

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung eines
hydrophoben Spinnenseidenproteins mit *Escherichia coli***

Georg Faust

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Oliver Lieleg
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 10.09.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 17.11.2014 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen und ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlich bedanken!

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz bedanke ich mich sehr für die hervorragende Unterstützung, dem vertrauensvollen Einräumung von Freiheiten, die hilfreichen Vorschläge und Anregungen während unserer freundlichen Gespräche sowie für die Möglichkeit ein sehr aktuelles und anwendungsorientiertes Thema bearbeiten zu dürfen.

Beim Coreferenten Prof. Dr. rer. nat. Johannes Buchner und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. rer. nat. Oliver Lieleg bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Christoph Bendig, Martin Schmidt, Tobias Kraxenberger und Lin Römer (AMSilk GmbH) danke ich sehr für die konstruktive und offene Zusammenarbeit sowie die vielen fachlichen Unterstützungen.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik bedanke ich mich herzlich für die wunderbare Zusammenarbeit und das großartige Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Christina Kantzow, Anna Groher, Christina Pfaffinger, Andreas Schmideder, Benjamin Kick und Christoph Bendig für das Korrekturlesen und gründliche Durchsehen meiner Dissertation.

Bei Christian Burger, Jacob Lory, Christina Pfaffinger, Sasha Trunz, Lisa Baier, Kathrin Doll, Simon Schulz, Mirko Beißner, Janina Edion, Werner Nelson, Aledandra Stand und Sebastian Meier bedanke ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten.

Meiner Familie und meiner Frau Johanna danke ich schließlich von ganzem Herzen für ihre vollste Unterstützung und dass sie mir in der spannenden Zeit stets den Rücken freigehalten haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Spinnenseide und Spinnenseidenproteine	7
3.1.1	Eigenschaften und Aufbau von Spinnenseide	7
3.1.2	Anwendungen von Spinnenseidenproteinen	12
3.1.3	Rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen	13
3.2	Kultivierung von Mikroorganismen	18
3.2.1	Kinetik von Wachstum und Produktbildung	18
3.2.2	Bilanzierung des idealen Bioreaktors	20
3.2.3	Kultivierung in Bioreaktoren verschiedener Maßstäbe	25
3.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> zur rekombinanten Proteinexpression	30
3.3.1	Zentraler Metabolismus von <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.2	Hochzelldichtekultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.3	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> und das T7-Expressionssystem	36
3.3.4	Metabolische Last als Stress durch die Expression	39
3.3.5	Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	40
3.3.6	Autoinduktion	42
3.3.7	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	43
4	Material und Methoden	45
4.1	Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten	45
4.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und Vektoren	45
4.1.2	Molekularbiologische Methoden	46
4.2	Medien, Puffer und Lösungen	48
4.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	53
4.3.1	Kultivierung im Schüttelkolben	53
4.3.2	Parallele Kultivierung im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab	54
4.3.3	Parallele Kultivierung im Liter-Maßstab mit 0,5 L Startvolumen	58
4.3.4	Kultivierung in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab	59
4.4	Analytische Methoden	63
4.4.1	Bestimmung der Zellkonzentration	63
4.4.2	Bestimmung der C16-Konzentration	63
4.4.3	Fluoreszenzmessung der eGFP-Konzentration	67
4.4.4	Bestimmung der Acetat-, Ammonium- und Zuckerkonzentrationen sowie der Invertase-Aktivität	67

5	Skalierbarkeit zwischen Liter- und Milliliter-Maßstab	69
5.1	Hochzelldichtekultivierung zur Herstellung von C16	69
5.2	Intermittierender Zulauf und Skalierung in den Milliliter-Maßstab	72
5.2.1	Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab	72
5.2.2	Abhängigkeit der Expression von der Zulaufstrategie	75
5.3	Satzkultivierung mit Autoinduktionsmedien	80
5.4	Einfluss des Leistungs- und Sauerstoffeintrags	83
5.5	Einfluss möglicher Nebenprodukte	87
5.6	Verdünnung des Mediums zum Einsatz verringerter Zelldichten	90
6	Medium	93
6.1	Hauptkomponenten im Satzmedium	93
6.2	Zulaufmedium: Magnesium, Ammonium, Komplexbestandteile	96
6.3	Weitere Komponenten im Satzmedium	103
6.3.1	Calcium- und Natriumsalze	103
6.3.2	Spurenelemente Mangan und Cobalt	105
7	Wachstum	109
7.1	Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion	109
7.2	Wachstum bei Hochzelldichtekultivierungen	115
8	Induktion und Expression	121
8.1	Optimierung der Induktion	121
8.1.1	IPTG-Konzentration und Zelldichte	121
8.1.2	IPTG-Konzentration und Zulauftrate	126
8.1.3	Induktionszeitpunkt	130
8.1.4	Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit der schwachen Induktion	132
8.2	Autoinduktion	136
9	Alternative Kohlenstoffquellen	141
9.1	Glycerol, Fructose und Arabinose	141
9.2	Saccharose-verwertender <i>Escherichia coli</i>	145
9.2.1	Vergleich mit Referenzstamm	145
9.2.2	Eingrenzung der Ursache für die schlechte Expression von C16 mit dem Saccharose-verwertenden Stamm	146
9.2.3	Einfluss der Induktion	150
9.2.4	Zuckerrübenmelasse als Substrat	153
10	Zusammenfassung	157
	Literaturverzeichnis	162
	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	181
	Abbildungsverzeichnis	183
	Tabellenverzeichnis	186
	Anhang	189

1 Einleitung

Das Thema der vorliegenden Arbeit, die Herstellung synthetischer Spinnenseidenproteine, kann im weitesten Sinne der Bionik zugeordnet werden. Der Begriff Bionik (auch Biomimetik, engl. *biomimetics*) wurde in den 1960er Jahren geprägt (Bhushan, 2009) und beinhaltet die Untersuchung von biologischen Materialien, Mechanismen und Prozessen in der Natur, zu dem Zweck, diese auf technische Lösungen zu übertragen.

Praktiziert wird Bionik bereits wesentlich länger und es gibt mittlerweile zahlreiche eindrucksvolle Beispiele, von denen einige im Folgenden in Anlehnung an Bhushan (2009) exemplarisch dargestellt werden. So ließ sich Leonardo da Vinci vom Vogelflug inspirieren und fertigte Konstruktionszeichnungen für Fluggeräte an. Auch die Entwicklung von Flugzeugen wurde von der Natur beeinflusst. Das Prinzip von Klettfrüchten wurde in Form des weit verbreiteten Klettverschlusses bionisch umgesetzt. Weitreichende Folgen bionischer Entwicklung zeigte die sogenannte „Riblet“-Folie. Diese verringert den Reibungseffekt turbulent überströmter Oberflächen und wurde von den feinen Rillen der Haifischschuppen inspiriert. Damit kann der Widerstand um 5–10 % verringert werden. Anwendung findet dies bei Flugzeugen, Schiffen oder Schwimmanzügen. So wurden bei der Sommerolympiade 2008 vor allem aufgrund neuartiger Schwimmanzüge zahlreiche Weltrekorde gebrochen. Zu den bekanntesten Beispielen für Bionik zählt der „Lotus-Effekt“, bei dem Wasser von speziellen Oberflächen aufgrund einer sehr hohen Hydrophobizität in Tropfen abperlt und dabei Schmutzpartikel auf der Oberfläche mitnimmt. Dies hat zur Entwicklung selbstreinigender Oberflächen beispielsweise bei Fenstern und Fassadenfarben geführt.

Ein Feld der Bionik ist die Materialforschung und zu diesem Feld zählt auch Spinnenseide. Die Fasern sind ungewöhnlich stark und resistent gegen Wind, Regen und Sonnenlicht (Bhushan, 2009). Unabhängig vom bionischen Ansatz wird Spinnenseide aufgrund seiner besonderen Eigenschaften schon lange vom Menschen als Material genutzt. Mit natürlichen Spinnennetzen wurden bereits in der Antike blutende Wunden abgedichtet und Aborigines in Australien verwenden bis heute Netze oder Fäden aus Spinnenseide zum Fischen. Bis zum zweiten Weltkrieg wurden Spinnenseidenfäden als Fadenkreuze in optischen Geräten wie Mikroskopen oder Zielfernrohren eingesetzt (Heim et al., 2009; Gerritsen, 2002). Im Jahr 2012 wurde im *Victoria and Albert Museum* in London ein Umhang vorgestellt, der in 8 Jahren Arbeit komplett aus natürlicher Spinnenseide hergestellt wurde. In diesem Kunstprojekt wurden in Madagaskar mit unverhältnismäßigem Aufwand etwa 1,2 Millionen Goldene Radnetzspinnen gesammelt und deren Seiden geerntet (Chung et al., 2012). Entstanden war das größte aus natürlicher Spinnenseide produzierte Kleidungsstück.

Eine wirtschaftliche Produktion von Spinnenseide oder zumindest dem Grundstoff, den Spinnenseidenproteinen, ist hingegen nur mit Hilfe der Biotechnologie realisierbar. Gen-

technisch lassen sich heterologe, also „fremde“ Gene in Bakterien und Hefen einschleusen und durch die Expression heterologe Proteine herstellen. Zu den Vorteilen biotechnologischer Prozesse gehört das schnelle Wachstum der Mikroorganismen und die damit einhergehende rasche Biomasse- und Produktbildung. Die Prozesse sind grundsätzlich skalierbar, die Produktionskapazitäten lassen sich problemlos erweitern und damit ist grundsätzlich eine beliebige Menge an Zielprotein herstellbar. Zudem sind eine Vielzahl biotechnologischer Prozesse industriell etabliert. Neben organischen Säuren oder Alkoholen als Zwischenprodukte der chemischen Industrie werden vor allem für die pharmazeutische Anwendung Peptide wie Insulin oder komplexe Proteine wie Antikörper mit Hilfe von Mikroorganismen im großen Maßstab hergestellt.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Spinnenseide ist in Bezug auf ihre mechanischen Eigenschaften ein herausragendes Material (Gosline et al., 1999), kann jedoch in der natürlichen Form nur von Spinnen produziert werden. Daneben wird Seide auch von Insekten wie beispielweise dem Seidespinner produziert. Die Raupen dieses Schmetterlings werden vom Menschen seit langem für die Herstellung von Seide genutzt. Im Gegensatz zu Seidenspinnern sind Spinnen nicht für eine industrielle Massentierhaltung geeignet. Gründe hierfür sind der Kannibalismus und das Territorialverhalten der Spinnen sowie die niedrige Qualität der Seide, die von Spinnen in Gefangenschaft produziert wird (Heidebrecht und Scheibel, 2013). Eine rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen wird daher von Forschung und Industrie mit verschiedenen Ansätzen angestrebt. Vielversprechend und industriell am weitesten entwickelt ist vor allem die Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) (Scott, 2014).

Scheibel (2004) und seine Arbeitsgruppe haben an der TU München durch spezielle Klonierungsstrategien erfolgreich Spinnenseidengene in *E. coli* eingeschleust und Spinnenseidenproteine produziert. Die Proteinsequenz der Spinnenseidenproteine wurde unter Nutzung der *E. coli*-Codonverteilung in die DNA-Sequenz „revers“ translatiert, die einzelnen repetitiven Motive (sogenannte Module) wurden synthetisiert und mit Hilfe spezieller Klonierungskassetten multimerisiert. Für einen Zulaufprozess mit komplexem Medium und optischen Dichten (OD_{600}) von 40–50 wurde zunächst der *E. coli*-Stamm BLR(DE3) gewählt. Mit Hilfe des mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren T7-Expressionssystems konnte eine Reihe verschiedener synthetischer Spinnenseidengene intrazellulär produziert und nach Aufschluss der Zellen gewonnen werden (Huemmerich et al., 2004a).

Der Prozess wurde auch bereits im 10 L-Maßstab realisiert. Hierbei wurde ein definiertes Medium basierend auf Korz et al. (1995) mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle eingesetzt. Allerdings zeigte der verwendete *E. coli* BLR(DE3) im definierten Medium eine Auxotrophie für Isoleucin (Schmidt et al., 2007). Daher wurde auf *E. coli* HMS174(DE3) umgestellt, der genauso wie der *E. coli* BLR(DE3) defizient in der *recA* Rekombinase ist (Hardy und Scheibel, 2009). Aufgrund der fehlenden Rekombinase sind in diesen *E. coli*-Stämmen auch große repetitive Gene stabil. Mit diesem Stamm war nun der Einsatz komplett definierter Medien möglich. Produktkonzentrationen von über 500 mg L^{-1} Spinnenseidenprotein konnten damit erreicht werden (Hardy und Scheibel, 2009). Dies ist jedoch weit von den Produktkonzentrationen entfernt, die bei anderen rekombinant erzeugten Proteinen erreicht werden ($\sim 10 \text{ g L}^{-1}$, Choi et al., 2006).

Spinnenseidenproteine sind schwierig zu exprimieren. Gründe hierfür sind die repetitive Struktur, der hohe Gehalt der DNA-Basen Guanin und Cytosin in der Gensequenz (GC-Gehalt) und der hohe Glycin-Anteil der Proteine (Xia et al., 2010). Spinnenseidenproteine sind zudem sehr groß. Bei natürlichen Proteinen des Abseilfadens beträgt das

Molekulargewicht 250–350 kDa (Heim et al., 2009; Xia et al., 2010). Die von der Scheibel-Arbeitsgruppe entwickelten synthetischen Spinnenseidenproteine sind zwar etwas kleiner, liegen aber dennoch bei 40–120 kDa (Hardy und Scheibel, 2009). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf eines dieser Proteine, das rekombinante *Araneus diadematus* Fibroin 4 beziehungsweise eADF(C16) oder kurz C16. Das synthetische Spinnenseidenprotein C16 hat eine Größe von 47,7 kDa und enthält gerade mal acht verschiedene Aminosäuren (Huemmerich et al., 2004a). Die Aminosäureverteilung ist mit 34 % Glycin, 23 % Alanin, 17 % Prolin und 26 % anderen Aminosäuren sehr einseitig. Nur eine von 35 Aminosäuren ist sauer (Glutaminsäure) und keine einzige basisch. Damit ist das Protein sehr unpolar, hydrophob und sehr schlecht wasserlöslich (Huemmerich et al., 2004a), wodurch die rekombinante Produktion zusätzlich erschwert wird. Gleichzeitig aber gehört C16 zu den am besten untersuchten synthetischen Spinnenseidenproteinen und zahlreiche verschiedene Morphologien und Anwendungen wurden für dieses Protein entwickelt (Hardy et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit ist es daher den mikrobiellen Herstellungsprozess des hydrophoben C16-Spinnenseidenproteins mit *E. coli* reaktionstechnisch zu analysieren und damit Wege zur Prozessintensivierung aufzuzeigen. Hierfür standen Bioreaktoren verschiedener Maßstäbe zur Verfügung, unter anderem ein Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab (Puskeiler et al., 2005a; Weuster-Botz et al., 2005). Die hohe Parallelisierung sollte eine Vielzahl von Kultivierungen und damit eine schnelle und effiziente Prozessentwicklung ermöglichen. In diesem System wurden bereits zahlreiche Anwendungen erfolgreich gezeigt (Hortsch und Weuster-Botz, 2010b). Darunter fällt auch die Expression von Proteinen in *E. coli*, allerdings nur in Satzmedien (Hortsch und Weuster-Botz, 2010a). Die Untersuchung von Zulaufprozessen mit hohen Zelldichten für die Proteinproduktion in *E. coli* war bisher jedoch im Milliliter-Maßstab noch nicht erfolgt.

In einem ersten Schritt muss daher der im Liter-Maßstab im Rührkesselreaktor etablierte Referenzprozess zur Herstellung des C16-Proteins mit *E. coli* in den Milliliter-Maßstab übertragen werden. Hierbei ist eine Fragestellung, wie ein Zulaufprozess zur Erzielung hoher Zelldichten in diesem Maßstab realisiert werden kann.

Prozessintensivierung bedeutet in der vorliegenden Arbeit primär die Erhöhung der Produktkonzentration und Minimierung der Kosten für die Einsatzstoffe. Je höher die Produktkonzentration, desto geringer können die Kosten für die Einsatzstoffe sein und desto günstiger ist oftmals die Produktaufbereitung. Auch kann bei höheren Produktkonzentrationen die Raum-Zeit-Ausbeute verbessert sein. Um die Produktkonzentration zu steigern, sind bei intrazellulären Produkten hohe Zelldichten von Vorteil. Hochzell-dichtekultivierungen sind mit *E. coli* gut durchführbar und bekannt, gehen aber auch mit Nachteilen, wie hohen Kosten für die Sauerstoffversorgung bei hohen Zelldichten, einher. Hier gilt es eine geeignete Prozessführung zu erarbeiten, um schnelles Wachstum und nachfolgend optimale Produktbildung unter Berücksichtigung einer begrenzten Sauerstoffversorgung zu ermöglichen.

Gerade bei intrazellulären Produkten ist die Erzielung hoher Zielproteinanteile in den Zellen von großer Bedeutung. Die rekombinante Produktbildung wird durch die Zugabe

eines Induktors (IPTG) gestartet. Die Identifizierung geeigneter Induktionszeitpunkte und geeigneter Induktorkonzentrationen kann daher beitragen, maximale Zielproteinmengen in *E. coli* zu erreichen.

Ein effizienter Ansatz zur Minimierung der Kosten für Einsatzstoffe ist schließlich die Verwendung kostengünstiger Kohlenstoffquellen (Haupteinsatzstoff neben dem Lösemitel Wasser). Bei dem bisher eingesetzten definierten Medium wird Glucose als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle verwendet. In Hochzeldichteprozessen ist der Bedarf an Glucose entsprechend hoch. Alternative günstigere Kohlenstoffquellen können Saccharose oder Melasse sein, wenn damit die Produktbildung aufrecht erhalten werden kann.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Spinnenseide und Spinnenseidenproteine

In diesem ersten Kapitel der theoretischen Grundlagen werden Spinnenseide und Spinnenseidenproteine, deren Vorteile, Anwendungsmöglichkeiten und Herstellungsverfahren erläutert.

3.1.1 Eigenschaften und Aufbau von Spinnenseide

Seide wird nicht nur von Spinnen, sondern auch von Insekten wie dem bekannten und industriell verwendeten Seidenspinner (*Bombyx mori*, ein Schmetterling) produziert. Spinnenseiden sind jedoch aufgrund der herausragenden mechanischen Eigenschaften von weitaus größerem wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesse. Dabei handelt es sich vor allem um die Seiden der Webspinnen (*Aranea*) und insbesondere der Unterordnung Echter Webspinnen (*Araneomorphae*) aus der Klasse der Spinnentiere (*Arachnida*) (Heidebrecht und Scheibel, 2013; Swanson et al., 2009). Die in dieser Arbeit untersuchten Spinnenseidenproteine leiten sich von einer Seide der Gartenkreuzspinne ab (*Araneus diadematus*, Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1: Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*. Bildmaterial von Lucarelli 2009 unter *GNU Free Documentation License* veröffentlicht.

Araneus diadematus-Weibchen können als echte Webspinnen sieben verschiedene Spinnenseidenfäden herstellen, von denen fünf für das Spinnennetz verwendet werden (Heidebrecht und Scheibel, 2013; Römer und Scheibel, 2008; Scheibel, 2009). Da die Seiden in verschiedenen Drüsen hergestellt werden (Abbildung 3.2), werden sie meist nach diesen benannt. Der wegen seinen Eigenschaften für eine industrielle oder medizinische Anwendung interessanteste Faden ist der sogenannte Abseilfaden. Er kommt aus der großen Ampullendrüse (MAS, *Major Ampullate Spidroins*) und wird wie der Name sagt als Ab-

seilfaden und Rettungsfaden sowie für den Rahmen und die Speichen des Netzes verwendet. Der Abseilfaden hat im Vergleich zu den anderen Fäden die höchste Zähigkeit und dient der Form und Stabilität des Netzes (Heim et al., 2009; Heidebrecht und Scheibel, 2013).

Die Flagelliform-Seide ist die zweite wichtige Seide für das Netz und bildet die Fangspirale. Sie wird zwischen den Speichen des Netzes gespannt, ist extrem dehnbar und kann kinetische Energie auftreffender Beute besonders gut aufnehmen. Bei der Konstruktion des Netzes verwendet die Spinne zusätzlich als eine Art Gerüst einen Hilfspiralfaden, der in der kleinen Ampullendrüse hergestellt wird (MIS, *Minor Ampullate Spidroins*). Die Verbindung der Fangspirale mit dem Rahmen sowie die Befestigung des Netzes am Untergrund erfolgt durch eine spezielle Seide aus der Piriformdrüse. Die Flagelliform-Seide der Fangspirale ist nicht klebrig. Um die Beute im Netz zu halten, wird daher eine klebrige Beschichtung aus der Aggregatdrüse angebracht. Zwei weitere Seiden aus der Tubuliform- und Aciniformdrüse werden für den äußeren Schutz beziehungsweise die Verpackung und Einbettung der Eier genutzt. Die Seide der Aciniformdrüse wird auch zum Einwickeln der gefangenen Beute verwendet. (Römer und Scheibel, 2008; Scheibel, 2009; Heim et al., 2009)

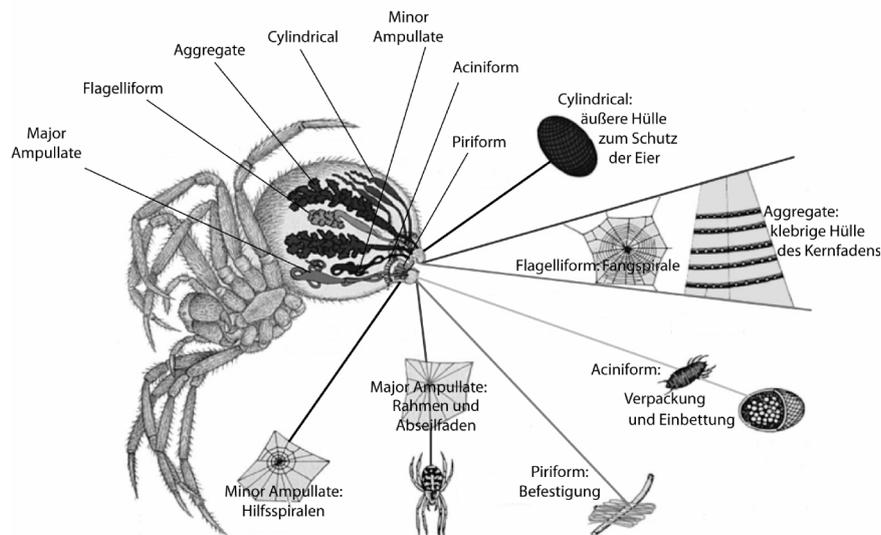


Abbildung 3.2: Echte Webspinnen wie *Araneus diadematus* können bis zu sieben verschiedene Spinnenseidenfäden produzieren, die aus verschiedenen Spinnendrüsen kommen und teilweise nach diesen benannt sind. Die Seidenfäden unterscheiden sich in Struktur und Eigenschaften und sind für verschiedene Anwendungen spezialisiert. Modifiziert nach Ackerschott (2007); Vollrath (2000).

Die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide werden anhand mehrerer Parameter beschrieben, die sich aus dem sogenannten Spannungs-Streckungs-Diagramm (Abbildung 3.3) ableiten lassen (Gosline et al., 1999; Omenetto und Kaplan, 2010): Die Spannung ist definiert als $\sigma = F/A$, also die Kraft, die auf den Anfangsquerschnitt wirkt. Die Streckung oder Dehnung ist $\epsilon = \Delta L/L_0$ mit L_0 als Länge der Faser vor der Dehnung und ΔL als Veränderung der Länge. Die Steifigkeit ist die Steigung der Kurve aus dem Span-

nungs-Streckungs-Diagramm. Der maximale Wert für die Spannung, die vor dem Bruch erreicht wird, ist die Festigkeit (σ_{max} , *strength*). Der maximale Wert für die Streckung ist die Dehnbarkeit ϵ_{max} . Die Fläche unter der Spannungs-Streckungs-Kurve ist schließlich die Zähigkeit, die angibt, wie viel Energie bis zum Bruch des Materials notwendig ist, beziehungsweise wie viel Energie vom Material aufgenommen werden kann, bevor es bricht oder reißt.

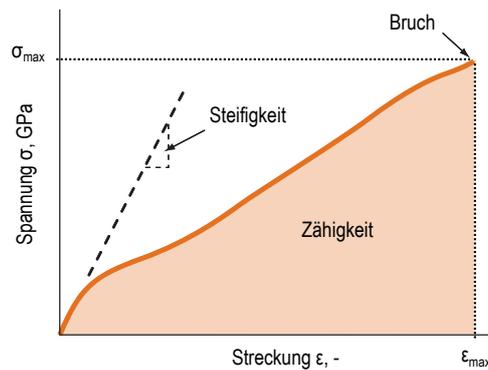


Abbildung 3.3: Spannungs-Streckungs-Kurve nach Omenetto und Kaplan (2010): Die Spannung σ ist gegen die Streckung beziehungsweise Dehnung ϵ aufgetragen. Die Steigung im linearen Bereich ist die Steifigkeit, während die Fläche unter der Kurve die Zähigkeit dargestellt. Die maximalen Werte für Spannung und Dehnung beim Bruch des Materials sind die Zugfestigkeit σ_{max} und die Dehnbarkeit ϵ_{max} .

In Tabelle 3.1 sind die mechanischen Eigenschaften des Abseilfadens von *Araneus diadematus* im Vergleich zu weiteren Materialien aufgelistet. Spinnenseide ist bezogen auf die Dichte 3–4 mal so zugfest wie Stahl und hat eine wesentlich höhere Zähigkeit. Die Zähigkeit übertrifft auch Hochleistungsmaterialien und ist etwa dreimal so groß wie bei Kevlar und etwa doppelt so groß wie bei Nylon. In der Kombination von Zugfestigkeit, Dehnbarkeit und Zähigkeit ist Spinnenseide herausragend (Tokareva et al., 2014).

Tabelle 3.1: Mechanische Eigenschaften von Spinnenseide im Vergleich zu weiteren Materialien. Die Angaben variieren je nach Quelle (Heidebrecht und Scheibel, 2013; Heim et al., 2009; Gosline et al., 1999)

Material	Dichte, g cm^{-3}	Zugfestigkeit, GPa	Steifigkeit, GPa	Dehnbarkeit, -	Zähigkeit, MJ m^{-3}
<i>Araneus diadematus</i> ¹ Abseilfaden	1,3	0,7–1,1	10	0,27–0,30	150–160
<i>Bombyx mori</i> ² Seide	1,3	0,6	7	0,18	70
Elastin ³	1,3	0,002	0,001	0,15	2
Nylon 6,6	1,1	0,95	5	0,18	80
Kevlar	1,4	3,6	130	0,027	50
Stahl	7,8	1,5	200	0,008	6
Gummi	0,9	0,05	0,001	8,5	100
Carbonfaser	1,8	4,0	300	0,013	25

¹ Gartenkreuzspinne; ² Seidenspinner; ³ Faserprotein in Wirbeltieren

Spinnenseide ist außerdem antimikrobiell, hypoallergen, biokompatibel und nur langsam biologisch abbaubar (Vendrey und Scheibel, 2007; Schacht und Scheibel, 2014). Die Biokompatibilität wurde unter anderem durch subkutane Implantationen in Schweinen gezeigt (Vollrath et al., 2002). Abhängig von der Feuchtigkeit ist Spinnenseide zu Superkontraktion in der Lage. Bei hoher Luftfeuchtigkeit oder Tau verkürzen sich die Fäden, was die Spannung und Stabilität von Spinnennetzen dauerhaft erhöht (Guinea et al., 2003; Blackledge et al., 2009).

Das Molekulargewicht der Proteine des Abseilfadens liegt etwa im Bereich von 250 bis 350 kDa, mit Transkripten von über 10.000 Basenpaaren und über 3000 Aminosäuren (Omenetto und Kaplan, 2010; Heim et al., 2009; Scheibel, 2004). Die Proteingröße ist entscheidend für die Eigenschaften. Künstliche Spinnenseide muss aus vergleichbar großen rekombinanten Proteinen aufgebaut sein, um ähnlich gute Eigenschaften wie natürliche Spinnenseide aufzuweisen. Dies ist laut Xia et al. (2010) mit kleineren Proteinen nicht möglich.

Spinnenseidenproteine wie das *Araneus diadematus* Fibroin 4 (ADF4, Abbildung 3.4) bestehen aus einer repetitiven Kerndomäne und nicht repetitiven N- und C-terminalen Domänen. Die wesentlich größere Kerndomäne (bis zu 90 % der Sequenz) ist ähnlich einem Blockcopolymer organisiert, das heißt die Proteine bestehen aus mehreren verschiedenartigen Monomereinheiten, die in längeren Sequenzen geblockt sind. In Spinnenseidenproteinen liegen verschiedene alternierende Konsensusmotive (10–50 Aminosäuren) mit unterschiedlichen Eigenschaften vor, die sich bis zu mehrere hundert Male wiederholen. Alaninreiche kristalline Regionen (Poly(A) oder Poly(GA)) und weniger kristalline (GGX oder GPGXX) wechseln sich ab (Tokareva et al., 2013). Spinnenseidenproteine haben einen außergewöhnlich hohen Anteil der fünf Aminosäuren Glycin, Glutamin, Alanin, Prolin und Serin (Heim et al., 2009). Die nicht-repetitiven N- und C-terminalen Domänen sind hoch konserviert, trotz ihrer relativ geringen Größe von etwa 130 Aminosäuren beim N-Terminus und 100 Aminosäuren beim C-Terminus (Omenetto und Kaplan, 2010).

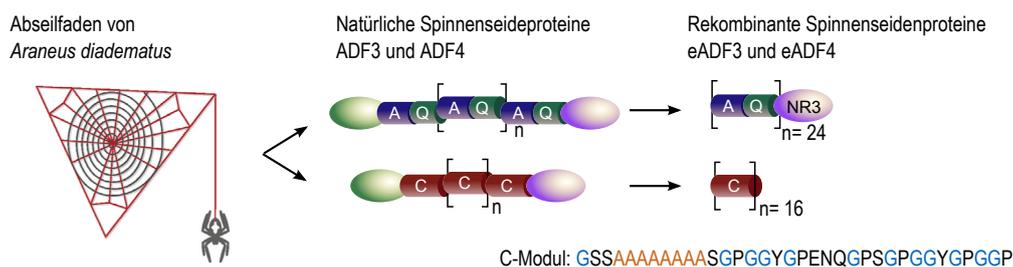


Abbildung 3.4: Der Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* besteht aus den beiden Proteinen ADF3 und ADF4 (*Araneus diadematus* Fibroine 3 und 4). Diese Spinnenseidenproteine bestehen aus nicht repetitiven terminalen Sequenzen (grün und gelb) sowie einer Kerndomäne aus Wiederholungen der Module A und Q oder des Moduls C. Das rekombinante Spinnenseidenprotein AQ24NR3 ist von ADF3 abgeleitet und besteht aus 24 Wiederholungen der Module A und Q sowie der nicht repetitiven Sequenz NR3. Das in der vorliegenden Arbeit vorwiegend untersuchte eADF(C16) oder vereinfacht C16 besteht aus 16 Wiederholungen des Moduls C. Dieses Modul ist sehr Glycin-reich (blau) und hat einen Poly(A)-Abschnitt (orange). Daneben wurden weitere Varianten mit unterschiedlicher Anzahl des C-Moduls hergestellt. Modifiziert nach Humenik et al. (2014) und Huemmerich et al. (2004a).

Die Aminosäuresequenz von eADF4(C16) wurde von der natürlichen Sequenz von ADF4 von *Araneus diadematus* übernommen (Abbildung 3.4). Die Kerndomäne besteht aus Wiederholungen eines Poly(A)-reichem Motivs mit hohem Glycin-Gehalt, welches als Modul C bezeichnet wird. eADF(C16) oder kurz C16 besteht aus 16 Wiederholungen des Moduls C mit einer Molekularmasse von 47,7 kDa (Huemmerich et al., 2004a). Es sind jedoch keine N- oder C-terminalen Sequenzen in C16 vorhanden, welches zudem kleiner ist als das natürliche ADF4. Daneben wurden weitere rekombinante Spinnenseidenproteine wie das AQ24NR3 hergestellt, das sich von ADF3 ableitet und aus 24 Wiederholungen der beiden Module A und Q sowie der nicht repetitiven terminalen Sequenz NR3 besteht.

