

Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Fluoreszenzensors für die online- Überwachung von Bioprozessen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Jan Christoph König, M. Sc.

2019

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

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 12.04.2019

Danksagung

Es sind Begegnungen mit Menschen, die das Leben lebenswert machen.

(Guy de Maupassant 1850-1893, französischer Schriftsteller)

Ich bedanke mich für die exzellente Betreuung, die netten und hilfsbereiten Kollegen und eine schöne Zeit mit vielen großartigen Events. Meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden danke ich für die fortlaufende Unterstützung.

Für
Kö Mi Gr Me

Kurzfassung

Fluoreszenz-Spektroskopie ist eine sehr sensitive Messmethode, die Echtzeit-online-Überwachungen von Bioprozessen ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fluoreszenzsensor entwickelt, der handlich und robust ist. Er funktioniert ohne bewegliche Teile und eignet sich zur Aufnahme von Fluoreszenzänderungen der wichtigsten biogenen Fluorophore in den Zellen.

Zu Beginn der Arbeit wurden mögliche Sensorkomponenten mit Hilfe von Modellfluorophoren in Bezug auf ihre Sensitivität und ihre Selektivität geprüft. Anschließend wurde ein Funktionsmuster erstellt. Dieses wurde an bakteriellen und eukaryotischen Batch-Kultivierungen und an Fed-Batch-Kultivierungen validiert.

Es wurde erfolgreich ein Vorhersagemodell für die Biomasse eines *E. coli* K1-Batch-Prozesses erstellt. Auch metabolische Veränderungen wie sie bei Hefen beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen, beim diauxischen Wachstum oder beim Crabtree-Effekt auftreten, wurden mit dem Sensor erfolgreich detektiert. Außerdem wurde die heterologe Produktion von GFP-GST mit dem Sensor überwacht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Messtechnik erfolgreich auf das Downstream Processing transferiert werden konnte und eine damit verbundene Aufreinigung des GFP-GST über eine NTA-Affinitätschromatographie und die direkte Quantifizierung des Proteins möglich ist.

Weiterhin konnte mit dem Sensor die Enzymkinetik einer ADH beim Umsatz von Ethanol aufgenommen werden.

Schlagwörter: Fluoreszenz, online-Bioprozessüberwachung, Chemometrie, Biomassevorhersage, Sensorik

Abstract

Fluorescence spectroscopy is a very sensitive measurement method that enables real-time online-monitoring of bioprocesses. In the present work a fluorescence sensor was developed which is easy to handle and robust. It was constructed without moving parts and is suitable for recording fluorescence changes of the most important biogenic fluorophores.

At the beginning of the work, possible sensor components were tested for their sensitivity and selectivity using model fluorophores. Subsequently, a functional model was created which was validated by bacterial and eukaryotic batch-cultivations as well as by fed-batch-cultivations.

A predictive model for biomass of an *E. coli* K1 batch process was successfully developed. Metabolic changes such as those occurring in yeasts during the change from aerobic to anaerobic conditions, during diauxic growth or the Crabtree-effect were also successfully detected with the sensor. The sensor was also used to monitor the heterologous production of GFP-GST. In addition, it was shown that the transfer of the measurement technique to downstream processing and the associated purification of GFP-GST via NTA affinity chromatography was successful and enabled direct quantification of the protein.

In addition, the sensor was applied to determine the enzyme kinetic of an ADH for the conversion of ethanol.

Key words: Fluorescence, online-bioprocess-monitoring, chemometrics, biomass prediction, Sensor-technology

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	x
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	3
3. Theoretischer Hintergrund.....	4
3.1. Fluoreszenz.....	4
3.2. Biogene Fluorophore	5
3.3. Rolle biogener Fluorophore im Stoffwechsel von Bakterien und Hefen	8
3.3.1. Bakterienstoffwechsel am Beispiel von <i>Escherichia coli</i>	8
3.3.2. Hefestoffwechsel am Beispiel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.4. Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie in der Bioprozesstechnik	12
3.5. Multivariate Datenanalyse	14
3.5.1. Multivariate Regressionsmethoden	16
4. Entwicklung und Charakterisierung des Fluoreszenzensors.....	18
4.1. Aufbau und Charakterisierung eines Laborfunktionsmusters	18
4.1.1. Untersuchung von verschiedenen Sensorkomponenten	18
4.1.2. Aufbau des Sensors	24
4.1.3. Untersuchung zur selektiven Detektion einzelner Fluorophore	28
4.2. Adapter	29
5. Anwendung des Fluoreszenzensors zur Bioprozessüberwachung.....	33
5.1. Online-Überwachung von <i>Escherichia coli</i> -Kultivierungen.....	33
5.1.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> K1 im Batch-Betrieb	33
5.1.2. Kultivierung eines <i>Escherichia coli</i> BL21-Stamms im Fed-Batch-Betrieb	40
5.1.3. Überwachung der Produktion eines rekombinanten Proteins mit Fluoreszenz-Tag	44
5.2. Online-Bioprozessüberwachung von eukaryotischen Zellen	48
5.2.1. Metabolische Studien mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
5.2.2. Hochzelldichtekultivierung von <i>Komagataella phaffii</i>	53
5.2.3. Online-Überwachung einer Chinese Hamster Ovary-Kultivierung	55
6. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des Fluoreszenzensors	58
6.1. Affinitätschromatographische Aufreinigung von fluoreszenzmarkiertem Protein.....	58
6.2. Messung einer Alkoholdehydrogenase-Enzymkinetik.....	60
7. Zusammenfassung und Ausblick.....	63

8.	Chemikalien und Materialien	67
8.1.	Chemikalien und Reagenzien	67
8.2.	Materialien.....	68
8.2.1.	Verbrauchsmaterialien.....	68
8.2.2.	Vektoren und Stämme	69
8.2.3.	Proteine und Enzyme.....	69
8.3.	Geräte.....	69
8.3.1.	Laborgeräte.....	69
8.3.2.	Sensorkomponenten	70
8.4.	Verwendete Software	71
8.5.	Puffer-, Reagenzlösungen und Kulturmedien	71
8.5.1.	Kalibrationsgeradenpuffer	71
8.5.2.	Kulturmedien	72
8.5.3.	Zellaufschluss	75
8.5.4.	SDS-PAGE.....	76
8.5.5.	FPLC.....	77
8.5.6.	GFP-GST-Konzentrationsbestimmung	77
9.	Methoden.....	78
9.1.	Fluoreszenzsensor-Messungen	78
9.2.	Erstellung von Kalibrationsgeraden	78
9.3.	Bestimmung der Selektivität des Sensors.....	79
9.4.	<i>E. coli</i> -Bioreaktorkultivierungen	80
9.4.1.	<i>E. coli</i> K1-Kultivierungen	81
9.4.2.	Fed-Batch Kultivierungen	81
9.4.3.	Heterologe GFP-Produktion.....	82
9.5.	Versuche mit kommerzieller Bäckerhefe	83
9.5.1.	Hefezugabe und Begasungsexperimente	83
9.5.2.	Hefezugabe in Anwesenheit von Umbelliferon.....	84
9.6.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	84
9.6.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
9.6.2.	<i>Komagataella phaffii</i>	85
9.7.	Offline-Analytik	86
9.7.1.	Optische Dichte	86
9.7.2.	Biotrockenmasse.....	86
9.7.3.	Glucosekonzentration	86

9.7.4.	Ethanolkonzentration.....	87
9.7.5.	Acetatkonzentration.....	87
9.7.6.	Fluoreszenzmessungen mit Hitachi F-7000	88
9.8.	Chemometrische Analyse und Modellierung	88
9.9.	Zellaufschluss	88
9.10.	SDS-PAGE.....	89
9.11.	FPLC.....	90
9.12.	Bestimmung der GFP-GST Konzentration	90
9.13.	Enzymkinetik.....	91
10.	Anhang Grafiken	93
10.1.	Sensorkomponenten	93
10.2.	Lichtleiter.....	93
10.3.	Streulichtmessung <i>E. coli</i> K1	94
10.4.	Bäckerhefeversuche.....	94
11.	Publikationsliste	95
12.	Unterstützende Arbeiten	97
13.	Literaturverzeichnis	98
14.	Abbildungsverzeichnis	102
15.	Tabellenverzeichnis	103
16.	Lebenslauf	104

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACDH	Acetaldehyd-Dehydrogenase
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bd	Cytochrom-bd-Oxidase
BSA	Rinderserumalbumin
bo ₃	Cytochrom-bo ₃ -Oxidase
BP	Bandpass
BTM	Biotrockenmasse
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Quelle	Kohlenstoff- bzw. Kohlenhydratquelle
DoE	Design of Experiment
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektronen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
Ex	Exzitation
F ₁ /F ₂	Untereinheiten der F ₁ /F ₂ - ATPase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FWHM	Halbwertsbreite
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
His6	(Poly)histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
l	Liter
LB	lysogeny broth
LED	Leuchtdiode
LoQ	Limit of Quantification
min	Minute

ml	Milliliter
MMCS6	Multi-Spektral-Sensor
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPPC	Multi-Pixel Photon Counter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäuren
NA	Numerische Apertur
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDH	NADH-Dehydrogenase
NI	Normierte Intensität
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei Wellenlänge von 600 nm
P	Loading Matrix
PAT	Process Analytical Technology
PBS	Phosphatpufferlösung
PC	Hauptkomponente (principle component)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis)
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMT	Photomultiplier Tube
PLS	Partial-Least-Square
PTS	Phosphotransferase
Q	Ubichinon
Q_{CO_2}	Kohlendioxidbildungsrate
Q_{O_2}	Sauerstoffverbrauchsrate
R^2	Regressionskoeffizient
rel. AU	Relative Absorptionseinheit
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RI	Relative Intensität
RMSE	Root Mean Square Error
RMSEP	Root Mean Square Error of prediction
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
T	Score Matrix
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS Puffer
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV-VIS-Bereich	Ultravioletter und sichtbarer Lichtbereich
vvm	Volumen Luft pro Volumen Medium pro Minute
X-Daten	Fluoreszenzdaten
Y-Daten	offline-Daten (z. B. Biomasse)

1. Einleitung

Bereits 350 v. Chr. beobachtete Aristoteles von Quallen oder Bakterien verursachte Lichterscheinungen, die bei Nacht auftraten, wenn man über das Meer ruderte. Erst Jahrtausende später wurde jedoch das Geheimnis um die Ursache des Lichts gelüftet. Das heute als Biolumineszenz bekannte Phänomen bezeichnet die Fähigkeit von Lebewesen, Licht als Folge von freiwerdender Energie aus chemischen Reaktionen zu entsenden.

Die Qualle *Aequorea victoria* erlangte Berühmtheit durch ihre Fähigkeit eben jene blaue Biolumineszenz erzeugen zu können. Sie hat ihren natürlichen Lebensraum an der Pazifikküste des nordamerikanischen Kontinents, wo sie von kleineren Krebstierchen und Quallen lebt. Neben der blauen Lumineszenz kann die Qualle mit Hilfe eines in ihren Leuchtorganen gebildeten Proteins die Energie des blauen Lichts für die Erzeugung von grünem Fluoreszenzlicht nutzen. Fluoreszenz ist eine häufig auftretende Form der Photolumineszenz. Dabei werden Moleküle durch Licht in einen angeregten Zustand überführt. Praktisch unmittelbar nach der Anregung wird ein Teil der Energie in Wärme umgewandelt und die restliche Energie wird in Form von Licht wieder abgegeben. Es kommt dadurch zu einer Rotverschiebung des Anregungslichts.

Die Isolierung des als grün fluoreszierenden Proteins bezeichneten Proteins aus *Aequorea victoria* führte zur Entwicklung neuer molekularer Werkzeuge, die eine Revolution der modernen Biologie in den letzten Jahrzehnten einleitete und Licht in die Abläufe vieler zellulärer Mechanismen brachte. Bis heute wird das Protein in diversen Modifikationen von vielen Forschergruppen eingesetzt. Im Jahr 2008 wurde deshalb Osamu Shimomura für die Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.

Auch Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien oder Hefen, bilden beim Wachstum körpereigene Stoffe, die kurz nach einer Anregung fluoreszierendes Licht entsenden. Die Fluoreszenz per se hat dabei in den meisten Fällen keine direkte biologische Funktion. Die Messung von Fluoreszenz schadet den Zellen jedoch nicht und ermöglicht es in Echtzeit biotechnologische Prozesse zu überwachen. Es kann so ohne Zeitverlust und zusätzliche Arbeit überprüft werden, wie der aktuelle Zellzustand ist, oder ob z. B. eine Produktion wichtiger Arzneistoffe reibungslos stattfindet.

Dennoch werden Fluoreszenzsensoren nur selten in der Industrie für die Bioprozessüberwachung eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher ein neuer Sensor entwickelt werden, der in der Lage ist, die wesentlichen Leuchtsignale aus dem Bioreaktor zu messen und gleichzeitig eine Neukonzeption der Technologie in Bezug auf die Punkte Miniaturisierung, Kostenfaktor und Benutzerfreundlichkeit durchzuführen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung eines neuen *in situ* Fluoreszenzensors für die online-Überwachung von Bioprozessen. Der Sensor soll robust, preisgünstig und ohne bewegliche Teile konzipiert werden. Er soll außerdem modular aufgebaut sein und so die Detektion von wichtigen biogenen Fluorophoren sicherstellen. Durch einen miniaturisierten Aufbau soll zusätzlich die Handhabung des Sensors erleichtert werden.

Die Charakterisierung von möglichen Sensorkomponenten soll zunächst mit Hilfe von Modellfluorophoren in Bezug auf Sensitivität und Selektivität erfolgen. Anschließend soll ein Funktionsmuster erstellt werden. Mit diesem sollen sowohl Batch- als auch Fed-Batch-Bioprozesse von prokaryotischen sowie eukaryotischen Organismen überwacht werden. Es soll dabei getestet werden, in wie weit der Sensor in der Lage ist, wichtige Prozessgrößen, wie die Biomasse oder die heterologe Produktion von Proteinen, vorherzusagen. Außerdem sollen metabolische Veränderungen, wie sie z. B. bei dem Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen auftreten, mit dem Sensor aufgedeckt werden. Neben der klassischen Bioprozessüberwachung soll evaluiert werden, ob der Sensor sich für weitere Anwendungsmöglichkeiten, wie z. B. die Messung von Enzymkinetiken oder für die Überwachung von Downstream-Prozessen, eignet.

3. Theoretischer Hintergrund

Um die hohen regulatorischen und Qualitätsanforderungen der Europäischen Union und der Food and Drug Administration (FDA) für die Herstellung von Pharmazeutika sicherzustellen, ist die pharmazeutische und biotechnologische Industrie angehalten innovative analytische Instrumente einzusetzen. 2002 wurde daher von der FDA eine Process Analytical Technology (PAT) Initiative vorgeschlagen. Ihr Ziel ist die Erhöhung der Produktqualität durch standardisierte Kontrollen und durch die Echtzeit-Überwachung kritischer Prozessgrößen. Sensoren zur online-Messung von Bioprozessen werden deshalb immer wichtiger. [1–4]

Aufgrund der Komplexität von biologischen Prozessen ist die nicht invasive online-Messung von wichtigen Prozessgrößen, wie z. B. die Substrat- oder Produktkonzentration, ohne Zeitverzug eine Herausforderung. Oft wird deshalb Infrarot- und Raman-Spektroskopie für die Bioprozessüberwachung eingesetzt [2, 5–8]. Die Fluoreszenz-Spektroskopie ist jedoch im Vergleich zu diesen Messmethoden sensitiver und wird seit mehr als 40 Jahren für die online-Überwachung eingesetzt. [9, 10]

3.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz tritt bei der Desaktivierung elektronisch angeregter Moleküle, die über konjugierte π -Doppelbindungen verfügen, auf. Dabei wird Energie in Form von Photonen innerhalb von einer Abklingzeit von 10^{-8} s freigesetzt und das Elektron kehrt in den Grundzustand zurück. Das Anregungslicht hebt die Elektronen in einen erhöhten Vibrationszustand an. Da nach dem Franck-Condon-Prinzip zunächst eine deutlich schnellere Relaxation (10^{-12} s) auf den niedrigsten Vibrationszustand stattfindet, ist das emittierte Licht energieärmer und somit langwelliger als das Anregungslicht (Stokes-Verschiebung). [11] Die strahlungslosen Übergänge werden in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Die Stokes-Verschiebung ermöglicht die hohe Sensitivität der Fluoreszenzspektroskopie. Das emittierte Licht kann isoliert vom Anregungslicht gemessen werden und weist somit eine niedrige Hintergrundstrahlung auf. [12]

Fluoreszenzmessungen werden allerdings durch eine Reihe von wichtigen Bioprozessparametern beeinflusst. Viskositäts- oder Temperaturänderungen wirken sich auf die Fluoreszenzintensität aus, indem sie die Wahrscheinlichkeit von desaktivierenden Stößen erhöhen oder erniedrigen. Hingegen können pH-Wert-Veränderungen die Fluoreszenzeigenschaften durch Protonierung der Fluorophore ändern und so sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Lage des Fluoreszenzmaximums verändern. Weitere Prozessparameter wie Begasung, Rührergeschwindigkeit und Gelöstsauerstoffkonzentration wirken sich ebenfalls auf das Fluoreszenzsignal aus. Kultivierungsparameter sollten somit weitgehend konstant gehalten werden um die Einflüsse zu minimieren. Auch Kaskaden- und Innerfiltereffekte wirken sich durch Energietransfer auf andere Fluorophore bzw. durch Adsorptionsprozesse auf die Fluoreszenzmessung aus. So können hohe optische Dichten an Zellen einen Innerfiltereffekt verursachen. [13, 14]

3.2. Biogene Fluorophore

In den meisten biotechnologischen Prozessen basieren die Fluoreszenzmessungen auf der Detektion von endogener Fluoreszenz. Zu den fluoreszenzaktiven biologischen Molekülen der Zellen (s. Tab. 3.1) gehören die aromatischen Aminosäuren, verschiedene Vitamine, wie z. B. Pyridoxin sowie die Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN). Auch das in Algen oder Pflanzen vorkommende Chlorophyll oder die Stoffgruppe der Häme, welche unter anderem in den Cytochromen vorkommen, sind aufgrund der von Porphin abgeleiteten Verbindungen fluoreszenzaktiv. [15]

Tabelle 3.1: Auflistung verschiedener biogener Fluorophore.

Fluorophor	Exzitation [nm]	Emission [nm]	Referenz
Phenylalanin	260	280	[15]
Tyrosin	275	300	[15]
Tryptophan	280	350	[15]
NADH	290, 352	440, 460	[15]
NADPH	336	464	[15]
FAD, FMN, Riboflavin	375, 454	520	[16]
Pyridoxin	332, 340	400	[15]
Porphyrine	400-450	630-690	[15]

Proteine, die wichtigsten Bestandteile der meisten biologischen Prozesse, werden aus 20 verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt, die bei allen Lebewesen übereinstimmen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) (s. Abb 3.1) kommen relativ selten in Proteinen vor. Der Tryptophananteil entspricht etwa 1 Mol-% in Proteinen [11]. Die drei Aminosäuren weisen alle einen hydrophoben Charakter auf. Bei Tyrosin und Tryptophan ist dieser wegen der Hydroxyl- bzw. Aminogruppe weniger stark ausgeprägt. Der Beitrag von Phenylalanin zur intrinsischen Proteinfluoreszenz ist aufgrund seiner geringen Absorptionsfähigkeit und einer sehr niedrigen Quantenausbeute vernachlässigbar. Tyr hat im Vergleich zu Trp eine ähnliche Quantenausbeute. In nativen Proteinen wird jedoch hauptsächlich Trp-Fluoreszenz gemessen, da die Tyr-Fluoreszenz oft durch Interaktionen mit Peptidketten oder durch Elektronentransfer zu Trp gequencht wird. Bei denaturierten Proteinen steigt hingegen die Tyr-Fluoreszenz an. Auch die Trp-Fluoreszenz hängt stark von dem lokalen Umfeld ab und wird oft als Reportergruppe für Konformationsänderungen, wie z. B. durch die Bindung eines Liganden oder durch Protein-Protein-Interaktionen, verwendet. [11, 17]

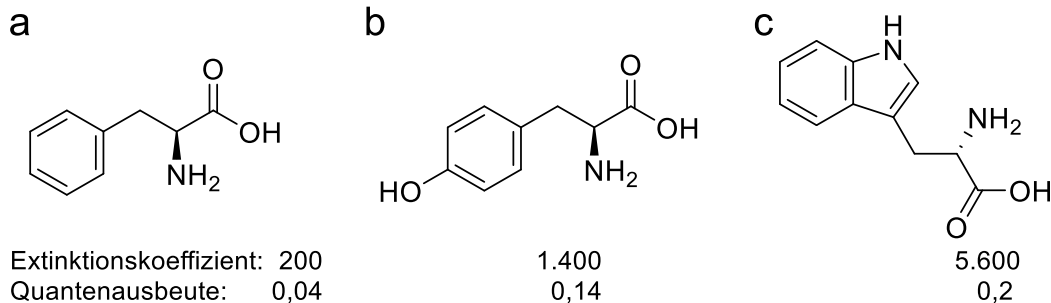


Abbildung 3.1: Aromatische Aminosäuren: (a) Phenylalanin, (b) Tyrosin und (c) Tryptophan [11, 17].

Die Coenzyme NADH und NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) sind beide wichtige Elektronentransporter. In der Zelle dient NADH in erster Linie zur Erzeugung von Energie durch die Verbrennung von Brennstoffen. Dagegen wird NADPH fast ausschließlich für die reduktive Biosynthese wie die Fettsäurebiosynthese verwendet. NADPH unterscheidet sich nur dadurch von NADH, dass die 2'-Hydroxylgruppe an der Adenosinstruktur mit Phosphat verestert ist (s. Abb. 3.2a). Die Elektronenübertragung findet bei beiden Coenzymen identisch über den Nicotinamidring statt. Im Zuge einer Redox-Reaktion werden zwei Elektronen und ein Proton auf den oxidierten Nicotinamidring

übertragen. Ein weiteres Proton wird ins Medium abgegeben. Die Rückreaktion erfolgt ausschließlich nach ionischem Mechanismus. Dabei wird der gebundene Wasserstoff als Hydrid in einem Zwei-Elektronen-Schritt übertragen. NADH fungiert somit in den Zellen auch als Wasserstoffüberträger. Der Nicotinamidring ist fluoreszenzaktiv, allerdings nur in seiner reduzierten Form. Die Fluoreszenzspektren von NADH und NADPH ähneln sich stark. In Lösung wird die Fluoreszenz jedoch teilweise durch Kollisionen oder durch die Adeninseitenkette gequenchet. Die Bindung von NADH durch ein Protein schützt den Nicotinamidring vor der Adeninseitenkette und führt im Allgemeinen zu einer längeren Fluoreszenzlebensdauer und zu einer ca. 4-fach erhöhten Quantenausbeute. [11, 18, 19]

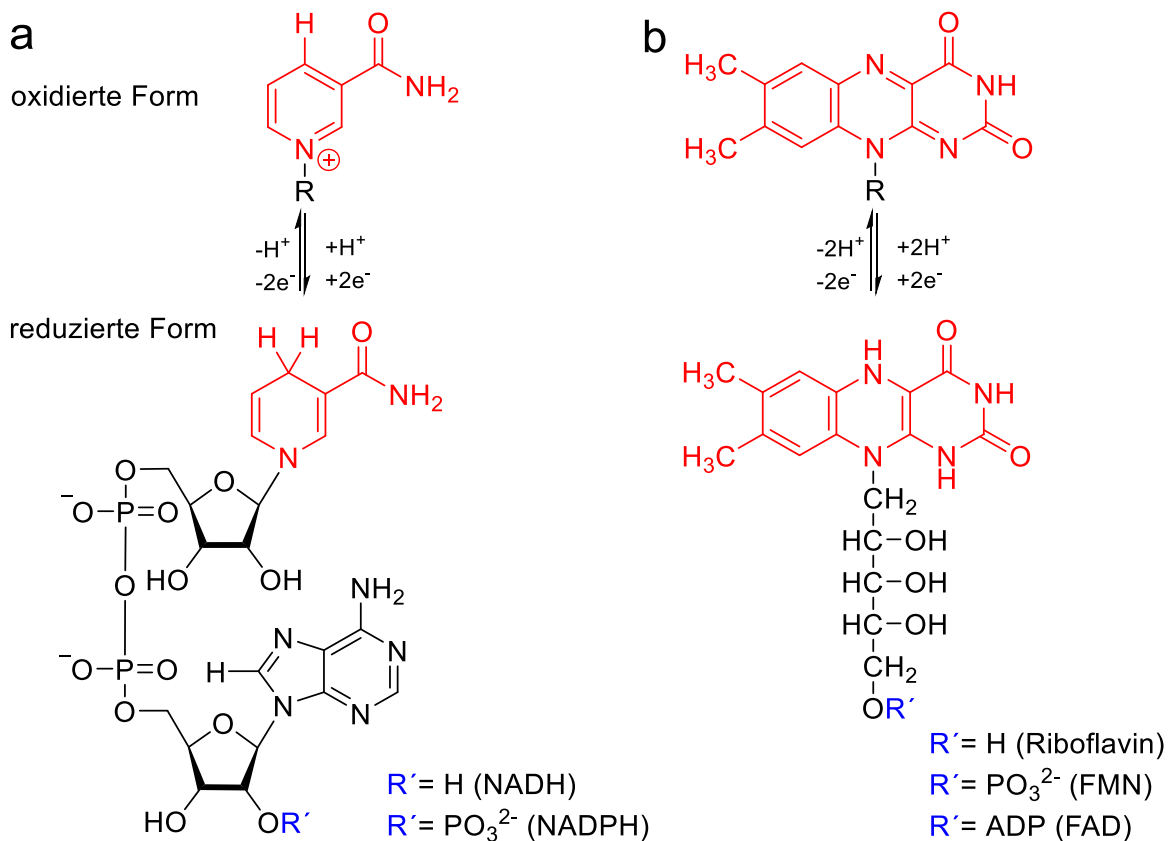


Abbildung 3.2: Fluoreszenzaktive Coenzyme. (a) Oxidierte und reduzierte Form des Nicotinamidrings von NADH und NADPH. (b) Oxidierte und reduzierte Form des Isoalloxazinring von FAD, FMN und Riboflavin. (rot) fluoreszenzaktives Strukturelement.

Die Coenzyme FAD und FMN sind ebenfalls wichtige Elektronenüberträger und leiten sich vom Vitamin B₂ (Riboflavin) ab. Sie unterscheiden sich lediglich durch die katalytisch nicht aktiven Seitenketten, die mit dem Isoalloxazinring verknüpft sind und eine spezifische

Bindung mit Flavoproteinen ermöglicht (s. Abb. 3.2b). Der Isoalloxazinring wird während der Reduktion mit zwei Elektronen und zwei Protonen bestückt. Im Gegensatz zu NADH sind die Flavine jedoch in der Lage einzelne Elektronen zu übertragen und radikalische Zwischenstufen zu bilden, wodurch verschiedene Reaktionen, wie die mit Sauerstoff, möglich sind. Die Fluoreszenzmaxima der verschiedenen Derivate sind ähnlich, wobei nur die oxidierte Variante fluoreszenzaktiv ist. Die Adeninseitenkette von FAD bildet einen Komplex mit dem Flavin aus und quencht wie auch bei NADH die Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität ist dadurch im Vergleich zu FMN und Riboflavin stark abgeschwächt. Die Bindung der Derivate durch Flavoproteine erhöht im Gegensatz zu NADH die Fluoreszenzintensität nicht. [19–22]

3.3. Rolle biogener Fluorophore im Stoffwechsel von Bakterien und Hefen

Die Coenzme NADH, FMN und FAD sind im Metabolismus an zahlreichen Reaktionen beteiligt. Sie sind vor allem im Katabolismus aktiv und spielen eine wichtige Rolle beim oxidativen Abbau von Kohlenhydraten (C-Quelle) zur Erzeugung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP).

3.3.1. Bakterienstoffwechsel am Beispiel von *Escherichia coli*

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zu den fakultativ anaeroben Organismen und stellt 0,1 % der humanen Darmflora dar [23]. Außerdem ist es ein beliebter Modellorganismus für die biochemische und biotechnologische Forschung sowie der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie. *E. coli* kann ein breites Spektrum an organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, wobei Glucose bevorzugt verstoffwechselt wird. Die Glucose wird über das Phosphotransferase-System (PTS) in die Zelle aufgenommen (s. Abb. 3.3). Hierbei wird ein energiereicher Phosphatrest ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) über mehrere Proteinkinasen auf die Glucose übertragen (Phosphorylierung). Neben dem Transport von C-Quellen übt das PTS gleichzeitig eine regulatorische Funktion aus. In Anwesenheit von Glucose verhindert es die Aufnahme alternativer C-Quellen, wie z. B. Lactose, und ruft so ein zweiphasiges Wachstum der Zellen hervor (Diauxie) [24, 25].

Die phosphorylierte Glucose ist in Form von Glucose-6-phosphat metabolisch aktiviert und kann über zwei verschiedene katabole Wege in der Zelle abgebaut werden. Der erste Weg, die Glykolyse, macht mit 80 % den Hauptanteil des Glucoseabbaus aus [26]. Das Glucose-6-phosphat wird hierbei unter Bildung von NADH und ATP zu Pyruvat oxidiert.

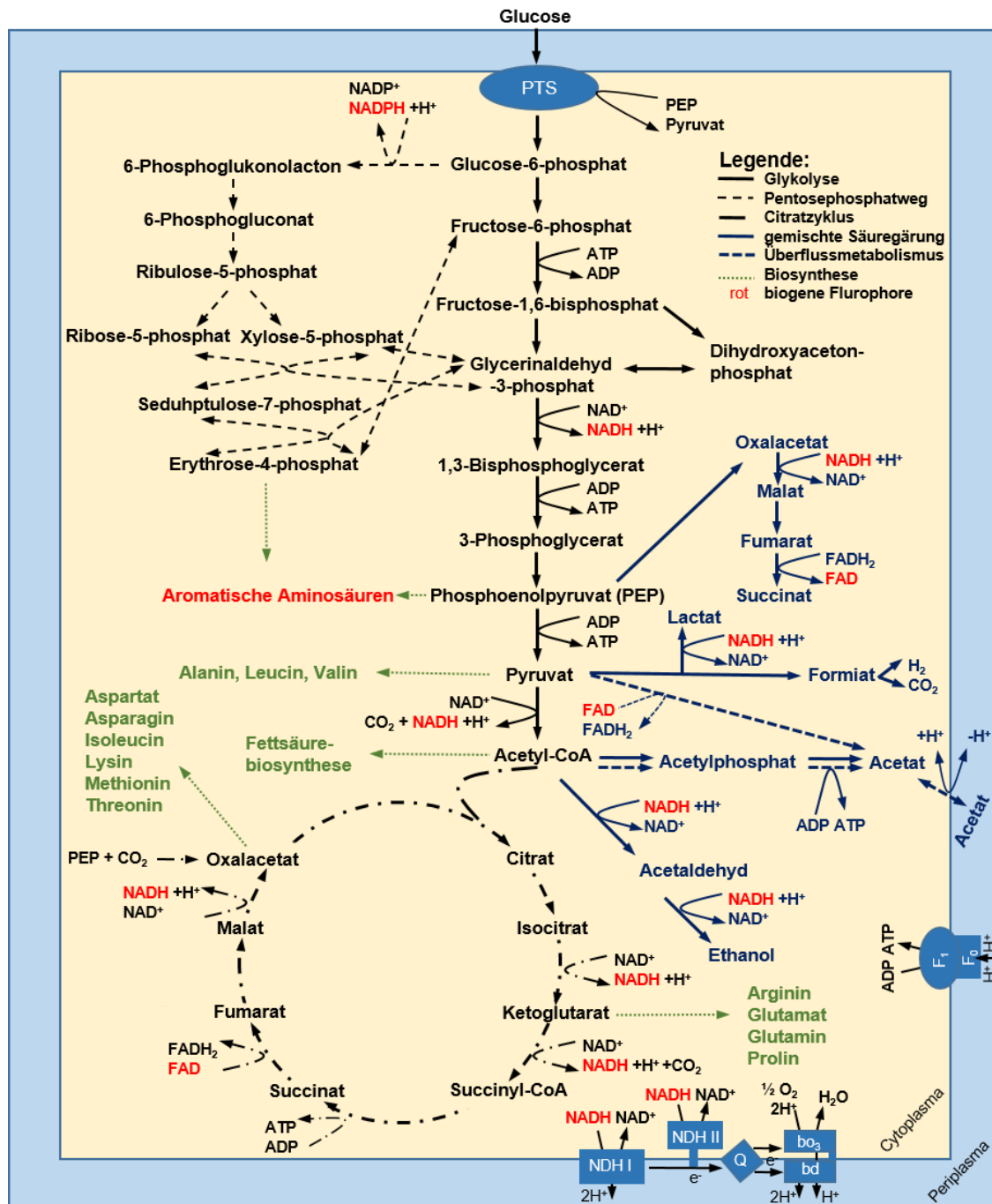


Abbildung 3.3: Glucosestoffwechsel in *E. coli*. (PTS) Phosphotransferase-System, (NDH I/II) NADH-Dehydrogenase 1/2, (e⁻) Elektronen, (Q) Ubichinon, (bo₃) Cytochrom-bo₃-Oxidase, (bd) Cytochrom-bd-Oxidase) und (F₁/F₀) Untereinheiten der F₁/F₀-ATPase.

Die zweite Möglichkeit für die Zellen Glucose abzubauen ist der Pentosephosphatweg und macht 20 % des Glucoseabbaus aus. Er dient zur Gewinnung des Reduktionsmittels NADPH, welches für den Anabolismus benötigt wird. Außerdem entstehen verschieden lange Zuckerketten, die für die Erzeugung wichtiger Bausteine, wie z. B. für die Nukleotidbiosynthese oder für die Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, verwendet werden. Die Zucker des Pentosephosphatweges können jedoch auch in Metaboliten der Glykolyse umgewandelt werden und dort zu Pyruvat oxidiert werden. Das Pyruvat wird anschließend nach einer oxidativen Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgewandelt. Dieses wird u. a. als Vorläufer für die Fettsäurebiosynthese benötigt. In Anwesenheit von Sauerstoff kann das Acetyl-CoA zusätzlich in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden. Dort wird es unter Mitwirkung von fluoreszenzaktiven Coenzymen (rot) zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert. Die Intermediate des Citrat-Zyklus können neben ihrer dortigen Funktion auch als Vorläufer für die Aminosäuresynthese genutzt werden. Um die Verluste durch den anabolen Stoffwechsel auszugleichen, müssen anaplerotische Reaktionen die Intermediate wieder auffüllen. Dafür ist unter anderem die PEP-Carboxylase verantwortlich, die unter Verbrauch von ATP die Synthese von Oxalacetat aus PEP katalysiert.

Die während der Glykolyse und dem Citratzyklus entstandenen Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 geben im Anschluss die zuvor aufgenommenen Elektronen an die Membranproteine der Atmungskette ab. Die Atmungskette besteht aus zwei primären Dehydrogenasen, der NADH-Dehydrogenase I (NDH I) und der NADH-Dehydrogenase II (NDH II), einem lipophilen Ubichinon (Q) und aus den beiden terminalen Chinol-Oxidasen, der Cytochrom- bo_3 -Oxidase (bo_3) und der Cytochrom-bd-Oxidase (bd). Die Enzymkomplexe NDH I und NDH II bzw bo_3 und bd transportieren unterschiedlich viele Protonen in das Periplasma der *E. coli* Zelle [27, 28]. Diese werden von der F_1/F_0 -ATPase zur ATP-Gewinnung benötigt. Durch unterschiedliche Kombination der Enzym-Komplexe können sich die Zellen flexibel auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen einstellen [29].

In Gegenwart von hohen Glucosekonzentrationen schlagen die Zellen neben dem Citratzyklus einen weiteren Weg ein (blaue gestrichelte Linie). Der sogenannte Überflusmetabolismus führt dazu, dass unter aeroben Bedingungen Acetat gebildet wird. Dieses kann durch die Zellmembran diffundieren, den transmembranen pH-Gradienten entkoppeln und so das Zellwachstum beeinflussen. [30–32]

Unter anaeroben Bedingungen wird hingegen die Glucose in den Zellen nicht vollständig zu CO_2 oxidiert, da ohne Sauerstoff der terminale Elektronenakzeptor in der Atmungskette fehlt. Stattdessen werden Gärprodukte gebildet, um NAD^+ zu regenerieren (blaue Linien). Als Gärprodukte können Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Ethanol entstehen. Die Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen basiert damit ausschließlich auf Substratkettenphosphorylierung. Zusätzlich führt der Sauerstoffmangel zu einer Repression von Enzymen des Citratzyklus [33].

3.3.2. Hefestoffwechsel am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist vielen als Bäckerhefe bekannt. Neben der Erzeugung von Brot, Bier und Wein ist sie für die Forschung als Modellorganismus interessant. Sie war der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde. *S. cerevisiae* ist fakultativ anaerob. Die Energiegewinnung erfolgt in Gegenwart von Sauerstoff über die Zellatmung und über die Gärung unter anaeroben Bedingungen, wobei als Gärprodukt Ethanol gebildet wird (s. Abb. 3.4). Auch unter aeroben Bedingungen kann Ethanol in *S. cerevisiae* produziert werden. Wie bei der aeroben Acetatbildung in *E. coli*-Zellen handelt es sich dabei um einen Stoffwechselweg des Überflussmetabolismus und wird bei Hefen als Crabtree-Effekt bezeichnet.

