Systems, bestehend aus zu untersuchenden Qualitätsmerkmalen und änderbaren Faktoren in einem definierten Arbeitsbereich, folgt die Erstellung von geeigneten Versuchsplänen. Die Auffindung einer optimalen und gleichzeitig robusten Arbeitsregion folgt typischerweise den drei Verfahrensschritten (I) Screening, (II) Optimierung und (III) Robustheitstest. Mit dem Screening soll bei möglichst geringem Arbeitsaufwand geklärt werden, welche Faktoren einen Einfluss auf die Qualitätsmerkmale haben und wo der angemessene Arbeitsbereich liegt. Im anschließenden Optimierungsschritt soll geklärt werden, welche Faktoreinstellungen für das Optimum eines Qualitätsmerkmals getroffen werden müssen oder ob ein Kompromiss zwischen Optima einzelner Qualitätsmerkmale zu schließen ist. Abschließend wird ein Akzeptanzbereich für die Variation der Faktoreinstellung festgelegt, in dem das Optimum des Qualitätsmerkmals nicht-signifikant beeinflusst wird und somit Robustheit gewährleistet wird.

Je nach Zielsetzung und Anzahl an Faktoren variiert der Versuchsplan. Gängige Designs sind voll- und teilfaktorielle, Central-Composite-, Plackett Burman, D-Optimal oder Rechtschaffner Versuchspläne. Aufgrund der ausschließlichen Verwendung von vollfaktoriellen Versuchsplänen, welche, wie in Abb. 4-5 dargestellt, auf zwei (A) oder drei (B) Stufen variiert werden, beschränkt sich die weitere Betrachtung auf diese. Vollfaktorielle Versuchspläne zeichnen sich durch Orthogonalität und Ausgewogenheit

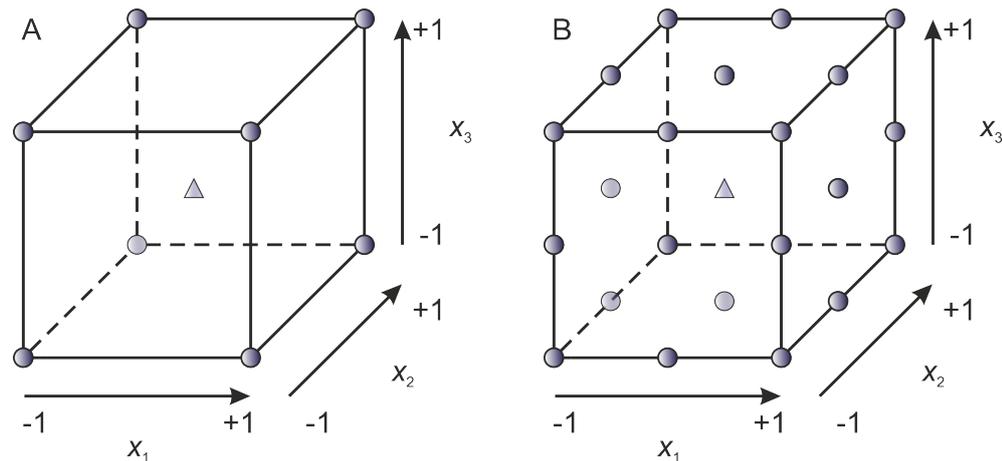


Abb. 4-5: Vollfaktorielle Versuchsdesigns in normierter Darstellungsform. Die Abbildung zeigt (A) einen zwei-stufigen und (B) einen dreistufigen vollfaktoriellen Versuchsplan. Einzelne Experimente sind durch einen Kreis symbolisiert und das im Versuchsraum zentral angeordnete Dreieck repräsentiert eine Dreifachbestimmung, den *Center Point CP*.

aus, wodurch die Wirkung der jeweiligen Faktoren isoliert voneinander untersucht werden kann. Orthogonal meint, dass die Einstellungsmuster der Faktoren unabhängig voneinander sind. Sortiert man einen beliebigen Faktor nach Faktorstufen und die Einstellungen aller übrigen Faktoren tauchen gleichmäßig verteilt auf, spricht man von einem ausgewogenen Versuchsplan. Generell erlauben vollfaktorielle Versuchspläne die Beschreibung von Faktorinteraktionen. Bei Variation auf drei Stufen können zusätzlich quadratische Zusammenhänge ausgemacht werden. Der Haupteffekt eines Faktors kann dabei als mittlere registrierte Änderung des Qualitätsmerkmals durch Einstellungswechsel von der unteren (-1) zur oberen Stufe (+1) beschrieben werden.

Nach der Erstellung des Versuchsplans folgt die randomisierte Durchführung aller vorgesehenen Experimente. Die Datenanalyse folgt drei prinzipiellen Schritten (I) Rohdatenanalyse, (II) Regressionsanalyse, Modellbildung und -interpretation und (III) Verwendung des Modells. (Siebertz et al. 2010; Eriksson et al. 2008)

4.5.2 Rohdatenanalyse

Zur Auswertung experimenteller Daten mit statistischen Methoden ist eine Normalverteilung der Messwerte vorteilhaft. Die Darstellung der Rohdaten in Histogrammen oder Box-Whisker-Plots dient hierbei als graphisches Hilfsmittel zur Überprüfung auf Normalverteilung. Dabei veranschaulicht die Schiefe die Art und Stärke der Asymmetrie einer Wahrscheinlichkeitsverteilung und hilft eine Messdatenverteilung mit der Normalverteilung zu vergleichen. Zu der auf der deskriptiven Statistik basierenden graphischen Beurteilung der Normalverteilung ist ein ergänzendes mathematisches Testverfahren, welches insbesondere bei der Überprüfung kleiner Stichproben ($n < 50$) eine hohe Teststärke aufweist, hilfreich. Hierzu wird der Test nach Shapiro und Wilk (1965) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 verwendet. Liegt keine Normalverteilung vor, kann eine Transformation der Messwerte erforderlich sein.

Des Weiteren müssen Rohdaten auf Ausreißer untersucht werden. Nach der Definition von Tukey kann dazu der Interquartilsabstand (IQR), also der Abstand zwischen dem unteren und oberen Quartil, genutzt werden. Werte, die mehr als $1,5 \cdot IQR$ vom oberen beziehungsweise unteren Quartil abweichen, werden als Ausreißer behandelt und außerhalb der Whisker im Box-Whisker-Plot dargestellt (Hoaglin 2003). Der Test nach Grubbs (1969) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 wird ergänzend zur Auffindung von Ausreißern verwendet. Voraussetzung für die Anwendung ist eine näherungsweise normalverteilte Stichprobe.

Die Rohdatenanalyse geschieht mit der Software OriginPro (Version 2016G, OriginLab Corp., Northampton USA).

4.5.3 Regressionsanalyse, Modellbildung und -interpretation

Zur Durchführung von Versuchen mittels SVP wird die Software MODDE® (Version Pro 11.0.1, Umetrics, Malmö, Schweden) verwendet. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Ziele mit der Anwendung der SVP verfolgt. Zum einen soll jeweils eine Modellgleichung für die Beschreibung der maximalen spezifischen Wachstumsrate und des Leucinausbeutekoeffizienten in Abhängigkeit der Leucin- und Glucosekonzentration ermittelt werden und zum anderen der Einfluss der Konzentration an Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid auf die Gesamtbio- und Produktmasse sowie die lösliche Zielproteinfraktion untersucht werden.

Nach der Rohdatenanalyse kann mittels multipler linearer Regression die Regressionsfunktion für beispielsweise den Leucinausbeutekoeffizienten

$$y_{X/Leu} = K_0 + K_1 c_{Leu} + K_2 c_{Glc} + K_{12} c_{Leu} c_{Glc} + K_{11} c_{Leu}^2 + K_{22} c_{Glc}^2 + \varepsilon \quad (4.4)$$

in Abhängigkeit der Leucin- und Glucosekonzentration berechnet werden. Diese kann lineare, Interaktions- und quadratische Modellterme aufweisen und erlaubt innerhalb des Versuchsraums für eine beliebige Faktoreinstellung die Vorhersage der Systemantwort.

Anfänglich enthält das Regressionsmodell zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Faktoren und Qualitätsmerkmalen alle Modellterme (lineare, quadratische, Interaktionsterme), unabhängig ob sie einen statistisch signifikanten oder nicht-signifikanten Effekt auf das Qualitätsmerkmal haben. Liegen nicht-signifikante Effekte vor, wird das Regressionsmodell von dem entsprechenden Modellterm bereinigt. Aufschluss darüber gibt die Darstellung des Vertrauensintervalls im Koeffizientenplot auf einem Signifikanzniveau von 0,05. Schließt dieses den Wert 0 ein, wie in Abb. 4-6 als rote Balken markiert, ist der Effekt des Modellterms als nicht-signifikant anzusehen. Die Anpassung erfolgt stets schrittweise beginnend bei Modelltermen höherer hin zu niedriger Ordnung. Beachtet werden muss, dass nicht-signifikante lineare Effekte (Haupteffekte), die signifikant in höheren Modelltermen auftreten, erhalten bleiben müssen.

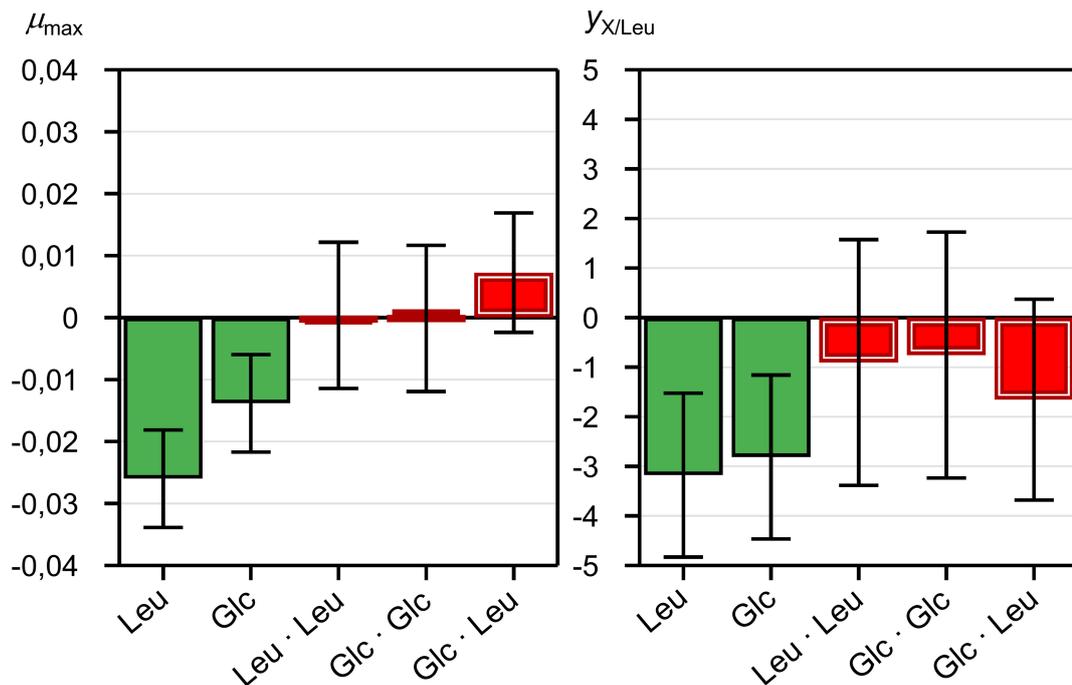


Abb. 4-6: Koeffizientendiagramm mit Angabe des Vertrauensintervalls auf einem Signifikanzniveau von 0,05. Anfängliches Regressionsmodell mit signifikanten (grün) und nicht-signifikanten (rot) Modelltermen.

Die Modellgüte wird anhand von Kenngrößen, welche auf Basis der Varianzanalyse gebildet werden, beurteilt. Eriksson et al. (2008) spezifizieren dazu die in Tab. 4-12 aufgeführten Kenngrößen.

Tab. 4-12: Kenngrößen zur Beurteilung der Güte von Regressionsmodellen (Eriksson et al. 2008).

Kenngröße	Beschreibung	Mindestanforderung
R^2	Bestimmtheitsmaß	> 0,50
Q^2	Vorhersagbarkeitsgüte	> 0,50
$R^2 - Q^2$	Differenz zwischen R^2 und Q^2	< 0,30
MV	Modellvalidität	> 0,25
ReP	Reproduzierbarkeit	> 0,50

Ist ein Regressionsmodell gefunden, wird dieses entweder zur Eingrenzung von Faktoreinstellungen für weiterführende Experimente oder zur Vorhersage des optimalen Arbeitsbereichs genutzt. (Siebertz et al. 2010; Eriksson et al. 2008)

4.6 Berechnungsgrundlagen

4.6.1 Zeitliche Prozesssteuerung

Die Prozesssteuerung der Varianten HCDC, iHCDC und i²HCDC in MFCS/win erfolgt zeitgesteuert durch Vorgabe der Zellkonzentration, die zu Beginn einer Phase i im

Reaktor vorliegt. Mit dem Ziel die Zeit zu berechnen, die benötigt wird, um eine vorgegebene Zelldichte zu erreichen, sollen nachfolgend die erforderlichen Gleichungen vorgestellt werden.

4.6.1.1 HCDC-Prozess mit Batch-Phase

Der HCDC-Prozess startet mit einem Medium, das Wachstum erlaubt. Ausgehend vom Volumen $V_{L0,0}$ beginnt die Batch-Phase mit $m_{\text{Glc}0,0} > 0$ und

$$m_{X0,0} = m_{X,\text{inoc}} \quad (4.5)$$

Das Wachstum in Phase 0 ohne lag-Phase mit durchgängig μ_{max} ist exponentiell

$$m_{X,0}(t_{F,0} \leq t \leq t_{F,1}) = m_{X0,0} e^{\mu_{\text{max}}(t-t_{F,0})} \quad (4.6)$$

Diese Wachstumsphase endet mit dem Verbrauch der im Startmedium vorgelegten Glucose bei $m_{X0,1}$, dem Startwert für die nachfolgende Fed-Batch-Phase 1 bei $t_{F,1}$. Die Biomasse ist aus $m_{\text{Glc}0,0}$ entstanden. Ein Teil ist allerdings für Erhaltungsstoffwechsel verbraucht worden, sodass für die Biomasse am Ende der Batch-Phase gilt

$$m_{X0,1} = m_{X0,0} + y_{X/\text{Glc}} m_{\text{Glc}0,0} \quad (4.7)$$

Aus (4.6) und (4.7) folgt unter Berücksichtigung der Zeitspanne Δt_0 , welche für den Abbau von Acetat aus der Batch-Phase genutzt wird,

$$t_{F,1} = t_{F,0} + \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \ln \left(1 + \frac{y_{X/\text{Glc}} m_{\text{Glc}0,0}}{m_{X0,0}} \right) + \Delta t_0 \quad (4.8)$$

Mit (3.13), also der Auftrennung des Glucoseausbeutekoeffizienten in einen wachstumsbezogenen und einen Verbrauchsterm für Erhaltungsstoffwechsel, kann aus (4.8) mit der Anfangsglucosekonzentration $c_{\text{Glc}0,0}$ in der Suspension nach Inokulation das Ende der Batch-Phase berechnet werden

$$t_{F,1} = t_{F,0} + \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \ln \left(1 + \frac{\mu_{\text{max}} y_{X/\text{Glc}g,0} c_{\text{Glc}0,0}}{\mu_{\text{max}} + q_{\text{Glc}/Xm,0} y_{X/\text{Glc}g,0} c_{X0,0}} \right) + \Delta t_0 \quad (4.9)$$

4.6.1.2 iHCDC und i²HCDC mit sofortiger Nachfütterung nach Inokulation

Bei den Prozessvarianten iHCDC und i²HCDC findet zwischen Inokulation und Nachfütterungsbeginn kein Wachstum statt. Die Phase mit dem Index $i = 0$ ist also eine Fed-Batch-Phase, deren Startwerte den Index 0 tragen.

Soll in der Fed-Batch-Phase 0 eine bestimmte Biomasse erreicht werden, die als Startwert für die nachfolgende Fed-Batch-Phase 1 $m_{X0,1}$ heißt, folgt durch Integration von (3.4)

$$m_{X0,1} = m_{X0,0} e^{\mu_{\text{set},0} (t_{F,1} - t_{F,0})} \quad (4.10)$$

oder aus der optischen Dichte mit dem Umrechnungsfaktor $f_{X/OD}$ und dem Kulturvolumen $V_{L0,1}$ berechnet

$$\Delta OD_{600,0,1} f_{X/OD} V_{L0,1} = c_{X0,1} V_{L0,1} = c_{X0,0} V_{L0,0} e^{\mu_{\text{set},0} (t_{F,1} - t_{F,0})} \quad (4.11)$$

Für das bis zu diesem Zeitpunkt im Reaktor befindliche Kulturvolumen $V_{L0,1}$ gilt

$$V_{L0,1} = V_{L0,0} + (1 + f_B) \int_{t_{F,0}}^{t_{F,1}} F_R(t) dt \quad (4.12)$$

Berücksichtigt wird also die zum Startvolumen bis dahin dosierte glucosehaltige Feedlösung und das dazu proportionale Volumen an Base. Durch Proben entnommene Volumina werden als hinreichend klein angesehen und an dieser Stelle nicht berücksichtigt.

Für exponentielles Wachstum muss die Feedlösung exponentiell dosiert werden. Aus (3.7) wird

$$F_R(t_{F,0} \leq t \leq t_{F,1}) = \frac{1}{c_{\text{GlcR}}} \left(\frac{\mu_{\text{set},0}}{y_{X/\text{Glc},0}} + q_{\text{Glc}/X_{m,0}} \right) m_{X0,0} e^{\mu_{\text{set},0} (t - t_{F,0})} \quad (4.13)$$

und mit der Nachfütterungsrate zu Phasenbeginn

$$F_{R0,0} = F_R(t_{F,0}) = \frac{1}{c_{\text{GlcR}}} \left(\frac{\mu_{\text{set},0}}{y_{X/\text{Glc},0}} + q_{\text{Glc}/X_{m,0}} \right) m_{X0,0} \quad (4.14)$$

folgt

$$F_R(t_{F,0} \leq t \leq t_{F,1}) = F_{R0,0} e^{\mu_{\text{set},0} (t - t_{F,0})} \quad (4.15)$$

Aus (4.12) und (4.15) wird

$$V_{L0,1} = V_{L0,0} + (1 + f_B) F_{R0,0} \int_{t_{F,0}}^{t_{F,1}} e^{\mu_{\text{set},0} (t - t_{F,0})} dt \quad (4.16)$$

und nach Integration folgt

$$V_{L0,1} = V_{L0,0} + \frac{(1 + f_B) F_{R0,0}}{\mu_{\text{set},0}} \left(e^{\mu_{\text{set},0} (t_{F,1} - t_{F,0})} - 1 \right) \quad (4.17)$$

Aus (4.11) und (4.17) ergibt sich somit

$$c_{X0,1} \left(V_{L0,0} + \frac{(1+f_B) F_{R0,0}}{\mu_{set,0}} \left(e^{\mu_{set,0} (t_{F,1} - t_{F,0})} - 1 \right) \right) = c_{X0,0} V_{L0,0} e^{\mu_{set,0} (t_{F,1} - t_{F,0})} \quad (4.18)$$

Auflösen nach $e^{\mu_{set,0} (t_{F,1} - t_{F,0})}$ liefert

$$\frac{c_{X0,1} (V_{L0,0} \mu_{set,0} - (1+f_B) F_{R0,0})}{c_{X0,0} V_{L0,0} \mu_{set,0} - (1+f_B) F_{R0,0} c_{X0,1}} = e^{\mu_{set,0} (t_{F,1} - t_{F,0})} \quad (4.19)$$

und nach Logarithmieren und Auflösen nach $t_{F,1}$ folgt

$$t_{F,1} = t_{F,0} + \frac{1}{\mu_{set,0}} \ln \frac{c_{X0,1} (V_{L0,0} \mu_{set,0} - (1+f_B) F_{R0,0})}{c_{X0,0} V_{L0,0} \mu_{set,0} - (1+f_B) F_{R0,0} c_{X0,1}} \quad (4.20)$$

oder mit $c_{X0,i} = f_{X/OD} \Delta OD_{600\ 0,i}$ und $F_{R0,0}$ aus (4.14)

$$t_{F,1} = t_{F,0} + \frac{1}{\mu_{set,0}} \ln \frac{\frac{\mu_{set,0} Y_{X/Glc,0} C_{GlcR}}{f_{X/OD} \Delta OD_{600\ 0,0}} - (1+f_B) (\mu_{set,0} + Y_{X/Glc,0} q_{Glc/Xm,0})}{\frac{\mu_{set,0} Y_{X/Glc,0} C_{GlcR}}{f_{X/OD} \Delta OD_{600\ 0,1}} - (1+f_B) (\mu_{set,0} + Y_{X/Glc,0} q_{Glc/Xm,0})} \quad (4.21)$$

Allgemein lässt sich das Ende einer i -ten Fed-Batch-Phase mit

$$t_{F,i+1} = t_{F,i} + \frac{1}{\mu_{set,i}} \ln \frac{\frac{\mu_{set,i} Y_{X/Glc,i} C_{GlcR}}{f_{X/OD} \Delta OD_{600\ 0,i}} - (1+f_B) (\mu_{set,i} + Y_{X/Glc,i} q_{Glc/Xm,i})}{\frac{\mu_{set,i} Y_{X/Glc,i} C_{GlcR}}{f_{X/OD} \Delta OD_{600\ 0,i+1}} - (1+f_B) (\mu_{set,i} + Y_{X/Glc,i} q_{Glc/Xm,i})} \quad (4.22)$$

berechnen. Das ist immer dann von Bedeutung, wenn Prozessschritte zeitgesteuert beginnen oder enden.

4.6.2 Berechnung der Sauerstoffaufnahme, Kohlenstoffdioxidbildungsrate und des Respirationsquotienten

Die durch die Mikroorganismen aufgenommene Sauerstoffmenge kann mithilfe einer Inertgasbilanz für Sauerstoff im Reaktionssystem nach folgender Gleichung bestimmt werden

$$Q_{O_2} = \frac{F_{Gin} M_{O_2} x_{O_2in} (1 - x_{CO_2out}) - x_{O_2out} (1 - x_{CO_2in})}{V_L V_m (1 - x_{O_2out} - x_{CO_2out})} \quad (4.23)$$

Analog gilt für die Kohlenstoffdioxidbildungsrate

$$Q_{CO_2} = \frac{F_{Gin} M_{CO_2} x_{CO_2out} (1 - x_{O_2in}) - x_{CO_2in} (1 - x_{O_2out})}{V_L V_m (1 - x_{O_2out} - x_{CO_2out})} \quad (4.24)$$

Für die eingangsseitige Gesamtbeegasungsrate F_{Gin} gilt

$$F_{\text{Gin}} = F_{\text{air}} + F_{\text{O}_2} \quad (4.25)$$

Bei gleichzeitiger Sauerstoff- und Druckluftbeegasung folgt für den Stoffmengenanteil an Sauerstoff

$$x_{\text{O}_2\text{in}} = \frac{F_{\text{air}} \cdot 0,2097 + F_{\text{O}_2}}{F_{\text{Gin}}} \quad (4.26)$$

und Kohlenstoffdioxid in der Reaktorzuluft

$$x_{\text{CO}_2\text{in}} = \frac{F_{\text{air}} \cdot 0,0004}{F_{\text{Gin}}} \quad (4.27)$$

Durch Integration der Gleichungen (4.23) beziehungsweise (4.24) kann die verbrauchte Sauerstoffmenge im Reaktionsvolumen

$$\frac{m_{\text{O}_2}}{V_L} = \int_{t_0}^t Q_{\text{O}_2} dt \quad (4.28)$$

sowie die produzierte Kohlenstoffdioxidmenge im gleichen Volumen

$$\frac{m_{\text{CO}_2}}{V_L} = \int_{t_0}^t Q_{\text{CO}_2} dt \quad (4.29)$$

berechnet werden.

Der Quotient aus Kohlenstoffdioxidbildungs- und Sauerstoffaufnahme unter Berücksichtigung der jeweiligen molaren Masse ergibt den Respirationsquotienten RQ

$$RQ = \frac{Q_{\text{CO}_2} M_{\text{O}_2}}{M_{\text{CO}_2} Q_{\text{O}_2}} \quad (4.30)$$

4.6.3 Berechnung der Produktkonzentration nach gelelektrophoretischer Quantifizierung

4.6.3.1 Gesamtproduktkonzentration aus Kultivierungsproben

Zur Berechnung des Produktgehalts in der Kultursuspension wird ein auf die Zellkonzentration bezogenes Volumen mit

$$V_s = \frac{180 \mu\text{l}}{\Delta OD_{600}} \quad (4.31)$$

dem Reaktor entnommen. Die im Reaktor befindliche Konzentration c_{Prod} mit den Produkten HTT-Rab11a, H-Rab11a oder GFP kann aus der Produktmasse in der Bande des Elektrophoresegels, als $m_{\text{Prod}w}$ quantifiziert, berechnet werden

$$c_{\text{Prod}} = (m_{\text{Prod}w} - m_{\text{Prod}0w}) \frac{V_{\text{LPP}} + V_{\text{LP}}}{V_s V_w} \quad (4.32)$$

$m_{\text{Prod}0w}$ stellt dabei die zum Induktionszeitpunkt vorhandene Proteinmenge dar und wird als vermeintlich Hostprotein abgezogen. Die verschiedenen Volumina berücksichtigen Verdünnungseffekte bei der Probenbehandlung.

4.6.3.2 Berechnung der Konzentration der löslichen und unlöslichen Zielproteinfraktion in Biomasseproben

Zur Berechnung der Konzentration an löslichem und unlöslichem Produkt in der Kultursuspension wird ein auf die Zellkonzentration bezogenes Volumen mit

$$V_s = \frac{4500 \mu\text{l}}{\Delta OD_{600}} \quad (4.33)$$

dem Reaktor entnommen. Die Berechnung der Produktkonzentration erfolgt analog zur Gleichung (4.32) mit dem eingesetzten Volumen an Natriumphosphatpuffer V_{NPP} anstatt des Lysepuffervolumens V_{LP}

$$c_{\text{Prod}} = (m_{\text{Prod}w} - m_{\text{Prod}0w}) \frac{V_{\text{LPP}} + V_{\text{NPP}}}{V_s V_w} \quad (4.34)$$

4.6.3.3 Berechnung der zellspezifischen Produktbildungsrate

Zur Bestimmung der zellspezifischen Produktbildungsrate wird der zeitliche Verlauf der Produktmasse durch eine Polynomfunktion (maximal vierten Grades) beschrieben. Allgemein gilt für diese leicht differenzierbare Funktion

$$m_{\text{Prod}}(t) = \sum_{i=0}^n K_i t^i \quad (4.35)$$

Aus $\frac{dm_{\text{Prod}}(t)}{dt}$ wird die zellspezifische Produktbildungsrate

$$q_{\text{Prod}/X}(t) = \frac{1}{m_X(t)} \frac{dm_{\text{Prod}}(t)}{dt} \quad (4.36)$$

berechnet.

4.6.4 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate

Eine semi-logarithmische Darstellung der Biomasse m_x gegen die Zeit zeigt einen linearen Zusammenhang für eine phasenweise konstante spezifische Wachstumsrate. Die Steigung der Regressionsgerade entspricht dabei der durchschnittlichen tatsächlichen spezifischen Wachstumsrate in der jeweiligen Prozessphase.

4.6.5 Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten und spezifischen Reaktionsraten verschiedener Substrate und Metabolite

Durch Auftragung der erzeugten Biomasse als Funktion der verbrauchten beziehungsweise gebildeten Masse an Substrat oder Metaboliten m_j wird der Ausbeutekoeffizient $y_{x/j}$ als die Steigung der linearen Regressionsfunktion bestimmt, wie Abb. 4-7 beispielhaft für die Biomasseausbeute aus Glucose zeigt. In der vorliegenden Arbeit wird die Biomasseausbeute aus Glucose vereinfacht als Glucoseausbeutekoeffizient bezeichnet. Diese Nomenklatur gilt für jedes Substrat j .

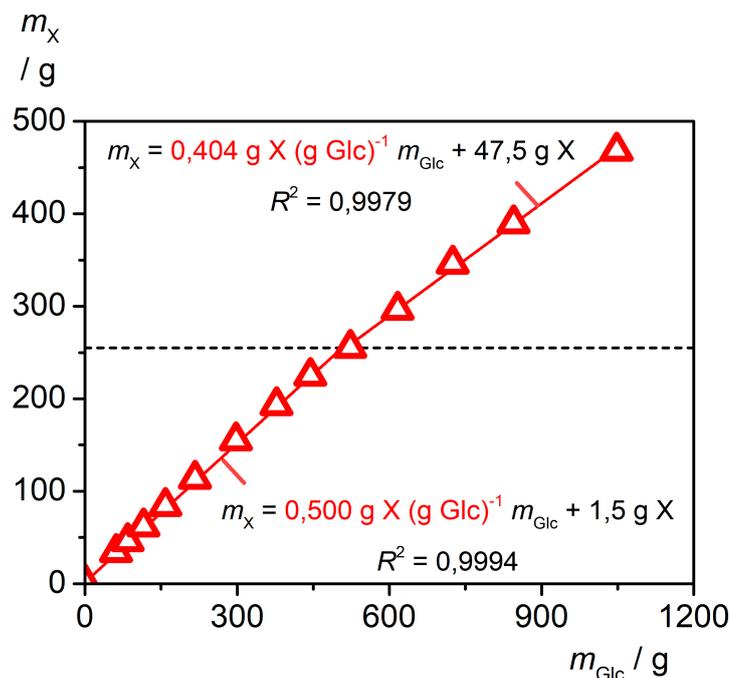


Abb. 4-7: Abschnittsweise Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten mittels linearer Regressionsanalyse. Die Bestimmung des Ausbeutekoeffizienten ist beispielhaft für die Biomasseausbeute aus Glucose $y_{X/Glc}$ mit Daten aus dem Batch BL210314 gezeigt. Die in Rot gekennzeichnete Zahl inklusive Einheit entspricht hierbei dem Ausbeutekoeffizienten. Der Ordinatenabschnitt des unteren Bereichs gibt die Biomasse zu Beginn der Kultivierung an.

Bei Kenntnis der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate in einer Prozessphase kann die zellspezifische Reaktionsrate

$$q_{j/X} = \frac{\mu}{y_{X/j}} \quad (4.37)$$

für das Substrat j phasenweise berechnet werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Optimierung der Startphase der Hochzelldichte-Kultivierung – iHCDC

Die Weiterentwicklung des zu Beginn der 1990er Jahre etablierten HCDC-Prozesses (Riesenberg et al. 1991) resultiert in einer Strategie, welche die Substitution der initialen Batch-Phase durch eine Fed-Batch-Phase vorsieht. Die Überlegung zum theoretischen Ablauf des als *improved High Cell Density Cultivation (iHCDC)* bezeichneten Prozesses, ist in Abb. 5-1 dargestellt. Nach der Inokulation startet die Kultivierung mit einer Fed-Batch-Phase 0 zur Erzeugung von Biomasse mit möglichst hoher Raum-Zeit-Ausbeute. Als Kriterium muss hierbei erfüllt sein, dass die eingestellte spezifische Wachstumsrate kleiner als die für Acetatbildung kritische ist. Dieser anfänglichen Fed-Batch-Phase 0 schließt sich die Fed-Batch-Phase 1 mit reduzierter spezifischer Wachstumsrate an. Sie dient der Adaption der wachsenden Kultur an die Produktbildung, hier bezeichnet als Fed-Batch-Phase 2. Die Prozessstrategie ist durch dauerhafte Substratlimitierung gekennzeichnet. Durch Vorgabe der spezifischen Wachstumsrate in jeder Wachstumsphase gewinnt der Prozess an Plan- und Kontrollierbarkeit und erlaubt die Eliminierung der in 3.5 beschriebenen Probleme, welche mit der Batch-Phase assoziiert sind.

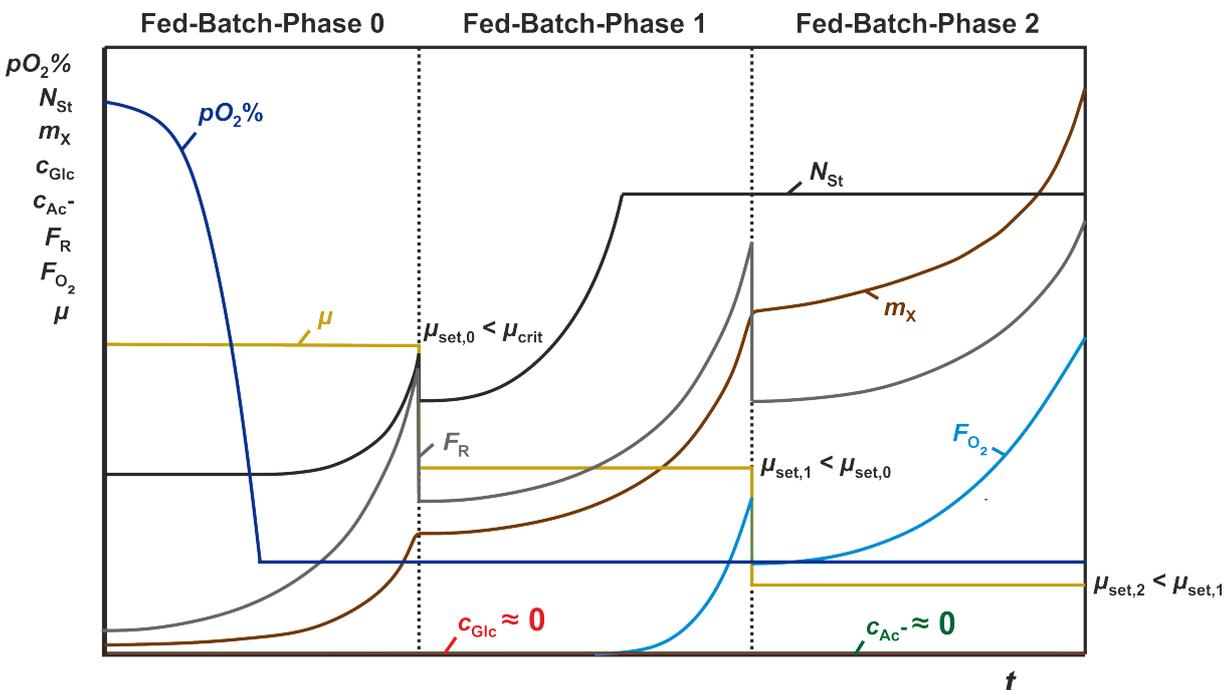


Abb. 5-1: Theoretischer Verlauf einer iHCDC. Der Prozess unterteilt sich in drei Fed-Batch-Phasen mit einem exponentiellen Nachfütterungsprofil. Prozessgrößen: Gelöstsauerstoffkonzentration $pO_2\%$, Rührerdrehzahl N_{St} , Biomasse m_x , Glucosekonzentration c_{Glc} , Acetatkonzentration c_{Ac^-} , Nachfütterungsrate der Feedlösung F_R , Sauerstoffbegasungsrate F_{O_2} sowie die spezifische Wachstumsrate μ .

5.1.1 Vergleich der klassischen Hochzelldichte-Kultivierung mit der iHCDC

Zur Optimierung der Startphase der Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli* wurde ein Vergleich zwischen der klassischen HCDC und der in 5.1 skizzierten iHCDC angestellt. *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a wurde dazu in zwei 5 l BIOSTAT® CT Rührkesselreaktoren ohne Induktion der HTT-Rab11a Expression kultiviert. Die Reaktoren sind in Versuchsanlagen mit minimalen Unterschieden in der Ausstattung bezüglich Mess- und Automatisierungssystemen (siehe 4.3.2) integriert.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Versuchsanlagen besteht in der pO₂-Kaskadenregelung. Im CT(A) wird bei konstanter Druckluftbegasung und Erreichen von N_{Stmax} die Zuluft additiv über einen Massendurchflussregler mit Sauerstoff angereichert. Daraus resultiert eine kontinuierliche Änderung der Gesamtbegasungsrate F_{Gin} . Der BIOSTAT® CT(B) verfügt über einen Massendurchflussregler für Druckluft. F_{Gin} wird stufenweise von 3 l min⁻¹ auf 4,5 l min⁻¹ in Fed-Batch-Phase 1 und auf 6 l min⁻¹ in Fed-Batch-Phase 2 erhöht. Nachdem N_{Stmax} erreicht ist, schaltet ein Dreiwegeventil zwischen Luft- und Sauerstoffbegasung um, wobei die Pulsdauer vom pO₂-Regler vorgegeben wird.

5.1.1.1 Wachstumsverhalten und Plasmidstabilität von *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a

Zum Vergleich der Prozessstrategien wurden beide Verfahren in einen dreiphasigen Prozess unterteilt. Kultivierungen nach dem HCDC-Verfahren starteten mit einer initialen Batch-Phase mit $c_{Glc,0} = 25 \text{ g l}^{-1}$. Nach vollständigem Verbrauch der Glucose folgte die Fed-Batch-Phase 1 mit $\mu_{set} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ bis zum Erreichen von $\Delta OD_{600} = 180$. Die Fed-Batch-Phase 2 mit $\mu_{set} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ wurde bis zum vollständigen Verbrauch der Feedlösung ($V_{Feed} = 1,5 \text{ l}$) mit einer Glucosekonzentration von $c_{GlcR} = 700 \text{ g l}^{-1}$ fortgesetzt. Im Vergleich dazu, wurde beim iHCDC-Verfahren die Fed-Batch-Phase 0 mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,30 \text{ h}^{-1}$ bei $t = 0 \text{ h}$ gestartet. Der Übergang in die Fed-Batch-Phase 1 erfolgte beim Erreichen von $\Delta OD_{600} = 80$. Die Einstellung der spezifischen Wachstumsrate in den Fed-Batch-Phasen 1 und 2 sowie der Übergang in die Fed-Batch-Phase 2 erfolgten analog zur HCDC. Als Prozessende wurde ebenfalls der vollständige Verbrauch der Feedlösung mit einer Glucosekonzentration von hier 750 g l^{-1} definiert. In beiden Prozessvarianten wird so die gleiche Gesamtglucosemasse eingesetzt.

Die Abb. 5-2 zeigt den typischen Verlauf einer Kultivierung mit *E. coli* BL21 (DE3) nach dem HCDC-Verfahren mit exponentieller *open-loop* Nachfütterung der Feedlösung in den Fed-Batch-Phasen 1 und 2. In der Batch-Phase wuchs die Kultur unlimitiert mit der vom Medium und Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Glucosekonzentration, pH, Gelöstsauerstoffkonzentration, u. a.) abhängigen maximalen spezifischen Wachstumsrate von $0,48 \text{ h}^{-1}$ bis zum vollständigen Glucoseverbrauch nach 7,53 h, gekennzeichnet durch den steilen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration. Bei anfänglich

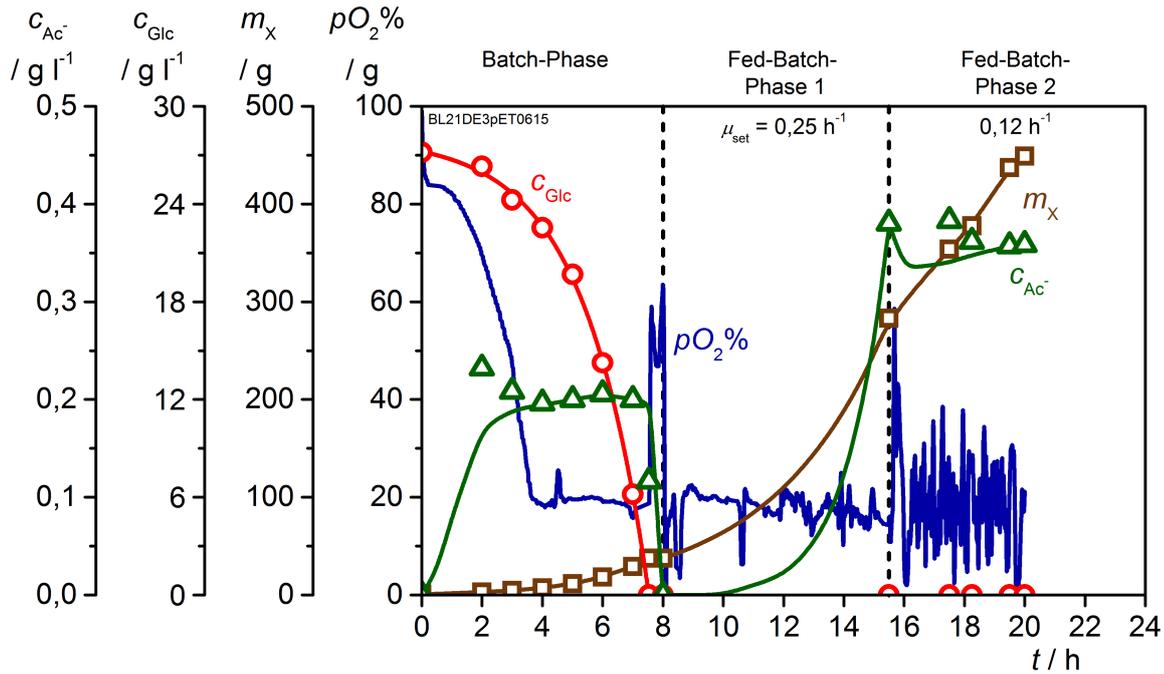


Abb. 5-2: HCD-Process mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a ohne Zielproteinexpression. Messwerte der Gelöstsauerstoffkonzentration wurden geglättet (Savitzky-Golay Methode, Schrittweite 50). Nicht detektierte beziehungsweise unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG) befindliche Glucose- und Acetatwerte wurden gleich Null gesetzt. Die angegebenen Werte für die Biomasse im Reaktor berücksichtigen die mit vorhergehenden Probenahmen entnommenen Biomassemengen. Die grün-linierte Acetatkonzentration spiegelt den zu erwartenden Verlauf wider und ist aus weiteren HCDs abgeleitet.

konstanter Rührerdrehzahl sank die Gelöstsauerstoffkonzentration ausgehend vom Sättigungszustand von 100 %, bedingt durch den steigenden Sauerstoffbedarf der wachsenden Kultur. Beim Unterschreiten von $pO_2\% = 20\%$ wurde der pO_2 -Regler aktiv und die Rührerdrehzahl auf $N_{St} = 950\ min^{-1}$ bis zum Verbrauch der Anfangsglucosemasse fortlaufend erhöht.