Die Primärstruktur der Seide spielt eine bedeutende Rolle für die charakteristischen Eigenschaften des Fadens, was sich aus der starken Konservierung der Konsensusmotive und dem sehr niedrigen Anteil an geladenen (sauren oder basischen) Aminosäuren ableiten lässt (Heim et al., 2009). In Spinnenseide bildet sich eine Art elastische Matrix mit anisotropen Einschlüssen (= gestapelte β -Faltblattstrukturen). Die Glycin-reichen amorphen Regionen tragen zur Dehnbarkeit und Flexibilität bei (Hayashi et al., 1999). Die β -Faltblätter aus Poly(A)- oder Poly(GA)-Domänen bilden Nanokristalle, die sich entlang der Faserachse ausrichten (Scheibel, 2009; Keten et al., 2010). Die besondere Stärke der Spinnenseide resultiert aus diesen β -Faltblatt-Nanokristallen (Abbildung 3.5). Schwache, aber zahlreiche intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Bereichen benachbarter Proteine sorgen insgesamt für eine stabile Struktur. Nach Alam (2014) finden bei der Dehnung von Spinnenseide mehrere Prozesse statt. Durch Scherung brechen zunächst größere Nanokristalle in kleine auf, die eine noch höhere Steifigkeit haben. Die Entfaltung der β -Faltblätter benötigt noch mehr Energie und findet erst danach statt.

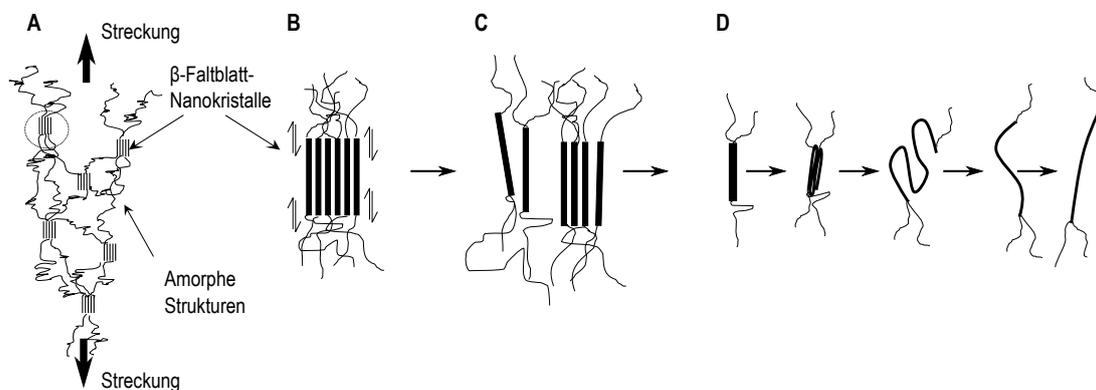


Abbildung 3.5: Hypothese zur mehrstufigen Entfaltung von Spinnenseide nach Alam (2014). Spinnenseide besteht aus amorphen Strukturen und kristallinen Untereinheiten mit β -Faltblättern (A). Werden die Seidenfäden gestreckt, so strecken sich zunächst die amorphen Strukturen (nicht gezeigt). Die Stärke der Spinnenseide resultiert jedoch aus den β -Faltblatt-Nanokristallen (B). Bei einer Streckung trennen sich zuerst die β -Faltblätter aus den Nanokristallen (C) und schließlich entfalten sich die β -Faltblätter (D).

Die mechanischen Eigenschaften natürlicher Spinnenseide resultieren aus der Struktur der Proteine und dem Spinnprozess (Omenetto und Kaplan, 2010). Der Assemblierungsprozess von Spinnenseidenfäden ist sehr komplex und erst während der Assemblierung strukturieren sich die Seidenproteine. Es erfolgt eine Flüssig-flüssig-Phasentrennung und

eine Flüssig-fest-Phasentrennung, ein Streckprozess und Verdunstung von Wasser. Die Spinnenseidenproteine sind biochemischen Veränderungen, verschiedenen pH, Lösungsmitteln und Salzkonzentrationen, Elongations- und Scherkräften ausgesetzt (Heim et al., 2009). Spinnenseidenfäden werden nicht aus den Drüsen herausgedrückt, sondern werden zum Beispiel durch die Beine der Spinne herausgezogen (Omenetto und Kaplan, 2010).

3.1.2 Anwendungen von Spinnenseidenproteinen

Neben Fasern beziehungsweise Fäden können Spinnenseidenproteine in eine Vielzahl anderer Formen verarbeitet werden: Partikel, Kapseln, Hydrogele, Schäume, Faservliese und Filme (Hardy et al., 2008; Omenetto und Kaplan, 2010; Schacht und Scheibel, 2014). Dies ist alleine mit einem einzigen Protein, dem C16, möglich (Abbildung 3.6). Eigenschaften wie Abbaubarkeit und Stabilität können zudem durch die Verarbeitung modifiziert werden. Daneben sind aber auch chemische Modifikationen möglich und durch die Variabilität der Module lassen sich bereits auf gentechnischer Ebene verschiedene Varianten darstellen.

Partikel beziehungsweise Kügelchen und Kapseln aus Spinnenseide eignen sich zum Beispiel für eine gezielte Medikamentenfreisetzung im Körper (Lammel et al., 2011; Hardy et al., 2013). Niedrigmolekulare Medikamente sowie Proteine können in C16-Partikel aufgenommen werden. Diese werden nur langsam biologisch abgebaut, was sich durch Herstellungsbedingungen und Quervernetzung steuern lässt (Schacht und Scheibel, 2014). Es können auch wasserunlösliche Moleküle eingekapselt werden, die beispielsweise im Magen intakt bleiben und im Dünndarm freigesetzt werden. Zudem können die Kügelchen porös gestaltet werden, was eine Diffusion von kleinen Partikeln ermöglicht (Humenik et al., 2011). Erst kürzlich wurden außerdem C16-Kapseln entwickelt, in denen geschützt Enzymreaktionen für potentielle technische und medizinische Anwendungen ablaufen (Blüm et al., 2014).

Aufgrund der Biokompatibilität sowie der langsamen Abbaurate sind Spinnenseidenproteine gute Biomaterialien für Gewebekonstruktionen (*tissue engineering*). Insbesondere Schäume und Hydrogele, die sehr elastisch und über Wochen stabil sind, können als Gerüst dienen (Humenik et al., 2011; Tokareva et al., 2013; Schacht und Scheibel, 2014).

Spinnenseidenproteine wurden als Oberfläche für Zelladhäsion (Hardy et al., 2014) sowie als Matrizen für neuronale Stammzellen oder Schwannsche Zellen (Stützzellen, die das Axon einer Nervenzelle umhüllen) untersucht (Allmeling, 2006; Lewicka et al., 2012). Schwannschen Zellen konnten entlang natürlicher Abseilfäden wachsen und damit wurden die Ergebnisse bei Nerventransplantationen verbessert (Allmeling et al., 2007).

Filme aus Spinnenseidenproteinen sind vielversprechend als Beschichtung von Implantaten, wie an Silikonimplantaten gezeigt wurde. Damit können die Biokompatibilität und Oberflächeneigenschaften verbessert und postoperative Komplikationen, wie Fibrose, verringert werden (Zeplin und Maksimovikj, 2014; Schacht und Scheibel, 2014).

Spinnenseidenproteine sind auch für kosmetische Produkte interessant, wie beispielsweise Hautpflege, Shampoos, Seifen, Haar- und Nagelpflege (Vendrely und Scheibel, 2007). Von AMSilk GmbH (im folgenden AMSilk) wurden mit der „Spidersilk Skin Care“-Linie erstmalig Spinnenseidenprodukte kommerzialisiert (AMSilk, 2014b). Daneben ent-

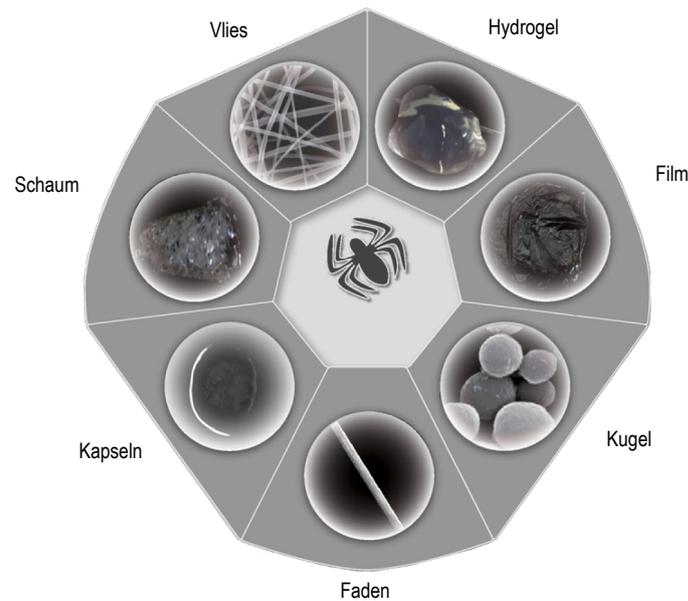


Abbildung 3.6: Verschiedene Morphologien, die mit nur einem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein, dem eADF4(C16), hergestellt werden können. Abbildung modifiziert nach Hardy et al. (2008).

wickelt AMSilk auch Produkte für die Wundheilung. Ein Seidenfilm soll dabei die Haut rehydrieren und eine Barrierefunktion wiederaufbauen (AMSilk, 2014a). Zudem kann die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten durch Spinnenseidenproteine begünstigt werden (Schacht und Scheibel, 2014).

Künstliche Fasern würden schließlich für viele industrielle Anwendungen in Frage kommen, wie Hochleistungskabel, Fallschirme, Verbundwerkstoffe für die Luftfahrt und beschusshemmenden Westen (Vendrely und Scheibel, 2007; Chung et al., 2012; Scott, 2014).

3.1.3 Rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen

Aufgrund der vielen Anwendungsmöglichkeiten besteht ein wirtschaftliches Interesse an der Herstellung von Spinnenseidenproteinen. Die massenhafte Haltung von Spinnen ist allerdings aus mehreren Gründen nicht wirtschaftlich realisierbar (Heidebrecht und Scheibel, 2013): Kannibalismus ist unter Spinnen weit verbreitet, vor allem bei hohen Populationsdichten in Laborversuchen (Wise, 2006). Neben sexuellem Kannibalismus und dem Kannibalismus als Nahrungssuche sowie weiteren Formen spielt der agonistische Kannibalismus (verbunden mit Rivalität) beziehungsweise das kannibalistische Territorialverhalten eine wichtige Rolle. Zudem wurde gezeigt, dass Spinnen in Gefangenschaft weniger Seide und von schlechterer Qualität produzieren und die Qualität zudem stark von ihrer Nahrung abhängt (Craig et al., 2000).

Die biotechnologische Herstellung von Spinnenseide ist ebenfalls schwierig. So sind Spinnenseidengene hoch repetitiv, was Sequenzierung und PCR-Methoden erheblich erschwert (Scheibel, 2009). Weitere Schwierigkeiten umfassen Limitierungen des Transkriptions- und Translationsapparats und die schlechte Löslichkeit der produzierten Pro-

teine (Heidebrecht und Scheibel, 2013; Scott, 2014). Bei der Produktion in Bakterien ist die Größe von natürlichen Spinnenseidenproteinen genauso problematisch wie die abweichende Codon-Verwendung von Bakterien und Spinnen. Die genetische Instabilität resultiert vor allem aus der Größe und der hohen Repetitivität der Spinnenseidenproteine. Die Fähigkeit von Bakterien zur homologen Rekombination kann zu einer ungewollten Verkürzung der Gene führen (Vendrely und Scheibel, 2007). Der hohe GC-Gehalt (teilweise über 70 %) und die Glycin- und Alanin-reiche Struktur der Seidenproteine und der damit einhergehende Verbrauch der tRNA- und Aminosäurevorräte der Zelle erschweren zusätzlich die Expression (Xia et al., 2010; Heim et al., 2009).

Verschiedene rekombinante Ansätze

Einen Überblick über verschiedene Wirte und Strategien für die Expression von Spinnenseidenproteinen geben Rising et al. (2011), Chung et al. (2012), Tokareva et al. (2013) und Heidebrecht und Scheibel (2013). Auf einige Ansätze wird hier genauer eingegangen. Insgesamt wurden einerseits natürliche Spinnenseidengene in transgenen Tieren (Mäuse und Ziegen), tierischen Zellen (COS-1, MAC-T und BHK), Insekten (Seidenspinner *Bombyx mori*), Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*), Hefen (*Pichia pastoris*) und Bakterien (*Escherichia coli*) exprimiert. Meistens wurden dabei Gene der Spinnen *Nephilia clavipes* oder *Araneus diadematus* verwendet, aber auch von *Argiope aurantia*, *Argiope trifasciata*, *Euprothenops australis* und *Latrodectus hesperus*. Die erzielten Produktkonzentrationen lagen jedoch nur bei bis zu maximal $105\text{--}150\text{ mg L}^{-1}$ (Tokareva et al., 2013; Heidebrecht und Scheibel, 2013).

Andererseits wurden synthetische Spinnenseidengene in *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, in der Hefe *Pichia pastoris*, in den Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, Tabak (*Nicotiana tabacum*), Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), in Insektenzellen (*Bombyx mori*), in transgenen Seidenspinnern (*Bombyx mori*) und Ziegen hergestellt. Die Expression und extrazelluläre Anreicherung eines Spinnenseiden-analogen Proteins mit *Bacillus subtilis* wurde zwar in einem Patent (Fahnestock, 1994), aber in keiner Publikation erwähnt (Heidebrecht und Scheibel, 2013).

Mit *Pichia pastoris* konnten bis zu $2,9\pm 0,3\text{ g L}^{-1}$ von dem seidenähnlichen Protein EE24 exprimiert werden (Werthen et al., 2008) – die höchste bekannte Konzentration (Heidebrecht und Scheibel, 2013). Schon deutlich früher konnte das synthetische, spinnenseidenähnliche Protein DP-1B in *Pichia pastoris* mit einer Produktkonzentration von immerhin 1 g L^{-1} hergestellt werden, allerdings erwies sich die Aufarbeitung aufgrund von Aggregationen als schwierig (Fahnestock und Bedzyk, 1997).

Eukaryotische Wirte haben unter anderem die Vorteile, dass die Codon-Verwendung ähnlicher zu Spinnen ist, die Rekombinationsfrequenz gering ist und es keine so starke Limitierung der Gengröße gibt. Zudem sind tierische Zellen zur Sekretion in der Lage, was die Produktaufreinigung vereinfacht (Vendrely und Scheibel, 2007; Heidebrecht und Scheibel, 2013). Mit eukaryotischen Expressionssystemen sind zudem posttranslationale Modifikationen möglich. Phosphorylierungen von Tyrosin- und Serin-Resten wurden in Spinnenseidengenen gefunden, allerdings ist der Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Spinnenseide unklar (Michal et al., 1996; Rising et al., 2011).

Insektenzelllinien dürften Spinnen phylogenetisch am ähnlichsten sein (Huemmerich et al., 2004b). So wurden von der Gruppe um Scheibel zunächst partielle cDNA der Spinnenseidengene ADF3 und ADF4 in Sf-9 exprimiert, einer immortalisierten Zelllinie aus *Spodoptera frugiperda*, einem Eulenfalter (Schmetterling). Die cDNA wurde mit Baculoviren, die genetisch leicht manipulierbar sind, in die Zellen transformiert. Zwar war die Expression erfolgreich und die Primärstruktur korrekt, allerdings konnten nur relativ geringe Produktkonzentrationen von etwa 30 mg L^{-1} erreicht werden (Huemmerich et al., 2004b; Vendrely et al., 2008; Hardy und Scheibel, 2009). Da die Kultivierung von Insektenzellen wegen langer Generationszeiten vergleichsweise teuer ist, sind diese Erträge für eine kommerzielle Anwendung zu gering (Vendrely und Scheibel, 2007). Die Proteinlöslichkeit war ein weiteres Problem. ADF3 ist relativ gut löslich (30 mg L^{-1}), ADF4 hingegen ist wegen des hohen β -Faltblatt-Gehalts deutlich schlechter löslich (etwa 1 mg L^{-1}) und neigt zur Selbstassemblierung in filamentöse Strukturen (Huemmerich et al., 2004b; Hardy und Scheibel, 2009).

Während sich Insektenzelllinien in Bioreaktoren kultivieren lassen, ist die Produktion von Spinnenseidenproteinen in Pflanzen schwierig mit mikrobiellen Produktionsprozessen zu vergleichen. Alternative Expressionssysteme und -methoden wie Multimerisierung, eine mögliche Akkumulation in Organellen oder Pflanzenteilen (Blätter, Wurzeln), posttranslationale Modifikationen sowie Stabilität von Genen könnten Vorteile von Pflanzen darstellen und es wurden erfolgreich verschiedene Pflanzen wie Tabak, Kartoffeln und *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Allerdings scheinen Produktmengen wie 0,5–2 % des Gesamtproteins beziehungsweise 1,8 mg pro 50 g Blattgewicht relativ gering (Heim et al., 2009; Tokareva et al., 2013; Scheller et al., 2001; Hauptmann et al., 2012). Vielversprechend waren beziehungsweise sind einige Ansätze mit transgenen Tieren, insbesondere Ziegen und dem Seidenspinner. Da hieraus teilweise Unternehmen hervorgegangen sind, sollen die Ansätze in dem letzten Abschnitt in diesem Kapitel genauer diskutiert werden.

Die Größe natürlicher Spinnenseidenproteine ist eines der Hauptprobleme für die rekombinante Herstellung. Insgesamt konnten mit rekombinanten Spinnenseidenproteinen aus *E. coli* oder Ziegen Fasern gesponnen werden, die Spinnenseiden ähnlich, aber immer noch unterlegen sind. Im Gegensatz zur Herstellung von Fasern ist die Größe der Spinnenseidenproteine für viele Anwendungen wie Filme, Hydrogele und Partikel nicht entscheidend. (Heidebrecht und Scheibel, 2013)

Produktion von Spinnenseidenproteinen mit *Escherichia coli*

Am häufigsten wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) für die Expression von Spinnenseidenproteinen eingesetzt und verschiedene Gruppen konnten erfolgreich rekombinante Spinnenseidenproteine oder Proteine, die sich davon ableiten, in *E. coli* herstellen (Tokareva et al., 2013; Heidebrecht und Scheibel, 2013). *E. coli* ist gentechnisch leicht veränderbar, gut untersucht und hat eine kurze Generationszeit. Vor allem lässt sich *E. coli* relativ günstig in definierten Medien, zu hohe Zelldichten und im großen Maßstab kultivieren. Zudem wurden verschiedene Klonierungsstrategien für die repetitiven Spinnenseidengene in *E. coli* entwickelt (Tokareva et al., 2013).

Limitierend für die Produktion von Spinnenseidenproteinen waren jedoch geringe Er-

träge, die meist schlechte Proteinlöslichkeit, die Codon-Verwendung, unerwünschte Rekombinationsereignisse und damit verkürzte Gene, Produktinhomogenitäten, mRNA-Sekundärstrukturen, Transkriptionsfehler, Auszehrung des tRNA-Pools, Translationspausen und Bildung von Einschlusskörperchen. Der Proteinерtrag verringerte sich zudem deutlich, wenn größere Proteine (über 43 kDa) exprimiert wurden (Heim et al., 2009; Rising et al., 2011; Tokareva et al., 2013; Heidebrecht und Scheibel, 2013).

Die höchste mit *E. coli* hergestellte Konzentration wurde von Xia et al. (2010) berichtet. Durch die Überexpression von *glyA* zur Anhebung des Glycyl-tRNA-Vorrats konnten bis zu $2,7 \text{ g L}^{-1}$ in *E. coli* BL21(DE3) von dem kleinsten untersuchten Protein erreicht werden (32mer). Bei dem 92mer (285 kDa) lag die Produktkonzentration bei $0,5 - 0,8 \text{ g L}^{-1}$. Nach der Aufreinigung konnten aus 1 L Reaktionslösung immerhin 1,2 g des 32mer Proteins gewonnen werden.

Die Gruppe um Scheibel etablierte ebenfalls einen Prozess zur Expression von Spinnenseidenproteinen in *E. coli*, zunächst in *E. coli* BLR(DE3) (Huemmerich et al., 2004a) und schließlich in *E. coli* HMS174(DE3), einem *E. coli* K12-Derivat (Schmidt et al., 2007). Ein entwickeltes Klonierungssystem ermöglichte die Bildung künstlicher Spinnenseidengene durch eine nahtlose Verknüpfung von Festphasen-synthetisierten Oligonucleotiden. Neben C16 (Abbildung 3.4) wurde eine Reihe weiterer rekombinanter Spinnenseidenproteine erstellt, mit Molekulargrößen zwischen 40 und 120 kDa. Mit Hochzelldichte-Kultivierungen konnten Produktkonzentration von über 500 mg L^{-1} erzielt werden (Huemmerich et al., 2004a; Hardy und Scheibel, 2009).

Kommerzielle Herstellung von Spinnenseidenproteinen

Gleich zwei große Unternehmen, DuPont und BASF, erforschten die industrielle Herstellung von Spinnenseidenproteinen, stellten ihre Bemühungen jedoch ein (Scott, 2014). Eine Reihe kleiner Unternehmen ist hingegen auf dem Weg oder hat bereits erste Produkte mit Spinnenseide kommerzialisiert (Tabelle 3.2).

Das Kanadische Unternehmen Nexia Biotechnologies entwickelte ein Konzept zur Herstellung von Spinnenseidenproteinen in der Milch von transgenen Ziegen (Vendrely und Scheibel, 2007). Die gentechnische Modifikation von Ziegen ist jedoch wesentlich schwieriger und zeitaufwendiger im Vergleich zu Mikroorganismen. Zu den weiteren Problemen gehörten die relativ geringen Konzentrationen und die schwierige Aufarbeitung von Spinnenseidenproteinen aus der Milch, insbesondere die Abtrennung vom Casein (Heidebrecht und Scheibel, 2013). Obwohl bereits eine Herde von transgenen Ziegen bei Nexia Biotechnologies vorhanden war, hat sich das Model als nicht wirtschaftlich erwiesen. Nach der Schließung von Nexia Biotechnologies wurden einige Ziegen an ein Museum übergeben (CBC News, 2012).

Demgegenüber hat das Konzept von Kraig Biocraft Laboratories mit transgenen Seidenspinnern den Vorteil, dass die Gewinnung von Seide aus Seidenspinnerraupe seit Jahrhunderten etabliert ist und in großem industriellem Maßstab erfolgen kann. Es wird jedoch eine hybride Seide aus Seiden der Seidenspinnerraupe und aus Spinnenseide produziert, mit einem Anteil von nur maximal 5 % Spinnenseide (Teulé et al., 2012). Dennoch sind die mechanischen Eigenschaften der hybriden Seide im Vergleich zur natürlichen

Tabelle 3.2: Kommerzielle Entwicklung von Spinnenseidenproteinen. Nach Scott (2014), erweitert um Spiber Technologies (Rising et al., 2011; Rising, 2012) und Nexia Biotechnologies (CBC News, 2012).

Organisation	Wirt	Erste Produkte	Entwicklungsstand
AMSilk GmbH, Planegg, Deutschland	<i>E. coli</i>	Hautpflegeprodukte, Zellkultur-Kits	Bereits kommerzialisiert
Araknitek, Inc., Delaware, USA	<i>E. coli</i> , Ziegen, Seidenspinner	Fasern für medizinische Anwendungen	Aufbau einer Pilotanlage
KBLB ¹ , Michigan, USA	Seidenspinner	Monster Silk TM : Hybride Spinnen-Seidenspinner- Fasern für Textilien	Transfer in kommerziellen Maßstab durch Warwick Mills
MBEL ² , KAIST, Daejeon, Südkorea	<i>E. coli</i>	Fasern stärker als Kevlar	Partnerschaft mit einem Unternehmen angestrebt
Spiber Inc., Yamagata, Japan	<i>E. coli</i>	Fasern und Filme	Massenproduktion 2015 geplant mit Kojima Industries Corporation
Spiber Techno- logies AB, Uppsala, Schweden	<i>E. coli</i>	Zellkultur, Wundheilung	Staatliche Förderung zur Entwicklung von Wundheilungsprodukten
Nexia Biotech- nologies, Kanada	Ziegen		In Konkurs gegangen

¹Kraig Biocraft Laboratories Inc.; ²Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory

Seide deutlich überlegen. Die Erzeugung und Nutzung transgener Tiere oder Pflanzen kann jedoch, gerade in Deutschland, ethische Bedenken und eine schlechte Akzeptanz auslösen (Vogt, 2004). Alle anderen in Tabelle 3.2 genannten Unternehmen setzen auf *E. coli* als Expressionswirt.

3.2 Kultivierung von Mikroorganismen

In diesem Abschnitt wird zunächst allgemein auf das Wachstum von Mikroorganismen und auf den idealen Rührkesselreaktor eingegangen. Acetatbildung und Substratinhibition sind im Zusammenhang mit Satz- und Zulaufverfahren von Bedeutung. Schließlich wird die Maßstabsübertragung in Bioreaktoren genauer betrachtet.

3.2.1 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Die mathematische Betrachtung von Zellen im Bioreaktor erfolgt am häufigsten und einfachsten mit unstrukturierten und unsegregierten Modellen (Chmiel, 2011). Die Zellen werden als eine Komponente und Zelleigenschaften als Mittelwerte gesehen. Es gibt keine unterscheidbaren Komponenten in den zellulären Systemen (strukturiert) und keine Subpopulationen (segregiert). Dadurch können viele wichtige Parameter für das Zellwachstum und die Prozessführung einfach definiert werden. Die mathematischen Beschreibungen in diesem Kapitel sind vorwiegend nach Chmiel (2011) und Katoh und Yoshida (2009) dargestellt, falls nicht anders angemerkt.

Die Wachstumsrate r_X ist einer der wichtigsten Parameter und beschreibt die Veränderung der Biomasse c_X über die Zeit t . Unter nicht-limitierenden Bedingungen ist die Wachstumsrate proportional zur Biomasse c_X , was mit einer autokalalytischen Gleichung beschrieben werden kann:

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad (3.1)$$

mit	r_X :	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	c_X :	Biomasse, g L^{-1}
	t :	Zeit, h
	μ :	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Die spezifische Wachstumsrate μ ist damit definiert als:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.2)$$

Die Wachstumsrate kann entscheidend für die Proteinexpression sein (Siurkus et al., 2010; Hellmuth et al., 1994; Luo et al., 2006). Wichtige globale Parameter wie die Verfügbarkeit von RNA-Polymerasen und Ribosomen hängen von der Wachstumsrate ab (Klumpp et al., 2009). Die Wachstumsrate zeigt dabei unterschiedliche Einflüsse, je nach dem wie die Genexpression gemessen wird (Transkription, mRNA oder Proteinkonzentration). Höhere Wachstumsraten können zudem das Zellvolumen erhöhen und die Expression konstitutiv exprimierter Gene beeinflussen (Klumpp et al., 2009), während mit niedrigeren Wachstumsraten ein höherer Plasmid-Gehalt gemessen wurde (Bentley et al., 1990).

In einem definiertem Medium ist das Wachstum von einer Komponente, üblicherweise der Kohlenstoffquelle, begrenzt. Monod (1949) beschrieb einen formalen Zusammenhang

zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und dem wachstumslimitierendem Substrat c_S in Form einer Sättigungsfunktion.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.3)$$

mit μ_{max} : maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
 c_S : Substratkonzentration, g L^{-1}
 K_S : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, g L^{-1}

Die maximale Wachstumsrate μ_{max} wird theoretisch erreicht, wenn c_S sehr viel größer ist als K_S . Die Konstante K_S ist die Substratkonzentration, bei der die spezifische Wachstumsrate halb so groß ist wie die maximale Wachstumsrate μ_{max} .

Analog zur Wachstumsrate werden auch die Produktbildungsraten (r_P , q_P) sowie die Substrataufnahmeraten (r_S , q_S) definiert. Dabei sind r_i (in $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) die volumetrischen und q_i (in h^{-1}) die spezifischen Raten.

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = q_S \cdot c_X \quad (3.4)$$

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = q_P \cdot c_X \quad (3.5)$$

mit r_S : volumetrische Substrataufnahmerate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
 q_S : spezifische Substrataufnahmerate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
 r_P : volumetrische Produktbildungsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
 q_P : spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
 c_P : Produktkonzentration, g L^{-1}

Die Substratkonzentration c_S aus dem empirischen Monod-Modell lässt sich mit der Biomasse c_X über den Ausbeutekoeffizienten beziehungsweise Biomasseausbeute $Y_{X/S}$ verknüpfen. Die Biomasseausbeute (*yield*) ist die gebildete Biomasse pro verbrauchtem Substrat, was auch als Selektivität bezeichnet werden kann (Chmiel, 2011).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{gebildete Biomasse}}{\text{verbrauchtes Substrat}} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad (3.6)$$

mit $Y_{X/S}$ Biomasseausbeute, g g^{-1}

Damit werden über $Y_{X/S}$ die Wachstumsrate und die Substrataufnahmerate zueinander in Beziehung gesetzt:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (3.7)$$

Dies gilt jedoch nur, wenn ausschließlich Wachstum stattfindet. Die Gleichung kann um den Term für den Erhaltungsstoffwechsel m_S und um die Substrataufnahme für die Produktbildung $q_{S,P}$ erweitert werden:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S + q_{S,P} \quad (3.8)$$

mit	m_S	Substrataufnahme für den Erhaltungstoffwechsel, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
	$q_{S,P}$	Substrataufnahme für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Werden Produkte mit vergleichsweise geringer Wertschöpfung bei gleichzeitig teurem Substrat hergestellt, ist die Produktausbeute wesentlich für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Die Produktausbeute $Y_{P/S}$ ist die Masse an gebildetem Produkt pro verbrauchtem Substrat und wird wie die Biomasseausbeute in g g^{-1} angegeben:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{gebildetes Produkt}}{\text{verbrauchtes Substrat}} = \frac{q_P}{q_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{dc_P}{dc_S} \quad (3.9)$$

In dieser Arbeit wurde die Expression von Spinnenseidenproteinen in verschiedenen Maßstäben mit unterschiedlichen Zelldichten durchgeführt. Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, kann daher die Produktkonzentration relativ zur Biotrockenmassekonzentration betrachtet werden. Diese wird unter anderem als zellspezifische Proteinkonzentration, spezifische Produktivität oder spezifische Produktausbeute bezeichnet: *Cell-specific protein concentration* (Li et al., 2011), *specific product concentration* (Striedner et al., 2010), *specific protein content* (Pinsach et al., 2008), *specific productivity* (Huber et al., 2011), *specific (product) yield* (Khalilzadeh et al., 2004; Schlottbom et al., 2013; Kensy et al., 2009) und *product yield* (Borja et al., 2012). In dieser Arbeit soll der Begriff zellspezifischer Proteingehalt verwendet werden, da dies am wenigsten missverständlich scheint. Als Symbol wird meist $Y_{P/X}$ verwendet (Striedner et al., 2010; Borja et al., 2012; Kensy et al., 2009; Schlottbom et al., 2013) und soll hier übernommen werden. Das X repräsentiert dabei die Biotrockenmasse. $Y_{P/X}$ wird wie die Produktausbeute in g g^{-1} angegeben.

$$Y_{P/X} = \frac{\text{gebildetes Produkt}}{\text{gebildete Biomasse}} = \frac{c_P}{c_X} \quad (3.10)$$

Da sich Biotrockenmasse nicht immer linear zur optischen Dichte verhält und vor allem im kleinen Maßstab nicht immer die Biotrockenmasse bestimmt werden kann, wird zudem die Proteinkonzentration relativ zur optischen Dichte, gemessen bei 600 nm (OD_{600}), angegeben und analog als $Y_{P/OD}$ bezeichnet. Da die optische Dichte keine Einheit hat, wird $Y_{P/OD}$ in g L^{-1} angegeben.

$$Y_{P/OD} = \frac{\text{gebildetes Produkt}}{\text{gebildete optische Dichte}} = \frac{c_P}{OD_{600}} \quad (3.11)$$

3.2.2 Bilanzierung des idealen Bioreaktors

Laut Chmiel (2011) ist ein Bioreaktor „ein abgegrenzter Raum bzw. Aparat [...], in dem in Anwesenheit und unter Mitwirkung eines Biokatalysators eine Stoffumwandlung stattfindet“. Die klassische Bauform für Bioreaktoren sind die sogenannten Rührkesselreaktoren (STR) mit Scheibenrührern (schematisch in Abbildung 3.7). Die Rührkessel sind die wichtigsten Produktionsreaktoren in der Biotechnologie (Weuster-Botz, 2006). Zu den Aufgaben eines Bioreaktors zählt vor allem das Durchmischen (Homogenisieren). Dazu kommt sowohl das Suspensieren von Feststoffen (Zellen) sowie das Dispergieren

der Gasphase. Zudem muss in Bioreaktoren die Temperatur geregelt und eine Sterilbarriere aufrecht erhalten werden. Ein idealer Bioreaktor ist isotherm ($T=\text{konst.}$), isobar ($p=\text{konst.}$) und isotrop: Die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften und Reaktionsraten sind räumlich konstant. Die Stoffbilanzgleichung für den idealen Rührkesselreaktor als Reaktionsraum lautet wie folgt (Chmiel, 2011):

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad (3.12)$$

mit	V_R	Reaktorvolumen, L
	F_{ein}, F_{aus}	Zulauf- und Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
	$c_i, c_{i,ein}, c_{i,aus}$	Konzentrationen der Komponente i in dem Reaktor sowie im Zulauf- und Ablaufvolumenstrom, g L^{-1}
	r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

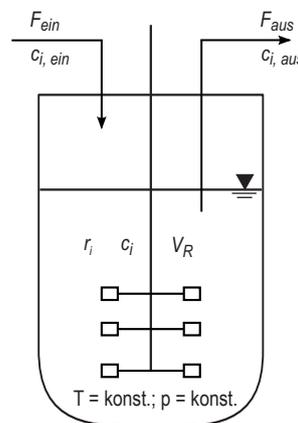


Abbildung 3.7: Ein Rührkesselreaktor (*stirred tank reaktor*, STR) im kontinuierlichem Betrieb mit dem Reaktionsvolumen V_R , dem Zulaufvolumenstrom F_{ein} und dem Ablaufvolumenstrom F_{aus} aus dem Reaktor. c_i , $c_{i,ein}$ und $c_{i,aus}$ sind die Konzentrationen der Komponente i in dem Reaktor sowie im Zulauf- und Ablaufvolumenstrom und r_i ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i .