Ist die maximale Kapazität der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) erreicht, werden die Enzyme Pyruvat-Decarboxylase (PDC), Acetaldehyd-Dehydrogenase (ACS) und Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) aktiv und das Pyruvat wird über Acetaldehyd und Acetat in Acetyl-CoA umgewandelt. Ist jedoch auch hier die maximale Kapazität der Enzyme erreicht, führt dies zu einer Akkumulation von Pyruvat, Acetaldehyd und NADH . Um letzteres für die Zelle zu regenerieren, wechseln die Zellen von einem rein oxidativen Stoffwechsel auf einen oxidoreduktiven Stoffwechsel. Die Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert dabei wie auch bei der Gärung die Bildung von Ethanol aus Acetaldehyd. [34–36]

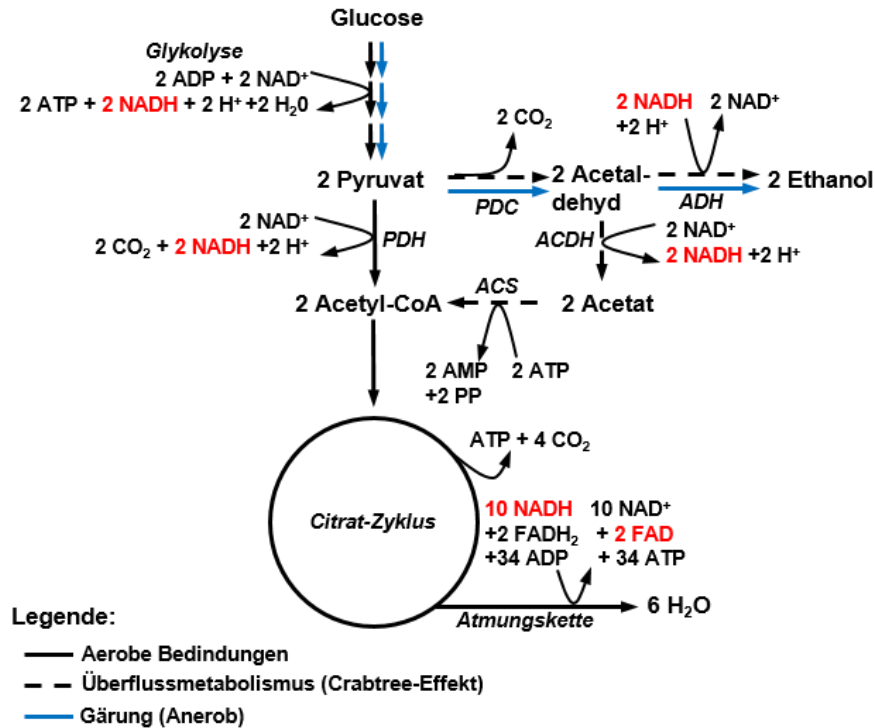


Abbildung 3.4: Ausschnitt aus der Energiegewinnung bei Hefen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. (rot) biogene Fluorophore; (PDH) Pyruvat-Dehydrogenase, (PDC) Pyruvat-Decarboxylase, (ACDH) Acetaldehyd-Dehydrogenase, (ACS) Acetyl-CoA-Synthetase und (ADH) Alkoholdehydrogenase.

3.4. Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie in der Bioprozesstechnik

Die ersten Fluoreszenzsensoren wurden bereits vor ca. 40 Jahren für die Bioprozessüberwachung eingesetzt. Sie waren jedoch nur in der Lage einzelne Fluorophore, wie die aromatischen Aminosäuren oder NADH, zu detektieren [10, 37, 38]. Heutige 2D-Fluoreszenzsensoren können hingegen sequentiell einen großen Anregungs- und Emissionsbereich messen und mehrere Fluorophore detektieren. Die Wellenlängenselektion des Lichts erfolgt hierbei entweder über Gitterchromatoren oder durch verschiedene Bandpässe [3, 39–41]. Der von Delta Light & Optics (Dänemark) entwickelte 2D-Fluoreszenzsensor, das Bioview[®], ist das in der Forschung am meisten eingesetzte Gerät für die online-Bioprozessüberwachung mittels Fluoreszenz. Es wurde speziell für industrielle Anwendungen konzipiert und ist damit u. a. inert gegen hohen Temperaturen und Feuchtigkeit. Es verfügt über zwei individuell steuerbare Filterräder, mit Platz für jeweils 16 Bandpässe (s. Abb. 3.5). Diese weisen eine Bandbreite von je 20 nm auf und erlauben die

Anregung von Molekülen in einem Bereich von 270 bis 550 nm sowie die Messung der Emission in einem Bereich von 310 bis 590 nm. Das Bioview[®] wird über einen zweiteiligen Lichtleiter und einem Adapter mit Saphirfenster in die Bioreaktoren eingekoppelt, wodurch kein direkter Kontakt des Sensors mit der Kulturbrühe vorliegt. Die Messung eines ganzen 2D-Spektrums dauert ca. eine Minute und erlaubt eine nahezu kontinuierliche Überwachung. Allerdings ist die bei einer Überwachung anfallende Datenmenge sehr groß und nicht alle Daten enthalten relevante Informationen. Die Analyse und Evaluation der Daten erfolgt daher meistens mit Hilfe von chemometrischen Methoden, um so die signifikanten Informationen aus den Daten herauszufiltern. [1, 42]

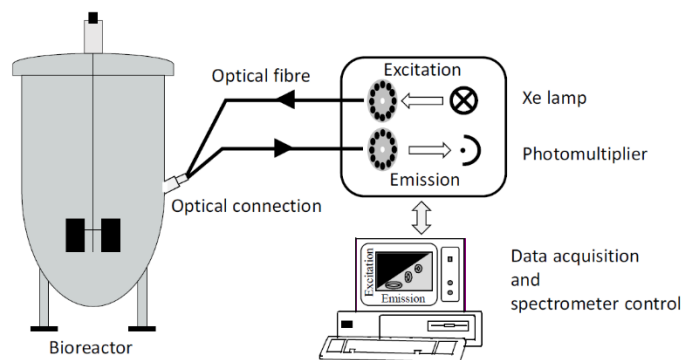


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau des Bioviews[®] [1].

In Tabelle 3.2 ist eine Auflistung verschiedener prokaryotischer und eukaryotischer Organismen dargestellt, die mit Hilfe des Bioviews[®] überwacht wurden. Die Überwachung und Vorhersage der Biomasse ist die meist genutzte Applikation des Bioviews[®]. Es wird aber auch oft für die Detektion von metabolischen Veränderungen oder für die Messung der Zellaktivität verwendet. Die Detektion des Crabtree-Effekts (s. Abschnitt 3.3.2) ermöglicht zusätzlich u. a. eine aktive Steuerung der Glucosezufuhr bei *S. cerevisiae* Kultivierungen. Sogar nicht fluoreszierende Moleküle wie Glucose, Lactat oder Glycerol können chemometrisch vorhergesagt werden. Die Vorhersage basiert dabei allerdings auf indirekt gemessenen Daten.

Tabelle 3.2: Applikationsbeispiele des Bioview® für die Bioprozessüberwachung verschiedener Organismen.

Typ	Organismus	Kultivierung	Anwendung	Referenz
Bakterien	<i>Bacillus</i>	Fed-Batch	Enzymaktivität	[43]
	<i>Bacillus polymyxa</i>	Batch	Biomasse und Polymyxin	[44]
	<i>Escherichia coli</i>	(Fed)-Batch, Kontinuierlich	Metabolische Veränderungen, Biomasse, Glucose, CO ₂ - Bildung	[45, 46]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Batch	Biomasse, 1,3-Propanediol, Glycerol	[47]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Fed-Batch	Biomasse, Aminosäuren	[48, 49]
Pilze	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Fed)-Batch	Biomasse, Lipaseaktivität	[50]
	<i>Claviceps purpurea</i>	Batch	Biomasse, Protein, Alkaloide	[51]
	<i>Pichia Pastoris</i>	Batch	Glycerol, Biomasse, GFP- Produktion, Methanol	[41, 52, 53]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Fed)-Batch	Metabolische Veränderungen, Feed-Kontrolle, Biomasse	[35, 54]
Säugetier- zellen	Chinese Hamster Ovary Zellen	Batch	Glucose, Lactat, Glutamat	[55]
	NSO-Zellen	Batch	Biomasse, Zellaktivität, rekombinante Protein- expression	[53]
Pflanzen	<i>Catharantuhus roseus</i>	Batch	Zellaktivität, Biomasse	[56]
	<i>Eschscholtzia california</i>	Batch	Alkaloide	[56]

3.5. Multivariate Datenanalyse

Aus den Fluoreszenzdaten der Bioprozessüberwachungen können wichtige Prozessgrößen (s. Tab. 3.2), wie z. B. die Biomasse, in Echtzeit gewonnen werden. Die große Anzahl an Wellenlängenkombinationen erzeugen allerdings eine hohe Anzahl an Variablen. Zusammenhänge können so nur kaum oder schwer mit herkömmlichen Methoden erkannt werden. Außerdem enthalten nicht alle aufgezeichneten Daten relevante Informationen oder die Informationen werden bereits durch redundanten Informationen beschrieben. Es bedarf somit einer multivariaten Datenanalyse, um die Daten auf den Kern zu reduzieren. Einen Lösungsansatz stellt die Hauptkomponentenanalyse dar. Die Daten werden dabei in zwei kleinere Matrizen, die Score (T)- und die Loading (P)-Matrix sowie in eine aus Messrauschen bestehende restliche Matrix (E) umgewandelt. Die Score-Matrix enthält

Informationen über den aktuellen Status eines Prozesses, wohingegen die Loading-Matrix Informationen über die Signalintensität beinhaltet (s. Gleichung 1).

$$X = TP^t + E \quad \text{Gleichung 1}$$

Bei der Transformation in eine neue Matrix werden Hauptkomponenten (principle component, PC) festgelegt. Sie bilden ein neues Koordinatensystem, welches die Daten besser beschreibt. In Abbildung 3.5 ist die Transformation von drei Punktgruppen, die sich in einem zweidimensionalen Raum befinden, dargestellt. Um die erste Hauptkomponente (PC-1) zu bestimmen, wird die Richtung der maximalen Varianz bestimmt. Die daraus resultierende Gerade beschreibt den Großteil der Informationen und liefert eine vereinfachte Darstellung der drei Punktgruppen. Weitere Hauptkomponenten werden analog zur PC-1 bestimmt, wobei die Hauptkomponenten immer orthogonal zu den bereits bestehenden Hauptkomponenten gebildet werden müssen. Die Hauptkomponentenanalyse ermöglicht es somit die Informationen vieler Variablen, die sich in einem mehrdimensionalen Raum befinden, in wenigen PCs zu verdichten. [1, 57, 58]

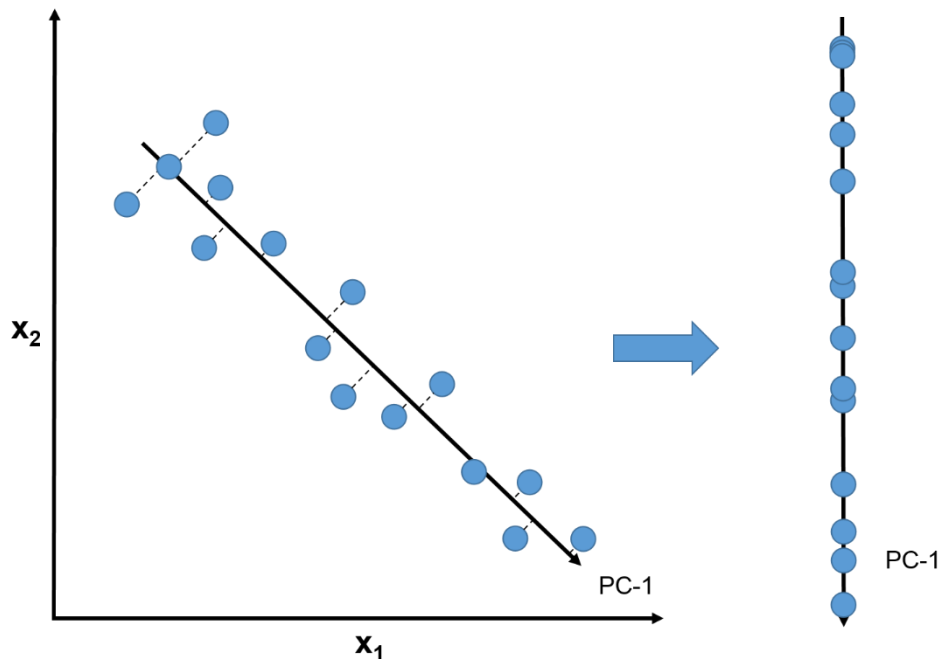


Abbildung 3.6: Bildung von Hauptkomponenten (PC-1 und PC-2) durch Transformation von Punkten im zweidimensionalen Raum. Die gestrichelten Linien stellen die Projektion der Datenpunkte auf die erste Hauptkomponente dar.

In Abbildung 3.6 ist exemplarisch eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) von 50.000 Boten-Ribonukleinsäuren (Messenger RNA, mRNA) gezeigt, die aus 301 einzelnen Zellen isoliert und über DNA-Chips quantifiziert wurden. Anhand des Score-Plots werden Zellgruppen deutlich, die u. a. als Blutzellen identifiziert werden können. Neben der Identifizierung von Gruppen können anhand der Loading-Werte auch Informationen gewonnen werden, welche Gene auf die Gruppenbildung starken Einfluss ausüben. Die Loading-Werte beschreiben den Anteil einer Variablen an der Gesamtvarianz. Es gilt, je höher der Wert ausfällt, desto wichtiger ist diese Variable zur Beschreibung der Originaldaten. Mit Hilfe der Loading-Werte können so mögliche neue Schlüsselgene identifiziert werden. [59]

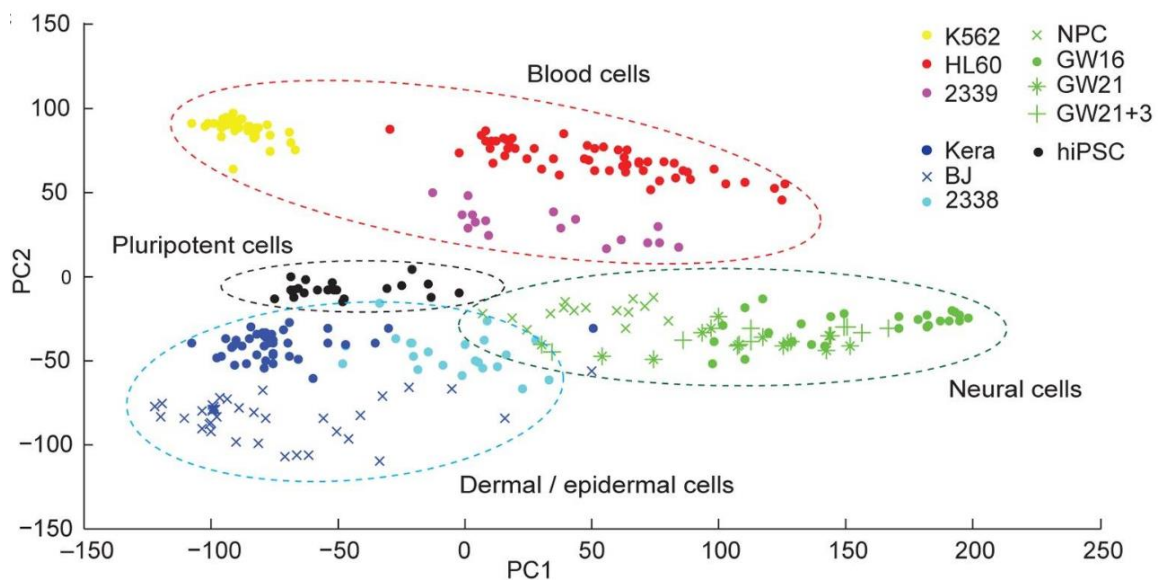


Abbildung 3.7: PCA der mRNA aus 301 einzelnen Zellen. Die Zellgruppen wurden anhand von Biomarkern identifiziert. [59]

3.5.1. Multivariate Regressionsmethoden

Die quantitative Vorhersage von Prozessgrößen erfolgt oft mit Hilfe von multivariaten Regressionsmethoden. Sie stellen dabei einen Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen her und basiert oft auf einer linearen Modellierung. Die Fluoreszenzmesswerte einer Prozessüberwachung liefern die X-Variablen, aus den offline-Messdaten werden die Y-Variablen gebildet. Ausgehend von der Analyse der Hauptkomponenten, die für beide

Datensätze angewandt wird, kann anschließend unter Minimierung der Fehlerquadrate eine lineare Regressionsgleichung bestimmt werden.

Die Partial Least Square Regression (PLS) ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Durchführung einer solchen multivariaten Regression. Im Unterschied zu anderen Verfahren werden zur Berechnung der Hauptkomponenten der X-Daten und der Y-Daten die Struktur der jeweils anderen Daten mitberücksichtigt. Dieses führt dazu, dass die Anzahl an Hauptkomponenten oft noch weiter reduziert werden kann und dass anstatt der Varianz der Daten die Korrelation zwischen optischer Messung und Referenzmessungen berücksichtigt wird.

Zur Bestimmung der richtigen Anzahl an Hauptkomponenten muss eine Validierung des Modells erfolgen. Wird eine nicht optimale Anzahl an Hauptkomponenten ausgewählt, können Probleme wie Underfitting oder Overfitting auftreten. Dieses spiegelt sich im Vorhersagefehler wider, welcher sich aus einem Kalibrier- und Schätzfehler zusammensetzt. Der Schätzfehler nimmt mit zunehmender Anzahl an Hauptkomponenten zu und entsteht wenn das Modell versucht zufällige Veränderungen wie Messrauschen zu modellieren und ist ein Zeichen für Overfitting. Der Kalibrierfehler verhält sich genau umgekehrt zum Schätzfehler.

Am Ende entsteht ein PLS-Modell mit dem aus den gemessenen X-Daten die Y-Daten vorhergesagt werden können. Die Evaluierung der Kalibrationsgüte kann anschließend mit Hilfe des Bestimmtheitsmaß (R^2) erfolgen (Gleichung 2). Die Vorhersagegüte kann durch den Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) beschrieben werden (s. Gleichung 3). [1, 60, 61]

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad \text{Gleichung 3}$$

4. Entwicklung und Charakterisierung des Fluoreszenzensors

4.1. Aufbau und Charakterisierung eines Laborfunktionsmusters

4.1.1. Untersuchung von verschiedenen Sensorkomponenten

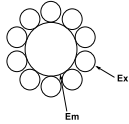
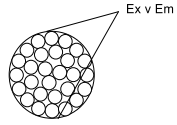
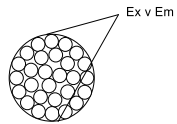
Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Funktionsmuster eines neuen Fluoreszenzensors für die online-Überwachung von Bioprozessen entwickelt und getestet werden. Der experimentelle Teil zur Entwicklung des Sensors umfasst dabei ein Screening von verschiedenen Hardwarekomponenten, einer Machbarkeitsstudie und die anschließende Fertigung des Funktionsmusters für folgende experimentelle Versuche im Rahmen von verschiedenen Bioprozessen.

Spezifische Vorgaben für die Konstruktion des Sensors waren:

1. Miniaturisierung: Der Sensoraufbau soll eine kompakte Bauform aufweisen, sodass ein handliches Format von ca. 50 mm x 80 mm x 150 mm erreicht wird.
2. Robustheit: Der Sensor soll eine geringe Störanfälligkeit und einen geringen Aufwand in der Wartung besitzen. Dieses soll durch die Vermeidung von beweglichen Teilen im Aufbau realisiert werden.
3. Online-Fähigkeit: Der Sensor soll zur Analyse des Bioprozesses während der laufenden Kultivierung verwendet werden können. Eine Steuerung der Kultivierung mithilfe der gewonnenen Daten soll möglich sein.
4. Günstiger Preis: Der Sensor soll im Vergleich zu anderen Analysemethoden im Aufbau und im Unterhalt günstig sein.
5. Datenreduktion: Der Sensor soll im Gegensatz zu bisherigen kommerziellen 2D-Fluoreszenzspektrometern, wie z. B. das Bioview[®], keine größeren Exzitations- und Emissionsbereiche abscannen. Er soll stattdessen auf die Detektion von drei wichtigen biogenen Fluorophoren (s. Abschnitt 3.1) spezifiziert und so die Menge an Daten reduziert werden.
6. Modulare Bauweise: Der Sensor soll aus Modulen bestehen, so dass bei Bedarf die Anregungsquelle und die Detektion leicht weiteren Fluorophoren angepasst werden kann.

Der Sensoraufbau gliedert sich im Wesentlichen in drei Bereiche auf: spezifische Anregung des jeweiligen Fluorophors, spezifische Detektion des Fluoreszenzlichts und Einkopplung des Anregungslicht (Ex) hin zum Fluorophor bzw. des Emissionslichts (Em) hin zum Detektor. Zu Beginn der Arbeit wurden Sensorkomponenten für die drei Bereiche in Hinblick auf die zuvor genannten Kriterien geprüft (s. Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der getesteten Sensorkomponenten.

Anregung	Preis	Leistung	Kühlung	Wellenlängen-selektion	Miniaturisier-barkeit
Xenon-Blitzlampe ^a	-	+	Passiv	benötigt (Gitter oder Bandpass)	-
High-Power LEDs ^a	++ ^b + ^c	++ ^b + ^c	Passiv	teilweise benötigt (Bandpass)	+
Detektion	Preis	Sensitivität	Kühlung	Wellenlängen-selektion	Miniaturisier-barkeit
Multi-Spektral-Sensor ^a	+	-	Passiv	<i>All-in-one</i> , aber große Bandbreite	++
Multi-Pixel Photon Counter ^a	-	++	Aktiv	benötigt (Bandpass)	-
Photo-diode ^a	+	++	Passiv	benötigt (Bandpass)	+
Einkopplung	Licht-transport	Merkmale	Konstruktion	Skizze	
Anglia-Instruments Ltd	+/-	Hitze stabil	Ex.: 12 · 200 µm Fasern Em.: 600 µm Faser 2 Faserbündel		
Y-Lichtleiter (PreSens-Design)	+	hitze stabil, statistisch verteilte Fasern	Ex./Em.: X · 200 µm Fasern 2 Faserbündel (je 1 mm Ø)		
Octo-Lichtleiter (PreSens-Design)	++	hitze stabil, statistisch verteilte Fasern	Ex./Em.: X · 105 µm Fasern 8 Faserbündel (je 2 mm Ø)		

^a Abbildung s. Anhang 10.1, ^b sichtbares Licht und ^c ultraviolettes Licht

Für die Anregung standen eine Xenon-Blitzlampe und Leuchtdioden (LEDs) zur Verfügung. Eine Xenon-Blitzlampe wird in vielen Fluoreszenzspektrometern verwendet, da sie den gesamten ultravioletten und sichtbaren Lichtbereich (UV-VIS-Bereich) abdeckt. Sie benötigt jedoch eine Methode zur Wellenlängenselektion (Gitter oder Bandpässe (BP)). Neben hohen Anschaffungskosten benötigt sie eine längere Aufwärmzeit (ca. 30 min). Außerdem nimmt die Leistung der Xenon-Lampe mit der Zeit ab. Besonderer Fokus lag daher auf den preiswerten High Power LEDs. Sie emittieren annähernd monochromatisches Licht mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von 10 bis 35 nm. Außerdem weisen sie hohe Intensitäten sowie eine lange Lebensdauer auf. In Abbildung 4.1 sind die Spektren der verwendeten LEDs mit und ohne Bandpässe für die 365 und 450 nm LED dargestellt.

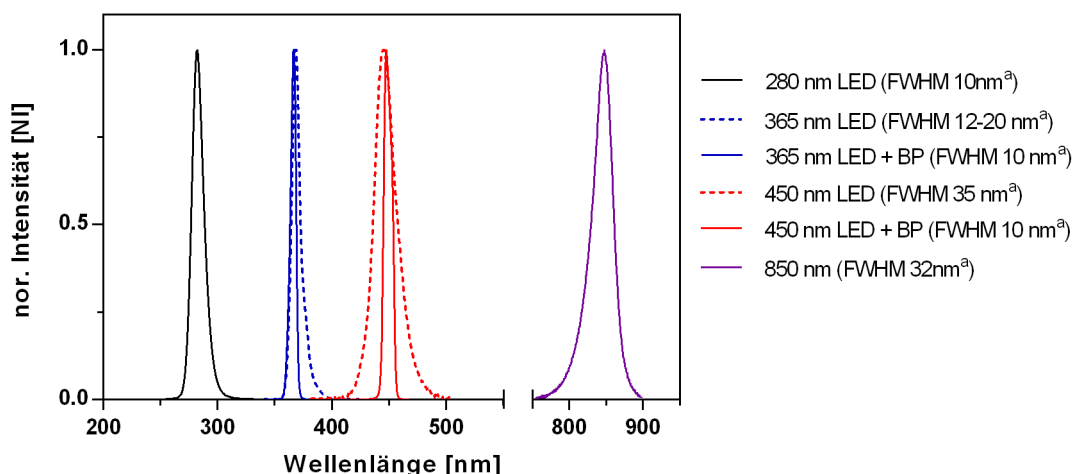


Abbildung 4.1: Normalisierte Spektren der verwendeten LEDs. Die 365 nm und 450 nm LED wurden zusätzlich mit Bandpässen verknüpft. ^aHerstellerangaben.

Für die Detektion wurde eine Alternative zum *Photomultiplier Tube* (PMT) gesucht, welcher häufig in gängigen Fluoreszenzspektrometern verwendet wird. PMTs benötigen eine starke Spannungsversorgung und eine aktive Kühlung. Außerdem liegen sie preislich mit über 1.000 Euro sehr hoch. Zunächst wurde ein Multi-Spektral-Sensor (MMCS6) der MAZeT GmbH (Jena, Deutschland) mit sechs spektralen Kanälen (425, 475, 525, 575, 625 und 675 nm) und einem panchromatischen Kanal getestet (s. Abb. 4.2). Für die Evaluierung des MMCS6 wurden Lösungen der Modellsubstanzen 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) und Riboflavin angesetzt und mit LEDs der Wellenlängen 365 und 450 nm angeregt. Die Ergebnisse zeigen, dass es mit dem MMCS6 möglich ist, die Fluoreszenz von verschiedenen

Modellsubstanzen zu detektieren. Für Riboflavin konnte ein Fluoreszenzmaximum bei 548 nm detektiert werden, wobei das Maximum für Umbelliferon bei 462 nm liegt. Die Messung zeigt aber auch, dass die in dem MMCS6 verbauten Filter einen sehr großen Bandpass von ca. 60 nm aufweisen. Dies hat zur Folge, dass die biogene Fluoreszenz von NADH (Ex/Em = 365/450 nm) und die biogene Fluoreszenz von Riboflavin (Ex/Em = 365/530 nm) überlappen und so eine angestrebte Prozessüberwachung der beiden Parameter erschwert werden. Das MMCS6-Modul kann aufgrund des verwendeten Halbleitermaterials nicht für die Detektion von Proteinfluoreszenz verwendet werden.

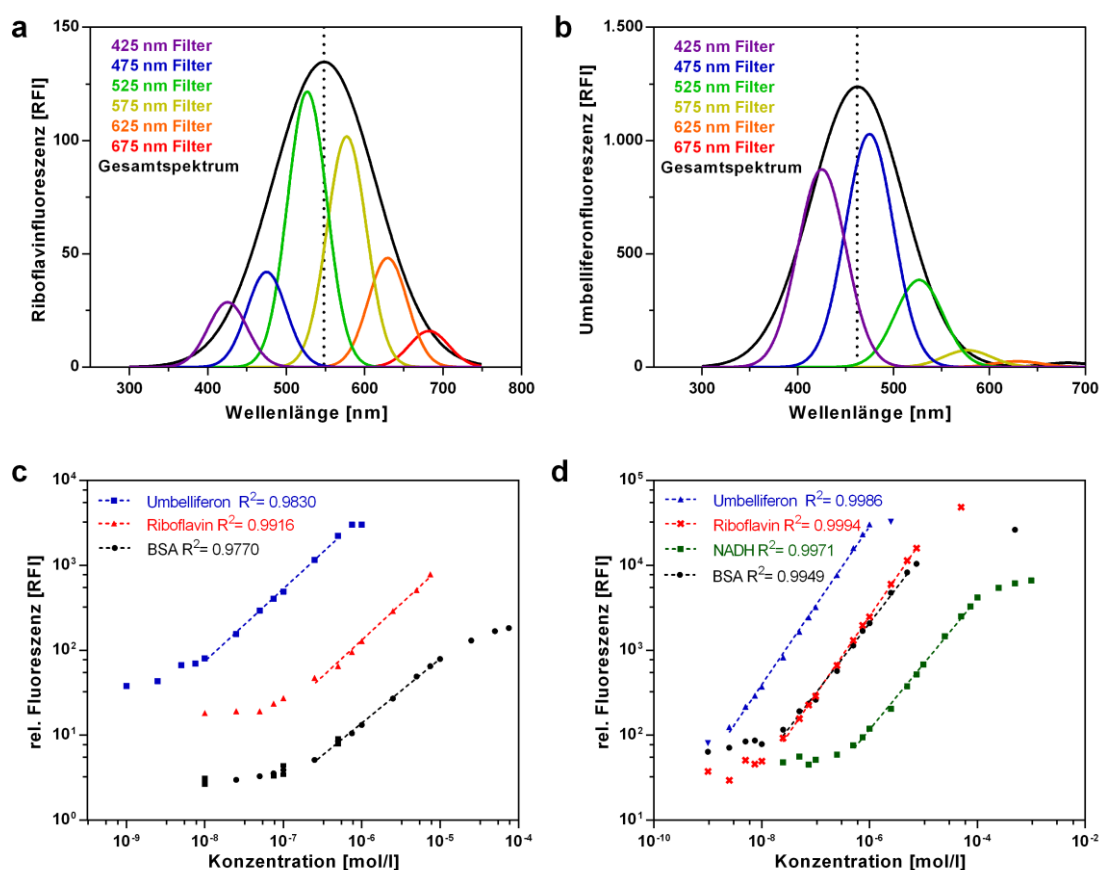


Abbildung 4.2: Testung verschiedener Detektortypen. Mazet-Detektor (a und b), a = $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l Riboflavinlösung und b = $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l Umbelliferonlösung (Anregung: 365 nm LED; Mazet: 1.024 ms Integration, 320 nA); MPPC-Detektor (c), Kalibrationsgeraden von BSA (Ex280/Em340), Riboflavin (Ex450/Em525) und Umbelliferon (Ex365/Em448); Photodiode (d), Kalibrationsgeraden von BSA (Ex280/Em340), Riboflavin (Ex450/Em525), NADH und Umbelliferon (Ex365/Em448).

Als Alternative zum MMCS6-Modul wurde ein Multi-Pixel Photon Counter (MPPC) der Firma Hamamatsu Photonics K. K. (Hamamatsu, Japan) getestet. Es wurden Kalibrationsgeraden für die Modellsubstanzen Umbelliferon, Riboflavin und BSA erstellt und doppelt logarithmisch aufgetragen (s. Abb. 4.2c). Die Anregung der Modellsubstanzen erfolgte mit High Power LEDs der Wellenlängen 285, 365 und 450 nm. Außerdem wurde der MPPC mit Bandpässen für die Protein-, Riboflavin- und NADH-Fluoreszenz verknüpft (s. Abb. 4.3). Die Bandpass-Filter weisen hohe Transmissionswerte und eine hohe Blockung außerhalb des Durchlassungsbereichs ($OD \geq 6$) auf. Außerdem verfügen sie über kleine Bandbreiten (15 bis 26 nm) und ermöglichen somit die selektive Messung der Fluoreszenz bestimmter Fluorophore. Analog zum MPPC wurden ebenfalls Photodioden von Advanced Photonix, Inc. (SD 112-45-11-221; Michigan, USA) getestet. Die 285 nm UV-LED wurde jedoch durch die leistungstärkere 280 nm UV-LED (LEUVA66G00HV700) ersetzt (s. Abschnitt 8, Tab. 8.6). Zusätzlich zu den oben bereits genannten Fluorophorkalibrierungen wurde eine NADH-Kalibrationsgerade erstellt. Die Ergebnisse (s. Abb. 4.2) zeigen, dass sowohl mit dem MPPC als auch mit der Photodiode die Modellsubstanzen über einen großen linearen Messbereich detektiert werden können.

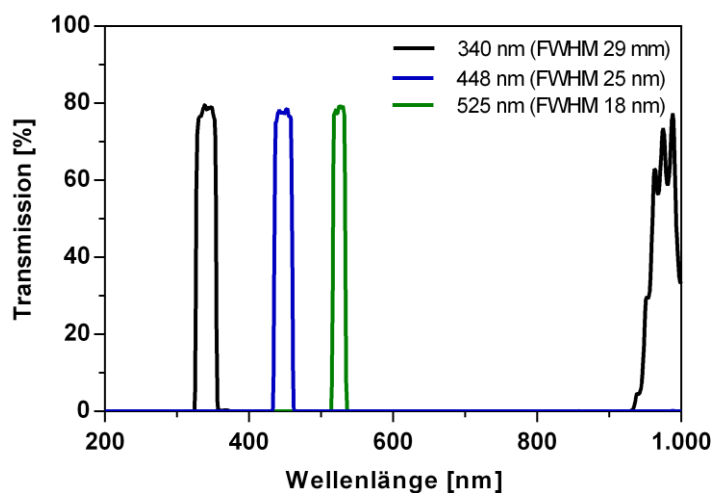


Abbildung 4.3: Transmissionsspektren der verwendeten Bandpässe.

In Tabelle 4.2 ist der Vergleich des linearen Messbereichs zwischen MPPC, Bioview[®] und Photodiode dargestellt. Der lineare Messbereich des Bioviews[®] (2D-Fluoreszenzspektrometer mit PMT) wurde ebenfalls über ein Kalibrationsgerade bestimmt (Daten nicht

gezeigt) und diente als Referenz. Alle Detektoren verfügen über ähnliche lineare Messbereiche. Der MPPC und die Photodiode eignen sich somit als Ersatz für den PMT. Aufgrund des preislichen Vorteils der Photodiode wurde sie für den Aufbau des Funktionsmusters verwendet und die Bestimmtheitsgrenze berechnet (s. Tab. 4.2). Die Bestimmtheitsgrenze gibt die kleinste Konzentration eines Analyten an, die mit einer festgelegten Präzision quantitativ bestimmt werden kann.

Tabelle 4.2: Vergleich des linearen Messbereichs von MPPC, Bioview und Photodiode incl. Limit of Quantification (LOQ).

Messbereiche	MPPC [$\mu\text{mol/l}$]	Bioview [$\mu\text{mol/l}$]	Photodiode [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ Photodiode [$\mu\text{mol/l}$]
BSA	0,25- 10	0,5- 10	0,025 -7,5	0,026
Riboflavin	0,25 - 7,5 ^a	0,05- 20	0,025- 7,5 ^b	0,020
Umbelliferon	0,01- 0,5	0,01- 0,25	0,0025- 1	-
NADH	-	-	0,5- 50	0,569

^ahöchste gemessene Konzentration. ^bSättigung der Photodiode mit Verstärkerstufe 8

Neben einer leistungsstarken Lichtquelle sowie einem sensitiven Detektor wird eine effiziente Einkopplung in den Versuchsraum benötigt. Hierfür wurden verschiedene Lichtleiter geprüft (s. Tab. 4.1). Zu Beginn wurde ein kommerziell erhältlicher Lichtleiter (FCR-UV200/600-2-IND-HAT) von Anglia Instruments Ltd. (Cambridgeshire, Großbritannien) und ein von dem Kooperationspartner PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) designter Lichtleiter (Y-Lichtleiter) getestet. Der Y-Lichtleiter wurde von der Firma Leoni Fiber Optics GmbH (Föritzal, Deutschland) angefertigt. Beide Lichtleiter sind mit UV-VIS durchlässigen Quarzfasern bestückt, die eine numerische Apertur (NA) von 0,22 bzw. einen Öffnungswinkel von $25,4^\circ$ aufweisen. Der Lichtleiter von Anglia Instruments Ltd. ermöglicht die Anregung und Detektion von einem einzelnen Fluorophor ohne die Verwendung von beweglichen Teilen oder teuren Optiken. Ein Vergleich der beiden Lichtleiter zeigte, dass der Lichtleiter von PreSens um zweifach höhere Intensitäten lieferte (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf den insgesamt größeren Durchmesser der Fasern des Y-Lichtleiters zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil des Y-Lichtleiters ist, dass die Fasern statistisch auf beide Arme verteilt sind. Der statistisch verteilte Aufbau der Fasern des Lichtleiters ermöglicht eine einfache Modifikation auf mehrere Arme. Ausgehend von den Ergebnissen wurde deshalb ein robuster Lichtleiter mit acht Faserbündeln entwickelt (s. Anhang 10.2). Das Gehäuse des Lichtleiterkopfs besteht

aus Edelstahl und die Fasern wurden mit einem hitzestabilen Epoxidharz verklebt. In Abbildung 4.4 ist die statistische Verteilung eines Lichtleiterarmes gezeigt. Sie bietet den Vorteil, dass sichergestellt wird, dass das Anregungslicht mit dem Öffnungswinkel ($25,4^\circ$) der Detektionsfasern überlappt. Die resultierende Fluoreszenz, welche in alle Richtungen abstrahlt, kann so im 180° Winkel von den Detektoren gemessen werden.