Trotz strikt aerober Kultivierung akkumuliert etwas Acetat, charakteristisch für die Batch-Phase. Für *E. coli* beträgt die kritische Sauerstoffkonzentration für aerobes Wachstum bei einer Temperatur von 37,8 °C laut Finn (1954) 0,26 $mg\ O_2\ l^{-1}$. Stolper et al. (2010) konnten sogar zeigen, dass die kritische Konzentration noch zwei bis drei Größenordnungen darunterliegt, sodass bei dem eingestellten Sollwert von 20 % eine Sauerstofftransportlimitierung definitiv auszuschließen ist. Stattdessen sekretiert der Organismus Acetat in der Batch-Phase infolge des Überflussmetabolismus bei überschüssigem Glucoseangebot. Im Vergleich zu *E. coli* K12 TG1 mit $c_{Ac^-} = 1\ g\ l^{-1}$ bei einer Temperatur von 28 °C (Korz 1993) ist die Acetatbildung hier mit 0,21 $g\ l^{-1}$ signifikant geringer, wie es für *E. coli* BL21 (DE3) zu erwarten ist (siehe hierzu 3.5.1). Durch Assimilation des entstandenen Acetats fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration zunächst wieder ab, ehe nach vollständiger Metabolisierung der zweite pO_2 -Anstieg folgte. Ein weiterer Zuwachs der Biomasse konnte in dieser Phase nicht beobachtet werden. Der zweite steile Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration ($pO_2\% \geq 25\%$) wurde mit weiteren Größen ($pH \geq 6,67$, $N_{St} \leq 650\ min^{-1}$, $t \geq 5\ h$) als Trigger für das Ende der Batch-Phase genutzt.

Mit $0,27 \text{ h}^{-1}$ in Fed-Batch-Phase 1 lag die tatsächliche leicht oberhalb der eingestellten spezifischen Wachstumsrate. Am Ende der ersten Fed-Batch-Phase betrug die Acetatkonzentration $0,38 \text{ g l}^{-1}$. Bei $\Delta OD_{600} = 187$ beginnt die Fed-Batch-Phase 2, gekennzeichnet durch den unmittelbaren Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration aufgrund der starken Reduktion der spezifischen Wachstumsrate. Bedingt durch die Reduktion der spezifischen Wachstumsrate, wird bereits gebildetes Acetat wieder dem Citratzyklus zur Verfügung gestellt und die Konzentration nimmt leicht ab. In der letzten Phase wurde die vorgegebene spezifische Wachstumsrate mit $0,10 \text{ h}^{-1}$ nicht mehr gehalten, was für eine Änderung im wachstumsabhängigen Glucoseausbeutekoeffizienten $y_{X/\text{Glcg}}$ sowie den für Erhaltungsstoffwechsel erforderlichen Anteil q_{Glc/X_m} spricht. Starke Schwankungen in der Gelöstsauerstoffkonzentration in der letzten Phase können auf fortwährende Antischaummittelzugabe und Änderungen der rheologischen Eigenschaften der Kultursuspension zurückgeführt werden. Des Weiteren wird die pO_2 -Regelung durch den für diese Reaktorgröße zu groß dimensionierten Sauerstoffmassenstromregler beeinträchtigt. Innerhalb von 20 h wurden insgesamt 449 g Biomasse erzeugt und die Acetatkonzentration stieg auf finale $0,36 \text{ g l}^{-1}$ an, sodass nicht von einer Inhibierung durch Acetat auszugehen ist.

Die iHCDC (Abb. 5-3) verzichtet auf die anfängliche Batch-Phase und beginnt in Fed-Batch-Phase 0 mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,31 \text{ h}^{-1}$ bei Glucose-limitiertem Wachstum. Bei $t = 15,2 \text{ h}$ erfolgte zeitgesteuert der Übergang in Fed-Batch-Phase 1, in der die Kultur bis zum Erreichen von $\Delta OD_{600} = 176$ mit $0,25 \text{ h}^{-1}$ wuchs. In

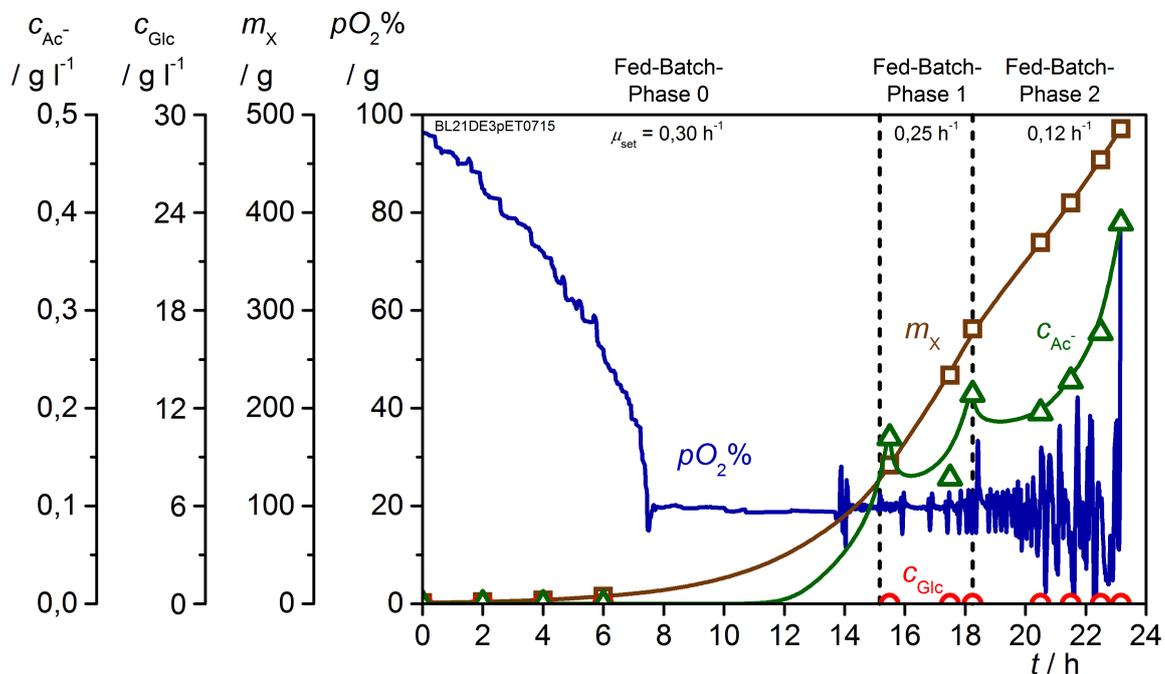


Abb. 5-3: iHCDC-Prozess mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a ohne Zielproteinexpression. Messwerte der Gelöstsauerstoffkonzentration wurden geglättet (Savitzky-Golay Methode, Schrittweite 50). Nicht detektierte beziehungsweise unterhalb der Bestimmungsgrenze befindliche Glucose- und Acetatwerte wurden gleich Null gesetzt. Die angegebenen Werte für die Biomasse im Reaktor berücksichtigen die mit vorhergehenden Probenahmen entnommenen Biomassemengen. Die grüne Verbindungslinie der Acetatmesswerte entspricht dem Verlauf, der sich aus einer Vielzahl von Kultivierungen ergibt.

der letzten Wachstumsphase konnte konstantes Wachstum mit $0,11\text{h}^{-1}$ beobachtet werden, was dazu führte, dass nach 23,2 h und vollständigem Verbrauch von 1125 g Glc eine kumulierte Biomasse (einschließlich mit Proben entnommener) von 486 g erreicht wurde. Die tatsächliche spezifische Wachstumsrate entspricht μ_{set} . Mit einer Glucosekonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lag somit durchgängig limitiertes Wachstum vor.

Ausgehend vom Sättigungszustand bei 100 %, fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration entsprechend des Bedarfs der wachsenden Kultur bis nach 7,5 h die pO_2 -Regelung aktiviert und auf 20 % gehalten wurde. Bedingt durch die Reduktion der spezifischen Wachstumsrate, konnte beim Übergang in die jeweils nachfolgende Fed-Batch-Phase ein sprunghafter Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden, welcher umgehend durch den Regler kompensiert wurde. Insbesondere in der Fed-Batch-Phase 2 konnte die Gelöstsauerstoffkonzentration aufgrund kontinuierlicher Änderungen der Regelstrecke (Viskositätsanstieg, Entschäumerdosierung) nicht konstant gehalten werden, wie weiter oben bereits diskutiert.

Analysen über die ersten 6 h der Kultivierung zeigen keine Acetatbildung, aber die Konzentration von $0,17\text{g l}^{-1}$ zu Beginn der Fed-Batch-Phase 1 ist nur mit der Bildung zum Ende der ersten Phase zu erklären. Nach kurzem Absinken war sowohl in Fed-Batch-Phase 1 als auch 2 ein Anstieg der Acetatkonzentration zu beobachten, der am Prozessende $c_{\text{Ac}^-} = 0,39\text{g l}^{-1}$ zeigt. Der Acetatabfall nach Verminderung der spezifischen Wachstumsrate spricht auch hier für die unmittelbare Wiederverwertung über den Glyoxylatzyklus. Die Akkumulation von Acetat im späten Verlauf der Kultivierung ist ein Resultat zunehmender Biomasse und der damit verbunden vermehrten Kohlenstoffdioxidbildung und -konzentrationen im Medium. Auch wenn im Bereich $(0,36 - 0,39)\text{g l}^{-1}$ am Prozessende keine Inhibierung durch Acetat zu erwarten ist, deutet der vergleichsweise frühe Anstieg in Fed-Batch-Phase 0 und 1 auf Wachstum in Nähe der kritischen spezifischen Wachstumsrate in beiden Phasen hin, sodass selbst mit einem *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a relativ hohe Acetatkonzentrationen erreicht werden. Zum Vergleich übersteigt bei Korz (1993), wo im Anschluss an die Batch-Phase $\mu_{\text{set}} \leq 0,11\text{h}^{-1}$ eingestellt wurde, die Acetatkonzentration mit *E. coli* K12 TG1 einen Wert von $0,1\text{g l}^{-1}$ nicht.

Abb. 5-4 (A) und (B) zeigen den zur Biomasse korrespondierenden Verlauf der Lebendkeimzahlkonzentration im HCDC- respektive iHCDC-Prozess. Nach Inokulation stieg die Lebendkeimzahl im HCDC-Prozess exponentiell von $7,7 \cdot 10^8$ auf $3,7 \cdot 10^{11}$ KBE ml^{-1} und im iHCDC-Prozess von $9,5 \cdot 10^8$ auf $4,2 \cdot 10^{11}$ KBE ml^{-1} . Dabei betrug der Anteil an plasmidhaltigen Zellen in jeweils zwei Kultivierungen mit der HCDC- und iHCDC-Strategie (Abb. 5-4 (C) und (D)) mindestens 73 %. Über die gesamte Prozessdauer konnte keine Plasmidsegregation beobachtet werden. Erstaunlich ist hingegen, dass trotz des Selektionsdrucks in der Vorkultur kein Plasmidgehalt von 100 % zu Beginn der Kultivierungen vorliegt. Da plasmidfreie Zellen jedoch häufig einen Selektionsvorteil mit höheren Wachstumsraten (Rosano und Ceccarelli 2014)

gegenüber plasmidhaltigen Zellen zeigen, wäre ein Überwachsen der Kultur mit unerwünschten, nicht-produktionsfähigen Zellen wahrscheinlich. Da dies nicht beobachtet wurde, kann unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Messdaten eher von einer vollständig plasmidhaltigen Population ausgegangen werden.

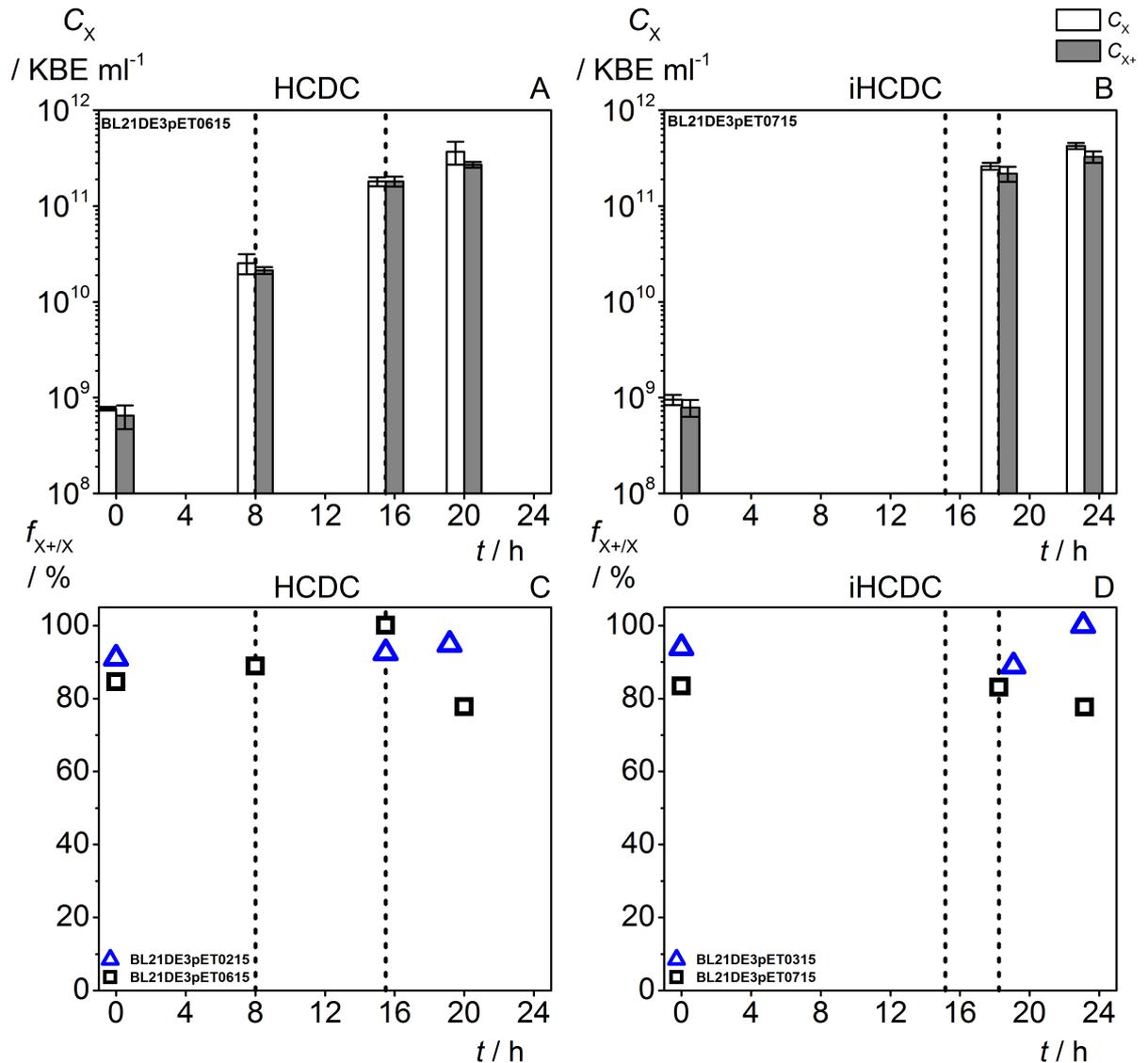


Abb. 5-4: Plasmidstabilitätsstudie bei den Prozessstrategien HCDC (A) und (C) sowie iHCDC (B) und (D). Für je zwei Kultivierungen ist aus den Daten der Lebendkeimzahlbestimmung der Anteil plasmidhaltiger Zellen berechnet worden und als Mittelwert aus Dreifachbestimmungen angegeben. Ein rechnerischer Anteil plasmidhaltiger Zellen $> 100\%$ wurde gleich 100% gesetzt.

Zusammenfassend betrachtet, zeigt der Vergleich beider Prozesse hinsichtlich der Biomasseproduktivität, dass im Mittel aus 1125 g Glucose in der iHCDC 476 g Biomasse gegenüber 460 g in der HCDC gebildet werden konnten. Der iHCDC-Prozess scheint eine effizientere Substratverwertung, vielleicht wegen des Fehlens der Batch-Phase, zu begünstigen, was durch die geringere Acetatbildung bestätigt wird. Der HCDC-Prozess erreicht eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute mit $(19,6 \pm 0,6)\text{ h}$ für die Bildung von 460 g Biomasse, verglichen mit $(23,1 \pm 0,1)\text{ h}$ für 476 g beim iHCDC-Prozess. Zur Vermeidung der Acetatbildung wurde in der ersten Prozessphase der iHCDC

eine stark reduzierte spezifische Wachstumsrate vorgegeben, sodass die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber der HCDC sinkt. Vorteilhaft scheint das für die Batch-zu-Batch Reproduzierbarkeit zu sein. Die benötigte Zeit für den vollständigen Glucoseverbrauch in der iHCDC weist, verglichen mit der HCDC, eine geringere Streuung auf, was in weiteren Kultivierungen mit Expression von HTT-Rab11a bestätigt werden konnte. Jenzsch et al. (2006) geben für *E. coli* BL21(DE3) an, dass eine höhere Batch-zu-Batch Reproduzierbarkeit zu erreichen ist, wenn in einer Kultivierung ohne anfängliche Batch-Phase μ_{set} bei exponentieller Nachfütterung deutlich unterhalb von μ_{max} liegt, da bei Vorgabe einer konstanten Biomasse zur Berechnung der Nachfütterrate zu Prozessbeginn eine Variation der Anfangsbiomasse mit der Zeit kompensiert werden kann. Unter dem Gesichtspunkt, dass geringfügige Abweichungen im Herstellungsprozess, wie Schwankungen in der Kultivierungszeit, zu relevanten Unterschieden in den Eigenschaften von Biopharmazeutika führen können, wird die Bedeutung eines robusten und reproduzierbaren Prozesses deutlich. Mögliche Probleme mit der Batch-Ende-Detektion und den daran geknüpften Übergang in die Nachfütterungsphase vermeidet der iHCDC-Prozess. Zudem kann die anschließende Überführung der Suspension in den Aufarbeitungsprozess leichter terminiert werden.

5.1.1.2 Glucose-, Stickstoff und Phosphatverbrauch von *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a im HCDC- und iHCDC-Prozess

Die zur Charakterisierung und Modellierung wichtigen Ausbeutekoeffizienten für die Hauptmedienkomponenten beziehungsweise Elemente Glucose, Stickstoff und Phosphor werden für beide Kultivierungsstrategien ermittelt.

Abb. 5-5 zeigt die Biomassebildung als Funktion der dazu verbrauchten Glucosemasse. Im HCDC-Prozess war die auf Glucose bezogene Biomasseausbeute in der Batch- und Fed-Batch-Phase 1 mit $0,47 \text{ g g}^{-1}$ konstant. Im iHCDC-Verfahren wurde in

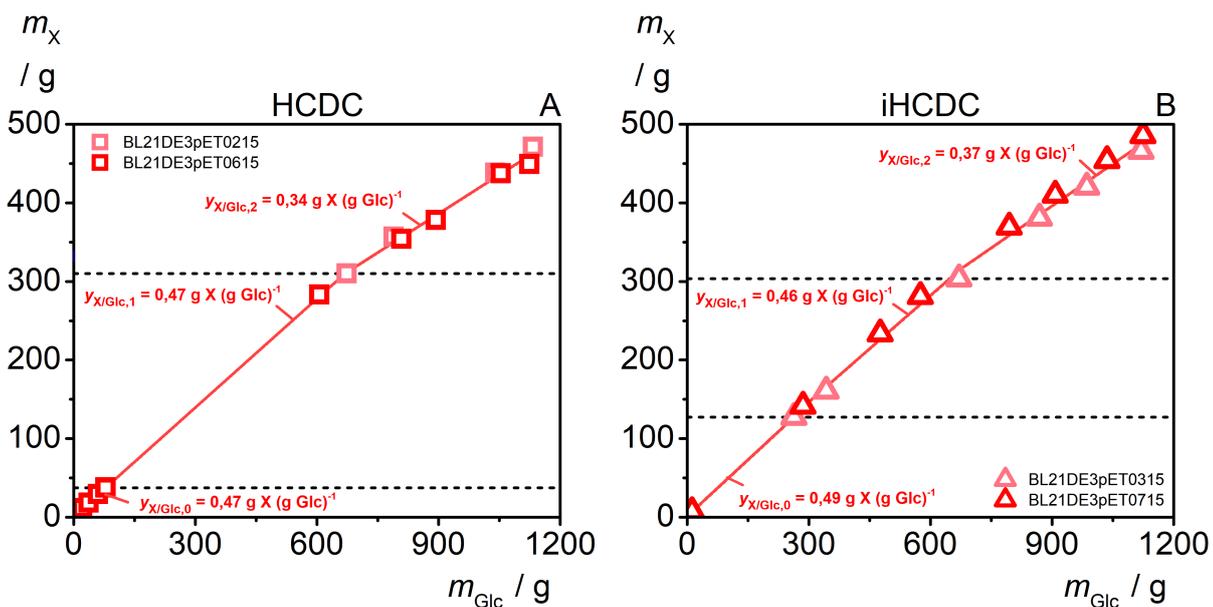


Abb. 5-5: Biomassebildung aus Glucose im HCDC- (A) und iHCDC-Prozess (B). Die Glucoseausbeutekoeffizienten resultieren aus abschnittsweiser Mittelwertbildung aus den genannten Kultivierungen.

Fed-Batch-Phase 0 mit $0,49 \text{ g g}^{-1}$ der höchste Glucoseausbeutekoeffizient ermittelt. Nach Reduktion der spezifischen Wachstumsrate in Phase 1 konnte ein minimaler Abfall der Ausbeute auf $0,46 \text{ g g}^{-1}$ registriert werden. In der letzten Phase sank bei beiden Prozessstrategien der Ausbeutekoeffizient auf $0,34 \text{ g g}^{-1}$ beziehungsweise $0,37 \text{ g g}^{-1}$.

Die starke Reduktion des Glucoseausbeutekoeffizienten in der letzten Prozessphase, kann als Resultat des größer werdenden Einflusses des Erhaltungsstoffwechsels bei Verminderung der spezifischen Wachstumsrate gedeutet werden, wie ihn beispielsweise Abbott und Clamen (1973) für *Pseudomonas fluorescens* beschrieben haben. In den in Abb. 5-5 dargestellten Kultivierungen ist die Auswirkung bei einer spezifischen Wachstumsrate oberhalb 50 % von μ_{\max} vergleichsweise gering, darunter wesentlich stärker. Die Änderung des Ausbeutekoeffizienten in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate kann genutzt werden, den Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel zu bestimmen. Mit $0,128 \text{ g (g h)}^{-1}$ im HCDC- und $0,111 \text{ g (g h)}^{-1}$ im iHCDC-Prozess (Tab. 5-1) übersteigt q_{Glc/X_m} , berechnet nach Gleichung (3.13), den ursprünglich angenommenen Wert von $0,01 \text{ g (g h)}^{-1}$ um mehr als eine Größenordnung, ist jedoch vergleichbar mit Literaturdaten für *E. coli* 1727 (Bhattacharya und Dubey 1995). Dabei sollte nicht von einem konstanten Wert über die gesamte Prozessdauer ausgegangen werden, wie Horta et al. (2012) für BL21 (DE3) zeigen konnten. Sie beobachteten einen kontinuierlichen Anstieg von q_{Gly/X_m} auf ungefähr $0,3 \text{ g (g h)}^{-1}$ mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und führten das auf eine Änderung in der metabolischen Belastung mit zunehmender Biomasse und Zielproteinexpression zurück. Beim rein wachstumsgekoppelten Glucoseausbeutekoeffizienten konnten nur geringfügige Unterschiede zwischen beiden Strategien festgestellt werden. Im Vergleich zum angenommenen Wert von $0,45 \text{ g g}^{-1}$ war die Ausbeute mit $(0,565 - 0,585) \text{ g g}^{-1}$ jedoch wesentlich höher. Der geringere Anteil für Erhaltungsstoffwechsel im iHCDC-Verfahren deutet darauf hin, dass der rekombinante BL21 (DE3) sich bei dieser Prozessführung durch eine geringere metabolische Belastung in Fed-Batch-Phase 0 in einer physiologisch günstigeren Situation befindet und somit Glucose als Substrat effizienter verwertet wird.

Tab. 5-1: $y_{X/\text{Glc}}$ und $q_{\text{Glc}/X}$ in den unterschiedlichen Wachstumsphasen des HCDC- und iHCDC-Prozesses sowie ermittelte Parameter für $y_{X/\text{Glc}}$ und q_{Glc/X_m} . Mit Ausnahme der ersten beiden Phasen der HCDC sind die Werte für den Glucoseausbeutekoeffizienten als arithmetischer Mittelwert von jeweils zwei Kultivierungen angegeben. HCDC-Phasen: 0 = Batch, 1 = Fed-Batch 1, 2 = Fed-Batch 2; iHCDC-Phasen: 0 = Fed-Batch 0, 1 = Fed-Batch 1, 2 = Fed-Batch 2.

Phase	$y_{X/\text{Glc}} / \text{g g}^{-1}$			$q_{\text{Glc}/X} / \text{g (g h)}^{-1}$			$y_{X/\text{Glc}} / \text{g g}^{-1}$	$q_{\text{Glc}/X_m} / \text{g (g h)}^{-1}$
	0	1	2	0	1	2		
HCDC	0,473	0,466	0,336	1,006	0,579	0,321	0,565	0,128
iHCDC	0,485	0,458	0,367	0,621	0,537	0,298	0,585	0,111

Für die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten für die Elemente Phosphor und Stickstoff wurde aus dem Phosphat- und Ammoniumgehalt im Medium der Phosphor- und Stickstoffanteil berechnet. Hinzu kommt der mit dem dosierten Ammoniakvolumen eingebrachte Stickstoffanteil, welcher über die Kultivierungsdauer durch den pH-Regler dosiert wurde. Abb. 5-6 und Abb. 5-7 zeigen jeweils die zeitliche Änderung der Stickstoff- und Phosphorkonzentration im Kulturüberstand (A) sowie die Abhängigkeit des Biomassezuwachses von der konsumierten Phosphormasse (B) im HCDC- und iHCDC-Verfahren. Entsprechend der exponentiell wachsenden Kultur nahm die Phosphorkonzentration in beiden Kultivierungen von circa 4 g l^{-1} bis zum Prozessende auf $0,03$ beziehungsweise $0,07 \text{ g l}^{-1}$ ab. Die Messdaten für Phosphor in der HCDC ermöglichen keine sichere phasenabhängige Bestimmung des Ausbeutekoeffizienten, wie es für die iHCDC (siehe Abb. 5-7 B) gemacht wurde. Unter der Annahme, dass beide Verfahren hinsichtlich des Phosphorbedarfs ein vergleichbares Verhalten zeigen, lassen sich mit 50 g g^{-1} die ersten beiden Prozessphasen und mit $37,1 \text{ g g}^{-1}$ die Fed-Batch-Phase 2 beschreiben. In weiteren HCDCs mit Expression von HTT-Rab11a konnte die deutliche Änderung des Ausbeutekoeffizienten in der letzten Prozessphase bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt scheint im Zusammenhang mit der Reduktion der spezifischen Wachstumsrate auf $\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ zu stehen. Da Phosphor in der Zelle zur Biosynthese energiereicher Verbindungen wie ATP benötigt wird, scheint unter Berücksichtigung eines abnehmenden Glucoseausbeutekoeffizienten, bedingt durch einen Mehrverbrauch für Erhaltungsstoffwechsel bei dieser Zelldichte, ein erhöhter Phosphorbedarf in dieser Phase realistisch.

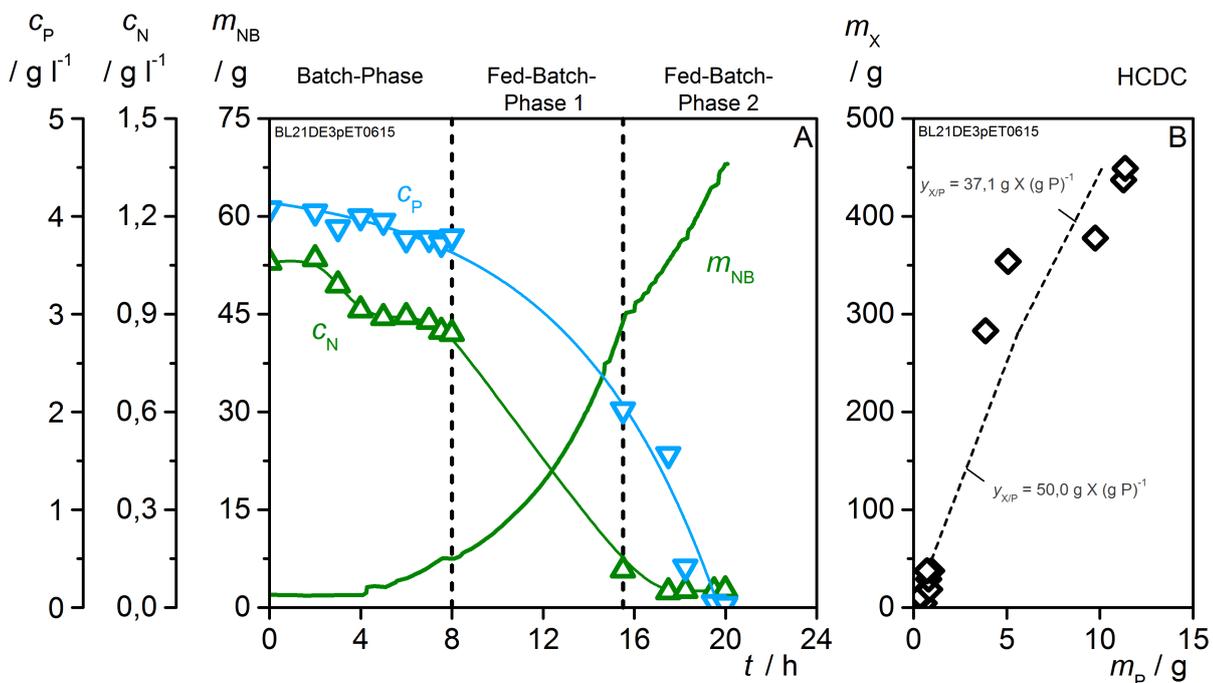


Abb. 5-6: P- und N-Bedarf im HCDC-Prozess. (A) Konzentrationen im Medium sowie Stickstoffeintrag mit der Base. (B) Biomasse als Funktion der aufgenommenen Phosphormasse. Die Werte der Phosphorausbeute geben kein klares Bild, daher ist der Verlauf der iHCDC als gestrichelte Linie den Werten gegenübergestellt.

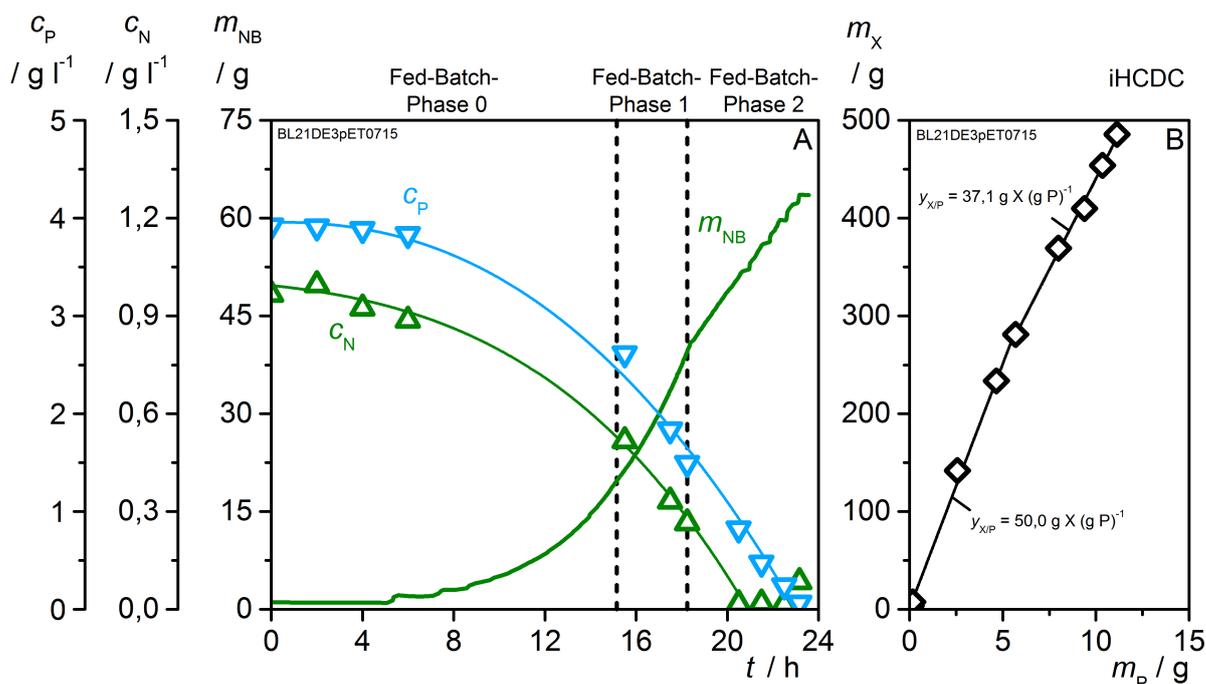


Abb. 5-7: P- und N-Bedarf im iHCDC-Prozess. (A) Konzentrationen im Medium und Stickstoffeintrag aus Base. (B) Biomasse als Funktion der aufgenommenen Phosphormasse.

In der Batch-Phase konnte ohne Ammoniakzugabe innerhalb der ersten 4 h eine Abnahme der Stickstoffkonzentration beobachtet werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf bis zum Batch-Ende war nachfolgend lediglich eine minimale Konzentrationsänderung festzustellen, sodass der Ammoniumverbrauch durch die Zellen nahezu vollständig durch die Ammoniakdosierung kompensiert wurde. Mit zunehmender Kultivierungsdauer nahm in beiden Prozessvarianten die Stickstoffkonzentration im Medium jedoch ab, obwohl der pH-Regler, so war die Annahme, für jedes von der Zelle aufgenommene NH_4^+ -Ion auch eines nachdosiert. Gegen Kultivierungsende konnte eine Abnahme der Stickstoffkonzentration auf konstant $0,05 \text{ g l}^{-1}$ beziehungsweise $0,02 \text{ g l}^{-1}$ beobachtet werden. Da der Messwert für die verdünnten Proben an der unteren Grenze des Messbereichs des verwendeten Ammonium-Tests liegen, kann eine Stickstofflimitierung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Aus dem für Biomassezuwachs dosierten Ammoniakvolumen wurde der Bedarf an Stickstoff aus NH_3 abgeleitet. Pro Gramm dosiertem Stickstoff unter Vernachlässigung der Konzentrationsänderung im Medium lassen sich somit $6,79 \text{ g}$ (HCDC) respektive $7,51 \text{ g}$ (iHCDC) Biomasse erzeugen, wie Abb. 5-8 zeigt. Wird die zeitliche Änderung der Ammoniumkonzentration im Medium (Abb. 5-6 A und Abb. 5-7 A) berücksichtigt, folgt für den Ausbeutekoeffizienten ein Wert im Bereich von $(6,55 - 7,19) \text{ g X (g N)}^{-1}$. Da der pH-Regler nicht genügend Ammoniaklösung dosiert, um den Stickstoffverbrauch durch den Organismus vollständig zu kompensieren, liegt der unter Berücksichtigung der Konzentrationsänderung im Medium ermittelte Ausbeutekoeffizient unterhalb des aus Basezugabe berechneten Werts. Aufgrund der geringen Abweichung von 4 % bis 5% wird in weiteren Kultivierungen vereinfacht nur der Ausbeutekoeffizient

aus Basezugabe angegeben. Die in 3.4.1.2 angegebenen Literaturwerte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den hier berechneten Ausbeutekoeffizienten.

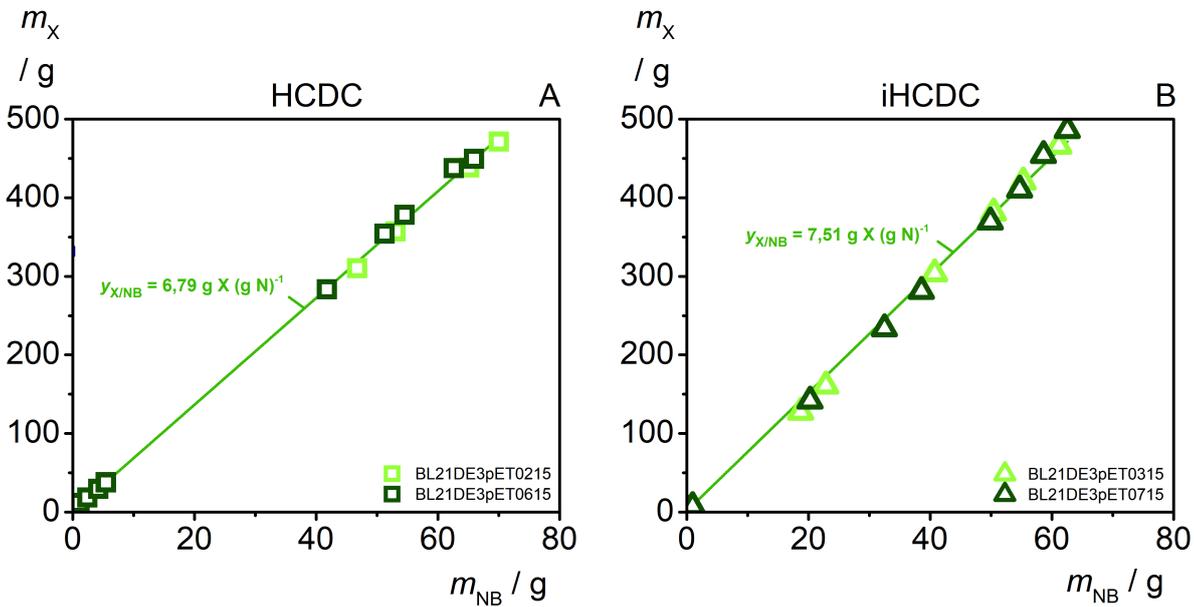


Abb. 5-8: Biomassebildung aus der dosierten Stickstoffmasse im HCDC- (A) und iHCDC-Prozess (B). Stickstoff-abhängiger Biomasseausbeutekoeffizient aus Mittelwertbildung von je zwei Kultivierungen.

Der Stickstoffbedarf scheint in der iHCDC geringer zu sein. Allerdings konnte in weiteren Kultivierungen gezeigt werden, dass der Ausbeutekoeffizient für Stickstoff unabhängig von der Prozessvariante in dem hier angegebenen Bereich von $(6,79 - 7,51) \text{ g g}^{-1}$ variiert. Die Firma Roth gibt für die verwendete Ammoniaklösung einen Konzentrationsbereich für NH_3 an, sodass es zwischen unterschiedlichen Chargen zu Schwankungen in der Konzentration kommen kann. Das wurde nicht geprüft, würde aber unterschiedliche Baseverbräuche erklären. Zusätzlich kann der Versuchsaufbau sowie äußere Einflüsse wie die Umgebungstemperatur die Messung beeinflussen, sodass das aus der Basevorlage geförderte Ammoniakvolumen durch beispielsweise Verdampfung nicht vollständig in den Reaktionsraum gelangen kann.

5.1.2 Einsatz des iHCDC-Prozesses für die Produktion von HTT-Rab11a

5.1.2.1 Wachstumsverhalten und HTT-Rab11a Ausbeute

Die Effizienz der iHCDC-Strategie wurde im Vergleich zur klassischen HCDC anhand der Bildung des Genprodukts HTT-Rab11a untersucht. Die Fed-Batch-Phase 2 dient nun als Produktionsphase mit Expression des Markerproteins bei $\Delta OD_{600} = 180 \pm 10$ durch Induktion mit IPTG (siehe 4.2.1.2).

Mit $\mu_{\max} = 0,48 \text{ h}^{-1}$ und $0,27 \text{ h}^{-1}$ in der HCDC beziehungsweise $0,30 \text{ h}^{-1}$ und $0,23 \text{ h}^{-1}$ in der iHCDC wuchs der Organismus mit der ihm vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate. Abb. 5-10 zeigt, dass die Acetatbildung im iHCDC-Verfahren erst zwischen 15 h und 16 h bei einer höheren Zelldichte im Vergleich zur HCDC einsetzte. Bei beiden Prozessstrategien stieg die Acetatkonzentration bis zum Induktionszeitpunkt auf circa $0,4 \text{ g l}^{-1}$ und damit auf einen für das Wachstum unkritischen Wert an. Die Induktion führt zu einem deutlich gebremsten Biomassezuwachs in Fed-Batch-Phase 2. In der HCDC nahm die Biomasse von 252 g auf 424 g zu, wobei die vorgegebene spezifische Wachstumsrate mit $0,12 \text{ h}^{-1}$ nur in den ersten beiden Stunden nach Induktion gehalten wurde und dann kontinuierlich auf $0,07 \text{ h}^{-1}$ abfiel. In der iHCDC konnte in der Produktionsphase ein Biomassezuwachs von 270 g auf 411 g beobachtet werden und die spezifische Wachstumsrate nahm von $0,11 \text{ h}^{-1}$ zwischen den ersten beiden Stunden nach Induktion stetig auf $0,04 \text{ h}^{-1}$ ab. In beiden Prozessvarianten war in der Produktionsphase zunächst nur eine geringe Zunahme in der Acetatkonzentration zu beobachten, ehe am Ende ein steiler Anstieg auf 1,4 beziehungsweise $1,6 \text{ g l}^{-1}$ zu verzeichnen war.