Bei der Reaktionsführung beziehungsweise Betriebsweise wird zwischen offenen Systemen (kontinuierlichen Betrieb) mit Zu- und Ablauf, teiloffenen Systemen (Zulaufverfahren, *fed-batch*) ohne Ablauf und geschlossenen Systemen (Satzverfahren, *batch*) unterschieden (Chmiel, 2011).

Satzverfahren

Beim Satzverfahren handelt es sich um ein geschlossenes System in Bezug auf die Flüssigphase. Die Begasung sowie die Zugabe kleiner Mengen von Säure oder Base zur pH-Regelung werden in der Praxis vernachlässigt und in der Gleichung daher nicht mehr beachtet. Das Volumen V_R ist näherungsweise konstant, F_{ein} und F_{aus} sind Null. Damit kann die Gleichung 3.12 deutlich vereinfacht werden:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.13)$$

Nach dem Monod-Modell ist die Wachstumsrate μ bei einer ausreichend hohen Substratkonzentration maximal. Für die Sättigungskonstante K_S von *E. coli* für Glucose werden sehr geringe Werte zwischen $0,058$ und 8 mg L^{-1} angegeben (Lendenmann et al., 2000). Die Wachstumsrate ist daher im unlimitierten Satzwachstum über einen langen Zeitraum näherungsweise konstant. Die Gleichung 3.1 kann damit integriert werden und man erhält die Gleichung für das exponentielle Wachstum (c_{X0} ist die Anfangsbiomasse):

$$c_X = c_{X0} \cdot e^{\mu t} \quad (3.14)$$

In Abbildung 3.8 sind die üblicherweise im Satzbetrieb beobachtbaren Wachstumsphasen gezeigt (Monod, 1949; Katoh und Yoshida, 2009). Nach der Inokulation müssen sich die Zellen zunächst an die neue Umgebung, beispielsweise mit anderen Substraten, anpassen. Ein Wachstum ist in der Verzögerungsphase nicht messbar und die Zellen sind zum Beispiel mit der Expression neuer Enzyme beschäftigt. Die Länge der Verzögerungsphase hängt von der Art der Zellen, ihrem Alter, der Anzahl, der Wachstumsphase (wachsend oder stationär), in der sie geerntet wurden und weiteren Faktoren ab. Nach der Anpassung fangen die Zellen in der Übergangsphase 1 mit dem Wachstum an. Die Wachstumsrate nimmt hier zu und erreicht ein Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase. Hier wachsen die Zellen mit μ_{max} und Gleichung 3.14 kann angewendet werden.

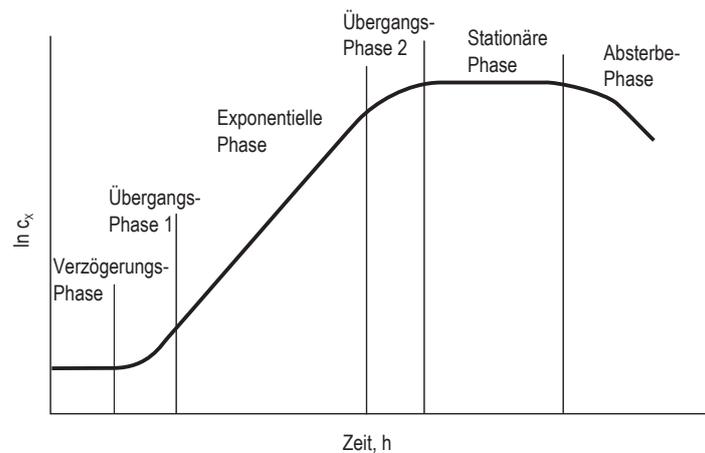


Abbildung 3.8: Typischer Wachstumsverlauf im Satzbetrieb: Verzögerungsphase, Übergangsphase 1, exponentielle Phase, Übergangsphase 2, stationäre Phase und Absterbephase. Geändert nach Monod (1949); Katoh und Yoshida (2009).

Die Verringerung der Wachstumsrate und damit das Ende der exponentiellen Wachstumsphase kann durch eine Limitierung des Substrats bedingt sein, was im Monod-Modell beschrieben wird. c_S ist nicht mehr viel größer als K_S . Die stationäre Phase beginnt noch bevor Glucose vollständig verbraucht ist, bei Konzentrationen von 10^{-7} M (Notley und Ferenci, 1996). Neben Glucose können auch andere Nährstoffe die Verringerung der Biomassebildung auslösen, wie zum Beispiel bei einer Phosphatlimitierung (Huber et al., 2011).

In der stationären Phase sind Wachstums- und Absterberate gleich und die Biomassekonzentration konstant. Im Vergleich zu exponentiell wachsenden Zellen sind Zellen

in der stationären Phase resistenter gegenüber Stress (Huber et al., 2011). Schließlich überwiegt in der letzten Phase das Absterben der Zellen (Lyse) und die Biomassekonzentration sinkt.

Satzkultivierungen werden üblicherweise in einfachen Bioreaktoren wie Mikrotiterplatten oder Schüttelkolben durchgeführt, meist mit relativ geringen Zelldichten. In Rührkesselreaktoren im Labormaßstab wurden mit *E. coli* jedoch Glucosekonzentrationen von bis zu 100 g L^{-1} eingesetzt und Biotrockenmassekonzentrationen von 40 g L^{-1} erreicht. Allerdings wurde hierfür das Glucose-PTS-Aufnahmesystem gentechnisch ausgeschaltet und eine Galactose-Permease überexprimiert, um eine zu starke Acetatbildung zu vermeiden und ein schnelles Wachstum zu ermöglichen (Borja et al., 2012).

Zulaufverfahren

Zulaufverfahren sind halboffene Systeme. Die Prozesse werden mit einer geringen Substratkonzentration gestartet und es erfolgt eine intermittierende oder kontinuierliche Zugabe des (oft limitierenden) Substrats. Zulaufverfahren werden auch in der Industrie vorzugsweise eingesetzt, um die volumetrische Produktivität zu erhöhen (Hewitt et al., 2000; Weuster-Botz et al., 2007). Zudem werden Substratüberschuss-Inhibierungen und ein zu hoher Sauerstoffverbrauch durch unlimitiertes Wachstum vermieden.

Das Volumen ist im Zulaufprozess nicht konstant und $F_{ein} > 0$. Da zudem $F_{aus} = 0$, kann die Gleichung 3.12 wie folgt vereinfacht werden:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (3.15)$$

beziehungsweise:

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (3.16)$$

Die Volumenänderung ist gleich dem Volumenzustrom:

$$\frac{dV_R}{dt} = F_{ein} \quad (3.17)$$

Damit gilt:

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot F_{ein} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (3.18)$$

und:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + r_i \quad (3.19)$$

In einem Zulaufprozess kann die Substratkonzentration geregelt werden. Dies erfordert jedoch die Messung der Substratkonzentration und einen Regelkreis. Einfacher ist es, mit einem vordefinierten exponentiellen Zulaufprofil die Wachstumsrate zu begrenzen (Korz et al., 1995). Dabei sollte die eingestellte Wachstumsrate unter der kritischen Wachstumsrate liegen, um Acetatanreicherung zu vermeiden. Schwankende Ausgangsbio-massen würden bei einem geregelter System zu schlechter Reproduzierbarkeit führen. Mit einer eingestellten Wachstumsrate μ_{set} , die deutlich geringer ist als μ_{max} , kann sich das System hingegen von selbst stabilisieren (Jenzsch et al., 2006).

Bei einem substratlimitierenden Zulauf sollte die Substratkonzentration sehr gering und näherungsweise konstant sein ($\frac{dc_S}{dt} = 0$). Damit gilt für den Zulaufstrom:

$$F_{ein} = \frac{V_R \cdot r_S}{(c_{S,ein} - c_S)} \quad (3.20)$$

Mit $r_s = q_S \cdot c_X$ (Gleichung 3.4) und $q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$ (Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt, Gleichung 3.7) sowie mit der Annahme, dass $\mu = \mu_{set} = \text{konst.}$ und damit $c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{set} t}$ (Gleichung 3.14) kann ein exponentielles Profil berechnet werden (Korz et al., 1995; Jenzsch et al., 2006):

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{X0}}{(c_{S,ein} - c_S) \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu_{set} t} \quad (3.21)$$

Da bei Substratlimitierung die Substratkonzentration im Reaktor nahe Null sein sollte und damit $c_S \ll c_{S,ein}$ ist, kann c_S vernachlässigt und die Gleichung noch weiter vereinfacht werden:

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{X0}}{c_{S,ein} \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu_{set} t} \quad (3.22)$$

Kontinuierliches Verfahren

Kontinuierliche Verfahren sind offene Systeme, mit Zulauf- und Ablaufstrom. Das Volumen kann dabei konstant gehalten und der Prozess in ein sogenanntes Fließgleichgewicht (*steady state*) gebracht werden. Dabei sind die Zustandsgrößen c_X , c_S und c_P konstant und die zeitliche Änderung $\frac{dc_i}{dt}$ ist gleich Null. Damit vereinfacht sich Gleichung 3.12 zu:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = 0 = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad (3.23)$$

Bei einem konstantem Volumen ist $F = F_{ein} = F_{aus}$. Zudem wird die Verdünnungsrate D (*dilutions rate*) definiert als:

$$D = \frac{F}{V} \quad (3.24)$$

Der Kehrwert der Verdünnungsrate ist im ideal durchmischten Rührkesselreaktor die Verweilzeit τ

$$\tau = \frac{1}{D} \quad (3.25)$$

Gleichung 3.23 lässt sich damit vereinfachen zu:

$$r_i = D \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) \quad (3.26)$$

Unter der meist gültigen Annahme, das Zulaufmedium sei steril und damit $c_{X,ein} = 0$, ergibt sich für die Biomasse ($r_X = \mu \cdot c_X$):

$$\mu = D \quad (3.27)$$

Wenn D kleiner als μ_{max} ist, was vorgegeben werden kann, stellt sich ein (auto)stabiler Zustand ein. Dies entspricht der chemostatischen Betriebsweise. Daneben können weitere Prozessregelungen für einen kontinuierlichen Betrieb eingestellt werden wie beispielsweise ein Nutristat (über *online*-Messung der Substratkonzentration) oder Turbidostat (über *online*-Messung der Trübung) (Sahm et al., 2013).

3.2.3 Kultivierung in Bioreaktoren verschiedener Maßstäbe

Die Entwicklung von biotechnologischen Prozessen findet in sehr unterschiedlichen Maßstäben statt. Für die hier vorliegende Arbeit standen parallele Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab zur Verfügung. Der Sauerstoffeintrag ist bei aeroben Kultivierungen mit hohen Zelldichten zentral und kann vor allem in sehr kleinen Maßstäben (Milliliter) und in sehr großen Maßstäben (Produktionsmaßstab) problematisch werden.

Zulaufprozesse in parallelen Miniatur-Bioreaktoren

Die Selektion von Biokatalysatoren beziehungsweise Stämmen sowie die erste Prozessentwicklung erfolgt üblicherweise in verschiedenen Parallelsystemen wie Mikrotiterplatten und Schüttelkolben. Damit soll eine „Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung“ (*high-throughput technology*, HTP oder *high-throughput bioprocess development*, HTBD) ermöglicht werden. Die Kultivierung im Mikroliter-Maßstab (1 μL –100 μL) unterscheidet sich grundlegend von Kultivierungen im Milliliter-Maßstab (beziehungsweise Mini-Maßstab, 100 μL –10 mL) oder Liter-Maßstab (Labor-Maßstab, 100 mL–10 L), was überwiegend auf die stärkeren Oberflächenphänomene zurückzuführen ist (Gernaey et al., 2012). Zudem unterscheidet sich der maximale Sauerstoffeintrag von Mikrotiterplatten und Schüttelkolben teilweise stark von Rührkesselreaktoren (Hortsch, 2011).

In industriellen Prozessen werden meist Zulaufverfahren verwendet (Gernaey et al., 2012; Bower et al., 2012). Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, können durch Substratlimitierung im Zulaufprozess Hochzelldichtekultivierungen leicht und robust realisiert werden. Eine Vielzahl von Bioreaktorkonzepten wurde in den letzten Jahren entwickelt und publiziert (Puskeiler et al., 2005b; Betts und Baganz, 2006; Hortsch und Weuster-Botz, 2010b; Lee et al., 2006; Long et al., 2014). Nur wenige der Miniatur-Bioreaktoren bieten jedoch die Möglichkeit für einen Zulaufprozess und in Miniatur-Bioreaktoren ist die Implementierung eines komplett skalierbaren kontinuierlichen Zulaufs schwierig. Parallele Zulaufprozesse im Milliliter-Maßstab wurden zum Beispiel durch eine intermittierende Glucosezugabe mit einem Pipettierroboter realisiert (Puskeiler et al., 2005b). Die meisten Bioreaktorkonzepte wurden außerdem nur mit geringen Zelldichten ($\text{OD}_{600} \leq 30$) evaluiert (Bareither und Pollard, 2011). Die Prozessoptimierung sollte jedoch unter Bedingungen ablaufen, die möglichst vergleichbar zum industriellen Maßstab sind. Auch für die ersten Schritte, die Auswahl der richtigen Stämme und Klone, sind Zulaufprozesse vorzuziehen. Stämme, die im Satzprozess am besten exprimieren, können in Zulaufprozessen unter den anderen physiologischen Bedingungen schlechtere Leistung zeigen, was für die Expression von eGFP in *Hansenula polymorpha* beispielhaft demonstriert wurde (Scheidle et al., 2010).

Um Zulaufprozesse in Miniatur-Bioreaktoren zu ermöglichen, wurden Freisetzungssysteme entwickelt, wie die FeedBead[®]-Technologie (Jeude und Dittrich, 2006) oder die EnBase[®]-Kultivierungsplattform (Panula-Perälä et al., 2008). In dem FeedBead[®]-System wird Glucose durch Diffusion aus Silikon-Elastomeren freigesetzt. In Schüttelkolben wurde eine Biotrockenmasse (BTM) von $23,4 \text{ g L}^{-1}$ mit *Hansenula polymorpha* erreicht. Bei EnBase[®] erfolgt die Glucosefreisetzung durch enzymatische Hydrolyse von Stärke. Optische Dichten (OD_{600}) von 20–30 wurden in Schüttelkolben und 96-Wellplatten

erreicht (entsprechend $6-9 \text{ g L}^{-1}$ BTM). Mit dem modifiziertem EnBase[®] Flo Kultivierungssystem, welches eine manuelle Zugabe von Wachstumsmedium erfordert, waren OD_{600} von bis zu 51,3 beziehungsweise $10-15 \text{ g L}^{-1}$ BTM möglich (Krause et al., 2010). Eine direkte Maßstabsübertragung und tatsächliche Hochzelldichtekultivierung (mit mehr als 50 g L^{-1} Biotrockenmasse) im Milliliter-Maßstab ist jedoch bisher nicht beschrieben.

Bestimmung und Anpassung des Sauerstoffeintrags in Bioreaktoren

Aufgrund der schlechten Sauerstofflöslichkeit und des hohen Sauerstoffbedarfs, insbesondere bei hohen Zelldichten, gehört die Sauerstoffversorgung zu den wichtigsten Prozessgrößen bei aeroben Kultivierungen. Die volumetrische Sauerstoffaufnahme (*oxygen uptake rate*, OUR) ist analog zur Substrataufnahmerate (Gleichung 3.4) das Produkt der spezifischen Sauerstoffaufnahme q_{O_2} und der Biomassekonzentration c_X .

$$OUR = q_{O_2} \cdot c_X \quad (3.28)$$

mit OUR Sauerstoffaufnahme, $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
 q_{O_2} spezifische Sauerstoffaufnahme, $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Der Sauerstoffeintrag in Bioreaktoren lässt sich mit dem Penetrationsmodell, der Theorie der Oberflächenerneuerung oder durch die Zweifilmtheorie beschreiben, wobei letztere in der Praxis am häufigsten verwendet wird (Chmiel, 2011). Bei der Zweifilmtheorie liegt der gesamte Stofftransportwiderstand auf der Seite des Flüssigkeitsfilms. Die Sauerstofftransportrate, auch OTR (*oxygen transfer rate*), lässt sich durch den flüssigkeitsseitigen Konzentrationsgradienten in der Grenzschicht an der Phasengrenzfläche zwischen Gasblase und Flüssigkeit ($c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}$) sowie den Stoffübergangskoeffizienten k_L und die spezifische Phasengrenzfläche a beschreiben.

$$OTR = k_L a \cdot (c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}) \quad (3.29)$$

mit OTR Sauerstofftransportrate, $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
 $k_L a$ volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s^{-1}
 $c_{O_2,L}$ Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit, g L^{-1}
 $c_{O_2,L}^*$ Sauerstoffkonz. an flüssigkeitsseitigen Phasengrenze, g L^{-1}

Es gibt eine Reihe chemischer und physikalischer Messmethoden für die Bestimmung des $k_L a$ (Hortsch, 2011). Während einer Kultivierung lässt sich am besten die statische Methode mit Hilfe von Messungen des Abgasstroms über eine Abgasanalytik anwenden. Die OUR wird durch eine Massenbilanz des Sauerstoffs in Zu- und Abluft bestimmt:

$$OUR = \frac{(y_{O_2, \text{ein}} - y_{O_2, \text{aus}}) \cdot F_G}{V_L} \cdot \frac{\rho}{M_{O_2}} \quad (3.30)$$

mit	$y_{O_2, \text{ein}}$	Molanteil des Sauerstoffs in der Zuluft, -
	$y_{O_2, \text{aus}}$	Molanteil des Sauerstoffs in der Abluft, -
	F_G	Gasvolumenstrom, L h ⁻¹
	V_L	Flüssigkeitsvolumen, L
	ρ	Dichte von Sauerstoff, g L ⁻¹
	M_{O_2}	Molmasse von Sauerstoff, g mol ⁻¹

Aus der Dichte ρ von Sauerstoff und der Molmasse M_{O_2} lässt sich das molare Volumen berechnen. Zur Berechnung des $k_L a$ wird angenommen, dass OTR und OUR gleich sind, solange sich die Sauerstoffkonzentration während einer aeroben Kultivierung nicht oder nur geringfügig ändert. Damit kann Gleichung 3.29 umgewandelt werden:

$$k_L a = \frac{OTR}{c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}} = \frac{OUR}{c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}} \quad (3.31)$$

Die Gelöstsauerstoffkonzentration $c_{O_2,L}^*$ an der Phasengrenze kann beispielsweise über das Henry-Gesetz abgeschätzt werden (Storhas, 2000), während sich die Differenz $c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}$ aus der *online*-Messung des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 ableiten lässt.

Die Sauerstofftransferate wird unter anderem durch den Leistungseintrag pro Volumeneinheit (kleine Gasbläschen und größeres a , zudem Änderung der Grenzschicht und damit k_L möglich), die Temperatur (Löslichkeit von O_2), das Antischaummittel (beeinflusst a), den Druck (Bläschen kleiner und $c_{O_2,L}^*$ höher), die Gasleerrohrgeschwindigkeit (beeinflusst a) und die Sauerstoffanreicherung in der Zuluft ($c_{O_2,L}^*$ höher) beeinflusst.

Eine minimaler Sauerstoffpartialdruck beziehungsweise eine konstante Sauerstofftransferate gehören zu den wichtigsten Kriterien für die Maßstabsübertragung. Dennoch können hohe Sauerstoffkonzentrationen aus mehreren Gründen für die Expression in *E. coli* schädlich sein (Konz et al., 1998): Es kann zur Oxidation der Plasmid-DNA, der Aminosäuren und dem heterologen Protein kommen und der Abbau reaktiver Sauerstoffspezies muss reguliert werden. Anoxische Bedingungen andererseits wirken über den Zitronensäurezyklus auf die Aminosäuresynthese sowie auf die Plasmid-Replikation.

Eine Erhöhung des Sauerstoffeintrags durch höheren Leistungseintrag kann zu kritischen Scherraten führen und kostet Energie. Die Verringerung der Temperatur ist im Produktionsmaßstab mit hohen Zelldichten ebenfalls mit hohen Kosten verbunden. Eine Sauerstoffanreicherung ist sehr teuer, da viel reiner Sauerstoff verbraucht wird. Der Druck lässt sich in bestimmten Grenzen hingegen leicht erhöhen.

Ma et al. (2010) zeigte, dass bei Expression von Kollagen mit hohen Zelldichten eine Erhöhung des Drucks zur Steigerung des OTR vorteilhafter ist als Sauerstoffanreicherung. Castan et al. (2002) konnte bei der Expression von menschlichem Wachstumshormon zwar mit einer Sauerstoffanreicherung ein exponentielles Wachstum länger aufrecht halten, allerdings mit sinkenden Wachstumsraten und Ertragskoeffizienten sowie mit einer geringeren Produktbildung als erwartet.

Ein Überdruck zur Steigerung des Sauerstofftransfers ist ebenfalls nicht immer vorteilhaft für den Prozess, da die Löslichkeit und der potentiell schädliche Effekt von CO_2 erhöht wird (Tripathi et al., 2009). CO_2 -Partialdrücke von über 0,3 bar beziehungsweise über 10 % CO_2 im Zulaufstrom können das Wachstum von *E. coli* verringern (Lee, 1996;

Castan et al., 2002). Andererseits gelten Drücke von bis zu 10–11 bar als nicht direkt schädlich für Bakterien und wurden erfolgreich angewendet, um die Produktivität bei *E. coli* zu erhöhen (Knoll et al., 2007; Follonier und Panke, 2012). Ein CO₂-Partialdruck von 0,8 bar beeinflusste dabei das Wachstum nicht.

Kriterien zur Maßstabsübertragung

Bei der Übertragung aus dem Labor- in den Produktionsmaßstab werden bei Zulauf- und insbesondere Hochzelldichte-Prozessen mit *E. coli* oft schlechtere Erträge beobachtet. Effekte auf Biomasseausbeute, Zellphysiologie und -lebensfähigkeit wurden gezeigt, wobei letztere sogar teilweise erhöht war. (Xu et al., 1999; Hewitt et al., 2000)

Biologisch sind in großen Maßstäben unter anderem Generationenzahl, Mutationswahrscheinlichkeit, Kontaminationsrisiko, Plasmidstabilität und Translationsfehler durch metabolischen Stress zu beachten. Chemisch können beispielsweise Redoxpotential, Titrationsmittel, Reinheit der Substanzen und die Schaumbildung abweichen. Physikalisch sind gegebenenfalls Begasung, Rührerdrehzahl, (hydrostatischer) Druck, Mediensterilisation und vor allem die Durchmischung anders als im Labormaßstab. (Junker, 2004; Schmidt, 2005)

Zirkulierende Zellen erfahren in großen Produktionsbioreaktoren schnell wechselnde Bedingungen, insbesondere in Bezug auf Sauerstoff- und Substratversorgung (Hewitt et al., 2000). Bei 30 g_{BTM} L⁻¹ und unlimitiertem Wachstum würde *E. coli* den maximal im Medium gelösten Sauerstoff (unter 10 mg L⁻¹) in weniger als 2 s aufbrauchen (Konz et al., 1998). Die Zellen sind in der Lage innerhalb von Sekunden auf Gradienten und Änderungen der Sauerstoff- und Substratkonzentration durch transkriptionelle Mechanismen zu reagieren (Schweder et al., 1999). Zwar bildet *E. coli* schon bei niedrigem Glucoseüberschuss (ab 30 mg L⁻¹) Acetat (Schmidt, 2005) und verbraucht es durch glucoselimitiertes Wachstum wieder (Neubauer et al., 1995), allerdings ist eher für die verminderte Biomasseausbeute die Tatsache verantwortlich, dass in Sauerstoff-reichen und -armen Zonen im Bioreaktor die Produkte der gemischten Säuregärung abwechselnd gebildet und verbraucht werden (Xu et al., 1999).

Es gibt unterschiedliche Auslegungskriterien für den Transfer vom Labor- in den Produktionsmaßstab, die einzeln oder in Kombination konstant gehalten werden können. Eine Übersicht hierzu geben beispielsweise Junker (2004) und Schmidt (2005), was im folgenden zusammengefasst wird. Die meisten Skalierungs-Kriterien und -Parameter beziehen sich auf bekannte physiologische Effekte, vor allem auf Sauerstoffversorgung, Wärmetransport und Durchmischung. Maßstabsübertragungen sind selten geradlinig und komplett Modell- oder Strategie-basiert, sondern das Ergebnis von Prozessentwicklung und -optimierung in jedem Maßstab. Die Konstanz eines Parameters führt oft zu Änderungen anderer Variablen, die ungünstig oder technisch nicht umsetzbar sind. In großem Maßstab sind überlicherweise die CO₂-Konzentrationen durch den höheren Druck höher, die Scherkräfte weniger einheitlich und die Durchmischung schlechter. Das Verhältnis Fläche/Volumen zum Beispiel für den Wärmetransport ist ebenfalls geringer.

Ein gleichbleibender Leistungseintrag (P/V) als naheliegendes Kriterium lässt sich oft aus wirtschaftlichen oder technischen Gründen nicht realisieren (Sahm et al., 2013);

zudem nehmen die Mischzeit und Rührerspitzen­geschwindigkeit stark zu (Storhas, 2000).

Geometrische Ähnlichkeit zwischen Bioreaktoren verschiedener Maßstäbe ist zwar eine wichtige Voraussetzung für viele Korrelationen, in der Praxis aber nicht immer erreichbar. Die Rührerspitzen­geschwindigkeit ist wiederum zu beachten, wenn eine Beziehung zwischen Scherrate und Morphologie besteht. Dies ist gerade bei mycelbildenden Mikroorganismen und weniger bei Bakterien oder Hefen der Fall (Junker, 2004).

Der Sauerstofftransfer beziehungsweise k_{La} ist wegen der schlechten Löslichkeit von Sauerstoff im Medium oft am wichtigsten. Daher ist der k_{La} , der mit dem Leistungseintrag, der Begasung und der Viskosität zusammen hängt, eines der am häufigsten angewendeten Kriterien. In industriellen Bioreaktoren liegt der k_{La} bei $0,11 - 0,22 \text{ s}^{-1}$ (Junker, 2004). Der k_{La} ist jedoch prozessspezifisch, im Prozessverlauf nicht immer konstant und daher für die Übertragung gegebenenfalls schwierig zu verwenden (Junker, 2004). Gradienten in der gelösten Sauerstoffkonzentration können außerdem trotz gleichem k_{La} die Maßstabsvergrößerung stören. Durch Zugabe von Substrat an einer Stelle, meist oben am Reaktor, entstehen Gradienten aus Substrat, die zu lokalen Sauerstofflimitierungen und gemischter Säuregärung von *E. coli* führen (Xu et al., 1999). Zudem spielt die Oberflächenbegasung bei kleineren Reaktoren im Vergleich zum Produktionsmaßstab eine deutlich größere Rolle.

Im Vergleich zum k_{La} ist die Einhaltung eines minimalen Sauerstoffpartialdrucks pO_2 einfach und robust (Schmidt, 2005). Für *E. coli* oder Hefe-Kultivierungen kann ein unterer Grenzwert von 10–30 % ausreichend sein (Junker, 2004). Der pO_2 kann wie der k_{La} durch die Rührerdrehzahl und die Begasung geregelt werden, wobei der Leistungseintrag nur soweit wie nötig erhöht werden muss. Beim pO_2 als Kriterium müssen jedoch ebenfalls Gradienten in großen Maßstäben berücksichtigt werden. Hier kann es jedoch zielführend sein, den pO_2 an den kritischen Stellen zu messen. Der festgelegte untere pO_2 -Grenzwert darf an diesen Messpunkten nicht unterschritten werden.

Eine konstante Belüftungsrate als weiteres Skalierungskriterium kann bei unterschiedlichen Reaktor-Geometrien zu unterschiedlichen Gasleerrohrgeschwindigkeiten und k_{La} -Werten führen (Sahm et al., 2013). Hohe Begasungsraten führen zudem zu vermehrter Schaumbildung.

Konstante Mischzeiten sind ebenfalls nicht einzuhalten und liegen in Laborreaktoren typischerweise im niedrigen Sekundenbereich (5 s für 10 L), während Produktionsreaktoren mehrere Minuten (70–140 s für 60.000–120.000 L) benötigen (Junker, 2004).

In der Praxis werden hauptsächlich pO_2 , k_{La} oder OTR als Kriterium im ersten Durchgang verwendet (Junker, 2004). Danach kann zum Beispiel der Einfluss der Mischzeit untersucht werden. Insgesamt muss für eine effiziente Prozessentwicklung und den Transfer in Produktionsmaßstab bekannt sein, welche Größen den Prozess maßgeblich beeinflussen.

3.3 Kultivierung von *Escherichia coli* zur rekombinanten Proteinexpression

Für die rekombinante Proteinexpression gibt es neben dem oft bevorzugten *E. coli* viele alternative Wirtsorganismen (Terpe, 2006; Gopal und Kumar, 2013), von denen auch einige für die Produktion von Spinnenseidenproteinen untersucht wurden (vgl. Abschnitt 3.1.3). Diese Arbeit konzentriert sich aber auf *E. coli*, da dieser Ansatz industriell am weitesten entwickelt ist (vgl. Tabelle 3.2).

E. coli ist ein fakultativ anaerobes, gramnegatives Enterobakterium, das in der Lage ist, viele Kohlenstoffquellen für heterologes Wachstum zu nutzen (Förster und Gescher, 2014). Es wird häufig als Wirtsorganismus für die rekombinante Proteinexpression verwendet, da es sich leicht gentechnisch verändern lässt und sich für Hochzelldichtekultivierung eignet (Gopal und Kumar, 2013; Marisch et al., 2013a). Zudem gibt es verschiedene Expressionssysteme mit zahlreichen Stämmen, Plasmiden und Promotoren (Terpe, 2006).

Zunächst wird der Metabolismus von *E. coli* sowie die Möglichkeit zur Hochzelldichtekultivierung (HCDC, *high cell density cultivation*) genauer betrachtet. Dann wird die Proteinexpression vor allem mit dem T7-Expressionssystem und die resultierende metabolische Last erläutert. Die Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) beziehungsweise die Autoinduktion werden daraufhin dargestellt und schließlich ein paar alternative *E. coli*-Stämme vorgestellt.