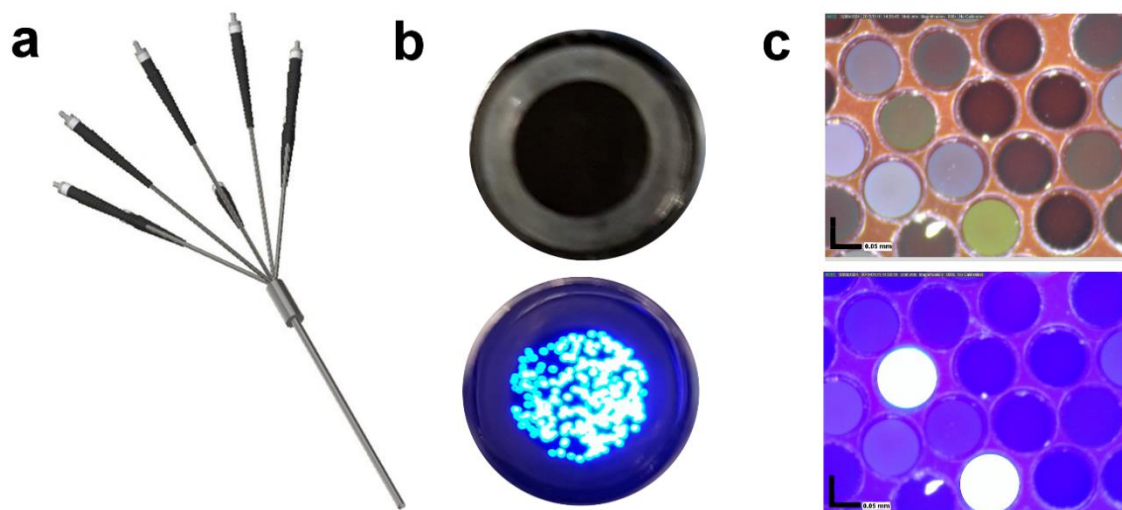


Abbildung 4.4: Achtarmiger Lichtleiter mit statistisch verteilten Fasern. (a) Schematische Darstellung des Lichtleiters, (b) Lichtleiterkopf mit und ohne LED-Beleuchtung (gedrosselte Beleuchtung eines Lichtleiterarmes mit einer 450 nm LED), (c) Nahaufnahme der Fasern mit und ohne Beleuchtung.

4.1.2. Aufbau des Sensors

Nachdem die Sensorkomponenten erfolgreich evaluiert wurden, wurde ein Laborfunktionsmuster des Sensors erstellt. In Abbildung 4.5 ist der Sensor dargestellt. Für die Anregung wurden wie zuvor beschrieben High Power LEDs (1a) verwendet. Neben der 280, der 365 und der 450 nm LED, die für die Fluoreszenzanregung benötigt wurden, wurde zusätzlich eine 850 nm LED für Streulichtmessungen implementiert. Die 365 und 450 nm LED weisen hohe FWHM-Werte von 24 und 35 nm auf und wurden deshalb zusätzlich mit Bandpässen (1b) bestückt (s. Abschnitt 4.1.1). Außerdem wurden in der Nähe der LEDs je eine Monitorphotodiode (1c) verbaut. Diese überwachen die Lichtintensität der LEDs und können gegebenenfalls bei Intensitätsverlust für Kalibrationen verwendet werden. Das Anregungslicht wird über den bereits beschriebenen Lichtleiter (2a) und einen Adapter (2b) in den Messraum, wie z.B. einen Bioreaktor, eingekoppelt. Das resultierende

Fluoreszenzlicht sowie das Streulicht werden zur Detektion über weitere Faserbündel des Lichtleiters auf vier Photodioden (3b) projiziert. Diese sind mit Bandpass-Filtern (3a) oder einer Blende für das Streulicht bestückt.

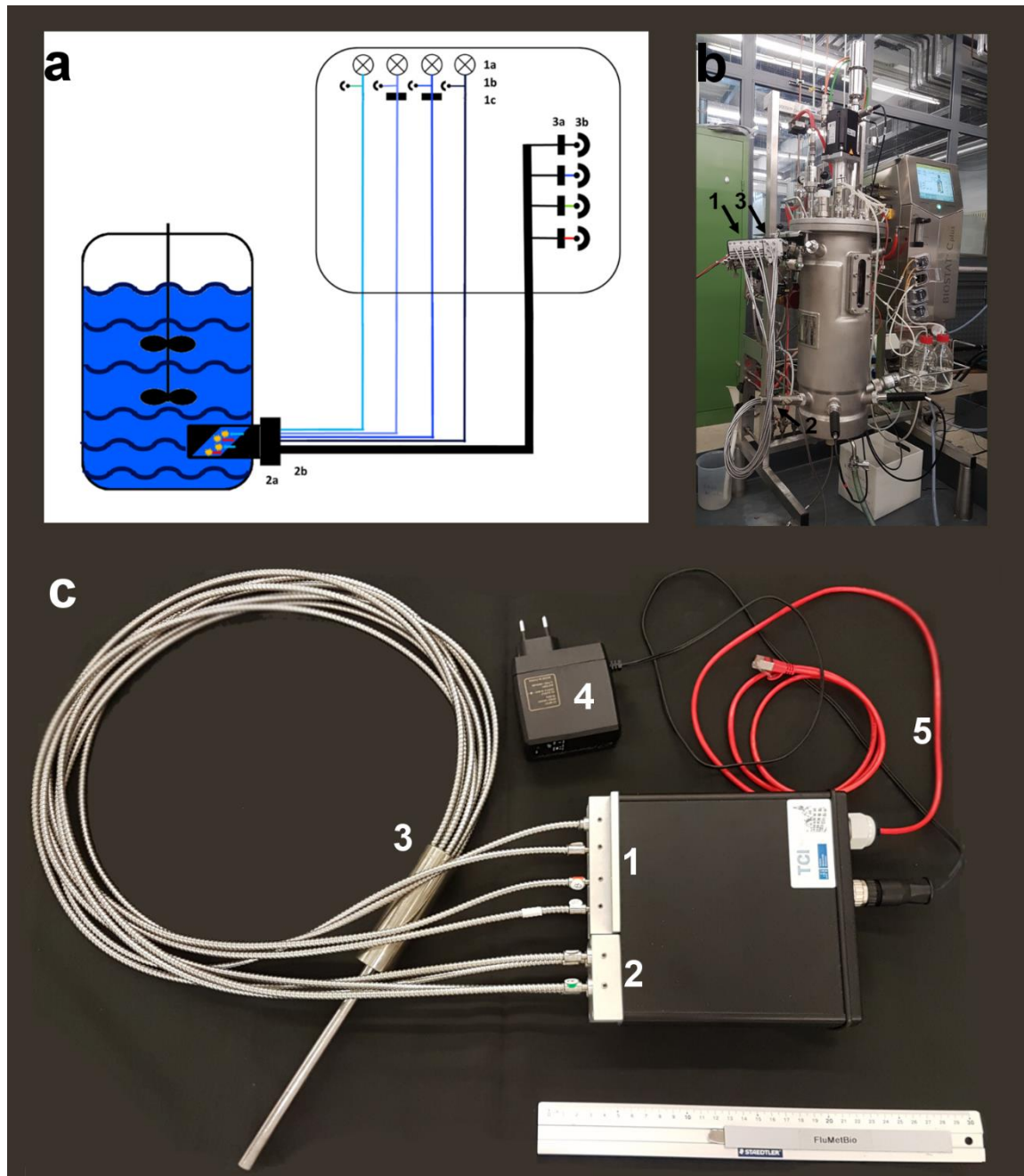


Abbildung 4.5: Aufbau des Funktionsmusters. (a) Schematischer Aufbau des Sensors, (b) Sensor mit Bioreaktor und (c) Sensor. Exzitation: 1a: 278 nm LED (Laser Components GmbH, München) und 365, 450 und 850 nm LED (Roithner Lasertechnik GmbH, Wien); 1b: Photodiode für jede LED als Referenz und 1c: Bandpass-Filter mit einer zentralen Wellenlänge (ZWL) von 365 und 450 nm (Edmund Optics GmbH, Karlsruhe; FWHM 10 nm). 2a: Adapter für Ingold Port; 2b: Lichtleiter mit acht Faserbündeln. Detektion: 3a: Bandpass-Filter mit einer ZWL von 340/448/525 (FWHM:29/25/18 nm) und einer Blende für Streulicht; 3b: Photodioden (Advanced Photonix, Inc.); 4: Unterbrechungsfreie Stromversorgung; 5: Ethernet-Kabel.

Um den Sensor vor Spannungsspitzen im Stromnetz oder vor kurzen Stromausfällen zu schützen verfügt der Sensor zusätzlich über eine unterbrechungsfreie Stromversorgung (4). Der Sensor wird über ein Ethernetkabel (5) mit dem lokalen Netz der Insituts verbunden und über eine Software ferngesteuert. Die erhaltenden Messdaten werden auf den lokalen Servern des Instituts gespeichert. Zusätzlich werden die Daten auf einer internen Speicherkarte des Sensors gesichert, um Datenverluste zu vermeiden. Die LEDs und Photodioden sind in separaten Aluminiumblöcken verbaut, die für eine passive Kühlung der Elektronik sorgen. Die Maße des Funktionsmusters sind mit 50 mm x 160 mm x 180 mm etwas größer als geplant. Das Ziel eines handlichen Sensors wurde jedoch erreicht und es besteht weiteres Einsparpotential.

In Abbildung 4.6 ist exemplarisch die mit der Monitordiode gemessene LED-Intensität für einen Kultivierungszeitraum von 15 h dargestellt. Die prozentuale Abweichung der Lichtintensität während des Zeitraums lag bei $\pm 1\%$ und kann als konstant angenommen werden.

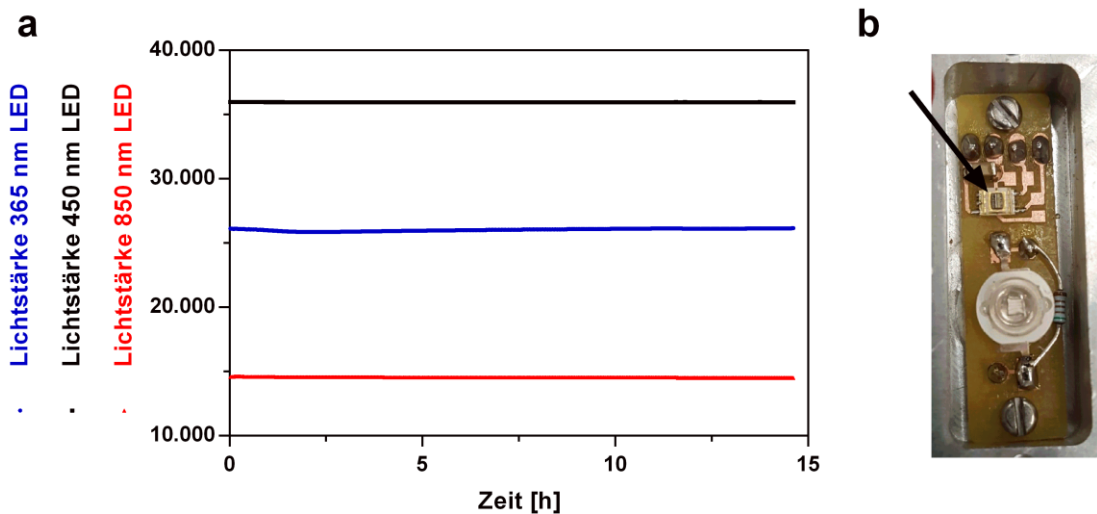


Abbildung 4.6: Monitordiodenmessung (a) Lichtintensität der 365, 450 und 850 nm LED über einen Zeitraum von 15 h, (b) Monitordiode (Pfeil).

Während der Bioprozessüberwachung werden die vier LEDs nacheinander im Lock-In-Verfahren ein- und ausgeschaltet, um Schwankungen der äußeren Lichtverhältnisse herauszufiltern und um die verschiedenen Fluorophore sequenziell messen zu können. Die

vier Photodioden detektieren parallel das Fluoreszenz- und das Streulicht. In Tabelle 4.3 ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Fluoreszenzkanäle und des Streulichtkanals des Sensors gezeigt.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der wichtigen Messkanäle des Sensors.

Fluorophore/Streukörper	Ex/ Em [nm]	Bezeichnung
Aromatische Aminosäuren (Tryptophan)	280/340	Proteinkanal
NADH	365/448	NADH-Kanal
NADH, Flavine, GFP	365/525	Misch-Kanal/GFP-Kanal
Riboflavin, FAD, FMN	450/525	Flavinkanal
Streukörper	850/850	Streulichtkanal

Die Messbereiche aller Kanäle wurden so gewählt, dass die Anregungs- und Emissionswellenlängen den Fluoreszenzeigenschaften der zu messenden Fluorophore entsprechen (s. Abb. 4.7).

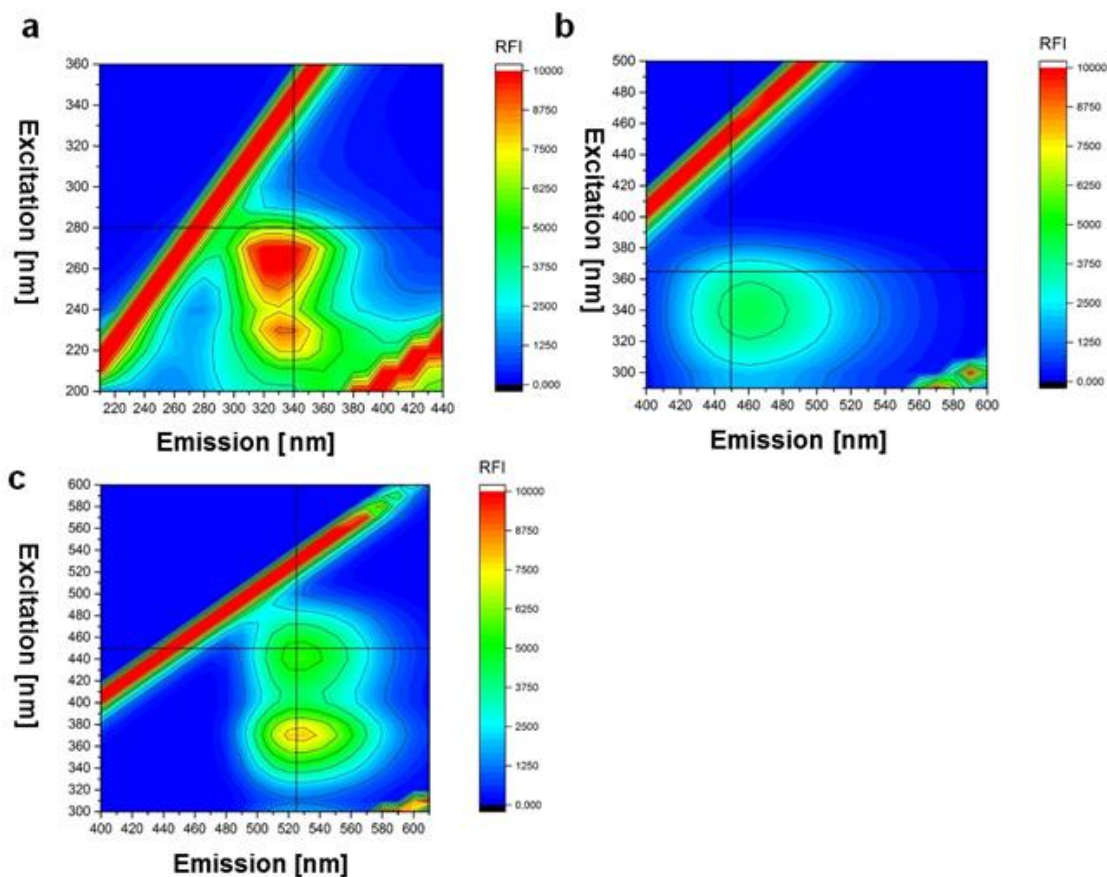


Abbildung 4.7: 2D-Fluoreszenzspektren verschiedener Fluorophore. (a) BSA, (b) NADH und (c) Riboflavin. Das Kreuz markiert die Anregungs- und Detektionswellenlänge des Sensors (ZWL) [62].

Bei einer Wellenlänge von 280 nm wird die aromatische Aminosäure Tryptophan in Proteinen angeregt und es wird Licht mit der Wellenlänge von 340 nm emittiert. Dies wird im Folgenden als Proteinkanal bezeichnet.

4.1.3. Untersuchung zur selektiven Detektion einzelner Fluorophore

Die bisherigen Versuche zeigten, dass das Funktionsmuster sensitiv die verschiedenen biogenen Fluorophore detektieren kann. Anhand der Abbildung 4.7 wird jedoch deutlich, dass sich die Fluoreszenz über einen großen Wellenlängenbereich um das Peakmaximum erstreckt. Es ist somit möglich, dass sich verschiedene Fluorophore überlagern und beeinflussen. Um diese möglichen Wechselwirkungen zu untersuchen und um zu testen, ob der Sensor die biogenen Fluorophore selektiv detektieren kann, wurde eine statistische Versuchsplanung durchgeführt (s. Abschnitt 9.3). In einem Gemisch aus BSA, Riboflavin und NADH wurden die Konzentrationen von jedem Fluorophor variiert und das Fluoreszenz-Signal gemessen. Zusätzlich wurden vier Zentralversuche mit gleichbleibender Analytenkonzentration vermessen und so die Reproduzierbarkeit des Versuchs bestimmt. Die prozentuale Abweichung der Zentralversuche lag jeweils unter 2 %. Systematische Fehler, die durch äußere Umstände verursacht wurden, können somit weitgehend ausgeschlossen werden. In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse des Selektivitätstest aufgetragen. Für jedes Fluorophor wurde unter Verwendung eines vollen Kreuzvalidierungsverfahrens ein PLS-Modell erstellt. Das PLS-Modell für NADH basiert auf drei Faktoren, während das Riboflavin- und das BSA-PLS-Modell ein bzw. zwei Faktoren benötigten. In Abbildung 4.8d sind die Regressionskoeffizienten der drei PLS-Modelle gezeigt. In allen Fällen weisen die erwarteten Wellenlängenkombinationen für BSA (Ex280/Em340), Riboflavin (Ex450/Em525) und NADH (Ex365/Em448) den stärksten Einfluss auf ihr jeweiliges Modell auf. Eine weitere wichtige Wellenlängen-Kombination stellt Ex280/Em448 dar. Sie zeigt sowohl Effekte auf das BSA- als auch das NADH-PLS-Modell. Dies kann möglicherweise durch einen Kaskaden-Effekt erklärt werden. Das Licht der BSA-Fluoreszenz wird dabei für die Anregung der NADH-Fluoreszenz verwendet. Außerdem kann, wie auch schon von Guo et al. (2009) beschrieben, ein Auslöschungseffekt von Riboflavin auf BSA gesehen werden (Ex280/Em525) [63]. Aufgrund der höheren eingesetzten Konzentration von NADH ist der Auslöschungseffekt von NADH auf die BSA-Fluoreszenz jedoch im Modell ausgeprägter. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen

werden, dass die reale BSA-Fluoreszenz höher als die gemessene sein sollte. Die Kalibrationsmodelle weisen für alle drei Fluorophore einen hohen Regressionskoeffizienten ($R^2 \geq 0,99$) und einen niedrigen Root Mean Square Error (RMSE) auf. Die Ergebnisse zeigen somit, dass der Sensor, trotz einer hohen Konzentrationsspanne an Fluorophor, in der Lage ist, die drei Fluorophore selektiv detektieren zu können.

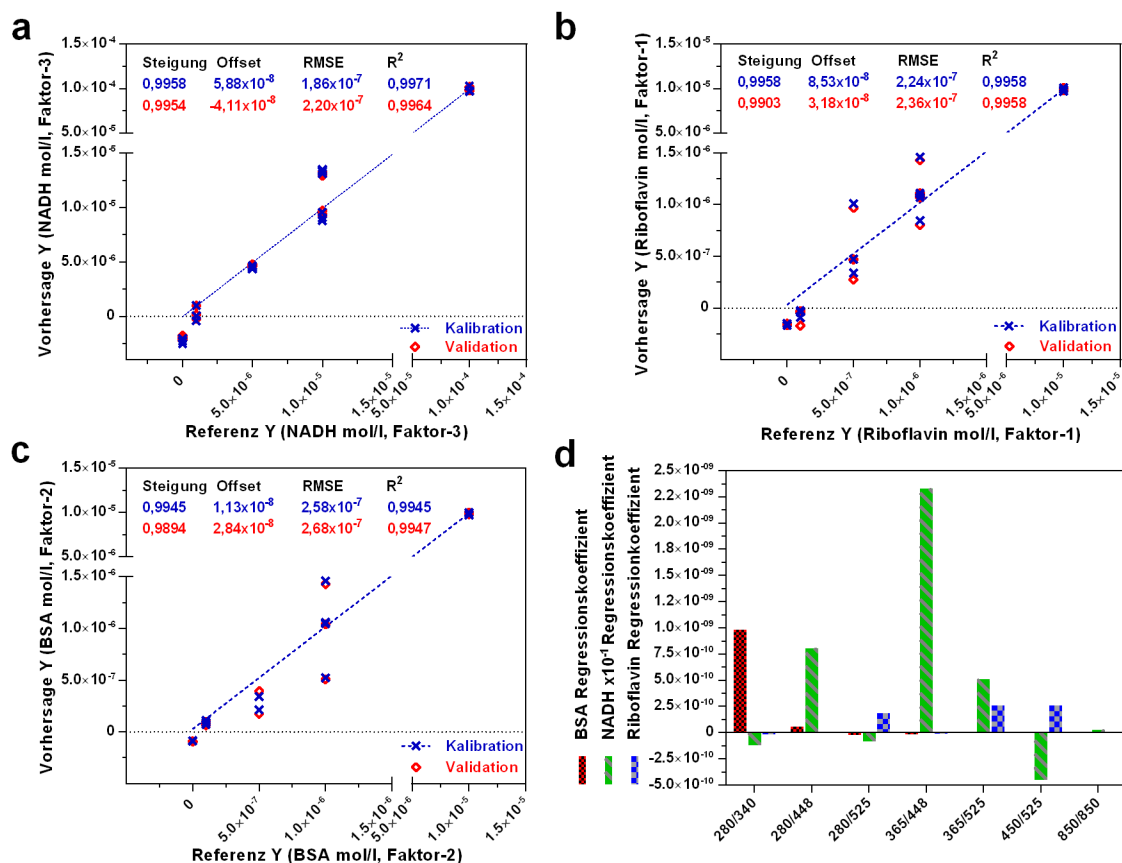


Abbildung 4.8: Selektivitätstests des Sensors für einzelne Fluorophore (BSA, NADH und Riboflavin). PLS Modelle von (a) BSA, (b) Riboflavin und (c) NADH. (d) Regressionskoeffizienten der drei PLS Modelle.

4.2. Adapter

Das Hauptaugenmerk des Sensors soll die online-Überwachung von Bioprozessen darstellen. Bei der Kultivierung von Bioprozessen ist es wichtig, dass eine volle Sterilisierbarkeit des Kultivierungsraums möglich ist. In der Regel wird dies durch Autoklavieren des Kultivierungsgefäßes bewerkstelligt, wobei hohe Temperaturen und Drücke erzeugt werden. Es wurden daher verschiedene autoklavierbare Adapter für den

Sensor entwickelt, die es ermöglichen den Sensor an einen Bioreaktor zu koppeln. Zunächst wurde ein Adapter aus Edelstahl für den Standard-Ingold-Port von Edelstahl-Bioreaktoren entwickelt (s. Abb. 4.9). Um reflektionsbedingtes Streulicht an dem Glas zu verringern, wurde ein Saphirglas im 45° Winkel verbaut und die Innenseite des Adapters geschwärzt. Außerdem wurde eine Kappe für den Adapter entwickelt. Sie stellt sicher, dass unabhängig vom Reaktortyp der Messbereich konstant gehalten wird. Neben dem klassischen Ingold-Port-Adapter wurde eine Adapter für einen Glasreaktor und ein Adapter für Bypass-Messungen entwickelt. Für weiterführende Anwendungen wurde zusätzlich ein 3D-gedruckter Adapter für Küvetten oder Durchflusszellenmessungen entworfen.

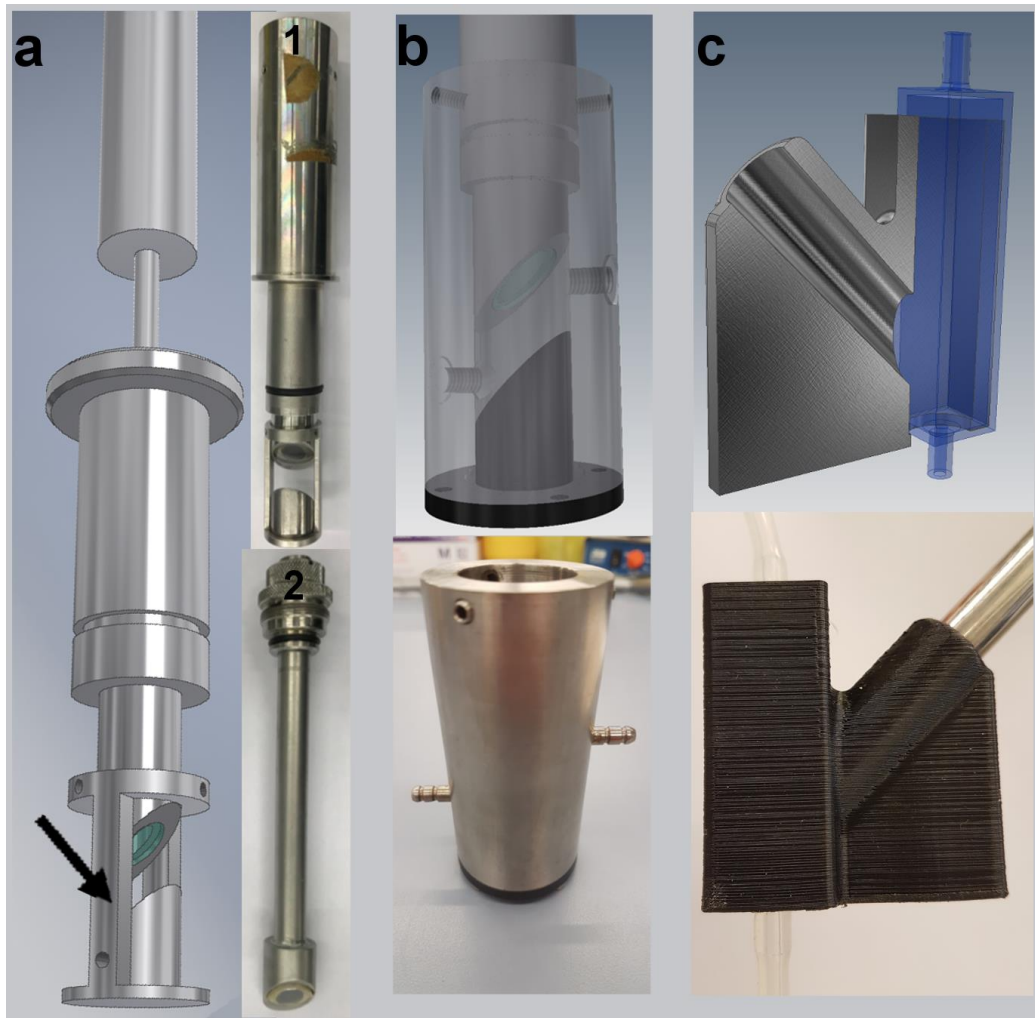


Abbildung 4.9: Übersicht der verschiedenen Adapter. (a) Ingold-Port für Edelstahlreaktor (1) und PG 13,5 für Glasreaktor (2), (b) Bypass und (c) Küvetten- oder Durchflusszellenmessung. Der Pfeil markiert die Kappe für eine definierte Messzone.

Um zu testen, welchen Effekt die Kappe auf die Sensormessung hat, wurde ein 2 l Edelstahlreaktor mit 0,025 μM 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) und mit modifiziertem Schatzmann-Medium (s. Abschnitt 8, Tab. 8.12) befüllt. Anschließend wurde schrittweise Bäckerhefesuspension (s. Abschnitt 9.5) zugegeben und die Zugabe wurde mit dem Sensor überwacht, sowohl mit als auch ohne Kappe.

In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse der Hefezugabe dargestellt. Es fällt auf, dass in beiden Fällen das durch Umbelliferon bedingte Fluoreszenzsignal im NADH-Kanal mit zunehmender Hefekonzentration zunächst abnimmt. Bei zunehmender Zelldichte werden steigende Fluoreszenzsignale erwartet. Demgegenüber steht jedoch eine Zunahme des Streulichts und eine zunehmende Absorption des Anregungslichts durch Zellmembranen und Fluorophore. Dies hat eine geringere Eindringtiefe des Anregungslichtes zur Folge, wodurch weniger Moleküle angeregt werden. Außerdem findet auch eine zunehmende Absorption des Emissionslichts statt. Dies führt in der Summe zu sinkenden Fluoreszenzsignalen bei steigender Trübung. Bei hohen Hefekonzentrationen überwiegt hingegen die Eigenfluoreszenz der Hefezellen und der NADH-Kanal steigt wieder an. Der Vergleich der beiden Versuche mit und ohne Kappe zeigt, dass die Fluoreszenzwerte insbesondere im NADH-Kanal mit Kappe zu Beginn niedriger sind, was auf die geringere Eindringtiefe zurückzuführen ist. Der Einfluss des steigenden Streulichts auf den NADH-Kanal wird jedoch deutlich reduziert. Außerdem wird das Messrauschen der Fluoreszenzkanäle reduziert. Vermutlich wirken sich mit der Kappe Effekte durch Glasblasen oder Reflektionen durch Bestandteile im Innenraum des Reaktors weniger stark aus. Bei hohen Zellkonzentrationen ist hingegen kein Unterschied mehr zu erkennen. Die Fluoreszenzmessungen finden vermutlich nur noch an der Grenzfläche zum Medium statt, wodurch die Kappe keinen Effekt mehr hat. Die Kappe hat somit neben der Schaffung eines reproduzierbaren Messraums weitere positive Effekte und wurde somit für die weiteren Kultivierungen verwendet.

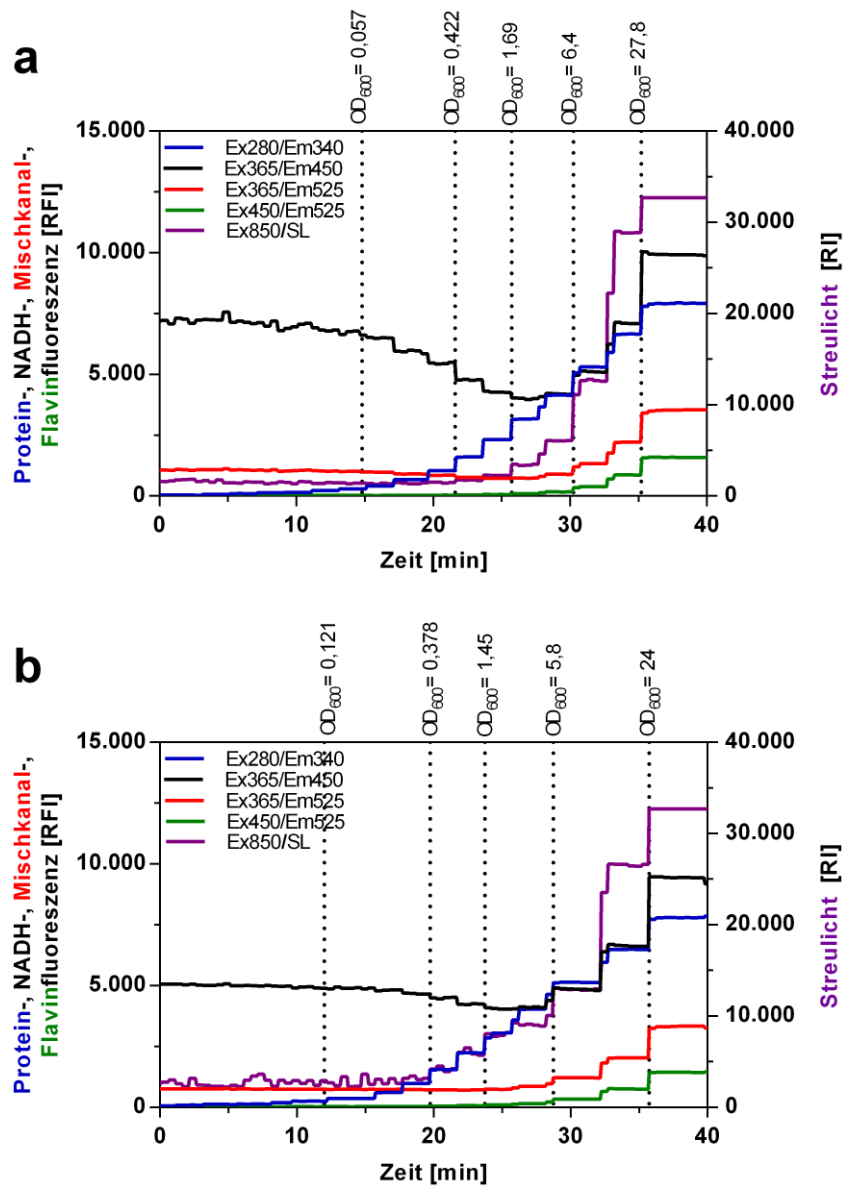


Abbildung 4.10: Überprüfung des Einflusses der Sensorkappe auf das Messsignal bei schrittweiser Zugabe von Hefesuspension. (a) ohne Kappe und (b) mit Kappe. In einem 2 l-Bioreaktor wurden zuvor $0,025 \mu\text{M}$ Umbelliferon und modifiziertes Schatzmann-Medium vorgelegt ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, 350 rpm).

5. Anwendung des Fluoreszenzensors zur Bioprozessüberwachung

5.1. Online-Überwachung von *Escherichia coli*-Kultivierungen

Nachdem der Sensor in vorangegangenen Untersuchungen erfolgreich gegenüber Ein- und Mehrkomponentenlösungen von Modellfluorophoren validiert wurde, wurde in weiteren Versuchen der Einsatz in Reaktorsystemen zur Messung intrazellulär und heterolog produzierter Fluorophore eingesetzt. Als Modellorganismus wurden hier verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet.

5.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli* K1 im Batch-Betrieb

Zu Beginn wurde *E. coli* K1 im 10 l-Reaktormaßstab (Biostat C, B. Braun) kultiviert. Die Kultivierung fand in definiertem Medium (s. Abschnitt 8.5.2) bei konstanter Temperatur (37 °C) und bei konstanter Rührgeschwindigkeit von 1.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) statt. Außerdem wurde der pH-Wert durch Zugabe von Säure oder Base auf einem Wert von pH 7,5 gehalten. Die konstanten Rahmenbedingungen sind von Vorteil, da Fluoreszenz durch viele Faktoren, wie z. B. dem pH-Wert, beeinflusst werden kann.

In Abbildung 5.1 ist exemplarisch der Verlauf einer Batch-Kultivierung gezeigt. Aus den verschiedenen Messkanälen des Sensors (s. Abschnitt 4.1.2) können unterschiedliche Informationen gewonnen werden. Das Streulicht (Ex850/SL) entsteht durch Streuung des Lichts an suspendierten Zellen im Medium. Erwartungsgemäß steigt das gemessene Streulicht proportional zur Zelldichte und liefert im Vergleich zu den offline bestimmten Daten der optischen Dichte und Biomasse einen ähnlichen Datenverlauf. Die Messung der Proteinfluoreszenz (Ex280/Em340) sowie der Fluoreszenz von Coenzymen wie NADH (Ex365/Em448) oder Flavinen (Ex450/Em525) liefert zusätzlich Informationen über den Stoffwechsel der Zellen. Da der in diesem Versuchsteil angewandte Bioprozess jedoch weder auf eine erhöhte Proteinproduktion, Diauxie oder ähnliches zielt, werden keine relevanten Stoffwechseländerungen und somit auch keine auffälligen Sprünge in den Messsignalen erwartet.