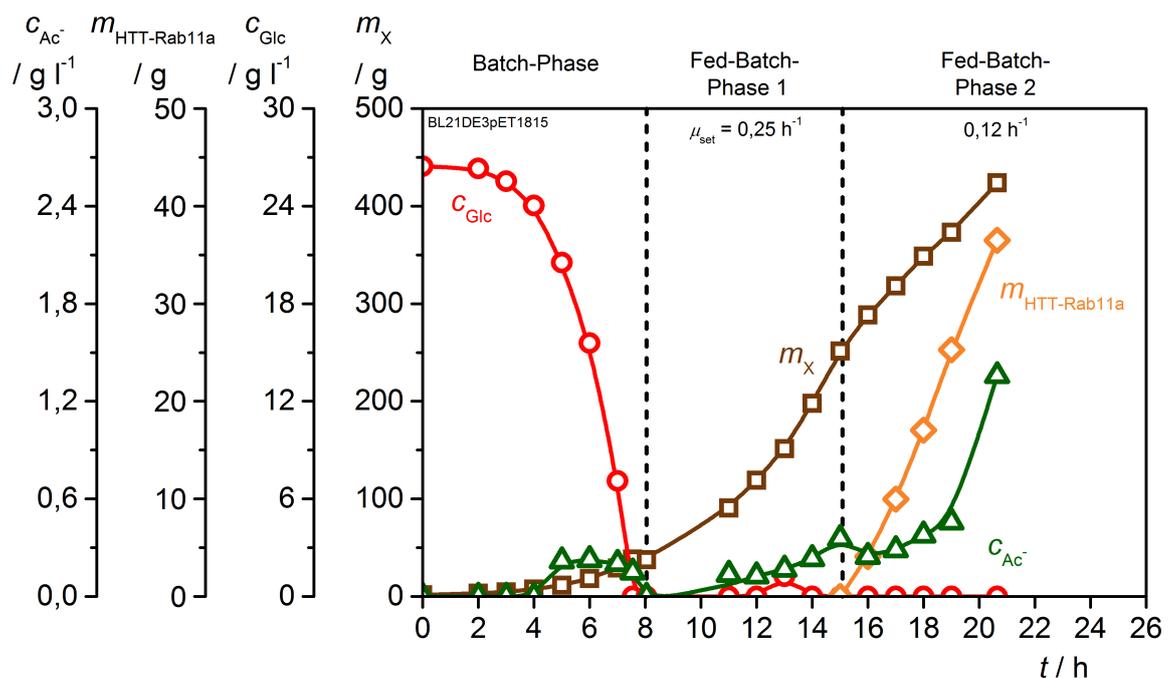


Abb. 5-9: HTT-Rab11a-Masse, Biomasse sowie Konzentration an Glucose und Acetat als Funktion der Zeit im HCDC-Prozess mit Induktion der Zielproteinexpression bei $\Delta OD_{600} = 175,8$.

5 Ergebnisse und Diskussion

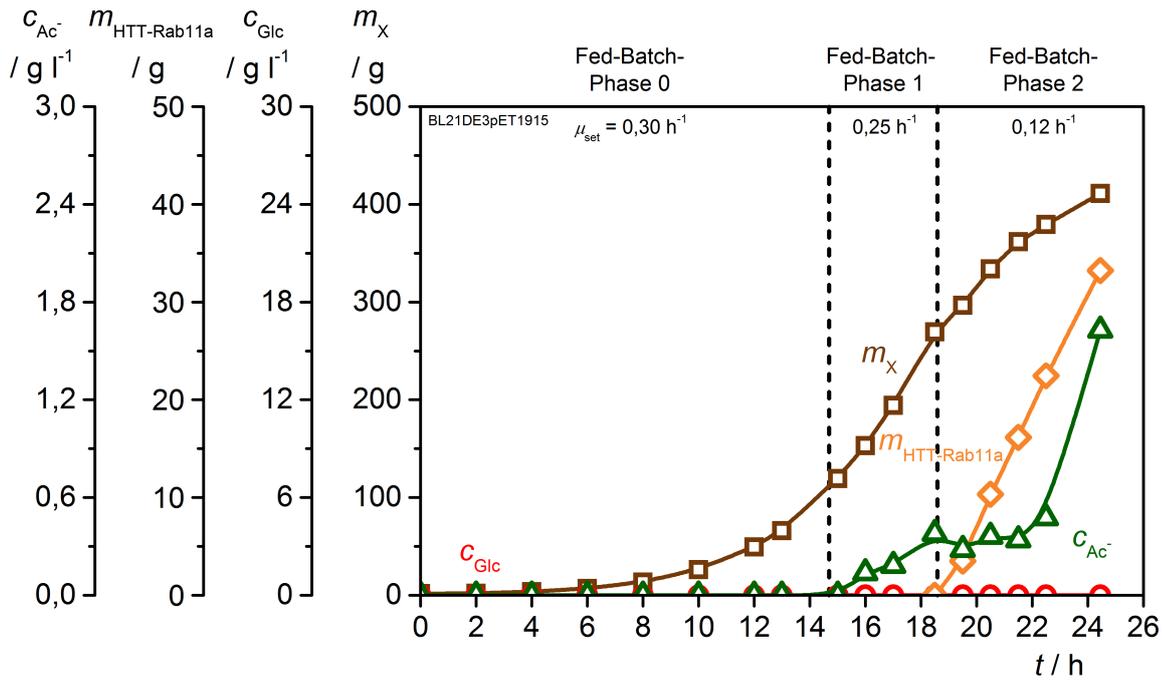


Abb. 5-10: HTT-Rab11a-Masse, Biomasse sowie Konzentration an Glucose und Acetat als Funktion der Zeit im iHCDC-Prozess mit Induktion der Zielproteinexpression bei $\Delta OD_{600} = 177,5$.

In drei Kultivierungen nach dem HCDC- und vier nach dem iHCDC-Verfahren wurde über die Prozessdauer eine mittlere Biomasse von (412 ± 12) g bei HCDC und (438 ± 25) g bei iHCDC erreicht. Dabei lagen am Kultivierungsende durchschnittlich etwa $(1,7 \pm 0,5)$ g l⁻¹ und $(1,4 \pm 0,2)$ g l⁻¹ Acetat in der Kultursuspension vor.

Trotz deutlicher Biomassezunahme nach Induktion, konnte für beide Strategien nicht nur kein Anstieg in der Konzentration lebensfähiger Zellen im Produktionszeitraum festgestellt werden (siehe Abb. 5-11), sondern sogar eine Abnahme, beruhend auf

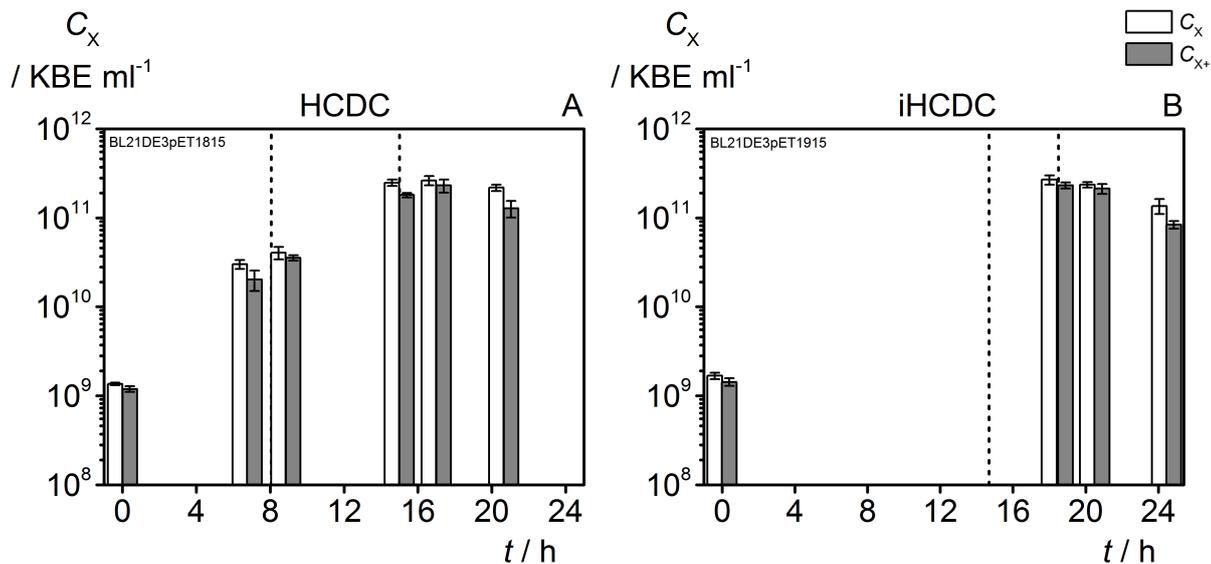


Abb. 5-11: Lebendkeimzahlkonzentration gesamt beziehungsweise die plasmidhaltiger Zellen im HCDC- (A) und iHCDC-Prozess (B).

dem Verdünnungseffekt durch Zugabe von Feedlösung und Base. Hoffmann und Rinas (2004) fassen zusammen, dass Zellen aus induzierten Fed-Batch Kultivierungen schnell die Fähigkeit der Koloniebildung verlieren und bezeichnen diesen Zellstatus als „lebensfähig, aber nicht kultivierbar“. Dazu führen sie als Begründung zellphysiologische Änderungen an, welche durch die Expression von Fremd-DNA verursacht werden. Die Zellzahl bleibt konstant und die Biomassezunahme resultiert schlicht aus der Vergrößerung der Zelle und nicht aus der Zellproliferation.

Die in Abb. 5-12 dargestellten SDS-PAGE Gele bildeten die Grundlage für den in Abb. 5-9 und Abb. 5-10 gezeigten Produktverlauf. Mit Ausnahme von Spur 6 in Abb. 5-12 (A) ist eine zeitliche Intensitätszunahme der HTT-Rab11a Bande bei circa 27,9 kDa zu erkennen. Grund für die geringere Gesamtintensität in Spur 6 ist die Agglomeration von Proteinen bei der Probenvorbereitung, wodurch offensichtlich nicht die vollständige Proteinmasse appliziert wurde. Nach einer kurzen Verzögerung zu Beginn der Produktionsphase nahm die Masse an Zielprotein bei den dargestellten Kultivierungen auf 36,5 g (HCDC) beziehungsweise 33,2 g (iHCDC) zu. Im Mittel wurden $(35,7 \pm 1,4)$ g im HCDC- und $(37,4 \pm 3,3)$ g im iHCDC-Prozess produziert. Davon fielen durchschnittlich (74 ± 6) % beziehungsweise (80 ± 7) % als lösliches Produkt an, wie in Abb. 5-13 zusammenfassend dargestellt. Mit Blick auf die Zielproteinisolation ist die Expression des Zielproteins in möglichst nur einer Form – löslich oder unlöslich – wünschenswert, da zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit meist nur die Aufreinigung einer Fraktion sinnvoll erscheint. Da durch Solubilisierung und Renaturierung bei der Aufreinigung von Ibs mit erheblichen Produktverlusten gerechnet werden kann, wird

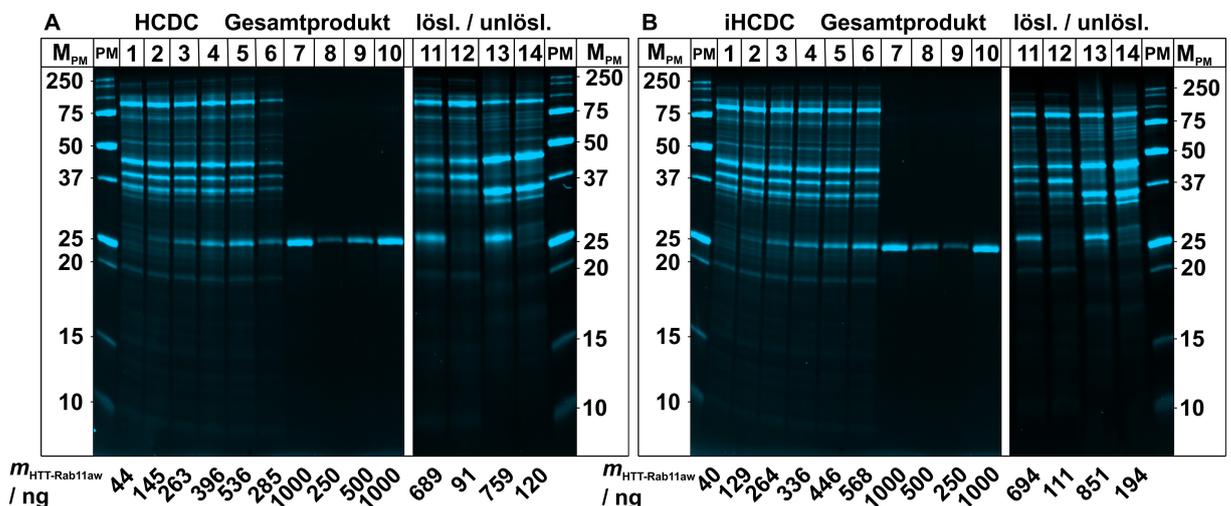


Abb. 5-12: Quantifizierung der HTT-Rab11a-Masse als Gesamtprodukt und als Fraktion löslichen und unlöslichen Produkts mittels SDS-PAGE. (A) HCDC mit PM: Protein Marker (Precision Plus Protein™, Bio-Rad); Produktproben von BL21DE3pET1815 mit Zeit nach Induktion 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, 4: 3 h, 5: 4 h, 6: 5,7 h; Standards in ng 7: 1000, 8: 250, 9: 500, 10: 1000; Lösliche Fraktion mit Zeit nach Induktion 11: 5,7 h, 12: 0 h; Unlösliche Fraktion mit Zeit nach Induktion 13: 5,7 h, 14: 0 h. (B) iHCDC mit PM: Protein Marker; Produktproben von BL21DE3pET1915 mit Zeit nach Induktion 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, 4: 3 h, 5: 4 h, 6: 6 h; Standards in ng 7: 1000, 8: 500, 9: 250, 10: 1000; Lösliche Fraktion mit Zeit nach Induktion 11: 6 h, 12: 0 h; Unlösliche Fraktion mit Zeit nach Induktion 13: 6 h, 14: 0 h. Angabe von *m*_{HTT-Rab11aw} in der Produktbande nach Quantifizierung mit linearer Kalibrierfunktion mit Image Lab (Bio-Rad).

ein hoher Anteil an löslichem Protein positiv gesehen. Hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit zeigt das iHCDC-Verfahren hier einen kleinen Vorteil.

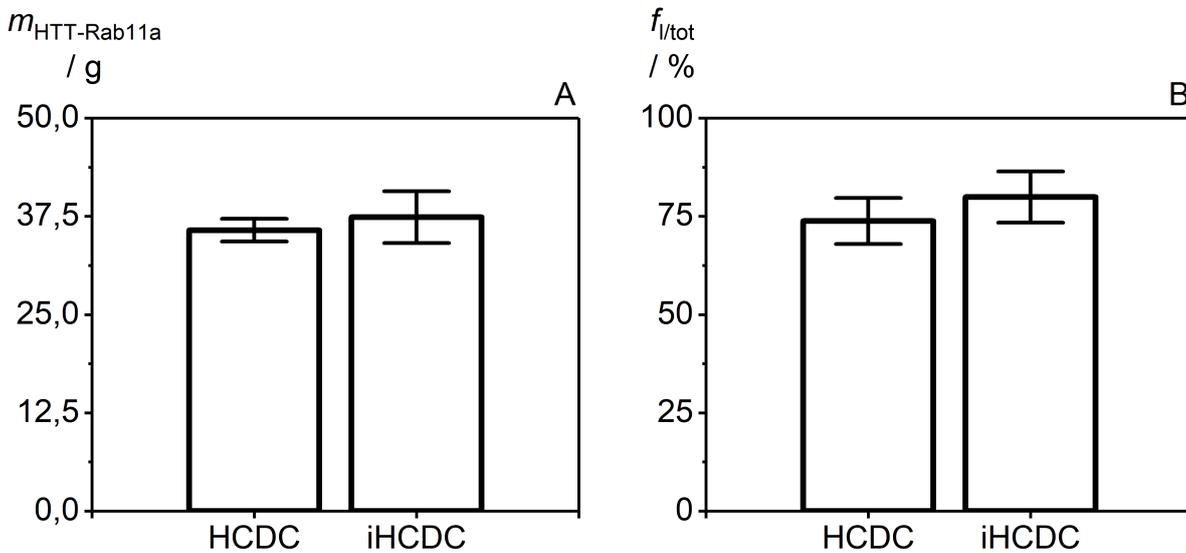


Abb. 5-13: Produktmasse (A) und lösliche Zielproteinfraktion (B) am Prozessende. Werte sind als Mittelwerte und Fehlerbalken als Standardabweichung von drei Kultivierungen nach dem HCDC- und vier Kultivierungen nach dem iHCDC-Verfahren angegeben.

Die Änderungen im Wachstumsverhalten in der Produktionsphase, geringere Biomasseausbeuten und die kontinuierliche Reduktion der spezifischen Wachstumsrate im Vergleich zur nicht-induzierten Kultur können nach Hoffmann und Rinas (2004) auf die zelluläre Reaktion auf physiologische Stresssignale während der Fremdproteinsynthese zurückgeführt werden. Die verstärkte Sekretion von unerwünschten Nebenprodukten wie Acetat deutet hier auf die Aktivierung alternativer, ineffizienterer Stoffwechselwege hin. Der erhöhte Energiebedarf aufgrund der Überexpression des Fremdproteins veranlasst offensichtlich die Zelle, für sie ungünstigere Stoffwechselrouten, auch unter kohlenstofflimitierten Bedingungen und bei Unterschreiten von μ_{crit} , zu aktivieren und vermehrt Acetat zu bilden.

5.1.2.2 Auswirkung der Produktbildung auf die Biomasseausbeute aus Stickstoff, Phosphor und Glucose

Neben dem Einfluss der Zielproteinexpression auf die Biomasse- und Acetatbildung, wurde in der Produktionsphase auch eine Auswirkung auf die Umsetzung von Glucose, Stickstoff und Phosphor festgestellt. Der Ausbeutekoeffizient für Glucose nahm wie in einer nicht-induzierten Kultur phasenabhängig, entsprechend der eingestellten spezifischen Wachstumsrate, in Fed-Batch-Phase 0 und 1 einen konstanten Wert an. Bei induzierten Kultivierungen, wie in Abb. 5-14 exemplarisch für den Batch BL21DE3pET1915 (iHCDC) gezeigt, gilt dies nicht mehr für die Fed-Batch-Phase 2 – die Produktionsphase. Bei weiterhin exponentieller Nachfütterung für Wachstum mit

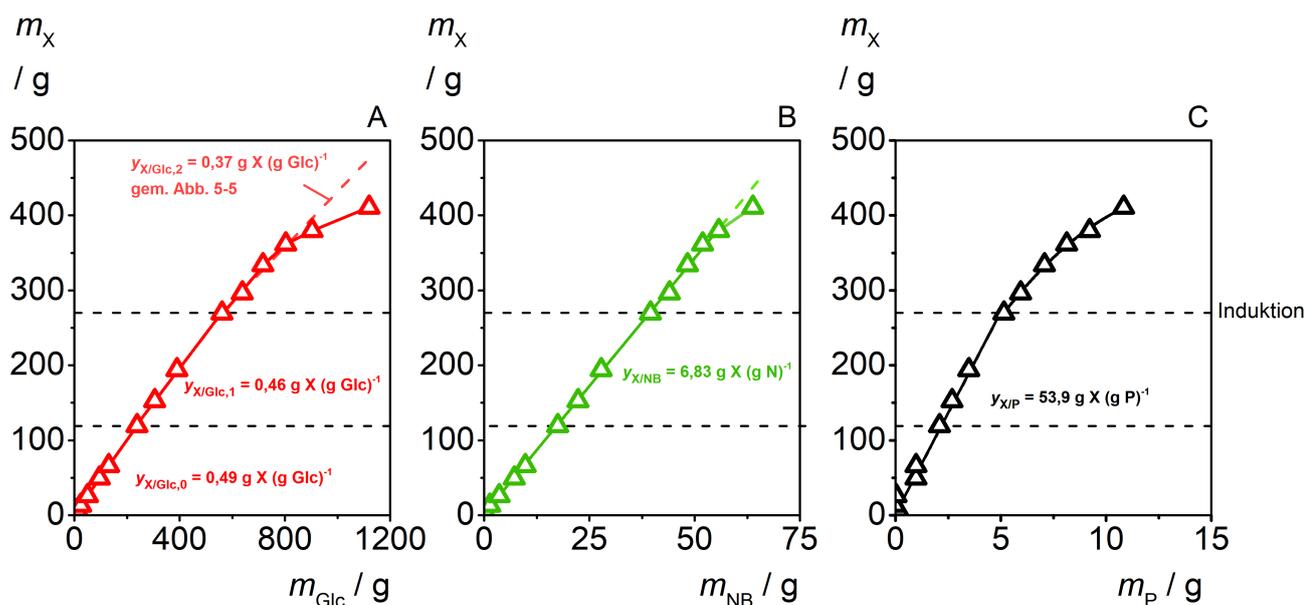


Abb. 5-14: Biomassegewinn aus Glucose (A), der per Base dosierten Stickstoffmasse (B) und der aus dem Medium aufgenommenen Phosphormasse (C). Daten aus induzierter iHDC Batch BL21DE3pET1915. Die gestrichelten Linien unterteilen die Phasen. Es sei angemerkt, dass die unterste Linie nicht den Phasenübergang symbolisiert, sondern die erste Messung 0,3 h nach dem Phasenübergang.

$0,12 \text{ h}^{-1}$ sank der Ausbeutekoeffizient gegenüber nicht-induzierten Kulturen (gestrichelt in Abb. 5-14) immer weiter bis auf $0,145 \text{ g}^{-1}$ zwischen den letzten beiden Werten.

Abb. 5-15 zeigt die mit der spezifischen Wachstumsrate lineare Zunahme der zellspezifischen Reaktionsrate für Glucose bis zur Induktion. Danach ist der zellspezifische Glucoseverbrauch trotz abnehmender spezifischer Wachstumsrate praktisch konstant bei $(0,265 \pm 0,013) \text{ g}(\text{g h})^{-1}$. Die biomassebezogene Phosphorausbeute betrug in Fed-Batch-Phase 0 und 1 konstant $53,9 \text{ g g}^{-1}$ und nahm in der Produktionsphase um mehr als 50 % auf $24,7 \text{ g g}^{-1}$ ab. Bis zu einer Prozesszeit von 22,5 h, also deutlich über den Induktionszeitpunkt hinaus, betrug der Ausbeutekoeffizient für Stickstoff konstant $6,83 \text{ g g}^{-1}$ und nahm dann geringfügig ab.

Als Folge der erhöhten metabolischen Belastung durch die Fremdproteinexpression werden die eingesetzten Substrate Glucose und Phosphor zur Biomasseerzeugung ineffizienter genutzt. Umstellungen in Stoffwechselprozessen innerhalb der Zelle führen zu einem Entzug energiereicher Verbindungen zu Gunsten der Zellerhaltung und der Fremdproteinproduktion. Bedingt durch vermehrte Lyse in der Produktionsphase wird zudem ein Teil der gebildeten Biomasse analytisch nicht weiter erfasst. Freigesetzte Proteine oder andere lösliche Zellbestandteile entziehen sich somit der Biomassebestimmung, woraus einerseits Schwankungen in den Messdaten und andererseits eine geringere Ausbeute resultiert. Ein weiterer negativer Effekt ist die mit der Lyse einhergehenden Viskositätserhöhung des Mediums mit suboptimaler Durchmischung und Sauerstoffeintrag.

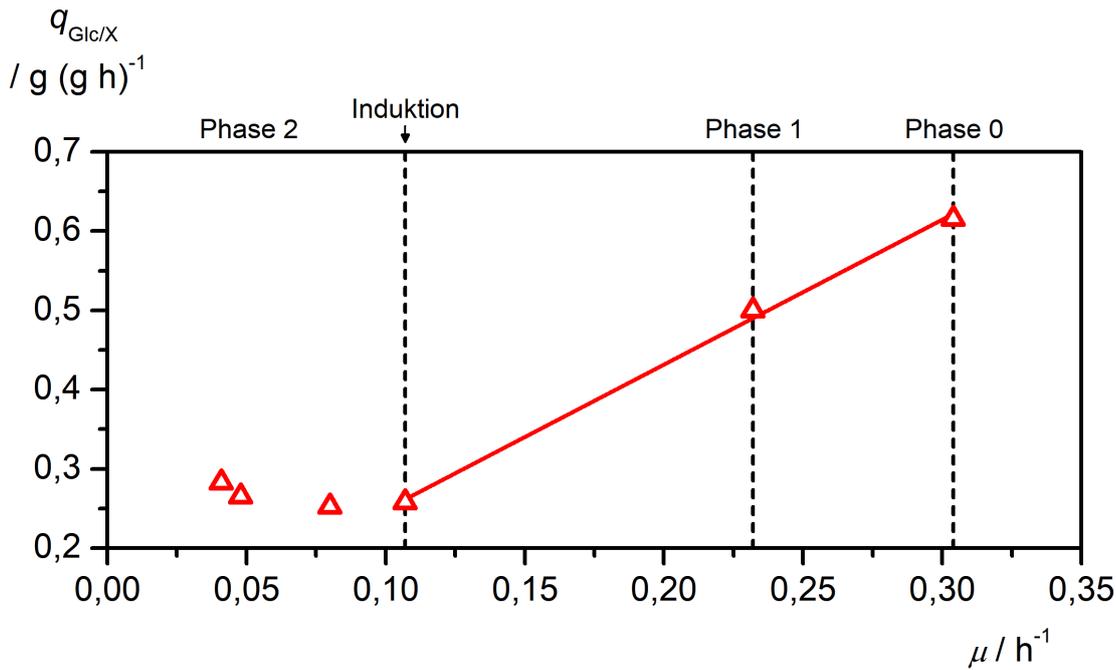


Abb. 5-15: Zellspezifische Glucoseverbrauchsrate als Funktion der spezifischen Wachstumsrate. Daten stammen aus einer induzierten iHCDC (Batch: BL21DE3pET1915). Gezeigt ist die Abhängigkeit der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate von der spezifischen Wachstumsrate vor und nach der Induktion.

5.1.2.3 Einfluss der Prozessvarianten auf die HTT-Rab11a Produktbildung

In Abb. 5-16 ist der zeitliche Verlauf der zellspezifischen HTT-Rab11a Bildungsrate im HCDC- (A) und iHCDC-Prozess (B) dargestellt. Charakteristisch für alle Kultivierungen war das Erreichen der maximalen zellspezifischen Produktivität erst 2 bis 3 h nach Induktion. Nach Erreichen des Maximums konnte ein mehr (HCDC) oder weniger (iHCDC) ausgeprägter Rückgang beobachtet werden. Der Anstieg auf die maximale spezifische Produktionsrate ist in der benötigten Zeit für die Aufnahme des Induktors und die Aktivierung der Expressionsmaschinerie begründet. Zudem ist bekannt, dass hohe Expressionsraten oft nur wenige Stunden aufrechterhalten werden können, wie beispielsweise von Lin et al. (2001) für die Produktion von α -Glucosidase mit *E. coli* RB791 beschrieben.

Der Parameter $q_{HTT-Rab11a/X}$ wird für den untersuchten Zeitraum in Abb. 5-16 mit Gleichung (5.1) beschrieben

$$q_{HTT-Rab11a/X}(t - t_{Ind}) = q_{HTT-Rab11a/Xmax} \cdot \frac{(t - t_{Ind})}{(t - t_{Ind}) + 0,75 \text{ h}} - P_1 \cdot (t - t_{Ind}) \quad (5.1)$$

Die Modellgleichung berücksichtigt den zeitlichen Anstieg der spezifischen Produktbildungsrate auf den Maximalwert $q_{HTT-Rab11a/Xmax}$ sowie einen Abnahmeterm als Produkt aus dem konstanten Faktor P_1 und der Zeit. Basierend auf den experimentellen Daten

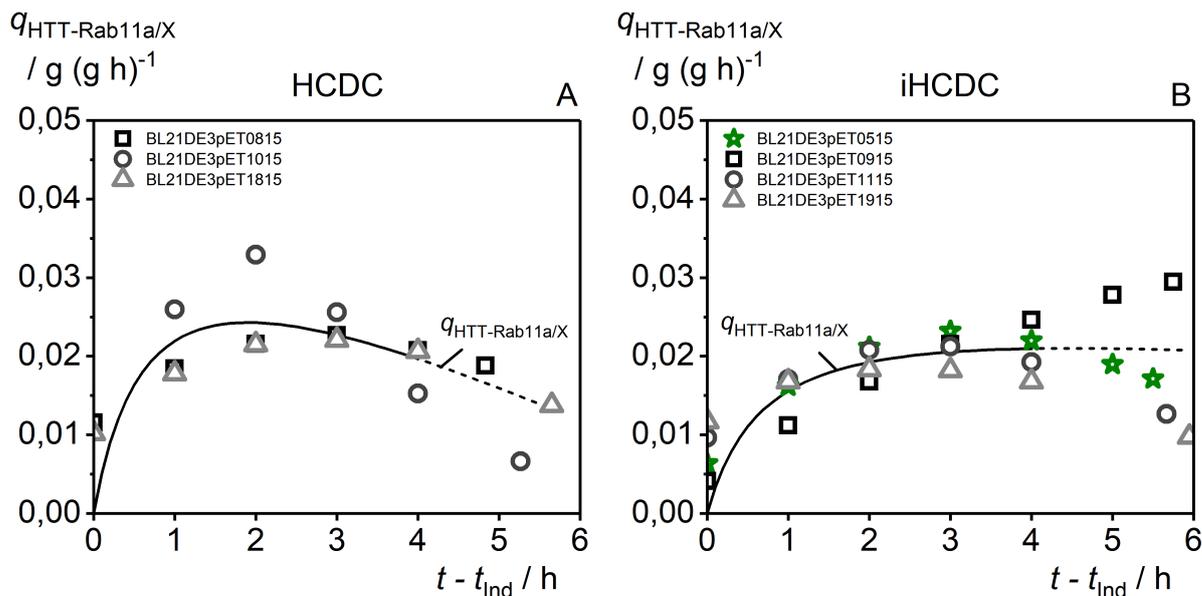


Abb. 5-16: Zellspezifische HTT-Rab11a Bildungsrate. (A) HCDC und (B) iHCDC. Zur Beschreibung der Verläufe von $q_{\text{HTT-Rab11a}}$ wurden bis 4 h nach Induktion zu jedem Messpunkt das arithmetische Mittel aus allen Kultivierungen gebildet. Die Anpassung der Modellgleichung 5.1 an diese Werte erfolgte mittels Downhill-Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead (1965) mit Hilfe der Minimierung der Fehlerquadratsumme aus der Differenz von Mess- und Modellfunktionswert, wodurch die optimalen Werte für die Parameter $q_{\text{HTT-Rab11a}/X_{\text{max}}}$ und P_1 mit den Anfangswerten $0,04 \text{ g (g h)}^{-1}$ und $0,002 \text{ g (g h}^2)^{-1}$ identifiziert wurden. Die maximale Anzahl erlaubter Iterationen betrug 100000. Die gestrichelten Linien resultieren aus der Extrapolation der Funktion.

wurde die Annahme getroffen, dass 0,75 h zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsrate benötigt werden. Zur Berechnung der Modellparameter $q_{\text{HTT-Rab11a}/X_{\text{max}}}$ und P_1 wurden die ersten 4 h der Produktionsphase berücksichtigt, da nur in diesem Bereich eine Mittelwertbildung für die Daten von $q_{\text{HTT-Rab11a}/X}$ aller Kultivierungen möglich war. Durch Anwendung des Downhill-Simplex-Verfahrens nach Nelder und Mead (1965) mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurden die beiden Modellparameter für diesen Zeitraum berechnet. Die Resultate der Parameteranpassung sind in Tab. 5-2 aufgeführt und der weitere Verlauf von $q_{\text{HTT-Rab11a}/X}$ über die ersten 4 h nach Induktion hinaus als gestrichelte Linie in Abb. 5-16 skizziert.

Tab. 5-2: Modellparameter zur Beschreibung der zellspezifischen HTT-Rab11a Bildungsrate nach Induktion.

Prozessstrategie	$q_{\text{HTT-Rab11a}/X_{\text{max}}}$ /g (g h) ⁻¹	P_1 /g (g h ²) ⁻¹
HCDC	0,0472	0,00501
iHCDC	0,0286	0,000780

Die Parameter zeigen, dass die modellbasierte maximale spezifische Produktionsrate bei einer HCDC höher ist als bei der iHCDC. Eine mögliche Ursache könnte das Wachstum mit μ_{max} in der Batch-Phase sein, gleichbedeutend mit einem Anstieg des Anteils ribosomaler Proteine sowie aktiver RNA Polymerase in dieser Phase (Gourse

et al. 1996). Blicke diese anfangs gegenüber der Fed-Batch-Phase 0 im iHCDC-Prozess erhöhte Proteinsyntheseleistung trotz identisch eingestellter spezifischer Wachstumsrate in der zweiten und dritten Prozessphase zumindest teilweise erhalten, wäre die Zelle im HCDC-Prozess in der Lage mehr Proteine in der Produktionsphase zu synthetisieren. Gleichzeitig würde der dazu erforderliche Energiebedarf steigen. Durch diese Belastung scheint die höhere spezifische Produktionsrate offensichtlich nur kurzfristig aufrechterhalten werden zu können und nimmt schneller ab. Im iHCDC-Prozess ist die maximale spezifische Bildungsrate circa 39 % geringer, allerdings kann die Expressionsrate auch für einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden und nimmt weniger stark mit der Zeit ab, wodurch vermutlich am Ende geringfügig höhere Produktausbeuten erzielt werden.

Neben dem zellphysiologischen Stress, dem die Zellen in der Produktionsphase ausgesetzt sind, ist ein Plasmidverlust zusätzliche Ursache für die Reduktion der Produktivität. Abb. 5-17 zeigt, dass bis zur Induktion der Plasmidgehalt als konstant angenommen werden kann. Obwohl in den Vorkulturen ein Selektionsdruck ausgeübt wurde, wird auch hier, analog zu nicht-induzierten Kulturen, kein Plasmidgehalt von nahezu 100 % gemessen. Da die Kulturen nicht von nicht-produktionsfähigen Zellen überwachsen wurden, kann auch hier eher von einer plasmidhaltigen Population ausgegangen werden. Nach Induktion konnte zunächst keine signifikante Änderung in der Fraktion plasmidhaltiger Zellen beobachtet werden. Anders als bei den nicht-induzierten Kultivierungen nahm hier jedoch im weiteren Verlauf der Anteil produktionsfähiger

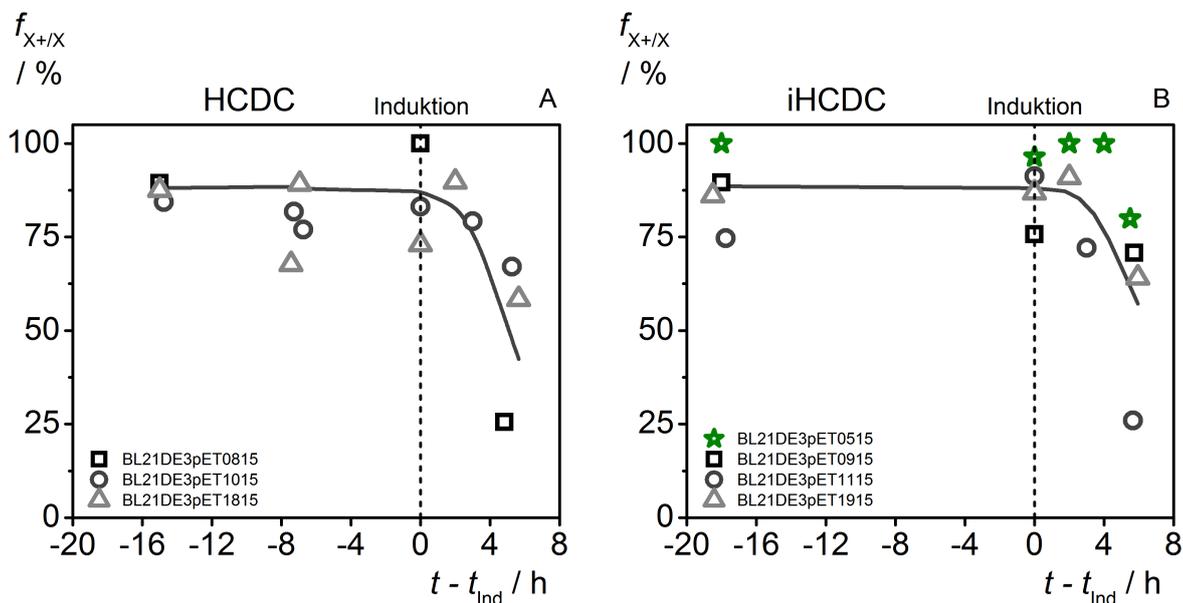


Abb. 5-17: Plasmidstabilitätsstudie bei HCDC (A) und iHCDC (B) für *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a bei induzierten Kulturen. Aus den Daten der Lebendkeimzahlbestimmung ist der Anteil plasmidhaltiger Zellen berechnet worden und als Mittelwert aus Dreifach- (BL21DE3pET0515/0815/0915) beziehungsweise Fünffachbestimmungen (BL21DE3pET1015/1115/1815/1915) angegeben. Ein rechnerischer Anteil plasmidhaltiger Zellen > 100 % wurde gleich 100 % gesetzt. Verläufe dargestellt als gemittelte Kurve durch lineare Interpolation über den gesamten Abszissenbereich. Bei HCDC Batch BL21DE3pET1815 wurde der Wert bei $(t - t_{Ind}) = -7,45$ h nicht berücksichtigt.

Zellen deutlich ab. Eine genaue Aussage über den Zeitpunkt des einsetzenden Plasmidverlusts kann anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Lediglich die Kultivierung BL21DE3pET0515 lässt vermuten, dass der Verlust erst in den letzten Stunden der Produktionsphase, vermutlich durch den hohen Selektionsdruck unter Induktionsbedingungen, einsetzt.

Die Verläufe der spezifischen Produktionsrate in Abb. 5-16 sowie der Produktmasse in Abb. 5-9 und Abb. 5-10 erwecken den Eindruck, dass insbesondere beim iHDCD-Prozess eine Erhöhung der eingesetzten Glucosemasse zur weiteren Steigerung der Produktmasse führen würde. Im Vergleich zur Gesamtprozessdauer von circa 24 h könnte somit durch Verlängerung der Produktionszeit um 1 bis 2 h die Raum-Zeit-Ausbeute gesteigert werden. Möglicherweise kann durch Induktion zu einem früheren Zeitpunkt die Ausbeute auch ohne Erhöhung der Glucosemasse gesteigert werden. Durch das geringere Zellalter und weniger unerwünschten Nebenprodukten im Medium befindet sich die Kultur bei früherer Induktion zusätzlich in einer physiologisch günstigeren Verfassung, wodurch die spezifische Produktivität eventuell gesteigert und somit trotz zum Induktionszeitpunkt weniger Biomasse im Reaktor die Gesamtausbeute an HTT-Rab11a erhöht werden kann.

5.1.3 Einsatz des iHCDC-Prozesses für die Kultivierung des Leucin-auxotrophen *E. coli* K12 ER2507 pGLO

Der Stamm *E. coli* K12 ER2507 kann aufgrund seiner *ara-14* Mutation, wodurch ihm die Fähigkeit Arabinose zu metabolisieren genommen ist, gut in Kombination mit Arabinose-induzierbaren Vektoren für die Expression von heterologen Proteinen eingesetzt werden. Problematisch bei diesem Leucin-auxotrophen Stamm ist allerdings, dass bereits eine geringe Konzentration der notwendigen Aminosäure das Wachstumsverhalten des Stammes negativ beeinflusst. Zudem führen steigende Glucose- und Leucinkonzentrationen zu einer Verringerung des Leucinausbeutekoeffizienten. Somit scheint die iHCDC mit durchgängig Glucose-limitiertem Wachstum eine ideale Strategie für diesen Organismus zu sein.

5.1.3.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* K12 ER2507 pGLO in Abhängigkeit der Leucinkonzentration in Batch Kultivierungen

Für die Entwicklung einer Hochzelldichte-Kultivierungsstrategie für den Leucin-auxotrophen *E. coli* K12 ER2507 pGLO wurde zunächst der Einfluss der Leucinkonzentration auf die maximale spezifische Wachstumsrate in Batch Kultivierungen untersucht. Dazu wurde die Leucinkonzentration im Bereich von (0 – 3) g l⁻¹ in Schüttelkultivierungen mit 100 ml synthetischem Medium (4.1.2) bei 30 °C und 120 min⁻¹ variiert. Inokuliert wurde mit je 100 µl Kryokultur.

Erwartungsgemäß konnte in Abwesenheit von Leucin kein Wachstum beobachtet werden (Abb. 5-18), was mit der *leuB6* Mutation in diesem Stamm erklärt werden kann. Mit 0,43 h⁻¹ wurde die höchste spezifische Wachstumsrate bei der geringsten Leucinkonzentration von 0,1 g l⁻¹ ermittelt. Der Übergang in eine Sättigung der Zelldichte bei einer Prozesszeit von circa 19 h spricht für eine Leucin-Limitierung, da beim Einsatz

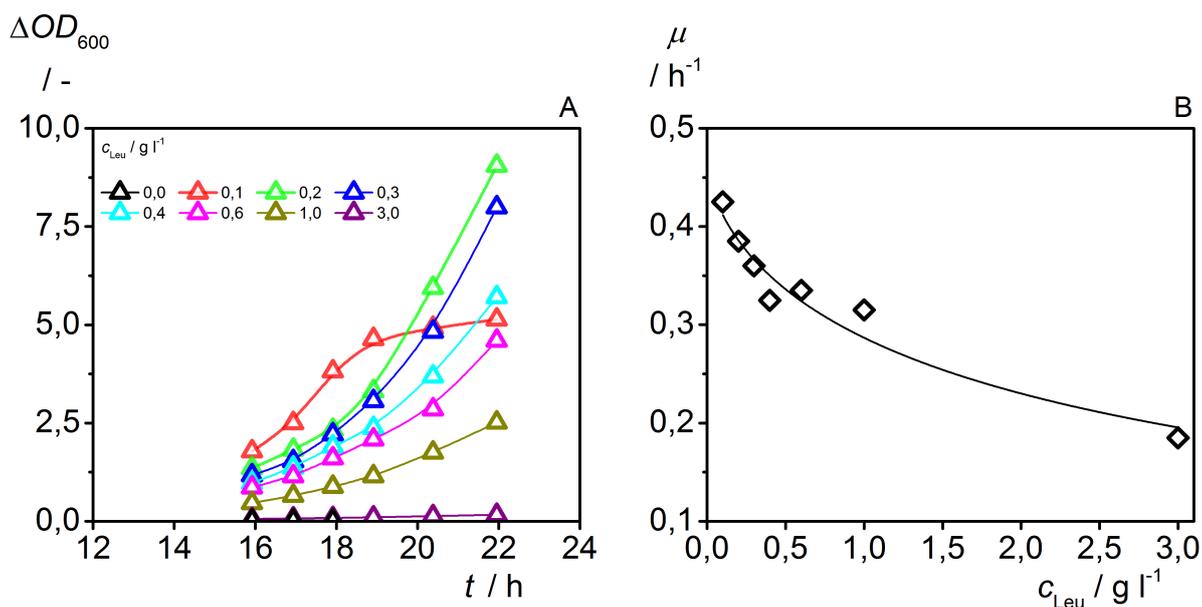


Abb. 5-18: (A) Wachstum von *E. coli* K12 ER2507 pGLO bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen. (B) Spezifische Wachstumsrate als Funktion der Leucinkonzentration (Mittelwerte aus zwei Kultivierungen).

höherer Konzentrationen bei gleicher Glucosekonzentration auch mehr Biomasse gebildet wird. Mit zunehmender Leucinkonzentration sank die spezifische Wachstumsrate auf weniger als 50 % des Maximalwertes bei $3,0 \text{ g l}^{-1}$ ab. Rothen et al. (1998) beschreiben für die Kultivierung von *E. coli* HB101 auf synthetischem Medium die gleiche Inhibition, die nach Gschaedler und Boudrant (1994) auf der Inhibierung des LIV-II Aminosäuretransportsystems durch hohe Leucinkonzentrationen basiert.