3.3.1 Zentraler Metabolismus von *Escherichia coli*

Glucoseaufnahme, gemischte Säuregärung und Überflussmetabolismus

Der Glucosetransport bei *E. coli* funktioniert primär über das bekannte glucosespezifische PEP-Phosphotransferase-System (Glucose-PTS, Steinsiek und Bettenbrock, 2012). Glucose wird dabei unter Umwandlung von PEP zu Pyruvat phosphoryliert (Abbildung 3.9). Nach Ferenci (1996) erfolgt jedoch bei mikromolaren Glucosekonzentrationen der Transport von Glucose über ein ABC-Transportsystem (ABC: *ATP binding cassette*) mit hoher Affinität und ist unabhängig vom PTS. Laut Steinsiek und Bettenbrock (2012) wird Glucose auch über das Manose-PTS sowie die ABC-Transporter für Galactose und Maltose aufgenommen. Da die Glucose dabei unphosphoryliert in die Zelle gelangt, wird sie unabhängig vom Transport von einer Glucokinase zu Glucose-6-P phosphoryliert (Steinsiek und Bettenbrock, 2012).

Nach der Aufnahme erfolgt der Abbau von Glucose über die Glykolyse zu Pyruvat. Pyruvat ist im Stoffwechsel ein zentraler Knotenpunkt. Bei aerobem Metabolismus wird es zu Acetyl-CoA umgewandelt, das in den Citratzyklus (TCA, *tricarboxylic acid cycle*) eintritt. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA zu Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidiert und die freigesetzte Energie in ATP und NADH umgewandelt. In der Atmungskette wird NADH schließlich schrittweise mit Hilfe von Sauerstoff unter Bildung von Wasser oxidiert und weiteres ATP gebildet. (Chmiel, 2011)

Unter anaeroben Bedingungen ist keine Atmungskette möglich und der Citratzyklus inaktiv. Wenn keine anderen Elektronenakzeptoren vorhanden sind, wandelt *E. coli* in der

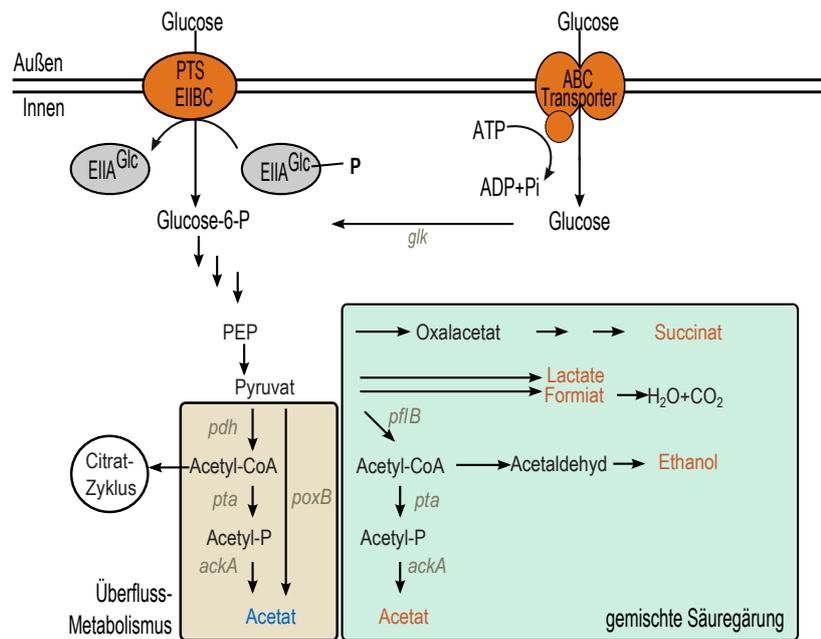
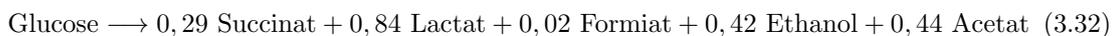


Abbildung 3.9: Vereinfachte Darstellung zur Glucoseaufnahme, Überflussmetabolismus und gemischter Säuregärung in *E. coli*. Im glucosehaltigen Medium wird Glucose über das glucosespezifische PEP-Phosphotransferase-System (PTS) aufgenommen. Bei glucoselimitierten Bedingungen hingegen exprimiert *E. coli* einen ABC-Transporter mit hoher Affinität zu Glucose. Bei aerobem Glucose-Überschuss wird Acetat über den *ackA-pta* (exponentielle Phase) oder *poxB*-Weg (stationäre Phase beziehungsweise sauerstofflimitiert) gebildet. Unter anaeroben Bedingungen verwertet *E. coli* Glucose durch die gemischte Säuregärung, wobei Succinat, Lactat, Formiat, Ethanol und Acetat entstehen.

glk: Glucokinase; *poxB*: Pyruvat-Oxidase; *pdh*: Pyruvat-Dehydrogenase; *pflB*: Pyruvat-Formiat-Lyase; *pta*: Phosphat-Acetyltransferase; *ackA*: Acetat-Kinase. Zusammengestellt nach Ferenci (1996); Xu et al. (1999); Dittrich et al. (2003).

sogenannten gemischten Säuregärung Glucose zu einer Mischung von Säuren um (Clark, 1989). Dabei werden Succinat, Lactat, Formiat, Ethanol und Acetat gebildet. Nach Fuchs und Schlegel (2007) gelten dabei die folgenden stöchiometrischen Verhältnisse:



Der Acetatstoffwechsel spielt eine wichtige Rolle für Zulaufprozesse mit *E. coli*, da höhere Acetatkonzentrationen das Wachstum und die Expression heterologer Proteine hemmen können (Xu et al., 1999; Eiteman und Altman, 2006). Acetatkonzentrationen von über 5 g L^{-1} bei pH 7 verringern die Wachstumsrate, die Biomasseausbeute und die maximale BTM in Hochzelldichtekultivierungen (Lee, 1996). Die Inhibierung der Wachstumsrate erfolgt nach einem nicht-kompetitiven Modell (Xu et al., 1999). Eine Ursache ist die Inhibierung des Methioninbiosynthesewegs. Dadurch fehlt den Zellen Methionin und das toxische Zwischenprodukt Homocystein akkumuliert. Beides führt zu einer Hemmung des Wachstums (Roe et al., 2002). Die Zugabe von Methionin kann die Inhibierung durch Acetat verringern, aber nicht komplett aufheben. Acetat hat folglich weitere negative Einflüsse auf die Zelle.

Acetat wird sowohl anaerob in der gemischten Säuregärung als auch bei aerobem Glucoseüberschuss gebildet. Bei diesem sogenannten Überflussmetabolismus (*overflow metabolism*) übersteigt die Glucoseaufnahme durch das sehr effiziente PTS den biosynthetischen Bedarf und die Kapazität der Respiration (Lee, 1996). Acetyl-CoA kann damit nicht in den Citratzyklus eintreten und würde akkumulieren.

Dittrich et al. (2003) beschreibt zwei Wege für aerobe Acetatbildung: über *poxB* oder über *ackA-pta*. Der *ackA-pta*-Weg ist aktiver während dem exponentiellen Wachstum und der *poxB*-Weg während der stationären Phase. Der *poxB*-Weg ist außerdem nur unter mikroaeroben beziehungsweise sauerstofflimitierten Bedingungen aktiv (Jantama et al., 2008). Der *ackA-pta*-Weg hingegen könnte auch bei Anwesenheit von Sauerstoff überschüssiges Acetyl-CoA in Acetat umwandeln.

Es wurde ein starker Zusammenhang zwischen der Acetatbildung und dem Redox-Potential festgestellt (Vemuri et al., 2006). Da bei der Acetatbildung im Gegensatz zum Citratzyklus kein NADH entsteht, könnte es ein Weg für die Zelle sein, die NADH-Akkumulation zu verhindern (Vemuri et al., 2006). Zudem wird die Acetatbildung vom sauren pH beeinflusst: Der *ackA-pta*-Weg wird gehemmt und der *poxB*-Weg aktiviert (Dittrich et al., 2003). In HCDC von *E. coli* W3100 wurden bei pH 6,0 und 6,5 bis zu 6 g L^{-1} , bei pH 7,5 hingegen bis zu 12 g L^{-1} Acetat gebildet (Kleman und Strohl, 1994).

Die Acetatbildung wird stark von der Wachstumsrate beeinflusst. Die kritische Wachstumsrate, ab der es zur Acetatbildung kommt, hängt wiederum von Stamm und Medium beziehungsweise der Kohlenstoffquelle ab (Lee, 1996). So findet mit Glycerol keine aerobe Acetatbildung statt (Holms, 1996) beziehungsweise erst deutlich später als mit Glucose (Nakano et al., 1997). Auf der anderen Seite gelten für Glucose Wachstumsraten von über $0,2 - 0,35 \text{ h}^{-1}$ als kritisch (Tripathi et al., 2009). Während einer Glucoselimitierung wird Acetat wiederum von den Zellen abgebaut (Luli und Strohl, 1990), was unter Anwesenheit von Glucose dreimal schneller erfolgt als in kompletter Abwesenheit von Glucose (Xu et al., 1999). Eine Limitierung des Wachstums durch einen substratlimitierenden Zulauf ist daher eine der einfachsten und häufigsten Strategien zur Vermeidung von Acetatbildung. Dialyse und Mediumerneuerung als Strategien für Acetatverringern sind hingegen schwer in den Produktionsmaßstab zu übertragen (Lee, 1996).

Neben prozesstechnischen Lösungen sind zahlreiche gentechnische Ansätze publiziert, um die Acetatbildung zu vermeiden: Dazu zählen die Deletionen von *pta* (Hahm et al., 1994), *ptsG* (Chou et al., 1994), *arcA* sowie die Überexpression einer NADH-Oxidase (Vemuri et al., 2006). Contiero et al. (2000) untersuchte das Ausschalten mehrerer Gene, die bei der Acetatbildung beteiligt sind. Mit einer *poxB*-Mutante wurde sogar eine höhere Acetatbildung gemessen. Deletionen in *pta* oder *ackA* führten zwar zu weniger Acetat, aber zugleich auch zu geringeren Biotrockenmassekonzentrationen bei Hochzelldichtekultivierungen. Die besten Ergebnisse konnten erreicht werden mit der Deletion von *rpoS*, einem Sigma-Faktor, der in Stressreaktionen involviert ist.

Katabolitrepression und *lac*-Operon

Bakterien wie *E. coli* sind sehr gut an ihre Umwelt angepasst, was zum Beispiel die sogenannte Katabolitrepression zeigt. Katabolitrepression findet statt, wenn mehr als

eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht und eine davon bevorzugt verwertet wird (Deutscher, 2008). Oftmals ist dabei das PEP-Phosphotransferasesystem (PTS) beteiligt, das die Kohlenhydrate transportiert und phosphoryliert.

Ein typisches Beispiel für die Katabolitrepression ist die Funktion des *lac*-Operons und die Inhibierung der β -Galactosidase-Expression (LacZ) in *E. coli* (Kimata et al., 1997). Das *lac*-Operon enthält die Gene für LacI, LacZ, LacY und LacA und wird durch mehrere Mechanismen reguliert (Abbildung 3.10).

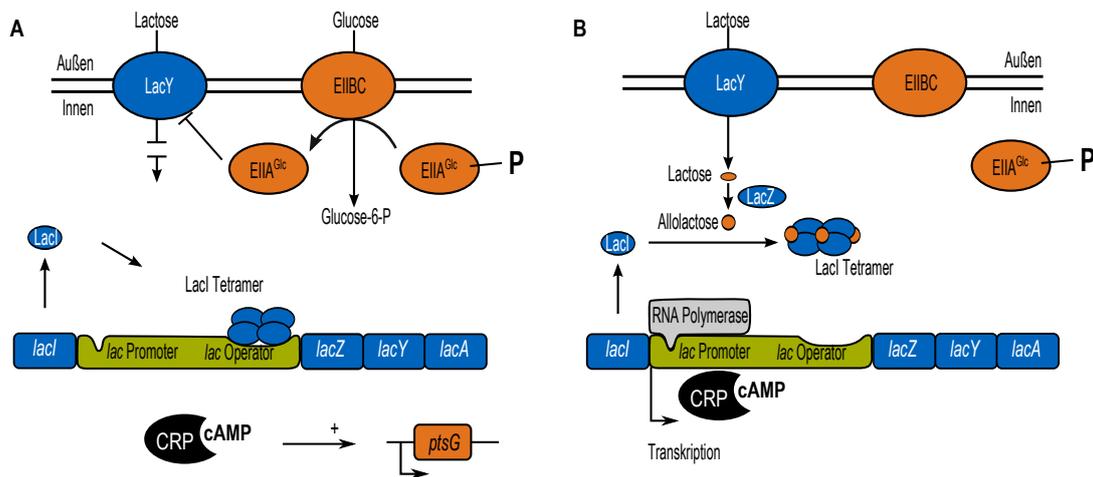


Abbildung 3.10: Katabolitrepression und Lac-Operon (blau): Bei Anwesenheit von Glucose (A) wird Glucose über das Glucose-Phosphotransferasesystem (*ptsG*, orangerot) aufgenommen. Die wichtigsten Bestandteile des Systems sind EIIBC und EIIA. Vom letzteren wird Glucose bei dem Import phosphoryliert. Die dephosphorylierte Form von EIIA hemmt die Lactose-Permease LacY. Der Lactoserepressor LacI bindet an den *lac*-Operator und verhindert die Transkription. Erst wenn Glucose fehlt (B), kann Lactose aufgenommen werden. Die β -Galactosidase LacZ wandelt als Nebenreaktion Lactose in Allolactose um. Allolactose bindet und inaktiviert den Repressor LacI, der dadurch nicht mehr an den *lac*-Operator binden kann. Zusammen mit der Anwesenheit von CRP-cAMP (CRP: *cAMP receptor protein*), welches die Affinität der RNA-Polymerase zum Promoter erhöht, können die Gene des *lac*-Operons transkribiert werden. Modifiziert nach Deutscher et al. (2006); Kimata et al. (1997); Inada et al. (1996).

Der Repressor LacI wird separat und konstitutiv exprimiert, bildet ein Tetramer und verhindert die Expression des *lac*-Operons durch Bindung an den Operator. Die RNA-Polymerase kann nur in Abwesenheit von LacI die Gene transkribieren. Für eine effiziente Bindung der Polymerase ist zudem der Komplex aus CRP (*cAMP receptor protein*) und cAMP nötig, auch als CAP-cAMP bezeichnet (*catabolite activator protein*). Ursprünglich wurde eine Verringerung der cAMP-Konzentration durch Glucose als Grund für den Einfluss der Glucose auf die Expression des *lac*-Operons angesehen. Inada et al. (1996) konnte jedoch zeigen, dass die cAMP-Konzentration gleich hoch ist in Anwesenheit von Lactose oder Glucose allein oder in Anwesenheit beider Substrate. Weitere Hinweise gegen die Wirkung von Glucose über cAMP liefert die Erkenntnis, dass die Inaktivierung des LacI oder die Zugabe von IPTG die Katabolitrepression verhindert. Die Aufnahme von Glucose verhindert die Aufnahme von Lactose über das PTS, was als Induktor-Ausschluss bezeichnet wird (*inducer exclusion*, Inada et al., 1996; Kimata et al., 1997). Bei der Aufnahme wird Glucose phosphoryliert und das Protein EIIA wird dephosphoryliert. Dieses gehört zum Enzymkomplex EII und ist Teil des PTS. Dephosphoryliertes EIIA

hemmt die Lactose-Permease LacY, wodurch Lactose erst gar nicht in die Zelle gelangt. CRP-cAMP spielt auch eine Rolle bei dem Induktor-Ausschluss, da es die Expression der PTS-Gene aktiviert (Kimata et al., 1997).

Weitere Kohlenstoffquellen

Neben der oft eingesetzten Glucose ist *E. coli* in der Lage weitere Kohlenstoffquellen wie Arabinose, Galactose, Glycerol, Maltose, Mannose, Sorbitol oder Xylose zu nutzen (Xia et al., 2012; Lin et al., 2005; Desai und Rao, 2010; Förster und Gescher, 2014). Interessanterweise geht die Katabolitrepression über Glucose hinaus, da *E. coli* beispielsweise Arabinose vor Xylose verstoffwechselt (Desai und Rao, 2010).

Definierte Medien mit einer Kohlenstoffquelle können zu einem langsameren Wachstum und schlechterer Expression führen. Sie werden trotzdem verwendet, da die Proteinkonzentrationen reproduzierbarer sind und die Prozesskontrolle sowie die Aufarbeitung des heterologen Proteins einfacher sein können. Es ist zudem erstrebenswert, die Zulaufmedien so einfach wie möglich zu gestalten. (Tripathi et al., 2009)

Ein weiteres mögliches Substrat ist Fructose, das von *E. coli* über drei Hauptwege verwertet wird (Kornberg, 2001). Das PTS spielt bei zwei Wegen eine entscheidende Rolle. Der wichtigste Weg beinhaltet Gene eines Fructose-Operons: Das Membranspannende Protein *fruA*, die 1-Phosphofruktokinase *fruB* und den Repressor *fruR*. Beim Import wird Fructose zunächst zu Fructose-1-Phosphat und dann zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Der zweite Weg führt über Membran-spannende Proteine, die mehrere Zucker erkennen können, insbesondere Mannose (*manXYZ*), Glucitol (*gutA*) und Mannitol (*mtlA*), und bei hohen Fructosekonzentrationen auch Fructose aufnehmen. Dabei wird jedoch im Gegensatz zum Fructose-PTS zunächst 6-Fructophosphat und erst im zweiten Schritt Fructose-1,6-bisphosphat gebildet. Ist *E. coli* durch Deletionen zu den ersten beiden Wegen nicht in der Lage, kann es durch weitere Mutationen die Fähigkeit zu einem dritten Weg erwerben. Fructose kann dann durch eine Isoform der Glucose-Permease in die Zelle diffundieren. Dabei ist das PTS nicht beteiligt und Fructose wird beim Import nicht phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt stattdessen intrazellulär durch die Manno(fructo)kinase. Wie die ersten beiden Wege führt auch dieser zu Fructose-1,6-bisphosphat, welches ein Intermediat der Glykolyse ist.

Aus Sicht der industriellen Biotechnologie ist es ungünstig, dass etwa die Hälfte der *E. coli*-Stämme, darunter auch die im Labor meist verwendeten *E. coli* K12 und *E. coli* B, nicht in der Lage sind, Saccharose zu verstoffwechseln (Lee et al., 2010; Förster und Gescher, 2014). Der wesentliche Vorteil von Saccharose wäre der niedrigere Preis, vor allem bei saccharosehaltigen Melassen, die als Rückstände bei der Saccharoseherstellung anfallen (Peters, 2006). Saccharose soll zudem einen positiven Einfluss auf den Erhalt der Proteinstruktur haben und die Zellen vor Stress durch Oxidation, Hitze oder Säuren schützen (Lee et al., 2010). Melasse enthält neben der Saccharose noch Mineralien, Vitamine und Stickstoffquellen, die sich positiv oder gegebenenfalls auch negativ auf Kultivierung auswirken können (Peters, 2006). Melasse wurde bereits erfolgreich für die Produktion von PHB (Polyhydroxybuttersäure) und für die Expression von PsCR (Carbonyl-Reductase) und BmGDH (einer Glucose-Dehydrogenase) verwendet (Liu et al., 1998; Ye et al., 2010).

Es sind vor allem drei verschiedene Saccharose-Verwertungssysteme in der Literatur beschrieben (Lee et al., 2010; Hoefel et al., 2012): Zum einen wird eine β -Fructofuranosidase beziehungsweise Invertase heterolog exprimiert und sekretiert. Die Saccharose wird extrazellulär gespalten. Die Aufnahme von Glucose und Fructose erfolgt über die zelleigenen Glucose- und Fructose-Phosphotransferasesysteme. Bei einem Substratüberschuss ist aber die Katabolitrepression durch Glucose zu beachten. Das zweite System ist ein Saccharose-spezifisches PTS. Die Aufnahme von Saccharose und Umwandlung zu Saccharose-6-P erfolgt analog zum Glucose-PTS gleichzeitig über die Gene *scrY* und *scrA*. Die Spaltung zu Fructose und Glucose-6-P erfolgt dann intrazellulär durch *scrB*. Schließlich findet die Umwandlung von Fructose zu Fructose-6-P durch *scrK* statt. Das dritte System ist ein Saccharose-Permease-System, das in manchen *E. coli*-Stämmen vorkommt. Die Aufnahme von Saccharose findet ohne Phosphorylierung über *cscB* statt. Es folgen die Spaltung zu Fructose und Glucose durch die Invertase *cscA* und die Umwandlung von Fructose zu Fructose-6-P durch *cscK*.

3.3.2 Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli*

Hochzelldichtekultivierung im Liter-Maßstab

Hochzelldichtekultivierungen (HCDC) von *E. coli* wurden in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben (Lee, 1996; Riesenberg und Guthke, 1999; Shiloach und Fass, 2005). Mit einem limitierenden Glycerolzulauf wurden $145 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (Korz et al., 1995) beziehungsweise mit einem nicht-limitierenden Glucose-geregelten Wachstum $148 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ (Horn et al., 1996) erzielt. Mit einem sog. „*model-based adaptive control*“ mit Hilfe einer Permittivitätssonde wurden $154 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ in weniger als 17 h erreicht (Horta et al., 2012). Die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen konnten in Dialysereaktoren realisiert werden: 180 und $190 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ mit Glycerol und Glucose (Nakano et al., 1997).

Mit Hilfe von HCDC lassen sich höhere Produktkonzentrationen und volumetrische Produktivitäten erreichen, Reaktordimensionen und Anlageninvestitionen können kleiner gehalten und beispielsweise Abwasser eingespart werden (Lee, 1996; Choi et al., 2006). Nachteile von HCDC können Substratinhibierungen (bei hohen Substratkonzentrationen), begrenzte Sauerstofftransferkapazität, hoher CO_2 -Gehalt, Bildung wachstumshemmender Nebenprodukte, Plasmidverlust und begrenzter Wärmeabtransport sein (Tripathi et al., 2009; Baneyx, 1999). Substratüberschussinhibierungen und Nebenproduktbildung lassen sich mit einem substratlimitierendem Zulauf vermeiden. Auch der Bedarf an Sauerstoff und die CO_2 -Bildung lassen sich durch die Zulauftrate steuern. Um den Plasmidverlust zu begrenzen, sind stabile Antibiotika (zum Beispiel Kanamycin statt Ampicillin), ein möglichst „dichter“ Promoter ohne basale Expression sowie möglichst geringer Stress durch die Proteinproduktion von Vorteil.

Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab

Hochzelldichtekultivierungen wurden vor kurzem auch in kleinen Bioreaktoren mit einem Volumen von $\leq 250 \text{ mL}$ realisiert. In *E. coli*-Zulaufkultivierungen wurden BTM von bis zu 70 g L^{-1} (Bareither et al., 2013) und sogar über 80 g L^{-1} (Schlottbom et al., 2013) er-

reicht. In einem neu entwickelten 1 mL Mikrobioreaktor wurden $OD_{600} = 40-60$ erzielt (Bower et al., 2012). Es sind jedoch keine HCDC mit über 50 g L^{-1} BTM im Milliliter-Maßstab bekannt. Die höchsten Zelldichten, die in diesem Maßstab mit einem intermittierenden Zulauf erreicht wurden, liegen bei $36,9 \text{ g L}^{-1}$ mit *E. coli* und $30-35 \text{ g L}^{-1}$ mit *Bacillus subtilis* (Puskeiler et al., 2005b; Knorr et al., 2007; Hortsch und Weuster-Botz, 2010b).

Ein intermittierender Zulauf kann verschiedene Effekte auf die Zellen haben. Insbesondere schwankt die Verfügbarkeit von Glucose nach jeder Zugabe. Ferenci (2001) definierte verschiedene Ausprägungen von „Hunger“: *hunger* und *starvation*. Ersteres findet statt, wenn Glucose in geringen Mengen vorhanden ist, also eine Glucoselimitierung vorliegt. Die Wachstumsrate ist weder maximal noch Null ($0 < \mu < \mu_{max}$). Im zweiten Fall fehlt Glucose (nahezu) vollständig, weswegen kein Wachstum stattfindet ($\mu = 0$) und die Zellen verhungern. Nach jeder einzelnen Zugabe bei einem intermittierenden Zulauf liegt zuerst ein Überschuss an Glucose vor und die Zellen wachsen maximal ($\mu = \mu_{max}$). Durch das Wachstum wird die Glucosekonzentration verringert bis sie limitierend für das Wachstum wird. Schließlich ist die Glucose aufgebraucht und das Wachstum bricht ein. *E. coli* ist in der Lage, innerhalb von Sekunden auf Änderungen der Substratkonzentration zu reagieren (Schweder et al., 1999). Schwankende Umgebungsbedingungen können die Zellphysiologie beeinflussen und die Biomasseausbeute verringern (Hewitt et al., 2000). Heterogenitäten in der Glucose-Versorgung gehen mit einer verringerten Expression von GFP einher (Brognaux et al., 2012). Ein Glucoseüberschuss kann zum Überflussmetabolismus und Acetatbildung führen. Auf der anderen Seite entstehen durch starke Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck vor allem bei hohen Zelldichten vorübergehende Sauerstofflimitierungen, die wiederum die gemischte Säuregärung auslösen könnten (Xu et al., 1999).

3.3.3 Proteinexpression in *Escherichia coli* und das T7-Expressionssystem

Für *E. coli* gibt es eine Vielzahl von Strategien zur heterologen Expression von Proteinen, darunter viele verschiedene Vektoren und unterschiedliche Induktionsstrategien (Terpe, 2006). Neben dem sehr verbreiteten T7-Expressionssystem kommen vor allem die Promotorsysteme p_L , *tetA*, *araBAD* und *rhaP_{BAD}* für die Proteinproduktion in *E. coli* zum Einsatz. Diese werden durch Erhöhung der Temperatur (p_L) oder Zugabe von Tetracyclin (*tetA*), Arabinose (*araBAD*) und Rhamnose (*rhaP_{BAD}*) induziert.

Je nach Expressionssystem variiert die Kopienzahl der Plasmide und damit die Gendosis genauso wie die Stärke der Promoters. Neben dem Promoter spielen weitere Teile des genregulatorischen Bereichs am 5'-Ende für die Transkription eine Rolle (Baneyx, 1999). Die mRNA-Stabilität (30 s bis 20 min in *E. coli*), die Sekundärstrukturen der mRNA sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz und die *Downstream Box* können die Translation steuern (Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Der zytoplasmatische Abbau ist ebenfalls relevant. So ist der häufig verwendete Expressionsstamm *E. coli* BL21 defizient in den Proteasen *lon* und *ompT*.

Noch komplizierter wird es, wenn eine korrekte Faltung des Proteins erwünscht beziehungsweise erforderlich ist, da nur so die Funktionalität erhalten wird. Die Co-Expression von Chaperonen kann hierbei die Löslichkeit der Proteine wesentlich erhöhen (de Marco,

2007). Die Expression von Fusionsproteinen wie beispielsweise dem maltosebindenden Protein (MBP) führt ebenfalls oft zu einer besseren Löslichkeit (Baneyx, 1999). Zudem gibt es *E. coli*-Stämme, die Disulfid-Bindungen im Zytoplasma oder Periplasma ermöglichen (Sahdev et al., 2008). Neben der zytoplasmatischen Expression besteht außerdem die Möglichkeit der periplasmatischen oder extrazellulären Expression (Swartz, 2001).

Zu den Nachteilen der Proteinproduktion mit *E. coli* gehört die Akkumulation von Lipopolysacchariden (LPS), die als Endotoxine im Menschen pyrogen wirken (Terpe, 2006). Zudem kann *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen durchführen sowie nur schlecht sekretieren und Disulfid-Bindungen ausbilden (Marisch et al., 2013a). Die Stabilität der exprimierten Proteine kann durch die Aktivität von Proteasen verringert werden und stark überexprimierte Proteine aggregieren oft in Einschlusskörperchen (Choi et al., 2006).

Für die Expression des Performanceproteins C16 sind keine Disulfidbindungen und keine korrekte Faltung erforderlich, da keine enzymatische Aktivität vorliegt. Daher stellen die genannten Schwierigkeiten beziehungsweise Nachteile der Proteinexpression in *E. coli* kein Problem für die in dieser Arbeit verfolgte Zielsetzung dar. Durch die sehr schlechte Löslichkeit und die Selbstassemblierung (siehe Abschnitt 3.1.3) ist die Bildung von Einschlusskörperchen oder Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) nicht zu vermeiden. Strategien zur Erhöhung der Löslichkeit wie Fusionsproteine könnten die Eigenschaften der Spinnenseidenproteine unerwünscht verändern. Der Fokus dieser Arbeit lag zudem nicht in der gentechnischen Modifizierung und Stammentwicklung, sondern auf der reaktionstechnischen Untersuchung von *E. coli* HMS174(DE3) und der C16-Expression unter Kontrolle des T7-Expressionssystems.

Das T7-Expressionssystem wurde von Studier und Moffatt (1986) entwickelt und enthält unter anderem den Promoter und die RNA-Polymerase des Phagen T7. Es gilt als eines der stärksten in *E. coli* und die T7-basierten pET-Plasmide sind die am häufigsten benutzten Systeme zur Proteinpreparation (Sørensen und Mortensen, 2005; Terpe, 2006; Tripathi et al., 2009). Für die Expression verwendete Stämme tragen chromosomal codiert ein λ -DE3 Lysogen, welches das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promoters trägt (Abbildung 3.11). Der *lacUV5* (teilweise auch L8-UV5 genannt) leitet sich vom *lac*-Promoter ab. Durch drei Punktmutationen ist *lacUV5* im Vergleich zum *lac*-Promoter stärker und weniger sensitiv gegenüber CRP-cAMP und Glucose, wird aber genauso durch LacI inhibiert. Auf dem pET-Plasmid wird das Zielgen hinter einem hybriden T7/*lac*-Promoter codiert, der nicht (oder kaum) von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt wird. Die *lac*-Operatorstelle beim T7-Promoter dient als zusätzliche Sicherung gegen eine ungewollte Expression. Falls die T7-RNA-Polymerase unspezifisch exprimiert wird, kann das Zielgen trotzdem nicht transkribiert werden, da die Bindung von LacI den hybriden T7/*lac*-Promoter blockiert. LacI wird sowohl vom *lac*-Operon des *E. coli*-Chromosom als auch zusätzlich von den pET-Plasmiden codiert, um ausreichend Repressor für beide Promotoren bereitzustellen.

Die Induktion kann wie beim *lac*-Promoter mit IPTG oder Lactose erfolgen. IPTG bindet den LacI-Tetramer, der dadurch nicht mehr an die Operator-Sequenz binden kann. Nach der Induktion wird zunächst das T7-Gen von der *E. coli*-RNA-Polymerase tran-

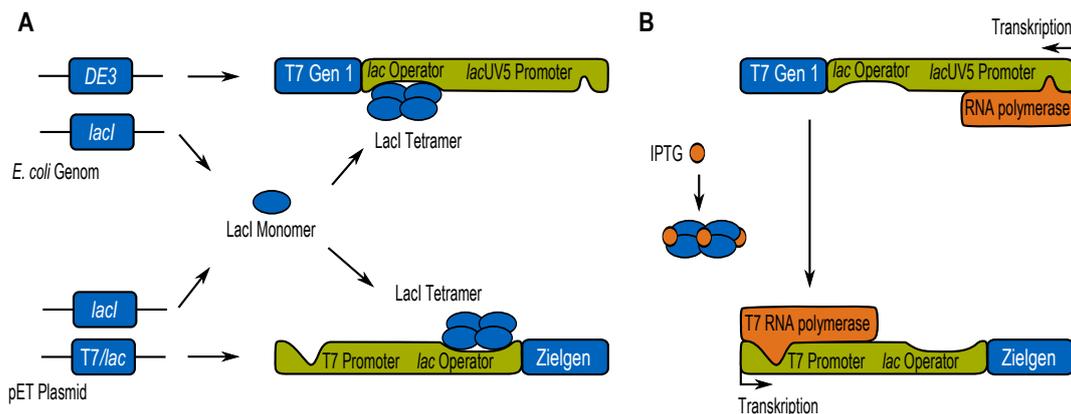


Abbildung 3.11: Das T7-Expressionssystem: (A) Sowohl vom *E. coli*-Genom als auch vom pET-Plasmid wird der Repressor LacI exprimiert. Dieser bindet an die Operatorstellen vor dem chromosomal codierten Gen für die T7-RNA-Polymerase sowie auf dem Plasmid beim T7-Promoter vor dem Zielgen. (B) Wird IPTG zugegeben, bindet es an LacI und verändert dessen Konformation. Dadurch kann der Repressor nicht mehr an den Operator binden. Es wird zunächst die chromosomal codierte T7-RNA-Polymerase exprimiert. Diese erkennt spezifisch den T7-Promoter auf dem pET-Plasmid und transkribiert das Zielgen (zum Beispiel C16). Modifiziert nach Sørensen und Mortensen (2005).

skribiert und die T7-RNA-Polymerase somit exprimiert. Diese ist etwa fünf Mal schneller als die *E. coli*-RNA-Polymerase und bindet an den T7-Promoter auf den pET-Plasmiden. Das Zielgen wird nun transkribiert und die gebildete mRNA kann translatiert werden.