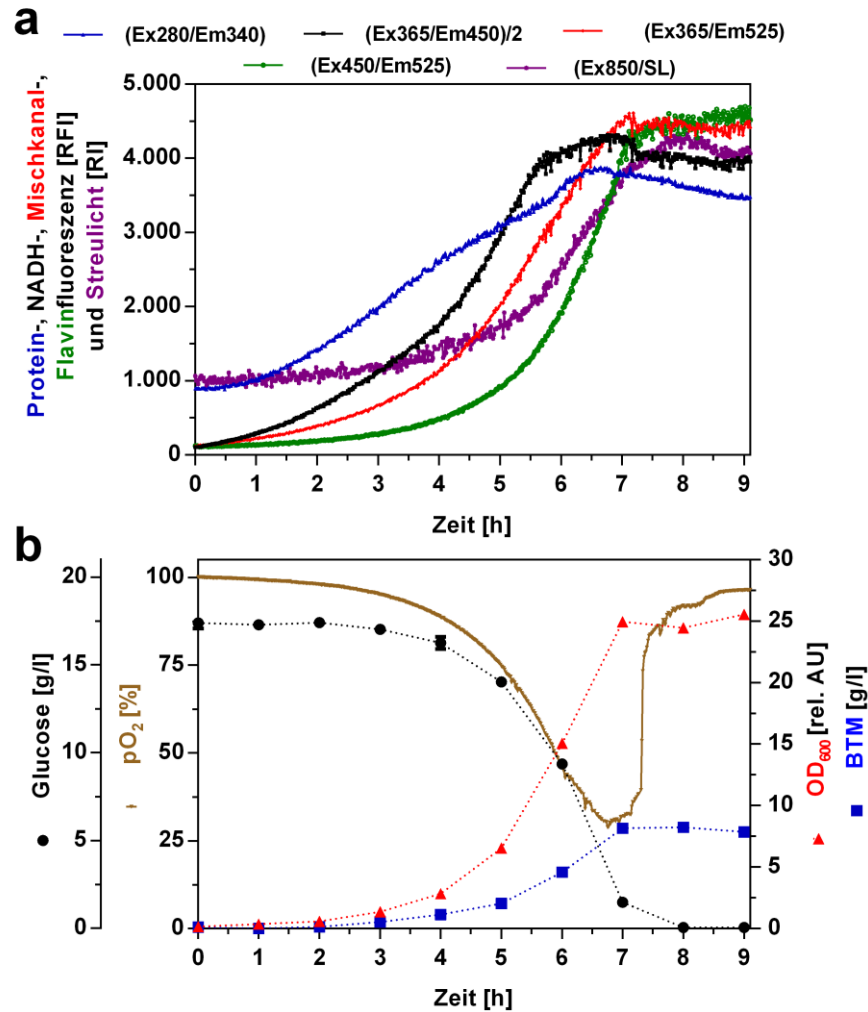


Abbildung 5.1: *E. coli* K1 Batch-Kultivierung in definiertem Medium im 10 l-Reaktormaßstab (pH-Wert=7,5; 1.000 rpm und 37 °C). (a) Fluoreszenzdaten, (b) Sauerstoff-Werte und offline-Werte (Glucosekonzentration, OD₆₀₀ und BTM).

Der Proteinkanal ist sehr sensitiv und deutet schon bei geringen optischen Dichten ein Wachstum der Zellen an. Während der exponentiellen Phase steigt hier das Fluoreszenzsignal im Gegensatz zum exponentiellen Wachstum der Zellmasse linear an. Nachdem die Zellen die Glucose verstoffwechselt haben, gehen die Zellen in die stationäre Phase über und die Proteinfluoreszenz beginnt leicht zu sinken. Da die Translation ein energieintensiver Prozess in der bakteriellen Zelle ist, wird wie erwartet bei einem vorhandenen Nährstoffdefizit die Proteinproduktion in der Zelle unterdrückt [64]. Der Flavinkanal und die anderen Fluoreszenzkanäle bilden im Gegensatz zum Proteinkanal in der exponentiellen Phase gut das Wachstum der *E. coli*-Zellen ab und können wie das Streulicht für eine Biomassevorhersage verwendet werden (s. Abschnitt 5.1.1.2).

Um die Fluoreszenzdaten mit einem etablierten Fluoreszenzspektrometer vergleichen zu können, wurden die offline-Proben der Kultivierung zusätzlich mit einem 2D-Fluoreszenzspektrometer, dem Hitachi F-7000 von der Firma Hitachi (Japan), vermessen. Hierzu wurden die Zellsuspensionen in einer 96-well-Mikrotiterplatte vermessen (s. Abschnitt 9.76). Anschließend wurden die Fluoreszenzdaten der beiden Messmethoden für eine bessere Vergleichbarkeit auf einen Maximalwert von eins normiert (s Abb. 5.2).

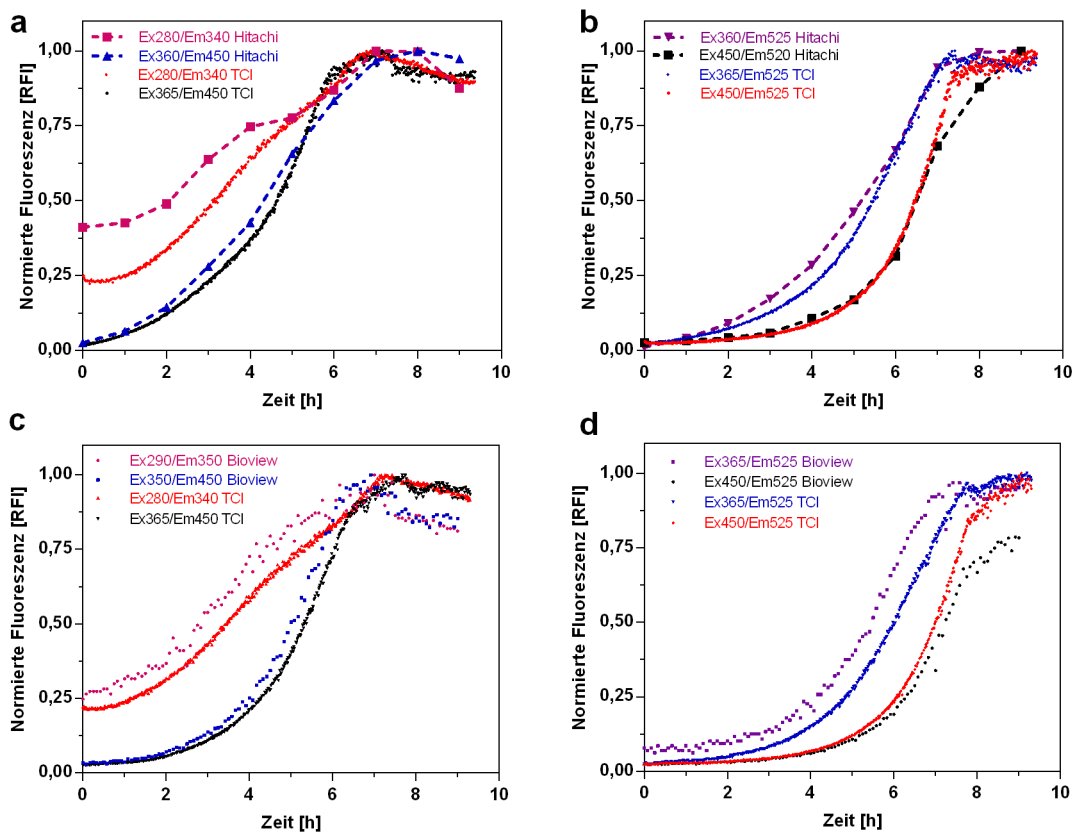


Abbildung 5.2: Vergleich der normierten Fluoreszenzdaten von verschiedenen Fluoreszenzgeräten. (a und b) online-Prozessüberwachung einer *E. coli* K1-Batchkultivierung mit dem neuen Sensor und Messung der offline-Proben mit dem Hitachi F-7000. (c und d) Vergleich zweier online-Fluoreszenzsensoren, dem Bioview® und dem neuen Sensor am Beispiel einer weiteren *E. coli* K1-Batchkultivierung.

Der Vergleich der Messdaten zeigt, dass die Messverläufe in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen sich grundsätzlich stark ähneln, was ein eindeutiger Beweis für die prinzipielle Funktionsweise des neuen Sensors ist. Gegen Ende der exponentiellen Phase werden allerdings auch Unterschiede im Fluoreszenzverlauf von NADH und Riboflavin bei den beiden Messgeräten sichtbar. Dies kann dadurch erklärt werden, dass gerade gegen Ende

der exponentiellen Phase der Sauerstoffverbrauch der Zellen sehr stark ist. Die offline-Proben werden jedoch nicht, wie die Zellkultur im Reaktor, kontinuierlich durch Rühren und Begasung mit frischem Sauerstoff versorgt, wodurch andere Redoxverhältnisse als im Reaktor entstehen können. Um solche Effekte auszuschließen, wurde eine weitere *E. coli* K1-Kultivierung durchgeführt und der Bioprozess sowohl mit dem neuen Sensor als auch mit dem Bioview[®] (s. Abschnitt 3.3) überwacht. Die Kultivierung wurde analog zur vorherigen durchgeführt und die resultierenden Fluoreszenzdaten wurden erneut normiert (s. Abb. 5.2). Der Vergleich der Messdaten zeigt erneut, dass die Funktionsweise des Sensors durch ähnliche Messverläufe gegeben ist. Auch gegen Ende der exponentiellen Phase stimmen hier die Messverläufe überein. Bei genauer Betrachtung ist jedoch bei den Bioview[®]-Daten ein größeres Messrauschen als beim neu entwickelten Sensor zu erkennen. Dieses bietet einen großen Vorteil für den neuen Sensor, da im Gegensatz zum Bioview[®], keine Mittelwert- oder Savitzky-Golay-Filter zur Reduktion des Rauschens und Glättung der Daten eingesetzt werden müssen. Außerdem müssen die Rohdaten des Bioview[®] in der Regel normiert werden, da sich die Größenordnungen der Fluoreszenzwerte der einzelnen Kanäle um einen Faktor von ca. 20 unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Beim Funktionsmodell liegt der Unterschied lediglich bei einem Faktor von ca. 1,6. Es bedarf daher keiner Normierung der Daten und sie können direkt für chemometrische Methoden verwendet werden.

5.1.1.1 Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit beschreibt die Fähigkeit, bei wiederholten Versuchsdurchläufen ähnliche Resultate zu erzielen und ist eine Voraussetzung für analytische Messmethoden. Um die Reproduzierbarkeit des Sensors zu überprüfen, wurden analog zur in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Kultivierung vier weitere Kultivierungen im 10 l- und eine Kultivierung im 30 l-Reaktormaßstab durchgeführt. Anhand der online-Daten wurden für jede Kultivierung multivariate Prozesstrajektorien berechnet. Dafür wurden die Fluoreszenzdaten der sechs Kultivierungen zunächst mit dem Programm Unscrambler X[®] (Camo, Norwegen) über eine Hauptkomponentenanalyse transformiert. Die PCA ist ein Werkzeug für die Datenreduktion und Datenanalyse (s. Abschnitt 3.4). Sie hilft Batch-zu-Batch-Variabilitäten zu detektieren und so von der Norm abweichende Kultivierungen zu identifizieren. Der Ergebnisgraph in Abbildung 5.3a zeigt, dass die erste Hauptkomponente (Principal Component, PC) 94 % und

die zweite PC 2 % der totalen Varianz der Rohdaten darstellt. Alle sechs Kultivierungen weisen ähnliche Prozesstrajektorien auf, auch wenn ein Upscale von 7,5 auf 30 l Kulturmedium stattgefunden hat (Kultivierung 6).

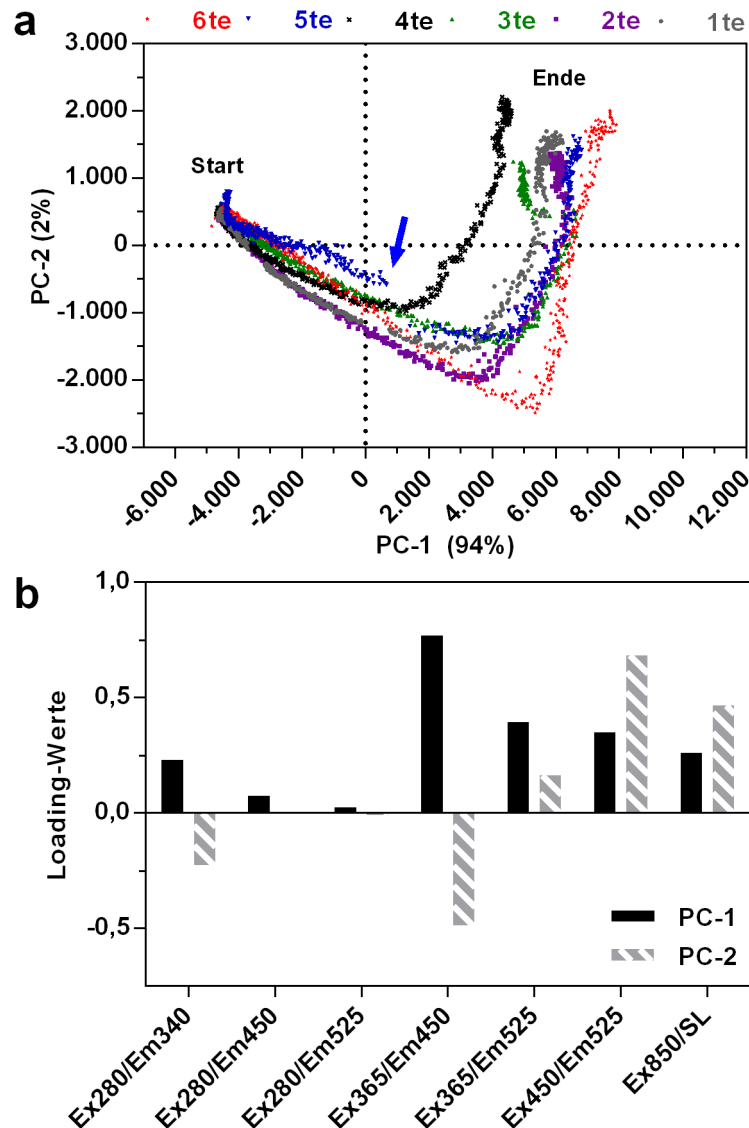


Abbildung 5.3: PCA der Fluoreszenzdaten von sechs *E. coli* K1-Kultivierungen (a). Der Pfeil markiert die nachträgliche Zugabe von Antischaummittel zu Kultivierung 5. Loading-Werte der PCA (b).

Die Kultivierung vier und fünf weisen jedoch Unterschiede in der Inter-Batch-Variabilität auf. Aufgrund eines erhöhten Zellwachstums erreichte die vierte Kultivierung den Wendepunkt früher als die anderen Kultivierungen. Bei der fünften Kultivierung wurde kein

Antischaummittel zu Beginn der Kultivierung zugefügt, was zu Abweichungen im Prozess führte. Dies kann anhand der Loading-Werte von PC-1 und PC-2 (s. Abb.5.3b) erklärt werden, da insbesondere das Streulicht einen großen positiven Effekt auf beide PCs ausübt. Der Vergleich des Streulichtkanals zeigt, dass ohne Antischaummittel das Streulicht durch verstärkte Schaumbildung deutlich schneller steigt und so zu der Abweichung in Prozess von Kultivierung 5 führt (s. Anhang 10.2). Nachdem nachträglich Antischaummittel zur Kultivierung beigefügt wurde, verhält sich der Prozess wieder ähnlich zu den anderen Kultivierungen (s. Pfeil). Der Sensor kann somit für Erstellung eines Golden-Batch verwendet werden. Dabei wird eine Kultivierung mit besonders hoher Produktausbeute und optimaler Prozessführung als Referenz für künftige Kultivierungen verwendet. Ausreißer können dadurch schnell identifiziert und gegebenenfalls in Echtzeit behandelt werden, wie z. B. die Zugabe von Antischaummittel. Da die Fluoreszenz jedoch sehr sensitiv gegenüber vielen Prozessgrößen, wie pH-Wert oder Rührergeschwindigkeit ist, muss bei jeder gewollten Veränderung des Prozesses ein neuer Datensatz an Kultivierungen erstellt werden, um einen Golden-Batch erstellen zu können.

Da mit dem Sensor zwischen den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Prozessen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten, wurde somit auch nachgewiesen, dass der Sensor wiederholbare Messergebnisse liefert.

5.1.1.2 Online-Biomassevorhersage einer *Escherichia coli* K1-Kultivierung

Ein wesentlicher Vorteil der online-Bioprozessüberwachung ist die Echtzeit-Überwachung von metabolischen Veränderungen, aber auch Substrat- oder Produktkonzentrationen. Eine wichtige Prozessgröße stellt die Biomasse einer Kultivierung dar. Um zu überprüfen, ob der Sensor für eine Biomassevorhersage geeignet ist, wurde zusätzlich durch stündliche Probenahme bei zuvor beschriebenen Kultivierungen (s. Abschnitt 5.1.1) die Biomasse gravimetrisch bestimmt. Diese Daten wurden anschließend in Kombination mit den Fluoreszenzdaten chemometrisch ausgewertet und für die Erstellung eines Biomassevorhersagemodells verwendet (s. Abb. 5.4). Das PLS-Modell basiert auf fünf der sechs durchgeführten Bioprozesse (ohne Kultivierung 2, s. Abb. 5.3), wobei eine vollständige Kreuzvalidierungsmethode angewandt wurde.

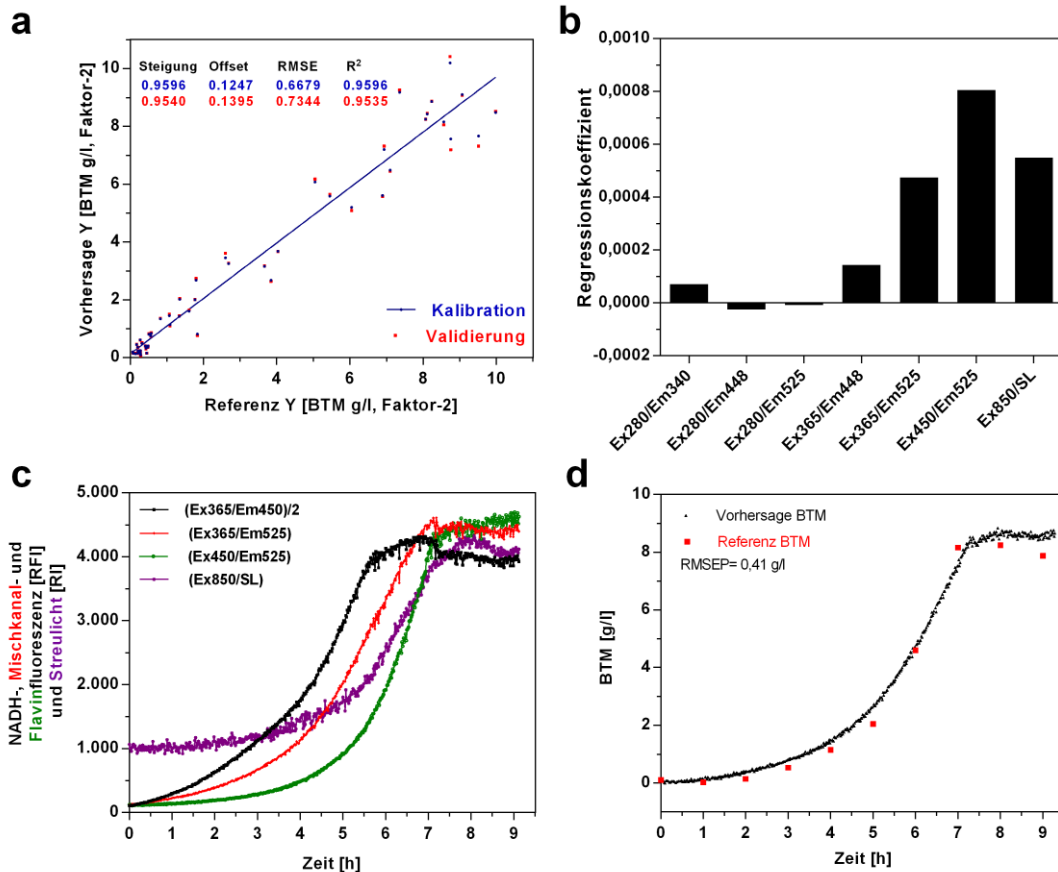


Abbildung 5.4: Biomassevorhersage einer *E. coli* K1-Kultivierung mit dem Fluoreszenzsensor. (a) PLS-Regressionsmodell der Biomasse; (b) Regressionskoeffizienten des PLS-Modells; (c) Fluoreszenzdaten der unabhängigen Kultivierung und (d) Biomassevorhersage im Vergleich zu gemessenen offline-Daten.

Das PLS-Modell basiert auf zwei principal components und weist ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,95$ sowie eine Steigung des Regressionsgraphen von 0,95 auf. Die Regressionskoeffizienten (s. Abb. 5.4b) der verschiedenen Messkanäle zeigen, dass das Modell hauptsächlich auf Flavinfloreszenz (Ex365/Em525 und Ex450/Em525) und Streulicht (SL) basiert. Der Einfluss von Proteinfluoreszenz (Ex280/Em340) und NADH-Fluoreszenz (Ex365/Em450) ist hingegen weniger wichtig für die Biomassevorhersage von *E. coli*-Kultivierungen. In der Literatur wird der NADH-Fluoreszenz eine gute Korrelation zur Zellmasse zugesprochen [3, 53]. Allerdings wird auch diskutiert, ob andere Fluorophore, wie z. B. Riboflavin, gegenüber verschiedenen stressauslösenden Faktoren weniger anfällig sind als NADH und sich so besser für die Biomassevorhersage eignen [53]. Die NADH-Fluoreszenz eignet sich daher eher für die Detektion von metabolischen Veränderungen [40]. In der vorliegenden Arbeit verläuft das NADH-Signal in den durchgeführten Versuchen in der frühen lag-Phase ähnlich wie das Zellwachstum. In der mittleren bis späten

exponentiellen Phase wächst das NADH- Signal jedoch verstärkt linear an. Das Streulicht und die FAD/FMN-Fluoreszenz weisen hingegen, wie das Zellwachstum, während des exponentiellen Wachstums einen exponentiellen Verlauf auf und erreichen nach sieben Stunden die stationäre Phase.

Basierend auf dem Biomasse-PLS-Modell wurde anschließend die unabhängige Kultivierung für die Biomassevorhersage verwendet (s. Abb. 5.4d). Der RMSEP der Vorhersage beträgt dabei 4,6 % des Kalibrationsbereichs und ist damit ähnlich zu dem RMSEP (5 %) einer *E. coli*-Kultivierung, die mit dem Bioview überwacht wurde [45]. Der niedrige RMSEP zeigt, dass der Sensor gut für die online-Messung der Biomasse in Batch-Kultivierungen geeignet ist. In weiteren Versuchen muss jedoch getestet werden, wo das Limit bei z. B. Fed-Batch Kultivierungen liegt. Außerdem muss evaluiert werden, ob weitere Prozessgrößen, wie z. B. die Proteinproduktion, mit dem Sensor überwacht werden können.

5.1.2. Kultivierung eines *Escherichia coli* BL21-Stamms im Fed-Batch-Betrieb

Um die Wirtschaftlichkeit und die Produktausbeute von Kultivierungen zu erhöhen, werden möglichst hohe Zelldichten angestrebt. Der Fed-Batch-Prozess hat sich als effektive Methode zur Hochzelldichtekultivierung erwiesen. Die Zellen werden hierbei zunächst in einem Batch-Prozess kultiviert, in dem zu Beginn der Anzucht alle nötigen Nährstoffe in hoher Konzentration im Kulturmedium vorgelegt werden. Sind die Nährstoffe verbraucht, erfolgt anschließend eine Zufütterung, z. B. mit einer Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und gegebenenfalls Spurenelementen. Das Verfahren hat den Vorteil, dass das Wachstum der Biomasse durch einen limitierenden Nährstoff im Prozess kontrolliert und die Akkumulation von inhibierenden Metaboliten durch ein zu hohes Nährstoffangebot, wie z. B. Acetat bei *E. coli*-Zellen, verhindert werden kann. Die Dosierung der Nährstoffe erfolgt auf Basis von selektiven online- oder inline-Signalen, wie dem pH-Wert oder dem Verbrauchswert von Sauerstoff, oder mathematischen Modellen, die ein exponentielles Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate voraussetzen. Letzteres kann jedoch auch zu einer Akkumulation der C-Quelle führen.

Der in der Arbeit entwickelte Fluoreszenzsensor wurde für den Einsatz im Fed-Batch-Prozess an einem *E. coli* BL21-Stamm evaluiert. Da Fluoreszenzmessungen durch einfallendes Umgebungslicht gestört werden können, werden online-Fluoreszenzsensoren

entweder in Bioprozessen in Reaktoren mit Edelstahlgehäuse eingetaucht oder über eine äußere Bypass-Schleife mit dem Bioprozess gekoppelt. Im Rahmen der Fed-Batch-Kultivierungen wurde deswegen auch der Einsatz des entwickelten Fluoreszenzsensors in einem Glasreaktor überprüft. Für den Einsatz im Glasreaktor wurde der eigens designte und in Abschnitt 4.2 vorgestellte Adapter verwendet, um die Sonde senkrecht durch den Deckel des Reaktors einbauen zu können.

Es wurden *E. coli* BL21-Kultivierungen im 2 l-Edelstahlreaktor und im 2 l-Glasreaktor durchgeführt (s. Abschnitt 9.4.2), wobei bei beiden Prozessen der prozessanalytische Fokus auf die Feed-Phase gelegt wurde. Nach Beendigung des Batch-Prozesses wurden mit Beginn des Feed-Prozesses stündlich Kulturproben entnommen und offline die Glucose- und Acetatkonzentration sowie die Biomasse untersucht. Als Fütterungsstrategie wurde ein exponentielles Modell verwendet, wobei eine feste spezifische Wachstumsrate (μ_{set}) von 0,3 1/h festgelegt wurde. Die Steuerung des Glucosefeeds erfolgte über das am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelte und intern genutzte Programm Online Runge Kutta-Feeder (ORK) (s. Abschnitt 9.4.2). Die Begasung im Prozess erfolgte mit einem Sauerstoff-Druckluft-Gemisch mit einem Volumenstrom von einem Volumen Luft pro Volumen Medium pro Minute (vvm). Um den gelösten Sauerstoffgehalt pO_2 im Reaktor auf einem Wert von 30 % aufrechtzuerhalten, wurde während der Feed-Phase schrittweise reiner Sauerstoff der Druckluft zugemischt. Die Gaszufuhr im Edelstahlreaktor erfolgte manuell, wohingegen die Begasung im Glasreaktor automatisch über die Biostat B-Einheit geregelt wird. Die Kultivierungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem konstanten pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Als Base wurde eine Ammoniumhydroxid-Lösung eingesetzt, die zusätzlich als Stickstoffquelle diente.

In Abbildung 5.5 sind die Fluoreszenz-, Reaktor- und offline-Daten der beiden Kultivierungen dargestellt. Die Sauerstoffregelung bei der Stahlreaktorkultivierung weist im Gegensatz zur Glasreaktorkultivierung sehr große Schwankungen auf, was mit der manuellen Regelung der Gaszufuhr in diesem Reaktortyp verbunden ist. Bei Betrachtung des Biomasseverlaufs wird deutlich, dass bei beiden Kultivierungen in den ersten 10 h des Feeds ein exponentielles Wachstum stattgefunden hat. Die spezifische Wachstumsrate wurde bestimmt, indem die BTM-Werte für eine nicht lineare Regression (s. Gleichung 4) verwendet wurden.

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{\left(\frac{\mu_{\text{spez}}}{t_1}\right)} \quad \text{Gleichung 4}$$

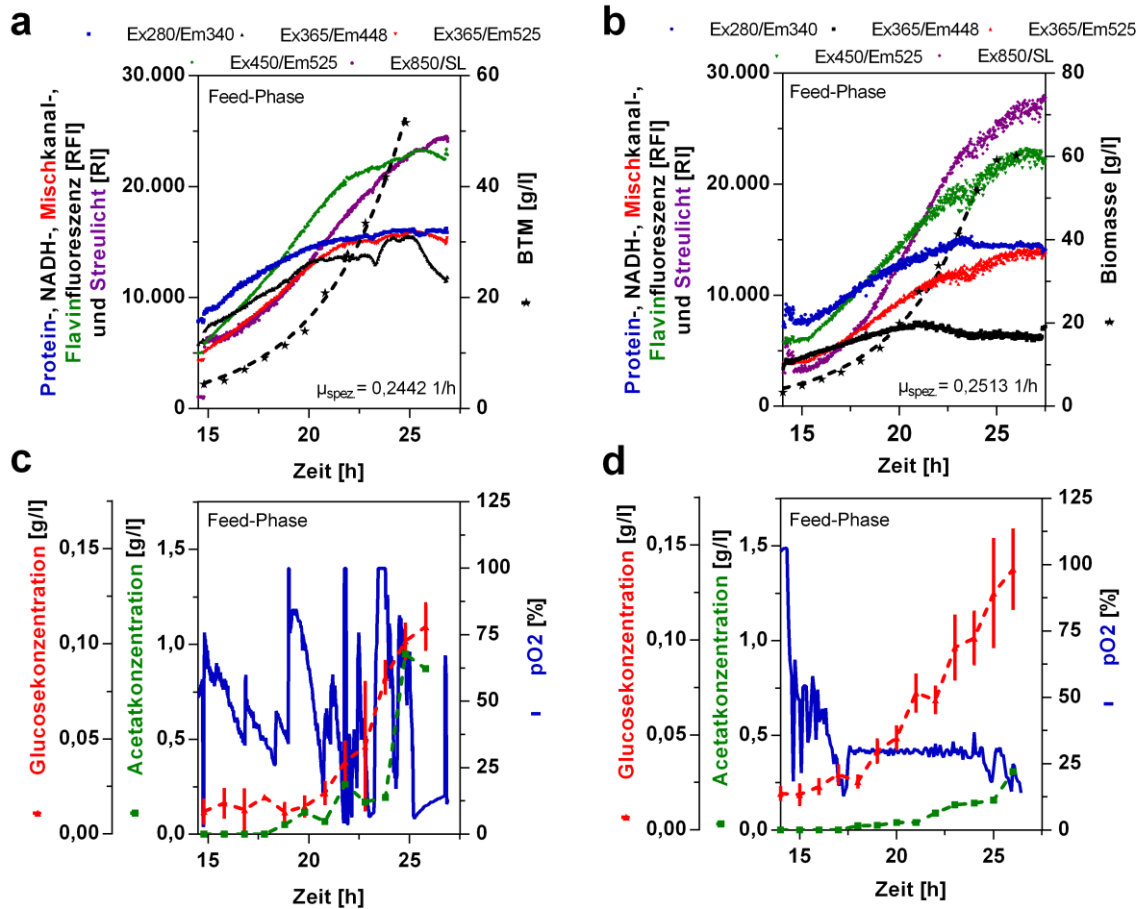


Abbildung 5.5: Fed-Batch-Kultivierungen von *E. coli* BL21 (nur Feed-Phase). (a und c) Fluoreszenz- und offline-Daten einer Kultivierung im 2 l-Edelstahlreaktor; (b und d) Fluoreszenz- und offline-Daten einer Kultivierung im Glasreaktor. Die gestrichelte Linie in a und b stellt eine nicht-lineare Regression (s. Gleichung 4) für die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate dar.

Die spezifischen Wachstumsraten der Kultivierungen betragen $\mu_{\text{spez.}} = 0,244$ 1/h im Edelstahlreaktor und $\mu_{\text{spez.}} = 0,251$ 1/h im Glasreaktor ähneln einander damit. Sie sind jedoch niedriger als die erwartete Wachstumsrate von $\mu_{\text{set.}} = 0,3$ 1/h. Hierfür gibt es mehrere Ursachen. Für die Erstellung des exponentiellen Wachstumsmodells werden neben der Wachstumsrate verschiedene Parameter, wie z. B. der Ausbeutekoeffizient, benötigt. Diese Parameter variieren abhängig vom *E. coli*-Stamm und müssen in Kultivierungsversuchen bestimmt werden. Es wurde jedoch auf die genaue Bestimmung der Parameter verzichtet und Näherungswerte verwendet. Ein weiterer Parameter ist die Glucosekonzentration im Feed-Medium. Messungengenauigkeiten bei der Messung der Glucosekonzentration wirken sich ebenfalls auf das Modell aus. Um die Schwankungen innerhalb der zwei Kultivierungen zu reduzieren, wurden deshalb die gleichen Parameter inklusive der gleichen Feed-Lösung

für beide Kultivierungen verwendet, woraus die ähnliche aber scheinbar etwas zu niedrige spezifische Wachstumsrate resultierte.

Die Fluoreszenzsignale nehmen während der Feed-Phase wie erwartet in beiden Kultivierungen zu, wobei die Zunahme bei der NADH- und Flavinfluoreszenz in den ersten zehn Stunden eher einen linearen Anstieg aufweist. Der Proteinkanal scheint sogar in eine Art Sättigungskurve zu laufen. Nur beim Streulichtkanal ist ein annähernd exponentieller Verlauf zu erkennen. Der Vergleich der Fluoreszenzdaten zeigt jedoch auch, dass die Signalwerte im Glasreaktor deutlich mehr als im Edelstahlreaktor rauschen. Dies hat vermutlich mit der veränderten Messanordnung (s. Anhang 10.4) zu tun. Der senkrecht eingebaute Adapter führt dazu, dass sich mehr Gasbläschen unter dem Sensor verfangen und so die Messung beeinflussen. Ein mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführter Versuch (s. Anhang 10.4) zeigte ebenfalls, dass im Glasreaktor die Messdaten ein höheres Rauschen aufweisen. Eine weitere Ursache für das Rauschen könnte die Lichtdurchlässigkeit des Reaktors sein. Allerdings wird dieser Effekt minimiert, indem das einfallende Außenlicht durch die Lock-In-Methode herausgerechnet wird. Vergleicht man das Messrauschen mit einer mit dem Bioview[®] überwachten Kultivierung (s. Abschnitt 5.1.1) wird deutlich, dass sich die Messdaten trotzdem gut für die Überwachung eignen. Außerdem kann, wie auch beim Bioview[®] üblich, das Messrauschen durch einen fließenden Mittelwertfilter reduziert werden. Eine Überwachung der Kultivierung mit dem Sensor ist demnach auch direkt im Glasreaktor möglich.

Zu Beginn der Feed-Phase wird die Glucose in beiden Kultivierungen fast vollständig verbraucht. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer leichten Akkumulation der Glucose (s. Abb. 5.5 c und d). Die spezifische Wachstumsrate ist, im Gegensatz zur Annahme im Modell, keine konstante Größe und variiert in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie z. B. Stoffwechselprozessen, wodurch sich die leichte Akkumulation erklären lässt. Nach ca. 22,5 h kommt es im Edelstahlreaktor zu einem sprunghaften Anstieg der NADH-Fluoreszenz. Dies liegt daran, dass aufgrund der hohen Zelldichte und der manuellen Regelung der Gaszufuhr anaerobe Bedingungen im Reaktor verursacht wurden, infolge derer es zu einem hohen Anstieg der Acetatkonzentration kommt (s. Abb. 5.5c). Bei der automatisch geregelten Sauerstoffversorgung im Glasreaktor ist hingegen kein NADH-Ausschlag zu erkennen. Auch die Acetatkonzentration ist deutlich geringer und steigt erst gegen Ende verstärkt an. Ab einer BTM-Konzentration von ca. 50 g/l war der Sauerstoffverbrauch in beiden Kultivierungen so stark, dass keine ausreichende Versorgung

mehr sichergestellt werden konnte. Um die Ausbeute dennoch weiter zu erhöhen, wurde deshalb durch schrittweise Reduktion der Pumprate die Zufütterungsrate erniedrigt. Die Biomassezunahme entspricht daher nicht mehr dem exponentiellen Modell. Bei einer Biomasse von 60 g/l wurden die Kultivierungen anschließend beendet.

Um analog zur Batch-Kultivierung ein Biomassevorhersagemodell mit den Sensordaten erstellen zu können, wurden zusätzlich zwei Kultivierungen durchgeführt und ein Modell mit Hilfe der Software Unscrambler X (Camo, Norwegen) erstellt (Daten nicht gezeigt). Es ist möglich, mit dem Sensor den Kultivierungsverlauf bis zu einer Zelldichte von 50 g/l abzudecken. Um die Güte und die Robustheit des Vorhersagemodells zu verbessern, sollten allerdings mehr Daten zur Verfügung gestellt werden. Es müssen somit weitere Kultivierungen durchgeführt werden. Außerdem muss die Sauerstoffzufuhr verbessert oder die Feed-Strategie bei hohen Zelldichten verändert werden, um noch höhere Zelldichten zu ermöglichen.

5.1.3. Überwachung der Produktion eines rekombinanten Proteins mit Fluoreszenz-Tag

Die Produktion von rekombinanten Proteinen stellt einen wichtigen Prozess für den Einsatz der Bioprozessüberwachung dar. Es gilt dabei möglichst hohe Ausbeuten an löslichem, aktivem Zielprotein für die Forschung oder pharmazeutische Industrie zu erzielen. Der in dieser Arbeit entwickelte Fluoreszenzsensor besitzt die technischen Eigenschaften Proteinfluoreszenz effektiv zu detektieren. Da jedoch eine große Menge an endogenen Hostcell-Proteinen in der Zelle vorhanden sind und *E. coli*-Zellen nicht das Zielprotein ins Medium sekretieren, ist es mit Schwierigkeiten verbunden ein rekombinant produziertes Protein selektiv zu detektieren. Eine hilfreiche Alternative stellt die Markierung des Zielproteins mit einem Fluorophor dar. Ein mögliches Fluorophor ist das GFP, welches erstmals von Shimomura et al. (1962) beschrieben wurde [65]. Es zeichnet sich durch seine hohe Stabilität aus. Das GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima mit einem Hauptabsorptionsmaximum bei 395 nm sowie einem Nebenabsorptionsmaximum bei 475 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm [66].