5.1.3.2 Untersuchung des Leucinausbeutekoeffizienten als Funktion der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP

Der große Einfluss der Leucinkonzentration auf das Wachstum verdeutlicht, dass für die Auslegung eines Hochzelldichte-Kultivierungsprozesses mit *E. coli* K12 ER2507 eine angemessene Versorgung mit Leucin ein entscheidender Parameter ist. Um unlimitedes Wachstum bei gleichzeitig hinreichend hoher spezifischer Wachstumsrate zu gewährleisten, ist die Kenntnis des Leucinausbeutekoeffizienten erforderlich. Zu diesem Zweck wurden dieser und die spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit der Leucin- und Glucosekonzentration mittels SVP untersucht. Beide Konzentrationen wurden in einem vollfaktoriellen Versuchsplan über drei Stufen variiert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 5.1.3.1 wurden als Stufenwerte $0,1 \text{ g l}^{-1}$, $0,35 \text{ g l}^{-1}$ und $0,6 \text{ g l}^{-1}$ für Leucin respektive 2 g l^{-1} , 16 g l^{-1} und 30 g l^{-1} für Glucose definiert. Drei *Center Point* Experimente wurden bei $0,35 \text{ g l}^{-1}$ und 16 g l^{-1} durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten in Schikanekolben bei 30 °C und 120 min^{-1} . 100 ml des synthetischen Mediums wurden mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ Kryokultur inokuliert und das Wachstum über $19,5 \text{ h}$ beobachtet. Beginnend bei einer Prozesszeit von 12 h , wurden die Kolben beprobt.

Tab. 5-3: Vollfaktorieller Versuchsplan und Ergebnisse zur Untersuchung der spezifischen Wachstumsrate und des Leucinausbeutekoeffizienten.

N_i	c_{Leu} / g l^{-1}	c_{Glc} / g l^{-1}	μ / h^{-1}	$y_{X/\text{Leu}}$ / g g^{-1}
N ₁	0,10	2	0,44	19,4
N ₂	0,35	2	0,40	15,9
N ₃	0,60	2	0,36	16,6
N ₄	0,10	16	0,41	17,4
N ₅	0,35	16	0,40	18,2
N ₆	0,60	16	0,37	10,5
N ₇	0,10	30	0,39	16,0
N ₈	0,35	30	0,38	12,4
N ₉	0,60	30	0,35	6,6
N ₁₀	0,35	16	0,38	14,6
N ₁₁	0,35	16	0,38	15,5
N ₁₂	0,35	16	0,38	16,8

Tab. 5-3 fasst die Faktoreinstellungen und Ergebnisse der Untersuchung der spezifischen Wachstumsrate und des Leucinausbeutekoeffizienten zusammen. Mit $0,44 \text{ h}^{-1}$ sowie $19,4 \text{ g g}^{-1}$ wurde bei der geringsten Leucin- und Glucosekonzentration die

höchste spezifische Wachstumsrate und der höchste Leucinausbeutekoeffizient beobachtet. Mit $0,35 \text{ h}^{-1}$ und $6,6 \text{ g g}^{-1}$ wurden an der oberen Grenze des untersuchten Versuchsraums die kleinsten Werte bestimmt.

Zur Modellbildung wurde zunächst der Datensatz für die spezifische Wachstumsrate und den Leucinausbeutekoeffizienten einer statistischen Rohdatenanalyse unterzogen. Die Lage des Medians der spezifischen Wachstumsrate innerhalb des Tukey Boxplots (Abb. 5-19 A) weist eine geringe Rechtsschiefe der Messdatenverteilung auf. Für den Leucinausbeutekoeffizienten kann hingegen eine leicht linksschiefe Verteilung beobachtet werden. Aufgrund der geringen Ausprägung der Schiefe wird von normalverteilten Datensätzen ausgegangen, was durch den Signifikanztest nach Shapiro-Wilk (4.5.2), basierend auf einem Signifikanzniveau von 0,05, bestätigt wird.

Mit $0,44 \text{ h}^{-1}$ für μ und $6,6 \text{ g g}^{-1}$ für $y_{X/\text{Leu}}$ wurden zwei ausreißerverdächtige Werte ermittelt, da die Werte um mehr als $1,5 \cdot IQR^1$ vom oberen beziehungsweise unteren Quartil abweichen. Nach der Definition von Tukey werden solche Werte als Ausreißer behandelt (Hoaglin 2003) und außerhalb der Whisker dargestellt. Durch die Anwendung des Grubbs-Tests bei einem Signifikanzniveau von 0,05 konnte jedoch kein signifikanter Ausreißer innerhalb der normalverteilten Datensätze identifiziert werden. Somit kann auf Grundlage aller Daten die Modellbildung erfolgen. Mit einem IQR von $0,026 \text{ h}^{-1}$ für die spezifische Wachstumsrate zeigen die mittleren 50 % der Messwerte eine geringe Streuung um den arithmetischen Mittelwert von $0,39 \text{ h}^{-1}$. Mit

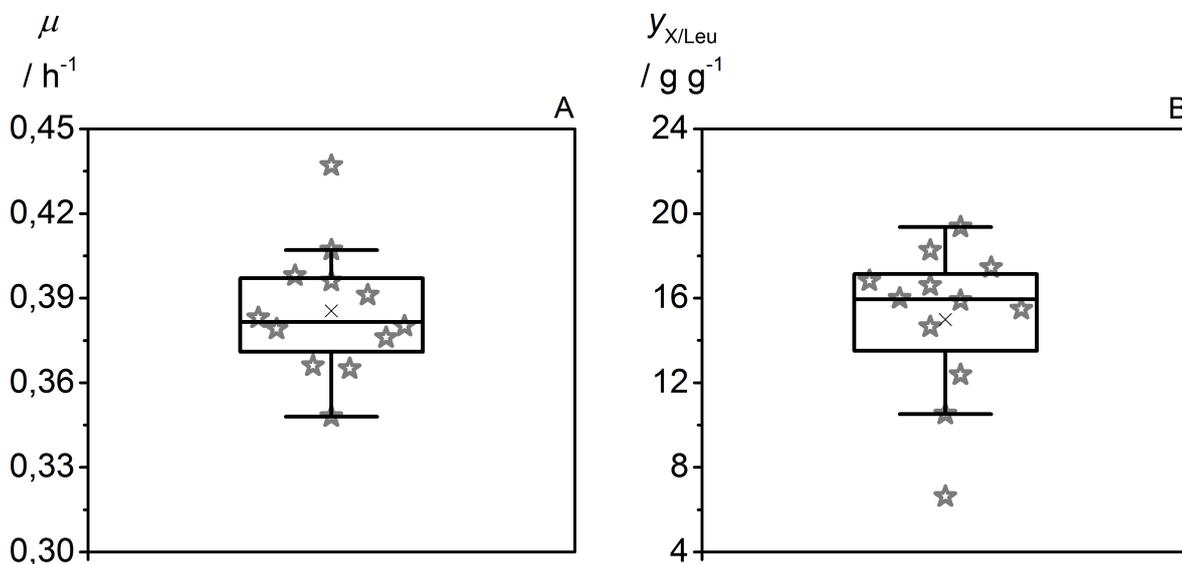


Abb. 5-19: Verteilung der Messdaten der SVP für die beiden Systemantworten μ (A) und $y_{X/\text{Leu}}$ (B). Streuungs- und Lagemaße berechnet für alle gemessenen Werte: (A) Arithmetisches Mittel (X) $\bar{\mu} = 0,388 \text{ h}^{-1}$, $IQR = 0,026 \text{ h}^{-1}$, Median $\tilde{\mu} = 0,3815 \text{ h}^{-1}$, NV liegt vor. (B) Arithmetisches Mittel (X) $\bar{y}_{X/\text{Leu}} = 15,0 \text{ g g}^{-1}$, $IQR = 3,62 \text{ g g}^{-1}$, Median $\tilde{y}_{X/\text{Leu}} = 15,935 \text{ g g}^{-1}$, NV liegt vor.

¹ Interquartilsabstand (Differenz zwischen dem 3. Quartil und dem 1. Quartil)

$IQR = 3,62 \text{ g g}^{-1}$ streuen die mittleren 50 % der Messwerte für den Leucinausbeutekoeffizienten hingegen etwas stärker als bei der spezifischen Wachstumsrate.

Die Regressionsanalyse wurde für die Datensätze der spezifischen Wachstumsrate und des Leucinausbeutekoeffizienten durchgeführt und lieferte zwei Funktionen (5.2) und (5.3), welche die Änderung der Systemantwort in Abhängigkeit der Leucin- und Glucosekonzentration im gewählten Versuchsraum beschreiben.

$$\mu = 0,4493 - 0,1371 \cdot c_{\text{Leu}} - 0,0017 \cdot c_{\text{Glc}} + 0,0021 \cdot c_{\text{Leu}} \cdot c_{\text{Glc}} \quad (5.2)$$

$$y_{X/\text{Leu}} = 20,0117 - 5,1476 \cdot c_{\text{Leu}} - 0,0353 \cdot c_{\text{Glc}} - 0,4729 \cdot c_{\text{Leu}} \cdot c_{\text{Glc}} \quad (5.3)$$

Beide Modelle weisen sowohl eine signifikante lineare Abhängigkeit von der Leucin- und Glucosekonzentration als auch einen Interaktionsterm auf. Die Ursache für den Einfluss von Leucin auf die spezifische Wachstumsrate wurde bereits in 5.1.3.1 diskutiert. Die hier zusätzlich beobachtete Auswirkung steigender Glucosekonzentration kann wahrscheinlich durch eine zugrundeliegende Substratinhibierung begründet werden. Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration und dem Leucinausbeutekoeffizienten wurde bereits von Rothen et al. (1998) für *E. coli* HB101 beschrieben. In Anlehnung an Gschaedler und Boudrant (1994) vermuten sie einen Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration und dem Aminosäurebedarf für verschiedene metabolische Vorgänge innerhalb der Zelle, wie Energiestoffwechsel

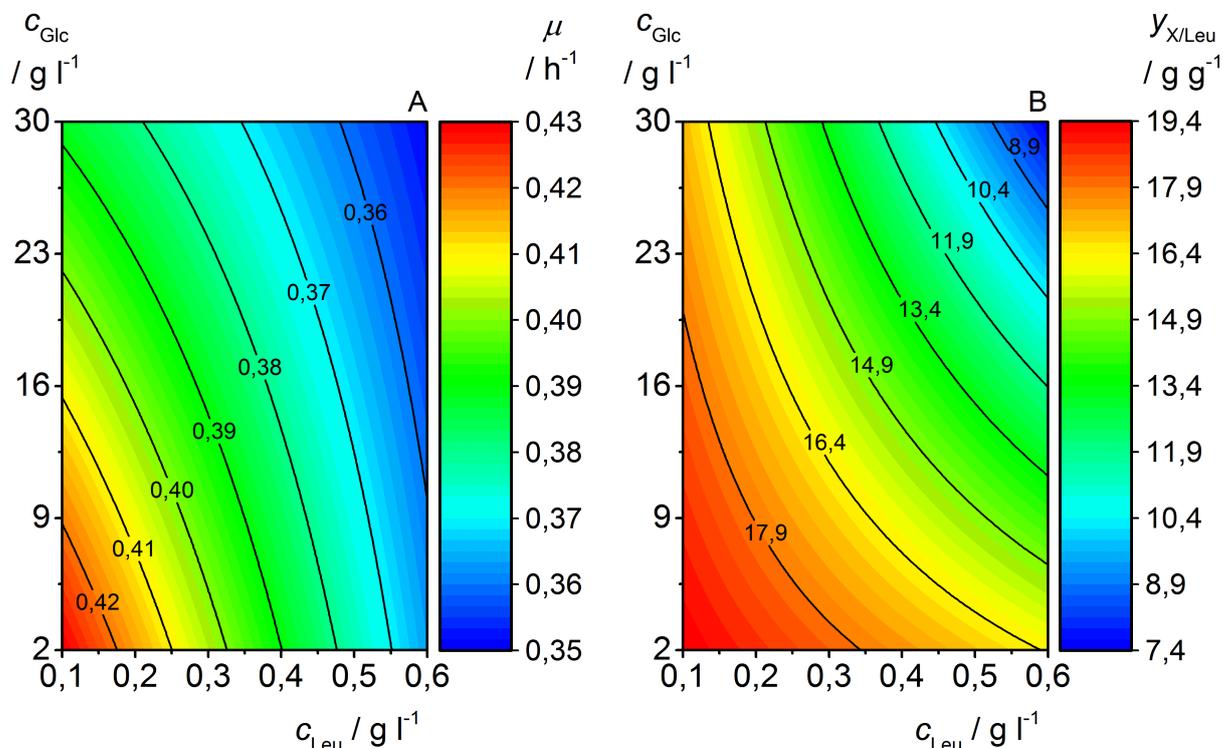


Abb. 5-20: Konturplot der spezifischen Wachstumsrate (A) und des Leucinausbeutekoeffizienten (B) als Interaktionsmodell in Abhängigkeit der Leucin- und Glucosekonzentration im Bereich (0,1 – 0,6) g l⁻¹ beziehungsweise (2 – 30) g l⁻¹.

oder Proteinbiosynthese. Zusätzlich kann die Abnahme von $y_{X/Leu}$ um 66 % als Resultat der Interaktion von steigender Leucin- und Glucosekonzentration möglicherweise als Ursache des Überflussmetabolismus interpretiert werden.

Die Darstellung der Modellgleichungen (5.2) und (5.3) als Konturplot in Abb. 5-20 veranschaulicht, dass die optimalen Wachstumsbedingungen bei minimaler Konzentration der beiden untersuchten Substanzen zu finden sind. Die Gütekenngößen der Modellbildung sind in Tab. 5-4 aufgeführt. Für beide Funktionen sind die Anforderung an ein geeignetes Modell gemäß Tab. 4-12 erfüllt. Durch Entfernung der quadratischen Regressionsterme konnte die Modellgüte in beiden Fällen gesteigert werden. Beide Interaktionsterme könnten nach erfolgter Regressionsanalyse als nicht-signifikant beurteilt werden, da der Fehlerbalken bei einem Sicherheitsniveau von 0,05 die Nulllinie im Koeffizientenplot minimal überschritt. Da die Berücksichtigung der Interaktionsterme jedoch eine Steigerung der Modellgüte zur Folge hatte, wurden sie zur Beschreibung der Abhängigkeit von der Leucin- und Glucosekonzentration beibehalten.

Tab. 5-4: Kenngrößen der μ und $y_{X/Leu}$ Modelle.

Qualitätsmerkmal	R^2	Q^2	$R^2 - Q^2$	MV	ReP
μ	0,94	0,85	0,09	0,96	0,85
$y_{X/Leu}$	0,84	0,69	0,05	0,82	0,81

5.1.3.3 Entwicklung einer Hochzelldichte-Kultivierungsstrategie für *E. coli* K12 ER2507 pGLO

Die vorgestellten Untersuchungen (5.1.3.1/5.1.3.2) zeigen, dass nur eine Kultivierungsstrategie erfolgreich sein kann, die durchgängig sowohl hinsichtlich Leucin als auch Glucose substratlimitiertes Wachstum sicherstellt – der **iHCDC**-Prozess (5.1.1).

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Leucin in wässrigen Lösungen, 21,5 g l⁻¹ bei 25 °C (Yalkowsky und Dannenfelser 1992), muss ein anderer Weg gefunden werden, die benötigte Leucinmenge zu dosieren als mit der Feedlösung. Als Säure ist Leucin zum einen in der Base deutlich besser löslich, zum anderen wird die Base proportional zur Feedlösung also ebenfalls exponentiell durch den pH-Regler dosiert. Die in der Base gelöste Menge der Aminosäure wird so bemessen, dass die für den iHCDC-Prozess bekannte Basemenge mit der aus dem Ausbeutekoeffizienten für Biomasse aus Leucin bestimmten Menge komplettiert wird.

Auch wenn die Modellbildung aus 5.1.3.2 keine Extrapolation über den untersuchten Versuchsraum hinaus erlaubt, wurden unter der Annahme, dass der Ausbeutekoeffizient für Leucin bei weiterer Reduktion der Glucosekonzentration ansteigt, zwei verschiedene Leucinkonzentrationen in der Ammoniaklösung – 52,6 g l⁻¹ und 63,3 g l⁻¹ – untersucht, die sich aus den Annahmen ergeben, dass circa 400 ml Base dosiert werden und die Ausbeutekoeffizienten für Biomasse aus Glucose und Leucin bei

0,45 g g⁻¹ und circa 24 g g⁻¹ beziehungsweise 20 g g⁻¹ liegen. Wie in Tab. 4-3 aufgeführt, wurde im Startmedium eine Leucinkonzentration von 0,3 g l⁻¹ eingestellt.

Zur Vermeidung einer übermäßigen Acetatproduktion, verursacht durch Überschreiten der kritischen spezifischen Wachstumsrate, wurde in Anlehnung an publizierte Werte für *E. coli* K12 TG1 (Korz et al. 1995) in der Fed-Batch-Phase 0 die spezifische Wachstumsrate auf 0,17 h⁻¹ begrenzt. In den darauffolgenden Phasen 1 und 2 wurde zunächst bei $\Delta OD_{600} = 80$ auf 0,15 h⁻¹, dann bei $\Delta OD_{600} = 180$ auf 0,12 h⁻¹ reduziert. Da für diesen Stamm sowohl $y_{X/Glc}$ als auch $q_{Glc/Xm}$ nicht bekannt waren, wurden zur Berechnung der Nachfütterungsrate die hier für *E. coli* BL21 (DE3) genutzten Werte (siehe 3.4.1.1) verwendet. Die Regelung von Temperatur, Gelöstsauerstoffkonzentration und pH erfolgten analog zur in 4.3.2.2 beschriebenen Vorgehensweise.

Unter Zugrundelegung des höheren Ausbeutekoeffizienten zeigt Abb. 5-21 den zeitlichen Verlauf der Biomasse, der Masse an dosiertem Stickstoff und Leucin aus Base sowie der Konzentration an Leucin und Acetat im Kulturüberstand. Die Biomassezunahme innerhalb der ersten 25 h erfolgte mit 0,18 h⁻¹ und somit praktisch mit μ_{set} . Zu diesem Zeitpunkt konnte in der Flüssigphase kein überschüssiges Leucin bestimmt werden. In Fed-Batch-Phase 1 konnte bis $t = 29$ h ein Wachstum mit konstant 0,13 h⁻¹ beobachtet werden. Trotz exponentieller Nachfütterung mit $\mu_{set} = 0,15$ h⁻¹ fiel die spezifische Wachstumsrate nachfolgend ab. Bis zum Abbruch der Kultivierung konnte zwischen 30,5 h und 33,5 h kein weiterer Zuwachs der Biomassekonzentration registriert werden. Im selben Zeitraum stieg die Acetatkonzentration auf 5,5 g l⁻¹ und die Leucinkonzentration auf 0,7 g l⁻¹ an. Beide Komponenten erreichen damit eine wachstumsinhibierende Konzentration. Die fast vollständige Einstellung des Zellwachstums

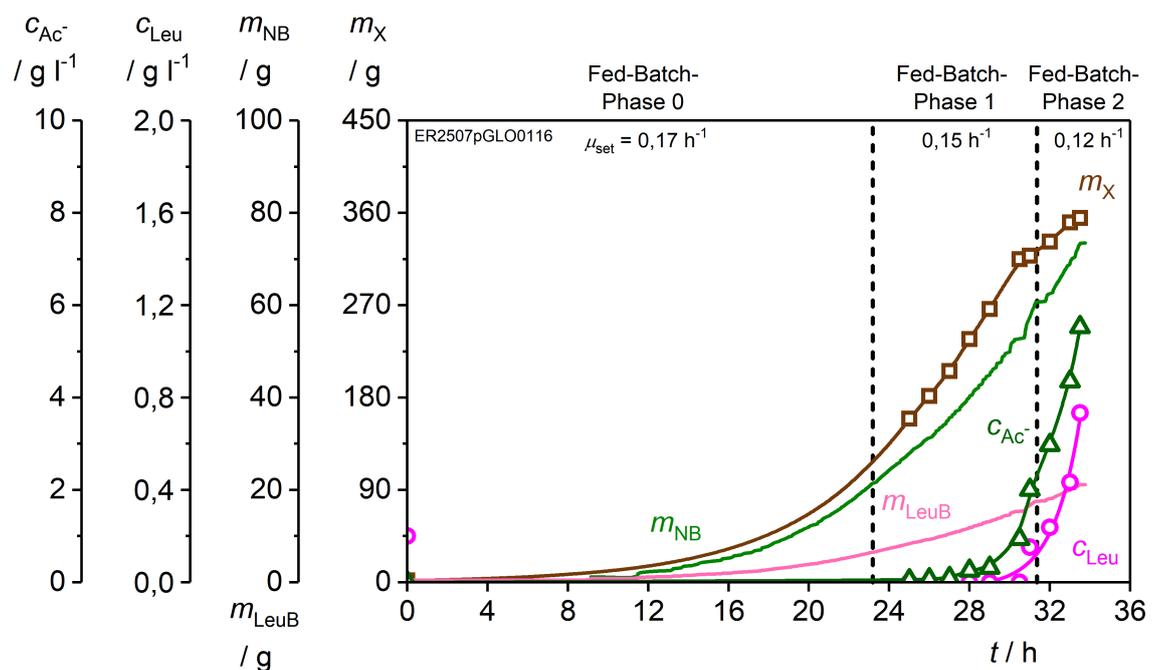


Abb. 5-21: iHCDC-Verlauf mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO bei Annahme von $y_{X/Leu} \approx 24$ g g⁻¹ mit 52,6 g l⁻¹ Leucin in Ammoniaklösung (25 %).

ist in der vorhergehend unzureichenden Versorgung mit Leucin begründet. Wird der Leucinverbrauch zum Erzeugen der Vorkultur vernachlässigt, beträgt $y_{X/Leu} = 17,0 \text{ g g}^{-1}$ für die ersten 25 h, um in den folgenden 5,5 h auf konstant $22,3 \text{ g g}^{-1}$ anzusteigen. Damit bestätigt sich hier der zuvor in Batch-Kultivierungen beobachtete negative Einfluss der Leucinkonzentration auf den Ausbeutekoeffizienten auch in einer Hochzelldichte-Kultivierung. Mit $0,3 \text{ g l}^{-1}$ und somit einem Leucinüberschuss im Medium ist der Leucinausbeutekoeffizient bis zur Messung bei 25 h geringer, ohne den Zeitpunkt, bei dem die Leucinkonzentration im Medium auf einen Wert nahe 0 g l^{-1} abfällt, zu kennen. Nachfolgend wird die Aminosäure offensichtlich für einen kurzen Zeitraum effizienter metabolisiert. Der Anstieg der Acetatkonzentration lässt vermuten, dass Leucin nicht ausreichend zugeführt wird, so dass Glucose im Medium akkumuliert (wurde nicht analytisch untersucht). Gleichzeitig sinkt dadurch der Ausbeutekoeffizient für Leucin, was den Effekt noch verstärkt. Der Glucoseüberschuss und die Limitierung durch Leucin bewirken Acetatbildung (Eiteman und Altman 2006), wodurch vermehrt Base dosiert und die Kultur mit Ammonium und dem in der Base gelösten Leucin übersorgt wird. Dabei ist eine vollständige Wachstumsinhibierung durch Ammonium, Acetat sowie Leucin in der Kombination sehr wahrscheinlich.

In einem zweiten Versuch wurde unter der Annahme von $y_{X/Leu} = 20 \text{ g g}^{-1}$ etwas mehr Leucin in 25 % Ammoniaklösung mit einer Konzentration von $63,3 \text{ g l}^{-1}$ vorgelegt. Erneut wuchsen die Zellen mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,18 \text{ h}^{-1}$. Während der Fed-Batch-Phase 1 blieb der Zellzuwachs mit $0,13 \text{ h}^{-1}$ knapp unter μ_{set} , was sich in der letzten Phase mit $0,09 \text{ h}^{-1}$ bei $\mu_{set} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ fortsetzte. Abb. 5-22 zeigt den erfolgreichen Verlauf mit einer kumulativen Biomasse von 444 g am Prozessende. Es ist davon auszugehen, dass die anfängliche Leucinkonzentration bis zur Beprobung bei

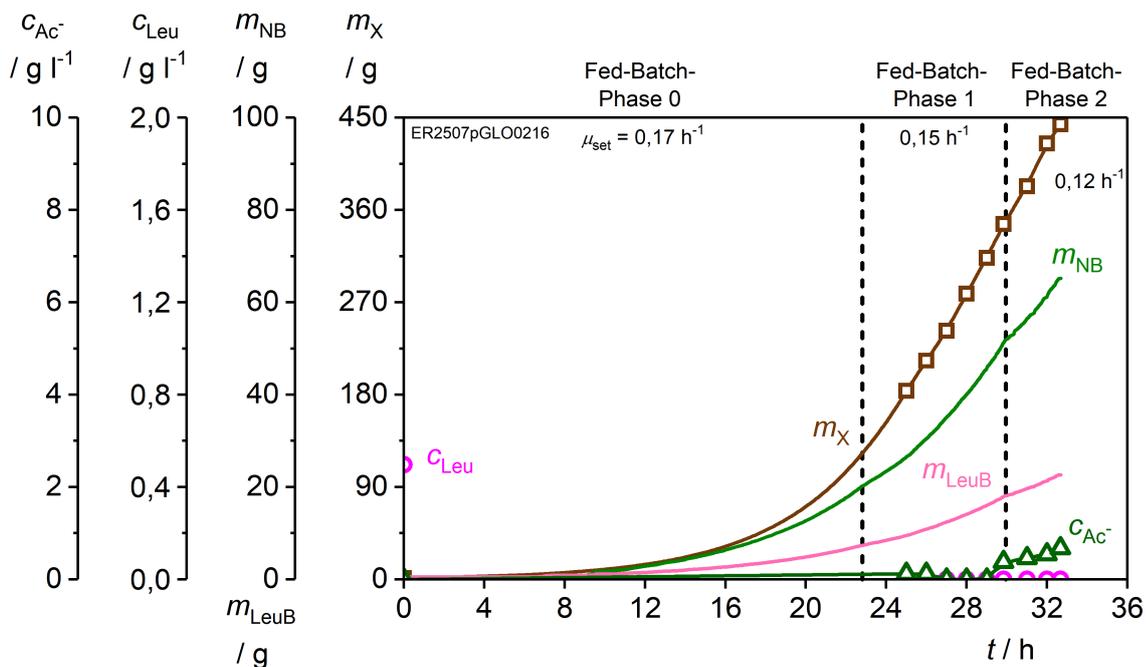


Abb. 5-22: iHDC-Verlauf mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO bei Annahme von $y_{X/Leu} \approx 20 \text{ g g}^{-1}$ mit $63,3 \text{ g l}^{-1}$ Leucin in Ammoniaklösung (25 %).

25 h auf 0 g l^{-1} abnahm. Die Basedosierung durch den pH-Regler erfolgte über die gesamte Prozessdauer exponentiell mit ersichtlicher Steigungsänderung bei den Reduktionen von μ_{set} . In der Schlussphase konnte lediglich ein minimaler Acetatanstieg auf nicht-inhibierend wirkende $0,7 \text{ g l}^{-1}$ beobachtet werden. Die moderate Nebenproduktbildung sowie der Biomassezuwachs scheinen zu bestätigen, dass die Kultur mit den notwendigen Nährstoffen ausreichend versorgt ist. Die Abweichung der spezifischen Wachstumsrate in der zweiten und dritten Wachstumsphase spricht für einen höheren Glucosebedarf im Energiestoffwechsel beim Erreichen hoher Zellmassen. Im Vergleich zur Kultivierung mit der Leucinunterversorgung (Abb. 5-21) konnte in dieser Kultivierung ein geringerer Unterschied im Leucinausbeutekoeffizienten in den ersten 25 h sowie in den Stunden danach bis zum Prozessende festgestellt werden. Mit $17,5 \text{ g g}^{-1}$ innerhalb der ersten 25 h bis zur zweiten Probenahme wurde bei beiden Versuchen vergleichbare Ausbeuten bestimmt. Anschließend stieg der Ausbeutekoeffizient bei ausreichender Leucindosierung auf konstant $19,8 \text{ g g}^{-1}$ und erreicht damit den zuvor angenommenen Wert.

Tab. 5-5: Endzellmasse, Stickstoffausbeutekoeffizient aus dosierter Base, Gesamtglucoseausbeutekoeffizient und Leucinausbeutekoeffizient für zwei Phasen als Mittelwerte der Kultivierungen ER2507pGLO0216, ER2507pGLO0416 sowie ER2507pGLO1116.

\bar{m}_X / g	$\bar{Y}_{X/\text{Leu}}$ / g g ⁻¹		$\bar{Y}_{X/\text{NB}}$ / g g ⁻¹	$\bar{Y}_{X/\text{Glc}}$ / g g ⁻¹
430 ± 12	17,3 ± 0,7 ¹	19,3 ± 0,4 ²	6,9 ± 0,2	0,38 ± 0,01

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei erfolgreichen Kultivierungen – ER2507pGLO0216, ER2507pGLO0416 und ER2507pGLO1116 – ist in Tab. 5-5 gezeigt. Der Batch ER2507pGLO0416 wurde aus zeitlichen Gründen vorzeitig bei einer verbrauchten Glucosemasse von 1097 g beendet, weshalb zu diesem Zeitpunkt mit 420,4 g die geringste Biomasse erreicht wurde. Für den Batch ER2507pGLO1116 wurde die Leucinkonzentration in der Base minimal auf $65,7 \text{ g l}^{-1}$ angehoben, um die Prozessrobustheit weiter zu erhöhen. In den drei erfolgreichen Kultivierungen wurde reproduzierbar Substrat-limitiertes Zellwachstum bis zum Prozessende beobachtet. Bis zur zweiten Probenahme lag der Leucinausbeutekoeffizient aufgrund des anfänglichen Leucinüberschusses circa 10 % unterhalb des Wertes für den betrachteten Zeitraum zwischen zweiter Probenahme und Kultivierungsende. Aus der dosierten Base

¹ Durchschnittlicher Leucinausbeutekoeffizient bis zur 2. Probenahme

² Durchschnittlicher Leucinausbeutekoeffizient zwischen 2. Probenahme und Kultivierungsende

konnten 6,9 g Biomasse pro 1 g Stickstoff und aus 1 g Glucose 0,38 g Biomasse erzeugt werden. Dabei wurde nicht berücksichtigt, dass $y_{X/Glc}$ in den einzelnen Fed-Batch-Phasen nicht konstant ist, wie zuvor für BL21 (DE3) gezeigt.

Wird eine geeignete Menge an Leucin im Startmedium und in der Base, berechnet aus dem ermittelten Leucinausbeutekoeffizienten sowie dem aus der Elementarzusammensetzung von *E. coli* abgeleiteten Stickstoffbedarf vorgelegt, kann in der iHDC-Variante auch der Leucin-auxotrophen K12 ER2507 sehr erfolgreich kultiviert werden – nach bestem Wissen wurde unter Verwendung eines synthetischen Mediums die bislang höchste bekannte Zellkonzentration mit diesem Stamm erzielt.

5.1.3.4 Einsatz der iHDC-Prozessvariante zur Produktion von GFP mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO

Mit einer Leucinkonzentration von 65,7 g l⁻¹ in 25 % Ammoniaklösung wurden die weiteren Kultivierungen durchgeführt. Die Induktion der GFP Expression erfolgte bei $\Delta OD_{600} = 180 \pm 10$ mit L-Arabinose (siehe 4.2.1.1).

Bis zum Erreichen der Induktionszelldichte ($\Delta OD_{600} = 173,5$) wuchsen die Zellen in Fed-Batch-Phase 0 beziehungsweise 1 näherungsweise mit der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate. Ein geringfügiger Anstieg der Acetatkonzentration auf 0,2 g l⁻¹ zu Beginn der GFP Produktion konnte beobachtet werden. In der Produktionsphase nahm sie zunächst leicht auf 0,6 g l⁻¹ zu, ehe zwischen den letzten beiden Proben ein deutlicher Anstieg auf 3,0 g l⁻¹ zu verzeichnen war. Der Biomassezuwachs auf 436 g in dieser Phase erfolgte bis zum Kultivierungsende mit 0,08 h⁻¹. Damit

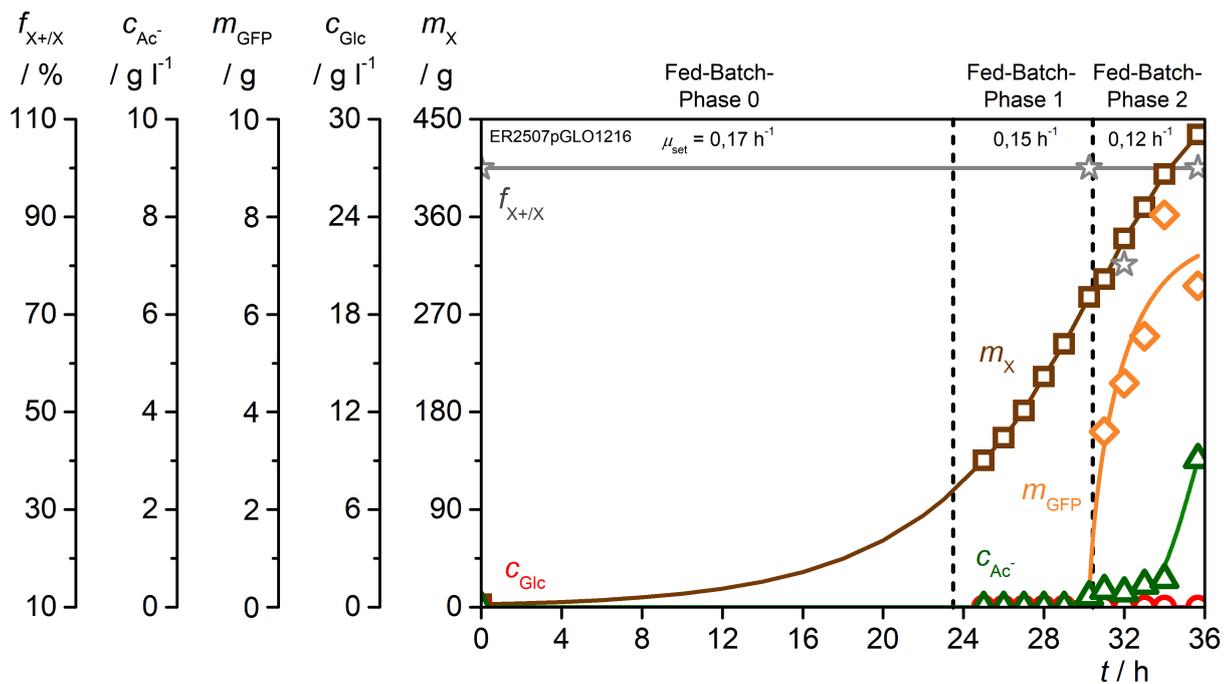


Abb. 5-23: Bio-, GFP-Masse, Konzentration an Glucose und Acetat in der Flüssigphase sowie der Anteil plasmidhaltiger Zellen als Funktion der Zeit im induzierten iHDC-Prozess mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO.

konnte μ_{set} zwar nicht erreicht werden, allerdings konnte auch keine deutliche Abnahme wie bei der Produktion von HTT-Rab11a mit *E. coli* BL21 (DE3) beobachtet werden. Die Abweichung zwischen der tatsächlichen spezifischen Wachstumsrate und μ_{set} ist auch hier wahrscheinlich auf einen steigenden Glucosebedarf für Erhaltungstoffwechsel zurückzuführen, welcher bei der Berechnung der Nachfütterungsrate nicht in der richtigen Höhe berücksichtigt wurde. Abb. 5-23 zeigt die Daten der Kultur, die über die Gesamtprozessdauer Glucose-limitiert wuchs.

Die gelelektrophoretischen Rohdaten, die der GFP Massenberechnung zugrunde liegen, sind in Spur 1 bis 6 der Abb. 5-24 dargestellt. Die größte Produktzunahme konnte innerhalb 45 min nach Induktion beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen 3,6 g GFP im Reaktor vor. Der weitere Anstieg kann durch einen Sättigungsverlauf beschrieben werden. In 5,4 h wurden GFP 6,6 g gebildet. In zwei Kultivierungen konnte jedoch circa 3,5 h nach Induktion eine höhere Produktkonzentration als am Kultivierungsende ermittelt werden. Als Ursache der Intensitätsabnahme der Zielproduktbande bei 26,9 kDa von Spur 5 zu 6 sowie Spur 14 zu 15 kann eine Degradation des Fremdproteins durch Proteasen nicht ausgeschlossen werden (wurde analytisch nicht untersucht), wobei anzumerken ist, dass GFP aufgrund seiner Struktur als recht stabil anzusehen ist. Trotzdem sollte die Produktionsdauer so gestaltet werden, dass nur mit einem minimalen Produktverlust zu rechnen ist. Wie Abb. 5-23 verdeutlicht, ist ein Plasmidverlust nicht für die abnehmende Produktivität verantwortlich. Der Anteil plasmidhaltiger Zellen war konstant 100 %. Vielmehr scheint die zunehmende metabolische Belastung durch die Fremdproteinsynthese und die Akkumulation des Zielproteins in der Zelle ursächlich hierfür zu sein, wodurch zusätzlich der starke Acetatanstieg am Ende der Kultivierung erklärt werden kann.

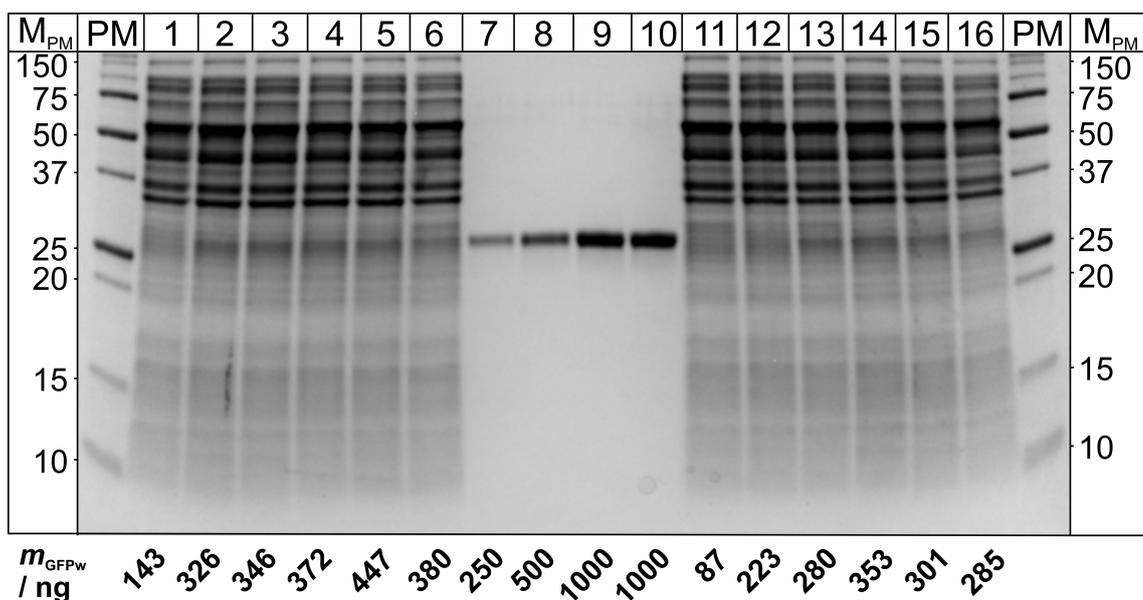


Abb. 5-24: Quantifizierung der GFP-Masse im iHCDC-Prozess mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO mittels SDS-PAGE. PM: Protein Marker (Precision Plus Protein™, Bio-Rad); Produktproben von ER2507pGLO1216 mit Zeit ab Induktion 1: 0 h, 2: 0,75 h, 3: 1,75 h, 4: 2,75 h, 5: 3,75 h, 6: 5,42 h; Standards in ng 7: 250, 8: 500, 9: 1000, 10: 1000; Produktproben von ER2507pGLO0516 mit Zeit nach Induktion 11: 0 h, 12: 1,25 h, 13: 2,25 h, 14: 3,25 h, 15: 4,25 h, 16: 4,75 h. Angabe von m_{GFP} nach Quantifizierung mit linearer Kalibrierfunktion mit Image Lab (Bio-Rad).

Im Vergleich zu BL21 (DE3) pET-28a (5.1.2.1) wurden mit K12 ER2507 pGLO wesentlich geringere Produktmassen erzielt, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass dieser Stamm ausschließlich die weniger effiziente wirtseigene RNA-Polymerase nutzt. Ansonsten wurde hier mit einer maximalen spezifischen GFP Bildungsrate von $(5,3 - 6,8) \text{ mg (g h)}^{-1}$ eine vergleichbare Produktivität, wie bei der GFP Produktion in Batch Kultivierungen mit *E. coli* MG1655 ($5,8 \text{ mg (g h)}^{-1}$) beziehungsweise MG1655 $\Delta arcA \Delta iclR$ ($6,7 \text{ mg (g h)}^{-1}$) erreicht (Waegeman et al. 2013). In einem HCDC-Elektrodialyseprozess mit *E. coli* K12 TG1 pGLO und gleicher Medienzusammensetzung, wie in der vorliegenden Arbeit, konnten Wong et al. (2009) 1,02 g GFP bei einer Gesamtbiomasse von 104 g in 6 l Kulturbrühe produzieren. Induziert wurde dort mit $2,5 \text{ g l}^{-1}$ Arabinose, sodass eine höhere zellspezifische Induktormenge vorlag. Wird der Biomasseunterschied berücksichtigt, wurden vergleichbare GFP Massen erzielt.