Die Optimierung der Proteinexpression in *E. coli* ist stark proteinabhängig (Sahdev et al., 2008; Long et al., 2014) und basiert weitgehend auf Versuch und Irrtum (Makino et al., 2011), wobei Parameter wie Expressionsvektoren, Medien und Temperatur variiert werden (Makino et al., 2011; Hortsch und Weuster-Botz, 2010a). Aufgrund der Komplexität biologischer Systeme gibt es keine allgemein gültigen Richtlinien für die Auswahl des besten Expressionssystems (Busso et al., 2011; Long et al., 2014).

Tabelle 3.4: Hohe heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Protein	Stamm	Protein, g L^{-1}	BTM, g L^{-1}	$Y_{P/X}$, g g^{-1}	Quelle
Humanes Mini-Proinsulin	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	7		< 0,12	Shin et al. (1997)
Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	<i>E. coli</i> TG1	8,6	75	0,11	Vallejo et al. (2002)
Insulin-like growth factor-2 (IGF-2)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	9,69	183	0,05	Hu et al. (2004)
Human leptin	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	9,7	52	0,19	Jeong und Lee (1999)

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden bei Herstellungsprozessen für rekombinante Proteine dennoch große Fortschritte erzielt mit Proteinkonzentrationen von $2 - 10 \text{ g L}^{-1}$ (Scott, 2008). Dabei gelten $3 - 5 \text{ g L}^{-1}$ als üblich und $8 - 10 \text{ g L}^{-1}$ als erreichbar (Guldager,

2009). Laut der Übersicht von Choi et al. (2006) liegen die höchsten Proteinkonzentrationen für Expressionsprozesse in *E. coli* bei $7-9,7 \text{ g L}^{-1}$. Dabei wird ein zellspezifischer Proteingehalt $Y_{P/X}$ von 0,05 bis $0,19 \text{ g g}^{-1}$ erreicht (vgl. Tabelle 3.4).

3.3.4 Metabolische Last als Stress durch die Expression

Die metabolische Last wird definiert als die Menge an Ressourcen (zum Beispiel Energie), die vom Wirtsmetabolismus zur Erhaltung und Expression der fremden DNA abgezogen werden müssen und stellt bei Produktionsprozessen ein häufiges Problem dar (Tripathi et al., 2009).

Vor allem die Expression mit dem T7-System ist eine hohe metabolische Last für die Zellen, die zum Verlust der Zellviabilität beziehungsweise zum Zelltod führen kann (Striedner et al., 2003). Mögliche Ursachen für die metabolische Last sind die Replikation der Plasmide sowie der Bedarf an ATP und tRNAs für die Translation heterologer Proteine. Die Überexpression führt außerdem zu einem Rückgang der rRNAs sowie zu einem Verlust von Ribosomen und der Proteinsynthesekapazität (Dong et al., 1995).

Die erste sichtbare Folge der metabolischen Last ist oft ein verlangsamtes Wachstum. Zudem sind Plasmidverlust und Änderungen der Zellmorphologie möglich. Schnelle molekulare Stressantworten wie die Regulation vieler Stressgene und die verstärkte Expression von Proteasen wurden bei *E. coli* beobachtet (Gill et al., 2000; Hoffmann und Rinas, 2004). Es wird jedoch angenommen, dass Proteine, die sich in Einschlusskörperchen einlagern, vor Proteasen weitestgehend geschützt sind. Der Stress während der Proteinexpression kann auch schädlich für die Qualität des exprimierten Proteins sein (Hoffmann und Rinas, 2004).

Das Ausmaß an metabolischer Last hängt von den Eigenschaften des rekombinanten Proteins ab (Hoffmann und Rinas, 2004). Bei der Untersuchung der Expression von fünf verschiedenen Proteinen wirkte sich die Expression abhängig vom Protein unterschiedlich auf das Wachstum aus, trotz ähnlicher Aktivierung von Stressgenen (Gill et al., 2000).

Als Folge einer bestimmten metabolischen Last kann es zu einer „stringenten Antwort“ kommen (engl. *stringent response* oder *stringent control*). Dies ist eine Anpassung des Stoffwechsels von *E. coli* an die Unterversorgung beispielsweise mit Aminosäuren oder tRNAs. Die Genexpression wird stark verändert und Gene für die Transkriptions- und Translationsapparate herunterreguliert. Die Synthese stabiler RNAs (tRNA und rRNA) wird gestoppt. (Sørensen und Mortensen, 2005; Hoffmann und Rinas, 2004)

Ein Mangel an Aminosäuren kann vor allem dann entstehen, wenn die Zusammensetzung des rekombinanten Proteins stark von den durchschnittlichen *E. coli*-Proteinen abweicht. Dies führt zudem direkt zu höheren Protease-Aktivität. Eine Zugabe der betroffenen Aminosäure kann den Stress und den proteolytischen Abbau verringern. (Ramirez und Bentley, 1993; Hoffmann und Rinas, 2004; Sørensen und Mortensen, 2005)

Für seltene Codons, wie beispielsweise Tryptophan, liegen nur wenige tRNAs in der Zelle vor. Das häufige Vorkommen von in *E. coli* seltenen Codons (*hungry codons*) führt dazu, dass Ribosomen bei fehlenden tRNAs pausieren oder sogar zum Stillstand kommen (*ribosome stalling*), was für die Expression von Minigenen gezeigt wurde (Roche und Sauer, 1999; Tenson et al., 1999; Li et al., 2006; Ito et al., 2011). Es entstehen nicht

produktive Translationskomplexe (*non-productive translation complexes*, NTCs), die aus Ribosom, Peptidyl-tRNA und mRNA zusammengesetzt sind. Diese Komplexe können aufgrund der fehlenden tRNAs auch einen Teil der mRNA überspringen (Lindsley et al., 2003).

Aufgrund einer stringenten Antwort oder allgemein einer zu hohen metabolischen Last kann die rekombinante Genexpression nur für eine kurze Zeit aufrecht erhalten werden. Dies gilt vor allem für starke Expressionssysteme. Nach mehreren Stunden Expression mit einer T7-RNA-Polymerase sind die Zellen nicht mehr lebensfähig (Striedner et al., 2003; Dong et al., 1995). Die Expressionszeit ist verkürzt und daher kann der maximal mögliche Ertrag oft nicht erreicht werden.

In dem in dieser Arbeit untersuchten C16 sind laut der *Codon Usage Database* keine seltene Codons von *E. coli* K12 enthalten (Nakamura, 2007), jedoch weicht die Aminosäureverteilung stark von *E. coli*-Proteinen ab. Die Sequenz des Moduls C von C16 besteht aus 35 Aminosäuren, wobei nur acht verschiedene Aminosäuren vertreten sind. Diese werden von 16 Codons codiert, insgesamt gibt es hingegen 61 mögliche Codons. Glycin (12x), Alanin (8x), Prolin (6x) und Serin (4x) sind in C16 stark überrepräsentiert. Vor allem ein Glycin- und ein Serin-Codon sind 9–10 mal häufiger verwendet als im *E. coli*-Genom. Dies könnte mutmaßlich zu einem Mangel entsprechender tRNAs und einer stringenten Antwort führen. Dies wiederum würde das Wachstum nach Induktion stoppen und die Expressionszeit verkürzen.

Zusätzlicher Stress durch die Expression kann bei der Sekretion auftreten, da durch die heterologe Expression die Sekretionssysteme stark belastet werden (Yoon et al., 2010). Enzymatische Aktivität oder Toxizität des exprimierten Proteins können die Expression ebenfalls stoppen. Sekretion, enzymatische Aktivität oder Toxizität liegen im Fall von C16 jedoch nicht vor.

3.3.5 Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Die Expressionsrate hängt vor allem von der Gendosis, der Promoterstärke, der mRNA-Stabilität und der Effizienz der Translationsinitiation ab (Swartz, 2001). Natürlich kann sich auch die Induktionskonzentration auf die Expressionsrate auswirken. Beim T7-System werden Lactose oder IPTG als Induktor verwendet. Ein großer Nachteil von Lactose ist, dass es von der Zelle verbraucht wird. Eine konstante Induktionsstärke ist daher nur mit aufwendigen Lactosezugabeprofilen realisierbar (Striedner et al., 2003), wobei selbst in diesem Fall die Produktbildungsrate nach IPTG-Induktion höher war.

Die Induktion durch Lactose ist zudem ein Alles-Oder-Nichts Prozess, da die Expression des Induktortransporters an den Induktor gekoppelt ist. Lactose induziert seinen eigenen Transporter LacY, der wiederum für die Induktion erforderlich ist. Bei mittleren Lactosekonzentrationen entstehen daher induzierte und nicht-induzierte Populationen (Keasling, 1999).

IPTG ist ein synthetisches Kohlenhydrat, ein sogenanntes Thio- oder S-Glycosid. Es hat eine hohe Affinität zum Repressor LacI. Die β -Thioglycosid-Bindung kann von *E. coli* nicht gespalten und IPTG nicht abgebaut werden (Striedner et al., 2003). Bei IPTG wurde davon ausgegangen, dass es nicht dem Alles-Oder-Nichts-Prozess unterliegt, da

der IPTG-Transport in die Zelle scheinbar unabhängig von LacY ist (Keasling, 1999). Dies ist jedoch nur bei hohen IPTG-Konzentrationen der Fall. Fernández-Castané et al. (2012a,b) konnten zeigen, dass IPTG bei niedrigen Konzentrationen von unter 20 μM aktiv durch LacY aufgenommen und sogar intrazellulär angereichert wird.

Oft werden die IPTG-Konzentrationen nicht optimiert beziehungsweise die Gründe für die Wahl einer bestimmten Konzentration nicht genannt (Lecina et al., 2013; Donovan et al., 1996). Dabei kann abhängig von der Plasmid-Zahl und der LacI-Expression eine volle Induktion schon ab 1–100 μM IPTG erzielt werden (Donovan et al., 1996). Ist jedoch *lacI* Plasmid-codiert und die Plasmid-Zahl sehr hoch, ist mehr IPTG nötig, um alle LacI-Tetramere zu binden. Die Höhe der Induktorkonzentration für eine optimale Expression hängt daher von mehreren Faktoren ab, wie der Promoterstärke, dem Vorhandensein von Repressorgenen auf dem Plasmid, der Proteinlöslichkeit und weiteren Eigenschaften des Proteins (Donovan et al., 1996). Die erforderliche IPTG-Konzentration für eine volle Induktion variiert sowohl zwischen verschiedenen Proteinen als auch zwischen verschiedenen Klonen (Tripathi et al., 2009).

Die IPTG-Induktion ruft außerdem eine Vielzahl von Stressreaktionen in der Zelle hervor (Donovan et al., 1996). Sogar in Stämmen ohne rekombinante Proteine und nur mit dem natürlichen chromosomalem *lac*-Operon wurden nach IPTG-Zugabe Stressreaktionen (Expression von Hitzeschock-Proteinen) und abweichende Wachstumsraten gemessen (Kosinski et al., 1992). Bei einer stärkeren Induktion und damit schnelleren Proteinakkumulation ist zudem die Aggregation von Proteinen und Bildung von Einschlusskörperchen wahrscheinlicher, was den Anteil funktionalen Proteins verringert (Swartz, 2001; Donovan et al., 1996).

Abgesehen von der Optimierung der Induktorkonzentration kann der expressionsbedingte Stress beispielweise durch eine langsame Anhebung der Induktion oder durch eine kontinuierliche Induktorzugabe verringert werden, da sich die Zellen nach und nach auf die Expression einstellen können (Striedner et al., 2003; Sørensen und Mortensen, 2005; Pinsach et al., 2008).

Es ist naheliegend, dass die optimale Induktor-Konzentration von der Biomasse abhängig sein sollte. Allerdings finden sich in der Literatur hierzu verschiedene Angaben. Striedner et al. (2003) bestimmte Modell-basiert das optimale IPTG/BTM-Verhältnis von 1,15 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ in *E. coli* HMS174(DE3). Bei Fernández-Castané et al. (2012b) war die Expression von RhuA (Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase) bei 1 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (20 μM) besser als bei 0,5 oder 10 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (10 und 200 μM). Für die Expression von Mini-Proinsulin in BL21(DE3) wurde hingegen ein optimales IPTG/BTM-Verhältnis von 30 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bestimmt (Shin et al., 1997). Ein direkter Zusammenhang zwischen Biomasse und IPTG-Konzentration würde bestehen, wenn die intra- und extrazellulären Konzentrationen von IPTG gleich wären und IPTG ausschließlich diffusiv über die Zellmembran in die Zelle gelangen würde. Wie bereits erwähnt gilt dies nur für hohe IPTG-Konzentrationen oder für Stämme ohne die Lactose-Permease LacY. Die Tatsache, dass LacY eine aktive Rolle bei der IPTG-Aufnahme spielt und beispielsweise Alles-Oder-Nichts-Prozesse möglich sind, widerspricht der Annahme einer einfachen Korrelation zwischen Biomasse und optimaler IPTG-Konzentration.

3.3.6 Autoinduktion

Das Autoinduktionskonzept wurde von Studier (2005) entwickelt und basiert auf der Katabolitrepression: Im Satzmedium werden Glucose, Glycerol und Lactose vorgelegt. Solange ausreichend Glucose im Medium vorhanden ist, wird die Verstoffwechslung von Glycerol und Lactose durch Katabolitrepression beziehungsweise Induktorausschluss verhindert. Sobald Glucose verbraucht ist, können Glycerol und Lactose verstoffwechselt werden. Die Aufnahme von Lactose führt dann zur Induktion des *lacUV5*-Promoter und zur Expression der T7-RNA-Polymerase. Glycerol dient als Energie- und Kohlenstoffquelle während der Expression. (Studier, 2005)

Die Lactosepermease LacY gilt als einzige Möglichkeit für die Lactoseaufnahme in die Zelle (Studier, 2005). Daneben ist auch eine funktionierende β -Galactosidase LacZ für die Lactoseverwertung und Induktion erforderlich. Viele Stämme, die für Klonierung und die sogenannte Blau-Weiß-Selektion verwendet werden, haben eine Deletion in *lacZ* und sind damit für die Autoinduktion nicht geeignet (Fox und Blommel, 2009).

Studier (2005) verwendete die „5052“-Substratmischung mit 5 g L^{-1} Glycerol, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Glucose und 2 g L^{-1} Lactose. Je nach Mediumvariante wurden zusätzlich Aminosäuren oder Succinat zugegeben. Bei einer ausreichenden Versorgung mit Substrat sind für eine gute Expression die limitierenden Faktoren ein möglichst neutraler pH sowie die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Wenn die Begasung hoch genug und der pH ausreichend stabil sind, können höhere Glycerol- und/oder Aminosäure-Konzentrationen zu höheren Zelldichten führen. Vor allem bei unlimitiertem Wachstum auf Glucose kommt es zu einer Verringerung des pH durch Acetatbildung. Bei Sauerstofflimitierungen kommt es aufgrund der gemischten Säuregärung auch mit Glycerol zur Verringerung des pH. Aminosäuren wie Aspartat und vor allem die Zugabe von Succinat (beziehungsweise Bernsteinsäure, 20 mM) führten zu einem wesentlich stabileren pH. Interessanterweise kann auch die Aufnahme oder Verstoffwechslung von Aminosäuren in Abwesenheit von Glucose die Induktion durch Lactose beeinflussen oder sogar verhindern. (Studier, 2005)

Die Expression ist stark abhängig von der Substratzusammensetzung. Höhere Glycerol- und Lactose-Konzentrationen können die Expression deutlich verbessern (Blommel et al., 2007), da Lactose im Gegensatz zu IPTG verstoffwechselt wird. Die Induktion mit IPTG ist irreversibel und unabhängig vom Zellmetabolismus – im Gegensatz zur Autoinduktion (Fox und Blommel, 2009).

Autoinduktionsmedien sparen Arbeitszeit im Labor, sind optimal geeignet für Hochdurchsatzversuche, ermöglichen effiziente Selektion von Klonen und sind gut für Markierungsversuche geeignet. Abhängig von den Proteinen sind Wachstum und Expression ähnlich oder sogar besser im Vergleich zu Komplexmedien (Studier, 2005; Tyler et al., 2005; Sreenath et al., 2005). Bei Prozessen in großen Maßstäben wäre eine automatische Induktion ohne Eingreifen von Bedienungspersonal ebenfalls wünschenswert (Swartz, 2001).

Zu den Nachteilen der Autoinduktion gehört, dass die Expression in diesen Medien bei manchen Gruppen in der Praxis schwierig kontrollierbar war und zu unterschiedlichen Ergebnissen in verschiedenen Maßstäben führte (Fox und Blommel, 2009). Verschiedene Maßstäbe und eine unterschiedliche Sauerstoffversorgung können sowohl das Wachstum

als auch die Expression in Autoinduktionsmedien stark beeinflussen (Blommel et al., 2007). Dieser Einfluss war geringer, wenn weniger Glucose sowie mehr Glycerol und Lactose verwendet wurden. Insbesondere eine Sauerstofflimitierung kann anscheinend dazu führen, dass die Katabolitrepression geschwächt und Lactose früher aufgenommen wird. Dabei hat jedoch die Stärke der LacI-Expression einen entscheidenden Einfluss, da diese Ergebnisse bei einer starken LacI-Überexpression und einem T5-Promoter beobachtet wurden (Blommel et al., 2007).

3.3.7 *Escherichia coli*-Stämme

Die *E. coli* Stämme K12 und B gehören zu den häufigsten Wirten für die rekombinante Proteinproduktion und haben jeweils Vor- und Nachteile (Marisch et al., 2013b). *E. coli* HMS174 ist ein *E. coli* K12-Stamm und hat eine Deletion in der Rekombinase *recA*, während *E. coli* BL21 defizient in den beiden Proteasen *ompT* und *Ion* ist (Studier und Moffatt, 1986; Terpe, 2006). *E. coli* K12 zeigte in Satzkultivierungen höhere Acetatbildung und geringere Zellerträge als *E. coli* BL21. Zudem konnte eine bessere Expression von einer Superoxiddismutase (SOD) in *E. coli* BL21(DE3) als in *E. coli* HMS174(DE3) bei gleichzeitig deutlich schlechterer Plasmidstabilität gezeigt werden (Marisch et al., 2013b). Für die Expression mit dem T7-System werden Stämme mit einem DE3-Lysogen verwendet (vgl. Abschnitt 3.3.3).

Trotz der doppelten LacI-Repression (Abbildung 3.11) findet im T7-System geringfügige basale Expression (*leaky expression*), das heißt ohne Zugabe von Induktor, statt. *E. coli* benötigt eine basale β -Galactosidase-Aktivität, um auf schwankende Lactose-Verfügbarkeit reagieren zu können. Vor allem bei toxischen Genprodukten kann dies jedoch zur Instabilität der pET-Plasmide führen. Eine solche nicht-induzierte Expression ist am höchsten in der stationären Phase beziehungsweise in komplexen Medien, die geringste Mengen Lactose enthalten können (Studier, 2005; Grossman et al., 1998). Diese basale Expression kann durch die Co-Expression von T7-Lysozym, das auf den Plasmiden pLysE oder pLysS codiert ist, vermieden werden. T7-Lysozym ist ein starker natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (Sørensen und Mortensen, 2005). In dem sogenannten *E. coli* Lemo21 wird die Expression des T7-Lysozym mit Rhamnose über den *rhaBAD*-Promoter gesteuert (Wagner et al., 2008).

Mit den sogenannten *E. coli* Tuner-Stämmen kann hingegen eine graduierte Induktion erreicht werden. Sie sind defizient in der Lactose-Permease *lacY*. Dadurch erfolgt die Aufnahme von IPTG nur diffusiv und ist rein konzentrationsabhängig (Sørensen und Mortensen, 2005).

Neben dem IPTG-induzierbaren T7-Expressionssystem gibt es *E. coli* BL21-Stämme mit alternativ induzierbaren Promotoren. Beim *E. coli* BL21-AI wird statt einem *lacUV5* der Arabinose-Promoter P_{araBAD} vor die T7 RNA Polymerase geschaltet. Wird ein pET Plasmid (die üblicherweise den Promoter P_{T7lac} tragen) verwendet, kann mit Arabinose alleine eine schwache und in Kombination mit IPTG eine starke Induktion erfolgen (Narayanan et al., 2011). Bei einem anderen Plasmid würde auch Arabinose alleine für eine stärkere Expression genügen. Auch das Autoinduktionskonzept lässt sich in *E. coli* BL21-AI mit vergleichbaren Ausbeuten realisieren wie mit *E. coli* BL21(DE3) (Studier,

2005). Eine weitere Alternative ist der *E. coli* BL21-SI (Donahue und Bebee, 1999). Hier wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch den Salz-induzierbaren *proU* Promoter geregelt. Für die optimale Expression von β -Glucuronidase (GUS) waren jedoch hohe Salzkonzentrationen erforderlich (150–300 mM beziehungsweise 8,8–17,5 g L⁻¹ NaCl). Anstelle von IPTG würde im großtechnischen Maßstab eher L-Arabinose verwendet, da dies preiswerter und weniger toxisch ist (Sahm et al., 2013).

Aufgrund der hohen Repetitivität der Spinnenseidengene sind *E. coli* BL21-Stämme wie bereits erwähnt nicht geeignet. Eine anwendbare Alternative wäre der *E. coli* Single-Step(KRX) (Hartnett et al., 2006). Dieser ist, wie der für die C16-Expression verwendete *E. coli* HMS174(DE3), ein *E. coli* K12-Derivat und hat ebenfalls die *recA*-Deletion. Die Expression einer T7-Polymerase wird mit Rhamnose induziert, wobei bereits 0,1 g L⁻¹ ausreichend sind, da Rhamnose wegen weiteren Deletionen nicht verstoffwechselt werden kann.

Die sogenannten „Walker“-Stämme leiten sich vom *E. coli* BL21(DE3) ab (Miroux und Walker, 1996; Wagner et al., 2008). Es wurden die Mutanten *E. coli* C41 und *E. coli* C43 isoliert, die in der Lage sind, einige Membranproteine und globuläre Proteine besser zu exprimieren als der Ausgangsstamm, bei gleichzeitig besserem Wachstum. Die Ursache für die generell schwierige Expression von Membranproteinen ist zwar nicht eindeutig, jedoch wird unter anderem die Sättigung der Sec-Translokation als ein Flaschenhals angenommen (Wagner et al., 2007). Die bessere Expression mit den *E. coli* Walker-Stämmen ließ sich auf Mutationen in dem *lacUV5*-Promoter zurückführen. Die IPTG-Induktion führt zu einer geringeren Expression und Aktivität der T7-RNA-Polymerase im Vergleich zur Induktion im *E. coli* BL21(DE3). Die vergleichsweise geringere Polymerase-Aktivität wiederum erlaubt eine länger anhaltende Expression, ohne die Zellen zu sehr zu stressen oder sogar zu töten (Miroux und Walker, 1996; Wagner et al., 2007).

Bei dem T7-Expressionssystem gibt es schließlich auch eine effiziente plasmidfreie Variante (Striedner et al., 2010). Dadurch wird die Gefahr von Instabilitäten des Prozesses durch Plasmidverlust vermieden. Die starke Effizienz des T7-Systems kompensiert die geringe Gendosis. Noch weiter führen Ansätze zur zellfreien Proteinexpression (Swartz, 2001).

Für die Stabilität der Spinnenseidengene ist eine Deletion in *recA* notwendig. Ein *E. coli* BL21 kommt daher nicht in Frage. Eine Alternative wäre der verwandte *E. coli* BLR, der defizient in *recA* ist und bereits erfolgreich für die Expression von C16 eingesetzt wurde. Allerdings zeigte dieser Stamm eine Auxotrophie für Isoleucin aufgrund einer Mutation in der Threonin-Deaminase (Schmidt et al., 2007). Damit ist eine Kultivierung in günstigen definierten Medien ohne Isoleucin nicht möglich. Daher bietet sich der *E. coli* HMS174 in der lysogenen Variante *E. coli* HMS174(DE3) am besten für die Expression von Spinnenseidenproteinen an.

4 Material und Methoden

4.1 Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten

4.1.1 *Escherichia coli*-Stämme und Vektoren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Wichtigstes Merkmal von *E. coli* HMS174 ist die Mutation der *recA* Rekombinase, weswegen sich der Stamm gut zum Klonieren oder zur Expression repetitiver Gene eignet. Mutationen in *hsdR* erlauben eine effiziente Transformation von klonierten unmethylierten PCR-Amplifikaten. *E. coli* HMS174 besitzt als K12-Stamm zwar ein Methylierungssystem, ist aber defizient im Restriktionssystem. Zudem hat HMS174 eine Rifampicin-resistente (Rif^R) RNA-Polymerase. (Studier und Moffatt, 1986; Terpe, 2006; OpenWetWare, 2014)

E. coli BL21 ist defizient in den Proteasen *Ion* und *ompT*. Heterolog exprimierte Proteine sind folglich stabiler als in anderen Wirtsstämmen. Durch die *hsdS*-Mutation sind Restriktion und Methylierung bestimmter DNA-Sequenzen in dem Stamm ausgeschaltet. Während K12-Stämme bestimmte DNA-Abschnitte methylieren, sind B-Stämme defizient in der Cytosin-Methylierung (*dcm*). *E. coli* BL21 hat zudem eine Mutation im Galactosemetabolismus (*gal*). (Studier und Moffatt, 1986; Terpe, 2006; OpenWetWare, 2014)

Von allen Stämmen wurden die Varianten mit dem sogenannten DE3-Lysogen eingesetzt, die sich für das T7-Expressionssystem eignen (vgl. Abschnitt 3.3.3). Neben *E. coli* HMS174(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) wurden die beiden „Walker“-Stämme *E. coli* C41(DE3) und *E. coli* C43(DE3) eingesetzt. *E. coli* C41(DE3) ist durch Mutagenese aus *E. coli* BL21(DE3) hervorgegangen; *E. coli* C43(DE3) durch weitere Mutagenese und Selektion von *E. coli* C41(DE3). Beide eignen sich für die Expression toxischer Proteine oder Membranproteine (vgl. Abschnitt 3.3.7).

Insgesamt wurden vier verschiedene Plasmide in dieser Arbeit eingesetzt (Tabelle 4.2). Der Fokus lag auf dem pET29a-C16 tragenden *E. coli* HMS174(DE3). Dieser wird vereinfachend als „Glucose-Stamm“ oder kurz „Gluc-Stamm“ bezeichnet – im Gegensatz zum Saccharose-verwertenden Stamm. Der Saccharose-verwertende Stamm oder kurz Sacch-Stamm trägt zusätzlich zum pET29a-C16 auch den Vektor pAMS001. Dieses Plasmid basiert auf pACYC184, trägt eine Chloramphenicol-Resistenz und enthält ein Invertase-codierendes Gen (*cscA*) aus *Acinetobacter succinogenes* hinter einem konstitutiven β -Lactamase-Promoter. Sowohl der Glucose- als auch der Saccharose-verwertende Stamm wurden von der AMSilk GmbH (Planegg/Martinsried) bereitgestellt, ebenso wie der *E. coli* HMS174(DE3) mit einem pET-29a-AQ24NR3 Plasmid.

Tabelle 4.1: In der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme (Marisch et al., 2013a; OpenWare, 2014).

Stamm	Abstammung	Charakteristika
HMS174(DE3)	K12	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺)(Rif ^R)(DE3)
BL21(DE3)	B834	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3)
C41(DE3)	BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3); zusätzliche Mutationen wurden für Toleranz gegen toxische Proteine selektiert
C43(DE3)	C41(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3); trägt zusätzliche Mutationen und Resistenzen gegen weitere toxische Proteine

Das pET-29a-C16 Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit in die beiden Walker-Stämme transformiert. Der am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik verfügbare *E. coli* BL21(DE3) mit einem pET-28a-eGFP Plasmid wurde ebenfalls vereinzelt eingesetzt.

Tabelle 4.2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Heterologes Protein	Resistenz
pET-29a-C16	Spinnenseidenprotein C16	Kanamycin
pAMS001	<i>E. coli</i> Invertase (<i>cscA</i>)	Chloramphenicol
pET-29a-AQ24NR3	Spinnenseidenprotein AQ24NR3	Kanamycin
pET-28a-eGFP	<i>enhanced</i> GFP (Grün fluoreszierendes Protein)	Kanamycin

4.1.2 Molekularbiologische Methoden

Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 mL LB-Medium (LB: Lysogeny Broth, vgl. Tabelle 4.3) mit 4 mL einer LB-Übernachtskultur des entsprechenden Stamms inokuliert. In einem 500 mL Schüttelkolben wurde diese Kultur bei 250 U min⁻¹ und 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3–0,6 inkubiert. Die Zellen wurden in zwei 50 mL Zentrifugationgefäße überführt, für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 3260 U min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 20 mL 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3260 U min⁻¹ wurden die Zellen in 10 mL 0,1 M CaCl₂ und 20 % Glycerol resuspendiert. Schließlich wurden die kompetenten Zellen in 100 µL Aliquots bei –80 °C gelagert.

Plasmidpräparation

Alle Plasmidpräparationen wurden mit dem GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit aus einer 5 mL Übernachtskultur nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit VE-H₂O von den Bindsäulen eluiert.

Transformation

Wie bei der Herstellung der kompetenten Zellen wurden alle Arbeiten bei ständiger Kühlung auf Eis durchgeführt. Beim Resuspendieren wurden starke Scherkräfte, wie etwa durch Vortexen, möglichst vermieden.

Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten *E.coli*-Aliquots wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 2 μL Plasmid-Lösung wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Einem 60 s-Hitzeschock bei 42°C folgten 2 min Kühlung auf Eis. Danach wurden 900 μL , auf 37°C vorgewärmtes, steriles LB-Medium zugegeben und für 60 min bei 37°C und 200 U min^{-1} inkubiert. Schließlich wurden 200 μL der Kultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausgewählte Klone wurden in LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum überführt und Stammkulturen erstellt.

Stammhaltung

Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden 50 mL LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 500 mL Schüttelkolben mit einer Kolonie des jeweiligen Stamms nach erfolgreicher Transformation oder mit 200 μL einer früheren Stammkultur beimpft. Es folgte die Kultivierung bei 37°C und 250 U min^{-1} bis zu einer OD_{600} von etwa 1–3.

Die Kulturen wurden anschließend mit einer sterilen 50 %igen (v/v) Glycerollösung vermischt, zu je 2 mL in sterile Kryoröhrchen mit Schraubdeckel aliquotiert und als Stammkultur bei -80°C gelagert.

Plasmidentfernung

Die Beseitigung eines Plasmids wird als *curing* bezeichnet (Madigan und Martinko, 2006). Dabei wird die Plasmidreplikation gehemmt, ohne dass parallel eine Hemmung der Chromosomenreplikation erfolgt. Ohne Selektionsdruck wird durch die Zellteilung das Plasmid ausverdünnert. Die Entfernung kann auch spontan erfolgen oder durch spezielle Behandlung erzwungen werden. Neben der Verwendung verschiedener *curing agents* kann auch die Kultivierung bei erhöhter Temperatur angewendet werden (Trevors, 1986). Durch diese Methode wurde erfolgreich der Saccharose-verwertende Stamm von dem zweiten Plasmid, pAMS001, befreit. Dafür wurden drei serielle Kultivierungen in LB-Medium mit 10 g L^{-1} Glucose und 50 mg L^{-1} Kanamycin, aber ohne Chloramphenicol, bei 40°C für je 18 h durchgeführt. Das Kultivierungsvolumen betrug je 50 mL und jeder Schritt wurde mit 2,5 mL der vorangegangenen Kultur inokuliert. Schließlich erfolgte der Ausstrich auf LB-Agarplatten mit Kanamycin beziehungsweise Kanamycin und Chloramphenicol. Ausgewählte Kolonien der Chloramphenicol-freien Agarplatten wurden auf weiteren selektiven Agarplatten auf den Plasmidverlust hin untersucht.