Für die durchgeführten Versuche wurde ein *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm mit einem Plasmid für das Fusionsprotein GFP-Glutathion-S-Transferase (GST) kultiviert. Es wurden drei Kultivierungen in definiertem Medium in einem 10 l Reaktor der Firma B. Braun Biotech

(Deutschland) durchgeführt (s. Abschnitt 9.4.3). In zwei der Kultivierungen wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer optischen Dichte von 2 bzw. 4 rel. AU induziert. Die dritte Kultivierung wurde nicht induziert und diente als Negativkontrolle. In Abbildung 5.6 ist der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten der biogenen Fluorophore dargestellt.

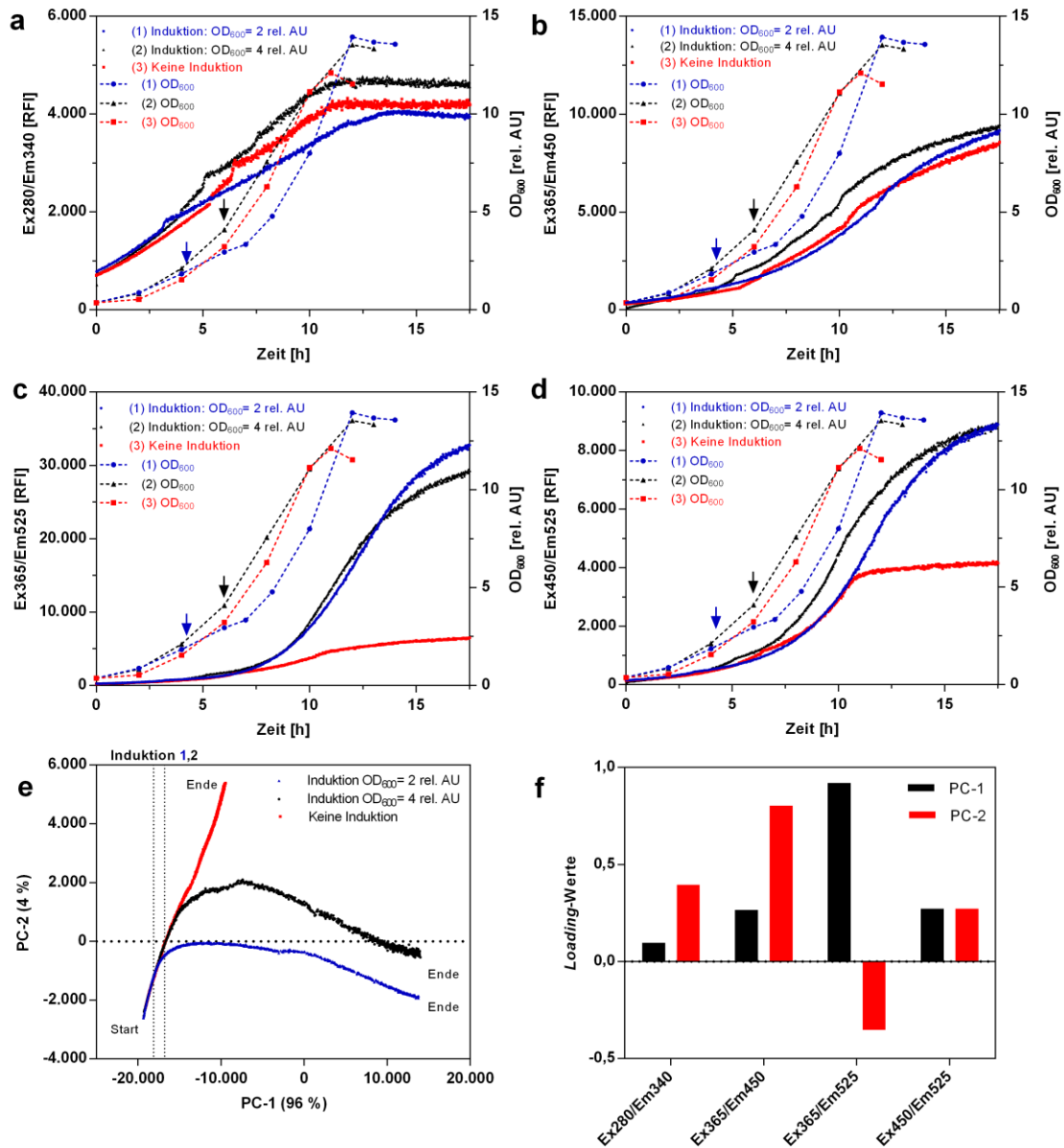


Abbildung 5.6: Überwachung der Proteinproduktion von GFP in *E. coli* BL21 bei unterschiedlichen Induktionszeitpunkten (Keine Induktion, OD₆₀₀= 2 rel. AU (blauer Pfeil) und 4 rel. AU (schwarzer Pfeil)). a: Ex280/Em340, b: Ex365/Em450, c: Ex365/Em525, d: Ex450/Em525, e: PCA der drei Kultivierungen und f: Loading-Werte der Fluoreszenzdaten.

Die Protein- und NADH Fluoreszenz der drei Kultivierungen weisen ähnliche Verläufe auf. Die zu Beginn detektierten Sprünge in der Fluoreszenz sind durch Änderungen der Kultivierungsparameter bedingt. Hierbei wurde, um die lösliche Menge an GFP-GST zu erhöhen, die Kultivierungstemperatur eine Stunde vor der Induktion von 30 auf 25 °C abgesenkt. Der Proteinkanal der Negativkontrolle weist keine wesentlichen Unterschiede zu den induzierten Kultivierungen auf. Das Fluoreszenzsignal der Hostcell-Proteine überlagert somit das Signal der heterolog produzierten Proteine. Dass eine Expression des Proteins stattgefunden hat, wird jedoch bei der Betrachtung der Kanäle Ex365/Em525 und Ex450/Em525 sichtbar. Nach der Induktion der Kultivierungen (s. Pfeile in Abb. 5.6 a-d) steigt die Fluoreszenz insbesondere bei Kanal Ex365/Em525 exponentiell an, wohingegen die nicht induzierte Kultivierung bedingt durch überlappende Fluoreszenzbereiche von NADH und Flavin eine normale Wachstumskurve aufweist. Auffällig ist, dass im Gegensatz zur Negativkontrolle nach Erreichen der stationären Phase die Fluoreszenz der beiden Kanäle in den induzierten Kultivierungen weiter ansteigt. Die Proteinkanäle und der NADH-Kanal gehen jedoch in eine Sättigung über. Nativ gefaltetes GFP weist eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität gegenüber der aggregierten Form auf [67]. Bei dem ansteigenden Fluoreszenzsignal nach Erreichen der stationären Phase kann es sich um nachträgliche Rückfaltungsprozesse von unlöslichem GFP handeln.

Die Proteinproduktion wurde auch mithilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen. Dafür wurde exemplarisch die Kultivierung herangezogen, die nach 6 h bei einer optischen Dichte von 4 rel. AU induziert wurde. Zu definierten Zeitintervallen wurden normierte Proben (s. Abschnitt 9.4.2) aus der Kultivierung entnommen und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Sowohl die löslichen als auch unlöslichen Zellfraktionen wurden auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Trennung mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (s. Abb. 5.7).

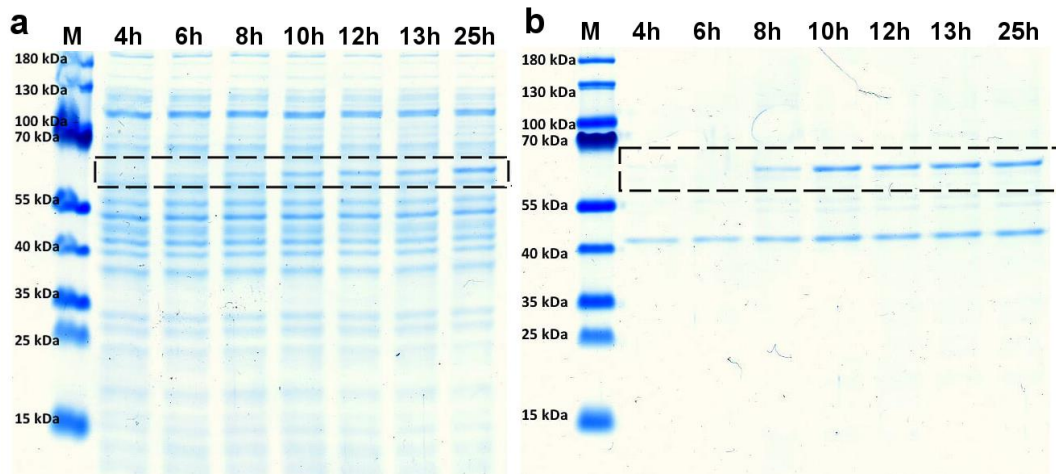


Abbildung 5.7: SDS-PAGE mit den Proben der *E. coli* BL21 (DE3) Kultivierung zur heterologen Proteinproduktion von GFP-GST. Es wurde nach 6 h bei einem OD_{600} von 4 rel. AU induziert. Die Proben wurden auf $OD_{600} = 2$ rel. AU normiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. (a) Lösliche Fraktion, (b) unlösliche Fraktion und M: Proteinmarker (#26616).

Auf den Proteingelen der löslichen und unlöslichen Fraktionen ist erstmals zwei Stunden nach der Induktion der Expression ein Protein mit einer Masse von ca. 60 kDa zu erkennen. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins GFP-GST beträgt 54 kDa und ist damit kleiner als die sichtbare Proteinbande im Gel [68]. Trotz der abweichenden Größe kann jedoch durch das induktionsbedingte Auftreten und die gemessene GFP-Fluoreszenz davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das Zielprotein handelt. Eine nicht vollständige Denaturierung des Proteins kann die Laufweite des Proteins im Gel verändern und könnte die Ursache für die Abweichung sein. Bei der Betrachtung der Gelbande nach 25 h fällt auf, dass die Bandenintensität des löslichen GFP-GST trotz stationärer Phase (Beginn nach 12 h) angestiegen ist. Diese Beobachtung deckt sich mit den ermittelten Daten aus den Sensormessungen, wo ebenfalls ein steigendes Fluoreszenzsignal in der stationären Phase beobachtet werden konnte und stützt die Theorie der nachträglichen Rückfaltung zu löslichem Protein.

Um die Unterschiede der Kultivierungen weitergehend zu analysieren wurde eine PCA durchgeführt (s. Abb. 5.6e). Die PCA zeigt, dass ein deutlicher Unterschied zwischen den Prozessstrajektorien der Negativkontrolle und der induzierten Kultivierungen vorliegt. Es ist auch zu erkennen, dass die früher induzierte Kultivierung einen deutlich früheren Wendepunkt aufweist. Es ist somit möglich, die Produktion von GFP-gekoppelten Proteinen selektiv mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor zu überwachen. Somit kann auch durch Erstellen von Modellen die Ausbeute an Zielprotein direkt bestimmt werden. Auch

Expressionsstudien, indem z. B. der Induktionszeitpunkt variiert wird, können durchgeführt werden.

5.2. Online-Bioprozessüberwachung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen besitzen in der pharmazeutischen Industrie einen hohen Stellenwert als Produktionsstämme. Allein mit dem Antikörper Humira[®] (Adalimumab), welcher in Zellen aus Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (Chinese Hamster Ovary, CHO) produziert wird, wurde 2013 ein Umsatz von 11 Milliarden US-Dollar erzielt [69]. Ein großer Vorteil von eukaryotischen Zellen gegenüber prokaryotischen Zellen ist, dass sie die komplexen posttranslationalen Modifikationsprozesse, wie sie auch in höheren Organismen vorkommen, durchführen können. So sind sie in der Lage heterolog gebildete Proteine zu glykosylieren und sie aus der Zelle zu sekretieren. Eukaryotische Kulturen sind allerdings sehr kostspielig und zeitintensiv. Eine gute online-Bioprozessüberwachung ist daher wichtig und wird zunehmend von der Food and Drug Administration (FDA) für eine gute Qualitätssicherung gefordert. Im Folgenden soll daher die Eignung des Sensors für den Einsatz in der Bioprozessüberwachung von eukaryotischen Zellen evaluiert werden.

5.2.1. Metabolische Studien mit *Saccharomyces cerevisiae*

Anhand von verschiedenen Experimenten mit einfachen eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* soll getestet werden, ob sich der Sensor zur Detektion von Stoffwechselveränderungen eignet. Zunächst wurde handelsübliche Bäckerhefe in einem 2 l Reaktor in modifizierten Schatzmann-Medium (s. Abschnitt 9.6.1) suspendiert und durch abwechselnde Stickstoff- und Druckluftbegasung ein anaerobes bzw. aerobes Milieu geschaffen (s. Abb. 5.8). Mit Einsetzen der Stickstoffbegasung tritt eine deutliche Veränderung der Signalintensitäten in den Fluoreszenzkanälen auf. Die NADH-Fluoreszenz steigt unter anaeroben Bedingungen stark an, wohingegen die Flavin-Fluoreszenz abnimmt. Sauerstoff wird als terminaler Elektronenakzeptor im Elektronenfluss der Atmungskette benötigt und sorgt für die Regeneration von NAD⁺ und FAD. Ohne Sauerstoff kommt die Atmungskette zum Erliegen, was zu einer Akkumulation von NADH und reduzierten Flavinen führt (s. Abschnitt 3.2). Die Fluoreszenzsignale beider Fluorophore sind dabei

maßgeblich vom Redoxzustand abhängig (s. Abschnitt 3.1). Die mit dem Sensor ermittelten Messdaten decken sich damit mit den erwarteten Stoffwechselveränderungen in der Zelle. Das Fluoreszenzsignal im Proteinkanal fällt unter anaeroben Bedingungen ebenfalls ab und steigt nach Begasung mit Sauerstoff erneut an. Eine Hoch- und Runterregulierung der Proteinproduktion bzw. des -abbaus dauert jedoch deutlich länger als der Mechanismus, der zum Erliegen der Atmungskette führt. Es ist daher wahrscheinlicher, dass durch die erhöhte Konzentration an NADH die Proteinfluoreszenz verstärkt gequenchet wird, wie es auch schon bei vorangegangenen Versuchen beobachtet wurde (s. Abschnitt 4.1.2). Das Streulicht wird hingegen nicht durch die veränderte Begasung beeinflusst. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die detektierten Stoffwechselveränderungen durch externe Faktoren, wie z. B. Gasblasen, verursacht wurden.

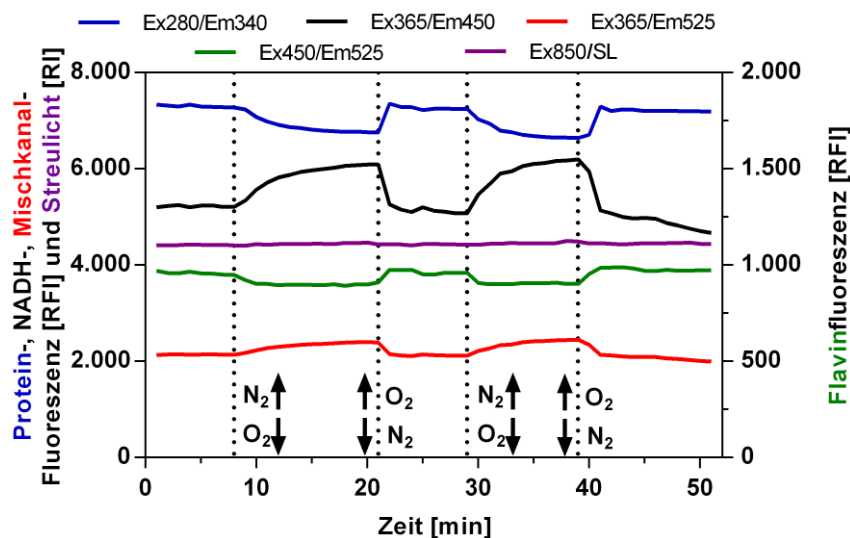


Abbildung 5.8 Induzierte Stoffwechseländerung von *S. cerevisiae* durch Veränderung der Begasung. N₂ (Pfeil hoch): Stickstoffbegasung und N₂ (Pfeil runter): Druckluftbegasung des Reaktorraums.

5.2.1.1 Durchführung einer diauxischen Kultivierung

Unter aerober Prozessführung kommt es während einer Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* aufgrund des Crabtree-Effekts in den Zellen zu einer Bildung von Ethanol (s. Abschnitt 3.2.2). Bei hohen Glucosekonzentrationen kommt es somit zu einer Akkumulation von Ethanol im Medium, welches nachdem die Glucose von den Zellen aufgebraucht wurde, als zweite Energiequelle dient. Dies hat ein zweiphasiges Wachstum

zur Folge. Zur weiteren Evaluierung des Sensors wurde deshalb eine Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* in einem 30 l-Reaktor der Firma Sartorius AG (Deutschland) durchgeführt (s. Abb. 5.9). Zusätzlich zum Fluoreszenzsensor wurde eine Trübungssonde (BioPat Fundalux 25mm, Sartorius AG) zur Überwachung eingesetzt und es wurden stündlich offline-Proben für die Bestimmung der Konzentrationen von Glucose und Ethanol sowie der Trockenbiomasse aus dem Reaktor entnommen. In den offline-Daten ist zu erkennen, dass zu Beginn der Kultivierung die Biomasse exponentiell anwächst, bis die Glucose nach ca. 10,5 h aufgebraucht ist. Während dieses Zeitraums steigt erwartungsgemäß auch die Ethanolkonzentration an. Im Anschluss beginnen die Zellen den Alkohol zu verstoffwechseln und sie gehen in ein langsames lineares Wachstum über.

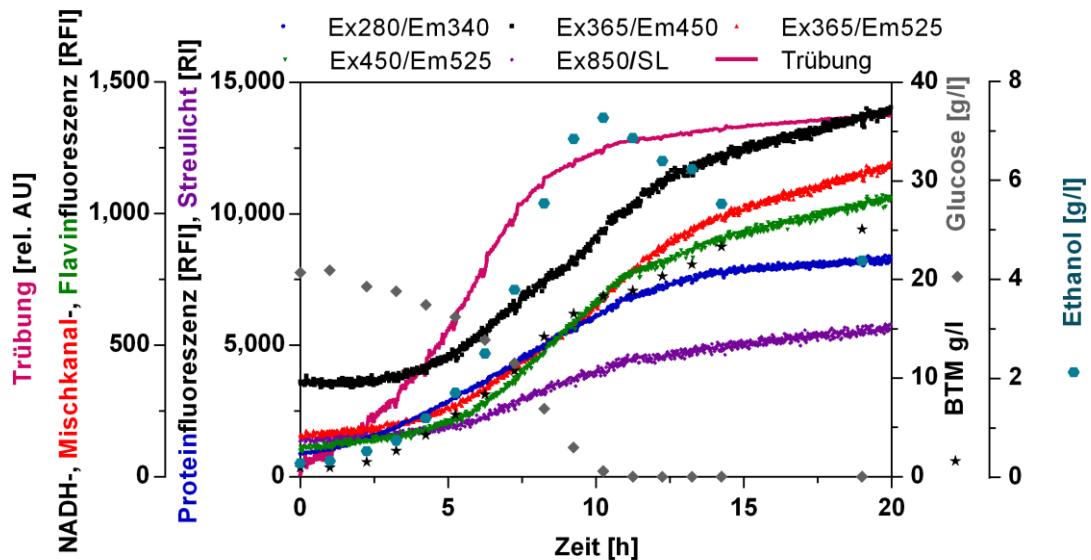


Abbildung 5.9: Fluoreszenz-, Trübungs- und Offline-Daten einer Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae*. Es wurde in einem 30 l-Bioreaktor der Firma Sartorius bei konstanter Rührgeschwindigkeit von 800 rpm und konstanter Temperatur von 30 °C kultiviert. Die Kultivierung fand in 7,5 l Schatzmann-Medium statt und der pH-Wert wurde auf einen Wert von pH 5,4 geregelt.

Das zweiphasige Wachstumverhalten spiegelt sich auch in den Fluoreszenzkanälen wider. Insbesondere am Flavinkanal lässt sich der Substratwechsel und der Wechsel zu linearem Wachstum gut verfolgen. Der genaue Zeitpunkt der Veränderungen des Wachstumsverhaltens müsste bedingt durch den Crabtree-Effekt an der NADH-Fluoreszenz zu erkennen sein. Sinkt die Glucosekonzentration unter eine kritische Grenze von 0,05 g/l kommt die Ethanolproduktion zum Erliegen und die NADH-Konzentration in der Zelle

sinkt [35]. Das Absinken des NADH-Signals ist jedoch bei niedrigen Biomassen sehr gering und geht so in der Wachstumskurve unter. Die Trübungssonde zeigt ebenfalls zu Beginn der Kultivierung ein exponentielles Wachstum. Im Gegensatz zum Fluoreszenzsensor knickt jedoch die Kurve schon nach acht Stunden ab. Sie gibt ebenfalls das weitere lineare Wachstum schlecht wider. Möglicherweise ist zu diesem Zeitpunkt die Sättigung der Trübungssonde erreicht. Die gemessenen offline-Daten zur Ethanolkonzentration zeigen allerdings, dass auch nach Abbruch der Kultivierung nach 20 h noch Ethanol als Kohlenstoffquelle im Medium vorlag. Der Übergang in die stationäre Phase wurde somit nicht aufgenommen. Es wird jedoch deutlich, dass der Fluoreszenzsensor den Kultivierungsverlauf gut nachbilden kann und Rückschlüsse auf den Zeitpunkt des Substratwechsels ermöglicht.

5.2.1.2 Detektion des Crabtree-Effekts bei Glucose-Feed

Um den Crabtree-Effekt (s. Abschnitt 3.2.2) zu detektieren, wurde anschließend zur vorangegangenen Batch-Kultivierung eine Fed-Batch-Kultivierung gestartet. Der Fed-Batch bietet den Vorteil, dass durch eine gesteuerte Substratzugabe die Akkumulation von Zellgiften, wie z. B. Ethanol, verhindert werden kann und so höhere Produktausbeuten erzielt werden können. Bei der Fed-Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* sollte daher der Glucose-Feed so eingestellt sein, dass die Glucosekonzentration im Medium unter 0,05 g/l gehalten wird. Dies hat einen rein oxidativen Abbau der Glucose zu Folge, wodurch höhere Wachstumsraten erzielt werden können [70]. Um einen solchen Feed durchführen zu können, ist daher eine unmittelbare Kontrolle der Glucosekonzentration (s. Abschnitt 9.6.1) notwendig. Alternativ kann aber auch durch die Detektion des Crabtree-Effekts eine Steuerung erfolgen. In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse einer Glucosefütterung dargestellt. Zu Beginn wurde eine konstante Pumprate von 0,4 ml/min eingestellt. Anhand der offline-Glucosedaten lässt sich nach 28,5 h ein Anstieg über die kritische Konzentration von 0,05 g/l erkennen. Dies spiegelt sich auch in einem sprunghaften Anstieg der NADH-Fluoreszenz und des Respirationskoeffizienten (RQ) wider.

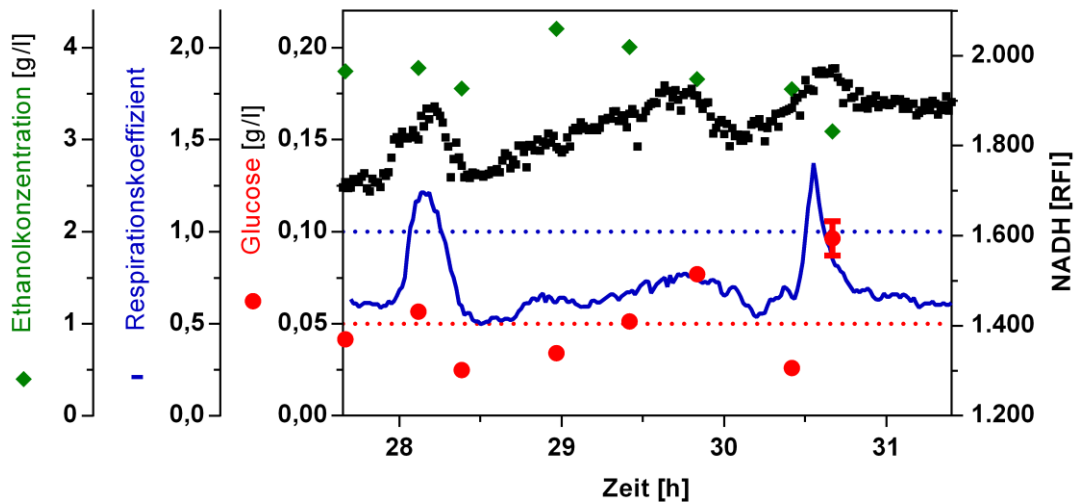


Abbildung 5.10: Detektion des Crabtree-Effekts durch Glucose-Feed bei *S. cerevisiae*. Der Schwellenwert für die oxidoreduktive Produktion von Ethanol ist für den Respirationskoeffizienten und für die Glucosekonzentration durch die jeweilige gepunktete Linie markiert.

Der RQ gibt das Verhältnis von entstandenem Kohlendioxid (Q_{CO_2}) und verbrauchtem Sauerstoff (Q_{O_2}) unter Berücksichtigung der jeweiligen molaren Masse an (s. Gleichung 5).

$$RQ = \frac{Q_{CO_2} \cdot M_{O_2}}{M_{CO_2} \cdot Q_{O_2}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Bei ausschließlich oxidativem Abbau der Glucose kann der RQ maximal einen Wert von eins einnehmen. Bei einem RQ größer eins deutet dies auf die Crabtree-Effekt-bedingte Ethanolproduktion hin. Die Zufütterung wurde gestoppt, woraufhin nach ca. 30 min die Glucosekonzentration unter die kritische Grenze sank. Das akkumulierte NADH wird regeneriert und die NADH-Fluoreszenz sinkt wie auch der RQ auf den Grundzustand ab.

Im Anschluss wurde über einen Zeitraum von 50 min in gleichmäßigen Schritten die Pumprate auf einen Endwert von 0,75 ml/min erhöht. Ein sprunghafter Anstieg der NADH-Fluoreszenz kann jedoch trotz Glucosekonzentrationen von $\geq 0,05$ g/l aufgrund von starkem Messrauschen und gesteigertem NADH-Signal durch Wachstum nicht beobachtet werden. Nachdem die Fütterung erneut gestoppt wurde, sinkt hingegen das NADH-Signal stark ab. Der RQ zeigt, dass während der schrittweisen Erhöhung keine Ethanolproduktion stattfand. Das stark schwankende NADH-Signal legt jedoch nahe, dass sich die Zufütterung an der

Grenze des Crabtree-Effekts bewegte, wodurch ein sprunghafter Anstieg möglicherweise verschleiert wurde. Abschließend wurde durch eine Pumprate von 1 ml/min ein erneuter sprunghafter Anstieg der NADH-Fluoreszenz erzeugt.

Der Sensor ist somit in der Lage den Crabtree-Effekt zu detektieren. Er kann theoretisch auch für die Steuerung eines Glucose-Feeds bei *S. cerevisiae* eingesetzt werden und so ein oxidoreduktiver Abbau der Glucose verhindert werden. Für eine vernünftige Steuerung bedarf es jedoch weiterer Kultivierungsdaten über einen längeren Zeitraum, damit ein solides Modell für die Berechnung erstellt werden kann.

Die metabolischen Studien mit Bäckerhefe haben somit gezeigt, dass sich der Sensor für die Detektion von Stoffwechselveränderungen (anaerob/aerob, Diauxie und Crabtree-Effekt) verwendet werden kann.

5.2.2. Hochzelldichtekultivierung von *Komagataella phaffii*

Um eine weitere Anwendung des Sensors zu evaluieren, wurde eine Fed-Batch-Kultivierung von *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*, ehemals *Pichia pastoris*) durchgeführt und mit dem Sensor überwacht. Eine Besonderheit von *K. phaffii* ist, dass die Zellen in der Lage sind Methanol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln. Dies kann, wie in dem vorliegenden Fall, zur heterologen Proteinproduktion eines Collagen Mimetic Proteins genutzt werden.

Die Kultivierung fand in 15 l Oehler-Medium mit 130 g/l Glycerol als Kohlenstoffquelle in einem 30l-Edelstahlreaktor der Firma Sartorius AG (Deutschland) bei einem konstanten pH-Wert von 5 statt (s. Abschnitt 9.6.2). Der Gelöstsauerstoffgehalt wurde durch kaskadierende Regelung der Rührergeschwindigkeit auf 30 % gehalten, bis die Maximalgeschwindigkeit von 1.200 rpm erreicht wurde. Im Anschluss wurde durch Beimischung von reinem Sauerstoff in die Druckluftbegasung der Gelöstsauerstoffgehalt von 30 % aufrechterhalten. In Abbildung 5.11 sind die Ergebnisse der Sensorüberwachung und der Biomasseverlauf dargestellt. Während der Batch-Phase (0-55 h) findet wie erwartet ein exponentielles Wachstum der Zellen statt. Ein Anstieg aller Fluoreszenzkanäle und des Streulichtkanals ist dabei zu beobachten, bis die Zellen in die stationäre Phase übergehen und die Sensordaten nicht weiter ansteigen. Der Übergang zur stationären Phase wird ebenfalls durch den sprunghaften Anstieg des Gelöstsauerstoffgehalts erkennbar (erste

gepunktete Linie). Durch fehlendes Glycerol kommt der Citratzyklus der Hefen zum Erliegen und der Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt.

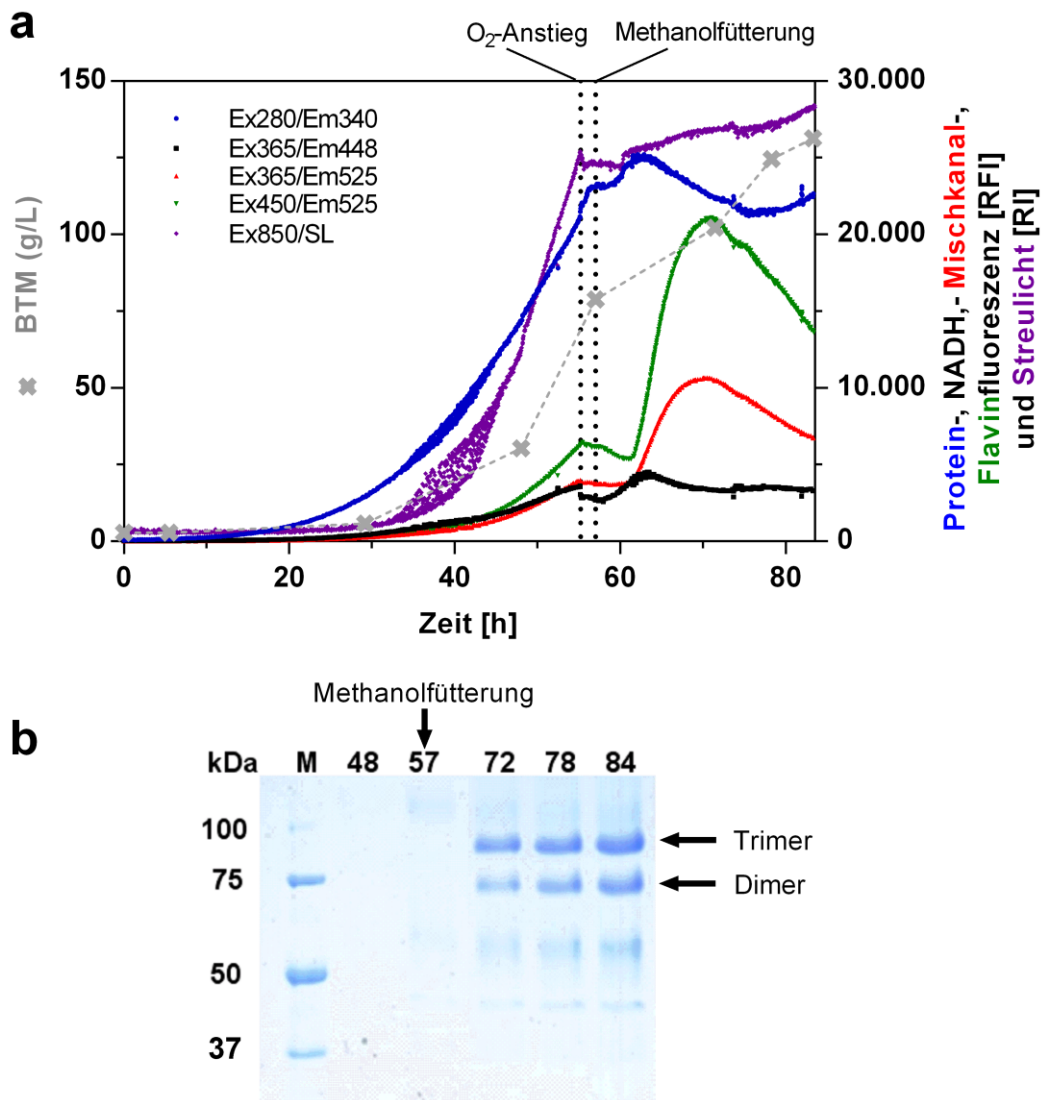


Abbildung 5.11: Hochzelldichtekultivierung von *K. phaffii*. (a) Sensordaten und Biomasse der Kultivierung und (b) SDS-Gel des Überstands vor und nach Induktion der Produktion eines Collagen Mimetic Proteins durch Methanol.

Nach 57 h wurde mit der Methanolzugabe (inklusive Spurenelementen) begonnen, wobei die Konzentration im Medium durch Überwachung mit einem Methanolsensor automatisch auf einem konstanten Wert von 0,2 % gehalten wurde. Außerdem wurde die Kultivierungstemperatur von 30 auf 25 °C abgesenkt, um die Ausbeute an löslichem Collagen Mimetic Protein zu erhöhen.

Als Folge der Methanolzugabe nimmt die Flavinfluoreszenz zunächst ab und steigt nach ca. 4 h wieder stark an. Die Proteinfluoreszenz verhält sich hingegen genau gegenteilig zur Flavinfluoreszenz. Wie bereits zuvor beschrieben, können Flavine die Fluoreszenz von Proteinen quenchen, wodurch sich das gegenseitig wachsende oder schrumpfende Signal erklären lässt. Interessant wäre jedoch zu wissen, ob der sprunghafte Anstieg der Flavinfluoreszenz durch das Einsetzen der Proteinproduktion verursacht wird oder ob hier eine metabolische Veränderung stattgefunden hat. In Abbildung 5.11b ist ein SDS-PAGE-Gel des Überstands der Kultivierung dargestellt. Es zeigt, dass 15 h nach Methanolfütterung Protein gebildet wurde, wohingegen ohne Methanolzugabe kein heterologes Protein produziert wurde. Anhand des Gelbildes kann jedoch keine Aussage über den Beginn der Proteinproduktion getroffen werden, da zu wenige Proben in einem zu großen Zeitraum entnommen wurden. Es bedarf daher weiterer Kultivierungen um herauszufinden, was den starken Anstieg der Flavinfluoreszenz verursacht hat. Positiv muss dennoch erwähnt werden, dass trotz einer Endbiomasse von 130 g/l der Sensor keine Sättigung aufwies und somit seine Eignung für den Einsatz bei Hochzelllichtmessungen bestätigt werden konnte.

5.2.3. Online-Überwachung einer Chinese Hamster Ovary-Kultivierung

CHO-Kultivierungen haben einen hohen Stellenwert in der biotechnologischen Industrie. CHO-Zellen wachsen jedoch im Vergleich zu Hefen und Bakterien nur sehr langsam und erreichen deutlich geringere Zelldichten. Ein Sensor für die online-Bioprozessüberwachung muss also eine hohe Sensitivität aufweisen und robust über mehrere Tage messen können. Anhand einer exemplarischen CHO-Kultivierung im 10 l-Edelstahlreaktor der Firma Sartorius AG (Deutschland) wurde daher die Eignung des Fluoreszenzsensors für die Bioprozessüberwachung der CHO-Zellen getestet. Die Kultivierung wurde im Rahmen der laufenden Promotion von Jens Claßen und Florian Aupert durchgeführt. Anders als in den bereits beschriebenen Versuchen wurde der Sensor nicht direkt an den Reaktor angeschlossen, sondern über einen Bypass (s. Abschnitt 4.3) in das System integriert. Dieser wurde alle 30 min mit dem Kulturmedium samt Zellen für etwa 5 min über eine Vakkumpumpe befüllt. Anschließend konnte eine Probe für offline-Analysen entnommen werden oder das Kulturmedium wurde zurück in den Reaktor gepumpt. Das Befüllen und Beladen des Bypasses hatte zur Folge, dass die gemessenen Fluoreszenzdaten eines Messzykluses einen parabelartigen Verlauf aufwiesen. Es wurden daher nur die mittleren

Daten des jeweiligen Messintervalls verwendet und diese anschließend gemittelt. Die daraus resultierenden Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 5.12 im Vergleich zu offline-Daten dargestellt.