Mit einer Variante des iHCDC-Prozesses wurde eine Strategie für *E. coli* K12 ER2507 pGLO entwickelt, welche am Prozessende die Produktion von $(6,1 \pm 0,7)^1 \text{ g GFP}$ und einer kumulativen Biomasse von $(438 \pm 3) \text{ g}$ erlaubt. Durch Reduktion der Leucinstartkonzentration könnte der Prozess eventuell noch etwas effizienter gestaltet werden, da wegen des vorgelegten Leucins im Startmedium der Ausbeutekoeffizient zu Beginn schon deutlich verringert ist, siehe auch Batch Kulturen/SVP. Für die Vergleichbarkeit weiterer Kultivierung wurde darauf verzichtet.

¹ Dieser Wert entspricht nicht der maximalen Masse an GFP. In beiden Kultivierungen wurde der Maximalwert vor dem Prozessende erreicht. $\bar{m}_{\text{GFPmax}} = (7,4 \pm 0,9) \text{ g}$ in $(3,25 - 3,75) \text{ h}$ nach Induktorzugabe.

5.2 Entwicklung eines neuen Mediums zur Erhöhung von Prozessrobustheit und Einsetzbarkeit im Pharmabereich – i²HCDC

Nach der erfolgreichen Weiterentwicklung des HCDC-Prozesses zum iHCDC-Verfahren stellt die Entwicklung einer neuen Medienformulierung für das Start- und Nachfütterungsmedium den zweiten zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Unter der Prämisse, dass ein Kulturmedium so einfach wie möglich aufgebaut sein soll, Fällungsreaktionen zu vermeiden sind und die Versorgung mit Nährstoffen idealerweise im Maße der Metabolisierungsrate erfolgt, wurde das Startmedium für die Hochzelldichte-Kultivierung grundlegend überarbeitet, wie in Abb. 5-25 schematisch skizziert. Für den neuen Prozess, bezeichnet als i²HCDC, wurden mit Ausnahme von KH_2PO_4 sowie die für auxotrophe Stämme benötigten Substanzen (z. B. Thiamin, Leucin etc.) alle Komponenten aus dem Startmedium entfernt. Im Vergleich zum Startmedium für den HCDC-Prozess bedeutet dies eine Reduktion um 12 Komponenten, wie der Tab. 5-6 zu entnehmen ist. Daraus resultieren entscheidende Vorteile, wie die Verhinderung

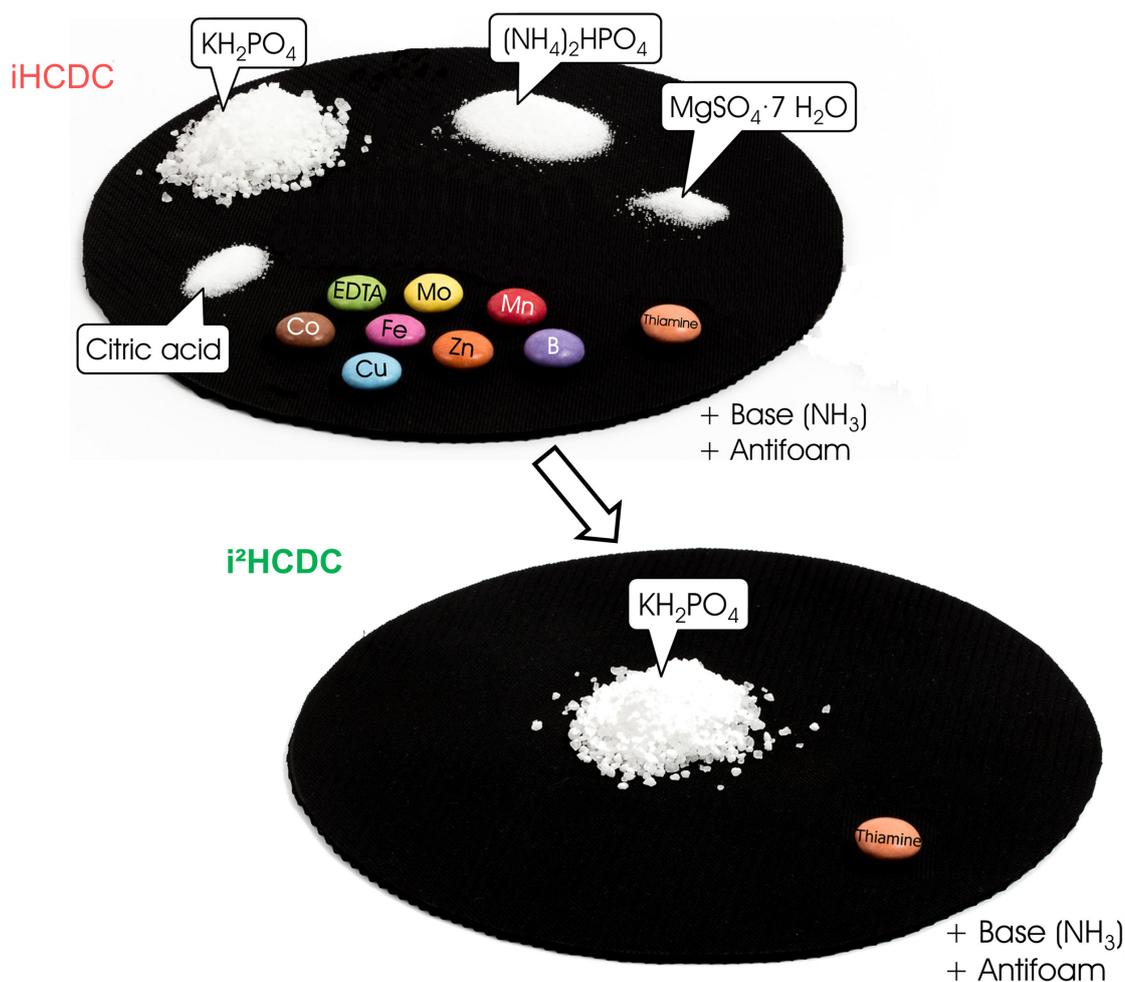


Abb. 5-25: Änderung des Startmediums für den i²HCDC-Prozess ausgehend vom iHCDC-Medium.

der Präzipitation von Magnesiumammoniumphosphat und ebenso von Korrosionseffekten an der Prozessanlage sowie die Zersetzung von Diammoniumhydrogenphosphat während der thermischen Sterilisation. Zusätzlich kann der Zusatz von Citronensäure, welche im iHCDC/HCDC-Verfahren lediglich zur Medienstabilisierung benötigt wird, komplett entfallen.

Tab. 5-6: Startmedienzusammensetzung für die verschiedenen Prozessvarianten.

Komponente	Konzentration		
	HCDC/iHCDC	i ² HCDC	
Glucose	25,0 / -	-	g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	13,3	17,42	g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0	-	g l ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2	-	g l ⁻¹
Citronensäure · 1H ₂ O	1,7	-	g l ⁻¹
Titriplex III	8,4	-	mg l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,5	-	mg l ⁻¹
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,5	-	mg l ⁻¹
H ₃ BO ₃	3,0	-	mg l ⁻¹
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	15,0	-	mg l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,5	-	mg l ⁻¹
Zn(CH ₃ -COO) ₂ · 2 H ₂ O	13,0	-	mg l ⁻¹
Fe(III)-citrat Hydrat	100,0	-	mg l ⁻¹
Thiamin · HCl	4,5	4,5	mg l ⁻¹

Da die Bereitstellung von Stickstoff im Kultivierungsverlauf ohnehin über die Ammoniaklösung erfolgen muss, kann Ammoniak auch zur Herstellung des Puffersystems im Startmedium verwendet werden. Erst nach der thermischen Sterilisation wird die Phosphatlösung im Reaktor durch Titration mit Ammoniak auf den gewünschten pH-Wert von 6,6 gebracht und gleichzeitig das Puffersystem erzeugt und die anfängliche Ammoniumkonzentration reproduzierbar eingestellt. Da eine konzentrierte Feedlösung für das Erreichen hoher Zellkonzentrationen unerlässlich ist, soll die Versorgung mit den übrigen wachstumsrelevanten Substanzen – Glucose, Magnesiumsulfat und Spurenelementen – ausschließlich durch die Feedzugabe erfolgen. Darüber hinaus soll mittels SVP untersucht werden, ob auf die Zugabe der human- und umwelttoxischen Komponenten Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid verzichtet werden kann, ohne einen nennenswerten Biomasse- und Produktverlust in Kauf nehmen zu müssen.

5.2.1 Auswirkung auf die Endzelldichte im Hochzelldichte-Kultivierungsprozess

Die Auswirkung der Medienänderung auf die Endzellkonzentration wurde zunächst mit einem nicht-rekombinanten *E. coli* BL21 Stamm untersucht. Die Zusammensetzung der Feedlösung ist in Tab. 5-7 aufgeführt. Im Vergleich zur iHCDC mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a und K12 ER2507 pGLO wurde auf den Zusatz des Komplexbildners Titriplex III verzichtet, die Glucosekonzentration im Feed auf 700 g l^{-1} eingestellt und die Eisencitrat-Hydrat Konzentration moderat auf 250 mg l^{-1} erhöht, da kein Eisen über das Startmedium zugesetzt wird. Mit Ausnahme von Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid wurde die Konzentration der übrigen Komponenten gegenüber dem iHCDC-Verfahren nicht variiert.

Tab. 5-7: Zusammensetzung der Feedlösung zur Untersuchung der Biomasseproduktivität mit *E. coli* BL21 im i²HCDC-Verfahren.

Komponente	Konzentration
Glucose	700 g l^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$20,0 \text{ g l}^{-1}$
Titriplex III	- mg l^{-1}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0; 4; 8 mg l^{-1}
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	2,5 mg l^{-1}
H_3BO_3	0; 5; 10 mg l^{-1}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0; 23,5; 47 mg l^{-1}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	4,0 mg l^{-1}
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	16,0 mg l^{-1}
Fe(III)-citrat Hydrat	250,0 mg l^{-1}

Bis zum Erreichen von $\Delta OD_{600} = 180 \pm 10$ erfolgte die Nachfütterung in den Fed-Batch-Phasen 0 und 1 nach Gleichung (3.7) durchgängig mit $\mu_{\text{set}} = 0,30 \text{ h}^{-1}$. Anschließend wurde die spezifische Wachstumsrate auf $0,15 \text{ h}^{-1}$ reduziert. Zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 15 % geregelt. Im Unterschied zu allen gezeigten Kultivierungen mit *E. coli* BL21 (DE3) wurde das Inokulumvolumen auf 200 ml reduziert und das Medium mit einer Glucosekonzentration von 6 g l^{-1} hergestellt, um die geringere Biomassekonzentration möglichst früh an die Prozessbedingungen im Reaktor zu adaptieren.

Mithilfe eines vollfaktoriellen Versuchsplans mit Faktorvariation auf zwei Stufen wurde der Einfluss der Cobaltchlorid-, Borsäure- und Manganchloridkonzentration in der Feedlösung auf die zu erzeugende Biomasse untersucht. Dazu wurden für die unterschiedlichen Elemente je drei Konzentrationen (Tab. 5-7, 5-8) eingestellt.

Tab. 5-8: Vollfaktorieller Versuchsplan zur Prüfung des Einflusses toxischer Medienkomponenten beim i²HCDC-Prozess. Nach drei Experimenten wurden die Arbeiten abgebrochen und das Experiment N₁ zweifach reproduziert, siehe Text.

N _i	C _{CoCl₂ · 6H₂O} / mg l ⁻¹	C _{H₃BO₃} / mg l ⁻¹	C _{MnCl₂ · 4H₂O} / mg l ⁻¹	m _{Xend} / g
N ₁₋₁	0	0	0	473
N ₂	8	0	0	-
N ₃	0	10	0	452
N ₄	8	10	0	-
N ₅	0	0	47	-
N ₆	8	0	47	-
N ₇	0	10	47	-
N ₈	8	10	47	-
N ₉	4	5	23,5	-
N ₁₀	4	5	23,5	464
N ₁₁	4	5	23,5	-
N ₁₋₂	0	0	0	472
N ₁₋₃	0	0	0	455

Da schon das zweite Experimente (N₃) der Reduktion auf ein einziges der kritischen Komponenten mit 452 g Biomasse praktisch die gleiche Zelldichte wie Experiment N₁₀ am Zentralpunkt mit 464 g Biomasse lieferte, wurde die Versuchsreihenfolge geändert. Abweichend von der von MODDE vorgegebenen Reihenfolge wurde die Kultivierung ohne Zusatz der drei toxischen Komponenten vorgezogen. Da die Zellmasse sogar auf 473 g anstieg, wurde das Experiment N₁ zweifach reproduziert. Die mittlere Biomasse aus drei Kultivierungen beträgt (466 ± 10) g und ist damit identisch zum iHCDK Referenzwert¹ aus vier Kultivierungen mit (463 ± 10) g.

Die Spannweite der Messdaten ist mithilfe eines Boxplots in Abb. 5-26 dargestellt. Berücksichtigt man die fünf Kultivierungen aus Tab. 5-8, so wurden im Mittel 463 g Biomasse erzeugt. Mit einem *IQR* von 17,2 g ist die Streuung der mittleren 50 % der Messdaten um das arithmetische Mittel als gering zu bewerten. Zudem weichen Minimal- und Maximalwert (unterer und oberer Whisker) nicht signifikant von den mittleren 50 % der Messdaten ab. Die beobachtete Streuung wird daher als nicht-signifikante Schwankung betrachtet.

¹ Kumulative, mittlere Biomasse aus vier Kultivierung mit *E. coli* BL21 erzeugt aus 1050 g Glc.

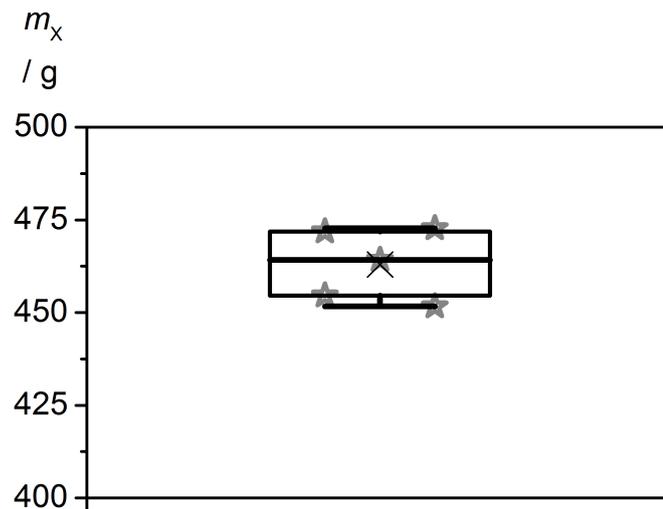


Abb. 5-26: Verteilung der Biomassedaten der Medienoptimierung im i²HCDC-Prozess mittels SVP. Kenngrößen der deskriptiven Statistik: Arithmetisches Mittel (\bar{X}) $\bar{m}_{X\text{end}} = 463,0 \text{ g}$, $IQR = 17,2 \text{ g}$, Median $\tilde{m}_{X\text{end}} = 464,2 \text{ g}$, NV liegt vor.

Abb. 5-27 zeigt einen typischen Wachstumsverlauf von *E. coli* BL21 im i²HCDC-Verfahren ohne Supplementierung mit Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid. Bedingt durch die Animpfzellichte und Wachstum mit der eingestellten spezifischen Wachstumsrate fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration ausgehend vom Sättigungszustand innerhalb von circa 11 h auf den Sollwert, welcher zunächst durch Erhöhung der Rührerdrehzahl und anschließend durch Anreicherung der Zuluft mit Sauerstoff konstant gehalten wurde. In Fed-Batch-Phase 0 und 1 wuchs der Organismus mit durchschnittlich $0,31\text{h}^{-1}$ bis nach 20 h $\Delta OD_{600} = 179$ erreicht wurde. Nach Reduktion von

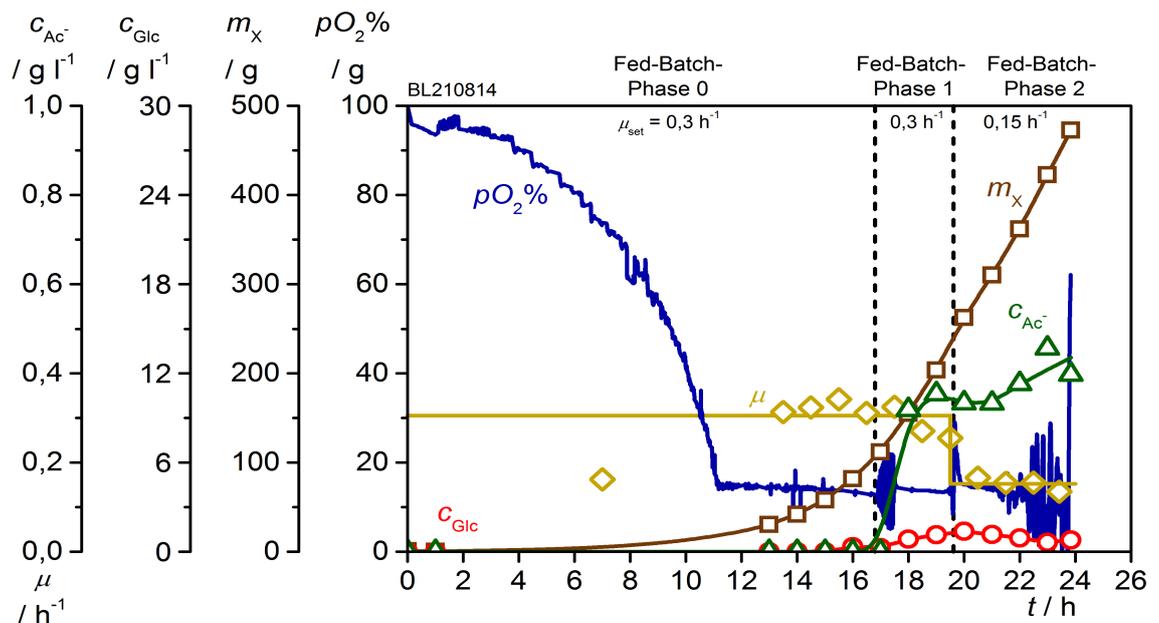


Abb. 5-27: Prozessgrößen in einem i²HCDC-Prozess ohne Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid. Messwerte der Gelöstsauerstoffkonzentration wurden geglättet (Savitzky-Golay Methode, für $t \leq 18 \text{ h}$ mit Schrittweite 3, für $t > 18 \text{ h}$ mit Schrittweite 50). Spezifische Wachstumsrate in den Fed-Batch-Phasen 0 und 1 als arithmetisches Mittel aus den Werten zwischen 13 und 20 h und in Fed-Batch-Phase 2 zwischen 20 und 23,8 h.

μ_{set} wurde bis zum Kultivierungsende eine spezifische Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ gehalten und insgesamt 473 g Biomasse erzeugt.

Nach 18 h stieg die Acetatkonzentration steil auf $0,32 \text{ g l}^{-1}$ und blieb wegen der reduzierten Nachfütterungsrate in Fed-Batch-Phase 2 nahezu unverändert, um nach 22 h noch etwas zu steigen. Scheinbar stieg die Glucosekonzentration bis zum Übergang in Fed-Batch-Phase 2 auf $1,4 \text{ g l}^{-1}$ an, um dann etwas zu sinken. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die fortwährenden Änderungen der Matrix zu Fehlern bei der Bestimmung der Glucosekonzentration führten. Wird für die Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate die Monod-Kinetik zugrunde gelegt, hätte bei dieser Substratkonzentration eine wesentlich höhere spezifische Wachstumsrate beobachtet werden müssen. Für Wachstum von *E. coli* mit Glucose können Werte für die Glucoseaffinitätskonstante K_{Glc} in einem weiten Bereich von $(0,05 - 100) \text{ mg l}^{-1}$ gefunden werden (Egli 1995). Folglich wäre die spezifische Wachstumsrate bei der scheinbar vorliegenden Glucosekonzentration annähernd μ_{max} .

Abb. 5-28 stellt die erzeugte Biomasse der verbrauchten Glucose-, Stickstoff- aus Basezugabe, Sauerstoff- und gebildeten Kohlenstoffdioxidmasse gegenüber mit Angabe des jeweiligen Ausbeutekoeffizienten nach Regressionsanalyse aller Werte von drei Kultivierungen. Analog zu den Beobachtungen in den Kultivierungen BL21DE3pET0315 und BL21DE3pET0715 – iHDC-Prozess, 5.1.1.2 – mit dem rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a nahm die Biomasseausbeute aus Glucose von $0,49 \text{ g g}^{-1}$ in den Phasen 0 und 1 deutlich nach Reduktion der spezifischen Wachstumsrate in Fed-Batch-Phase 2 auf $0,40 \text{ g g}^{-1}$ ab. Der Baseverbrauch war in den betrachteten Kultivierungen ebenfalls nicht identisch. Insbesondere im Versuch BL210814 wurde mehr Ammoniaklösung dosiert, ohne dass eine stärkere Nebenproduktbildung (Carbonsäuren) nachgewiesen werden konnte. Auch hier dürften apparative Gründe und Unterschiede in der Konzentration der verwendeten Ammoniaklösung die Ursache sein. Im Mittel betrug $y_{\text{X/NB}} = 7,28 \text{ g g}^{-1}$. Wie in Abb. 5-28 C ersichtlich, nahm die Biomasseausbeute aus Sauerstoff in Fed-Batch-Phase 2 von $1,25 \text{ g g}^{-1}$ in den Phasen 0 und 1 deutlich auf $0,77 \text{ g g}^{-1}$ ab. Analog dazu wurde ein entsprechender Anstieg an gebildetem Kohlenstoffdioxid beobachtet.

Zwischen spezifischer Verbrauchs- beziehungsweise Bildungsrate und der Wachstumsrate besteht, ausgedrückt über den Ausbeutekoeffizienten, eine direkte Proportionalität. Bei einem phasenunabhängigen, konstanten Ausbeutekoeffizienten führt somit eine beliebige Änderung der spezifischen Wachstumsrate zu der gleichen relativen Änderung der spezifischen Verbrauchsrate. Wie Tab. 5-9 verdeutlicht, gilt das für Glucose nur bedingt. Bei Halbierung der spezifischen Wachstumsrate in Fed-Batch-Phase 2 nahm $q_{\text{Glc/X}}$ lediglich um 41 % ab. Die für den Erhaltungsstoffwechsel benötigte Glucose ist Zellmassen-abhängig, aber nicht von der spezifischen Wachstumsrate. Das wird an dieser Stelle sichtbar.

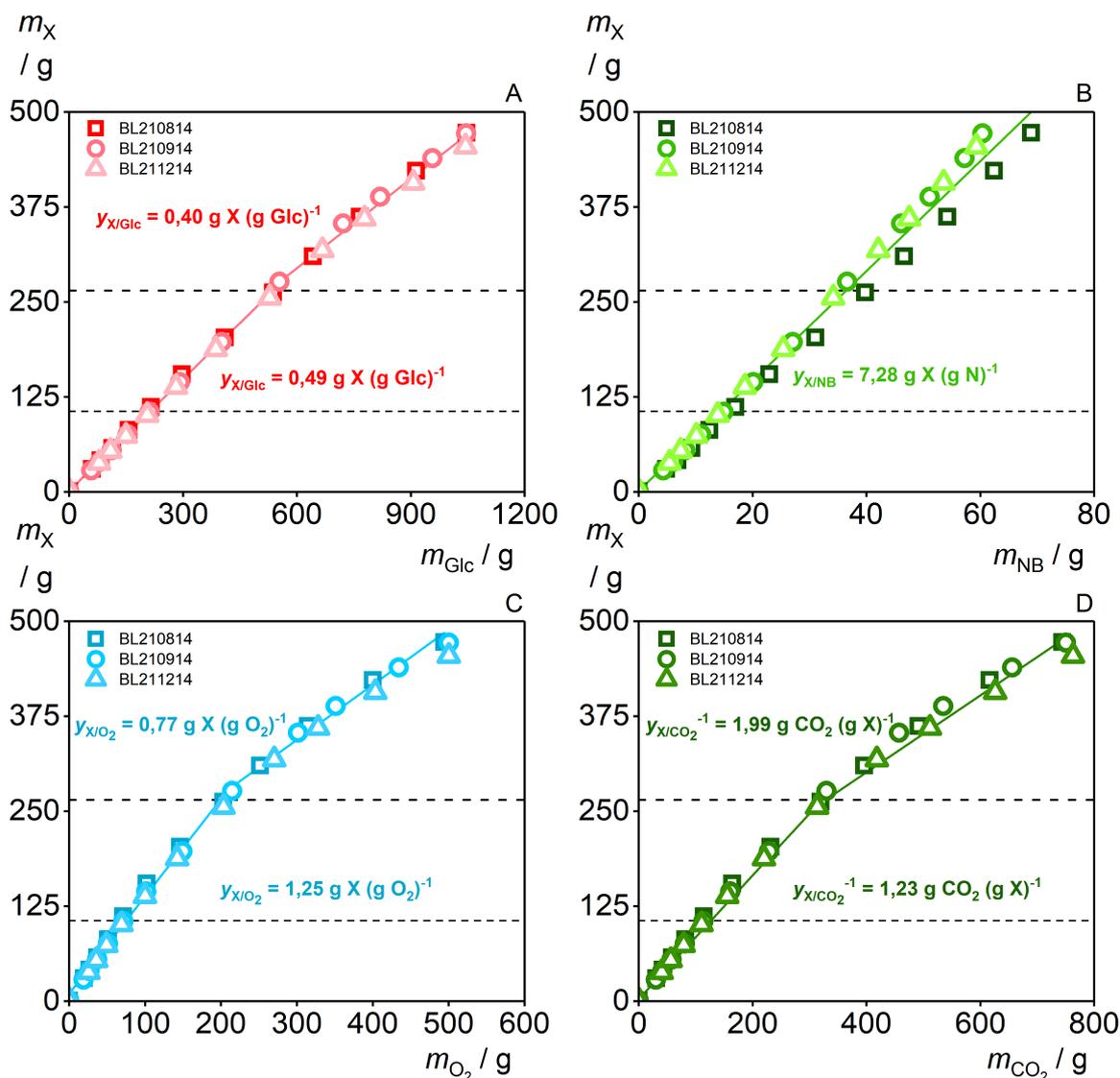


Abb. 5-28: Ausbeutekoeffizienten für Glucose (A), Stickstoff aus Basezugabe (B), Sauerstoff (C) und Kohlenstoffdioxid (D) für *E. coli* BL21 im i²HDCD-Verfahren ohne Zusatz von Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid. Die Ausbeutekoeffizienten sind arithmetische Mittelwerte nach abschnittsweiser Regression der Daten von drei Kultivierungen. Zur Berechnung der verbrauchten O₂-Masse und der gebildeten CO₂-Masse aus Abgasanalysendaten wurde der von der DCU ausgegebene Wert für die Sauerstoffbegasungsrate um seinen Offset von 0,07 l min⁻¹ korrigiert.

Auch die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate sowie die Kohlenstoffdioxidbildungsrate beträgt nach Halbierung der spezifischen Wachstumsrate in Fed-Batch-Phase 2 nicht die Hälfte, was wie bei Glucose auf den Anstieg des Erhaltungstoffwechselanteils zurückzuführen ist.

Tab. 5-9: Ausbeutekoeffizienten und spezifische Aufnahme-/Bildungsraten für Glucose und Stickstoff aus Basezugabe in einem i²HCDC-Prozess mit *E. coli* BL21 ohne Zugabe toxischer Spurenelemente. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate in Fed-Batch-Phase 0 und 1 betrug $(0,306 \pm 0,003) \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $(0,145 \pm 0,007) \text{ h}^{-1}$ in Phase 2.

Phase	$Y_{X/\text{Glc}}$ / g g^{-1}	$q_{\text{Glc}/X}$ / g (g h)^{-1}	$Y_{X/\text{NB}}$ / g g^{-1}	$q_{\text{NB}/X}$ / g (g h)^{-1}
0/1	$0,490 \pm 0,007$	$0,625 \pm 0,004$	$7,276 \pm 0,495$	$0,042 \pm 0,003$
2	$0,396 \pm 0,015$	$0,367 \pm 0,006$		$0,020 \pm 0,002$

Tab. 5-10: Ausbeutekoeffizienten und spezifische Aufnahme-/Bildungsraten in einem i²HCDC-Prozess mit *E. coli* BL21 für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate für den betrachteten Abschnitt in Fed-Batch-Phase 0 und 1 betrug $(0,315 \pm 0,004) \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $(0,154 \pm 0,003) \text{ h}^{-1}$ in Phase 2. ¹

Phase	Y_{X/O_2} / g g^{-1}	$q_{\text{O}_2/X}$ / g (g h)^{-1}	Y_{X/CO_2}^{-1} / g g^{-1}	$q_{\text{CO}_2/X}$ / g (g h)^{-1}
0/1	$1,251 \pm 0,033$	$0,252 \pm 0,006$	$1,235 \pm 0,025$	$0,389 \pm 0,004$
2	$0,766 \pm 0,035$	$0,201 \pm 0,005$	$1,986 \pm 0,111$	$0,306 \pm 0,011$

Die Ergebnisse zeigen, dass das Startmedium stark vereinfacht werden kann. Die Komponenten Diammoniumhydrogenphosphat, Citronensäure und Titriplex III können vollständig entfernt werden, wenn durch Aufstockung des Kaliumdihydrogenphosphats die eingesetzte Phosphatmenge beibehalten wird. Zudem kann auf den Zusatz der kritischen Spurensalze (Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid) verzichtet werden. Darüber hinaus kann durch den Wegfall des Spurensatzes im Startmedium die Menge an Magnesiumsulfat, Kupferchlorid, Natriummolybdat sowie Zinkacetat, die sich kumulativ aus Start- und Nachfüttermedium ergibt, signifikant gegenüber dem HCDC/iHCDC-Medium reduziert werden (siehe Abb. 5-29), ohne die maximal zu erreichende Biomasse zu beeinträchtigen. Überraschend können die toxischen Komponenten, obwohl sie teilweise Bestandteil mikrobieller Enzymsysteme sind, auch aus der Feedlösung entfernt werden. Entweder ist der tatsächliche Bedarf an Spurenelementen wesentlich geringer oder Verunreinigungen in eingesetzten Substanzen oder das Herauslösen aus Behältern und anderen Anlagenkomponenten deckt den Bedarf.

¹ Abweichung von μ gegenüber Angaben in Tab. 5-9 da in Phase 0/1 der erste und in Phase 2 der letzte Wert nicht in die Berechnung eingeht.

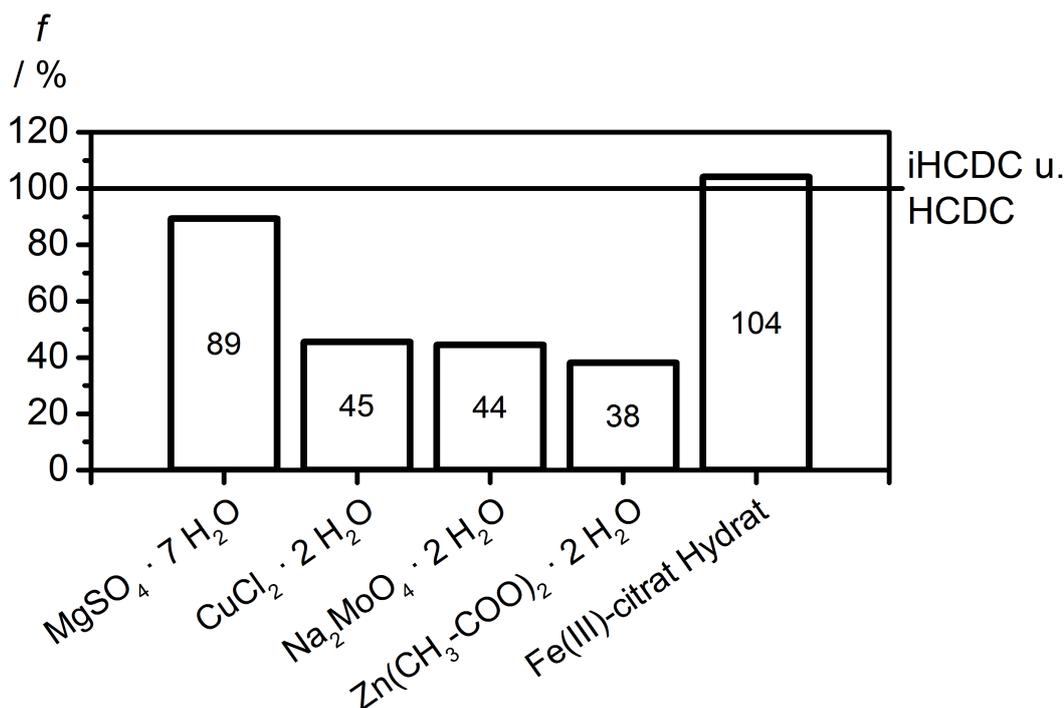


Abb. 5-29: Reduktion der eingesetzten Masse ausgewählter Substanzen im i²HCDC-Prozess mit *E. coli* BL21. Angaben beziehen sich relativ zur kumulativen Substanzmasse aus 3 l Startvolumen und 1,5 l Feedlösung des iHCDC-Mediums beziehungsweise HCDC nach Korz et al. (1995).

Die Festlegung der Konzentrationen einzelner Spurenelemente in Kulturmedien erfolgt häufig aus Erfahrungswerten, da quantitative Angaben über den realen Bedarf häufig nicht bekannt sind. Korz (1993) konnte für *E. coli* K12 TG1 nach der Inokulation des Bioreaktors bei allen Metallionen eine starke Konzentrationsabnahme beobachten. Diese führte er auf Bindungseffekte der Metallionen an der Zelloberfläche zurück, so dass sie nicht zur Erzeugung von Biomasse genutzt werden. Im weiteren Prozessverlauf unterscheiden sich die Raten, mit denen die einzelnen Elemente verstoffwechselt werden, deutlich voneinander. Ein proportionaler Zusammenhang besteht zwischen der Biomassezunahme und dem Verbrauch der Elemente Eisen und Zink, welche nach Porcheron et al. (2013) in lebenden Organismen die beiden häufigsten Übergangsmetallionen sind. Bei ausreichender Versorgung mit diesen beiden Elementen konnte Korz (1993) keinen signifikanten Verbrauch an Kupfer, Cobalt und Mangan beobachten. Stattdessen fungiert insbesondere Cobalt als Substitutionselement, welches verbraucht wird, sobald Eisen und Zink nicht weiter zur Verfügung stehen. Diese Substitution von Metallionen ist für diverse Metalloenzyme in unterschiedlichen Mikroorganismen beschrieben (Shumilina et al. 2014; Ma et al. 2009; Butler 1998). Aufgrund der ausreichenden Versorgung mit Eisencitrat-Hydrat scheint hier eher die Kompensation fehlender Metallionen wie Cobalt und Mangan durch dieses Element sehr wahrscheinlich.

Ein weiterer Aspekt ist die Bereitstellung von Cobalt, Bor und Mangan über Verunreinigungen in den übrigen Medienkomponenten. Laut Herstellerspezifikation enthält das eingesetzte Kaliumdihydrogenphosphat weniger als 5 ppm Cobalt und Mangan. Somit würde im Grenzfall bei einem Startvolumen von 3 l eine Masse an Cobalt und Mangan

von 261 µg im Startmedium vorliegen. Im Vergleich dazu würde bei der CP Einstellung beider Komponenten (siehe Tab. 5-8) durch Zugabe von 1,5 l Feedlösung 1486 µg Cobalt beziehungsweise 9785 µg Mangan bis zum Prozessende dosiert werden. Unter Annahme eines wesentlich geringeren Bedarfs an diesen Elementen als im Allgemeinen zugesetzt, Substitution durch andere Ionen und weiteren Verunreinigungen in anderen Medienkomponenten, welche in den Analysendaten der Hersteller nicht aufgeführt sind, ist diese geringe Masse an Cobalt und Mangan offensichtlich für die Erfüllung ihrer zellbiologischen Aufgaben ausreichend und erlaubt das reproduzierbare Erreichen hoher Zelldichten.

Klumpp et al. (2009) fassen zusammen, dass verschiedene Medien für die Kultivierung von *E. coli* zu Zellen mit identischer Makromolekülzusammensetzung führen, solange diese Medien Wachstum mit gleicher spezifischer Wachstumsrate ermöglichen. Da es mit dem modifizierten Medium für die i²HCDC gelingt, die gleiche spezifische Wachstumsrate zu erreichen, erwarte ich trotz der massiven Medienänderung die gleiche Zusammensetzung der Zellen wie beim HCDC- und iHCDC-Prozess.

5.2.2 Produktivitätsvergleich der i²HCDC mit den Vorgängervarianten anhand der Herstellung von HTT-Rab11a

Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den Vorgängervarianten wurde eine Glucosekonzentration von 750 g l^{-1} in der Feedlösung eingestellt. Zur Sicherstellung der Verfügbarkeit der verbleibenden Spuren wird der Feedlösung wieder der Komplexbildner Titriplex III (1,5-fache Menge gegenüber Korz et al. (1995)) zugesetzt, da ohne eine kleine Menge Präzipitat beobachtet wurde. Hinsichtlich Kupferchlorid, Natriummolybdat und Zink-Acetat wird die extreme Reduktion (nur Feedmenge nach Korz et al. (1995)) wieder zurückgenommen und auf das 1,5-fache der dort angegebenen Werte festgesetzt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit erfolgte die Einstellung der spezifischen Wachstumsrate in den Fed-Batch-Phasen 0 bis 2 analog zur iHCDC mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a (5.1.2).

5.2.2.1 Medienoptimierung mittels SVP

Zur quantitativ sicheren Prüfung, ob auf die Zugabe von Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid auch im Hinblick auf die Produktbildung verzichtet werden kann, wurde der Einfluss auf die HTT-Rab11a- und Biomassebildung sowie die lösliche Zielproteinfraktion mittels SVP in einem vollfaktoriellen Versuchsplan mit Variation auf zwei Stufen untersucht. Tab. 5-11 zeigt links den Versuchsplan und rechts die Ergebnisse.

Tab. 5-11: Faktoreinstellungen und Ergebnisse der Medienoptimierung für die HTT-Rab11a Expression in *E. coli* BL21 (DE3) im i²HCDC-Verfahren.

N_i	$C_{\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}$ / mg l^{-1}	$C_{\text{H}_3\text{BO}_3}$ / mg l^{-1}	$C_{\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}}$ / mg l^{-1}	$m_{\text{HTT-Rab11a end}}$ / g	m_{Xend} / g	$f_{i/\text{totend}}$ / %
N ₁	0	0	0	34,6	402	83,8
N ₂	6	0	0	32,3	426	80,1
N ₃	0	7,5	0	31,6	403	75,2
N ₄	6	7,5	0	25,7	400	85,1
N ₅	0	0	35,25	27,3	415	80,6
N ₆	6	0	35,25	32,4	403	83,0
N ₇	0	7,5	35,25	26,9	417	88,3
N ₈	6	7,5	35,25	28,7	395	81,6
N ₉	3	3,75	17,625	34,5	425	90,0
N ₁₀	3	3,75	17,625	29,7	396	75,4
N ₁₁	3	3,75	17,625	28,2	431	86,5

Bevor die Modellbildung mithilfe von MODDE erfolgen konnte, wurden die Daten zur Prüfung auf Normalverteilung und zur Auffindung von Ausreißern der Rohdatenanalyse unterzogen. Trotz ausgeprägter Linksschiefe für die Biomassedaten, erkennbar an der stark asymmetrisch nach unten verschobenen Medianlinie im Boxplot (Abb. 5-30 B), liegt den Daten bei einem Signifikanzniveau von 0,05 eine Normalverteilung

zugrunde. Wie im Boxplot in Abb. 5-30 zu erkennen und durch den Grubbs-Test bestätigt, konnte kein Ausreißer gefunden werden.

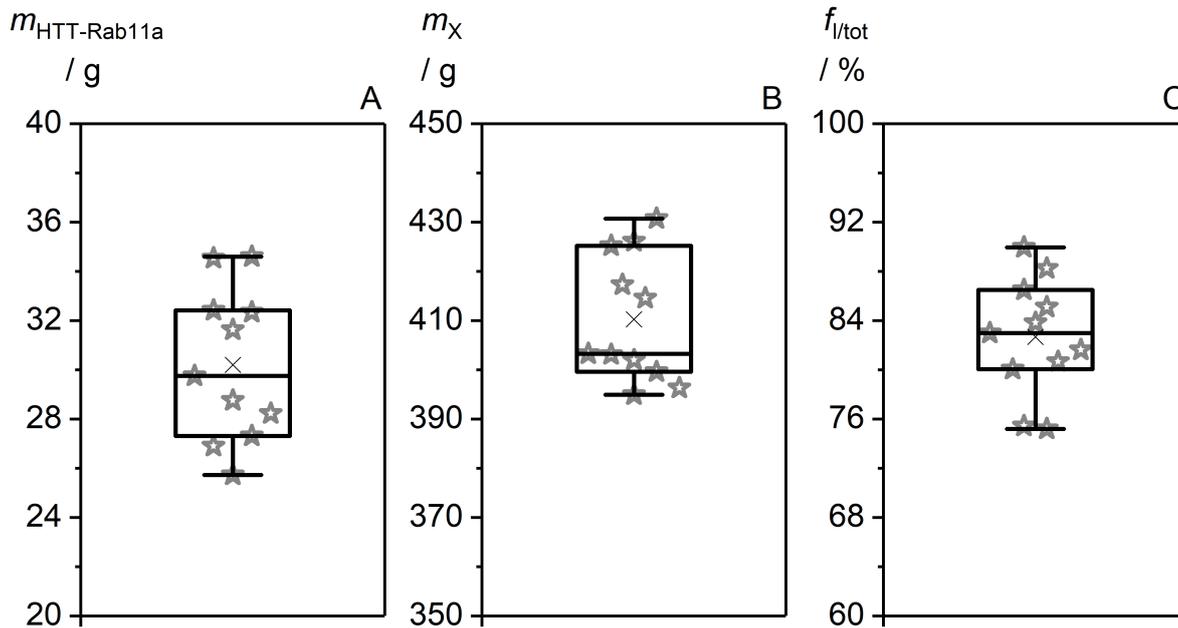


Abb. 5-30: Verteilung der Produkt- und Biomassendaten sowie der Daten für die lösliche Produktfraktion bei der Medienoptimierung im i²HCDC-Prozess mittels SVP. Kenngrößen der deskriptiven Statistik: (A) Masse an HTT-Rab11a; arithmetisches Mittel (X): $\bar{m}_{\text{HTT-Rab11a end}} = 30,2 \text{ g}$, Median: $\tilde{m}_{\text{HTT-Rab11a end}} = 29,7 \text{ g}$, IQR = 5,1 g, NV liegt vor. (B) Biomasse; arithmetisches Mittel (X): $\bar{m}_{X\text{end}} = 410,3 \text{ g}$, Median: $\tilde{m}_{X\text{end}} = 403,3 \text{ g}$, IQR = 25,6 g, NV liegt vor. (C) Lösliche Zielproteinfraktion; arithmetisches Mittel (X): $\bar{f}_{l/\text{totend}} = 82,7 \%$, Median $\tilde{f}_{l/\text{totend}} = 83,0 \%$, IQR = 6,4 %, NV liegt vor. Kultivierungen: BL21DE3pET1215, 1315, 1415, 1515, 1615, 1715, 2015, 0116, 0216, 0316, 0416

Im Durchschnitt aller Kultivierungen der Versuchsreihe zur Medienoptimierung wurde $(30,2 \pm 3,1) \text{ g}$ HTT-Rab11a gebildet. Die mittleren 50 % der Produktdaten streuen in einem Abstand von 5,1 g zwischen 27,3 g und 32,4 g, wobei lediglich drei Werte deutlich außerhalb der Box liegen. Mit einer Spannweite von 8,9 g variierten Minimal- und Maximalwert jedoch deutlich. Im Mittel wurde eine Biomasse von $(410 \pm 13) \text{ g}$ erreicht, wobei der Minimal- und Maximalwert bei 395 g beziehungsweise 431 g liegen. Sechs Werte befinden sich im unteren Bereich von 395 g bis 403 g nah beieinander, woraus die Schiefe resultiert. $(82,7 \pm 4,8) \%$ des exprimierten Zielproteins lagen als lösliche Fraktion mit einer breiten Spannweite von 14,8 % vor. Aufgrund der Verteilung der Daten wurde erwartet, dass eine Beziehung zwischen der Konzentration an toxischen Spurenelementen und den drei Zielgrößen besteht.