4.2 Medien, Puffer und Lösungen

Lysogeny-Broth (LB) Medium

Für Vorkulturen (Vorstufen) sowie molekularbiologische Arbeiten wurde das weit verbreitete LB-Medium (Lysogeny-Broth) verwendet. Die in Tabelle 4.3 aufgelisteten Komponenten wurden einzeln eingewogen, in VE-H₂O gelöst und der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das LB-Medium bei 121 °C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Fertigung von LB-Agarplatten erfolgte vor dem Sterilisieren zusätzlich die Zugabe von 15 g L⁻¹ Agar. Nach dem Abkühlen auf etwa 60–70 °C wurden die benötigten Antibiotika zugegeben und das Medium aseptisch etwa 1 cm hoch in Petrischalen gegossen.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung des Lysogeny-Broth (LB) Mediums

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Pepton aus Casein	10,0
Natriumchlorid, NaCl	5,0
Hefeextrakt	5,0

Satz- und Zulaufmedien für die Kultivierung von *E. coli*

In den Hauptkultivierungen wurden definierte Medien verwendet. Die Stammlösungen sind in Tabelle 4.4 und die Zusammensetzung in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Bei definierten Medien, die auch als synthetische Medien bezeichnet werden, ist die chemische Zusammensetzung sowohl quantitativ als auch qualitativ genau definiert. Komplexe Medien wie das LB-Medium enthalten Extrakte aus Hefe, Peptone oder Abfallstoffe wie Melasse. Die Zusammensetzung dieser Komponenten ist nicht exakt festgelegt und kann von Charge zu Charge variieren. (Chmiel, 2011)

Das in dieser Arbeit verwendete definierte Medium leitet sich von Korz et al. (1995) ab. Dieses ist wiederum fast identisch mit dem Medium nach Riesenberg et al. (1991b). Einzig die Konzentrationen von Fe(III)-citrat (100 mg L⁻¹ statt 60 mg L⁻¹) und Zinkacetat-Dihydrat (13 mg L⁻¹ statt 8 mg L⁻¹) sind im Satzmedium etwas höher. Das Zulaufmedium hat bei Riesenberg et al. (1991b) keine Spurenelemente und 770 g L⁻¹ Glucose, bei Korz et al. (1995) sind hingegen Spurenelemente und 795 g L⁻¹ Glucose enthalten. Abweichend von beiden Varianten wurde in dieser Arbeit kein Thiaminhydrochlorid eingesetzt, da dies nur bei dem von Korz und Riesenberg verwendeten auxotrophen *E. coli* TGI notwendig ist. Zudem wurde statt *Antifoam SP1* das leichter verfügbare und bereits erfolgreich eingesetzte Antischaummittel Antifoam 204 (AF204, SigmaAldrich) eingesetzt.

Die Mediumherstellung erfolgte stets in mehreren Schritten. Die Salz- und Spurenelementlösungen wurden zusammen mit dem Antischaummittel autoklaviert; bei parallelen Kultivierungen in Schottflaschen (10 mL und 0,5 L Startvolumen) und im größeren Maßstab direkt im Rührkesselreaktor (2 L und 10 L Startvolumen). Die separat sterilisierten

Tabelle 4.4: Stammlösungen für Zulauf- und Satzmedien. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

Stammlösung	Konzentration, x-fach beziehungsweise g L^{-1}	Lösungsmittel, Behandlung
Glucose: Glucose*H ₂ O	500 g L^{-1} Hydrat: 550 g L^{-1}	Durch Autoklavieren in VE-H ₂ O gelöst, steril verwendet
Salze nach Korz et al. (1995): KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , Citronensäure, NaOH	10x	In VE-H ₂ O gelöst, jeweils mit Satzmedium sterilisiert, bei 4 °C gelagert
Salze modifiziert ab Kapitel 6: KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄	10x	In VE-H ₂ O gelöst, jeweils mit Satzmedium sterilisiert, bei 4 °C gelagert
Magnesiumsulfat: MgSO ₄ *7H ₂ O	500 g L^{-1}	In VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert, steril verwendet
Spurenelemente nach Korz et al. (1995)	50x	Durch Autoklavieren in VE-H ₂ O gelöst, jeweils mit Satzmedium sterilisiert, bei 4 °C gelagert
IPTG	1 M; 238,3 g L^{-1}	In VE-H ₂ O gelöst, sterilfiltriert, in sterilisierte 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert
Kanamycin	50 g L^{-1}	Wie IPTG
Antischaummittel AF204	100 %	Direkt zum Satzmedium gegeben beziehungsweise als 10 %ige Emulsion zur Schaumkontrolle verwendet
Trypton	200 g L^{-1}	In VE-H ₂ O gelöst und autoklaviert, steril verwendet, bei 4 °C gelagert

Bestandteile Glucose, Magnesiumsulfat und Kanamycin wurden entweder unter der Sterilwerkbank mit den autoklavierten Hauptbestandteilen in Schottflaschen zusammengemischt oder in Schottflaschen mit Schlauchdurchführungen gegeben, die dann aseptisch in die sterilisierten Rührkesselreaktoren gepumpt wurden. Ammoniak, das als Titrationmittel eingesetzt wurde, wurde nicht sterilisiert.

Glucose wurde separat im Messkolben autoklaviert und nach dem Autoklavieren mit sterilem VE-H₂O beziehungsweise für Zulaufmedien (Tabelle 4.6) mit weiteren separat autoklavierten Bestandteilen wie Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat oder Trypton aufgefüllt. Die Löslichkeit von Glucose in Wasser ist stark temperaturabhängig (Alves et al., 2007). So können zwar bei 60 °C rund 74 $\text{g}_{\text{Glucose}} \text{g}_{\text{Lösung}}^{-1}$ gelöst werden, bei 25 °C liegt dieser Wert jedoch nur noch bei 50,5 $\text{g}_{\text{Glucose}} \text{g}_{\text{Lösung}}^{-1}$. Daher wurde im Gegensatz zu den Angaben von Korz et al. (1995) die Zulauflösung nur mit 500 g L^{-1} Glucose angesetzt, um die Handhabung auch im späteren Produktionsmaßstab zu erleichtern. Da meist Glucose-Monohydrat zur Verfügung stand, wurden jeweils 10 % mehr eingewogen. Im Fall des Zulaufmediums entsprechend 550 statt 500 g L^{-1} .

Tabelle 4.5: Komponenten und Konzentrationen der verwendeten Satzmedien. Das Medium im Referenzprozess ist von Korz et al. (1995) abgeleitet.

Komponente	Referenzprozess, g L ⁻¹	Modifiziert ab Kapitel 6, g L ⁻¹
Substrat		
Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆	25	25
Salze		
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	13,3	6
Dikaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	-	10
Diammoniumhydrogenphosphat, (NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0	-
Ammoniumsulfat, (NH ₄) ₂ SO ₄	-	7,5
Citronensäure, C ₆ H ₈ O ₇	1,7	-
Natriumhydroxid, NaOH	2,4	-
Magnesiumsulfat, MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2	6
Spurenelemente		
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O	0,0084	0,0084
Cobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat, CoCl ₂ *6H ₂ O	0,0025	0,0025
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat, MnCl ₂ *4H ₂ O	0,0150	0,0150
Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat, CuCl ₂ *2H ₂ O	0,0015	0,0015
Borsäure, H ₃ BO ₄	0,0030	0,0030
Natriummolybdat-Dihydrat, Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,0025	0,0025
Zinkacetat-Dihydrat, (CH ₃ COO) ₂ Zn*2H ₂ O	0,013	0,013
Eisen(III)-citrat, C ₅ H ₅ FeO ₇	0,100	0,100
Sonstige Bestandteile		
Antischaummittel AF204	0,1 – 1 % (v/v)	0,1 – 1 % (v/v)
Kanamycin	0,05	0,05

Tabelle 4.6: Komponenten und Konzentrationen der verwendeten Zulaufmedien. Die Komponenten in Klammern wurden untersucht, später im vereinfachtem Zulaufmedium aber nicht eingesetzt.

Komponente	Referenzprozess, g L ⁻¹	Modifiziert ab Kapitel 6, g L ⁻¹
Glucose	500	500
Magnesiumsulfat	20	-
Trypton oder Ammoniumsulfat	-	(20-30) ¹
Spurenelemente		
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	0,0130	-
Cobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat	0,0040	-
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	0,0235	-
Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat	0,0025	-
Borsäure	0,003	-
Natriummolybdat-Dihydrat	0,0040	-
Zinkacetat-Dihydrat	0,016	-
Eisen(III)-citrat	0,040	-

¹ Trypton und Ammoniumsulfat als zusätzliche Komponenten im Zulaufmedium untersucht, siehe Kapitel 6

Autoinduktionsmedien und weitere Kohlenstoffquellen

Weitere Komponenten wurden für Kultivierungen mit Autoinduktionsmedien oder alternativen Kohlenstoffquellen benötigt (Tabelle 4.7).

Für die Versuche mit Autoinduktionsmedien wurden neben Glucose auch Lactose und Glycerol als Kohlenstoffquelle verwendet. In den Kultivierungen in Abschnitt 8.2 wurden zudem Ammoniumsulfat und Bernsteinsäure eingesetzt, da auf eine pH-Regelung verzichtet wurde. Die Komponenten wurden wie Glucose separat sterilisiert und aseptisch zum restlichen Medium zugegeben.

Tabelle 4.7: Zusätzliche Komponenten für Kultivierungen mit Autoinduktionsmedien und alternativen Kohlenstoffquellen

Komponente	Stammlösung, g L ⁻¹	Konzentration, g L ⁻¹	Behandlung
Autoinduktionsmedien			
Glycerol, C ₃ H ₈ O ₃	500	10,0–50,0	Autoklaviert
Lactose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	200	0,5–20,0	Autoklaviert
Autoinduktionsmedien ohne pH-Regelung			
Ammoniumsulfat, (NH ₄) ₂ SO ₄	500	5	Autoklaviert
Bernsteinsäure, C ₄ H ₆ O ₄	40	3,75	Sterilfiltriert
Saccharose-verwertender Stamm			
Saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	500	2,0–25,0	Sterilfiltriert
Chloramphenicol	30 g L ⁻¹	30 mg L ⁻¹	In Ethanol gelöst und aliquotiert bei –20 °C gelagert

Bei Kultivierungen des Saccharose-verwertenden Stamms wurde Glucose durch Saccharose ersetzt und die gleichen Konzentrationen verwendet. Saccharose wurde abweichend zur Glucose nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert, um eine thermische Spaltung des Disaccharids in seine Monomere zu verhindern. Eine thermisch bedingte Spaltung von Saccharose wurde zuvor in der Arbeit von Höfel (2011) beobachtet. Während Kanamycin sterilfiltriert wurde, wurde Chloramphenicol in Ethanol gelöst.

Puffer und weitere Lösungen

Die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*, Tabelle A6 im Anhang) wurde zur Verdünnung der Kultivierungsproben vor allem bei Messungen der optischen Dichte (OD₆₀₀) oder Fluoreszenz verwendet.

Für die Probenaufbereitung und Produktanalytik wurden weitere Puffer und Lösungen eingesetzt (Tabelle A7 im Anhang). Ein 1 M Glycin/Natriumchlorid-Puffer diente als Fällungsreagenz und eine 4 M Guanidiniumthiocyanatlösung als chaotropes Salz zum Lösen von C16. Für die HPLC-Methode (Abschnitt 4.4.2) wurden Tris-HCl als Laufmittel und Natriumhydroxid sowie Ethanol zur Reinigung und Lagerung der Säule verwendet.

Für die Calciumchlorid-Lösungen bei der Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde zunächst eine 1 M CaCl₂-Stammlösung hergestellt. Hierfür wurden 147 g L⁻¹

CaCl₂*2H₂O in VE-H₂O gelöst. Für die 0,1 M CaCl₂-Lösung wurde die Stammlösung mit VE-H₂O verdünnt und sterilfiltriert. Bei der zweiten Lösung wurde neben 0,1 M CaCl₂ zusätzlich 20 % Glycerol zugegeben und ebenfalls sterilfiltriert.

4.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

In Abbildung 4.1 ist eine Übersicht über den gesamten Referenzprozess für C16 dargestellt. Der pH für die Kultivierung wurde mit 12,5 % Ammoniaklösung auf 6,7 geregelt, falls nicht anders angegeben, und der pO_2 bei nicht limitierenden Werten gehalten. Während der Wachstumsphase betrug die Temperatur 37 °C. Je nach Spinnenseidenprotein kann die Temperatur während der Produktion angepasst werden und wurde in dieser Arbeit für C16 auf 30 °C geregelt. Neben dem definierten Satzmedium wurde auch das komplexe LB-Medium für die Vorkulturherstellung verwendet. Als konstante Wachstumsrate während der exponentiellen Zulaufphase wurde, wenn nicht anders angegeben, $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ gewählt.

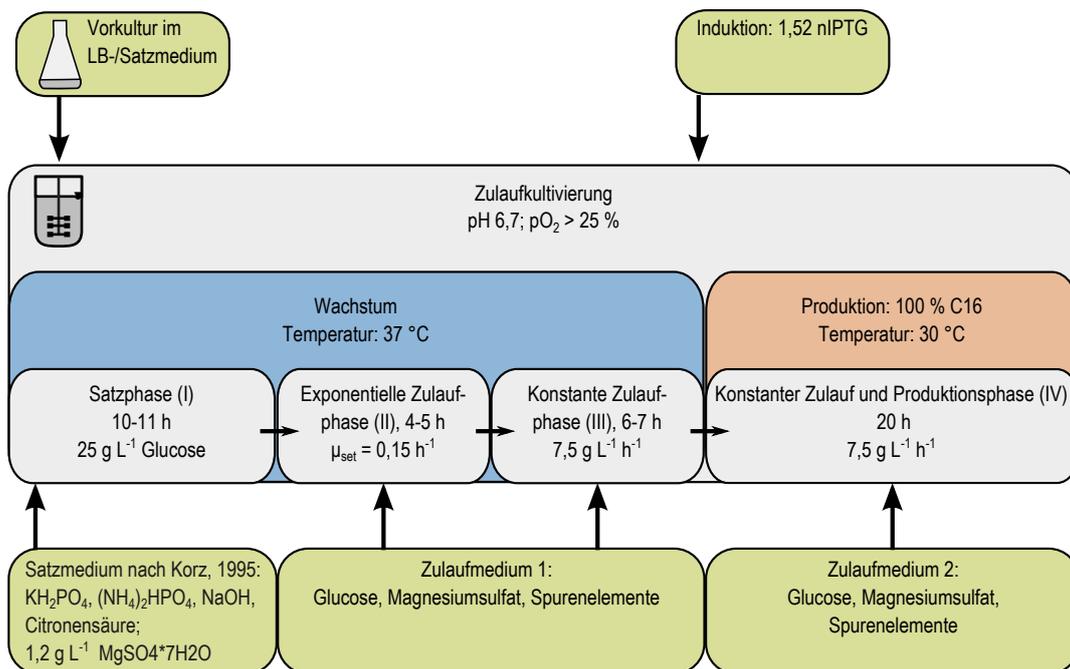


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Referenzprozesses für die Herstellung von C16 in *E. coli* (mit normierter IPTG-Konzentration nIPTG).

4.3.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Alle Vorkulturen, also die Vorstufen, die zur Inokulation der Hauptkultur in Rührkesselreaktoren verwendet wurden, wurden in Schüttelkolben durchgeführt. Hierfür kamen 0,5 L oder 1 L Schüttelkolben ohne Schikanen mit 100 beziehungsweise 200 mL LB-Medium zum Einsatz. Zur Selektion diente das Antibiotikum Kanamycin, welches in einer Endkonzentration von 50 mg L^{-1} vorlag. Bei der Verwendung des Saccharose-verwertenden Stamms enthielt das LB-Medium zusätzlich 30 mg L^{-1} Chloramphenicol. Alternativ zum LB-Medium wurde auch das von Korz et al. (1995) abgeleitete definierte Mineralsalzmedium eingesetzt, was auch in der Hauptkultur zum Einsatz kam. Dabei wurden $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Glucose oder Glycerol verwendet. Bei 37 °C und 250 U min^{-1} wurde für 4 – 16 h kultiviert. Inokuliert wurden die Vorkulturen mit 25 – 2000 μL Gefrierbestand oder 2 mL einer LB-Übernachtskultur. Vor der Inokulation der Hauptkultur wurden die optischen Dichten der

Vorkultur bei 600 nm gemessen, die möglichst bei OD_{600} 1–3 liegen sollten. Es wurden aber auch teilweise OD_{600} 0,3–4 verwendet.

4.3.2 Parallele Kultivierung im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab

Aufbau und Steuerung

In dieser Arbeit wurde ein Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren und gasinduzierenden Rührern eingesetzt (Puskeiler et al., 2005a; Hortsch und Weuster-Botz, 2010b). Der Bioreaktorblock ist in einen Laborroboter integriert, der mit einem Pipettier- und Robotergreifarm sowie einem MTP-Photometer und einer MTP-Waschstation ausgestattet ist (Abbildung 4.2; Auflistung aller Komponenten in Tabelle A1 im Anhang). Mit Hilfe der acht fest installierten teflonbeschichteten Spitzen des Pipettierroboters werden pH-Regelung, Zulaufverfahren sowie *atline*-Messungen der optischen Dichte und Fluoreszenz realisiert, während der Greifarm die Mikrotiterplatten auf der Arbeitsfläche bewegt. Die verdünnten Proben werden im MTP-Photometer vermessen und die Mikrotiterplatten werden in der MTP-Waschstation gereinigt, sodass sie für die nächste Probenahme wieder verwendet werden können.



Abbildung 4.2: Aufbau des parallelen Kultivierungssystems im Milliliter-Maßstab: (1) Parallel-Bioreaktorblock, (2) Pipettierarm, (3) Robotergreifarm, (4) MTP-Photometer, (5) MTP-Waschstation und (6) Vorlagegefäße.

Zulaufkultivierungen mit geregelter pH und automatisierter Probenahme werden über die Prozessleitsoftware Fedbatch-XP realisiert (Abbildung 4.3). Diese kommuniziert mit der Sensorik und steuert über FBXPServer die Robotersoftware Gemini an. Diese wiederum steuert entweder direkt den Laborroboter und die MTP-Waschstation an, oder indirekt das MTP-Photometer über die Photometer-Software Magellan. LabView war im Gegensatz zu Höfel (2011) zur Ansteuerung der Waschstation nicht mehr notwendig, da dies mit Gemini direkt realisiert wurde. Zudem kann Gemini Skripte ausführen und selbstausführende Programme starten. So wurde zusätzlich AutoIT eingesetzt, um Parameter der pH-Messung in Fedbatch-XP zu bestimmten Zeitpunkten anzupassen. Auf die Rührerausfallerkennung wurde im Rahmen dieser Arbeit meistens verzichtet, da sich diese als nicht notwendig erwies.

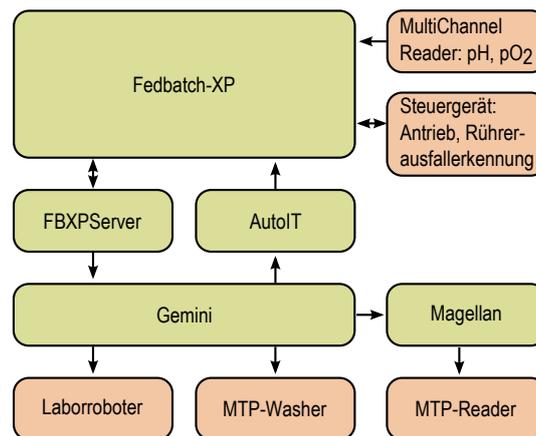


Abbildung 4.3: Schema des Prozessleitsystems im Bioreaktorblock. Mehrere Programme (grün) kommunizieren miteinander und steuern Roboter und Peripheriegeräte (orangerot) beziehungsweise empfangen von diesen Messwerte. Modifiziert und erweitert nach Höfel (2011).

Die Miniatur-Bioreaktoren aus Polystyrol haben einen Durchmesser von 20 mm, ein Arbeitsvolumen von 8–14 mL und besitzen am Reaktorboden fluorometrische Sensorfilme zur Messung von pH und pO_2 . Der Bioreaktorblock ist mit entsprechenden fluorometrischen Sensorriegeln, einem magnetisch-induktiven Antrieb sowie zwei Wärmeaustauschern ausgestattet. Letztere dienen der Temperatureinstellung in den Bioreaktoren beziehungsweise der Kühlung des Kopfraumes zur Reduktion der Verdunstung. Die Bioreaktoren werden steril geliefert, die Sterilgasabdeckung über den Reaktoren ist hingegen autoklavierbar. An dieser Abdeckung sind auf Hohlachsen die gasinduzierenden Rührorgane angebracht. Diese Rührorgane verfügen über starke Dauermagneten, die von Elektromagneten des Bioreaktorblocks angetrieben werden. Durch die Drehbewegung wird über die Hohlachse Medium vom Reaktorboden und Gas aus dem Reaktorkopfraum angesaugt und durch die Rührer im Reaktormedium dispergiert. Damit wird ein k_{La} von bis zu $0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht (Puskeiler et al., 2005a). Die Sterilgasabdeckung verfügt zudem über Öffnungen, durch die der Pipettierroboter Zugang zum Reaktormedium hat. Der Kopfraum jedes Reaktors wird über die Sterilgasabdeckung mit steriler Luft oder einem einstellbaren Gasgemisch versorgt, welches dann über die Öffnungen entweichen kann. Damit werden Kontaminationen über diese Öffnungen vermieden. Der Biotreaktorblock wurde vor Kurzem von 2mag als bioREACTOR48 kommerzialisiert und diverse Anwendungen wurden bereits gezeigt (Puskeiler et al., 2005b; Knorr et al., 2007; Kusterer et al., 2008; Vester et al., 2009; Hoefel et al., 2010; Hortsch et al., 2010; Riedlberger und Weuster-Botz, 2012; Bendig und Weuster-Botz, 2013; Schmidt und Weuster-Botz, 2012; Gebhardt et al., 2011).

pH-Messung im Bioreaktorblock

Die Messung des pH erfolgt nach der *Dual-Lifetime-Referencing* (DLR) Methode (Kocincová, 2007; Kusterer, 2007). Eine Kombination von zwei Fluoreszenz-Farbstoffen, sogenannten Luminophoren, ist in die Sensorfilme eingeschlossen. Der erste Luminophor ist

nicht sensitiv, hat eine lange Abklingzeit und erzeugt ein konstantes Hintergrundsignal. Der zweite Luminophor ist sensitiv und hat eine kurze Abklingzeit. Beide Luminophore haben überlappende Absorptions- und Emissionsspektren. Anregung und Auslesung des Antwortsignals findet daher bei derselben Wellenlänge statt. Das Antwortsignal weist eine Phasenverschiebung auf, die zum pH im sigmoidalen Verlauf korreliert werden kann.

Offline mit einem pH-Meter bestimmte pH-Werte zeigten bei mehreren Kultivierungen im Milliliter-Maßstab große Abweichungen zum *online* gemessenen pH. Dies war stark abhängig von der eingesetzten Charge der Einwegbioreaktoren.

Für die *online*-Messung des pH sind unter anderem die Amplituden des Messsignals von Bedeutung. Diese liefern eine Aussage über die Stärke und damit Qualität des Messsignals und schwankten innerhalb von Parallelkultivierung teilweise sehr deutlich zwischen den Positionen beziehungsweise Reaktoren (beispielsweise Werte von 4.000 – 40.000). Tendenziell war zwar der Messfehler *offline* – *online* bei höheren Amplituden geringer, jedoch war der Zusammenhang nicht ganz eindeutig und es spielten daher weitere Faktoren eine Rolle.

Eine wahrscheinliche Ursache für die fehlerhafte pH-Messung wurde in der Eigenfluoreszenz der Zellen gefunden. Hierfür wurden Emissionsspektren von *E. coli*-Zellen bei den Anregungswellenlängen von 470 nm und 505 nm aufgezeichnet, also den Wellenlängen, die für die pH- und pO₂-Sensorfilme zur Anregung verwendet werden (Abbildung 4.4 A). Die stärkste Fluoreszenz bei der kürzeren Anregungswellenlänge von 470 nm liegt um die Emissionswellenlänge von 530 nm vor. Die Emission der pH-Sensoren wird nahe diesem Maximum bei 559 nm bestimmt und wird damit potentiell von der Fluoreszenz der Zellen gestört. Die Fluoreszenz nach der Anregung bei 505 nm, also der Wellenlängen der pO₂-Sensoren, ist hingegen deutlich geringer. Zellfreies definiertes Medium zeigt bei beiden Anregungswellenlängen quasi keine Fluoreszenz. Zudem wurde festgestellt, dass die Fluoreszenz bei den Wellenlängen des pH-Sensorfilms nahezu linear mit der optischen Dichte im Kultivierungsverlauf zunimmt (Daten nicht gezeigt).

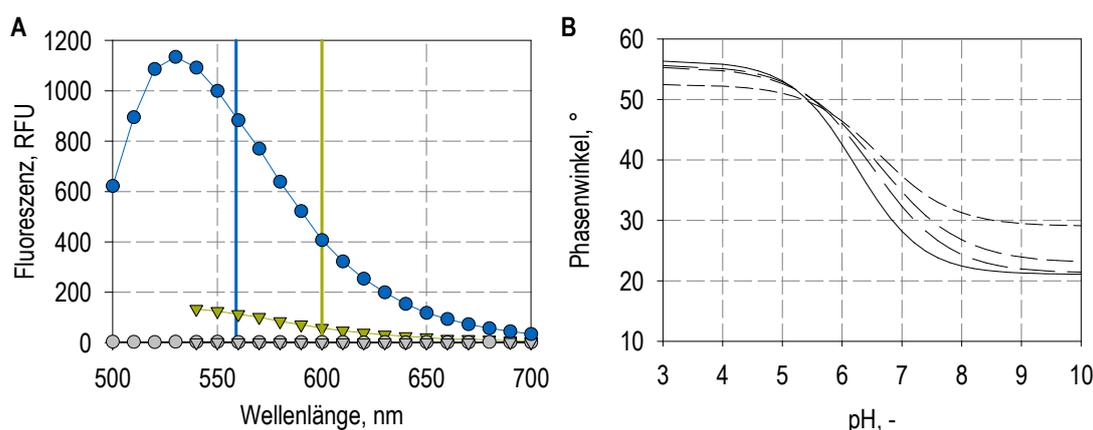


Abbildung 4.4: (A) Emissionsspektren für die Anregung bei 470nm (pH-Sensorfilm, ●) und für die Anregung bei 505 nm (pO₂-Sensorfilm, ▼). Die Fluoreszenz des zellfreien Mediums ist jeweils in hellgrau dargestellt. Bestimmung jeweils im Dreifachansatz. Die senkrechten Striche markieren die Messwellenlängen bei 559 nm (pH) und 600 nm (pO₂). (B) pH-Sigmoidfunktionen einer Reaktorcharge im Zulaufprozess bei unterschiedlichen Zelldichten: OD₆₀₀ = 0 (durchgezogene Linie), OD₆₀₀ = 9 (lang gestrichelt), OD₆₀₀ = 16 (mittel gestrichelt) und OD₆₀₀ = 31 (kurz gestrichelt).

Es wurde daher der Ansatz verfolgt, die Veränderung der pH-Messung genauer und im gesamten Kultivierungsverlauf zu charakterisieren. Die Abhängigkeit des Phasenwinkels vom pH wird durch eine Sigmoidfunktion beschrieben (Abbildung 4.4 B). Über diese Kurve wird aus dem gemessenen Phasenwinkel der pH im Reaktor bestimmt. Das Ziel war es, herauszufinden, wie sich diese Sigmoidfunktion im Kultivierungsverlauf ändert, ob dies reproduzierbar und vorhersagbar ist und daher automatisiert berücksichtigt werden kann. Es zeigte sich, dass sich diese Werte der Sigmoidfunktion weniger mit der Prozesszeit, als vielmehr mit der optischen Dichte veränderten. In Abbildung 4.4 (B) sind aus mehreren unabhängigen Kultivierungen bei unterschiedlichen optischen Dichten die Sigmoidfunktionen einer Charge während der Kultivierung aufgezeichnet worden. Einzelne Reaktoren wurden manuell schrittweise zu höheren oder niedrigeren pH-Werten titriert und der pH mittels pH-Elektrode direkt im Reaktor vermessen. Für die Charge 1303-01 wurden ausreichend viele Sigmoidfunktionen aufgezeichnet, um die Veränderung der pH-Messung im Kultivierungsverlauf berücksichtigen zu können. Die Parameter der Sigmoidfunktion können in der FB-XP-Software nur manuell verändert werden und zeitlich veränderbare Profile sind nicht vorgesehen. Daher wurden sogenannte AutoIt-Skripte programmiert, die die Parameter der Sigmoidfunktion in der FB-XP-Software verändern und damit die pH-Kalibrierung im Kultivierungsverlauf ohne manuellen Eingriff anpassen. Diese Anpassung ist jedoch nicht geregelt. Da die Abweichung der pH-Messung stark von der optischen Dichte abhängt, muss der Verlauf der optischen Dichte im Vorfeld bekannt sein. Mit gewissem Aufwand ließ sich die *online*-Messung des pH für niedrige bis mittlere Zelldichten deutlich verbessern, auch bei Einsatz von nicht optimalen Reaktorchargen. Bei hohen Zelldichten und langen Prozessen war die Streuung zwischen den Reaktoren bei der eingesetzten Charge dennoch hoch.

Vorbereitung und Versuchsdurchführung

Die Einweg-Bioreaktoren wurden steril verpackt geliefert. Unter einer Sterilwerkbank wurden die Reaktoren ausgepackt und in den Bioreaktorblock eingesetzt. Die Reaktoren wurden unter der Sterilwerkbank mit Hilfe einer autoklavierten Dispensette befüllt und die ebenfalls autoklavierte Sterilgasabdeckung auf die Reaktoren gesetzt. Der zusammengesetzte Bioreaktorblock wurde abgedeckt und auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters positioniert. Nachdem die Begasung, Temperierung und Rührersteuerung angeschlossen wurden, wurde die Begasung auf 288 L h^{-1} , die Temperatur auf 37°C und die Rührerdrehzahl auf $2500\text{--}2800 \text{ U min}^{-1}$ eingestellt. Diese Parameter waren in einem Kultivierungslauf für alle Positionen gleich und wurden manuell an der Gasmischstation, dem Wasserbad und der Rührersteuerung eingeschaltet.

Die Vorlagegefäße wurden mit Alufolie abgedeckt autoklaviert und unter der Sterilwerkbank mit $\text{VE-H}_2\text{O}$, $12,5\%$ (v/v) Ammoniak-Lösung, $1\times$ PBS und dem Zulaufmedium befüllt. Je nach Bedarf wurden zudem IPTG und Antischaummittel in 96-Deepwell-Vorlagegefäßen vorgelegt, wobei das Antischaummittel zusammen mit dem Vorlagegefäß autoklaviert wurde. Vor jeder Kultivierung wurde der Pipettierroboter mit speziellen Reinigungslösungen gespült (*Set Up Clean* oder *Daily System Clean* von LVL, Crailsheim, Deutschland).

Das Startvolumen betrug 10 mL und das Inokulum 1:10 des Startvolumens. Die Inokulation erfolgte entweder bereits zusammen mit dem Medium beim Befüllen der Reaktoren unter der Sterilwerkbank, oder es wurde eine Multipipette (Eppendorf) mit sterilen Spitzen verwendet. Die Multipipette verfolgt das Direktverdrängerprinzip und erlaubt die mehrfache genaue Abgabe eines definierten Volumens. Damit war auch eine zügige und weitestgehend sterile Inokulation nach Inbetriebnahme durch die Öffnungen der Sterilgasabdeckung möglich. Als Verdunstungsausgleich, wenn in den Ergebnissen nicht anders angemerkt, wurde VE-H₂O mit 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ zugegeben. Die automatische Probenahme zur OD₆₀₀-Messung erfolgte alle 2–3 Stunden. Probenahmen zur HPLC-Analytik wurden manuell gestartet. Die Biotrockenmassekonzentration wurde nur zum Versuchsende bestimmt.