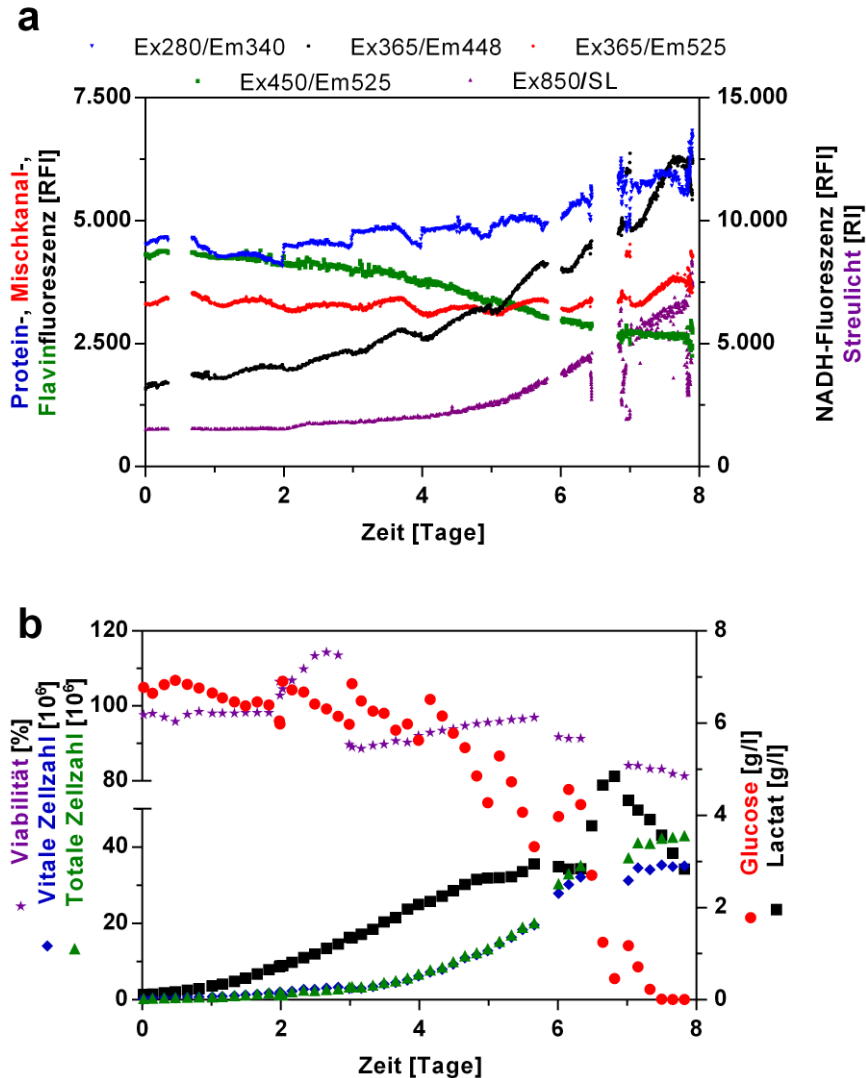


Abbildung 5.12: CHO-Kultivierung. (a) Fluoreszenzdaten und (b) offline-Daten der Kultivierung.

Die Fluoreszenzdaten weisen während des acht Tage langen Kultivierungsverlaufs drei größere Lücken auf. Die erste wurde durch einen Sensorausfall verursacht. Dies lag vermutlich daran, dass die Verbindung zwischen Computer und Sensor abgebrochen ist. Um solche Ausfälle in Zukunft zu vermeiden, wurde deshalb im Anschluss der Sensor mit einer Ethernet-Verbindung und einer internen Speicherkarte bestückt (s. Abschnitt 4.1.2). Nach dieser Hardwareumrüstung lief der Sensor bei einem Test über mehrere Tage stabil, ohne

dass Verbindungsabbrüche auftraten. Die weiteren zwei Lücken in den Daten der Kultivierung liegen daran, dass es im Reaktor zu einem Überdruck kam und die Beladung des Bypass nicht mehr richtig funktionierte.

Die Fluoreszenzdaten weisen, wie beim Protein- und NADH-Kanal zu sehen ist, ein Stufenmuster auf. Der hierbei durchgeführte Prozess beinhaltete, dass ab Tag zwei täglich ein Feed mit frischem Medium durchgeführt wurde. Das Medium enthält wichtigen Zucker, Proteine und Vitamine. Dies erklärt den sprunghaften Anstieg der Proteinfluoreszenz. Im Kulturmedium ist aber auch Riboflavin enthalten. Da die Zellen nicht in der Lage sind es selber herzustellen und es aus dem Medium einbauen, sinkt wie erwartet das Riboflavin-Signal in Folge der Zellteilung. Das NADH-Signal und das Streulicht steigen hingegen mit zunehmender Zellzahl an und spiegeln gut den Wachstumsverlauf wider. Es ist somit prinzipiell möglich den Sensor für die Überwachung von CHO-Zellen einzusetzen. Weitere Kultivierungen sind jedoch nötig um zu testen, ob es mit dem Sensor möglich ist, wie in der Literatur beschrieben, die Lebendzellzahl der Kultivierung vorhersagen zu können [71].

6. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des Fluoreszenzensors

6.1. Affinitätschromatographische Aufreinigung von fluoreszenzmarkiertem Protein

Wie in Abschnitt 5.1.3 beschrieben, konnte der Fluoreszenzsensor erfolgreich für die Bioprozessüberwachung der Produktion von rekombinanten Proteinen mit Fluoreszenz-Tag verwendet werden. Im Gesamtprozess zur Gewinnung von Proteinen folgt auf den Kultivierungsprozess meist eine Extraktion und Aufreinigung des Zielproteins aus der Kulturbrühe. Ob sich der Sensor neben der Bioprozessüberwachung auch für das anschließende Downstream Processing eignet, soll im weiteren Verlauf diskutiert werden.

Für chromatographische Aufreinigungsversuche wurde repräsentativ Feuchtzellbiomasse aus der in Abschnitt 5.1.3 dargestellten Kultivierung zur GFP-GST-Produktion (Induktion der Proteinexpression bei $OD_{600} = 2$ rel. AU) verwendet. Sechs Gramm der Biomasse wurden in Bindungspuffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (s. Abschnitt 9.9). Das GFP-GST-Fusionsprotein, welches zusätzlich über einen Polyhistidin-Tag (His6) verfügt, wurde anschließend über eine Cobalt-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie (Co-NTA) aufgereinigt (s. Abschnitt 9.11). Der Fluoreszenzsensor wurde über einen Adapter (s. Abschnitt 4.2), der eine Durchflussküvette beinhaltet, mit dem Fast Protein Liquid Chromatography-System (FPLC) der Firma BioRad (München) verbunden und vor den UV-Detektor der Anlage geschaltet. In Abbildung 6.1 sind die UV- und Fluoreszenz-Daten zum Verlauf der Aufreinigung dargestellt. Beim Beladen der Säule mit dem Proteinrohextrakt steigt das UV-Signal und die Proteinfluoreszenz stark an, da Hostcell-Proteine, die nicht an die Säule binden, das System passieren und von den Sensoren detektiert werden. Im GFP-Kanal wird ebenfalls ein Fluoreszenzanstieg gemessen. Dies kann zum einen auf eine nicht vollständige Bindung des GFP-GST-His6 zurückzuführen sein, zum anderen kann es aber auch an Flavinen und NADH aus der Zelle liegen, deren Fluoreszenz in den GFP-Kanal überlappen.

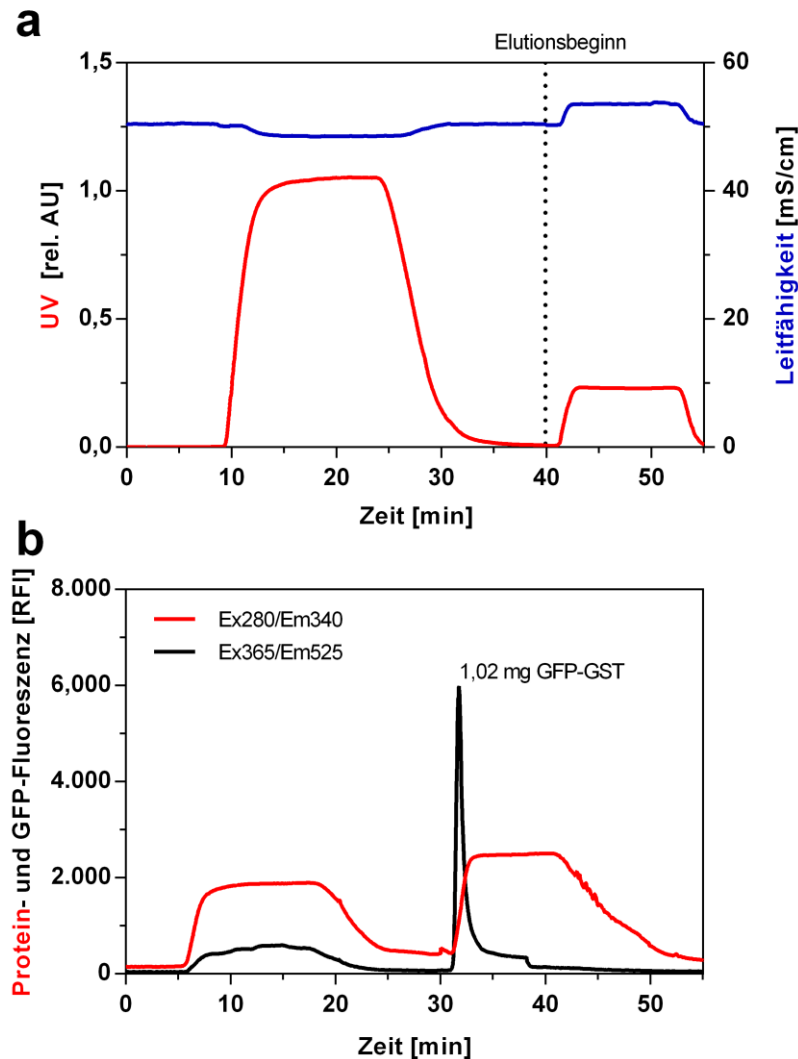


Abbildung 6.1: Co-NTA-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des Fusionsproteins GFP-GST-His6. (a) UV-Detektor (b) Fluoreszenzsensor (Kalibration s. Abschnitt 9.12). Elution mit 300 mM Imidazol.

Auf dem SDS-PAGE-Gel mit Proben aus dem Aufreinigungsprozess ist im Durchfluss kein Anteil an Fusionsprotein mehr zu erkennen (s. Abb. 6.2). Somit muss es sich bei dem im GFP-Kanal gemessenen Signal um Flavin- und NADH-Fluoreszenz handeln. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit Bindungspuffer gespült, was in beiden Sensoren zu einem Signalabfall auf den Grundzustand führte. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit 300 mM Imidazol von der Säule eluiert. Das UV- und das Proteinfluoreszenzsignal steigen erneut an, allerdings ist hier im Gegensatz zum GFP-Kanal kein Proteinelutionspeak zu erkennen. Obwohl im Gelbild das Zielprotein in den Elutionsfraktionen eindeutig aufzufinden ist, kann die Eigenabsorption von Imidazol im

UV-Bereich dazu führen, dass im UV-Signal der Elutionspeak überdeckt wird. Der Fluoreszenzsensor ist somit aufgrund der höheren Sensitivität von Fluoreszenzmessungen und der nicht vorhandenen Störung durch die Eigenabsorption von Imidazol in der Lage, auch geringe Mengen an fluoreszenzmarkiertem Protein zu detektieren. Es ist damit auch möglich, das Zielprodukt direkt zu quantifizieren. Hierfür wurden Kalibrationsreihen mit BSA und GFP-GST erstellt (s. Abschnitt 9.12). Es wurden 1,02 mg GFP-GST aus sechs Gramm Feuchtzellbiomasse aufgereinigt. Der Fluoreszenzsensor kann somit für die Bioprozessüberwachung und das Downstream Processing von fluoreszenzmarkiertem Protein verwendet werden.

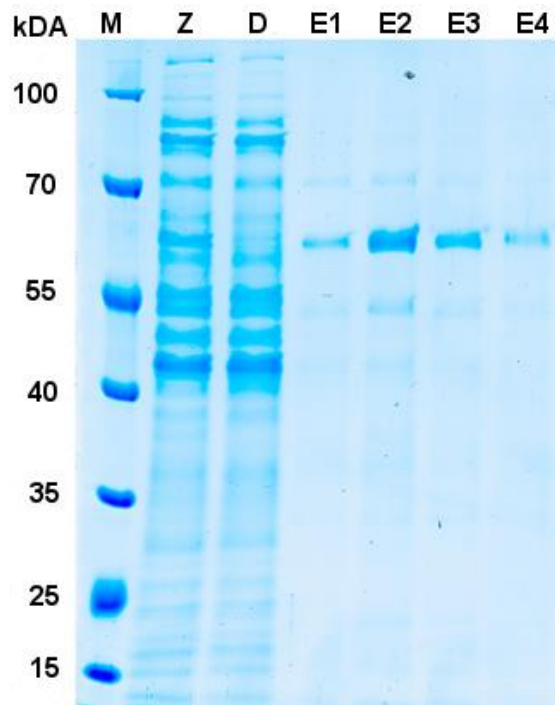


Abbildung 6.2: SDS-PAGE mit den Proben einer Co-NTA-Affinitätschromatographie. (M) Proteinmarker (#26616), (Z) Zellysate der *E. coli* BL21 (DE3)-Kultivierung zur heterologen Proteinproduktion von GFP-GST-His6 (Induktion $OD_{600} = 2$ rel. AU); (D) Durchfluss; (E1-E4) Elutionsproben.

6.2. Messung einer Alkoholdehydrogenase-Enzymkinetik

Enzyme sind zu einer bedeutenden Säule in der industriellen Biotechnologie geworden. Sie werden in vielen Sektoren, wie der Lebensmittel-, Waschmittel- und Textilindustrie, eingesetzt [72]. Es ist daher wichtig, Enzyme genau zu charakterisieren und ihre Aktivität zu untersuchen.

Um den Einsatzbereich des in dieser Arbeit entwickelten Sensors weiter zu untersuchen, wurden Versuche zur Bestimmung von Enzymkinetiken durchgeführt. Da der Sensor NADH-Fluoreszenz detektieren kann, wurde exemplarisch eine Reaktion ausgewählt, an der NAD^+ als Coenzym beteiligt ist. Als Modellsystem wurde die Umsetzung von Ethanol (s. Reaktionsschema 1) durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) betrachtet und die Reaktionskinetik aufgenommen.



Reaktionsschema 1: Umsetzung von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase unter Bildung von NADH.

Für die Bestimmung der Kinetik wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Umsetzung unterschiedlich stark konzentrierter Ethanolösungen (s. Abschnitt 9.13) bestimmt und gegen die jeweilige Anfangskonzentration des Substrats aufgetragen (s. Abb. 6.3). Der Kurvenverlauf entspricht in ihrer Charakteristik der einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik.

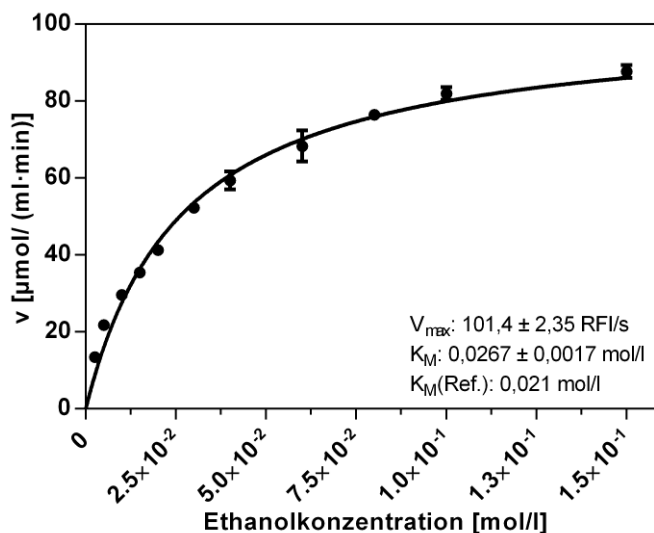


Abbildung 6.3: Michaelis-Menten-Kinetik der Alkoholdehydrogenase (0,1 μM) für den Umsatz von Ethanol in PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 8,8.

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism (USA) wurden die ermittelten Daten anschließend durch nicht lineare Regression dem Michaelis-Menten-Fit angepasst (s. schwarze Linie, Gleichung 6).

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die kinetischen Parameter wurden mit einer Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 26,7 \pm 1,7$ mmol/l sowie einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{max} = 101,4 \pm 2,35$ RFI/s bestimmt.

Der K_M -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren des Enzyms besetzt ist. Er liefert somit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Außerdem gibt der K_M -Wert eine Aussage über die Stärke des Enzym-Substrat-Komplexes wieder. Dies gilt jedoch nur, wenn die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes deutlich schneller ist als die Produktbildung. Der mit dem Sensor bestimmte K_M -Wert für die ADH ähnelt dem vom Hersteller angegebenen Wert (K_M 21 mmol/l). Der Sensor kann somit auch für die Bestimmung von Reaktionskinetiken oder Enzymaktivitäten benutzt werden, solange fluoreszierende Produkte gebildet werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer, kostengünstiger Fluoreszenzsensor für die online-Überwachung von Bioprozessen entwickelt. In der Hardware-Konstruktion wurde auf bewegliche Teile verzichtet, um die Robustheit des Sensors zu erhöhen. Hierfür wurde der Sensoraufbau auf die Anregung und Detektion der wesentlichen biogenen Fluorophore (Proteine, NADH und Flavinen) und Streulicht reduziert. Für die Anregung wurden High Power LEDs (teilweise mit Bandpässen) verbaut. Zur Detektion der Fluoreszenz haben sich mit Bandpässen bestückte Photodioden als geeignet erwiesen. Der Lichttransport erfolgte über einen speziell designten Lichtleiter der im Sondenkopf über statistisch verteilte Quarzfasern verfügt, die sich anschließend in acht Faserbündel aufsplitten und mit je einer LED oder je einer Photodiode verknüpft sind. Der Lichtleiter wurde über einen autoklavierbaren Adapter mit Saphirfenster (im 45 °C Winkel zum Lichtleiter) und mit einer definierten Messzone (20 mm) in einen Reaktor eingekoppelt. Neben einem Adapter für den klassischen Ingold-Port von Edelstahlreaktoren wurden auch ein Adapter für Glasreaktormessungen und ein weiterer Adapter für Bypass-Messungen entwickelt. Außerdem wurde ein Adapter für Küvetten oder Durchflußzellen-Messungen entworfen. Zur Charakterisierung des Sensors wurden zunächst Reinstlösungen von verschiedenen Modellfluorophoren (BSA, NADH und Riboflavin) vermessen. Es wurden Kalibrationsgeraden erstellt, mit dem Resultat, dass der Sensor eine hohe Sensitivität und einen großen linearen Messbereich bei allen Modellfluorophoren aufweist. Ein anschließendes DoE mit Mischlösungen der Modellfluorophore ergab daraufhin, dass der Sensor in der Lage ist, selektiv die Fluorophore zu detektieren, wobei aber auch Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren (BSA und NADH/Riboflavin) offengelegt wurden.

Im nächsten Schritt wurde die intrazelluläre Fluoreszenz von *E. coli* K1-Kultivierungen im Edelstahlreaktor vermessen. Vergleichsversuche mit dem kommerziell erhältlichen Bioview[®] zeigten, dass die Fluoreszenzsignale des neuen Sensors weniger Rauschen aufweisen. Außerdem waren die Größenordnungen der verschiedenen Fluoreszenzkanäle des neuen Sensors untereinander ähnlich. Es kann daher auf ein sonst übliches Glätten und Normalisieren der Daten verzichtet werden.

Die PCA-Analyse von sechs Kultivierungen zeigte außerdem, dass der Sensor reproduzierbar misst, Prozessabweichungen detektieren und für Golden-Batch-Überwachungen eingesetzt werden kann. Fünf der Kultivierungen wurden daraufhin für die Erstellung eines PLS-Modells zur Vorhersage der Biomasse verwendet. Das Modell weist ein gutes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,95$ sowie eine Steigung von 0,95 auf und basiert dabei hauptsächlich auf der Flavinfluoreszenz und dem Streulicht. Mit Hilfe des Modells wurde anschließend die BTM einer unabhängigen Kultivierung vorhergesagt. Der RMSEP des Modells beträgt 4,6 % des Kalibrationsbereichs und ist ähnlich dem RMSEP (5 %) einer Bioview-Vorhersage. Der Sensor kann somit für die Biomassevorhersage von Batch-Kultivierungen von *E. coli* eingesetzt werden.

Um die Eignung des Sensors für die Überwachung von Fed-Batch Kultivierungen zu testen, wurden zusätzlich *E. coli* BL21-Kultivierungen im Edelstahlreaktor und eine Kultivierung im Glasreaktor durchgeführt. Der Vergleich Glasreaktor und Edelstahlreaktor zeigte, dass der Sensor auch für Glasreaktoren verwendet werden kann. Die Signale im Glasreaktor rauschen jedoch mehr. Sie müssten somit eventuell bei Bedarf geglättet werden. Die Messung zeigte auch, dass der Sensor gut metabolische Veränderungen, wie anaerobe Zustände, detektieren kann. Ein valides Biomassevorhersagemodell konnte jedoch aufgrund mangelnder Kultivierungen nicht erstellt werden, es zeigte jedoch einen positiven Trend.

Neben der Biomassevorhersage wurde getestet, ob der Sensor sich zur Detektion von fluoreszenzmarkiertem Protein (GFP-GST-His6) eignet. Hierzu wurden drei Kultivierungen durchgeführt, wobei zwei Kultivierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit IPTG induziert wurden und eine Kultivierung nicht induziert wurde. Die Prozessüberwachung ergab, dass mit dem Sensor im Vergleich zur Negativkontrolle ein signifikanter Fluoreszenzanstieg gemessen wurde, der auf die heterologe Proteinproduktion zurückzuführen war. Der Fluoreszenzanstieg war wie erwartet abhängig von dem Induktionszeitpunkt. Mit Hilfe von chemometrischen Methoden bietet der Sensor somit die Möglichkeit für Induktionsstudien (Zeitpunkt und Induktorkonzentration). Es wurde jedoch auch beobachtet, dass die GFP-Fluoreszenz, trotz Erreichen der stationären Phase, weiter anstieg. Dies ist vermutlich auf nachträgliches Rückfalten des Fusionsproteins zurückzuführen, welches auch durch das SDS-PAGE-Gel gestützt wird, da dort ebenfalls der Anteil an löslichem Protein (stärker fluoreszierende Variante) trotz stationärer Phase weiter anstieg.

Neben der Überwachung der Proteinproduktion wurde getestet, ob der Sensor auch für das Downstream Processing eingesetzt werden kann. Hierfür wurde der Sensor über einen Adapter mit einer Durchflusszelle an ein FPLC-System angeschlossen und eine NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei fiel auf, dass im Gegensatz zum UV-Detektor der FPLC-Anlage die GFP-Fluoreszenz auch geringe Proteinkonzentrationen detektieren kann, da keine durch das Imidazol im Elutionsmittel verursachten Interferenzsignale vorliegen. Außerdem misst der Sensor selektiv das Zielprotein und ermöglicht eine direkte Quantifizierung.

Der Sensor kann aber auch für Proteinaktivität- und Kinetik-Messungen verwendet werden, solange ein fluoreszierendes Molekül beim Substratumsatz entsteht. So konnte der K_M -Wert (26,7 mM) einer ADH unter Umsatz von Ethanol mit dem Sensor ermittelt werden.

Ein weiteres Einsatzgebiet des Sensors stellte die online-Überwachung von eukaryotischen Zellen dar. Zunächst wurde der Sensor zur Überwachung verschiedener metabolischer Effekte, die bei *S. cerevisiae* Kultivierungen auftreten können, eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Wechsel der Begasung von N_2 statt O_2 wie erwartet zu einem gesteigerten bzw. gesunkenen Fluoreszenzsignal von NADH bzw. Flavinen führt. Außerdem bildete der Sensor gut das typisch diauxische Wachstumsverhalten (erst Wachstum durch Glucosestoffwechsel und später durch Ethanolverbrauch) einer Batch-Kultivierung von den Hefen-Zellen ab. Beim anschließenden Glucosefeed wurde deutlich, dass der Sensor den Crabtree-Effekt und den damit verbundenen NADH-Signalanstieg ebenfalls detektieren kann. Dies kann eine Fütterungskontrolle des Fed-Batch durch den Sensor ermöglichen, es müssen jedoch weitere Kultivierungen durchgeführt werden um ein Modell erstellen zu können.

Außerdem wurde eine Hochzelldichtekultivierung von *K. phaffii* durchgeführt. Während der Batch-Kultivierung stiegen die Fluorezenzsignale und das Streulicht ähnlich wie die Biomasse exponentiell an. Beim anschließenden Methanolfeed, der auch eine heterologe Proteinproduktion induzierte, kam es insbesondere beim Flavinsignal zu einer signifikanten Veränderung. Inwieweit dies mit der einsetzenden Proteinproduktion verbunden ist, müssen jedoch weitere Versuche zeigen. Der hohe Biomassezuwachs (130 g/l) zeigt aber auch, dass der Sensor einen großen Messbereich abdecken kann.

Als abschließenden Versuch wurde getestet, ob der Sensor sich für die Überwachung von CHO-Kultivierungen eignet. Hierfür wurde der Sensor an einen Bypass-Adapter

angeschlossen und die Fluoreszenz gemessen. Die Sensorsignale zeigten, dass der Sensor auf Veränderungen in der Kultivierung reagiert. Die NADH-Fluoreszenz und das Streulicht stiegen mit wachsender Zellzahl an und ähnelten dem Wachstumsverlauf. Um zu prüfen, ob ähnlich zum Biomassemodell ein Lebendzellzahlmodell erstellt werden kann, müssen jedoch weitere Kultivierungen durchgeführt werden.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich der Sensor in vielfältiger Weise für die Bioprozessüberwachung und weitere Anwendungen eignet. In vielen Fällen bedarf es aber weiterer Wiederholungen, um mit Hilfe von chemometrischen Verfahren umfassendere Funktionen des Sensors nutzen zu können. Auch könnte eine Weiterentwicklung der Hardware für eine noch weitere Miniaturisierung und Kostenreduktion des Sensors sorgen. So könnte z. B. anstelle von einzelnen LEDs eine spezifisch dem Sensor angepasste mehrfach LED nach dem Vorbild der Rot-Grün-Blau-LED entwickelt werden. Alternativ könnte, sobald vorhanden, eine LED eingesetzt werden, deren Wellenlängen geregelt werden kann. Die Anzahl der Lichtleiterarme könnte so reduziert oder die frei werdenden Lichtleiter für die Detektion weiterer biogener Fluorophore verwendet werden. Der modulare Aufbau des Sensors ermöglicht es aber auch schon jetzt weitere biogene Fluorophore, wie z. B. Chlorophyll aus Algen, im Austausch eines Kanals zu detektieren. Außerdem kann der Fluoreszenzsensor in Zukunft mit weiteren Sensoriken, z. B. Impedanzmessungen, OUR-Messungen oder Raman-Messungen verknüpft werden. Mit Hilfe von neuronalen Netzen können so noch mehr wichtige Prozessgrößen und Veränderungen analysiert und bestimmt werden.

8. Chemikalien und Materialien

8.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 8.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Inc., USA
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Inc., USA
Biotin	AppliChem GmbH, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cobaltchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Eisen(III)-chlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisen(II)-sulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Merck KGaA, Deutschland
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Imidazol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
IPTG	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kupfer(II)-sulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Magnesiumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Manganchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Mangansulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Metabisulfit	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
myo-Inositol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland

Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Di-Natrium-ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Inc., USA
Natriummolybdat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natronlauge	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Nickelsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Nicotinamidenindinukleotidphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ca-Pantothenat	Sigma-Aldrich Inc., USA
Phosphorsäure (85%)	Merck KGaA, Deutschland
N-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pyridoxinhydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Quick Start TM Bradford	Bio-Rad, München
Riboflavin	Sigma-Aldrich Inc., USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure Fluka (Sigma-Aldrich), USA	Salzsäure Fluka (Sigma-Aldrich), USA
SDS	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG
7-Hydroxyumbelliferon	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Urea	Sigma-Aldrich Inc., USA
Zinkacetat	Merck KGaA, Deutschland
Zink(II)-chlorid	Merck KGaA, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG

8.2. Materialien

8.2.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8.2: Auflistung des Verbrauchsmaterials.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Land
Einwegspritzen (1 ml- 50 ml)	Omnifix B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml und 5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Sterilfilter (Luer-Lock) Minisart 0,2 µm	Sartorius AG, Deutschland
Vakuumfilter	Sartorius AG, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Corning, Inc., USA

8.2.2. Vektoren und Stämme

Tabelle 8.3: Verwendete Vektoren und Stämme.

Vektor	Hersteller
pETM30-His6-GST-GFP	[68]
Stamm	Hersteller
<i>E. coli</i> B121 (DE3)	Merck KGaA, Deutschland
<i>E. coli</i> B2032/82 Serotyp K1	original klinisches Isolat [74]
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1024	National Collection of Yeast Cultures, Großbritannien
<i>K. phaffii</i> (ehemals <i>Pichia pastoris</i>)	[73]

8.2.3. Proteine und Enzyme

Tabelle 8.4: Auflistung der verwendeten Proteine und Enzyme.

Name	Hersteller
Alkoholgehydrogenase (aus <i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldirch Inc., USA
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldirch Inc., USA
Page Ruler Prestained, Protein Ladder (#26616)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

8.3. Geräte

8.3.1. Laborgeräte

Tabelle 8.5: Auflistung der Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Abgasanalytik BlueInOne Ferm	BlueSens gas sensor GmbH, Deutschland
Aminex HPX-87H	Bio-Rad, München
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor Typ C10-3	B.Braun Biotech, Deutschland
Bioreaktor Typ C30-3	Sartorius AG, Göttingen
Biostat (Aplus und C)	Sartorius AG, Göttingen
Biostat (B)	B.Braun Biotech, Deutschland
Bioview	Delta Light & Optics
Chromaster Hitachi (HPLC)	Hitachi, Japan
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
SDS-PAGE-System	Bio-Rad, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
FPLC (Biologic Duoflow)	Bio-Rad, München
Gaschromatograph GC-2010 Plus	Shimadzu Corporation, Japan
Hitachi F-7000	Hitachi, Japan
Inkubator Certomat BS-1	Sartorius AG, Göttingen

Magnetrührer	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikropipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
pH-Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
pH-Sonde EasyFerm Plus	Hamilton Company, USA
Photometer (Libra Biochrom)	Merck KGaA, Deutschland
Sauerstoffsonde Oxyferm FDA	Hamilton Company, USA
Schlauchpumpe	Idax Corporation, USA
Supelco 24160-U Silica-Kapillarsäule	Sigma-Aldrich Inc., USA
Thermoblock	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallsonde LABSonic	Sartorius AG, Göttingen
Vortex-Mixer	Scientific Industries, USA
Wasseraufbereitungsanlage (Arium®)	Sartorius AG, Göttingen
YSI 2900D	Xylem Inc., USA
Zentrifuge (verschiedene Varianten)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

8.3.2. Sensorkomponenten

Tabelle 8.6: Zusammenfassung der verwendeten High-Power LEDs und Photodioden.

LED	Verwendung	Leistung	Verkäufer
278 nm	Protein-Fluoreszenz	70 mW	Lasercomponents (LEUVA66G00HV700)
285 nm	Protein-Fluoreszenz	1-3 mW	Roithner (UVLUX275-3), Österreich
365 nm	NADH-Fluoreszenz	270 mW	Roithner (H2A1-H365-r4), Österreich
450 nm	Flavin-Fluoreszenz	430 mW	Roithner (H2A1-H450), Österreich
850 nm	Streulicht	90 mW	Roithner (H2A1-H850), Österreich
Photodiode	Verwendung	Verkäufer	
SD 112-45-11-221	Fluoreszenz/Streulicht	Advanced Photonix, Inc., USA	
TSL2561	Referenz	Mouser Electronics, Inc., Deutschland	

Tabelle 8.7: Zusammenfassung der verwendeten Bandpässe.

Band-pass	Verwendung	Bandbreite	FWHM	Blockung	Verkäufer
340 nm	Proteinfluoreszenz	26 nm	29 nm	OD6	Edmund Optics GmbH, DE
448 nm	NADH-Fluoreszenz	20 nm	25 nm	OD6	Edmund Optics GmbH, DE
525 nm	Flavinfluoreszenz	15 nm	18 nm	OD6	Edmund Optics GmbH, DE
365 nm	Anregung mit LED	10 nm	10 nm	OD4	Edmund Optics GmbH, DE
450 nm	Anregung mit LED	10 nm	10 nm	OD4	Edmund Optics GmbH, DE

8.4. Verwendete Software

Tabelle 8.8: Auflistung der verwendeten Software.

Name	Hersteller
ChemDraw	CambridgeSoft, USA
GNU Image Manipulation Program	The GIMP Team, USA
GraphPad Prism6	GraphPad Software, Inc., USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
The Unscrambler X 10.1	Camo Software AS, Oslo

8.5. Puffer-, Reagenzlösungen und Kulturmedien

Die pH-Werte der hergestellten Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt. Wenn notwendig, wurden die Puffer, Kulturmedien oder Reagenzlösungen für 30 min bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert. Ggf. wurde anschließend 1 ml/l Antibiotika-Stammlösung zugegeben.

Tabelle 8.9: Antibiotikum-Stammlösung.

Antibiotikum	Menge	Konzentration
Kanamycin	50	50 g/l
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 ml	

8.5.1. Kalibrationsgeradenpuffer

Tabelle 8.10: Zusammensetzung des 10x PBS-Puffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Natriumchlorid	80 g	80 g/l
Kaliumchlorid	2 g	2 g/l
Natriumdihydrogenphosphat	14,2 g	14,2 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	2,7 g	2,7 g/l
demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 ml	

8.5.2. Kulturmedien

Tabelle 8.11: Zusammensetzung des LB-Mediums (pH-Wert 7,5).

Bestandteil	Menge	Konzentration
Trypton	10 g	10 g/l
Hefeextrakt	5 g	5 g/l
Natriumchlorid	10 g	10 g/l
demineralisiertes H ₂ O	Ad 1000 ml	

Tabelle 8.12: Schatzmann-Medium (pH-Wert 5,4).

	Bestandteil	Menge	Bemerkung
A	Natriumcitrat	6,47 g	autoklavieren
	Ammoniumsulfat	4,49 g	
	Di-Ammoniumhydrogenphosphat	1,85 g	
	Kaliumchlorid	907 ml	
	Calciumchlorid	322 mg	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 800 ml	
B	Glucose	30,08 g	sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 100 ml	
C	Magnesiumsulfat	169 mg	sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 100 ml	
D	Spurenelemente	1/10 ml	

Tabelle 8.13: Spurenelemente für das Schatzmann-Medium.

Bestandteil	Menge	Verdünnungsfaktor	Bemerkung
Eisen(III)-chlorid	454 mg	1000	sterilfiltrieren
Zinksulfat	250 mg	1000	
Mangan(II)-sulfat	423 mg	1000	
Kupfersulfat-Pentahydrat	125 mg	1000	
myo-Inositol	300 mg	100	
Calcium-Pantothenat	1,5 g	1000	
Thiaminhydrochlorid	304 mg	1000	
Pyridoxinhydrochlorid	72 mg	1000	
Biotin	15 mg	100	
demineralisiertes H ₂ O	ad 50 ml		

Tabelle 8.14: Definiertes Medium für *E. coli* K1-Kultivierungen (pH-Wert 7,5).

	Bestandteil	Menge	Bemerkungen
Medium	Di-Kaliumhydrogenphosphat	9,3 g	
	Kaliumdihydrogenphosphat	2,03 g	
	Glucose	22 g	
	Ammoniumsulfat	10 g	
	Natriumchlorid	1,2 g	autoklavieren
	Kaliumsulfat	1,1 g	
	Calciumchlorid	1,1 g	
	Spurenelemente	jeweils 1 ml	(nachträglich)
	demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 ml	
Spuren- elemente	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	7,5 g	
	Eisensulfat-Heptahydrat	0,05 g	getrennt ansetzen
	Kupfersulfat- Heptahydrat	0,05 g	und sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 ml	

Tabelle 8.15: Definiertes Medium für *E. coli* B121-Batch-Kultivierungen (pH-Wert 6,9).

Anteil	Bestandteil	Menge	Bemerkungen
A (1,25 l)	Kaliumdihydrogenphosphat	13,3 g	
	Di-Ammoniumhydrogenphosphat	4 g	
	Zitronensäure	1,7 g	
	Di-Natrium-EDTA	18,2 mg	
	Cobaltchlorid-Hexahydrat	3,9 mg	
	Mangansulfat-Monohydrat	13 mg	autoklavieren
	Kupfersulfat	2 mg	
	Borsäure	4,7 mg	
	Natriummolybdat-Dihydrat	4 mg	
	Zinkacetat	44,2 mg	
	Eisen(III)-Citrat	131,3 mg	
	demineralisiertes H ₂ O	1250 ml	
B (32,5 ml)	Glucose	200 g	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 500 ml	autoklavieren
C (13 ml)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	12 g	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 100 ml	sterilfiltrieren
D (1,3 ml)	Thiamin-HCl	50 mg	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 10 ml	sterilfiltrieren
E (1,3 ml)	Kanamycinstammlösung		

Tabelle 8.16: Feed-Medium für *E. coli* BL21 Fed-Batch-Kultivierungen (pH-Wert 6,9).