Die Regressionsanalyse mit MODDE zeigt allerdings, dass keinem Faktor ein signifikanter Effekt auf die drei untersuchten Qualitätsmerkmale zugeordnet werden kann. Abb. 5-31 A zeigt, dass sowohl lineare als auch Interaktionsterme eines Interaktionsmodells eine so große Unsicherheit aufweisen, dass bei einem Sicherheitsniveau von 0,05 die Regressionskoeffizienten als statistisch nicht-signifikant beurteilt werden. Auch nach Eliminierung der Interaktionsterme (Abb. 5-31 B) übersteigt die statistische

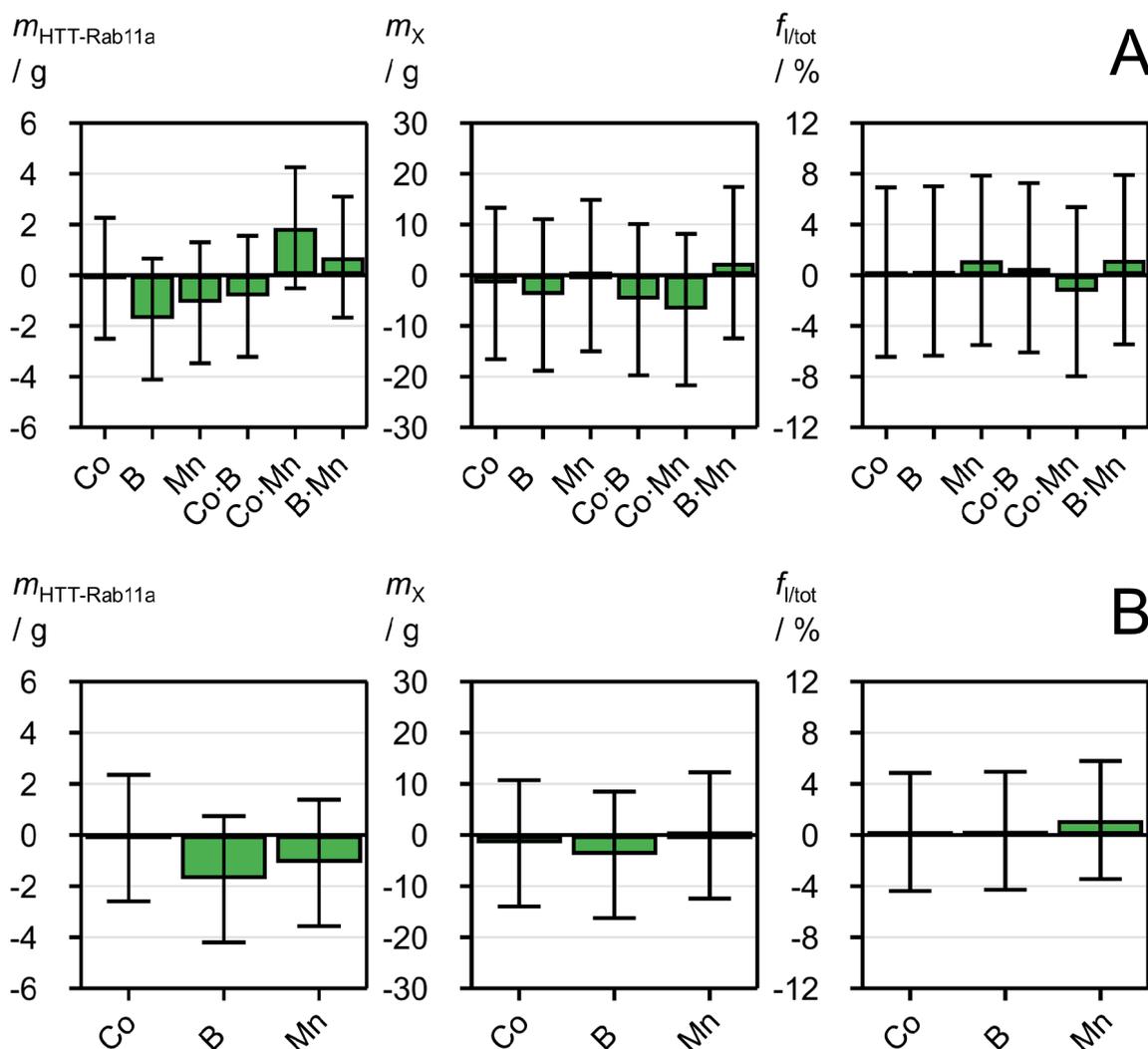


Abb. 5-31: Koeffizientendiagramm (skaliert u. zentriert) für die Qualitätsgrößen $m_{\text{HTT-Rab11a}}$, m_X und $f_{I/\text{tot}}$. (A) Regressionskoeffizienten für ein Interaktionsmodell. (B) Regressionskoeffizienten für ein lineares Modell. Die Bezeichnungen Co, B und Mn stehen für $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 und $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

Unsicherheit den Effekt der Faktoren auf die Qualitätsmerkmale. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid die Biomasse- und HTT-Rab11a Bildung sowie die lösliche Zielproteinfraktion statistisch nicht signifikant beeinflussen und folglich aus dem Medienansatz entfernt werden können. Der Grund, warum eine Modellbildung nicht möglich ist, liegt in der großen Spannweite der CP-Experimente. Eine mögliche Ursache für die Variation der messbaren Bio- und Produktmasse besteht in der partiellen oder vollständigen Lyse der Zellen, welche durch ein bestehendes Restrisiko einer DE3-Phagenaktivität in *E. coli* BL21 (DE3), wie von Noll et al. (2013) beschrieben, begünstigt wird.

5.2.2.2 Prüfung der Prozesssicherheit des $i^2\text{HDC}$ -Prozesses bei Verzicht auf toxische Spurensalze

Da bei den Experimenten der SVP keine signifikanten Unterschiede in der Produkt- und Biomassebildung sowie der löslichen HTT-Rab11a Fraktion bei Kultivierungen mit

und ohne Zusatz der drei kritischen Medienkomponenten beobachtet werden konnten, sollte die Prozesssicherheit mit dem neuen Medium (ohne Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid) mittels Reproduktionsversuchen (SVP Experiment N₁, Abschnitt 5.2.2.1) näher untersucht werden.

Abb. 5-32 zeigt den typischen Kultivierungsverlauf des rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) mit Expression von HTT-Rab11a nach dem i²HCDC-Verfahren. Bis zur Induktion bei $\Delta OD_{600} = 180$ wuchsen die Zellen wie vorgegeben, wobei in der Fed-Batch-Phase 1 das tatsächliche Wachstum mit $0,23 \text{ h}^{-1}$ etwas niedriger lag. In der ersten Stunde der Produktionsphase konnte die vorgegebene Wachstumsrate mit $0,12 \text{ h}^{-1}$ gehalten werden, ehe sie kontinuierlich bis zum Prozessende abnahm. In 24,7 h wurden insgesamt 441 g Biomasse erzeugt. Die Masse an HTT-Rab11a stieg nach Induktion bis zum Prozessende auf 37,1 g an. Am Ende der Fed-Batch-Phase 1 stieg die Acetatkonzentration auf $0,54 \text{ g l}^{-1}$ an. Mit der Reduktion von μ_{set} in der Produktionsphase sank sie zunächst etwas und stieg anschließend wieder an. Eine zwischenzeitliche Glucosekonzentration von $0,9 \text{ g l}^{-1}$ wird im Rahmen der analytischen Genauigkeit eher bei nahe Null angenommen, wie bereits in 5.2.1 diskutiert.

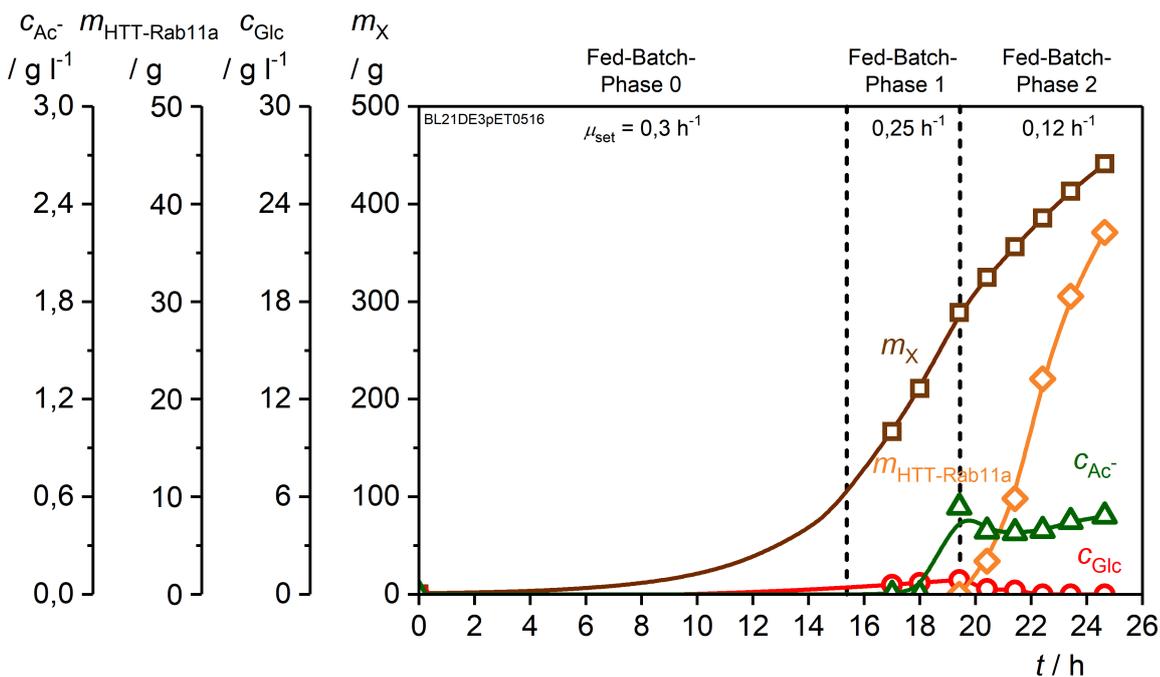


Abb. 5-32: Biomasse, HTT-Rab11a-Masse sowie Konzentration an Acetat und Glucose als Funktion der Zeit im i²HCDC-Prozess ohne Zusatz von Cobalt-, Manganchlorid und Borsäure mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a.

In insgesamt drei Kultivierungen, einschließlich Experiment N₁ aus Abschnitt 5.2.2.1, wurden durchschnittlich $(425 \pm 21) \text{ g}$ Biomasse sowie $(35,6 \pm 1,3) \text{ g}$ HTT-Rab11a gebildet. Die Acetatkonzentration am Prozessende lag im Mittel bei $(0,81 \pm 0,51) \text{ g l}^{-1}$ und damit etwa bei der Hälfte der iHCDC- und HCDC-Prozesse. Eine eher bedarfsgerechte Versorgung mit der Kohlenstoffquelle, Magnesium, Schwefel sowie Spurenelementen rein über die Feedlösung hat verglichen mit den Vorgängervarianten somit möglicher-

weise eine geringere Acetatbildung zur Folge. Tab. 5-12 fasst die Ausbeutekoeffizienten und spezifischen Reaktionsraten für Glucose, Stickstoff und Phosphor als gemittelte Werte aus den drei Kultivierungen zusammen. Zwischen den zellspezifischen Substratumsatzraten im i²HCDC- und iHCDC-Prozess kann kein Unterschied festgestellt werden. Bis zum Eintritt in die Produktionsphase nahm die spezifische Glucoseverbrauchsrate erwartungsgemäß linear mit der spezifischen Wachstumsrate ab. Dies setzte sich für die kleine spezifische Wachstumsrate beziehungsweise μ_{set} der Produktionsphase nicht fort. Hier nimmt $q_{\text{Glc}/X}$ einen konstanten Wert von $(0,265 \pm 0,011) \text{ g (g h)}^{-1}$ – praktisch identisch mit $(0,265 \pm 0,013) \text{ g (g h)}^{-1}$ im iHCDC-Prozess – an.

Tab. 5-12: Durchschnittliche Ausbeutekoeffizienten und spezifische Reaktionsraten für Glucose, Stickstoff aus Basezugabe (NB) und Phosphor für *E. coli* B21 (DE3) pET-28a im Triplikat des induzierten i²HCDC-Prozesses.

Phase	$Y_{X/\text{Glc}}$ / g g^{-1}	$q_{\text{Glc}/X}$ / g (g h)^{-1}	$Y_{X/\text{NB}}$ / g g^{-1}	$q_{\text{NB}/X}$ / g (g h)^{-1}	$Y_{X/\text{P}}$ / g g^{-1}	$q_{\text{P}/X}$ / g (g h)^{-1}
0	$0,484 \pm 0,012$	$0,611 \pm 0,018$		$0,041 \pm 0,001$		$0,0057 \pm 0,0002$
1	$0,435 \pm 0,027$	$0,519 \pm 0,011$	$7,14 \pm 0,23$	$0,032 \pm 0,002$	$52,3 \pm 1,9$	$0,0043 \pm 0,0002$
2	n. konst.	$0,265 \pm 0,011$		n. konst.	$23,8 \pm 0,3$	n. konst.

Der über alle Prozessphasen konstante Stickstoffausbeutekoeffizient beträgt $(7,14 \pm 0,23) \text{ g g}^{-1}$. Der Phosphorausbeutekoeffizient nahm hingegen nach Induktion von $(52,3 \pm 1,9) \text{ g g}^{-1}$ um mehr als die Hälfte ab, gleichbedeutend mit einer signifikanten Steigerung des Phosphorbedarfs für die Bereitstellung energiereicher Verbindungen, bedingt durch die Biosynthese des Fremdproteins.

Die Produktivität von *E. coli* BL21 (DE3) im i²HCDC-Prozess ohne Zusatz der kritischen Komponenten ist in Abb. 5-33 A in Form der zellspezifischen HTT-Rab11a Bildungsrate als Funktion der Induktionsdauer dargestellt. Analog zum iHCDC-Prozess konnte auch hier beobachtet werden, dass die maximale spezifische Produktbildungsrate etwa zwei Stunden nach IPTG-Zugabe erreicht wurde, um dann wieder abzunehmen. Zur modellhaften Beschreibung des HTT-Rab11a-Produktionsverhaltens mit *E. coli* BL21 (DE3) wurde die gebrochene rationale Funktion (5.1) angewandt. Nach Anpassung der Parameter für alle gemittelten Werte folgt für $q_{\text{HTT-Rab11a}/X_{\text{max}}} = 0,0379 \text{ g (g h)}^{-1}$ und $P_1 = 0,00294 \text{ g (g h}^2\text{)}^{-1}$. Damit ist hier die Produktivität vergleichbar zur iHCDC. Der Anteil plasmidhaltiger Zellen nahm zum Ende der Kultivierung leicht ab, was für den Rückgang der Produktivität mit verantwortlich sein dürfte.

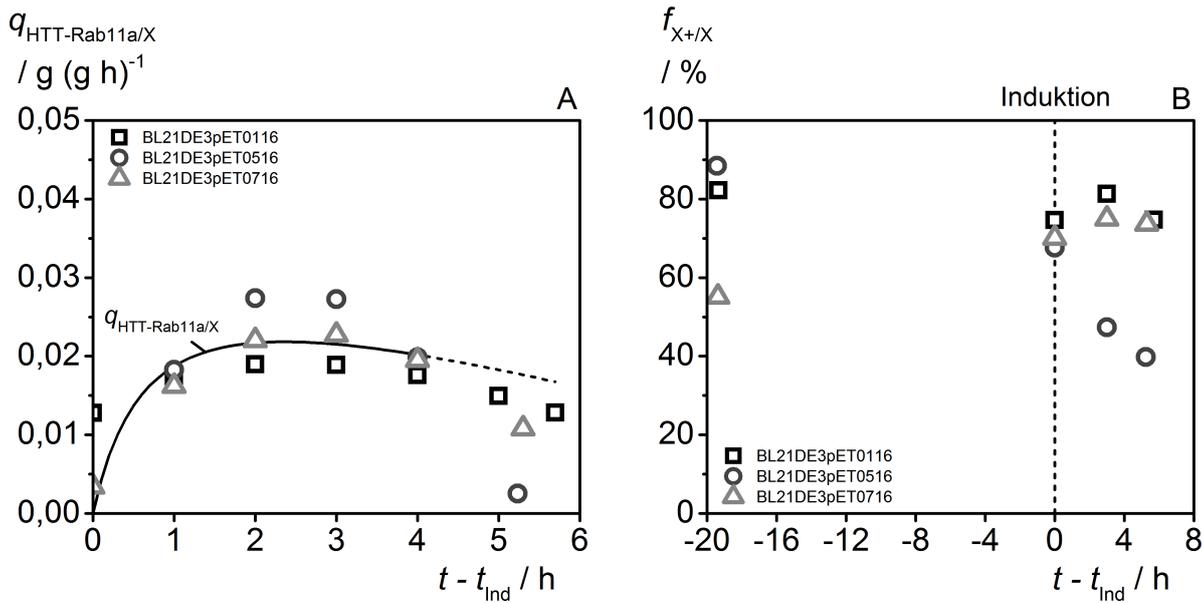


Abb. 5-33: Zeitlicher Verlauf der spezifischen HTT-Rab11a Bildungsrate (A) und Plasmidstabilitätsstudie (B) im i^2 HCDC-Prozess ohne Zugabe von Cobalt-, Manganchlorid und Borsäure. Zur Beschreibung des Verlaufs von $q_{\text{HTT-Rab11a/X}}$ wurden bis 4 h nach Induktion zu jedem Messpunkt das arithmetische Mittel aus allen Kultivierungen gebildet. Die Anpassung der Modellgleichung 5.1 an diese Mittelwerte erfolgte mittels Downhill-Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead (1965) mit Hilfe der Minimierung der Summe aller Fehlerquadrate aus der Differenz von Mess- und Modellfunktionswert, wodurch die optimalen Werte für die Parameter $q_{\text{HTT-Rab11a/Xmax}}$ und P_1 mit den Anfangswerten $0,04 \text{ g (g h)}^{-1}$ und $0,002 \text{ g (g h}^2\text{)}^{-1}$ identifiziert wurden. Die maximale Anzahl erlaubter Iterationen betrug 100000. Die gestrichelte Linie resultiert aus der Extrapolation der Funktion.

Die Resultate der SVP und die Reproduktionsversuche ohne Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid zeigen, dass der i^2 HCDC-Prozess trotz deutlicher Änderung der Medienzusammensetzung vergleichbar gute und reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Expression von HTT-Rab11a wie die Varianten HCDC und iHCDC liefert. Die Reduktion beim Einsatz von Magnesiumsulfat wird beibehalten, bei Eisen bleibt es bei der ursprünglich für das i^2 HCDC-Medium definierten Menge (104 %). Aus den eingangs genannten Gründen (S. 102) fällt die Reduktion hinsichtlich Titriplex III, Kupferchlorid, Natriummolybdat und Zink-Acetat unterschiedlich aus, liegt aber im Schnitt bei etwa 64 % des HCDC/iHCDC-Mediums (Abb. 5-34). Für diese Komponenten wurde kein Optimierungsprozess durchgeführt.

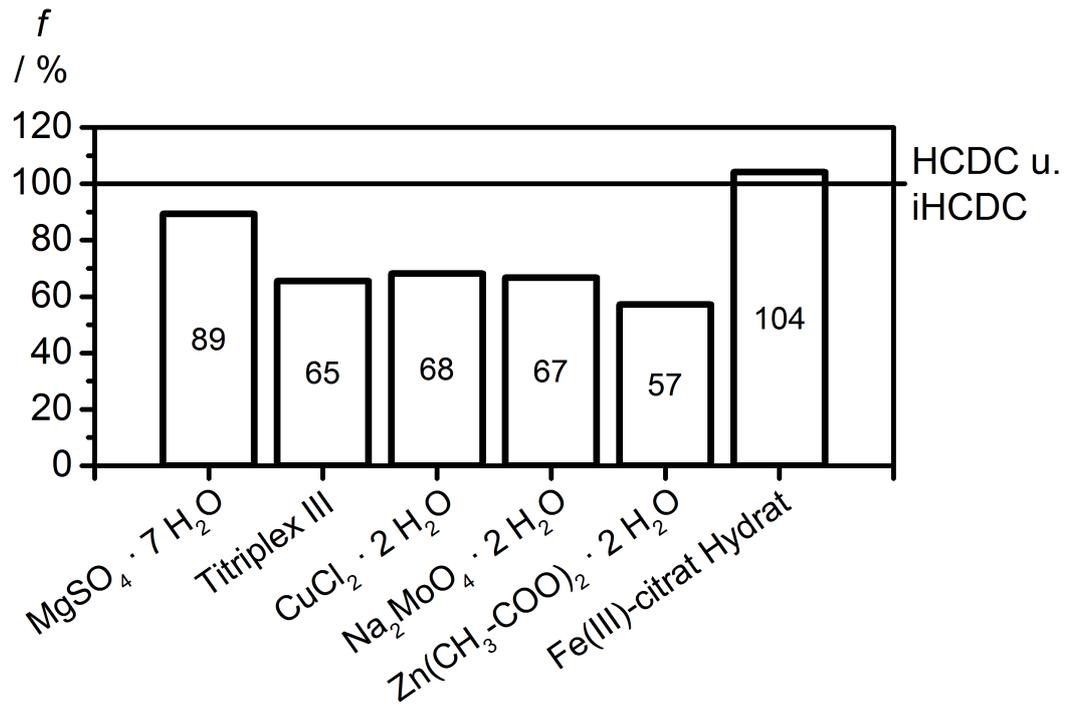


Abb. 5-34: Relative Massenreduktion ausgewählter Substanzen im induzierten i²HCDC-Prozess mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a. Angaben beziehen sich zur kumulativen Substanzmasse aus 3 l Startvolumen und 1,5 l Feedlösung nach dem iHCDC-Medium.

5.2.3 Anwendung des i²HCDC-Prozesses auf unterschiedliche Derivate von *Escherichia coli*

Nach erfolgreicher Etablierung des i²HCDC-Prozesses für *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a mit Expression von HTT-Rab11a sollte nachfolgend die Anwendbarkeit der Strategie auf weitere Derivate untersucht werden. Dazu wurden die Stämme K12 ER2507, M15 und K12 TG1 mit den Vektoren pGLO zur Herstellung von GFP beziehungsweise pQE-30 für H-Rab11a ausgewählt.

5.2.3.1 Herstellung von GFP mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO

Das Medium für den i²HCDC-Prozess wurde dem Leucin-Bedarf von *E. coli* K12 ER2507 angepasst. Dem Startmedium wurden 0,3 g l⁻¹ Leucin zugesetzt und die weitere Dosierung erfolgte über die Base mit 65,7 g l⁻¹ in 25 % Ammoniaklösung (siehe Abschnitt 5.1.3.4).

In 36,3 h wurden insgesamt 430 g Biomasse erzeugt. Der Organismus wuchs in den ersten beiden Fed-Batch-Phasen näherungsweise mit der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate (0,16 h⁻¹ und 0,14 h⁻¹). In Fed-Batch-Phase 2 wurde mit durchschnittlich 0,08 h⁻¹ die eingestellte spezifische Wachstumsrate erneut nicht erreicht. Nach Induktion bei ΔOD₆₀₀ = 167 wurde in einem Produktionszeitraum von 5 h insgesamt 4,7 g GFP gebildet. In den ersten 27 h konnte kein Acetat bestimmt werden. Nachfolgend akkumulierte Acetat bis zum Kultivierungsende bis zu einer unkritischen Konzentration von 0,59 g l⁻¹ und somit 80 % weniger als im iHCDC-Prozess (Abschnitt 5.1.3.4, Batch ER2507pGLO1216). Im Rahmen der Messgenauigkeit konnte kein Plasmidverlust beobachtet werden.

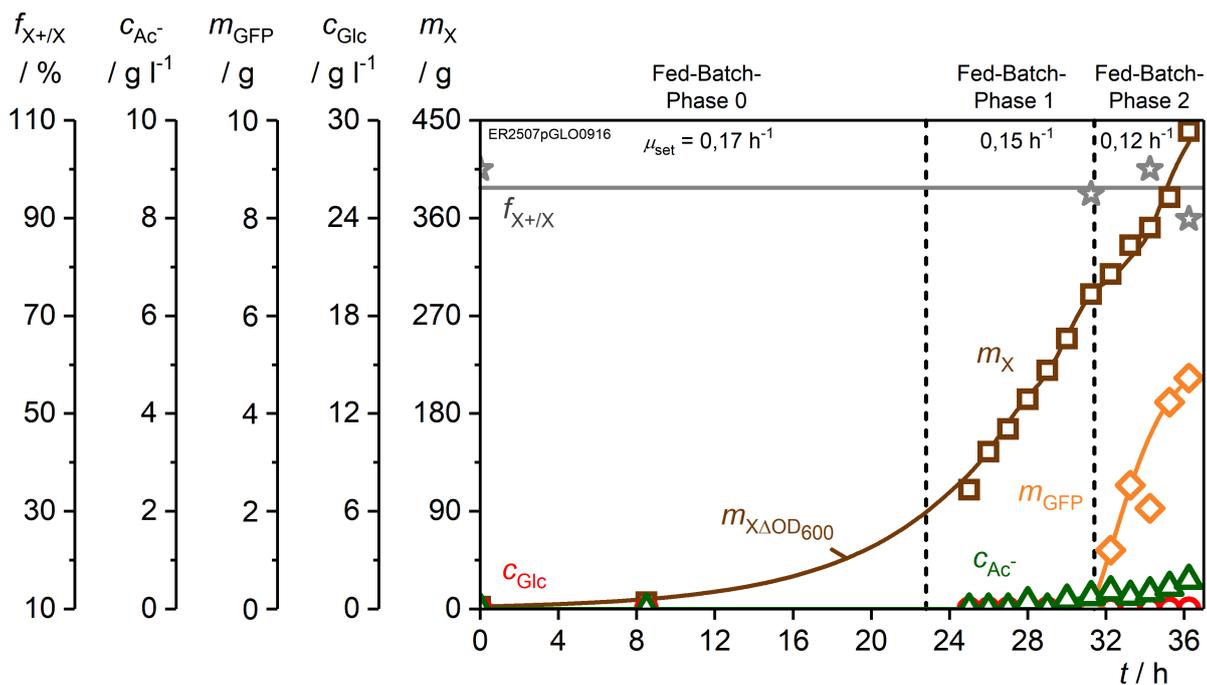


Abb. 5-35: GFP- und Biomasse, Konzentration an Acetat und Glucose sowie der Anteil plasmidhaltiger Zellen im i²HCDC-Prozess mit *E. coli* K12 ER2507 pGLO.

Im Vergleich zur iHCDC wurden identische spezifische Wachstumsraten erreicht, so dass die Medienmodifikation im i²HCDC-Prozess die Biomassebildung nicht beeinträchtigt. Mit 4,7 g ist die Produktmasse geringer als in der iHCDC. Allerdings wurde die Produktmasse nur in einem Versuch bestimmt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es ein Ausreißer nach unten ist. Da Metallionen kein struktureller Bestandteil von GFP sind, ist davon auszugehen, dass die Massenreduktion der Spurenelemente sowie die Entfernung von Cobalt-, Manganchlorid und Borsäure aus dem Medium keinen direkten Einfluss auf die zu erzeugende GFP-Masse haben. Eine geringere Acetatausschleusung insbesondere am Prozessende spricht auch hier für eine adäquate Versorgung mit den wachstumsnotwendigen Medienbestandteilen.

5.2.3.2 Expression von H-Rab11a mit *E. coli* M15 pQE-30

Der Kultivierungsverlauf von *E. coli* M15 im i²HCDC-Prozess mit Induktion des Zielproteins H-Rab11a ist in Abb. 5-36 gezeigt. Wachstum erfolgte mit μ_{set} in Fed-Batch-Phase 1 und fast mit μ_{set} in der nachfolgenden Phase. Nach 30,8 h wurde bei $\Delta OD_{600} = 173$ induziert, wobei die vorgegebene Wachstumsrate nicht gehalten werden konnte. Für 3 h wurde Wachstum mit $0,08 \text{ h}^{-1}$ beobachtet, ehe in den letzten 1,5 h eine weitere Reduktion auf $0,05 \text{ h}^{-1}$ festzustellen war. Am Kultivierungsende wurden kumulativ 436 g Biomasse gebildet. Die Masse an produziertem H-Rab11a stieg nach IPTG-Zugabe linear auf einen Wert von 26,7 g nach 3 h an. In einer weiteren Kultivierung konnte auch darüber hinaus ein linearer Anstieg der H-Rab11a-Masse auf 36,3 g nach 4,2 h registriert werden. Die maximale spezifische H-Rab11a Bildungsrate lag bei $0,0260 \text{ g}(\text{g h})^{-1}$, welche bis zum Ende des jeweils betrachteten Produktionszeitraums nur minimal abnahm. Mit einer auf die Biomasse bezogenen H-Rab11a Ausbeute von $66,0 \text{ mg g}^{-1}$ bis $88,7 \text{ mg g}^{-1}$ zeigt der Stamm eine vergleichbare Produktivität wie bei der RhuA Produktion mit einem Glycin-auxotrophen *E. coli* M15 (Fernández-Castané et al. 2012). Sie erreichen bei Induktion mit einer geringen IPTG-Konzentration ($200 \mu\text{M}$) eine etwas höhere Ausbeute von circa 130 mg g^{-1} . Ruiz et al. (2011) zeigen, dass die initiale Induktorkonzentration signifikant die zellbezogene Ausbeute mit *E. coli* M15 ΔglyA beeinflusst. Übersteigt die pro Biomasse zugegebene IPTG-Menge einen Wert von $1 \mu\text{mol g}^{-1}$, wird die Ausbeute zunehmend geringer. Da hier eine Konzentration $\geq 14 \mu\text{mol g}^{-1}$ eingesetzt wurde, ist eine Steigerung der Ausbeute bei Reduktion der Induktormenge vielleicht möglich. Interessanterweise konnte von der Prä- zur Postinduktionsphase eine deutliche Änderung des Verhältnisses zwischen der Biomassekonzentration zur optischen Dichte festgestellt werden. Von $f_{\text{X/OD}} = 0,44 \text{ g l}^{-1}$ nahm der Umrechnungsfaktor auf durchschnittlich $0,28 \text{ g l}^{-1}$ ab. Die Akkumulation des Zielprodukts in Form von Ibs erhöht die Lichtbrechung, wie Hwang und Feldberg (1990) für die Produktion eines gp41-Fragments in *E. coli* W3110 beschreiben. Am Ende der Kultivierung nahm der Anteil an plasmidhaltigen Zellen geringfügig auf 88 % ab. Über mehrere Kultivierungen betrachtet, kann das Plasmid jedoch als hinreichend stabil integriert angesehen werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

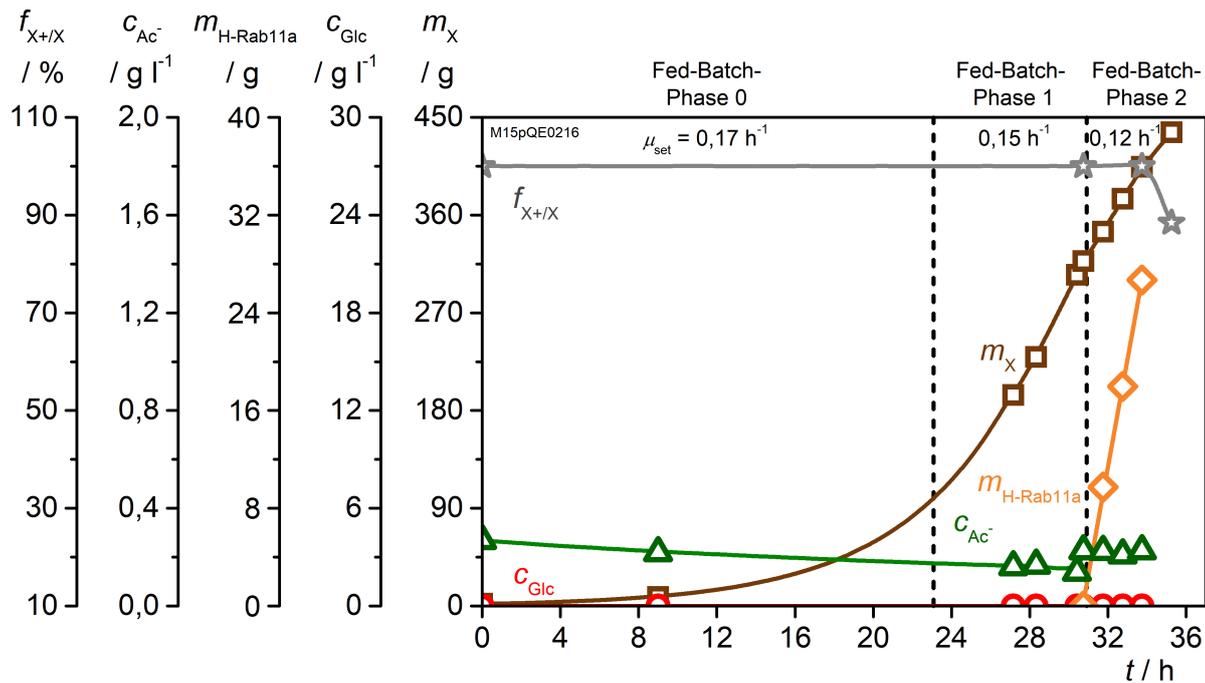


Abb. 5-36: H-Rab11a- und Biomasse, Konzentration an Acetat und Glucose sowie der Anteil plasmidhaltiger Zellen im i²HCDC-Prozess mit *E. coli* M15 pQE-30.

Die Verläufe der Glucose- und Acetatkonzentration unterstreichen, dass der i²HCDC-Prozess erfolgreich für die Kultivierung von *E. coli* M15 pQE-30 für die Expression von H-Rab11a eingesetzt werden kann. Mit Acetatkonzentrationen bis maximal $0,27\ g\ l^{-1}$ kann eine Inhibierung ausgeschlossen werden. Die Glucosekonzentration lag durchgängig unterhalb der Bestimmungsgrenze. Damit wuchs der Organismus permanent kohlenstofflimitiert. Die Unterschreitung der tatsächlichen von der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate um 33 % in den ersten 3 h nach Induktion wird auf die erhöhte metabolische Belastung einer induzierten Kultur zurückgeführt.

5.2.3.3 H-Rab11a Produktion mit *E. coli* K12 TG1 pQE-30

In einer Kultivierung mit *E. coli* K12 TG1 pQE-30 im i²HCDC-Prozess mit Induktion des Zielproteins H-Rab11a wuchs der Organismus in den ersten beiden Phasen geringfügig schneller als vorgegeben ($0,18\ h^{-1}$ und $0,16\ h^{-1}$). Die Expression von H-Rab11a wurde nach 30,8 h induziert. Anschließend wuchs der Organismus substratlimitiert für zwei weitere Stunden mit einer tatsächlichen spezifischen Wachstumsrate von $0,11\ h^{-1}$. Nachfolgend konnte ein Anstieg der Glucosekonzentration im Medium beobachtet werden. Gleichzeitig nahm die Biomasse bis zum Prozessende trotz exponentieller Nachfütterung nur noch minimal auf 399 g zu und die Acetatkonzentration stieg auf über $10\ g\ l^{-1}$, wie in Abb. 5-37 zu erkennen ist. Zur Neutralisation der Säure stieg das Volumen an dosiertem Ammoniak parallel zur einsetzenden Acetatbildung an. Wurde zu Beginn der Zielproteinexpression mit 243,4 ml noch eine zu den anderen gezeigten Kultivierungen mit verschiedenen Derivaten von *E. coli* vergleichbare Menge an Base dosiert, stieg sie bis zum Prozessende auf einen unverhältnismäßig hohen Wert. Mit final 457 ml wurde circa 100 ml mehr Base als beispielsweise bei den Kultivierungen mit *E. coli* M15 zugegeben. Nach 36,2 h war die Feedlösung vollständig

dosiert. Da nach 36,8 h kein Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden konnte, spricht dieser Umstand für einen signifikanten Anstieg in der Glucosekonzentration im Medium. Das Ausbleiben eines Anstiegs der Gelöstsauerstoffkonzentration spricht hier für weitere Stoffwechselaktivitäten ohne Beitrag zum Zellwachstum. In einer weiteren Kultivierung konnte am Ende der Kultivierung eine Anreicherung von Glucose und Acetat auf $26,9 \text{ g l}^{-1}$ beziehungsweise $20,8 \text{ g l}^{-1}$ beobachtet werden. Bedingt durch die dabei verstärkte Basezugabe stieg die Ammoniumkonzentration auf $4,2 \text{ g l}^{-1}$, was zusammen mit Acetat eine vollständige Wachstumsinhibierung verursacht.

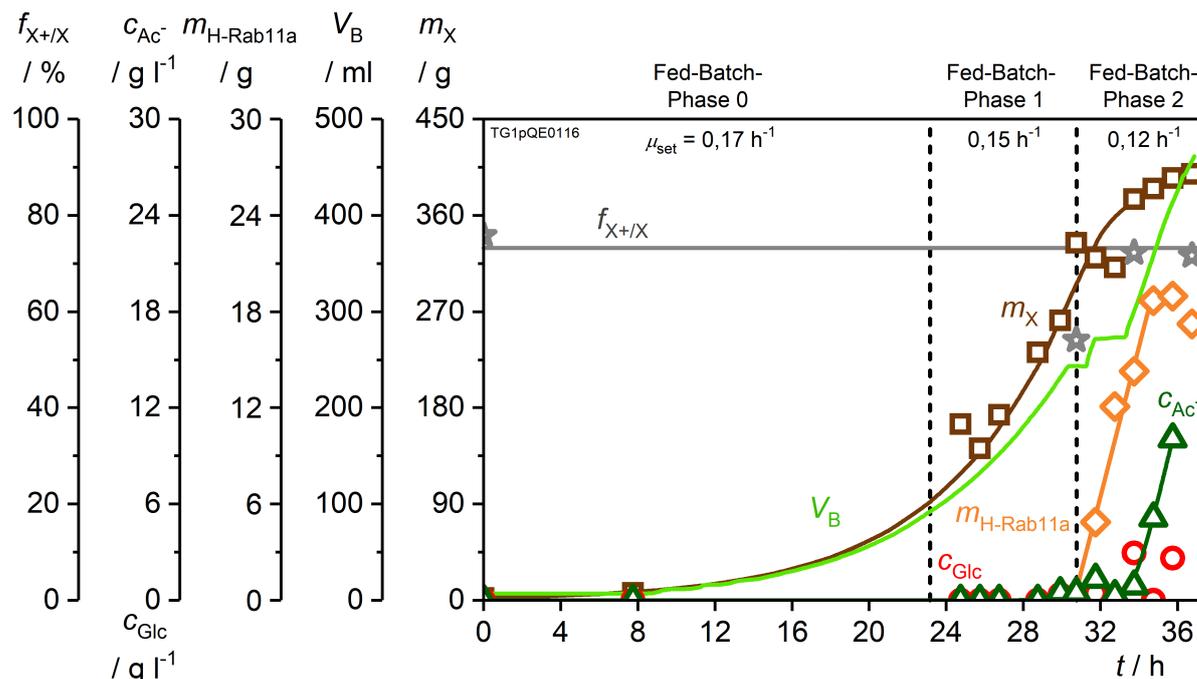


Abb. 5-37: H-Rab11a- und Biomasse, Konzentration an Acetat und Glucose sowie der Anteil plasmidhaltiger Zellen und das dosierte Ammoniakvolumen als Funktion der Zeit im i²HDC-Process mit *E. coli* K12 TG1 pQE-30. Die Induktion des Zielproteins erfolgte bei $\Delta OD_{600} = 170$.

Der Anteil plasmidhaltiger Zellen lag während der gesamten Prozessdauer konstant oberhalb von 70 %. Trotz der zellphysiologisch ungünstigen Situation in der Induktionsphase ist kein Plasmidverlust erkennbar. Die H-Rab11a-Masse stieg linear bis zum Erreichen einer Produktmasse von $18,7 \text{ g}$ nach 4 h an und stagnierte anschließend. Mit einer maximalen spezifischen H-Rab11a Bildungsrate von $0,0288 \text{ g (g h)}^{-1}$ wurde bis zur Inhibierung durch Ammonium und Acetat eine vergleichbare Produktivität wie bei der Expression von H-Rab11 mit *E. coli* M15 erreicht. Die starke Expression beeinflusst die Zellphysiologie von *E. coli* K12 TG1 im Vergleich zu den anderen hier verwendeten Stämmen so stark, dass bereits nach wenigen Stunden die vorgegebene Wachstumsrate nicht gehalten werden kann. Die unregelmäßige Dosierung der Feedlösung führt dann zur Akkumulation von Glucose und der daraus folgende Überflussmetabolismus zur Acetatbildung mit Wachstumsinhibierung durch Acetat und Ammonium. Ein identisches Verhalten für diesen Stamm beobachtete Korz (1993) bei der Produktion von β -Galactosidase. Eine kürzere Induktionsdauer mit Induktion bei einer höheren Zelldichte könnte somit für diesen Stamm günstig sein.