Die Spitzen des Pipettierarms wurden nach jedem Arbeitsschritt mit sterilem VE-H₂O sowie bei jeder Probenahme zusätzlich in 70 % Ethanol gespült. Für die Spülvorrichtung der Pipettierspitzen und für die MTP-Waschstation stand ein mit VE-H₂O gefüllter Tank zur Verfügung, der über einen Sterilfilter verbunden war. In einem zweiten Tank wurde das anfallende Biomüll-belastete Spülwasser gesammelt.

4.3.3 Parallele Kultivierung im Liter-Maßstab mit 0,5 L Startvolumen

Im nächstgrößeren Maßstab wurde ein paralleles Bioreaktorsystem (DASGIP GmbH, Jülich) eingesetzt. Eine detaillierte Auflistung der Gerätekomponenten ist im Anhang zu finden (Tabelle A2) und der Aufbau ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

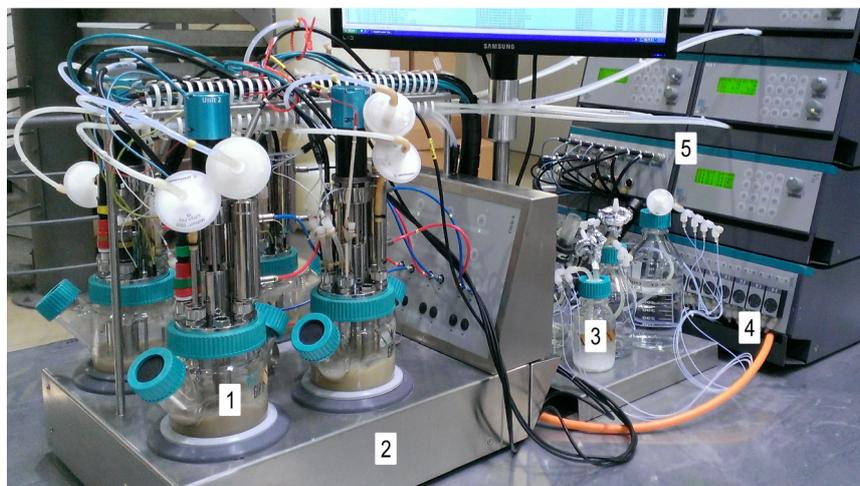


Abbildung 4.5: Aufbau des parallelen Bioreaktorsystems im 500 mL-Maßstab (DASGIP GmbH, Jülich): (1) Glas-Rührkesselreaktoren, (2) Heizblock, (3) Zulaufmedien, Base, Antischaummittel, (4) Mikropumpen, (5) Einheiten zur Messung/Regelung von Temperatur, Drehzahl, pH, pO₂ sowie vier Gas-mischstationen

Aufbau

Die vier identischen einwandigen Rührkesselreaktoren haben einen Flachboden und ein Totalvolumen von 1,5 L sowie ein Arbeitsvolumen von 300–800 mL. Jeder Reaktor besitzt zwei Seitenarme und eine von oben eintauchende Rührwelle mit je zwei 6 Blatt-

Scheibenrührern. Der untere Teil der Reaktoren ist von einem Heizblock umgeben, wobei die Temperatur für jeden Reaktor separat geregelt wird. Jeder Bioreaktor verfügt über einen oben aufsitzenden Elektromotor und Durchführungen für pH-Sonde, pO₂-Sonde, Füllstandssonde, Temperaturfühler, Begasungsrohr, Abluftkühlung, Probenahmerohr und insgesamt fünf Luer-Lock-Schraubverschlüsse für Säure, Base, Antischaummittel und Zulaufmedien. Hierfür sind pro Reaktor je vier Mikropumpen vorhanden. Die Begasung erfolgt über vier unabhängige Gasmischstationen. Ab einem Druck von 0,4 bar verringerten die Gasmischstationen automatisch die Begasungsrate. An Zu- und Abluft waren Sterilfilter angebracht. Über eine vierfache Abgasanalytik kann der O₂ und CO₂-Gehalt im Abgas jedes Reaktors aufgezeichnet werden. Die Prozesssteuerung und Dokumentation erfolgte mit der Steuerungssoftware DASGIP Control (DASGIP GmbH). Jeder Prozessparameter kann für jeden Reaktor getrennt eingestellt werden. Die automatisierte Antischaumzugabe (10 % AF204) erfolgte über die Detektion mittels der Füllstandssonde. Im Gegensatz zu den verwendeten Rührkesselreaktoren in anderen Maßstäben wurde hier außerdem von dem Elektromotor der Rührwelle das Drehmoment erfasst. Die aufgewendete Leistung P (W) lässt sich aus der Rührerdrehzahl n (min⁻¹) und dem Drehmoment M (Nm) berechnen:

$$P = 2\pi nM \quad (4.1)$$

Versuchsdurchführung

Die Kalibrierung der pH-Sonden erfolgte wie in den Reaktoren im Liter-Maßstab vor der Sterilisation. Die Reaktoren wurden zusammengebaut, mit VE-H₂O gefüllt und zusammen mit den benötigten Medien, Lösungen und Vorlageflaschen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Eine Einpunktkalibrierung der Pumpen für Base und Zulaufmedien wurde verwendet. Es wurde ein Startvolumen von 350 beziehungsweise 500 mL (inklusive Inokulum) eingesetzt. Die Bioreaktoren wurden unter der Sterilwerkbank nach der Sterilisation entleert und mit sterilem Medium befüllt. Das in der Software hinterlegte CIP-Protokoll (*cleaning in place*) wurde vor jeder Kultivierung zur Reinigung der Schläuche durchgeführt. Dabei wurden die Leitungen der Pumpen in folgender Reihenfolge gespült: 70 % Ethanol, VE-H₂O, 2 M NaOH, VE-H₂O und schließlich jeweiliges Medium (12,5 % NH₃, 10 % Antischaummittel und Glucose beziehungsweise Zulaufmedium). Der erste Spülschritt mit VE-H₂O ist nicht in der CIP-Prozedur des Herstellers vorgesehen, wurde aber manuell durchgeführt, um einen direkten Kontakt von Ethanol und NaOH in den dünnen Schläuchen zu vermeiden. Nach dem Anschließen der Reaktoren wurden die pO₂-Sonden mittels Druckluft sättigung und Stickstoff kalibriert. Je einer der Seitenarme ist mit einem Septum versehen, über das mit Hilfe von Spritzen und Kanülen die Inokulation und Induktion erfolgte. Die Begasungsrate betrug 1,5 – 2 L min⁻¹ und die Rührerdrehzahl 800 – 1200 U min⁻¹. Die Probenahme erfolgte über spezielle Probenahmerohre.

4.3.4 Kultivierung in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab

Für Kultivierungen im Liter-Maßstab wurden Rührkesselreaktoren vom Typ Labfors und Techfors42 und die Prozesssoftware IRIS (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) eingesetzt.

Aufbau des Glas-Rührkesselreaktors

Für die Zulaufkultivierungen im Liter-Maßstab wurde ein doppelwandiger Glas-Rührkesselreaktor mit einem Totalvolumen von 7,5 L verwendet (Abbildung 4.6; Einzelkomponenten in Tabelle A3 im Anhang). Drei 6-Blatt-Scheibenrührer sitzen an einer von oben eintauchenden Rührwelle, die von einem auf dem Reaktor montierten Elektromotor angetrieben wird. Der Reaktordeckel besitzt Durchführungen für Drucktransmitter, pH-Sonde, pO_2 -Sonde, Antischaumsonde, Temperaturfühler, Abgaskühler, Begasungs- und Probenahmerohr sowie Schnellkupplungen für das Anschließen von Titrationsmittel, Zulaufmedium, Inokulum und Antischaummittel.

Zusätzlich zur Schaumfalle wurde ein Überdruckventil in die Abgasleitung eingebaut. Dem Versuchsaufbau ist eine Abgasanalytik angegliedert, die den O_2 - und CO_2 -Gehalt der Abluft aufzeichnet. Die Prozesssteuerung und -aufzeichnung erfolgt über die Labfors-Steuerungseinheit und die IRIS-Software. Die Gewichte des Zulaufmediums und des Titrationsmittels wurden manuell dokumentiert.

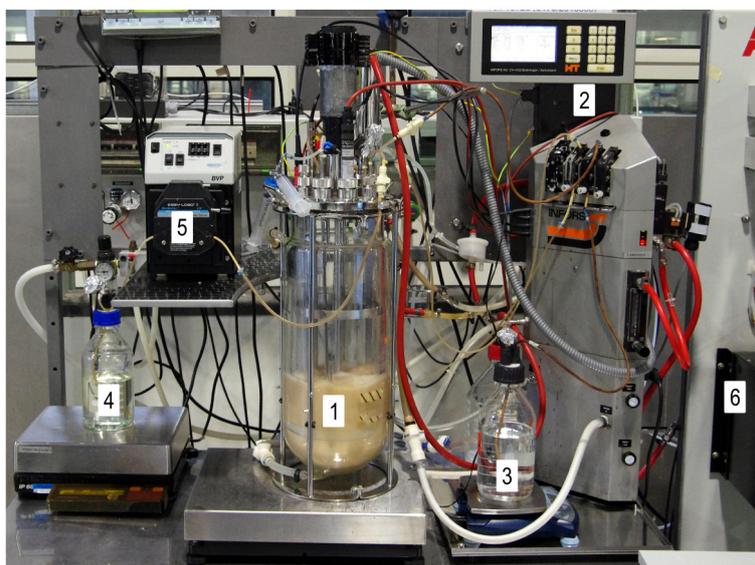


Abbildung 4.6: Aufbau des Glas-Rührkesselreaktors: (1) Glas-Rührkesselreaktor mit 7,5 L Totalvolumen, (2) Steuereinheit mit Pumpen für Säure/Base/Antischaummittel, (3) Vorlageflasche für Titrationsmittel, (4) Vorlageflasche für Zulaufmedium, (5) Zulaufpumpe, (6) Abgasanalytik. Der Reaktor und die Vorlageflaschen stehen auf Waagen. Nicht zu sehen ist die Vorlageflasche für Antischaummittel und die Schaumfalle

Aufbau des Edelstahl-Rührkesselreaktors

Der Aufbau des Edelstahl-Rührkesselreaktors ist in Abbildung 4.7 dargestellt und die Einzelkomponenten in Tabelle A4 im Anhang aufgelistet.

Der Bioreaktor mit einem Gesamtvolumen von 42 L und einem Arbeitsvolumen von bis zu 30 L verfügt über einen Doppelmantel. Durch einen Heißdampf- und Kühlwasseranschluss erfolgt über Wärmetauscher die Temperatur-Regelung. Die Rührerwelle mit drei 6-Blatt-Scheibenrührer ist am Boden des Reaktors auf einer Kondensat geschmierten Gleitringdichtung angebracht. An der Innenwand sorgen vier eingesetzte Strömungsbre-

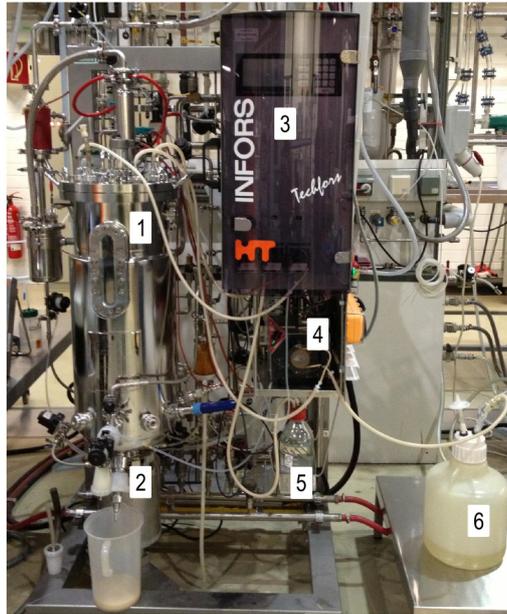


Abbildung 4.7: Aufbau des Edelstahl-Rührkesselreaktors: (1) Edelstahl-Rührkesselreaktor mit 42 L Totalvolumen, (2) Bodenventil, (3) Steuereinheit mit Pumpen für Säure/Base/Antischaummittel, (4) Zulaufpumpe, (5) Vorlageflaschen für Titrations- und Antischaummittel, (6) Vorlagebehälter für das Zulaufmedium

cher für eine turbulente Durchmischung. Seitlich im unteren Teil des Reaktors wurden durch Durchführungen eine pH-, pO_2 - und Temperatursonde sowie ein Probenahmerohr angebracht. Durch das Bodenventil kann der Reaktor vollständig entleert werden. Am Deckel des Reaktors befanden sich mehrere Durchführungen, welche einerseits dem Einschrauben des Abluftkühlers, der Antischaumsonde und des Drucktransmitters und andererseits über Anstechmembranen den Anschluss von Zufuhrschläuchen für Zulaufmedium, Inokulum, Titrationsmittel sowie Antischaummittel ermöglichen. Die Zugabe dieser Lösungen wurde durch in die Steuereinheit integrierte sowie weitere peristaltische Pumpen realisiert. Die Steuerung beziehungsweise Regelung der Prozessparameter erfolgte entweder direkt über die Steuereinheit oder mithilfe der Prozesssoftware IRIS.

Versuchsdurchführung im Liter-Maßstab

Im Gegensatz zu den parallelen Reaktoren mit 0,5 L wurde das Satzmedium, genauer die Salze, Spurenelemente und das Antischaummittel im Rührkesselreaktor vorgelegt und zusammen autoklaviert. Die Sterilisation des Glas-Rührkesselreaktors erfolgte im Autoklaven. Zuvor wurde jeweils die 80 %ige Glycerollösung der Gleitringdichtung gewechselt. Bei den pO_2 -Sonden wurde in beiden Reaktoren vor dem Einbau die Elektrolytlösung getauscht.

Die Sterilisation des Edelstahl-Rührkesselreaktors konnte an Ort und Stelle (*sterilisation in place*) mit Hilfe eines Heißdampfanschlusses durchgeführt werden. Hierfür wurde der Bioreaktor zuvor mit einem Teil des Mediums befüllt und dicht verschlossen. Über die Prozesssoftware IRIS wurde die Sterilisation gestartet. Das Bodenventil und die doppelte Gleitringdichtung wurden durch manuelle Ventilschaltungen sterilisiert. Der Bioreaktor

wurde auf 121 °C aufgeheizt und 20 min bei dieser Temperatur gehalten. Die Sterilisation der Zuluft- und Abluftstrecke inklusive der Sterilfilter erfolgte automatisch. Während der Sterilisationsphase wurde der Nullwert der pO₂-Sonde kontrolliert und gegebenenfalls kalibriert. Vorlageflaschen mit Anstechgarnituren wurden separat autoklaviert.

Für beide Reaktoren wurden die restlichen Komponenten des Satzmediums (Glucose, Kanamycin und Magnesiumsulfat) separat sterilisiert und nach dem Autoklavieren über die peristaltische Pumpe in den Bioreaktor gepumpt. Auch die Inokulation erfolgte über diese Pumpe, die während der Kultivierung für das Zulaufmedium verwendet wurde.

IPTG wurde manuell mit Spritze und Kanüle über Anstechmembranen in die Reaktoren gegeben. Die Probenahmen erfolgten manuell mit einer Spritze (Labfors) beziehungsweise über ein spezielles Probenahmerohr (Techfors42). Die pO₂-Sonden wurden für mindestens 6 h polarisiert, bevor sie mit Druckluftsättigung und Stickstoff kalibriert wurden. Im Edelstahl-Reaktor erfolgte nur die Kalibrierung mit Druckluftsättigung. Im Glas-Rührkesselreaktor betrug das Startvolumen 2 L, die Begasungsrate 3–9 L min⁻¹, der Druck 0,05–0,25 bar und die Rührerdrehzahl 800–1200 U min⁻¹. Im Edelstahl-Rührkesselreaktor lag die Begasungsrate bei 15–30 L min⁻¹, der Druck bei 0,5 bar und die Rührerdrehzahl bei 800–1000 U min⁻¹. Der pO₂ sollte hier nicht unter 30 % fallen und das Startvolumen lag bei 10 L.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde sowohl mit der optischen Dichte (OD_{600}) als auch mit der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) bestimmt. OD_{600} und BTM lassen sich zwar korrelieren. Allerdings wurde beobachtet, dass diese Korrelation nur in der Wachstumsphase stabil ist und sich Werte für OD_{600} und BTM während der Expression unterschiedlich verändern können.

Für die Messung der OD_{600} wurden die Proben entweder manuell mit PBS verdünnt und in einer Küvette im Einstrahlphotometer bei 600 nm gemessen. Alternativ wurde im Bioreaktorblock die Verdünnung mit PBS durch den Pipettierroboter durchgeführt und die OD_{600} in Mikrotiterplatten (MTP mit flachem Boden) im MTP-Photometer bei 600 nm gemessen. Die Schichtdicke in den MTPs ist mit den verwendeten Volumina von 200 μ L anders als die standardisierte Schichtdicke in Küvetten (1 cm) und zudem hängt die Messung der optischen Dichte stark von dem eingesetzten Photometer ab (Matlock et al., 2011). Damit die OD_{600} -Werte aus den MTPs dennoch besser mit den Küvettenmessungen vergleichbar sind, wurde eine Korrelation zwischen den Messungen in Küvette und MTP aufgestellt (Polynom zweiten Grades) und alle MTP-Werte umgerechnet, sodass diese den Messungen in Küvetten entsprechen.

Die BTM wurde gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden leere 2 mL-Reaktionsgefäße bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Für jede Einzelmessung wurden 1 – 2 mL Probe in diesen Reaktionsgefäßen bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge für 10 min sedimentiert, der Überstand entfernt und das Pellet bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Reaktionsgefäße mit dem Pellet gewogen. Aus der Massedifferenz und dem eingesetzten Probenvolumen ergibt sich die BTM.

4.4.2 Bestimmung der C16-Konzentration

Proteinassays

Der BCA-Assay ist eine der beliebtesten Methoden zur Messung der Proteinkonzentrationen. Hierbei wird in der sogenannten Biuret-Reaktion zwischen Proteinen und Cu^{2+} das Kupfer zu Cu^+ reduziert. Bicinchoninsäure (*bicinchonin acid*, BCA) wiederum bildet mit Cu^+ eine Komplexverbindung mit einer intensiven violetten Farbe, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Cystein, Tryptophan, Tyrosin und die Peptidbindung können Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren, vor allem bei angepassten Reaktionsbedingungen (60 °C). (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988)

Neben diesem BCA-Assay ist der sogenannte Bradford-Assay eine weitere beliebte photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Die anionische Form des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau bildet in saurer Lösung Komplexe mit Proteinen. Dies führt zu einer Verschiebung der rötlich-braunen Form (Absorptionsmaximum bei 465 nm) zu der blauen Form des Farbstoffs (Absorptionsmaximum bei

610 nm); der Unterschied ist am größten bei 595 nm. Die Interaktion findet vor allem mit basischen Aminosäuren, insbesondere Arginin, aber auch Lysin und Histidin, statt. Aromatische Aminosäurereste (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) verursachen nur schwache Färbungen. Es findet keine Reaktion mit dem Proteinrückgrat statt. (Bradford, 1976; Compton und Jones, 1985)

Das C16-Protein enthält keine basischen Aminosäuren, kein Cystein oder Tryptophan, aber Tyrosin (Abschnitt 3.1.1). Die generelle Anfärbung mit Coomassie und damit auch der Bradford-Assay sind daher leider nicht möglich. Da die Biuret-Reaktion unter anderem mit der Peptidbindung erfolgt, ist der BCA-Assay hingegen für C16 grundsätzlich möglich. Die schlechte Löslichkeit von C16 ist jedoch problematisch. So kann C16 zwar gut in konzentrierter Ameisensäure gelöst werden, allerdings sind selbst geringste Konzentrationen von Ameisensäure aufgrund der starken reduzierenden Wirkung sehr störend beim BCA-Assay. Daneben ist C16 auch in 4–6 M Guanidiniumthiocyanat löslich. Dies stört den BCA-Assay zwar deutlich geringer als Ameisensäure, dennoch sorgt alleine die Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat für eine starke Farbentwicklung und damit verfälschte Werte. Proteinassays sind bei der Expression von intrazellulären Proteinen allgemein schwierig anwendbar, da die Zellen quantitativ aufgeschlossen werden müssen und alle Zellproteine mitgemessen werden. Eine Kombination beider Assays zur Messung aller Proteine beziehungsweise nur der Zellproteine, deren Differenz der C16-Konzentration entsprechen müsste, ließ sich nicht zufriedenstellend umsetzen. Daher wurden spezifischere Quantifizierungsmethoden zur Messung von C16 benötigt, wie zum Beispiel in Form eines ELISA.

ELISA

Da die Seidenproteine selbst nicht immunogen sind, wurde in den verwendeten Expressionsvektoren den Spinnenseidengenen ein sogenannter T7-Tag angefügt. Der T7-Tag besteht aus den 12 N-terminalen Aminosäuren (MASMTGGQQMGR) vom *major capsid protein* Gen aus dem T7-Bakteriophagen (Huemmerich et al., 2004a; Kroll et al., 1993). Gegen den T7-Tag gibt es kommerziell erhältliche Antikörper, die beispielsweise mit einer Peroxidase konjugiert sind. Mit einem T7-Tag Antikörper-HRP-Konjugat (*horseradish peroxidase*) wurde von AMSilk ein einfacher *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) entwickelt, mit dem die C16-Konzentration in aufgeschlossenen Zellsuspensionen detektiert werden kann. Der sogenannte *direkte* ELISA besteht aus folgenden Schritten (exklusive Waschschrte):

1. Beladung der Mikrotiterplatte (MTP) mit der Probe (Inkubation für 2h)
2. Blockieren aller nicht besetzten Bindungsstellen auf der MTP-Oberfläche (Inkubation für 0,5 h)
3. Bindung des Antikörpers an die Probe (Inkubation für 0,5 h)
4. Zugabe des Chromogens und Enzymreaktion (Farbentwicklung)
5. Stoppen der Enzymreaktion
6. Messung der entstandenen Färbung

Es wurde eine Automatisierung des ELISAs im Pipettierroboter realisiert. Die Probenvorbereitung wurde jedoch weiterhin manuell durchgeführt. Entgegen erster Annahmen sind die verwendeten Reagenzien zwar sehr lichtempfindlich, aber bei Raumtemperatur lichtgeschützt über den Zeitraum des Assays stabil.

Zusätzlich wurde eine Optimierung des ELISAs durchgeführt und dabei die Antigen- und Antikörper-Konzentration sowie alle Reagenzien untersucht. Verschiedene Antikörper, Bindungspuffer, Chromogene, Detergenzien und blockierende Reagenzien wurden eingesetzt. Indem für alle Positionen die gleichen Bedingungen, also Konzentrationen und Volumina an Antigen und Antikörper gewählt wurden, konnte der sogenannte Rand- oder Kanteneffekt beobachtet werden: Die Positionen am Rand der MTP zeigen deutlich höhere Signale als die Positionen in der Mitte. Solche Effekte sind in der Literatur und insbesondere für die ursprünglich verwendeten Nunc Mikrotiterplatten bekannt (Kricka et al., 1980; Esser, 1985). Als Ursachen werden Licht- und vor allem Temperatur-Differenzen genannt. Letztere entstehen durch Inkubation oberhalb der Raumtemperatur, gekühlte Reagenzien oder Verdunstungseffekte. Im Fall des ELISA für C16 wurde Licht als größte Störquelle identifiziert. Durch Verwendung von lichtundurchlässigen, schwarzen Platten eines anderen Herstellers (*high binding*-Mikrotiterplatten von Greiner) konnten die Randeffekte vermieden werden. Damit wurden Variationskoeffizienten von 8,6—11,6 % je MTP erreicht, allerdings nur mit aufgereinigtem C16-Protein.

Trotz der Automatisierung und Optimierung lagen die Variationskoeffizienten für Fermentationsproben meist bei bis zu 20 %, teilweise sogar über 30 %. Die Präzision und Richtigkeit des Pipettierroboters wurde als Ursache für die hohe Variation des ELISAs durch eigene Messungen ausgeschlossen (je < 0,5 % für 100 μL H_2O).

Zusätzlich wird in Fermentationsproben bereits bei geringeren C16-Konzentrationen von unter 2 mg L^{-1} die Bindekapazität der Vertiefungen überschritten und die gemessene Absorption fällt wieder ab. Dadurch wird der Messbereich stark eingeschränkt. Außerdem ist die Stabilität der aufbereiteten und verdünnten Proben und der Standards sehr gering, sodass die Vorbereitung der Proben und Standards immer direkt vor dem Start des ELISAs erfolgen muss. Zu den weiteren Nachteilen des ELISAs gehören der geringe Probendurchsatz, die lange Messdauer, die sehr hohe Sensitivität (hohe Verdünnungen nötig), ein geringer Messbereich (etwa eine Größenordnung) und die hohen Kosten pro Probe (durch Antikörper und Mikrotiterplatten). Auch die Automatisierung bringt Nachteile mit sich. So ist keine gleichzeitige Kultivierung möglich, nur eine MTP kann auf einmal gemessen werden und die Probenvorbereitung muss wegen der Zentrifugationsschritte weiterhin manuell durchgeführt werden. Insgesamt wurde der ELISA daher nur in Einzelfällen durchgeführt und alle in dieser Arbeit gezeigten Produktkonzentrationen vorrangig mit der überlegenen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) bestimmt.

SEC-HPLC: Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie oder auch Gelfiltrations-Chromatographie, im Englischen *Size Exclusion Chromatography* (SEC), verwendet eine Trennsäule, welche die Bestandteile der Probe nach ihrem hydrodynamischen Volumen auftrennt. Größere

Moleküle wandern schneller durch die Säule als kleinere. Dieser umgekehrte Siebeffekt entsteht durch unterschiedliche Diffusionsvolumina für verschieden große Moleküle. Kleinere Moleküle können in die porösen Polymere der stationären Phase eindringen, wodurch ihnen ein größeres Diffusionsvolumen zur Verfügung steht. Durch die Diffusion in die Polymerpartikel werden die Moleküle aufgehalten und die Retentionszeit verlängert sich. Je größer die Moleküle sind, desto weniger tief können sie eindringen und desto weniger wird die Retentionszeit durch die Diffusion in die Poren der Polymere verzögert. Ab einer bestimmten Größe können die Probenbestandteile nicht mehr in die Poren eindringen und fließen ungehindert mit dem Laufmittel durch die Säule. (Porath, 1960)

Die SEC-HPLC-Methode zur Bestimmung von C16 wurde bei AMSilk entwickelt. Hierfür wird die Säule G4000PWXL von TOSOH eingesetzt, mit Partikeln von 10 μm Größe aus hydroxyliertem Polymethacrylat. Die Säule ist vor allem dafür geeignet, lineare Polymere mit einer Größe von bis zu 300 kDa aufzutrennen und ist temperaturbeständig. Die entwickelte Methode sieht eine Säulentemperatur von 80 °C vor. Als Laufmittel sollte 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) mit einer Flussrate von 0,8 mL min^{-1} eingesetzt werden.

Bei der Etablierung der Methode am BioVT-Lehrstuhl erfolgten einige Anpassungen. Die Komponenten des verwendeten HPLC-Systems sind in Tabelle A5 im Anhang aufgelistet. Die Säulentemperatur wurde geringfügig auf 75 °C herabgesetzt, um die Säule sowie den Säulenofen unterhalb der maximalen zulässigen Temperatur zu betreiben. Es wurde zudem die Konzentration des Laufmittels von 100 mM auf 25 mM verringert, damit ein eventuelles Auskristallisieren des Laufmittels beispielsweise an Verbindungsstellen vermieden wird und um die HPLC-Pumpe zu schonen. Ein Nachteil der eingesetzten Säule ist die geringe maximale Druckbelastung von nur etwa 20 bar. Um den Druck zu verringern und zudem die Peakauflösung zu verbessern, wurde die Flussrate auf 0,7 mL min^{-1} verringert. Um dem Problem des Druckanstiegs bei der Messung von vielen Proben hintereinander zu begegnen, wurde zusätzlich eine geeignete Vorsäule eingesetzt. Diese ist allerdings laut den Herstellerangaben nur für eine begrenzte Probenzahl ausgelegt (30–40 Probeninjektionen). Zudem wurden größere unlösliche Partikel durch Sterilfiltration oder Zentrifugation bei 23 300 U min^{-1} für 5 min entfernt. Etwa alle 30–50 Proben wurden Vor- und Hauptsäule in Laufrichtung durch Spülschritte mit 10 mM NaOH gereinigt. Etwa wöchentlich erfolgte zudem der Ausbau beider Säulen und anschließende Spülschritte mit 20 % Ethanol entgegen der Laufrichtung. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in 20 % Ethanol. Durch diese Reinigungsschritte konnte der mit jeder Probe einhergehende Druckanstieg wieder verringert werden.

Bei der Probenvorbereitung erfolgt zunächst die Zellyse mittels Ameisensäure (20–50 μL Probe + 200 μL Ameisensäure) durch Inkubation für 10 min bei 40 °C und 600 U min^{-1} in einem Thermomixer. Daraufhin werden die Proteine durch Zugabe einer Glycin/NaCl-Lösung (483 μL , 1 M, pH 9,0) sowie von NaOH (267 μL , 10 M) gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 13 000 U min^{-1}) sedimentiert. Das Pellet wird in 4 M Guanidiniumthiocyanat resuspendiert (10 min bei 40 °C und 600 U min^{-1}), unlösliche Bestandteile sedimentiert (5 min bei 23 300 U min^{-1}) und der Überstand für die HPLC verwendet (Injektion von 20 μL). Für die Probenvorbereitung wurde statt 6 M nur 4 M Guanidiniumthiocyanat eingesetzt, da bereits diese Konzentration in der Lage

ist C16-Protein zu lösen und im Gegensatz zu 6 M Guanidiniumthiocyanat bei 4 °C nicht auskristallisiert. Zudem waren die Proben und Standards bei 4 °C über mehrere Wochen problemlos lagerbar.

Die Detektion von C16 erfolgte mittels Fluoreszenz. Hierfür wurden nach Extinktion bei 275 nm die Emissionen bei 305 nm und 350 nm gemessen. Die Emission bei 305 nm ist vor allem auf Tyrosin und die Emission bei 350 nm auf Tryptophan zurückzuführen. Da das Spinnenseidenprotein C16 im Gegensatz zu den meisten *E. coli*-Proteinen über kein Tryptophan verfügt, konnte mit Hilfe der Messung bei 350 nm die Peakfläche bei 305 nm um die bei dieser Retentionszeit gemessenen Wirtsproteine korrigiert werden.

C16-Standardreihen wurden mit gereinigtem C16-Protein erstellt. Etwa 4 mg C16-Protein wurden in 2 mL sterilfiltriertem 4 M Guanidiniumthiocyanat gelöst. Über die UV-Messung der Extinktion E_λ bei 276 nm wurde die tatsächliche Konzentration c jeder Stammlösung nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt:

$$E_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (4.2)$$

Die Schichtdicke d war dabei 1 cm. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_\lambda = 0,859 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ergibt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten ($40\,974 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) und der molaren Masse von C16 ($47\,700 \text{ g mol}^{-1}$, Lammel et al., 2008). Diese C16-Lösungen wurde in einer 7-stufigen 1/2-Verdünnungsreihe mit 4 M Guanidiniumthiocyanat verdünnt und mit der gleichen Methode wie die Proben gemessen.

4.4.3 Fluoreszenzmessung der eGFP-Konzentration

Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) kann über die Fluoreszenz verfolgt werden (Albano et al., 1996). Mit Hilfe des Pipettierroboters kann daher bei Kultivierungen im Bioreaktorblock die GFP-Konzentration *atline* bestimmt werden, nur nach Verdünnung in PBS und ohne aufwendige Probenvorbereitung. Das eingesetzte eGFP (*enhanced*) ist für menschliche Codonverwendung und den Einsatz im Durchflusszytometer optimiert und trägt Mutationen im Chromophor, die zu einer 35-fach höheren Fluoreszenz führen (Cormack et al., 1996; Li et al., 1997). Mit Hilfe einer aufgereinigten GFP-Lösung wurde eine Korrelation zwischen Fluoreszenz und GFP-Konzentration in dem eingesetzten MTP-Photometer erstellt. Die Messung der Fluoreszenz der Kultivierungsbrühe erlaubt daher unter Berücksichtigung der zelleigenen Fluoreszenz die Abschätzung der vorliegenden GFP-Konzentration.