	Bestandteil	Menge	Bemerkungen
A	Glucose	800 g	autoklavieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 900 ml	
B	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	20 g	sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 ml	
C	Di-Natrium-EDTA	13 mg	sterilfiltrieren
	Cobaltchlorid-Hexahydrat	4 mg	
	Manganchlorid-Tetrahydrat	23,5 mg	
	Kupferchlorid	54,4 mg	
	Borsäure	4,7 mg	
	Natriummolybdat-Dihydrat	4 mg	
	Zinkacetat	16 mg	
	Eisenchlorid demineralisiertes H ₂ O	40 mg ad 40 ml	
D	Thiamin-HCl	4,5 mg	sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 10 ml	
E	Kanamycinstammlösung	1 ml	

Tabelle 8.17: Modifiziertes ZYP-31-Medium für die heterologe GFP-Produktion (pH-Wert 7,5).

Anteil	Bestandteil	Menge	Bemerkungen
A (900 ml)	Kaliumdihydrogenphosphat	6,51 g	autoklavieren
	Di-Natriumhydrogenphosphat	6,8 g	
	Ammoniumsulfat	3,16 g	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 900 ml	
B (50 ml)	Glucose demineralisiertes H ₂ O	100 g ad 500 ml	autoklavieren
C (50 ml)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat demineralisiertes H ₂ O	20 g ad 50 ml	sterilfiltrieren
D (0,5 ml)	Eisen (III)-chlorid demineralisiertes H ₂ O	1,6 mg ad 50 ml	sterilfiltrieren
E (1 ml)	Cobaltchlorid-Hexahydrat	5 mg	sterilfiltrieren
	Manganchlorid-Heptahydrat	8,9 mg	
	Kupfersulfat	10 mg	
	Borsäure	2 mg	
	Nickelsulfat	10 mg	
	Zinkchlorid	6,54 mg	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 100 ml	
F (0,5 ml)	Natriummolybdat-Dihydrat demineralisiertes H ₂ O	1,05 g ad 50 ml	sterilfiltrieren
Induktion (1 ml)	IPTG demineralisiertes H ₂ O	1,19 g ad 10 ml	sterilfiltrieren

Tabelle 8.18: YPD-Medium (pH-Wert 5).

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	1 %
Pepton	2 %
Glucose	2 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 1l

Tabelle 8.19: Oehler Medium (pH-Wert 5).

Anteil	Bestandteil	Menge	Bemerkungen
Oehler Medium	Natriumhexametaphosphat	25 g	(Vorkultur/Kultur)
	Calciumsulfat-Dihydrat	1,17 g	
	Kaliumsulfat	18,2 g	
	Ammoniumsulfat	9 g	
	Glycerol	40/130 g	
	Casein	10 g	
	Spurenelemente	4,4 ml	
	demineralisiertes H ₂ O	1000 ml	
Spuren- elemente	Cobaltchlorid-Hexahydrat	0,5 g	sterilfiltrieren
	Natriumiodid	0,08 g	
	Mangansulfat-Monohydrat	3 g	
	Kupfersulfat-Pentahydrat	6 g	
	Borsäure	0,02 g	
	Natriummolybdat-Dihydrat	0,2 g	
	Zinkchlorid	20 g	
	Eisensulfat	65 g	
	Biotin	0,2g	
	Schwefelsäure	5 ml	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 ml	
Feed- Medium	Methanol	100 %	
	Spurenelemente	0,44 %	

8.5.3. Zellaufschluss

Tabelle 8.20: Lysis-Puffer (links; pH-Wert 8) und Extraktionspuffer (rechts; pH-Wert 8).

Bestandteil	Konzentration	Bestandteil	Menge
Urea	6 M	MOPS	1,05
Metabisulfit	10 mM	Dithiothreitol	77 mg
β-Mercaptoethanol	10 mM	Glycerin	10 ml
Ascorbinsäure	10 mM	demineralisiertes	ad 100 ml
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 ml	H ₂ O	

8.5.4. SDS-PAGE

Tabelle 8.21: Auflistung der verschiedenen Lösungen für eine SDS-PAGE.

Lösung	Bestandteil	Menge
10 % Trenngel (2 Gele)	Rotiphorese 40 (37,5:1)	2,5 ml
	SDS (1 %)	1 ml
	Tris/HCl (pH 8,8)	2,8 ml
	demineralisiertes H ₂ O	3,7 ml
	TEMED	20 µl
	APS (25 %)	20 µl
6 % Sammelgel (1-4 Gele)	Rotiphorese 40 (37,5:1)	750 µl
	SDS (1 %)	300 µl
	Tris/HCl (pH 6,8)	630 µl
	demineralisiertes H ₂ O	3,77 ml
	TEMED	10 µl
	APS (25 %)	10 µl
10x TGS-Puffer (pH 8,3)	Tris	3 g
	Glycin	140 g
	SDS	10 g
	demineralisiertes H ₂ O	ad 1l
2x SDSProbenpuffer	Bromphenolblau	20 mg
	EDTA-Natriumsalz	58 mg
	SDS	5 g
	Tris-HCl	0,315 g
	demineralisiertes H ₂ O	ad 80 ml
Laemmli-Puffer	2x SDS Probenpuffer	800 µl
	Glycerin (55 %ig)	100 µl
	β-Mercaptoethanol	100 µl
Kolloidale Coomassie-Farbelösung [75]	Coomassie Brilliant Blue G 250	490 mg
	Ammoniumsulfat	40,8 g
	Phosphorsäure (85 %)	48 ml
	Methanol	82 ml
	demineralisiertes H ₂ O	367 ml
Fixierer	Ethanol (96 %)	50 %
	Phosphorsäure (85 %)	20 %
	demineralisiertes H ₂ O	30 %

Anmerkung zur kolloidalen Coomassie-Farbelösung: In einer braunen Glasflasche (alternativ eine in Alufolie eingewickelte Glasflasche) 40 mL demineralisiertes H₂O vorlegen und Phosphorsäure langsam zugeben. Ammoniumsulfat und Coomassie Brilliant Blue G250 unter Rühren zugeben. Restliches demineralisiertes H₂O zugeben. Methanol langsam unter Rühren zugeben. Bei 4 °C lagern.

8.5.5. FPLC

Tabelle 8.22: Auflistung der verwendeten FPLC-Puffer.

Lösung	Bestandteil	Menge
Bindungspuffer/ Waschpuffer (pH 8)	Tris-HCl	3,152 g
	Natriumchlorid	29,22 g
	demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 ml
Elutionspuffer (pH 8)	Tris-HCl	3,152 g
	Natriumchlorid	29,22 g
	Imidazol	20,4 g
	demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 ml
Lagerungspuffer	Ethanol	200 ml
	demineralisiertes H ₂ O	800 ml

Die Lösungen werden angesetzt und der pH-Wert eingestellt. Anschließend werden die Puffer im Ultraschallbad entgast.

8.5.6. GFP-GST-Konzentrationsbestimmung

Tabelle 8.23: BSA-Verdünnungsreihe für die GFP-Kalibration und Volumen der GFP-GST-Standards^a.

	Stammlösung	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
BSA	1 g	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl
H₂O	ad 5 ml	1990 µl	1975 µl	1950 µl	1900 µl
	S1	S2	S3	S4	
GFP-GST	22,5 ml	20 ml	25 ml	10 ml	

^a selbst aufgereinigtes GFP-GST

9. Methoden

9.1. Fluoreszenzsensor-Messungen

Der Sensor verfügt über vier LEDs und vier Photodioden. Während der Messung werden die LEDs sequentiell nacheinander angesteuert. Die Photodioden messen hingegen gleichzeitig. Eine Messung pro LED dauert eine Sekunde, wobei die LED in fünf Intervallen (an/aus) für je 100 ms an bzw. ausgeschaltet wird. Die Photodioden messen ebenfalls in Intervallen. Um Umgebungslichteffekte herauszufiltern, werden die gemittelten Daten der beiden Intervallmessungen voneinander abgezogen (*lock-in-Methode*). Ein kompletter Messzyklus dauert somit nur vier Sekunden, wobei um Sättigungen der Photodiode zu vermeiden, eine zweite Messrunde mit geringerem Photodiodenverstärker (1/8) in den Messzyklus (insgesamt 8 s) integriert wurde. Da während einer Kultivierung keine so schnelle Taktung nötig war, wurden die Messungen auf einen Messzyklus pro Minute beschränkt. Für die Enzymkinetik und die Proteinaufreinigung wurden die Messintervalle individuell angepasst.

9.2. Erstellung von Kalibrationsgeraden

Von den Modellfluorophoren BSA, NADH, Riboflavin und Umbelliferon wurden Verdünnungsreihen in 50 ml Reaktionsgefäßen mit PBS-Puffer (s. Tab. 8.10) hergestellt. Für BSA, NADH, und Riboflavin wurde PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 und für Umbelliferon mit einem pH-Wert von 9 verwendet. Ausgehend von der jeweiligen Stammlösung (s. Tab. 9.1) wurden Konzentrationsstufen (je 25 ml) erstellt. Für die Umbelliferonstammlösung wurde Ethanol (70 %) anstelle von PBS-Puffer zum Lösen verwendet. Die jeweiligen Konzentrationsstufen wurden anschließend durch schrittweises Verdünnen bis auf $X \cdot 10^{-9}$ mol/l verdünnt (22,5 ml pro Ansatz). Jede Verdünnungsreihe wurde dreimal angesetzt. Die Verdünnungsreihen wurden nun in aufsteigender Konzentration mit dem Sensor (mit Ingold-Adapter) vermessen. Die Messergebnisse wurden anschließend gegen die Konzentration der Fluorophorlösungen in einer doppelt logarithmischen Skalierung aufgetragen. Der lineare Messbereich und das Bestimmtheitsmaß wurden über eine lineare Regression bestimmt (Microsoft Excel).

Tabelle 9.1: Stammlösungen und Verdünnungsstufen von Modellsubstanzen.

	BSA [50 ml]	NADH [10 ml]	Riboflavin [1 l]	Umbelliferon [100 ml]
Stammlösung [mol/l]	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Einwaage	1,661 g	0,071 g	0,019 g	0,0194 g
Verdünnungsstufen [mol/l]	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$
	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$

9.3. Bestimmung der Selektivität des Sensors

Zur Bestimmung der Selektivität des Sensor wurden Mischlösungen der Modellfluorophore BSA, NADH und Riboflavin aus den Stammlösungen (s. Tab. 9.1) angesetzt (je 22,5 ml) und mit dem Sensor (mit Ingold-Adapter) vermessen. Mit Hilfe der Software Unscrambler X (Camo, Norwegen) wurden PLS-Modelle für die jeweilige Modellsubstanz erstellt (s. Abschnitt 4.1.3).

Für ein gutes PLS-Modell werden mindestens 5 verschiedene Konzentrationen benötigt. Bei drei Variablen ergeben sich daraus 3^5 verschiedene Kombinationen. Um die benötigte Menge an Lösungen zu reduzieren wurde ein von Dr. Patrick Lindner (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) geschriebener Algorithmus verwendet und ein *Design of Experiment* (DoE) erstellt. Der Versuch wird dabei in drei Blöcke aufgeteilt (s. Tab. 9.2). Jeder dieser Blöcke beinhaltet fünf verschieden zusammengesetzte Mischlösungen, wobei jede Konzentrationsstufe eines Fluorophors genau einmal vorkommt. Vor und nach diesen Blöcken werden Zentralversuche durchgeführt. Dieser beinhaltet eine immer gleich zusammengesetzte Lösung (Überprüfung der äußeren Einflüsse). Die Kombinationen der unterschiedlichen Konzentrationen wurden im Vorfeld so ausgewählt, dass sich möglichst niedrige Korrelationskoeffizienten zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Fluorophore ergeben.

Tabelle 9.2: *Design of Experiment* der verschiedenen Mischlösungen.

BSA (mol/l)	NADH (mol/l)	Riboflavin (mol/l)
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
0	0	0
$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-7}$	0	0
0	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$
$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-7}$	0	$1 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
0	$1 \cdot 10^{-6}$	0
$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$

9.4. *E. coli*-Bioreaktorkultivierungen

Ausgehend von einer Kryokultur wurden die Zellen (*E. coli* K1 oder *E. coli* BL21) zunächst in einem Schüttelkolben mit vier Schikanen angezogen (erste Vorkultur). Dazu wurden die Kolben mit 100 ml LB-Medium (s. Tab. 8.2) befüllt und mit 20 μ l der jeweiligen Kryokultur angeimpft. Beim *E. coli* BL21-Stamm wurden zusätzlich 100 μ l Kanamycinstammlösung in den Kolben zugefügt. Anschließend wurde die erste Vorkultur bei 37 °C und bei einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm für 7 h inkubiert. Mit diesen Kulturen wird nun eine weitere Vorkultur angeimpft. Hierfür wurden 100 ml definiertes Medium (s. Tab. 8.14, Tab. 8.15 und Tab. 8.17) in die Kolben gefüllt und ggf. 100 μ l Kanamycin-Stammlösung zugegeben. Aus der ersten Vorkultur wurden 100 μ l zum Animpfen der zweiten Vorkultur verwendet. Auch diese wurde analog zur ersten Vorkultur im Inkubator inkubiert. Nach 14 h konnte aus diesen Kulturen die Hauptkultur im Bioreaktor inokuliert werden.

9.4.1. *E. coli* K1-Kultivierungen

Die Hauptkultur wurde in einem 10 l-Bioreaktor der Firma B. Braun oder in einem 30 l-Bioreaktor der Firma Sartorius durchgeführt. Zur Vorbereitung des Bioreaktors wurden 7,5 bzw. 30 l definiertes Medium ohne Glucose und Phosphatpuffer hergestellt (s. Tab. 8.15). Anschließend wurde das Medium im Bioreaktor für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Unmittelbar vor der Inokulation wurden die Glucoselösung, die Spurenelemente und der Phosphatpuffer (Gesamtvolumen: 900 ml) zugegeben. Die Zelldichte der Hauptkultur wird anschließend so eingestellt (mittels der Vorkultur), dass eine optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ rel. AU vorliegt. Die Kultivierung fand bei 37 °C statt. Die Rührerdrehzahl wurde auf 1.000 rpm eingestellt und das Medium mit einer Flussrate von 7,5 bzw. 30 l/min mit Druckluft begast. Der pH-Wert wurde automatisch durch Zugabe von Ammoniumhydroxid (25 %) oder Salzsäure (1 mol/l) auf einem pH 7,5 statiert. Für die anschließenden offline-Messungen (Glucose und BTM) wurden ab Inokulation stündlich Proben aus dem Reaktor entnommen. Die Sensormessungen finden automatisiert alle 60 s statt.

9.4.2. Fed-Batch Kultivierungen

Die Hauptkultur wurde in einem 2 l-Edelstahlbioreaktor (Biostat B) oder in einem 2 l-Glasreaktor der Firma Sartorius (Biostat Aplus) durchgeführt. Zur Vorbereitung des Bioreaktors wurden 1,25 l definiertes Medium ohne Glucose, Magnesiumsulfat und Thiamin-HCl hergestellt (s. Tab. 8.16). Anschließend wurde das Medium im Bioreaktor für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Unmittelbar vor der Inokulation (100 ml *E. coli* BL21-Vorkultur) wurden die restlichen, sterilen Bestandteile zugegeben. Die Batch-Kultivierung fand über Nacht bei 37 °C statt. Die Regelung der Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend, sodass ein konstanter gelöstsauerstoffgehalt von 30 % der Sättigung im Medium vorlag. Das Medium wurde mit einer Flussrate von 2 l/min mit Druckluft begast. Der pH-Wert wurde automatisch durch Zugabe von Ammoniumhydroxid (25 %) oder Salzsäure (1 mol/l) auf einem pH 6,9 statiert. Nachdem die stationäre Phase der Kultivierung erreicht wurde, wurde der Glucose-Feed (s. Tab. 8.16) gestartet. Die Steuerung der Pumprate erfolgte automatisch durch ein ORK-Feeder-Programm (TCI-Software). Die verwendeten Prozessparameter sind in Abbildung 9.1 dargestellt. Die Glucosekonzentration des Feed-

Mediums wurde mittels dem YSI-Gerät (Xylem Inc., USA) bestimmt. Die Startbiomassekonzentration wurde mittels optischer Dichtemessungen (s. Abschnitt 9.7.1) annähernd berechnet.

Während der Feed-Phase wurde die Rührergeschwindigkeit konstant gehalten (Edelstahlreaktor: 1100 rpm; Glasreaktor: 800 rpm). Bei Unterschreiten des Gelöstsauerstoffgehalts von 30 % wurde im Edelstahlreaktor schrittweise mehr reiner Sauerstoff der Druckluft beigemischt (Edelstahlreaktor: manuell; Glasreaktor: automatisch). Für die anschließenden offline-Messungen (Glucose, Acetat und BTM) wurden ab der Fütterung stündlich Proben aus dem Reaktor entnommen.

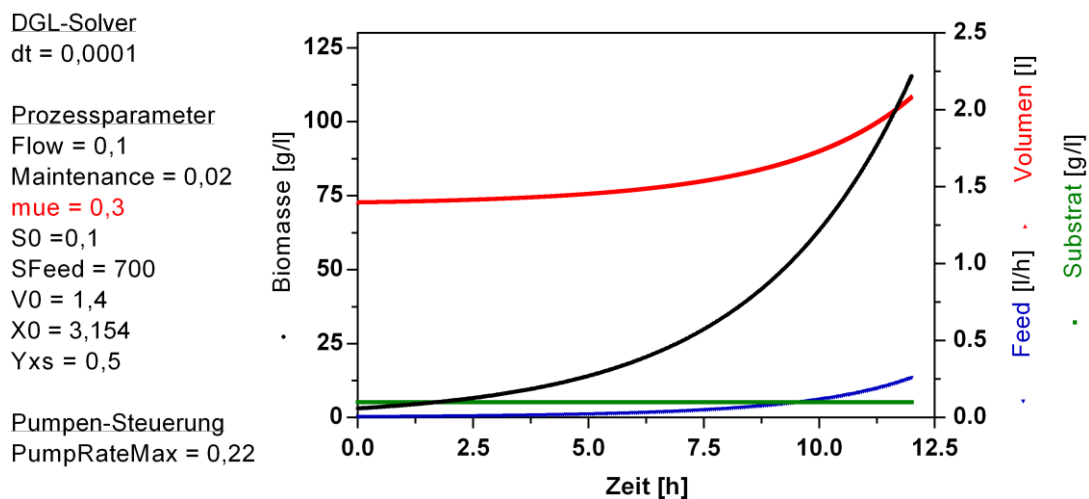


Abbildung 9.1: Prozessparameter des ORK-Feeders für eine *E. coli* BL21 Fed-Batch-Kultivierung.

9.4.3. Heterologe GFP-Produktion

Die Hauptkultur wurde in einem 10 l-Bioreaktor der Firma B. Braun durchgeführt. Zur Vorbereitung des Bioreaktors wurden 7,5 l ZYP-31-Medium hergestellt (s. Tab. 8.17) und im Reaktor autoklaviert (Lösung A). Anschließend wurden die restlichen sterilen Bestandteile (Lösung B bis F) sowie 7,5 ml Kanamycin-Stammlösung zugegeben. Die Begasung mit Druckluft wurde auf eine Flussrate von 7,5 l/min eingestellt. Sobald die Gelöstsauerstoffkonzentration unter einen Wert von 20 % der Sättigung fiel, wurde die Rührerdrehzahl auf 500 rpm erhöht. Der pH-Wert wurde automatisch durch Zugabe von Natronlauge (1 mol/l) oder Salzsäure (1 mol/l) auf einem pH 7,5 statiert. Vor der Induktion

bei $OD_{600} = 2$ rel. AU oder bei $OD_{600} = 4$ rel. AU wurde die Kultivierungstemperatur auf 25 °C erniedrigt. Es wurden $7,5\text{ ml}$ IPTG-Stammlösung zum Induzieren verwendet. Zusätzlich wurde eine Kultivierung ohne Induktion durchgeführt. Für die anschließenden offline-Messungen (Glucose, BTM und OD_{600}) wurden ab der Inokulation alle zwei Stunden Proben aus dem Reaktor entnommen. Zusätzlich wurden normierte Proben ($V_{\text{Probe}} = 2/OD_{600}$) entnommen. Die normierten Proben wurden für 5 min bei voller Drehzahl (13.500 rpm , 4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in $300\text{ }\mu\text{L}$ Extraktionspuffer resuspendiert.

9.5. Versuche mit kommerzieller Bäckerhefe

9.5.1. Hefezugabe und Begasungsexperimente (Edelstahlreaktor und Glasreaktor)

In einem 2 l -Edelstahlbioreaktor (Biostat B) oder in einem 2 l -Glasreaktor der Firma Sartorius (Biostat Aplus) wurden 2 l modifiziertes Schatzmann-Medium vorgelegt. Die Temperatur wird auf 30 °C geregelt und das Medium mit 350 rpm gerührt. Die Begasungsrate mit Druckluft wurde auf 2 l/min eingestellt. Zur Erhöhung der optischen Dichte wurde nun schrittweise eine konzentrierte Bäckerhefesuspension zugegeben. Dazu wurden 100 g eines Presshefeblocs in modifiziertem Schatzmann-Medium gelöst. Die Zugabe der Zellsuspension wurde gemäß Tabelle 9.3 durchgeführt. Die Sensormessungen fanden im Abstand von jeweils 30 s statt. Darüber hinaus wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Außerdem wurden ab einer gewissen Zelldichte Begasungsexperimente durchgeführt (s. Tab. 9.3). Hierfür wurden die Reaktoren abwechselnd mit Stickstoff oder Druckluft begast.

Tabelle 9.3: Zellsuspensionszugabe von Bäckerhefe und Begasungsexperimente.

Edelstahlreaktor			Glasreaktor		
Zugabe	Volumen	OD ₆₀₀	Zugabe	Volumen	OD ₆₀₀
1 bis 4	25 µl		1 bis 4	50 µl	
5 bis 6	50 µl		5	100 µl	0,066
7	100 µl	0,044	6	100 µl	
8	200 µl		7	200 µl	0,192
9	400 µl		8	400 µl	
10	800 µl	0,328	9	800 µl	0,579
11	1,6 ml		10	1,6 ml	
12	3,2 ml	1,31	11	3,2 ml	2,09
13	6,4 ml		12	6,4 ml	
14	12,8 ml	5,1	13	12,8 ml	8,0
15	25,6 ml		14	25,6 ml	
16	51,2 ml	20,3	15	51,2 ml	35,5
Begasung	N ₂		16	80 ml	63,0
Begasung	O ₂		Begasung	N ₂	
Begasung	N ₂		Begasung	O ₂	
Begasung	O ₂		Begasung	N ₂	
17	100 ml	37,6	Begasung	O ₂	

9.5.2. Hefezugabe in Anwesenheit von Umbelliferon

Der Edelstahlbioreaktor wurde analog zu Abschnitt 9.5.1 vorbereitet und die Hefesuspension zugeben. Zuvor wurden jedoch 100 ml einer 7-Hydroxycumarinlösung ($7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in den Reaktor vorgelegt.

9.6. Kultivierung eukaryotischer Zellen

9.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Ausgehend von einer Kryokultur wurden die Zellen (*S. cerevisiae* NCYC 1024) zunächst in einem Schüttelkolben mit vier Schikanen angezogen (erste Vorkultur). Dazu wurden die Kolben mit 100 ml YPD-Medium (s. Tab. 8.18) befüllt und mit 100 µl der Kryokultur angeimpft. Anschließend wurde die erste Vorkultur bei 30 °C und bei einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm für 8 h inkubiert. Mit diesen Kulturen wird nun eine weitere Vorkultur angeimpft. Hierfür wurden 100 ml ZYP-31-Medium (s. Tab. 8.12) in die Kolben gefüllt. Aus der ersten Vorkultur wurden 100 µl zum Animpfen der zweiten

Vorkultur verwendet. Auch diese wurde analog zur ersten Vorkultur im Inkubator inkubiert. Nach 14 h konnte aus diesen Kulturen die Hauptkultur im Bioreaktor inokuliert werden (auf eine optische Dichte von 0,25 rel. AU). Die Kultivierung der Hauptkultur wurde in einem 30 l-Bioreaktor (Sartorius) durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 7,5 l Schatzmann-Medium befüllt und der Reaktor wurde autoklaviert. Anschließend wurden die restlichen Bestandteile zugeben und das Medium wurde mit der Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung fand bei 30 °C und einer konstanten Rührergeschwindigkeit von 800 rpm statt. Es wurde mit einer Flussrate von 10 l/min begast, wobei 25 % reiner Sauerstoff der Druckluft zugefügt wurden. Der pH-Wert wurde mittels Ammoniumhydroxid oder Salzsäure auf einen pH 5,4 geregelt. Es wurden stündlich offline-Proben gezogen. Zusätzlich wurde eine Abgasanalytik an den Reaktor angeschlossen.

Im Anschluss an die Batch-Kultivierung wurde die Glucose-Fütterung (200 g/l) gestartet (Pumprate von 0,4 ml/min) und das NADH-Signal beobachtet. Bei sprunghaften NADH-Anstieg wurde die Pumpe ausgeschaltet. Im Anschluss wurde über einen Zeitraum von 50 min in gleichmäßigen Schritten die Pumprate auf einen Endwert von 0,75 ml/min erhöht. Nachdem die Fütterung erneut gestoppt wurde, wurde abschließend eine Pumpenrate von 1 ml/min gestartet. Die Proben für die Bestimmung der offline-Daten werden jeweils vor Beginn und nach Beenden der Zufütterungen aus dem Reaktor entnommen. Bestimmt werden die Glucose- und Ethanolkonzentrationen sowie der respiratorische Quotient anhand der Abgaswerte.

9.6.2. *Komagataella phaffii*

Ausgehend von einer Kryokultur wurden die Zellen (*K. phaffii*) zunächst in einem Schüttelkolben mit vier Schikanen angezogen (Oehler-Medium, 30 °C, 180 rpm). Anschließend wurden die Kulturen für die Inokulation der Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultivierung fand in 15 l Oehler-Medium (s. Tab. 8.19) in einem 30 l-Edelstahlreaktor der Firma Sartorius bei einem konstanten pH-Wert von 5 statt (Regelung durch Ammoniumhydroxid und Salzsäure). Der Gelöstsauerstoffgehalt wurde durch kaskadierende Regelung der Rührergeschwindigkeit auf 30 % gehalten, bis die Maximalgeschwindigkeit von 1.200 rpm erreicht wurde. Im Anschluss wurde durch Beimischung von reinem Sauerstoff in die Druckluftbegasung der Gelöstsauerstoffgehalt

von 30 % aufrechterhalten. Nachdem das Glycerol durch die Zellen aufgebraucht wurde, wurde die Kultivierungstemperatur von 30 auf 25 °C abgesenkt. Außerdem wurde mit der Methanolzugabe (s. Tab. 8.19) begonnen, wobei die Konzentration im Medium durch einen Methanolsensor (TCI-Eigenbau) auf einem konstanten Level von 0,2 % gehalten wurde. Nachdem sieben Liter Methanol zugefügt wurden, wurde die Kultivierung gestoppt.

9.7. Offline-Analytik

9.7.1. Optische Dichte

Die Messung der Proben findet bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer statt. Als Blank dient eine 0,9 %ige-Natriumchlorid-Lösung. In dieser werden Proben verdünnt, die eine optische Dichte von über 0,5 rel. AU aufweisen.

9.7.2. Biotrockenmasse

Zunächst wurde gravimetrisch das Leergewicht von getrockneten Reaktionsgefäßen (1,5 ml oder 5 ml) bestimmt. Anschließend wurden je 1 ml Probe (bei geringen optischen Dichten 5 ml) in die Reaktionsgefäße gefüllt (Dreifachbestimmung). Die Reaktionsgefäße wurden nun für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde für weitere Analysen aufbewahrt oder verworfen. Das Präzipitat wurde über Nacht im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet und vor dem Wiegen im Exsikkator abgekühlt. Die Differenz der Wägungen ergab die BTM.

9.7.3. Glucosekonzentration

Die Überstände aus der BTM-Bestimmungen dienten u. a. für die Bestimmung der Glucosekonzentration mittels YSI 2900D, wobei bei Glucosewerten über 10 g/l die Proben erneut und in verdünnter Form gemessen wurden.

9.7.4. Ethanolkonzentration

Die Ethanolkonzentration wurde mittels gaschromatographischen Verfahren (GC-2010 Plus) bestimmt. Es wurde eine Supelco 24160-U Silica-Kapillarsäule von Sigma-Aldrich mit den Maßen 100 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,5 µm verwendet. Die Probe wurde mit einem Injektionsvolumen 0,2 µl direkt auf die Säule aufgetragen. Als Trägergas diente Wasserstoff. Die Starttemperatur betrug 50 °C. Nach der Injektion wurde die Temperatur mit einer Rate von 10 °C/min bis auf 200 °C erhöht. Die Endtemperatur wurde 5 min gehalten. Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet. Um die Ethanolkonzentration quantifizieren zu können wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe von Ethanol vermessen und eine Kalibrationsgerade (s. Abb. 9.2) erstellt. Außerdem wurden alle Proben mit einem internen Standard (n-Proanol, 8 g/l) versehen.

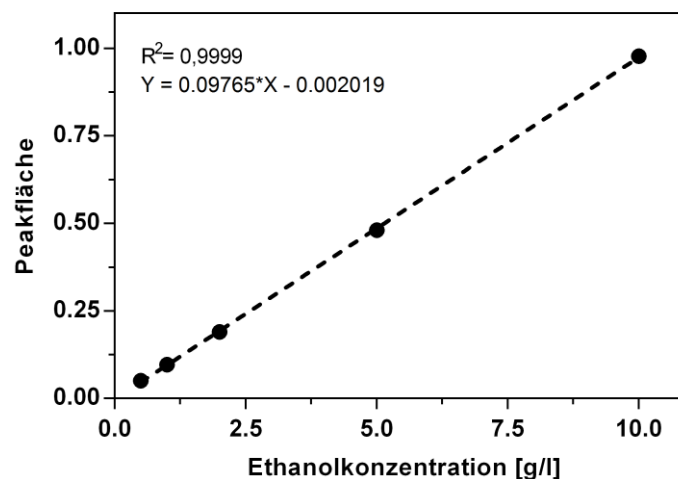


Abbildung 9.2: Kalibrationsgerade für Ethanol (gemessen mit GC-2010 plus).

9.7.5. Acetatkonzentration

Die Acetatkonzentration wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermittelt. Als Säule wurde eine Aminex HPX-87H mit den Maßen 300x7,8 mm (Temperatur von 55 °C) verwendet. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben zunächst zentrifugiert und filtriert (ggf. wurde eine Carrez-Fällung durchgeführt). Als Eluent diente Schwefelsäure (5 mM) mit einer Fließrate von 0,6 ml/min. Als Detektor

wurde ein RI-Detektor (Brechungsindex) verwendet. Um die Ethanolkonzentration quantifizieren zu können, wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe von Acetat vermessen.

9.7.6. Fluoreszenzmessungen mit Hitachi F-7000

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren von offline-Proben einer *E. coli* K1-Kultivierung wurde das Hitachi F-7000 (Hitachi, Japan) verwendet. Zur Messung wurden je 300 µl der Zellkultur auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die verwendeten Geräteeinstellungen sind in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

Tabelle 9.4: Geräteeinstellungen der Fluoreszenzmessung mit dem Hitachi F-7000.

Exzitation	200 bis 600 nm
Emission	210-610 nm
Schrittweite Ex/Em	10 nm
Scan-Geschwindigkeit	30.000 nm/min
Photomultiplierspannung	700 V

9.8. Chemometrische Analyse und Modellierung

Die PCA- und PLS-Modelle wurden mit Hilfe der Unscrambler X[®] Software durchgeführt. Es wurde keine Datenvorprozessierung wie Kultur-Medium-Subtraktion, Glättung und Normalisierung der Fluoreszenzdaten angewendet. Bei der PLS-Regression wurden die Daten um den Mittelwert zentriert und anschließend wurde eine vollständige Kreuzvalidierung mittels *Nonlinear Iterative Partial Least Squares* (NIPALS) Algorithmus durchgeführt. Für die Biomassevorhersage wurde ein PLS-Modell aus fünf von sechs Kultivierungen erstellt und anschließend wurde die ausgeschlossene Kultivierung für eine unabhängige Vorhersage verwendet.

9.9. Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellpellets (s. Abschnitt 9.4.3) wurden mittels Ultraschallsonde (Amplitude = 90 %, Zyklus = 0,6 s) aufgeschlossen. Während und nach dem Aufschluss

wurden die Proben in Eis gelagert. Der Aufschluss wurde sechsmal für eine Dauer von 15 Sekunden wiederholt. Zwischen jeder Probenbeschallung war eine 15 Sekunden lange Pause. Die Proben wurden für 10 Minuten bei einer Drehzahl von 13.500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die übergebliebenen Zelltrümmer wurden mit 300 µl Lysis-Puffer versetzt, resuspendiert und 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss von größeren Biomassen (6 g Feuchtmasse) für die Aufreinigung über eine IMAC-Säule (s. Abschnitt 9.11) fand in Bindungspuffer statt (200 mg Feuchtbio-masse pro ml Bindungspuffer). Anschließend fand ein analoger Aufschluss mittels Ultraschallsonde statt. Mit der Ausnahme, dass die Gesamtzeit des Aufschlusses auf 5 min verlängert wurde. Das Zellysate wurde für 1 h bei voller Drehzahl (4.700 rpm, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

9.10. SDS-PAGE

Zunächst wurden SDS-Gele zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach Auspolymerisieren eines 10 %igen Trenngels wurde ein 6 %iges-Sammelgel über das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Die Proben wurden im 1:1-Verhältnis mit vorbereitetem Laemmli-Puffer versetzt und für 5-10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden bei voller Drehzahl (13.500 rpm) für 1 min zentrifugiert und auf ein Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker aufgetragen (2-5 µl). Das Gel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer überführt und die gelelektrophoretische Auftrennung wurde gestartet (100-150 V). Sobald die Bromphenolblau-Bande am unteren Ende des Gels angekommen war, wurde der Gellauf beendet (ca. 2 h). Das Gel wurde anschließend mittels kolloidaler Coomassie-Färbung angefärbt. Hierfür wurde das SDS-PAGE-Gel nach dem Gellauf kurz mit demineralisiertem Wasser gespült und für 15-20 min in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurde das Gel in kolloidale Coomassie-Färbelösung überführt und es wurde über Nacht auf einer Schüttelplatte inkubiert. Mittels wiederholtem Waschen mit demineralisiertem Wasser wurde am darauffolgenden Tag das Gel entfärbt, bis der Hintergrund des Gels farblos ist.

9.11. FPLC

Für die Aufreinigung des Zielproteins wurde eine GE Healthcare HiTrap NTA-IMAC Säule (5 ml) verwendet. Die Säule war mit Co^{2+} -Metallionen beladen. Die Aufreinigung des Zelllysats (s. Abschnitt 9.9.) fand nach einem auf Herstellerangaben basierenden, weiterentwickeltem Protokoll statt. Das Zelllysat wurde über einen Pufferschlauch auf die Säule aufgetragen. Der Fluoreszenzsensor wurde über einen Adapter mit einer Durchflussküvette vor den UV-Detektor der FPLC-Anlage (Bio-Rad, München) geschaltet.

- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 5 min, 3 ml/min
- Isocratic Flow (Probe): 16 min, 2,5 ml/min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 15 min, 2,5 ml/min
- Isocratic Flow (Elutionspuffer): 10 min, 3 ml/min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 15 min, 3 ml/min
- (Isocratic Flow (Wasser und Ethanol 20 %): je 6 min, 3 ml/min)^a

^a für die Lagerung der Säule

Das Eluat, das Voreluat, sowie der Durchfluss wurden anschließend in Fraktionen von je 2 ml durch einen Probensammler aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert.

9.12. Bestimmung der GFP-GST Konzentration

Um die Konzentration an GFP-GST während einer Aufreinigung direkt quantifizieren zu können (s. Abschnitt 6.1), wurde zunächst nach den Vorschriften des Herstellers (Bio-Rad, München) ein Bradford-Assay mit dem Quick StartTM Bradford-Reagenz durchgeführt. Es wurden sowohl BSA-Proben als auch Proben eines GFP-GST-Standards, die aus einer Aufreinigung stammen, vermessen (s. Tabelle 8.5.6). Anschließend wurde über eine BSA-Kalibrationsgerade (s. Abb. 9.3a) die Proteinkonzentration der Standardproben bestimmt. Außerdem wurden definierte Volumen (s. Tabelle 8.5.6) des Standards in die FPLC-Anlage injiziert und mit dem Fluoreszenzsensor analog zur Aufreinigung (s. Abschnitt 9.11) vermessen. Anschließend wurden die Peakflächen der Standardproben mittels der Software Graph Pad Prism (Camo, Norwegen) ausgewertet (s. Abb. 9.3b) und für die Erstellung einer GFP-GST-Kalibrationsgerade genutzt (s. Abb. 9.3c).