6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, das Anfang der 1990er Jahre etablierte Verfahren zur Hochzelldichte-Kultivierung von *E. coli* durch geeignete Optimierungsmaßnahmen zu einem anwenderfreundlicheren, robusteren und sichereren Prozess weiterzuentwickeln. Dabei sollte die Kultivierungsstrategie für ein breites Spektrum unterschiedlicher *E. coli* Stämme – einschließlich Vertretern der B- und K-Familie sowie für Aminosäure-auxotrophe Stämme – nutzbar sein. Die Entwicklungsarbeiten erfolgten überwiegend mit einem rekombinanten BL21 (DE3). *E. coli* K12 ER2507 wurde als Modell für Aminosäure-auxotrophe Stämme verwendet. Ergänzend kamen ein nicht-rekombinanter BL21 sowie rekombinante Varianten von K12 TG1 und M15 zum Einsatz. Mit diesen Stämmen wurde die Leistungsfähigkeit der neuen Kultivierungsstrategien sowohl hinsichtlich reiner Biomassebildung als auch der Expression unterschiedlicher Genprodukte untersucht.

Im ersten Schritt wurde durch Eliminierung der Batch-Phase ein reiner Nachfütterungsprozess mit konstanten, submaximalen spezifischen Wachstumsraten in unterschiedlichen Prozessphasen entworfen. Der als *improved High Cell Density Cultivation* (iHCDC) bezeichnete Prozess vereint gegenüber dem klassischen Verfahren die Vorteile

- Vermeidung des Überflussmetabolismus in früher Wachstumsphase,
- reduzierte Sauerstoffaufnahme in der ersten Wachstumsperiode,
- Vermeidung einer Stressantwort im Übergang zwischen Batch- und Fed-Batch-Phase,
- Plan- und Reproduzierbarkeit durch gezielte Vorgabe der spezifischen Wachstumsphase in allen Wachstumsphasen,
- kein Bedarf einer automatisierten Batch-Ende-Detektion,
- Verhinderung des Wachstums von Kontaminanten nach unvollständiger Reaktorsterilisation mangels C-Quelle (könnte bei älteren und großen Reaktoren sonst kritisch sein).

Ein Vergleich von HCDC und iHCDC ohne Induktion mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a zeigte, dass aus identischer Glucosemasse ($m_{\text{Glc}} = 1125 \text{ g}$) in Kultivierungen nach dem iHCDC-Verfahren mit durchschnittlich 476 g geringfügig mehr Biomasse erzeugt werden konnte. Mit einer Prozesszeit von $(23,13 \pm 0,06) \text{ h}$ wurde außerdem ein hohes Maß an zeitlicher Reproduzierbarkeit erreicht. Minimale Vorteile zeigten sich bei der Expression von HTT-Rab11a. Mit $(37,4 \pm 3,3) \text{ g}$ stieg die Ausbeute um 5 % gegenüber der klassischen HCDC-Variante. Gleichzeitig konnte mit der iHCDC eine Akkumulation von Acetat bis zu einer Prozesszeit von $(13 - 15) \text{ h}$ nach Inokulation vermieden werden. Verglichen mit der HCDC akkumulierte Acetat darüber hinaus erst beim Erreichen einer höheren Biomassekonzentration. Obwohl mit der iHCDC eine Verlängerung der Kultivierungszeit um bis zu 4 h in Kauf genommen werden muss, ist diese Strategie

von gewichtigen Vorteilen geprägt, zumal eine Produktüberführung in den Reinigungsprozess nun einfach terminiert werden kann.

Um Expressionsvektoren, die unter Kontrolle des Arabinose-Operons stehen, verwenden zu können, wurde parallel an einer Prozessadaption für den Leucin-auxotrophen, Arabinose-Stoffwechsel defizienten *E. coli* K12 ER2507 pGLO gearbeitet. Voruntersuchungen mithilfe der SVP haben gezeigt, dass dieser Stamm auf die Erhöhung der Leucin- und Glucosekonzentration im Startmedium mit einer signifikanten Reduktion der spezifischen Wachstumsrate und des Leucinausbeutekoeffizienten reagiert. Dadurch erscheint ein Einsatz im klassischen HCDC-Verfahren nicht möglich. Die Modellgleichungen zeigen an der unteren Grenze des untersuchten Versuchsraums mit $c_{\text{Leu}} = 0,1 \text{ g l}^{-1}$ und $c_{\text{Glc}} = 2 \text{ g l}^{-1}$ eine maximale spezifische Wachstumsrate von $0,43 \text{ h}^{-1}$ und einen Leucinausbeutekoeffizienten von $19,3 \text{ g g}^{-1}$. Unter Verwendung dieses Ausbeutekoeffizienten wurde nachfolgend eine Variante der iHCDC-Strategie entwickelt, welche das Erreichen hoher Zelldichten erlaubt. Der an den Glucoseverbrauch gekoppelte Bedarf an Ammoniak wurde genutzt, um die Versorgung mit Leucin über die Base zu gewährleisten und gleichzeitig das Problem der geringen Leucinlöslichkeit in wässrigen Lösungen zu eliminieren. Mit $65,7 \text{ g l}^{-1}$ Leucin in der Ammoniaklösung konnten $(438 \pm 3) \text{ g}$ Biomasse und $(6,1 \pm 0,7) \text{ g}$ GFP aus 1125 g Glucose gewonnen werden.

In weiteren Kultivierungen, mit denen punktuell Einzelaspekte untersucht wurden und deren Daten hier nicht präsentiert werden, zeigte sich, dass die iHCDC auch für den Einsatz von *E. coli* M15 pQE-30 mit der Expression von H-Rab11a geeignet ist. Auch die Anwendbarkeit auf Arbeiten mit BL21 (DE3) pLysS wurde geprüft, wobei die Verwendung dieses Stammes in Hochzelldichte-Kultivierungsprozessen generell als kritisch zu beurteilen ist. Grund hierfür ist eine starke Autolyse, vermutlich induziert durch die Co-Expression von T7-Lysozym, wodurch die Biomasseausbeute geringer ausfiel.

Probleme traten bei der Kultivierung von K12 TG1 pQE-30 mit der iHCDC-Strategie auf. Obwohl die eigentlich für Acetatbildung kritische spezifische Wachstumsrate für diesen Stamm in Fed-Batch-Phase 0 und 1 unterschritten wurde, war nicht einmal die Induktionszelldichte von $\Delta OD_{600} = 180$ zu erreichen, da extrem hohe Acetatkonzentrationen das Wachstum inhibierten. Weil sich dieser Stamm in der HCDC erfolgreich kultivieren lässt, wie Korz et al. (1995) zeigen konnten und ebenso in der i²HCDC, wie in dieser Arbeit belegt, muss eine mit der iHCDC-Strategie verbundene Ursache vorliegen. Bei diesem Prozess wird die komplette Spurenmenge des Startmediums vorgelegt und während der Nachfütterungsphase bei nur begrenztem Wachstum weiter erhöht. Möglicherweise wird dabei eine kritische Konzentration überschritten. Wie in Abschnitt 5.2.3.3 für Cobalt, Bor und Mangan gezeigt, deutet sich an, dass eine Reduktion von Medienkomponenten durchaus eine positive Wirkung erzielen kann.

Der zweite Entwicklungsschritt, i²HCDC, stellt die Vereinfachung der Medienzusammensetzung und Kultivierungsvorbereitung sowie die Steigerung der Arbeitssicherheit in den Fokus. Zur Vermeidung der Maillardreaktion und Präzipitation von Salzen,

insbesondere Magnesiumammoniumphosphat, während der thermischen Sterilisation ist eine getrennte Sterilisation einzelner Medienbestandteile im klassischen HCDC-Prozess, wie in Abb. 6-1 unten dargestellt, zwingend erforderlich. Anschließend kann das Startmedium im Bioreaktor nach Vereinigung der Glucoselösung, der Spurenelement-/Magnesiumsulfat-/Citronensäurelösung sowie thermolabiler Zusätze unter aseptischen Bedingungen über eine sterile Transferstrecke vervollständigt werden. Kumulativ sind hierfür 14 Medienkomponenten zuzüglich Wasser und Ammoniaklösung für die Einstellung auf den gewünschten pH-Wert erforderlich. Der neue i²HCDC-Prozess startet nur noch mit Kaliumdihydrogenphosphat und Wasser sowie Ammoniaklösung, welche im Anschluss an die thermische Sterilisation zur Erzeugung des zum HCDC-Startmedium identischen Puffersystems bis zum gewünschten pH-Wert zugegeben wird. Hieraus resultiert eine maximale Vereinfachung der Medien- und Prozessvorbereitung und folglich steigt die Prozessrobustheit. Des Weiteren ist der Wegfall des Korrosionsrisikos durch Zersetzung von Ammoniumphosphat während der Sterilisation zu nennen. Mithilfe der SVP wurde der Einsatz der als krebserzeugend, reproduktionstoxisch beziehungsweise umweltgefährlich und giftig klassifizierten Bestandteile Cobaltchlorid, Borsäure und Manganchlorid ohne Produktivitätsverlust gegenüber von Verfahren mit diesen Zusätzen auf Null reduziert. Zudem ist gegenüber dem iHCDC-Verfahren eine deutliche Einsparung von Magnesiumsulfat, Titriplex III, Kupferchlorid, Natriummolybdat und Zink-Acetat möglich.

Eine Gegenüberstellung der drei Verfahrensstrategien – HCDC, iHCDC und i²HCDC – in Tab. 6-1 zeigt, dass mit den beiden neuen Verfahren geringfügig mehr Biomasse erreicht werden kann. Unterschiede in der Ausbeute an HTT-Rab11a zwischen der klassischen HCDC und i²HCDC sind nicht ersichtlich. Die Acetatkonzentration am Prozessende ist hingegen fast halbiert. Außerdem gelang es, den Anteil der löslichen HTT-Rab11a Fraktion sukzessive zu erhöhen, was der i²HCDC einen zusätzlichen Vorteil seitens der Produktaufreinigung verschafft.

Tab. 6-1: Gegenüberstellung der Produktivität der drei Verfahren HCDC, iHCDC und i²HCDC mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a.

	m_x / g	$m_{\text{HTT-Rab11a}}$ / g	$f_{\text{l/tot}}$ / %	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
HCDC	412 ± 12	35,7 ± 1,4	74 ± 6	1,7 ± 0,5
iHCDC	438 ± 25	37,4 ± 3,3	80 ± 7	1,4 ± 0,2
i ² HCDC	425 ± 21	35,6 ± 1,3	84 ± 6	0,8 ± 0,5

Im Anschluss an die Entwicklung des i²HCDC-Prozesses mit BL21 (DE3) pET-28a konnte eine Erweiterung der Anwendbarkeit dieser Strategie auf unterschiedliche Stämme gezeigt werden. So wurde der Prozess erfolgreich für die Expression von H-Rab11a mit K12 TG1 pQE-30 und M15 pQE-30 sowie für die Herstellung von GFP mit dem Leucin-auxotrophen K12 ER2507 pGLO getestet.

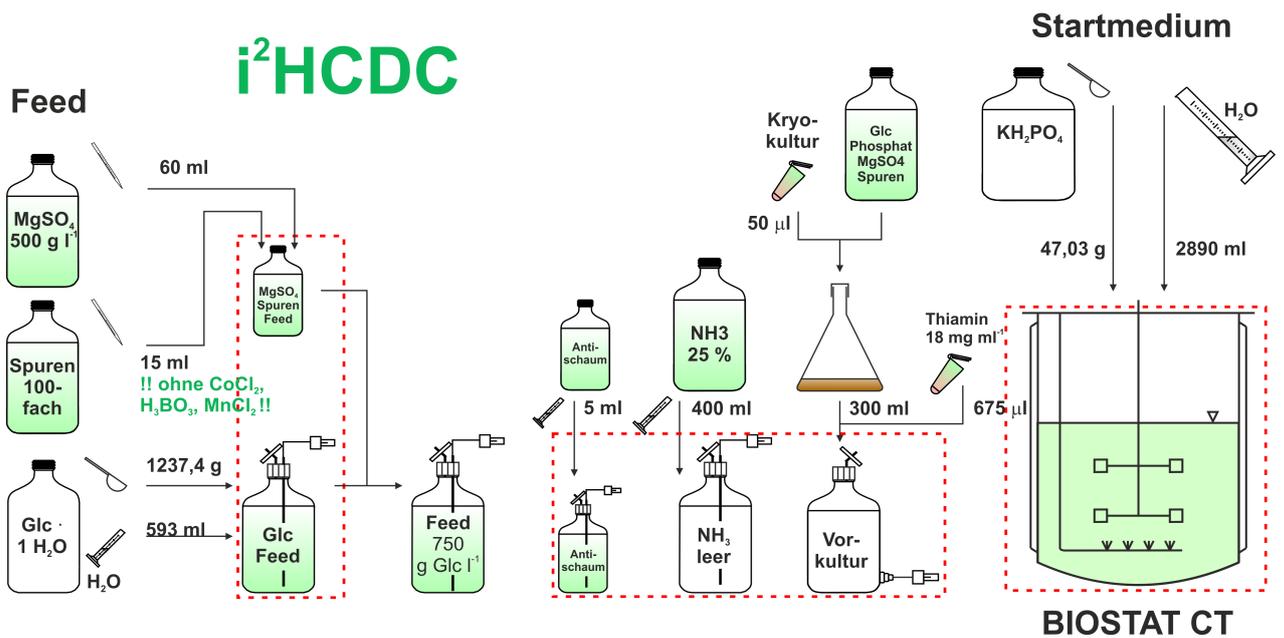
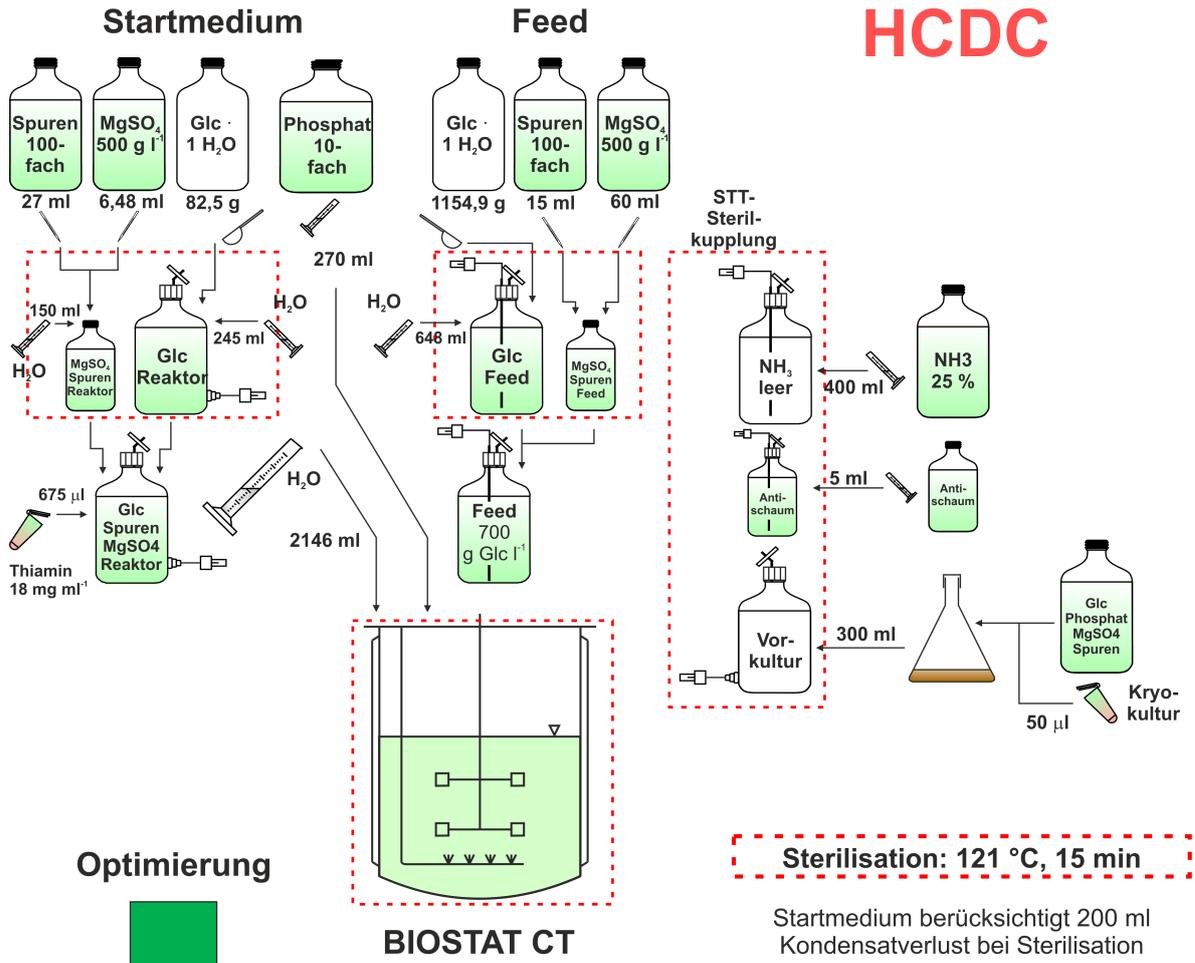


Abb. 6-1: Optimierung der Kultivierungsvorbereitung ausgehend vom HCDC- zum i²HCDC-Prozess. Der Medienansatz ergibt ein Startvolumen von 3 l und 1,5 l Feedlösung.

Ausgehend vom HCDC-Verfahren wurde über die iHCDC bis zur i²HCDC eine Kultivierungsstrategie entwickelt, welche dem Anwender eine einfache und robuste Methode zur Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener *E. coli* Derivate bietet. In Zeiten, in denen der Bedarf an geringeren Mengen Patienten-spezifischer Wirkstoffe sowie Wirkstoffe zur Behandlung von seltenen Erkrankungen steigt, ermöglicht das i²HCDC-Verfahren eine sichere und kosteneffizientere Lösung zur Herstellung unterschiedlicher Biopharmazeutika im Grammaßstab in Laborbioreaktoren.

Literaturverzeichnis

- Abbott BJ, Clamen A (1973) The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1): 117-127
- Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR (2001) Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology* 147 (Pt 6): 1483-1498
- Åkesson M, Hagander P, Axelsson JP (1999) A probing feeding strategy for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnol. Tech.* 13 (8): 523-528
- Arifin Y, Sabri S, Sugiarto H, Krömer JO, Vickers CE, Nielsen LK (2011) Deletion of *cscR* in *Escherichia coli* W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture. *J. Biotechnol.* 156 (4): 275-278
- Babaeipour V, Shojaosadati SA, Khalilzadeh R, Maghsoudi N, Tabandeh F (2008) A proposed feeding strategy for the overproduction of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 49 (Pt 2): 141-147
- Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Baeshen NA, Redwan EM (2015) Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (7): 953-962
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed M, Ramadan HI, Saini K, Redwan EM (2014) Cell factories for insulin production. *Microb. Cell. Fact.* 13 (1): 141-149
- Balasundaram B, Nesbeth D, Ward JM, Keshavarz-Moore E, Bracewell DG (2009) Step change in the efficiency of centrifugation through cell engineering: co-expression of *Staphylococcal* nuclease to reduce the viscosity of the bioprocess feedstock. *Biotechnol. Bioeng.* 104 (1): 134-142
- Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (5): 411-421
- Bang HB, Lee YH, Lee YJ, Jeong KJ (2016) High-Level Production of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 L1 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2): 356-363
- Battesti A, Majdalani N, Gottesman S (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 189-213
- Bauer S, Shiloach J (1974) Maximal exponential growth rate and yield of *E. coli* obtainable in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 16 (7): 933-941
- Berlec A, Štrukelj B (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (3-4): 257-274

- Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San K-Y (2002) Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase. *Metab. Eng.* 4 (3): 217-229.
- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (24): 13703-13708
- Bhandare P, Madhavan P, Rao B, Someswar Rao N (2010) Determination of amino acid without derivatization by using HPLC-HILIC column. *J Chem Pharm Res* 2 (2): 372-380
- Bhattacharya SK, Dubey AK (1995) Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. *Biotechnol. Lett.* 17 (11): 1155-1160
- Biener R, Steinkämper A, Hofmann J (2010) Calorimetric control for high cell density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain. *J. Biotechnol.* 146 (1–2): 45-53
- Blankenhorn D, Phillips J, Slonczewski JL (1999) Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 181 (7): 2209-2216
- Bordeaux M, de Girval D, Rullaud R, Subileau M, Dubreucq E, Drone J (2014) High-cell-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*, purification and characterization of a self-sufficient biosynthetic octane omega-hydroxylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (14): 6275-6283
- Bren A, Park JO, Towbin BD, Dekel E, Rabinowitz JD, Alon U (2016) Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Sci. Rep.* 6: 24834-24843
- Briehl H (2014) Korrosion von Metallen. In: Briehl H (Hrsg.) *Chemie der Werkstoffe*. Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden: 107-118
- Butler A (1998) Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms. *Science* 281 (5374): 207-209
- Cao Y, Cheng T, Zhao G, Niu W, Guo J, Xian M, Liu H (2016) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hydroxy fatty acids from glucose. *BMC Biotechnol.* 16: 26-34
- Casali N (2003) *Escherichia coli* Host Strains. In: Casali N, Preston A (Hrsg.) *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. Humana Press, Totowa, NJ: 27-48
- Castan A, Näsman A, Enfors S-O (2002) Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme Microb. Technol.* 30 (7): 847-854

- Chavrier P, Vingron M, Sander C, Simons K, Zerial M (1990) Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10 (12): 6578-6585
- Chen N, Huang J, Feng Z-B, Yu L, Xu Q-Y, Wen T-Y (2009) Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of L-threonine by *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158 (3): 595-604
- Chen W, Feng Y, Chen D, Wandinger-Ness A (1998) Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* 9 (11): 3241-3257
- Cheng J, Wu D, Chen S, Chen J, Wu J (2011) High-level extracellular production of alpha-cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *J. Agric. Food Chem.* 59 (8): 3797-3802
- Cherrington CA, Hinton M, Chopra I (1990) Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 68 (1): 69-74
- Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* 61 (3): 876-885
- Chubukov V, Gerosa L, Kochanowski K, Sauer U (2014) Coordination of microbial metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (5): 327-340
- Chung W-J, Huang C-L, Gong H-Y, Ou T-Y, Hsu J-L, Hu S-Y (2015) Recombinant production of biologically active giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli* by fed-batch culture. *Protein Expr. Purif.* 110: 79-88
- Daegelen P, Studier FW, Lenski RE, Cure S, Kim JF (2009) Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* 394 (4): 634-643
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6 (1): 23-28
- Dashty M (2013) A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin. Biochem.* 46 (15): 1339-1352
- Desclozeaux M, Venturato J, Wylie FG, Kay JG, Joseph SR, Le HT, Stow JL (2008) Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 295 (2): C545-C556
- Dittrich CR, Vadali RV, Bennett GN, San K-Y (2005) Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate. *Biotechnol. Prog.* 21 (2): 627-631

Doelle HW, Ewings KN, Hollywood NW (1982) Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. In: Fiechter A (Hrsg.) *Microbial Reactions*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 1-35

Dreher T, Walcarius B, Husemann U, Klingenberg F, Zahnow C, Adams T, de Wilde D, Casteels P, Greller G (2014) Microbial high cell density fermentations in a stirred single-use bioreactor. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 138: 127-147

Dreher T, Husemann U, Zahnow C, de Wilde D, Adams T, Greller G (2012) High Cell Density *Escherichia coli* Cultivation in Different Single-Use Bioreactor Systems. *Chem. Ing. Tech.* 85 (1-2): 162-171

Egli T (1995) The Ecological and Physiological Significance of the Growth of Heterotrophic Microorganisms with Mixtures of Substrates. In: Jones JG (Hrsg.) *Advances in Microbial Ecology*. Springer US, Boston, MA: 305-386

Eikmanns M, Eikmanns B (2008) Chemoorganotrophie: II. Aerobe und anaerobe Atmung. In: Munk K (Hrsg.) *Mikrobiologie*, 2008th edn. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 359-394

Eiteman MA, Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.* 24 (11): 530-536

Elbahloul Y, Steinbüchel A (2010) Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered *Escherichia coli* strain harboring the p(Microdiesel) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13): 4560-4565

El-Mansi EMT, Holms WH (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 135 (11): 2875-2883

Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström C, Wold S (2008) Design of experiments: principles and applications. MKS Umetrics AB, Umeå

Ernsting BR, Atkinson MR, Ninfa AJ, Matthews RG (1992) Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174 (4): 1109-1118

Ferenci T, Zhou Z, Betteridge T, Ren Y, Liu Y, Feng L, Reeves PR, Wang L (2009) Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 191 (12): 4025-4029

Fernández-Castané A, Vine CE, Caminal G, López-Santín J (2012) Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *J. Biotechnol.* 157 (3): 391-398

Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell. Fact.* 8: 17-24

- Finn RK (1954) Agitation-aeration in the laboratory and in industry. *Bacteriol. Rev.* 18 (4): 254-274
- Fuchs G (2014) Elektronentransportphosphorylierung der Atmungskette. In: Fuchs G (Hrsg.) Allgemeine Mikrobiologie, 9. Auflage edn. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 281-284
- Gaciarz A, Veijola J, Uchida Y, Saaranen MJ, Wang C, Hörkko S, Ruddock LW (2016) Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of *E. coli*. *Microb. Cell. Fact.* 15: 22-31
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (Hrsg.) The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ: 571-607
- Goldenring JR, Shen KR, Vaughan HD, Modlin IM (1993) Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung. *J. Biol. Chem.* 268 (25): 18419-18422
- Goldenring JR, Soroka CJ, Shen KR, Tang LH, Rodriguez W, Vaughan HD, Stoch SA, Modlin IM (1994) Enrichment of rab11, a small GTP-binding protein, in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* 267 (2 Pt 1): G187-G194
- Gopal GJ, Kumar A (2013) Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 32 (6): 419-425
- Gottesman S (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 465-506
- Gourse RL, Gaal T, Bartlett MS, Appleman JA, Ross W (1996) rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 645-677
- Grubbs FE (1969) Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11 (1): 1-21
- Gschaedler A, Boudrant J (1994) Amino acid utilization during batch and continuous cultures of *Escherichia coli* on a semi-synthetic medium. *J. Biotechnol.* 37 (3): 235-251.
- Han K, Lim HC, Hong J (1992) Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39 (6): 663-671
- Hellmuth K, Korz DJ, Sanders EA, Deckwer W-D (1994) Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J. Biotechnol.* 32 (3): 289-298
- Henes B, Sonnleitner B (2007) Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity. *J. Biotechnol.* 132 (2): 118-126

- Hoaglin DC (2003) John W. Tukey and Data Analysis. *Stat. Sci.* 18 (3): 311-318
- Hoffman RM (2015) Application of GFP imaging in cancer. *Lab. Invest.* 95 (4): 432-452
- Hoffmann F, Rinas U (2000) Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16 (6): 1000-1007
- Hoffmann F, Rinas U (2004) Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. In: Enfors S-O (Hrsg.) Physiological Stress Responses in Bioprocesses. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 73-92
- Holms H (1996) Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19 (2): 85-116
- Horta ACL, Sargo CR, da Silva AJ, de Carvalho Gonzaga M, Dos Santos MP, Goncalves VM, Zangirolami TC, de Campos Giordano R (2012) Intensification of high cell-density cultivations of *r E. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. *Bioprocess Biosyst Eng.* 35 (8): 1269-1280
- Huang C-J, Lin H, Yang X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (3): 383-399
- Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91 (1): 119-149
- Hwang SO, Feldberg RS (1990) Effect of Inclusion Body Production on Culture Turbidity and Cell Dry Weight in Growing Bacterial Cultures. *Biotechnol. Prog.* 6 (1): 48-50
- Jae-Ho L, Choi Y-H, Kang S-K, Park HH, Kwon I-B (1989) Production of human leukocyte interferon in *Escherichia coli* by control of growth rate in fed-batch fermentation. *Biotechnol. Lett.* 11 (10): 695-698
- Jagoe WN, Lindsay AJ, Read RJ, McCoy AJ, McCaffrey MW, Khan AR (2006) Crystal structure of rab11 in complex with rab11 family interacting protein 2. *Structure* 14 (8): 1273-1283
- Jensen EB, Carlsen S (1990) Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1): 1-11
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006) Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J. Biotechnol.* 127 (1): 84-94

- Jeong KJ, Rani M (2011) High-level production of a single chain antibody against anthrax toxin in *Escherichia coli* by high cell density cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 34 (7): 811-817
- Jung G, Denèfle P, Becquart J, Mayaux J-F (1988) High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1 β . *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139 (1): 129-146
- Kamionka M (2011) Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (2): 268-274
- Kayser A, Weber J, Hecht V, Rinas U (2005) Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology* 151 (Pt 3): 693-706
- Khalilzadeh R, Mohammadian-Mosaabadi J, Bahrami A, Nazak-Tabbar A, Nasiri-Khalili MA, Amouheidari A (2008) Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (12): 1643-1650
- Kim S-K, Park Y-C, Lee HH, Jeon ST, Min W-K, Seo J-H (2015a) Simple amino acid tags improve both expression and secretion of *Candida antarctica* lipase B in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 112 (2): 346-355
- Kim T-S, Jung H-M, Kim S-Y, Zhang L, Li J, Sigdel S, Park J-H, Haw J-R, Lee J-K (2015b) Reduction of Acetate and Lactate Contributed to Enhancement of a Recombinant Protein Production in *E. coli* BL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (7): 1093-1100
- Klumpp S, Zhang Z, Hwa T (2009) Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* 139 (7): 1366-1375
- Knabben I, Regestein L, Schauf J, Steinbusch S, Büchs J (2011) Linear correlation between online capacitance and offline biomass measurement up to high cell densities in *Escherichia coli* fermentations in a pilot-scale pressurized bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2): 204-211
- Korz DJ (1993) Entwicklung von Prozessstrategien zur Kultivierung von *Escherichia coli* zu hohen Zelldichten. Technische Universität, München
- Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer W-D (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39 (1): 59-65
- Lai F, Stubbs L, Artzt K (1994) Molecular analysis of mouse Rab11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein. *Genomics* 22 (3): 610-616
- Lecina M, Sarró E, Casablanco A, Gòdia F, Cairó JJ (2013) IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. *Biochem. Eng. J.* 70: 78-83

- Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg APJ (1999) Control of fed-batch fermentations. *Biotechnol. Adv.* 17 (1): 29-48
- Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14 (3): 98-105
- Lee YJ, Kim HS, Ryu AJ, Jeong KJ (2013) Enhanced production of full-length immunoglobulin G via the signal recognition particle (SRP)-dependent pathway in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 165 (2): 102-108
- Lee YJ, Lee R, Lee SH, Yim SS, Jeong KJ (2016) Enhanced secretion of recombinant proteins via signal recognition particle (SRP)-dependent secretion pathway by deletion of *rrsE* in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 113 (11): 2453-2461
- Levisauskas D, Simutis R, Borvitz D, Lübbert A (1996) Automatic control of the specific growth rate in fed-batch cultivation processes based on an exhaust gas analysis. *Bioprocess Eng.* 15 (3): 145-150
- Li J, Jaitzig J, Lu P, Süßmuth RD, Neubauer P (2015) Scale-up bioprocess development for production of the antibiotic valinomycin in *Escherichia coli* based on consistent fed-batch cultivations. *Microb. Cell. Fact.* 14: 83-95
- Li P, Gu Q, Wu X (2016) Fed-batch production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in soluble form in *Escherichia coli* and its purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 126: 115-121
- Li X, Robbins JW, Jr, Taylor KB (1992) Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *J. Ind. Microbiol.* 9 (1): 1-9
- Lin H, San KY, Bennett GN (2005) Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (4): 515-523
- Lin HY, Hanschke R, Nicklisch S, Riemschneider S, Meyer S, Gupta A, Neubauer P, Nietsche T, Hecker M, Jarchow R, Schwahn C (2001) Cellular Responses to Strong Overexpression of Recombinant Genes in *Escherichia Coli*. In: Merten O-W, Mattanovich D, Lang C, Larsson G, Neubauer P, Porro D, Postma P, de Mattos JT, Cole JA (Hrsg.) Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology: Selected articles from the Meeting of the EFB Section on Microbial Physiology, Semmering, Austria, 5th--8th October 2000. Springer Netherlands, Dordrecht: 55-73
- Lizak C, Fan Y-Y, Weber TC, Aebi M (2011) N-Linked glycosylation of antibody fragments in *Escherichia coli*. *Bioconjug. Chem.* 22 (3): 488-496
- Lovley DR, Woodward JC, Chapelle FH (1996) Rapid Anaerobic Benzene Oxidation with a Variety of Chelated Fe(III) Forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1): 288-291

Luli GW, Strohl WR (1990) Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (4): 1004-1011

Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* 109 (10): 4644-4681

Majewski RA, Domach MM (1990) Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 35 (7): 732-738

Martínez-Martínez I, Kaiser C, Rohde A, Ellert A, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer Á, Luttmann R (2007) High-level production of bacillus subtilis glycine oxidase by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Biotechnol. Prog.* 23 (3): 645-651

Matsui T, Sato H, Yamamuro H, Shinzato N, Matsuda H, Misawa S, Sato S (2008) High cell density cultivation of recombinant *E. coli* for hirudin variant 1 production by temperature shift controlled by pUC18-based replicative origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (5): 779-783

Meyer H-P, Leist C, Fiechter A (1984) Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. *J. Biotechnol.* 1 (5): 355-358.

Mishin AS, Belousov VV, Solntsev KM, Lukyanov KA (2015) Novel uses of fluorescent proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 27: 1-9

Mori H, Yano T, Kobayashi T, Shimizu S (1979) High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J. Chem. Eng. Japan* 12 (4): 313-319

Najafpour GD (2007) Material and Elemental Balance. In: Najafpour GD (Hrsg.) Biochemical Engineering and Biotechnology. Elsevier, Amsterdam: 228-251

Nakano K, Rischke M, Sato S, Märkl H (1997) Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (5): 597-601

Nelder JA, Mead R (1965) A Simplex Method for Function Minimization. *Comp. J.* 7 (4): 308-313

Nesbeth DN, Perez-Pardo M-A, Ali S, Ward J, Keshavarz-Moore E (2012) Growth and productivity impacts of periplasmic nuclease expression in an *Escherichia coli* Fab' fragment production strain. *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2): 517-527

Noll S, Reyelt J, Rysiok T, Kellner R, Güssow D, Jäkel S, Hager S, Kranz H (2013) Gezielte Optimierung von *Escherichia coli* BL21(DE3). *BIOspektrum* 19 (2): 211-213

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273 (5280): 1392-1395

Overmann J (2013) Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation, and Preservation of Prokaryotes. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 149-207

Paalme T, Tiisma K, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R (1990) Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 35 (3): 312-319

Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 9 (2): 89-94

Pleissner D, Wimmer R, Eriksen NT (2011) Quantification of amino acids in fermentation media by isocratic HPLC analysis of their alpha-hydroxy acid derivatives. *Anal. Chem.* 83 (1): 175-181

Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, Sabri M, Dozois CM (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 90-113

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 (2): 229-233

Reiling HE, Laurila H, Fiechter A (1985) Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *J. Biotechnol.* 2 (3): 191-206.

Ren Q, Henes B, Fairhead M, Thöny-Meyer L (2013) High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 13: 18-27

Riesenberg D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (4): 422-430

Riesenberg D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (1): 77-82

Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl H-D, Korz D, Sanders EA, Roß A, Deckwer W-D (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20 (1): 17-27

Riesenberg D (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (3): 380-384

Rizzo MA, Davidson MW, Piston DW (2009) Fluorescent protein tracking and detection: fluorescent protein structure and color variants. *Cold Spring Harb Protoc.* 4 (12): pdb.top63

Robinson M-P, Ke N, Lobstein J, Peterson C, Szkodny A, Mansell TJ, Tuckey C, Riggs PD, Colussi PA, Noren CJ, Taron CH, DeLisa MP, Berkmen M (2015) Efficient

- expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat. Commun.* 6: 8072-8080
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5: 172-188
- Rothen SA, Sauer M, Sonnleitner B, Witholt B (1998) Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101[pGEc47] on defined medium. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (1): 92-100
- Ruiz J, González G, de Mas C, López-Santín J (2011) A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 55 (2): 82-91
- Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A (2016) Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb. Cell. Fact.* 15: 33-39
- Sandén AM, Prytz I, Tubulekas I, Förberg C, Le H, Hektor A, Neubauer P, Pragai Z, Harwood C, Ward A, Picon A, de Mattos JT, Postma P, Farewell A, Nyström T, Reeh S, Pedersen S, Larsson G (2003) Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2): 158-166
- Schaepe S, Kuprijanov A, Simutis R, Lübbert A (2014) Avoiding overfeeding in high cell density fed-batch cultures of *E. coli* during the production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* 192, Part A: 146-153
- Schlegel S, Rujas E, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Luirink J, de Gier J-W (2013) Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microb. Cell. Fact.* 12 (1): 24-35
- Schmideder A, Priebe X, Rubenbauer M, Hoffmann T, Huang F-C, Schwab W, Weuster-Botz D (2016) Non-water miscible ionic liquid improves biocatalytic production of geranyl glucoside with *Escherichia coli* overexpressing a glucosyltransferase. *Bioprocess Biosyst Eng.* 39 (9): 1409-1414
- Schofield DM, Templar A, Newton J, Nesbeth DN (2016) Promoter engineering to optimise recombinant periplasmic Fab' fragment production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 32 (4): 840-847
- Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG, Deckwer W-D, Rinas U (1995) Comparison of temperature- and isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 17 (10): 947-953
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52 (3): 591-611
- Shiloach J, Bauer S (1975) High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 17 (2): 227-239

Shiloach J, Kaufman J, Guillard AS, Fass R (1996) Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (lambdaDE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* 49 (4): 421-428

Shiloach J, Fass R (2005) Growing *E. coli* to high cell density — A historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* 23 (5): 345-357

Shiloach J, Rinas U (2009) Glucose and Acetate Metabolism in *E. coli* - System Level Analysis and Biotechnological Applications in Protein Production Processes. In: Lee SY (Hrsg.) *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer Netherlands, Dordrecht: 377-400

Shimada T, Saito N, Maeda M, Tanaka K, Ishihama A (2015) Expanded roles of leucine-responsive regulatory protein in transcription regulation of the *Escherichia coli* genome: Genomic SELEX screening of the regulation targets. *Microb. Genom.* 1 (1): 1-19

Shimomura O (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* 217 (Pt 1): 1-15

Shimomura O (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 104 (2): 220-222

Shimomura O, Johnson FH (1978) Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (6): 2611-2615

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 (3): 223-239

Shojaosadati SA, Varedi Kolaei SM, Babaeipour V, Mohammad Farnoud A (2008) Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iran. J. Biotechnol.* 6 (2): 63-84

Shumilina E, Dobrovolska O, Del Conte R, Holen HW, Dikiy A (2014) Competitive cobalt for zinc substitution in mammalian methionine sulfoxide reductase B1 overexpressed in *E. coli*: structural and functional insight. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (1): 85-95

Siebertz K, van Bebber D, Hochkirchen T (2010) *Statistische Versuchsplanung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg

Singer A, Eiteman MA, Altman E (2009) DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (4): 521-530

Somers JM, Amzallag A, Middleton RB (1973) Genetic fine structure of the leucine operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 113 (3): 1268-1272

Son Y-J, Park K-H, Lee S-Y, Oh S-J, Kim C-K, Choi B-T, Park Y-C, Seo J-H (2007) Effects of temperature shift strategies on human preproinsulin production in the fed-

batch fermentation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12 (5): 556-561

Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115 (2): 113-128

Soto R, Caspeta L, Barrón B, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng. J.* 56 (3): 165-171

Stolper DA, Revsbech NP, Canfield DE (2010) Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (44): 18755-18760

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 (1): 113-130

Swartz JR (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2): 195-201

Tabandeh F, Khodabandeh M, Yakhchali B, Habib-Ghomi H, Shariati P (2008) Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture. *Chem. Eng. Sci.* 63 (9): 2477-2483

Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2): 211-222

Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2010) A thermostable phytase from *Bacillus sp.* MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (3): 279-287

Tripathi NK, Sathyaseelan K, Jana AM, Rao PVL (2009) High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. *Def. Sci. J.* 59 (2): 137-146

Tripathi NK (2016) Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Reviews* 3 (3): 116-133

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544

Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD (2009) High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One* 4 (2): e4489

Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135 (4): 913-924

Veit A, Polen T, Wendisch VF (2007) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2): 406-421

Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (5): 3653-3661

Wachter RM (2006) The family of GFP-like proteins: structure, function, photophysics and biosensor applications. Introduction and perspective. *Photochem. Photobiol.* 82 (2): 339-344

Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW, Aebi M (2002) N-Linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 298 (5599): 1790-1793

Waegeman H, De Lausnay S, Beauprez J, Maertens J, De Mey M, Soetaert W (2013) Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering. *N. Biotechnol.* 30 (2): 255-261

Walsh G (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* 32 (10): 992-1000

Wang J, Cheng L-K, Wang J, Liu Q, Shen T, Chen N (2013) Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (17): 7587-7596

Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr, Karcher R, Li X-, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA, Ehlers MD (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135 (3): 535-548

Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (5): 494-499

Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E (2014) Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol.* 24 (7): 407-415

Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (1): 12-50

Wong MS, Wu S, Causey TB, Bennett GN, San K-Y (2008) Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metab. Eng.* 10 (2): 97-108

Wong M, Wright M, Woodley JM, Lye GJ (2009) Enhanced recombinant protein synthesis in batch and fed-batch *Escherichia coli* fermentation based on removal of inhibitory acetate by electrodialysis. *J Chem Technol Biotechnol* 84 (9): 1284-1291

Xue W, Fan D, Shang L, Zhu C, Ma X, Zhu X, Yu Y (2010) Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *J Biosci Bioeng* 109 (3): 257-261

Yalkowsky SH, Dannenfelser RM (1992) Aquasol database of aqueous solubility. *College of Pharmacy, University of Arizona, Tucson, AZ*

- Yamane T, Hibino W, Ishihara K, Kadotani Y, Kominami M **(1992)** Fed-batch culture automated by uses of continuously measured cell concentration and culture volume. *Biotechnol. Bioeng.* 39 (5): 550-555
- Yang F, Moss LG, Phillips GN, Jr **(1996)** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14 (10): 1246-1251
- Yang Y-X, Qian Z-G, Zhong J-J, Xia X-X **(2016)** Hyper-production of large proteins of spider dragline silk MaSp2 by *Escherichia coli* via synthetic biology approach. *Process Biochem.* 51 (4): 484-490
- Yari K, Fatemi SS-A, Tavallaei M **(2012)** High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 35 (3): 407-414
- Yee L, Blanch HW **(1993)** Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.* 41 (2): 221-230
- Zanette D, Dundon W, Soffientini A, Sottani C, Marinelli F, Akeson A, Sarubbi E **(1998)** Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: Large-scale microbial growth and protein purification. *J. Biotechnol.* 64 (2-3): 187-196
- Zhang J, Greasham R **(1999)** Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (4): 407-421
- Zhang X-M, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T **(2004)** Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279 (41): 43027-43034
- Zhu F, Lu L, Fu S, Zhong X, Hu M, Deng Z, Liu T **(2015)** Targeted engineering and scale up of lycopene overproduction in *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 50 (3): 341-346
- Zou C, Duan X, Wu J **(2014)** Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy. *Bioresour. Technol.* 172: 174-179

Skripte

Telgheder U (2013) Leitfaden zur Auswertung analytischer Ergebnisse. *Praktikum Wasserchemie/Wasseranalytik* Universität Duisburg Essen: URL https://www.uni-due.de/imperia/md/content/water-science/ws1314/1351_2661_ws1314_leitfaden_auswertung.pdf

Webseiten

ExpASy ProtParam tool (2015), Zugriff am 26.02.2015 (H-Rab11a);
<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>

ExpASy ProtParam tool (2015), Zugriff am 19.11.2015 (HTT-Rab11a);
<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>

IFA (2016) GESTIS-Stoffdatenbank, Zugriff am 15.08.2016;
<http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisdeu:sdb-deu>.