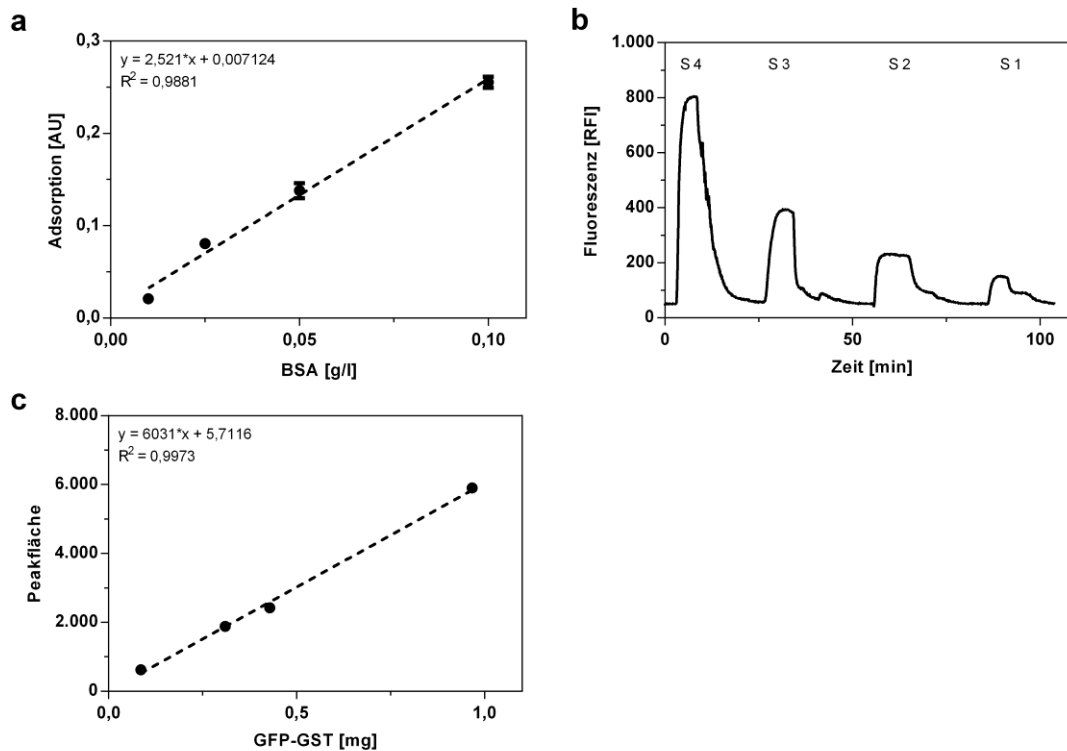


Abbildung 9.3: Bestimmung der GFP-GST Konzentration. (a) BSA-Kalibrationsgerade (Bradford), (b) Fluoreszenzmessung von GFP-GST (FPLC-Anlage) und (c) GFP-GST-Kalibrationsgerade (Fluoreszenzpeak gegen Bradfordkonzentration von GFP-GST)

9.13. Enzymkinetik

Zur Aufnahme der Enzymkinetik wurde die Umsetzung verschiedener Ethanolkonzentrationen mittels ADH (s. Tab. 9.3) mit dem Sensor (mit Ingold-Adapter) gemessen. Zur Verdünnung wurde Ethanol (99,8 %) und PBS-Puffer (pH-Wert von 8,8) verwendet. Pro Ansatz (Dreifachbestimmung) wurden 22,5 ml in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Vor Beginn der Messung wurden zusätzlich je 100 μ l NAD-Stammlösung (7,96 mg/1,2 ml; 0,044 mmol) und ADH-Stammlösung (3,95 mg/1,2 ml; 0,1 μ mol) in das Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde anschließend durch kurzes Schwenken vermischt und die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 1 min mit dem Sensor überwacht. Zur Erstellung des Michaelis-Menten-Plots wurden die gemittelten Anfangsgeschwindigkeiten für jede Verdünnungsstufe bestimmt und anschließend gegen die Ethanolkonzentration aufgetragen. Mithilfe des Programms Graph Pad Prism wurden nun der K_M -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

Tabelle 9.5: Ethanolkonzentrationen zur Bestimmung der ADH Kinetik

Konzentration Ethanol
0,25 · 10 ⁻² mol/l
0,5 · 10 ⁻² mol/l
1 · 10 ⁻² mol/l
1,5 · 10 ⁻² mol/l
2 · 10 ⁻² mol/l
3 · 10 ⁻² mol/l
4 · 10 ⁻² mol/l
6 · 10 ⁻² mol/l
8 · 10 ⁻² mol/l
0,1 mol/l
0,15 mol/l

10. Anhang Grafiken

10.1. Sensorkomponenten

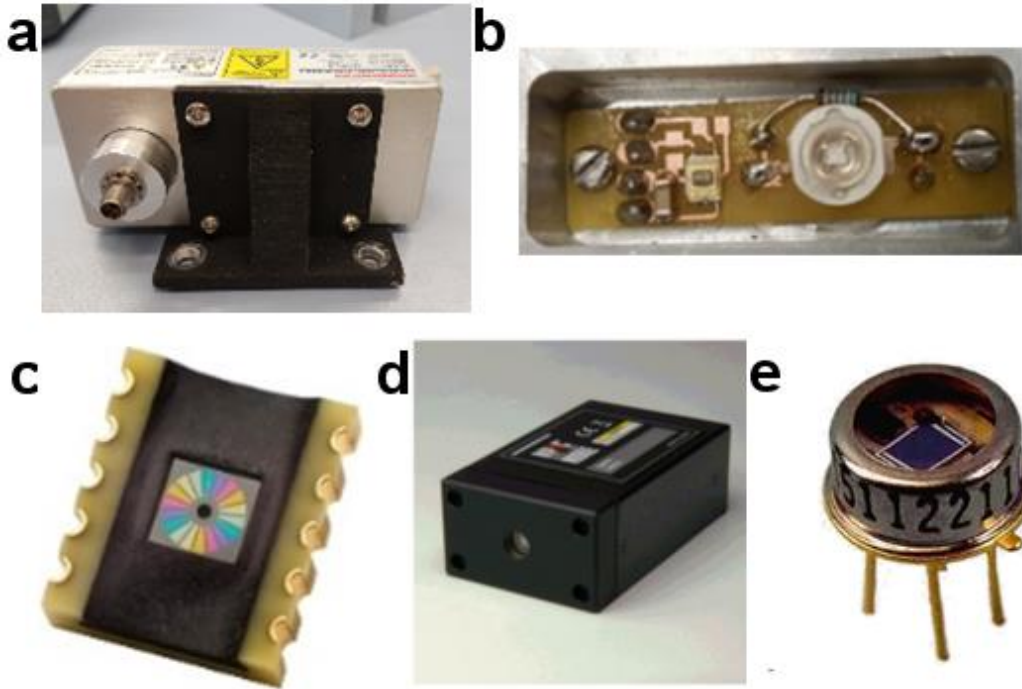


Abbildung 10.1: Grafiken der getesteten Sensorkomponenten. (a) Xenon-Blitzlampe, (b) High-Power-LED, (c) MMSC6 [76], (d) MPPC [77] und (e) Photodiode.

10.2. Lichtleiter

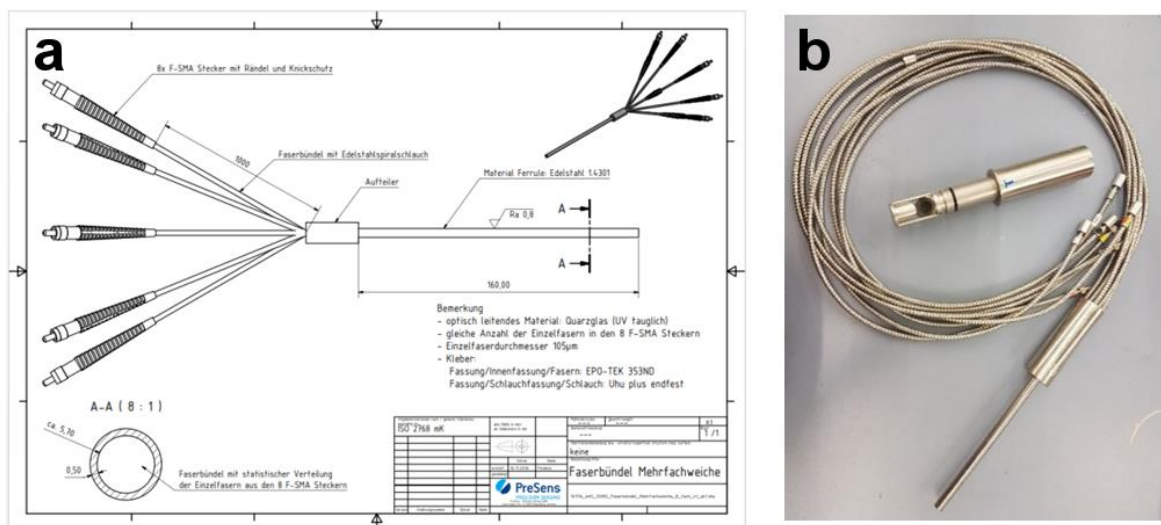


Abbildung 10.2: Lichtleiter des Sensors. (a) Konstruktionsskizze, (b) Foto des Lichtleiters.

10.3. Streulichtmessung *E. coli* K1

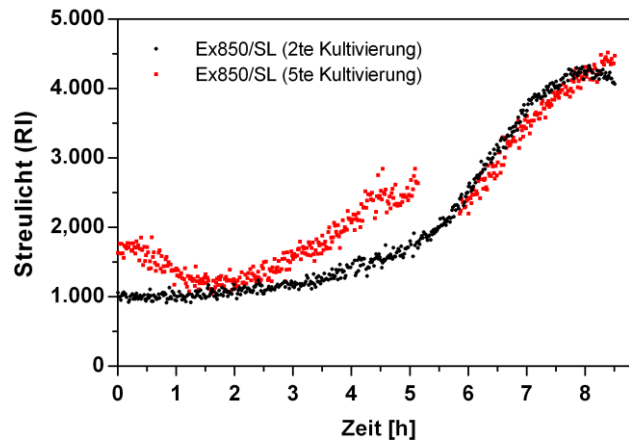


Abbildung 10.3: Streulichtwerte der zweiten und fünften *E. coli* K1-Kultivierung.

10.4. Bäckerhefeversuche

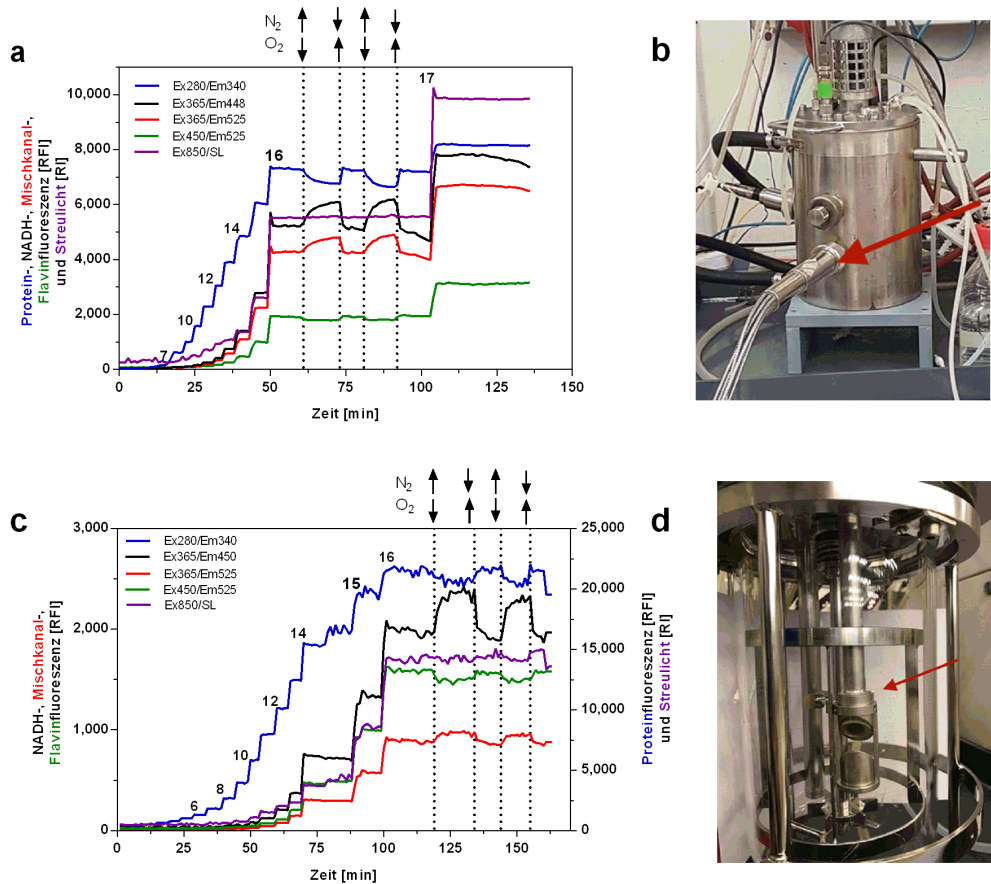


Abbildung 10.4: Bäckerhefeversuche (s. Abschnitt 9.5.1). (a und b) Edelstahlreaktor, (c und d) Glasreaktor

11. Publikationsliste

Fachartikel

J. C. König (80 %), T. Steinwedel, D. Solle, P. Lindner, I. de Vries, T. Hentrop, M. Findeis, G. T. John, Thomas Scheper, Sascha Beutel: Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. *J. Sens. Sens. Syst.* 2018, 7: 461-467.

S. Alemdar, **J. C. König (30 %)**, K. Seidel, A. Kirschning, T. Scheper, S. Beutel: Substrate specificity of α -humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith and determination of kinetic constants by a spectrophotometric assay. *Eng Life Sci* 2018, 18(9):654-658.

S. Alemdar, **J. C. König (10 %)**, S. Hartwig, T. Frister, T. Scheper, S. Beutel: Bioproduction of alpha-humulene in metabolically engineered *Escherichia coli* and application in zerumbone synthesis. *Eng Life Sci* 2017, 17(8):900–907.

S. Alemdar, S. Hartwig, T. Frister, **J. C. König (30%)**, T. Scheper, S. Beutel: Heterologous expression, purification and biochemical characterization of alpha-humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *ABAB* 2016, 178(3):474-89.

Posterbeiträge

J. C. König, T. Steinwedel, D. Solle, I. de Vries, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper, S. Beutel (2017): Untersuchung von *E. coli* K1 batch-Kultivierungen mit einem neuartigen Fluoreszenzsensor, 13. Dresdner Sensor-Symposium, Dezember 4-6, 2017, Dresden, Germany.

J. C. König, G. T. John, M. Findeis, T. Scheper, S. Beutel (2016): Entwicklung eines neuartigen 2D-Fluoreszenzsensors für die Online-Überwachung von Bioprozessen, 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 2016.

S. Alemdar, S. Hartwig, T. Frister, **J. C. König**, T. Scheper, S. Beutel (2015): Towards the biocatalytic production of alpha-humulene: Recombinant expression and characterization of alpha-humulene synthase from *Z. zerumbet* Smith, Bioflavour 2015.

Vorträge

J. C. König, T. Steinwedel, D. Solle, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper, S. Beutel (2018): Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses, 18th European Congress On Biotechnology, 1-4 July, 2018, Geneva, Switzerland.

S. Alemdar, S. Hartwig, T. Frister, **J. C. König**, T. Scheper, S. Beutel: A semi-synthetic route for zerumbone production using metabolically engineered *Escherichia coli* and transition metal catalysis. 8th International Congress on Biocatalysis, 28.08.2016-01.09.2016, Hamburg-Harburg.

12. Unterstützende Arbeiten

Mitarbeit an Experimenten

An einigen praktischen Experimenten waren neben dem Autor der vorliegenden Arbeit auch folgende Personen beteiligt:

- Kapitel 5.1.3: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Bioreaktorkultivierung mit Jana Schlaugat, M. Sc., Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- Kapitel 5.2.2: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Bioreaktorkultivierung mit Pia Gellermann, M. Sc., Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- Kapitel 5.2.3: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Bioreaktorkultivierung mit Florian Aupert, M. Sc., und Jens Claßen, M. Sc., Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.

Betreute Arbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

- Tobias Steinwedel: Evaluierung eines neuen *in-situ* Fluoreszenzensors für die Überwachung von Bioprozessen. Masterarbeit im Studienfach Life Science, September 2017. Teilergebnisse in Kapitel 4.1.3, Kapitel 5 und Kapitel 6.2.
- Marc Buttkewitz: Online-Überwachung von Bioprozessen mit einem neuen *in situ* Fluoreszenzsensor. Bachelorarbeit im Studienfach Chemie, Juli 2018. Teilergebnisse in Kapitel 5.1.2.

13. Literaturverzeichnis

- [1] Faassen, S. M., Hitzmann, B., Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2015, 15, 10271–10291.
- [2] Claßen, J., Aupert, F., Reardon, K. F., Solle, D. et al., Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2017, 409, 651–666.
- [3] Marose, S., Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Trends in Biotechnology* 1999, 17, 30–34.
- [4] Stärk, E., Hitzmann, B., Schügerl, K., Scheper, T. et al., In-situ-fluorescence-probes: A useful tool for non-invasive bioprocess monitoring. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2002, 74, 21–38.
- [5] Oh, S.-K., Yoo, S. J., Jeong, D. H., Lee, J. M., Real-time estimation of glucose concentration in algae cultivation system using Raman spectroscopy. *Bioresource technology* 2013, 142, 131–137.
- [6] Landgrebe, D., Haake, C., Höpfner, T., Beutel, S. et al., On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 88, 11–22.
- [7] Clavaud, M., Roggo, Y., Daeniken, R. von, Liebler, A. et al., Chemometrics and in-line near infrared spectroscopic monitoring of a biopharmaceutical Chinese hamster ovary cell culture: prediction of multiple cultivation variables. *Talanta* 2013, 111, 28–38.
- [8] Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C. et al., A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2007, 44, 683–700.
- [9] Ulber, R., Frerichs, J.-G., Beutel, S., Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2003, 376, 342–348.
- [10] Harrison, D. E. F., Chance, B., Fluorimetric Technique for Monitoring Changes in the Level of Reduced Nicotinamide Nucleotides in Continuous Cultures of Microorganisms. *Applied Microbiology* 1970, 19, 446–450.
- [11] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd Ed., Springer Science+Business Media LLC, Boston, MA 2006.
- [12] Tsien, R. Y., The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 1998, 67, 509–544.
- [13] Li, J. K., Humphrey, A. E., Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 1991, 37, 1043–1049.
- [14] Srinivas, S. P., Mutharasan, R., Inner filter effects and their interferences in the interpretation of culture fluorescence. *Biotechnology and bioengineering* 1987, 30, 769–774.
- [15] Ramanujam, N., Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2000, 2, 89–117.
- [16] Weber, G., Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 1950, 47, 114–121.
- [17] Teale, F. W. J., Weber, G., Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem. J.* 1957, 65, 476–482.
- [18] Gafni, A., Brand, L., Fluorescence decay studies of reduced nicotinamide adenine dinucleotide in solution and bound to liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 2002, 15, 3165–3171.
- [19] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2013.
- [20] Visser, A. J., Kinetics of stacking interactions in flavin adenine dinucleotide from time-resolved flavin fluorescence. *Photochemistry and photobiology* 1984, 40, 703–706.
- [21] Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.-M., Mayhew, S. G., Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. *Biochemistry* 2002, 13, 589–597.

- [22] Mataga, N., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Tanaka, F. et al., Femtosecond Fluorescence Dynamics of Flavoproteins: Comparative Studies on Flavodoxin, Its Site-Directed Mutants, and Riboflavin Binding Protein Regarding Ultrafast Electron Transfer in Protein Nanospaces. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 8917–8920.
- [23] Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E. et al., Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)* 2005, 308, 1635–1638.
- [24] Chubukov, V., Gerosa, L., Kochanowski, K., Sauer, U., Coordination of microbial metabolism. *Nature reviews. Microbiology* 2014, 12, 327–340.
- [25] Postma, P. W., Lengeler, J. W., Jacobson, G. R., Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews* 1993, 57, 543–594.
- [26] Fuhrer, T., Fischer, E., Sauer, U., Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of bacteriology* 2005, 187, 1581–1590.
- [27] Walker, J. E., The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly reviews of biophysics* 1992, 25, 253–324.
- [28] Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B. et al., Properties of the two terminal oxidases of Escherichia coli. *Biochemistry* 2002, 30, 3936–3942.
- [29] Unden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H. G. et al., Control of FNR function of Escherichia coli by O₂ and reducing conditions. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2002, 4, 263–268.
- [30] Veit, A., Polen, T., Wendisch, V. F., Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in Escherichia coli and reduction of aerobic acetate formation. *Applied microbiology and biotechnology* 2007, 74, 406–421.
- [31] Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F., The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in microbial physiology* 1998, 39, 205–234.
- [32] Holms, H., Flux analysis and control of the central metabolic pathways in Escherichia coli. *FEMS microbiology reviews* 1996, 19, 85–116.
- [33] Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W. A. et al., Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 2004, 186, 3516–3524.
- [34] Lei, F., Rotbøll, M., Jørgensen, S. B., A biochemically structured model for Saccharomyces cerevisiae. *Journal of biotechnology* 2001, 88, 205–221.
- [35] Hantelmann, K., Kollerker, M., Hüll, D., Hitzmann, B. et al., Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A novel approach for controlling fed-batch cultivations. *Journal of biotechnology* 2006, 121, 410–417.
- [36] Scheper, T., Schügerl, K., Culture fluorescence studies on aerobic continuous cultures of Saccharomyces cerevisiae. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986, 23, 440–444.
- [37] Thomas Scheper, *Messung zellinterner und zellexterner Parameter zur Fermentationskontrolle*. Dissertation, Uni Hannover 1985.
- [38] Scheper, T., Lorenz, T., Schmidt, W., Schügerl, K., On-line measurement of culture fluorescence for process monitoring and control of biotechnological processes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1987, 506, 431–445.
- [39] Beutel, S., Henkel, S., In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, 91, 1493–1505.
- [40] Gahlawat, G., Srivastava, A. K., Use of NAD(P)H fluorescence measurement for on-line monitoring of metabolic state of Azohydromonas australica in poly(3-hydroxybutyrate) production. *Applied biochemistry and biotechnology* 2013, 169, 821–831.
- [41] Surribas, A., Amigo, J. M., Coello, J., Montesinos, J. L. et al., Parallel factor analysis combined with PLS regression applied to the on-line monitoring of Pichia pastoris cultures. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2006, 385, 1281–1288.
- [42] Lindemann, C., Marose, S., Scheper, T., Nielsen, H. O. et al., Fluorescence Techniques for Bioprocess Monitoring, in: Flickinger, M. C. (Ed.), *Encyclopedia of bioprocess technology*:

- Fermentation, biocatalysis, and bioseparation. Wiley biotechnology encyclopedias*, Wiley, New York, NY 1999.
- [43] Mortensen, P. P., Bro, R., Real-time monitoring and chemical profiling of a cultivation process. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2006, 84, 106–113.
- [44] Eliasson Lantz, A., Jørgensen, P., Poulsen, E., Lindemann, C. et al., Determination of cell mass and polymyxin using multi-wavelength fluorescence. *Journal of biotechnology* 2006, 121, 544–554.
- [45] Jain, G., Jayaraman, G., Kökpinar, Ö., Rinas, U. et al., On-line monitoring of recombinant bacterial cultures using multi-wavelength fluorescence spectroscopy. *Biochemical Engineering Journal* 2011, 58-59, 133–139.
- [46] Johansson, L., Lidén, G., A study of long-term effects on plasmid-containing *Escherichia coli* in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorimetry. *Biotechnology progress* 2006, 22, 1132–1139.
- [47] Misturini Rossi, D., Solle, D., Hitzmann, B., Ayub, M. A. Z., Chemometric modeling and two-dimensional fluorescence analysis of bioprocess with a new strain of *Klebsiella pneumoniae* to convert residual glycerol into 1,3-propanediol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2012, 39, 701–708.
- [48] Rønnest, N. P., Stocks, S. M., Eliasson Lantz, A., Gernaey, K. V., Introducing process analytical technology (PAT) in filamentous cultivation process development: Comparison of advanced online sensors for biomass measurement. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2011, 38, 1679–1690.
- [49] Odman, P., Johansen, C. L., Olsson, L., Gernaey, K. V. et al., Sensor combination and chemometric variable selection for online monitoring of *Streptomyces coelicolor* fed-batch cultivations. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 86, 1745–1759.
- [50] Haack, M. B., Lantz, A. E., Mortensen, P. P., Olsson, L., Chemometric analysis of in-line multi-wavelength fluorescence measurements obtained during cultivations with a lipase producing *Aspergillus oryzae* strain. *Biotechnology and bioengineering* 2007, 96, 904–913.
- [51] Boehl, D., Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization. *Journal of biotechnology* 2003, 105, 179–188.
- [52] Surribas, A., Geissler, D., Gierse, A., Scheper, T. et al., State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology* 2006, 124, 412–419.
- [53] Hisiger, S., Jolicoeur, M., A multiwavelength fluorescence probe: Is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of biotechnology* 2005, 117, 325–336.
- [54] Haack, M. B., Eliasson, A., Olsson, L., On-line cell mass monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* cultivations by multi-wavelength fluorescence. *Journal of biotechnology* 2004, 114, 199–208.
- [55] Bonk, S., Sandor, M., Rüdinger, F., Tscheschke, B. et al., In-situ microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation. *BMC proceedings* 2011, 5 Suppl 8, P76.
- [56] Hisiger, S., Jolicoeur, M., Plant cell culture monitoring using an in situ multiwavelength fluorescence probe. *Biotechnology progress* 2005, 21, 580–589.
- [57] Lever, J., Krzywinski, M., Altman, N., Points of Significance: Principal component analysis. *Nat Meth* 2017, 14, 641–642.
- [58] Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P., Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1987, 2, 37–52.
- [59] Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Shuga, J., Wang, X. et al., Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nature biotechnology* 2014, 32, 1053.

- [60] Kessler, W., *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik: Ein Lehrbuch*, 1st Ed., 2008.
- [61] Geladi, P., Kowalski, B. R., Partial least-squares regression: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 1986, 185, 1–17.
- [62] Steinwedel, T., Evaluierung eines neuen in-situ Fluoreszenzsensors für die Überwachung von Bioprozessen. Masterarbeit im Studiengang Life Science.
- [63] Guo, X.-J., Sun, X.-D., Xu, S.-K., Spectroscopic investigation of the interaction between riboflavin and bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 2009, 931, 55–59.
- [64] Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A. et al., Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase. *Acta naturae* 2015, 7, 22–33.
- [65] SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., SAIGA, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology* 1962, 59, 223–239.
- [66] SHIMOMURA, O., Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters* 1979, 104, 220–222.
- [67] García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A. et al., Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial cell factories* 2005, 4, 27.
- [68] Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., Rinas, U., Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, 91, 1203–1213.
- [69] Walsh, G., Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature biotechnology* 2014, 32, 992–1000.
- [70] Rieger, M., KAPPELI, O., FIECHTER, A., The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By Saccharomyces Cerevisiae. *Microbiology* 1983, 129, 653–661.
- [71] Claßen, J., A Novel LED-Based 2D-Fluorescence Spectroscopy System for In-line Bioprocess Monitoring of Chinese Hamster Ovary Cell Cultivations- Part II. *Engineering in Life Sciences* Eingereicht 2018.
- [72] Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., Takors, R. (Eds.), *Industrielle Mikrobiologie*, Springer Spektrum, Berlin 2013.
- [73] Pia Gellermann, *Produktion von Biopolymeren für Biomedizinanwendungen*, Hannover laufende Dissertation.
- [74] Vries, I. de, Busse, C., Kopatz, J., Neumann, H. et al., Polysialic acid production using Escherichia coli K1 in a disposable bag reactor. *Eng. Life Sci.* 2017, 17, 723–731.
- [75] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L. et al., Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004, 25, 1327–1333.
- [76] PEO Electro Optics, MMCS6CS Multi Spectral Sensor – Mazet [Internet], 2018 [modified 2018 Dec 13]. Available from: <https://www.peo-electro-optics.com/product/mmcs6cs-multi-spectral-sensor-mazet/?lang=en>.
- [77] HAMAMATSU, MPPC-Modul [Internet], 2018 [modified 2018 Dec 13]. Available from: <https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/type/C13366-1350GA/index.html>.

14. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Aromatische Aminosäuren: (a) Phenylalanin, (b) Tyrosin und (c) Tryptophan	6
Abbildung 3.2: Fluoreszenzaktive Coenzyme. t.	7
Abbildung 3.3: Glucosestoffwechsel in <i>E. coli</i> . (PTS) Phosphotransferase-System.	9
Abbildung 3.4: Ausschnitt aus der Energiegewinnung bei Hefen unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	12
Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau des Bioviews® [1].	13
Abbildung 3.6: Bildung von Hauptkomponenten (PC-1 und PC-2)	15
Abbildung 3.7: PCA der mRNA aus 301 einzelnen Zellen.	16
Abbildung 4.1: Normalisierte Spektren der verwendeten LEDs.....	20
Abbildung 4.2: Testung verschiedener Detektortypen.....	21
Abbildung 4.3: Transmissionsspektren der verwendeten Bandpässe.....	22
Abbildung 4.4: Achtarmiger Lichtleiter mit statistisch verteilten Fasern.	24
Abbildung 4.5: Aufbau des Funktionsmusters.....	25
Abbildung 4.6: Monitordiodenmessung.....	26
Abbildung 4.7: 2D-Fluoreszenzspektren verschiedener Fluorophore.....	27
Abbildung 4.8: Selektivitätstests des Sensors für einzelne Fluorophore	29
Abbildung 4.9: Übersicht der verschiedenen Adapter.	30
Abbildung 4.10: Überprüfung des Einflusses der Sensorkappe auf das Messsignal bei schrittweiser Zugabe von Hefesuspension.....	32
Abbildung 5.1: <i>E. coli</i> K1 Batch-Kultivierung in definiertem Medium im 10 l-Reaktormaßstab...	34
Abbildung 5.2: Vergleich der norm. Fluoreszenzdaten von verschiedenen Fluoreszenzgeräten.....	35
Abbildung 5.3: PCA der Fluoreszenzdaten von sechs <i>E. coli</i> K1-Kultivierungen.	37
Abbildung 5.4: Biomassevorhersage einer <i>E. coli</i> K1-Kultivierung mit dem Fluoreszenzsensor. ...	39
Abbildung 5.5: Fed-Batch-Kultivierungen von <i>E. coli</i> BL21 (nur Feed-Phase).....	42
Abbildung 5.6: Überwachung der Proteinproduktion von GFP in <i>E. coli</i> BL21 bei unterschiedlichen Induktionszeitpunkten.....	45
Abbildung 5.7: SDS-PAGE mit den Proben der <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Kultivierung zur heterologen Proteinproduktion von GFP-GST.....	47
Abbildung 5.8 Induzierte Stoffwechseländerung von <i>S. cerevisiae</i> durch Veränderung der Begasung.....	49
Abbildung 5.9: Fluoreszenz-, Trübungs- und Offline-Daten einer Batch-Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	50
Abbildung 5.10: Detektion des Crabtree-Effekts durch Glucose-Feed bei <i>S. cerevisiae</i>	52
Abbildung 5.11: Hochzelldichtekultivierung von <i>K. phaffii</i>	54
Abbildung 5.12: CHO-Kultivierung.	56
Abbildung 6.1: Co-NTA-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des Fusionsproteins GFP-GST-His6.	59
Abbildung 6.2: SDS-PAGE mit den Proben einer Co-NTA-Affinitätschromatographie.	60
Abbildung 6.3: Michaelis-Menten-Kinetik der Alkoholdehydrogenase	61
Abbildung 9.1: Prozessparameter des ORK-Feeders für eine <i>E. coli</i> BL21 Fed-Batch-Kultivierung.	82
Abbildung 9.2: Kalibrationsgerade für Ethanol (gemessen mit GC-2010 plus).	87
Abbildung 9.3: Bestimmung der GFP-GST Konzentration.	91
Abbildung 10.1: Grafiken der getesteten Sensorkomponenten.....	93
Abbildung 10.2: Lichtleiter des Sensors. (a) Konstruktionsskizze, (b) Foto des Lichtleiters.	93
Abbildung 10.3: Streulichtwerte der zweiten und fünften <i>E. coli</i> K1-Kultivierung.	94
Abbildung 10.4: Bäckerhefeversuche	94

15. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Auflistung verschiedener biogener Fluorophore.....	5
Tabelle 3.2: Applikationsbeispiele des Bioview® für die Bioprozessüberwachung verschiedener Organismen.....	14
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der getesteten Sensorkomponenten.....	19
Tabelle 4.2: Vergleich des linearen Messbereichs von MPPC, Bioview und Photodiode incl. Limit of Quantification (LOQ).....	23
Tabelle 4.3: Zusammenfassung der wichtigen Messkanäle des Sensors.....	27
Tabelle 8.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	67
Tabelle 8.2: Auflistung des Verbrauchmaterials.....	68
Tabelle 8.3: Verwendete Vektoren und Stämme.....	69
Tabelle 8.4: Auflistung der verwendeten Proteine und Enzyme.....	69
Tabelle 8.5: Auflistung der Laborgeräte.....	69
Tabelle 8.6: Zusammenfassung der verwendetet High-Power LEDs und Photodioden.....	70
Tabelle 8.7: Zusammenfassung der verwendeten Bandpässe.....	70
Tabelle 8.8: Auflistung der verwendeten Software.....	71
Tabelle 8.9: Antibiotikum-Stammlösung.....	71
Tabelle 8.10: Zusammensetzung des 10x PBS-Puffers.....	71
Tabelle 8.11: Zusammensetzung des LB-Mediums (pH-Wert 7,5).....	72
Tabelle 8.12: Schatzmann-Medium (pH-Wert 5,4).....	72
Tabelle 8.13: Spurenelemente für das Schatzmann-Medium.....	72
Tabelle 8.14: Definiertes Medium für <i>E. coli</i> K1-Kultivierungen (pH-Wert 7,5).....	73
Tabelle 8.15: Definiertes Medium für <i>E. coli</i> B121-Batch-Kultivierungen (pH-Wert 6,9).....	73
Tabelle 8.16: Feed-Medium für <i>E. coli</i> B121 Fed-Batch-Kultivierungen (pH-Wert 6,9).....	74
Tabelle 8.17: Modifiziertes ZYP-31-Medium für die heterologe GFP-Produktion (pH-Wert 7,5).....	74
Tabelle 8.18: YPD-Medium (pH-Wert 5).....	75
Tabelle 8.19: Oehler Medium (pH-Wert 5).....	75
Tabelle 8.20: Lysis-Puffer (links; pH-Wert 8) und Extraktionspuffer (rechts; pH-Wert 8).....	75
Tabelle 8.21: Auflistung der verschiedenen Lösungen für eine SDS-PAGE.....	76
Tabelle 8.22: Auflistung der verwendeten FPLC-Puffer.....	77
Tabelle 8.23: BSA-Verdünnungsreihe für die GFP-Kalibration und Volumen der GFP-GST-Standards ^a	77
Tabelle 9.1: Stammlösungen und Verdünnungsstufen von Modellsubstanzen.....	79
Tabelle 9.2: <i>Design of Experiment</i> der verschiedenen Mischlösungen.....	80
Tabelle 9.3: Zellsuspensionszugabe von Bäckerhefe und Begasungsexperimente.....	84
Tabelle 9.4: Geräteeinstellungen der Fluoreszenzmessung mit dem Hitachi F-7000.....	88
Tabelle 9.5: Ethanolkonzentrationen zur Bestimmung der ADH Kinetik.....	92

16. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jan Christoph König
Geburtsdatum/ -ort: 27. Dezember 1989/ Hannover
Nationalität: Deutsch

Schulische und akademische Ausbildung

Seit 10/2015 Leibniz Universität Hannover, Promotion in der Chemie
Promotionsthema: Entwicklung und Charakterisierung eines
neuen Fluoreszenzensors für die online-Bioprozessüberwachung

10/2012 - 06/2015 Medizinische Hochschule Hannover, M. Sc. in Biochemie
Thema der Masterarbeit: Produktion und Charakterisierung einer
 α Humulensynthase zur biotechnologischen Herstellung von
Terpenen

10/2009 – 09/2012 Leibniz Universität Hannover, B. Sc. in Biochemie
Thema der Bachelorarbeit: Zielgerichtete Mutagenese an
Myosinmotordomänen und biophysikalische
Proteincharakterisierung

08/2000 – 07/2009 Lauenburgische Gelehrtenschule Ratzeburg, Abitur

Berufliche Erfahrungen

07/2015 – 07/2018 Wissenschaftliche Hilfskraft/ Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover,
Hannover

03/2017 – 05/2017 Honorarkraft, Deutsche Messe AG, smartLAB, Hannover