IFA (2016), GESTIS-Stoffdatenbank, Zugriff am 15.08.2016;
<http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisdeu:sdb-deu>.

IFA (2016), GESTIS-Stoffdatenbank, Zugriff am 15.08.2016;
<http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisdeu:sdb-deu>.

Anhang A

Berechnungsgrundlagen zur Auswertung von Analysendaten nach Telgheder (2013). Die angegebenen Gleichungen beziehen sich beispielhaft auf den Analyten Glucose und tragen daher den Index Glc. Andere Analyten werden durch entsprechende Indices kenntlich gemacht.

$$h_{\text{Peak}} = b_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}} + a_{\text{Glc}} \quad (\text{A.1})$$

$$\hat{c}_{\text{Glc}} = \frac{h_{\text{Peak}} - a_{\text{Glc}}}{b_{\text{Glc}}} \quad (\text{A.2})$$

$$b_{\text{Glc}} = \frac{Q_{\text{C}_{\text{Glc}} h_{\text{Peak}}}}{Q_{\text{C}_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}} \quad (\text{A.3})$$

$$Q_{\text{C}_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}} = \sum_{i=1}^n c_{\text{Glc},i}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n c_{\text{Glc},i} \right)^2}{n} \quad (\text{A.4})$$

$$Q_{h_{\text{Peak}} h_{\text{Peak}}} = \sum_{i=1}^n h_{\text{Peak},i}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n h_{\text{Peak},i} \right)^2}{n} \quad (\text{A.5})$$

$$Q_{\text{C}_{\text{Glc}} h_{\text{Peak}}} = \sum_{i=1}^n (c_{\text{Glc},i} h_{\text{Peak},i}) - \frac{\sum_{i=1}^n c_{\text{Glc},i} \sum_{i=1}^n h_{\text{Peak},i}}{n} \quad (\text{A.6})$$

$$a_{\text{Glc}} = \bar{h}_{\text{Peak}} - b_{\text{Glc}} \bar{c}_{\text{Glc}} \quad (\text{A.7})$$

$$\bar{c}_{\text{Glc}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_{\text{Glc},i}}{n} \quad (\text{A.8})$$

$$\bar{h}_{\text{Peak}} = \frac{\sum_{i=1}^n h_{\text{Peak},i}}{n} \quad (\text{A.9})$$

$$s_{h_{\text{peak}}} = \sqrt{\frac{Q_{h_{\text{Peak}} h_{\text{Peak}}} - \frac{Q_{\text{C}_{\text{Glc}} h_{\text{Peak}}}^2}{Q_{\text{C}_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}}{n - 2}} \quad (\text{A.10})$$

$$s_{b_{\text{Glc}}} = \frac{s_{h_{\text{peak}}}}{\sqrt{Q_{\text{C}_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.11})$$

$$s_{a_{\text{Glc}}} = s_{h_{\text{Peak}}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n c_{\text{Glc},i}^2}{n Q_{c_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.12})$$

$$s_{c_{\text{Glc}0}} = \frac{s_{h_{\text{Peak}}}}{b} \quad (\text{A.13})$$

$$h_{\text{Peakcrit}} = a_{\text{Glc}} + s_{h_{\text{Peak}}} t_{f\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}_{\text{Glc}}^2}{Q_{c_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.14})$$

Nachweisgrenze:

$$c_{\text{GlcNG}} = \frac{s_{h_{\text{Peak}}}}{b_{\text{Glc}}} t_{f\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}_{\text{Glc}}^2}{Q_{c_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.15})$$

Erfassungsgrenze:

$$c_{\text{GlcEG}} = c_{\text{GlcNG}} + \frac{s_{h_{\text{Peak}}}}{b_{\text{Glc}}} t_{f\beta} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}_{\text{Glc}}^2}{Q_{c_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.16})$$

Bestimmungsgrenze:

$$c_{\text{GlcBG}} = k \frac{s_{h_{\text{Peak}}}}{b_{\text{Glc}}} t_{f\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k c_{\text{GlcNG}} - \bar{c}_{\text{Glc}})^2}{Q_{c_{\text{Glc}} c_{\text{Glc}}}}} \quad (\text{A.17})$$

Tab. A-1: Ergebnis der Regressionsanalyse von Glucose-Kalibrierproben mit Anzahl der Standards n , Parallelbestimmungen m und relativer Ergebnisunsicherheit $1/k$ für Standards in HCDC/iHCDC-Startmedium mit $n = 6$; $m = 14$, $k = 3$ und in i²HCDC-Startmedium mit $n = 10$; $m = 17$, $k = 3$

	a_{Glc} / μV	b_{Glc} / $\mu\text{V l g}^{-1}$	c_{GlcNG} / mg l^{-1}	c_{GlcEG} / mg l^{-1}	c_{GlcBG} / mg l^{-1}
HCDC/iHCDC	6074,7	42220,0	38,6	77,3	110,9
i ² HCDC	5207,4	47924,9	7,4	14,7	21,9

Tab. A-2: Ergebnis der Regressionsanalyse von Acetat-Kalibrierproben mit Anzahl der Standards n , Parallelbestimmungen m und relativer Ergebnisunsicherheit $1/k$. HCDC/iHCDC: $n = 4$; $m = 14$, $k = 3$; i²HCDC: $n = 4$; $m = 17$, $k = 3$

	a_{Ac^-} / μV	b_{Ac^-} / $\mu\text{V l g}^{-1}$	$c_{\text{Ac}^- \text{NG}}$ / mg l^{-1}	$c_{\text{Ac}^- \text{EG}}$ / mg l^{-1}	$c_{\text{Ac}^- \text{BG}}$ / mg l^{-1}
HCDC/iHCDC	60,5	18851,7	2,28	4,55	6,77
i ² HCDC	66,2	18972,7	3,98	7,95	11,76

Anhang B

Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.1

HCDC

Tab. B-1: Prozessbeginn und -ende Batch BL21DE3pET0215

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,046	0,8	$9,2 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^8$	0,8	28,70	0,0	0,0	0,00
19,17	4,799	471,1	$4,7 \cdot 10^{11}$	$4,4 \cdot 10^{11}$	238,3	0,00	1133,6	70,0	0,57

Tab. B-2: Batch BL21DE3pET0615

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,979	0,6	$7,7 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^8$	0,9	27,17	0,0	1,36	0,0	12,51	0,00	0,00
2,00	2,959	3,0			2,2	26,31	2,6	1,38	-0,1	12,41	0,10	0,23
3,00	2,941	4,4			3,5	24,25	8,6	1,27	-0,1	11,92	0,57	0,21
4,00	2,926	7,1			5,6	22,54	13,6	1,18	-0,1	12,26	0,25	0,20
5,00	2,916	11,3			8,9	19,68	21,8	1,15	1,2	12,11	0,36	0,20
6,00	2,906	18,5			14,9	14,25	37,4	1,15	2,5	11,56	0,85	0,21
7,00	2,898	29,1			25,3	6,17	60,7	1,13	4,2	11,57	0,81	0,20
7,53	2,877	37,7			32,2	0,00	78,5	1,09	5,4	11,43	0,97	0,12
8,00	2,877	37,4	$2,5 \cdot 10^{10}$	$2,1 \cdot 10^{10}$	32,6	0,00	79,4	1,08	5,5	11,63	0,72	0,00
15,50	3,806	283,2	$1,8 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{11}$	187,0	0,00	606,7	0,15	41,8	6,20	3,87	0,38
17,50	4,130	354,0			211,3	0,00	809,0	0,06	51,3	4,79	5,08	0,38
18,25	4,254	377,8			221,0	0,00	893,9	0,07	54,6	1,27	9,75	0,36
19,50	4,512	437,3			239,0	0,00	1054,3	0,07	62,6	0,16	11,27	0,36
20,00	4,607	449,0	$3,7 \cdot 10^{11}$	$2,7 \cdot 10^{11}$	241,3	0,00	1124,6	0,07	66,0	0,10	11,35	0,36

iHCDC

Tab. B-3: Prozessbeginn und -ende Batch BL21DE3pET0315

t / h	V_L / l	m_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,002	1,7	$1,2 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	0,9	0,00	0,0	0,0	0,00
23,08	4,706	465,9	$4,3 \cdot 10^{11}$	$4,4 \cdot 10^{11}$	234,3	0,00	1119,8	61,2	0,18

Tab. B-4: Batch BL21DE3pET0715

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,033	1,1	$9,5 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^8$	0,9	0,00	0,0	1,24	0,0	12,03	0,00	0,00
2,00	3,016	2,1			1,4	0,00	1,5	1,28	-0,1	12,00	0,02	0,00
4,00	2,997	3,6			2,9	0,00	5,1	1,19	-0,1	11,92	0,09	0,00
6,00	2,989	7,5			5,9	0,00	12,3	1,14	1,0	11,76	0,18	0,00
15,50	3,439	141,6			103,3	0,00	285,5	0,66	20,3	8,02	2,58	0,17
17,50	3,744	233,4			154,0	0,00	476,3	0,43	32,5	5,63	4,67	0,13
18,25	3,893	281,0	$2,6 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{11}$	175,5	0,00	575,6	0,34	38,6	4,58	5,69	0,21
20,50	4,227	369,3			210,5	0,00	794,5	0,02	49,9	2,53	8,00	0,19
21,50	4,381	410,0			222,3	0,00	907,7	0,02	54,7	1,45	9,39	0,23
22,50	4,547	454,0			242,5	0,00	1035,3	0,02	58,6	0,74	10,35	0,28
23,17	4,650	485,8	$4,2 \cdot 10^{11}$	$3,3 \cdot 10^{11}$	245,3	0,00	1124,5	0,11	62,5	0,20	11,14	0,39

Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.2

HCDC

Tab. B-5: Kultivierungsbeginn und -ende Batch BL21DE3pET0815

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+}	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,027	1,8	$1,1 \cdot 10^9$	$9,6 \cdot 10^8$	0,8		25,91	0,0	0,0	0,00
15,00	3,820	260,9	$2,6 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{11}$	174,5	0,0	1,36	560,0	34,8	0,39
19,83	4,642	412,8	$1,6 \cdot 10^{11}$	$3,9 \cdot 10^{10}$	228,5	34,1	0,00	1123,0	60,2	1,51

Tab. B-6: Kultivierungsbeginn und -ende Batch BL21DE3pET1015

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+}	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,029	1,4	$5,2 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^8$	0,8		28,19	0,0	1,53	0,0	12,17	0,00	0,00
14,75	3,652	251,4	$2,1 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{11}$	176,3	0,0	1,12	529,1	0,36	34,9	5,19	5,39	0,42
20,02	4,571	399,7	$9,5 \cdot 10^{10}$	$5,6 \cdot 10^{10}$	213,5	36,6	0,00	1132,2	0,27	62,7	0,09	11,40	2,31

Tab. B-7: Batch BL21DE3pET1815

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+}	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,989	1,5	$1,4 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	0,9		26,44	0,0	1,47	0,0	12,68	0,00	0,00
2,00	2,975	3,3			2,2		26,32	0,4	1,40	-0,1	12,33	0,35	0,00
3,00	2,961	4,6			3,5		25,52	2,8	1,31	-0,2	12,47	0,21	0,00
4,00	2,948	7,4			5,6		24,04	7,1	1,18	-0,3	12,31	0,36	0,00
5,00	2,934	11,5			8,9		20,53	17,3	1,14	0,9	12,28	0,37	0,22
6,00	2,929	18,3			14,5		15,59	31,6	1,17	2,1	12,24	0,38	0,23
7,00	2,919	29,0			24,7		7,10	56,3	1,13	3,6	11,97	0,61	0,20
7,55	2,910	38,2	$3,0 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^{10}$	32,5		0,00	76,9	1,12	4,8	11,69	0,85	0,15
8,05	2,896	37,6	$4,1 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^{10}$	34,3		0,00	77,6	1,13	4,8	11,67	0,85	0,00
11,00	3,070	90,4			74,3		0,00	182,1	0,88	12,5	10,33	1,49	0,14
12,00	3,160	118,9			92,0		0,00	238,7	0,76	16,3	9,18	2,32	0,13
13,00	3,272	151,2			114,5		1,24	310,9	0,65	21,1	8,24	2,95	0,17
14,00	3,426	197,8			142,8		0,00	404,4	0,55	27,3	7,07	3,80	0,23
15,00	3,626	251,6	$2,5 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{11}$	175,8	0,0	0,00	524,9	0,32	35,4	5,63	5,01	0,35
16,00	3,763	288,5			194,0	4,1	0,00	613,3	0,04	40,4	4,79	5,75	0,24
17,00	3,919	318,3	$2,6 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{11}$	207,5	10,0	0,00	705,5	0,03	45,2	2,97	7,81	0,29
18,00	4,081	348,6			211,5	17,0	0,00	809,6	0,01	50,5	1,87	9,10	0,38
19,00	4,237	373,3			217,8	25,3	0,00	928,0	0,01	56,4	0,93	10,30	0,46
20,65	4,554	423,8	$2,2 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{11}$	238,0	36,5	0,00	1119,5	0,15	65,2	0,11	11,41	1,36

iHCDC

Tab. B-8: Batch BL21DE3pET0515

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+}	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,977	0,3	$5,9 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$	0,9		0,00	0,0	0,0	0,00
18,00	3,742	255,4	$2,8 \cdot 10^{11}$	$2,7 \cdot 10^{11}$	170,8	0,0	0,00	534,2	34,5	0,45
23,50	4,493	421,6	$1,2 \cdot 10^{11}$	$1,0 \cdot 10^{11}$	232,8	37,8	0,00	1123,0	60,5	1,25

Tab. B-9: Batch BL21DE3pET0915

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,988	2,1	$1,4 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	1,0		0,00	0,0	0,0	0,00
18,00	3,749	249,7	$2,6 \cdot 10^{11}$	$1,9 \cdot 10^{11}$	173,5	0,0	0,00	532,0	35,3	0,38
23,75	4,564	463,6	$1,9 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{11}$	236,3	41,2	0,00	1122,3	62,9	1,40

Tab. B-10: Batch BL21DE3pET1115

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,994	1,3	$4,3 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	1,0		0,00	0,0	1,34	0,0	12,31	0,00	0,00
17,75	3,778	269,0	$2,2 \cdot 10^{11}$	$2,0 \cdot 10^{11}$	179,0	0,0	1,50	542,3	0,37	39,3	4,76	5,88	0,25
23,42	4,647	454,1	$5,9 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	237,8	37,3	0,00	1122,7	0,45	68,6	0,13	11,49	1,26

Tab. B-11: Batch BL21DE3pET1915

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,989	1,5	$1,7 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	1,1		0,00	0,0	1,26	0,0	12,14	0,00	0,00
2,00	2,976	2,1			1,4		0,00	0,8	1,27	0,0	12,10	0,04	0,00
4,00	2,963	3,7			3,0		0,00	4,3	1,37	0,0	12,04	0,08	0,00
6,00	2,940	6,9			5,9		0,00	11,3	1,19	0,0	12,03	0,12	0,00
8,00	2,964	13,4			11,3		0,00	24,9	1,05	1,4	12,00	-0,02	0,00
10,00	2,984	26,1			21,8		0,00	50,0	1,13	3,6	11,80	0,03	0,00
12,00	3,055	49,4			40,0		0,00	95,7	1,01	7,2	10,50	0,98	0,00
13,00	3,096	66,0			52,8		0,00	131,0	0,94	9,8	10,31	0,98	0,00
15,00	3,271	119,4			93,8		0,00	238,7	0,77	17,5	8,67	2,10	0,00
16,00	3,369	152,9			115,5		0,00	305,8	0,69	22,3	7,83	2,69	0,14
17,00	3,500	194,0			135,3		0,00	390,0	0,58	27,9	6,81	3,49	0,18
18,50	3,750	269,6	$2,7 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{11}$	177,5	0,0	0,00	561,6	0,35	39,5	4,96	5,15	0,38
19,50	3,823	296,6			186,5	3,5	0,00	638,4	0,16	44,0	4,19	5,94	0,28
20,50	3,951	334,0	$2,4 \cdot 10^{11}$	$2,1 \cdot 10^{11}$	211,3	10,3	0,00	716,9	0,04	48,3	3,15	7,08	0,36
21,50	4,063	361,6			218,3	16,1	0,00	804,3	0,01	51,9	2,25	8,13	0,34
22,50	4,203	379,6			220,0	22,5	0,00	903,5	0,07	55,7	1,38	9,21	0,47
24,45	4,552	411,0	$1,4 \cdot 10^{11}$	$8,4 \cdot 10^{10}$	220,5	33,2	0,00	1121,1	0,22	63,8	0,17	10,84	1,63

Kultivierungsdaten Kapitel 5.1.3

Tab. B-12: Verlauf der optischen Dichte bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen. Von links nach rechts c_{Leu} in g l⁻¹: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 1,0 und 3,0.

1. Messung									2. Messung								
t / h	ΔOD_{600} / -								t / h	ΔOD_{600} / -							
0,0									0,0								
12,9	0,02	0,33	0,38	0,36	0,30	0,22	0,14	0,02	15,9	0,02	1,78	1,35	1,17	0,97	0,86	0,46	0,06
14,1	0,02	0,45	0,50	0,49	0,40	0,28	0,19	0,03	16,9	0,02	2,50	1,83	1,53	1,37	1,15	0,65	0,07
15,6	0,01	0,88	0,95	0,92	0,77	0,52	0,32	0,04	17,9	0,02	3,81	2,33	2,21	1,91	1,60	0,88	0,08
17,5	0,02	1,96	2,01	1,84	1,53	1,04	0,62	0,05	18,9		4,64	3,31	3,06	2,38	2,08	1,15	0,10
18,8		3,25	3,08	2,80	2,40	1,60	0,95	0,07	20,4		4,93	5,94	4,83	3,69	2,85	1,75	0,13
20,5		5,21	5,86	5,11	4,16	2,71	1,54	0,09	22,0		5,14	9,05	7,99	5,70	4,60	2,51	0,16
21,5		5,28	7,76	6,40	5,00	3,21	2,33	0,11									

Tab. B-13: Untersuchung der Abhängigkeit von μ und $y_{X/Leu}$ von der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP. N₁ bis N₃

N ₁				N ₂				N ₃			
t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}
/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹
0,00	0,00 ¹	0,00	0,105	0,00	0,00	0,00	0,340	0,00	0,00	0,00	0,605
12,00	0,36	0,14	0,100	12,00	0,23	0,09	0,337	12,00	0,18	0,07	0,606
13,00	0,55	0,22	0,071	13,00	0,34	0,13	0,327	13,00	0,25	0,10	0,604
14,00	0,88	0,35	0,073	14,00	0,52	0,20	0,310	14,00	0,36	0,14	0,608
15,50	1,63	0,64	0,072	15,50	0,96	0,38	0,295	15,50	0,64	0,25	0,599
17,55	2,97	1,17		17,55	2,08	0,82	0,288	17,55	1,31	0,51	0,574
19,50	2,23	0,88		19,50	2,10	0,83		19,50	1,44	0,57	

Tab. B-14: Untersuchung der Abhängigkeit von μ und $y_{X/Leu}$ von der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP. N₄ bis N₆

N ₄				N ₅				N ₆			
t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}
/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹
0,00	0,00	0,00	0,105	0,00	0,00	0,00	0,340	0,00	0,00	0,00	0,605
12,00	0,30	0,12	0,098	12,00	0,17	0,07	0,341	12,00	0,13	0,05	0,594
13,00	0,42	0,17	0,095	13,00	0,25	0,10	0,295	13,00	0,19	0,07	0,587
14,00	0,66	0,26	0,090	14,00	0,37	0,14	0,334	13,92	0,27	0,10	0,590
15,50	1,22	0,48	0,078	15,50	0,69	0,27	0,328	15,50	0,47	0,19	0,590
17,55	2,77	1,09		17,55	1,49	0,59	0,308	17,50	0,94	0,37	0,570
19,50	4,11	1,62		19,50	2,10	0,83		19,50	1,67	0,66	

Tab. B-15: Untersuchung der Abhängigkeit von μ und $y_{X/Leu}$ von der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP. N₇ bis N₉

N ₇				N ₈				N ₉			
t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}
/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹
0,00	0,00	0,00	0,105	0,00	0,00	0,00	0,340	0,00	0,00	0,00	0,605
12,00	0,20	0,08	0,097	12,00	0,13	0,05	0,315	12,00	0,09	0,03	0,598
13,00	0,27	0,11	0,088	13,00	0,19	0,07	0,290	13,00	0,13	0,05	0,583
14,00	0,42	0,17	0,095	13,92	0,27	0,11	0,330	13,92	0,18	0,07	0,586
15,50	0,76	0,30	0,086	15,50	0,51	0,20	0,320	15,50	0,31	0,12	0,576
17,55	1,68	0,66		17,50	1,00	0,39	0,308	17,50	0,61	0,24	0,569
19,50	2,93	1,15		19,50	1,72	0,68		19,50	1,13	0,44	

¹ Bei $t = 0$ h wurde die optische Dichte aufgrund der geringen Zelldichte zu diesem Zeitpunkt nicht gemessen. Der Wert wurde gleich Null gesetzt und rot markiert. Gilt für Tab. B-13 bis Tab. B-16.

Tab. B-16: Untersuchung der Abhängigkeit von μ und $y_{X/Leu}$ von der Glucose- und Leucinkonzentration mittels SVP. N₁₀ bis N₁₂

N ₁₀				N ₁₁				N ₁₂			
t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}	t	ΔOD_{600}	$c_{X\Delta OD_{600}}$	c_{Leu}
/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹	/ h	/ -	/ g l ⁻¹	/ g l ⁻¹
0,00	0,00	0,00	0,340	0,00	0,00	0,00	0,340	0,00	0,00	0,00	0,340
12,00	0,18	0,07	0,336	12,00	0,17	0,07	0,338	12,00	0,18	0,07	0,341
13,00	0,26	0,10	0,334	13,00	0,26	0,10	0,331	13,00	0,27	0,10	0,335
13,92	0,37	0,14	0,331	13,92	0,36	0,14	0,330	13,92	0,38	0,15	0,345
15,50	0,68	0,27	0,324	15,50	0,66	0,26	0,322	15,50	0,70	0,28	0,329
17,50	1,42	0,56	0,302	17,50	1,37	0,54	0,305	17,50	1,47	0,58	0,305
19,50	2,63	1,04		19,50	2,49	0,98		19,50	2,67	1,05	

Tab. B-17: Batch ER2507pGLO0116

t	V _L	\bar{m}_X	\bar{c}_X	\bar{c}_{X+}	ΔOD_{600}	m _{Glc}	m _{NB}	c _{Leu}	m _{LeuB}	c _{Ac⁻}
/ h	/ l	/ g	/ KBE ml ⁻¹		/ -	/ g	/ g	/ g l ⁻¹	/ g	/ g l ⁻¹
0,0	3,050	1,8	2,6 · 10 ⁹	2,6 · 10 ⁹	1,7	0,0	0,0	0,20	0,53	0,00
25,0	3,616	159,3			116,3	327,0	27,9	0,00	8,38	0,05
26,0	3,689	181,6			126,0	382,2	31,3	0,00	9,33	0,07
27,0	3,775	205,8			135,3	444,8	35,6	0,00	10,54	0,10
28,0	3,875	237,2			150,0	517,4	40,2	0,00	11,82	0,26
29,0	3,982	266,3			158,3	601,6	44,9	0,00	13,14	0,32
30,5	4,189	314,8			178,3	752,3	52,8	0,00	15,38	0,94
31,0	4,170	318,5	1,7 · 10 ¹¹	1,8 · 10 ¹¹	176,8	811,4	57,5	0,15	16,69	2,00
32,0	4,372	332,2			186,0	893,6	62,6	0,24	18,12	2,97
33,0	4,498	350,8			169,8	985,3	69,1	0,43	19,96	4,35
33,5	4,582	355,2	1,5 · 10 ¹¹	1,4 · 10 ¹¹	161,3	1033,9	73,4	0,73	21,16	5,53

Tab. B-18: Batch ER2507pGLO0216

t	V _L	\bar{m}_X	\bar{c}_X	\bar{c}_{X+}	ΔOD_{600}	m _{Glc}	m _{NB}	c _{Leu}	m _{LeuB}	c _{Ac⁻}
/ h	/ l	/ g	/ KBE ml ⁻¹		/ -	/ g	/ g	/ g l ⁻¹	/ g	/ g l ⁻¹
0,0	3,049	1,4	2,5 · 10 ⁹	2,7 · 10 ⁹	1,8	0,0	0,0	0,50	0,56	0,00
25,0	3,688	183,6			121,5	384,2	26,5	0,00	9,53	0,12
26,0	3,769	213,3			138,3	448,3	30,4	0,00	10,86	0,12
27,0	3,869	242,3			151,3	523,0	35,1	0,00	12,42	0,00
28,0	3,986	278,4			167,8	609,4	40,0	0,00	14,11	0,00
29,0	4,123	313,5			180,8	710,6	45,7	0,00	16,04	0,00
29,8	4,256	346,5	2,3 · 10 ¹¹	1,7 · 10 ¹¹	192,3	808,3	51,3	0,00	17,91	0,38
31,0	4,415	383,2			208,5	929,4	56,5	0,00	19,68	0,47
32,0	4,564	424,8			211,8	1044,6	61,2	0,00	21,28	0,55
32,7	4,655	443,5	2,7 · 10 ¹¹	1,9 · 10 ¹¹	214,3	1119,4	65,2	0,00	22,63	0,68

Tab. B-19: Batch ER2507pGLO0516

t	V _L	\bar{m}_X	\bar{c}_X	\bar{c}_{X+}	ΔOD_{600}	m _{GFP}	c _{Glc}	m _{Glc}	m _{NB}	m _{LeuB}	c _{Ac⁻}
/ h	/ l	/ g	/ KBE ml ⁻¹		/ -	/ g l ⁻¹	/ g	/ g	/ g	/ g	/ g l ⁻¹
0,0	3,000	3,6	2,2 · 10 ⁹	1,9 · 10 ⁹	1,8		0,000	0,0	0,0	0,24	0,00
30,9	3,948	298,7	1,0 · 10 ¹¹	9,2 · 10 ¹⁰	175,3	0,00	0,000	679,7	43,5	15,54	0,27
35,7	4,560	439,7	1,5 · 10 ¹¹	1,0 · 10 ¹¹	217,8	5,54	0,000	1110,6	65,1	23,13	0,60

Tab. B-20: Batch ER2507pGLO1216

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+}	ΔOD_{600} / -	m_{GFP} / g l ⁻¹	c_{Glc} / g	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	m_{LeuB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,0	2,987	2,5	$2,1 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	1,6		0,000	-0,2	0,0	0,41	0,00
25,0	3,437	135,4			99,8		0,000	277,6	20,2	7,50	0,00
26,0	3,489	156,1			108,0		0,000	325,1	23,4	8,62	0,00
27,0	3,560	181,2			130,3		0,000	380,4	27,3	9,98	0,00
28,0	3,655	212,6			147,3		0,000	444,5	31,9	11,63	0,00
29,0	3,757	242,8			158,5		0,000	518,7	36,6	13,28	0,00
30,2	3,913	286,3	$1,2 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{11}$	173,5	0,00	0,000	627,3	42,9	15,48	0,21
31,0	3,982	302,6			178,8	3,59	0,000	685,0	45,7	16,46	0,34
32,0	4,096	339,9	$2,0 \cdot 10^{11}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	195,8	4,59	0,000	766,5	51,1	18,35	0,29
33,0	4,214	368,9			205,3	5,56	0,000	856,8	55,3	19,84	0,45
34,0	4,351	399,5			216,8	8,04	0,000	959,8	59,6	21,34	0,57
35,7	4,588	435,8	$2,0 \cdot 10^{11}$	$2,1 \cdot 10^{11}$	214,0	6,59	0,000	1118,8	69,5	24,83	3,03

Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.1

i²HCD

Tab. B-21: Batch BL210814

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	m_{O_2} / g	m_{CO_2} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,031	0,9	0,3	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
1,00	2,985	0,5	0,5	0,00	0,0	-0,2	0,2	0,2	0,00
13,00	3,057	30,4	23,9	0,00	59,9	4,8	19,5	30,7	0,00
14,00	3,056	41,7	32,1	0,00	82,8	6,8	26,9	42,4	0,00
15,00	3,059	57,8	44,5	0,00	114,2	9,3	37,0	58,7	0,00
16,00	3,082	81,6	59,5	0,33	157,1	12,5	51,2	81,9	0,00
17,00	3,135	111,7	84,0	0,27	216,0	17,0	71,2	114,5	0,00
18,00	3,283	154,9	111,0	0,84	297,3	22,9	102,1	164,3	0,32
19,00	3,403	203,3	144,0	1,14	410,0	31,1	146,3	231,6	0,35
20,00	3,581	262,7	179,0	1,36	537,3	39,8	203,2	319,9	0,33
21,00	3,708	310,1	196,5	1,15	642,2	46,6	251,6	396,1	0,33
22,00	3,865	361,9	231,0	0,92	766,4	54,2	314,6	491,8	0,38
23,00	4,066	422,6	252,0	0,62	914,2	62,4	400,0	616,4	0,46
23,83	4,287	472,7	270,0	0,79	1047,0	68,9	494,2	744,3	0,40

Tab. B-22: Batch BL210914

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	m_{O_2} / g	m_{CO_2} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,000	1,5	0,5	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
13,00	3,077	28,2	23,5		58,8	4,4	19,3	30,1	
14,00	3,094	39,4	32,0	0,00	81,4	6,1	26,7	41,8	0,00
15,00	3,119	54,9	42,9		112,1	8,2	36,9	58,1	
16,00	3,164	75,6	57,4	0,00	154,3	11,0	51,2	81,2	0,00
17,00	3,240	105,1	81,0		212,4	14,9	71,5	114,0	
18,00	3,354	144,4	106,5	0,60	292,1	20,2	101,8	161,0	0,41
19,00	3,510	197,2	139,0		402,1	27,1	149,2	229,2	
20,00	3,748	276,4	179,0	1,32	554,4	36,6	214,9	330,1	0,54
21,17	3,999	353,3	212,5		721,9	46,1	301,6	457,7	
22,00	4,087	388,3	224,5	0,64	819,9	51,1	351,5	535,0	0,41
23,00	4,272	439,1	243,0		957,6	57,3	434,2	656,2	
23,67	4,416	471,8	252,0	0,29	1046,5	60,4	500,1	750,6	0,35

Tab. B-23: Batch BL211214

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	ΔOD_{600} / -	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	m_{O_2} / g	m_{CO_2} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,0	2,962	1,3	0,5	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
14,0	3,077	38,3	31,6	0,00	78,7	5,4	25,7	40,6	0,00
15,0	3,101	54,0	42,3		108,8	7,4	35,6	56,6	
16,0	3,145	73,9	53,8	0,37	149,8	10,2	49,5	79,1	0,00
17,0	3,213	101,1	74,5		205,7	13,9	69,1	110,6	
18,0	3,322	138,3	98,5	0,75	281,9	18,7	100,1	155,7	0,43
19,0	3,475	187,7	133,0		386,4	25,4	142,4	220,2	
20,0	3,691	255,6	169,5	1,24	528,7	34,2	203,5	313,8	0,64
21,0	3,902	318,0	203,5		667,9	42,1	270,2	418,2	
22,0	4,054	359,8	215,5	0,86	778,4	47,5	328,2	511,8	0,50
23,0	4,230	407,1	231,0		907,3	53,6	403,6	626,6	
24,0	4,415	454,6	245,0	0,26	1044,9	59,3	500,4	763,1	0,46

Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.2

i²HCDC

Tab. B-24: Batch BL21DE3pET0516

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,012	0,5	$6,3 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^8$	0,9		0,00	0,0	0,93	0,0	12,23	0,00	0,00
17,00	3,558	166,5			113,0		0,60	336,1	0,62	22,4	7,73	2,96	0,00
18,00	3,703	210,7			138,0		0,72	431,6	0,54	28,3	6,48	4,07	0,00
19,42	3,979	289,0	$1,6 \cdot 10^{11}$	$1,0 \cdot 10^{11}$	179,5	0,0	0,89	610,1	0,46	39,3	4,87	5,52	0,54
20,42	4,080	324,9			194,0	3,4	0,34	688,8	0,25	43,5	4,23	6,19	0,39
21,42	4,207	356,3			205,5	9,8	0,23	774,4	0,12	47,8	3,15	7,47	0,38
22,42	4,341	385,5	$1,2 \cdot 10^{11}$	$5,3 \cdot 10^{10}$	219,0	22,1	0,00	870,2	0,04	52,4	2,16	8,72	0,39
23,42	4,500	413,1			226,8	30,6	0,00	978,1	0,03	56,7	1,32	9,84	0,45
24,65	4,703	441,3	$1,2 \cdot 10^{11}$	$4,4 \cdot 10^{10}$	241,0	37,1	0,00	1123,0	0,04	62,4	0,39	11,17	0,48

Tab. B-25: Batch BL21DE3pET0116

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,000	1,0	$1,0 \cdot 10^9$	$8,3 \cdot 10^8$	0,9		0,00	0,0	0,89	0,0	12,13	0,00	0,00
19,33	3,887	270,3	$2,1 \cdot 10^{11}$	$1,5 \cdot 10^{11}$	175,5	0,0	1,40	583,1	0,28	36,8	5,04	5,22	0,55
25,03	4,607	402,0	$1,2 \cdot 10^{11}$	$9,3 \cdot 10^{10}$	218,8	34,6	0,00	1122,5	0,21	59,6	0,90	10,14	1,40

Tab. B-26: BL21DE3pET0716

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{HTT-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	$c_{NH_4^+}$ / g l ⁻¹	m_{NB} / g	$c_{PO_4^{3-}}$ / g l ⁻¹	m_P / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,989	0,7	$4,4 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	0,9		0,00	0,0	1,30	0,0	12,60	0,00	0,00
19,37	3,967	284,1	$2,1 \cdot 10^{11}$	$1,5 \cdot 10^{11}$	177,0	0,0	0,76	610,6	0,45	41,7	4,99	5,72	0,46
24,67	4,696	432,5	$1,1 \cdot 10^{11}$	$7,6 \cdot 10^{10}$	227,3	35,2	0,00	1122,3	0,04	64,3	0,72	10,96	0,55

Kultivierungsdaten Kapitel 5.2.3

i²HCDC

Tab. B-27: Batch ER2507pGLO0916

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	$m_{X\Delta OD_{600}}$ / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	\bar{m}_{GFP} / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	m_{LeuB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,993	1,9	2,3	$2,3 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$	1,8		0,00	0,0	0,0	0,53	0,00
8,50	3,008	6,2	8,1			6,3		0,00	11,3	0,0	0,53	0,00
25,00	3,440	109,6	123,4			83,5		0,00	275,9	18,2	6,90	0,00
26,00	3,498	144,7	144,2			95,5		0,00	321,0	21,0	7,89	0,00
27,00	3,568	165,5	172,3			111,5		0,00	373,3	24,3	9,08	0,00
28,00	3,652	193,0	196,0			123,5		0,00	434,1	28,3	10,49	0,13
29,00	3,744	219,8	214,8			131,5		0,00	504,1	32,1	11,79	0,00
30,00	3,853	249,1	251,5			149,3		0,00	584,3	36,4	13,30	0,18
31,25	4,032	290,1	294,9	$1,4 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{11}$	167,0	0,00	0,00	704,8	43,0	15,63	0,25
32,25	4,116	308,5	301,4			166,3	1,20	0,00	774,7	46,0	16,70	0,35
33,25	4,215	334,9	324,4			174,3	2,53	0,00	846,7	50,3	18,19	0,26
34,25	4,317	351,2	341,4	$1,8 \cdot 10^{11}$	$2,0 \cdot 10^{11}$	178,5	2,06	0,00	926,9	53,7	19,38	0,33
35,25	4,449	379,1	398,6			202,5	4,23	0,00	1018,7	57,9	20,85	0,44
36,25	4,567	440,0	429,7	$1,9 \cdot 10^{11}$	$1,7 \cdot 10^{11}$	212,5	4,73	0,00	1112,2	62,8	22,60	0,59

Tab. B-28: Batch M15pQE0216

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{H-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	3,000	2,0	$2,1 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	1,8		0,00	0,2	0,0	0,27
9,00	2,998	8,3			7,0		0,00	13,7	0,0	0,22
27,17	3,664	194,3			121,0		0,00	415,1	29,0	0,16
28,33	3,770	229,5			136,3		0,00	493,9	33,9	0,17
30,42	4,038	305,1			170,0		0,00	672,0	44,3	0,14
30,75	4,063	317,7	$2,3 \cdot 10^{11}$	$2,4 \cdot 10^{11}$	172,5	0,0	0,00	704,8	46,3	0,23
31,75	4,191	344,8			189,5	9,7	0,00	785,5	50,3	0,22
32,75	4,301	375,1			205,0	18,0	0,00	868,9	53,8	0,21
33,75	4,423	404,4	$1,7 \cdot 10^{11}$	$1,7 \cdot 10^{11}$	214,8	26,7	0,00	964,1	57,5	0,23
35,25	4,630	436,1	$1,4 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	225,5	-	-	1116,5	62,6	-

Tab. B-29: Batch M15pQE0516

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{H-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,979	1,3	$1,9 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$	1,6		0,00	-0,1	0,0	0,00
31,13	3,883	298,9	$2,1 \cdot 10^{11}$	$2,3 \cdot 10^{11}$	172,3	0,0	0,00	643,7	42,3	0,39
35,30	4,295	409,1			229,0	36,3	0,00	1002,4	57,5	0,40
36,55	4,464	-	$2,0 \cdot 10^{11}$	$2,5 \cdot 10^{11}$	224,3	-	-	1118,7	64,9	-

Tab. B-30: Batch TG1pQE0116

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{H-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,955	2,2	$1,3 \cdot 10^9$	$9,4 \cdot 10^8$	1,7		0,00	0,0	0,0	0,00
7,75	2,947	6,9			5,0		0,00	9,1	0,0	0,00
24,75	3,375	164,6			77,3		0,00	265,5	20,2	0,00
25,75	3,430	141,9			90,3		0,00	310,1	23,5	0,00
26,75	3,490	173,3			104,5		0,00	361,9	27,1	0,00
28,75	3,684	232,0			125,5		0,00	488,5	35,8	0,00
29,92	3,817	261,9			158,5		0,36	580,2	42,0	0,48
30,75	3,928	334,4	$1,9 \cdot 10^{11}$	$9,6 \cdot 10^{10}$	169,5	0,0	0,30	654,3	44,2	0,45
31,75	3,978	320,4			174,5	4,9	0,44	722,3	49,5	1,32
32,75	4,061	311,4			205,5	12,1	0,00	796,8	49,8	0,29
33,75	4,213	375,3	$2,0 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{11}$	191,3	14,3	2,95	882,0	54,9	0,89
34,75	4,373	385,0			192,0	18,7	0,00	976,3	65,8	5,13
35,75	4,545	395,0			177,5	19,0	2,63	1081,1	76,1	10,05
36,75	4,654	398,7	$1,7 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	160,5	17,2	-	1140,3	84,1	-

Tab. B-31: Batch TG1pQE0216

t / h	V_L / l	\bar{m}_X / g	\bar{C}_X / KBE ml ⁻¹	\bar{C}_{X+} / KBE ml ⁻¹	ΔOD_{600} / -	$\bar{m}_{H-Rab11a}$ / g	c_{Glc} / g l ⁻¹	m_{Glc} / g	m_{NB} / g	c_{Ac^-} / g l ⁻¹
0,00	2,960	1,8	$1,8 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	1,8		0,00	0,0	0,0	0,00
29,75	3,962	-	$2,2 \cdot 10^{11}$	$1,5 \cdot 10^{11}$	171,8	0,0	-	644,1	53,7	-
32,75	4,337	337,8			185,0	11,4	0,00	891,9	70,1	6,67
35,08	4,655	370,6	$1,3 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^{11}$	142,3	9,0	26,90	1117,7	82,5	20,79

Lebenslauf

Name: Björn Beckmann
Geburtsdatum: 06. April 1987
Geburtsort: Iserlohn
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Bildungsgang

seit 2013 Promotion an der HAW Hamburg im Labor für Bioverfahrenstechnik in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

2011 – 2013 Studium MSc Pharmaceutical Biotechnology, HAW Hamburg

2006 – 2011 Studium BSc Biotechnologie, HAW Hamburg

2003 – 2006 Abitur, Gymnasium Letmathe der Stadt Iserlohn

1997 – 2003 Mittlere Reife, Realschule Letmathe der Stadt Iserlohn

Berufspraxis

seit 2017 Prozessingenieur, Rentschler SE, Laupheim

2013 – 2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, HAW Hamburg, Labor für Bioverfahrenstechnik

2013 – 2015 Lehrbeauftragter für Steril- und Sicherheitstechnik in der Biotechnologie (Vorlesung) und Fermentations- und Bioreaktortechnik (Labor), HAW Hamburg, Fakultät Life Sciences

2009 – 2012 Tutor in verschiedenen Fachbereichen der HAW Hamburg, Fakultät Life Sciences

2009 – 2011 Werkstudent in der Abteilung für biotechnologische Sicherheit, TÜV NORD CERT GmbH, Hamburg