4.4.4 Bestimmung der Acetat-, Ammonium- und Zuckerkonzentrationen sowie der Invertase-Aktivität

Für die Bestimmung der Acetat-, Ammonium- und Zucker-Konzentrationen wurden enzymatische UV-Tests von R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland) verwendet: Essigsäure (Acetat) UV-Test (Nr. 10148261035); Ammoniak UV-Test (Nr. 11112732035), Milchsäure UV-Test (Nr. 11112821035) und Saccharose/D-Glucose/D-Fructose UV-Test (Nr. 10716260035). Die Durchführung entsprach den beiliegenden Angaben des Herstellers, die eingesetzten Volumina wurden jedoch für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifiziert.

Es wurde die Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Acetat, Lactat), die Abnahme von $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Ammonium) beziehungsweise die Bildung von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (Zucker) bei 340 nm gemessen.

Daneben wurde ein halbquantitativer kolorimetrischer Ammonium-Test eingesetzt, der bis zu $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ misst und unter anderem kompatibel mit Abwasser und Nährlösungen ist (Merck Millipore MColortestTM, 1.14400.0001). Die Proben können direkt einzeln vermessen werden; parallel waren bis zu fünf Messungen möglich.

Die Invertase-Aktivität in sterilfiltriertem Überstand (900 μL) wurde über die zeitliche Zunahme der Glucose-Konzentration nach Zugabe einer definierten Saccharosekonzentration bestimmt (100 μL von 70 g L^{-1}). Hierfür wurde das Blutzucker-Messgerät ACCUCHEK[®] von Roche Diagnostics verwendet.

5 Skalierbarkeit zwischen Liter- und Milliliter-Maßstab

5.1 Hochzelldichtekultivierung zur Herstellung von C16

Ausgangslage für die reaktionstechnische Untersuchung der Herstellung des Spinnenseidenproteins C16 mit *Escherichia coli* war ein von AMSilk bereitgestellter Referenzprozess. Sowohl das definierte Medium als auch die Zulaufstrategie sind von Riesenberg et al. (1991a) und Korz et al. (1995) abgeleitet. Hauptmerkmal ist dabei das substratlimitierte Wachstum. Die dabei eingestellte Wachstumsrate liegt unterhalb der kritischen Wachstumsrate μ_{crit} und verhindert Acetatbildung durch den Überflussmetabolismus (vgl. Abschnitt 3.3.1). Der Prozess besteht insgesamt aus vier Phasen, die in Abbildung 5.1 dargestellt sind.

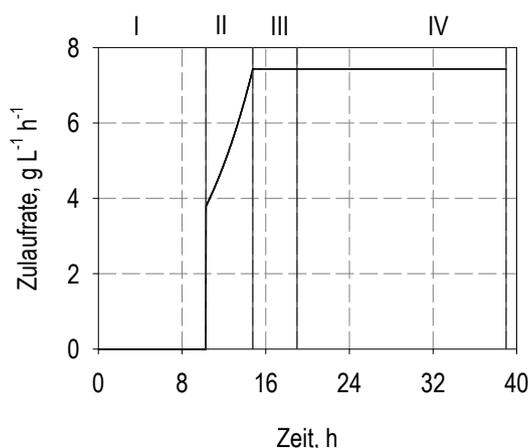


Abbildung 5.1: Zulaufprofil für den Referenzprozess zur Herstellung von C16 in *E. coli*. Der Prozess besteht aus vier Phasen: Satzphase (I), exponentielle Zulaufphase (II), konstante Zulaufphase (III) und Produktionsphase mit konstantem Zulauf (IV).

Im Medium sind 25 g L^{-1} Glucose vorgelegt, die in der Satzphase von *E. coli* verstoffwechselt werden. Hier findet unlimitiertes Wachstum statt. Die Satzphase endet, wenn die Glucose verbraucht ist. Dies ist unter anderem an einem schnellen Anstieg des pO_2 -Signals zu erkennen. In der zweiten Phase wird das Wachstum durch einen exponentiellen Zulauf gesteuert. Die hier verwendete Wachstumsrate betrug $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Da ansteigende Zelldichten bei einer konstanten Wachstumsrate einen immer höheren Sauerstoffbedarf haben und dieser in Bioreaktoren nicht beliebig gesteigert werden kann, wird nach mehreren Stunden vom exponentiellen auf einen konstanten Zulauf umgestellt. Sobald die gewünschte Zelldichte erreicht ist, erfolgt die Induktion durch Zugabe von 1,52 nIPTG (Beginn der Produktionsphase).

In Abbildung 5.2 sind zwei Kultivierungen dargestellt, die unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurden. Diese sollen als Referenzkultivierungen dienen. Die mittleren Produktkonzentrationen und -ausbeuten nach 20 h Expression werden als 100 % Referenzwerte gesetzt.

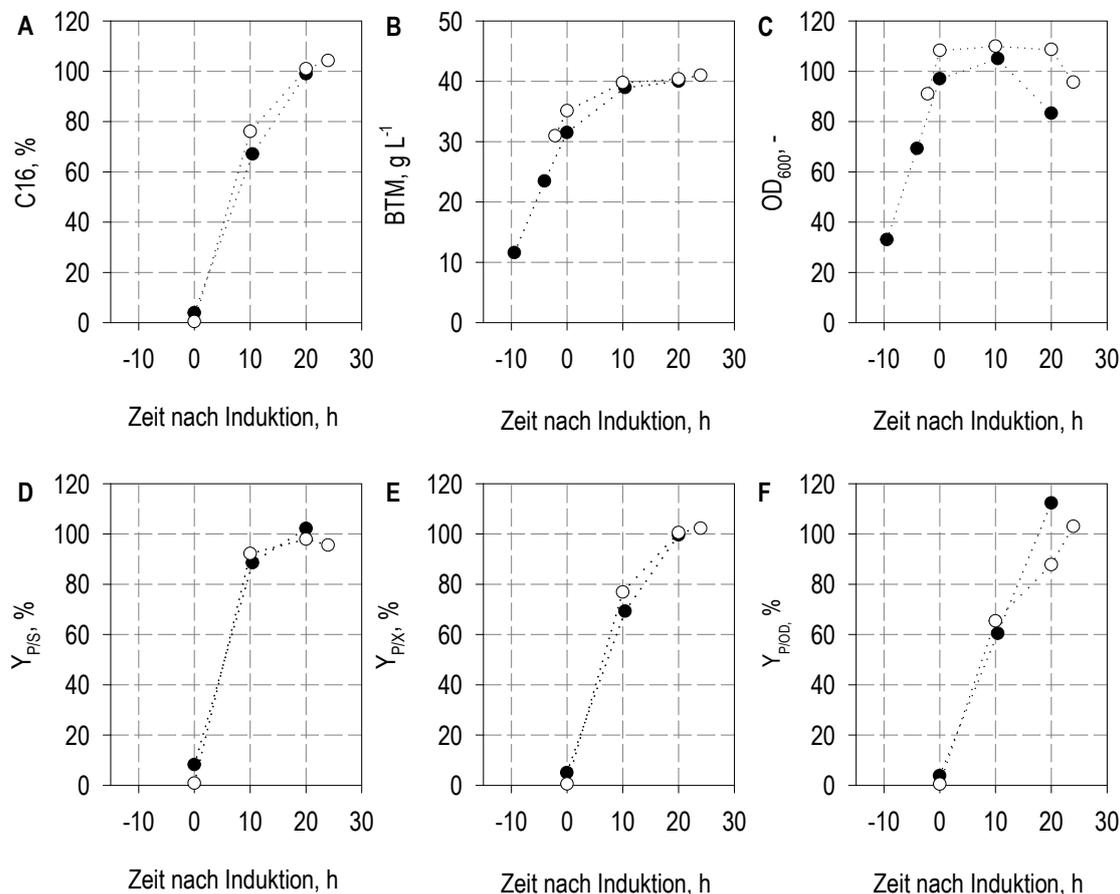


Abbildung 5.2: Zwei Referenz-Zulaufkultivierungen von *E. coli* HMS174(DE3) zur Expression des Spinnenseidenproteins C16 im Liter-Maßstab. Es wurden 25 g L⁻¹ Glucose im Satzmedium mit anschließender exponentieller und konstanter Zulaufphase (7,5 g L⁻¹ h⁻¹ Glucose bezogen auf das Startvolumen) eingesetzt. Die Induktion erfolgte mit 1,52 nIPTG. Dargestellt sind im zeitlichen Verlauf ab Induktion die C16-Konzentrationen (A), Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, B), optischen Dichten (OD₆₀₀, C), die Produktausbeuten Y_{P/S} (D) sowie der zellspezifischen C16-Gehalt bezogen auf die BTM (Y_{P/X}, E) und die OD₆₀₀ (Y_{P/OD}, F). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe.

Diskussion

Die lange Expressionszeit von 20 h ist im Referenzprozess erforderlich, damit die Expression weitestgehend abgeschlossen werden kann. Die BTM und OD₆₀₀ stiegen während der Expression wenig oder sanken zum Prozessende sogar. Gerade das Abfallen der optischen Dichten zum Ende der Expression deutet auf einen starken Stress für die Zellen hin. Leider war genau dieser OD₆₀₀-Verlauf, wie auch hier zu sehen, nicht immer gleich. Durch die fallenden OD₆₀₀-Werte steigen die OD₆₀₀-spezifischen Y_{P/OD} stärker im Vergleich zu den BTM-spezifischen Y_{P/X}. Die substratspezifische Produktausbeute Y_{P/S} hingegen steigt zwischen 10 h und 20 h nur noch gering und fällt danach sogar ab.

Nicht dargestellt sind die Konzentrationen für Glucose, die während allen drei Zulaufphasen limitierend waren mit Messwerten unter 10 mg L^{-1} . Die Ammoniumkonzentrationen lagen zwischen $1,3 \text{ g L}^{-1}$ und $1,5 \text{ g L}^{-1}$ während der Produktion und die Acetatkonzentration bei $24\text{--}37 \text{ mg L}^{-1}$. Damit ist der Prozess nicht stickstofflimitiert und die Acetatbildung sollte unproblematisch sein. Nach Gleichung 3.30 und 3.31 wurden der OUR und der k_{La} aus Daten der Abgasanalytik abgeschätzt. Diese lagen bei $120\text{--}140 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise bis zu $0,15 \text{ s}^{-1}$ in der konstanten Zulaufphase. k_{La} -Werte in industriellen Bioreaktoren (bis 100.000 L) werden mit $0,11\text{--}0,22 \text{ s}^{-1}$ angegeben (Junker, 2004). Die gewählte Zulauftrate von $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sollte daher in verschiedenen Maßstäben anwendbar sein.

Von der Gruppe von Scheibel wurden Produktkonzentrationen für Spinnenseidenproteine von $> 500 \text{ mg L}^{-1}$ publiziert (Hardy und Scheibel, 2009). Die höchste bekannte Spinnenseidenkonzentration von $2,9 \text{ g L}^{-1}$ wurde mit *Pichia pastoris* erzielt. Die maximal mit gentechnisch modifizierten *E. coli* erzielte Konzentration eines synthetischen Spinnenseidenproteins lag ähnlich hoch bei $2,7 \text{ g L}^{-1}$ (vgl. Abschnitt 3.1.3). Im Vergleich zu den Daten der besten publizierten Expressionsprozesse verschiedener Proteine mit *E. coli* (c_P von $7\text{--}9,7 \text{ g L}^{-1}$ und $Y_{P/X}$ von $0,05\text{--}0,19 \text{ g g}^{-1}$ in Tabelle 3.4) zeigt die Herstellung von Spinnenseidenproteinen Raum für Verbesserungen.

5.2 Intermittierender Zulauf und Skalierung in den Milliliter-Maßstab

5.2.1 Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab

Ein am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelter Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren ermöglicht durch viele parallele Kultivierungen eine effiziente reaktionstechnische Analyse. Jedoch ist hierfür die Skalierbarkeit des Referenzprozesses zwischen Milliliter- und Liter-Maßstab erforderlich. Der Prozess im Milliliter-Maßstab sollte zugleich möglichst robust sowie parallel und sequenziell reproduzierbar sein. Für eine gute und direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Milliliter-Maßstab in den Liter-Maßstab wären reproduzierbare Hochzelldichtekultivierungen im Milliliter-Maßstab Voraussetzung. Es wurde daher zunächst untersucht, ob eine Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab möglich ist.

Zwei unterschiedliche Zulaufstrategien wurden hierfür untersucht (Abbildung 5.3): Erstens wurde die etablierte intermittierende Zugabe von Glucose durch den Pipettierroboter eingesetzt. Zweitens wurde ein neuer Ansatz zur enzymatischen Freisetzung des Substrats entwickelt und verwendet.

Dieser Ansatz lehnt sich an die „enzyme-based-substrate-delivery“ oder kurz „EnBase“ an und entwickelt diese für die Anwendung im Parallelbioreaktor weiter. Bei EnBase wird ein konstanter Glucosezulauf durch die enzymatische Freisetzung von Glucose aus einem Stärke-Depot realisiert. Die Tatsache, dass viele übliche *E. coli*-Laborstämme nicht in der Lage sind, Saccharose abzubauen, ermöglicht die Modifikation des EnBase-Konzeptes dahingehend, dass Saccharose statt Stärke verwendet wird und eine Invertase (β -Fructofuranosidase) statt des EnBase-Enzym-Mixes eingesetzt werden kann.

Eine Hochzelldichtekultivierung wurde in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab realisiert, mit OD_{600} von 114–133 (Abbildung 5.3 A+B). Mit der enzymatischen Freisetzung wurden höhere optische Dichten erreicht als mit dem intermittierenden Zulauf. Dagegen lagen die BTM für beide Zulaufstrategien zum Prozessende gleich hoch bei $69-70 \text{ g L}^{-1}$. Das Verhältnis BTM/OD_{600} lag damit zwischen $0,53 \text{ g L}^{-1}$ (enzymatische Freisetzung) und $0,61 \text{ g L}^{-1}$ (intermittierende Glucose). Ein ähnlicher Unterschied im BTM/OD_{600} -Verhältnis wurde auch in anderen Kultivierungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die unterschiedlichen optischen Dichten zwischen den Zulaufstrategien wurden auch bei einer weiteren Kultivierung mit einem anderen *E. coli*-Stamm beobachtet (BL21 statt HMS174, Abbildung 5.3 C). Während der Satzphase (I) war das Wachstum bei allen Reaktoren gleich (OD_{600} 24–25). Der Unterschied in den OD_{600} war am größten am Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) und blieb annähernd konstant bis zum Prozessende.

In Abbildung 5.4 sind die pO_2 für die Zeitspanne 15–18 h aus der Kultivierung in Abbildung 5.3 C gezeigt. Die Frequenz der intermittierenden Zugaben lag bei bis zu 20 h^{-1} (minimales Volumen einer einzelnen Zugabe: $15 \mu\text{L}$, maximale Zulauftrate: $321 \mu\text{L h}^{-1}$ von 250 g L^{-1} Substrat). Hohe Zugabefrequenzen stehen im zeitlichen Konflikt mit anderen Operationen des Pipettierroboters wie beispielsweise Zugaben von Säure/Base für die pH-Regelung. Die längeren Intervalle zwischen den Zugaben bei etwa 16 h resultieren

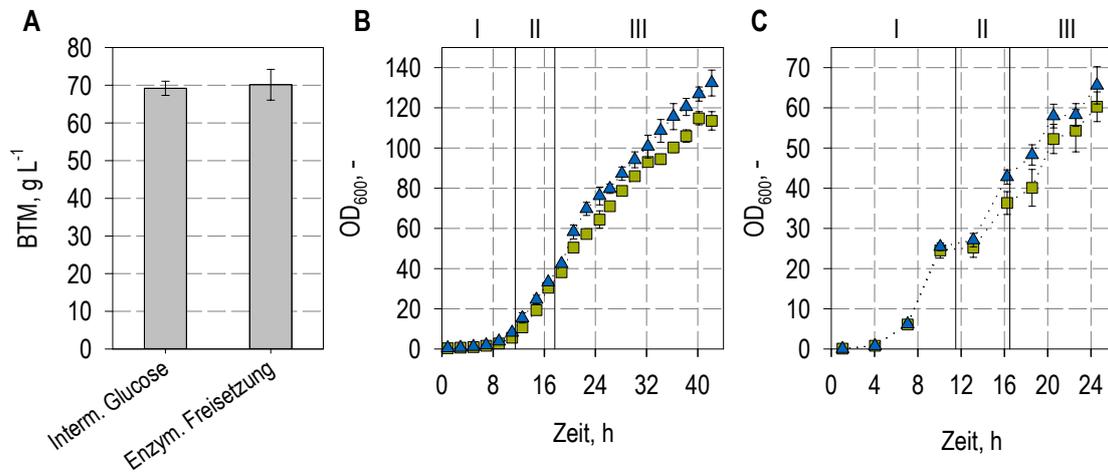


Abbildung 5.3: Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) und optische Dichten (OD₆₀₀) aus zwei Kultivierungen von *E. coli* HMS174(DE3) (A+B) und *E. coli* BL21(DE3) (C) in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab mit zwei unterschiedlichen Zulaufstrategien: Intermittierender Glucosezulauf durch einen Pipettierroboter (■) und ein enzymatisches Freisetzungssystem ausgehend von intermittierend zugegebener Saccharose (▲). Die Zellen wurden in einer Satz- (I), einer exponentiellen Zulauf- (II) und einer konstanten Zulaufphase (III) kultiviert. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 4–12 parallelen Kultivierungen. In (A+B) startete die Zulaufphase (II) bevor die Glucose im Satzmedium komplett verbraucht war.

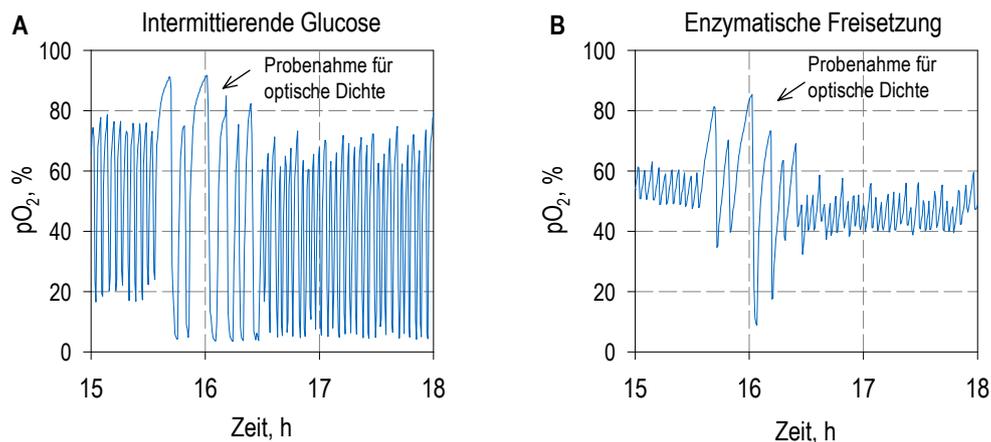


Abbildung 5.4: Sauerstoffpartialdruck aus Kultivierungen in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab mit zwei unterschiedlichen Zulaufstrategien: Intermittierender Glucosezulauf durch einen Pipettierroboter (A) und ein enzymatisches Freisetzungssystem ausgehend von intermittierend zugegebener Saccharose (B). Es ist die Zeitspanne zwischen 15 h und 18 h aus der Kultivierung in Abbildung 5.3 (C) gezeigt.

aus Probenahmen und Verdünnungsschritten für die Messung der optischen Dichte. Die durchschnittliche Frequenz in der konstanten Phase lag bei $13,6 \text{ h}^{-1}$ mit einem durchschnittlichen Volumen von $22 \mu\text{L}$

Die enzymatische Freisetzung führte zu geringere Oszillationen, zumindest während regelmäßiger Substratzugaben durch den Pipettierroboter (Abbildung 5.4 C). Da der Pipettierroboter die Saccharose zugibt, können in den längeren Intervallen während der Messung der optischen Dichte bei 16 h die Substrate vollständig verstoffwechselt werden, was zu sprunghaft ansteigenden pO_2 -Werten führt, ähnlich wie beim intermittierenden Zulauf.

Diskussion

Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* mit OD_{600} von über 100 und BTM von über 50 g L^{-1} wurden in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Zulaufstrategien realisiert. Die Zulaufstrategien hatten einen Einfluss auf den Sauerstoffgehalt und die OD_{600} , jedoch nicht auf die BTM.

Zellen mit intermittierendem Zulauf durchleben mehrere metabolische Zustände. Die individuelle Zugabe von $15 - 25 \mu\text{L}$ Zulaufmedium ($250 - 500 \text{ g L}^{-1}$ Glucose) in 10 mL Reaktormedium ergibt eine Glucosekonzentration von $375 - 1250 \text{ mg L}^{-1}$. Die Sättigungskonstante K_S von *E. coli* wird mit $0,058 - 8 \text{ mg L}^{-1}$ angegeben (Lendenmann et al., 2000). Da die Glucosekonzentration nach jeder Zugabe mindesten 46 mal höher ist, kann ein unlimitiertes Wachstum angenommen werden. Andererseits wird von einer minimalen Glucosekonzentration ausgegangen, unterhalb der *E. coli* nicht wächst (Ferenci, 2001; Kovárová et al., 1996). Der pO_2 -Anstieg auf über 80 % Luftsättigung vor jeder Substratzugabe lässt darauf schließen, dass diese minimale Konzentration unterschritten wird.

Ein Ziel der enzymatischen Freisetzung war es, die Schwankungen in der Glucoseverfügbarkeit zu verringern und damit das Wachstum von *E. coli* zu verbessern. Wird eine ausreichend niedrige Enzymkonzentration eingesetzt, so wird die enzymatische Spaltung der Saccharose limitierend für die Substratversorgung. Dadurch wird die hohe Substratverfügbarkeit vermieden, die bei einer intermittierenden Substratdosierung nach jeder Zugabe auftritt. Durch die bessere Substratlimitierung sollte der maximale Sauerstoffbedarf sinken. Tatsächlich wurden die Oszillationen deutlich verringert und höhere optische Dichten im Vergleich zum intermittierenden Zulauf erreicht. Dennoch waren die Biotrockenmassekonzentrationen zum Prozessende vergleichbar. Dies deutet auf unterschiedliche Morphologien beziehungsweise physiologische Zustände der Zellen hin, abhängig von der Zulaufstrategie.

Ausgehend von den pO_2 -Profilen konnte ein nahezu kontinuierlicher Zulauf mit der enzymatischen Freisetzung erreicht werden. Zwar konnte dieses Konzept damit erfolgreich umgesetzt werden, allerdings ist es offensichtlich nur für ein System mit intermittierendem Zulauf sinnvoll anwendbar. Der Vorteil des neuen Ansatzes liegt in der hohen Löslichkeit von Saccharose in Wasser ($2,4 \text{ g g}^{-1}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$, Lützen und Seibel, 2007). Im Gegensatz zu anderen Freisetzungssystemen wie FeedBead oder EnBase ermöglicht die Kombination aus der intermittierend zudosierten Saccharose und dem enzymatischen Abbau zu Glucose und Fructose einen Zulaufprozess mit hochkonzentriertem Substrat. Bei der Dosierung

einer Stärkelösung wäre hingegen die Verdünnung aufgrund der schlechten Löslichkeit von Stärke zu stark. In den FeedBead oder EnBase-Systemen werden die *Beads* oder die Stärke von Anfang an im Medium vorgelegt oder manuell zugegeben. Dadurch sind nur konstante Zulaufstraten und nicht beliebig hohe Zelldichten möglich. Mit EnBase wurden in Schüttelkolben und Mikrotiterplatten Zelldichten von $OD_{600} = 20 - 30$ (entsprechend $6 - 9 \text{ g L}^{-1}$ BTM) beziehungsweise im Parallelbioreaktor BTMs von $12 - 14 \text{ g L}^{-1}$ erzielt (Panula-Perälä et al., 2008; Hortsch und Weuster-Botz, 2010b). Zudem können keine weiteren Komponenten wie Magnesium über ein Zulaufmedium zugegeben werden, was vor allem bei Hochzelldichtekultivierungen entscheidend ist.

Bei der hier gezeigten Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab wurden mehrere Probleme beobachtet und es waren mehrere Anpassungen erforderlich. Die Zugabe von bis zu 1 % (v/v) Antischaummittel war notwendig, um Schaumbildung zu unterbinden. Ein ansteigendes Kultivierungsvolumen durch das Zulaufmedium verringert zudem den Sauerstoffeintrag (Puskeiler et al., 2005a), weswegen während der Kultivierung in Abbildung 5.3 A+B das Kultivierungsvolumen durch den Pipettierroboter konstant gehalten wurde. Zusätzlich wurde die Temperatur auf 30°C statt 37°C eingestellt, um die Sauerstofflöslichkeit zu steigern. Die Rührerdrehzahl wurde mehrfach auf bis zu 3100 rpm erhöht. Zudem wurde eine Reaktorcharge mit gut funktionierenden pH-Sensorfilmen verwendet. Eine Sauerstoffanreicherung wurde hingegen nicht eingesetzt, um die Schwankungen des pO_2 nicht zusätzlich zu erhöhen. Im Fall von definierten Medien und hohen Zelldichten kommt es zu einer Wechselwirkung der zellbedingten Fluoreszenz mit der Fluoreszenz-basierten Messung des pH. Der pH wurde auf 6,5 geregelt (statt 6,7), ein Wert, der zentraler im Messbereich liegt und weniger stark von der Drift der pH-Sensoren betroffen ist. Leider ist jedoch die enzymatische Freisetzung stark vom pH abhängig. Zwar ist eine Hochzelldichtekultivierung im Milliliter-Maßstab möglich, für eine besseren Reproduzierbarkeit wurden aber geringere Zelldichten untersucht.

5.2.2 Abhängigkeit der Expression von der Zulaufstrategie

Die Expression von zwei verschiedenen Proteinen wurde mit zwei verschiedenen Zulaufstrategien untersucht. Neben der Expression des Spinnenseidenproteins C16 wurde auch das häufig eingesetzte Reporter- und Modellprotein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Verglichen mit den Kultivierungen in Abschnitt 5.2.1 wurden geringere Zelldichten eingesetzt. Da in der Satzphase kein Unterschied zwischen Zulaufstrategien erkannt werden konnte, wurde die Glucose im Satzmedium auf 2 g L^{-1} verringert, der exponentielle Zulauf gleich nach der Inokulation mit $7,3 \mu\text{L h}^{-1}$ gestartet und bis $108,6 \mu\text{L h}^{-1}$ erhöht (beziehungsweise $0,4 - 5,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bezogen auf das Startvolumen).

Bei der Expression von C16 in Abbildung 5.5 wurden höhere optische Dichten mit der enzymatischen Freisetzung gemessen als mit dem intermittierenden Zulauf. Der Unterschied der OD_{600} war mit 7,2–14,6 % ähnlich wie in Abbildung 5.3. Wiederum war aber die BTM fast gleich zum Prozessende: $27,4 \pm 2,1 \text{ g L}^{-1}$ für den intermittierenden Zulauf und $28,1 \pm 2,2 \text{ g L}^{-1}$ für die enzymatische Freisetzung. Der Unterschied von 2,7 % ist nicht signifikant (einseitiger t-Test, $p = 0,252$).

Die Expression von C16 (Abbildung 5.5) war bei enzymatischer Freisetzung ebenfalls höher als beim intermittierenden Zulauf nach 32 h (13,5 %, signifikant, $p < 0,01$), aber nur geringfügig höher nach 42 h Prozesszeit (7,5 %, nicht signifikant, $p = 0,172$). Da im Vergleich zum Referenzprozess geringere optische Dichten verwendet wurden, ist auch der zellspezifische C16-Proteingehalt $Y_{P/OD}$ in Abbildung 5.5 B gezeigt. Für beide Zulaufstrategien wurden vergleichbare $Y_{P/OD}$ -Werte nach 32 und 42 h erreicht (keine signifikanten Unterschiede von 4,3 % und -5,8%, $p = 0,173$ und $p = 0,181$). Die zellspezifischen Konzentrationen können auch als $Y_{P/X}$, bezogen auf die BTM, beschrieben werden. Die BTM konnte wegen des geringen Kultivierungsvolumens leider nur einmalig zum Prozessende bestimmt werden. Die $Y_{P/X}$ -Werte waren ebenfalls sehr ähnlich für beide Ansätze (Unterschied von 7,5 %, Daten nicht gezeigt).

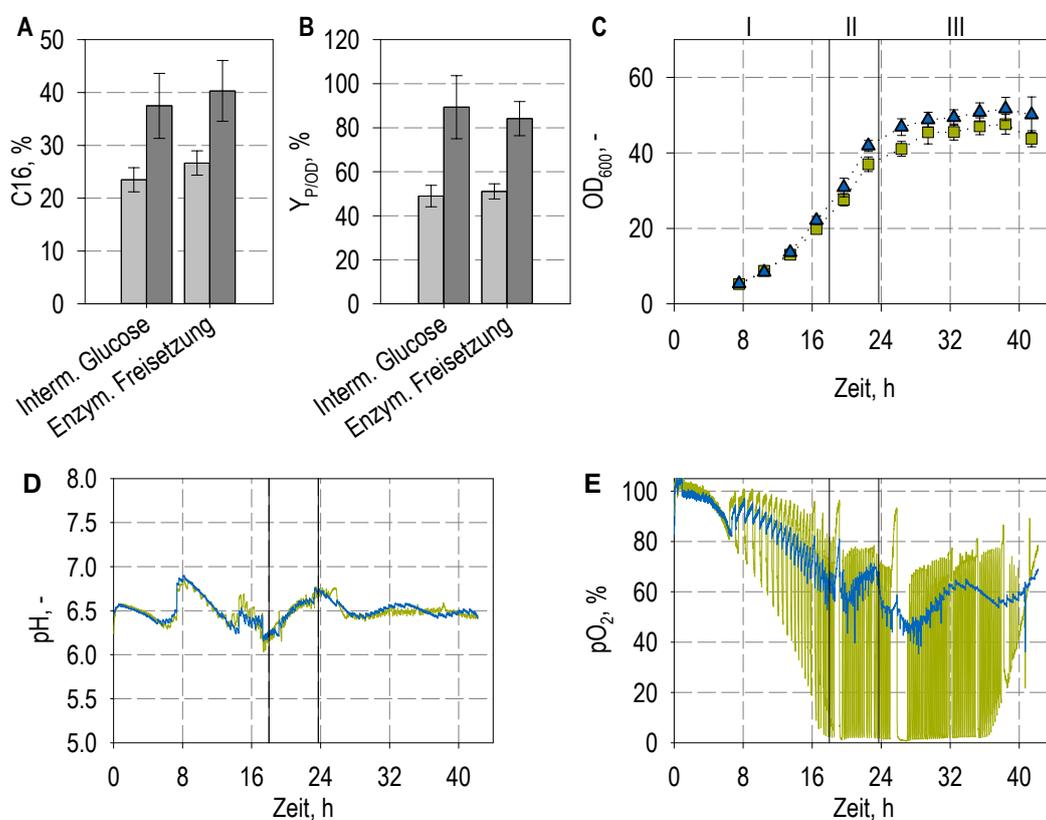


Abbildung 5.5: Expression des Spinnenseidenproteins C16 mit zwei verschiedenen Zulaufstrategien in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab: Intermittierender Glucosezulauf (■) und ein enzymatisches Freisetzungssystem (▲). Die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifischen C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) wurden bei der Prozesszeit von 32 h (hellgrau) und 42 h (dunkelgrau) gemessen. Zudem sind die mittleren optischen Dichten für beide Zulaufstrategien (OD_{600} , C) sowie der pH (D) und der Sauerstoffpartialdruck pO_2 (E) für einen Reaktor mit intermittierendem Zulauf (hellgrün) und einen Reaktor mit enzymatischer Freisetzung (blau) dargestellt. Die Kultivierung erfolgte mit einer exponentiellen (I) und konstanten Zulaufphase (II), gefolgt von der Produktionsphase (III). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 7–9 parallelen Kultivierungen.

Aufgrund der im Vergleich zu den Kultivierung in Abbildung 5.3 geringeren maximalen Zulauftrate ($108,6 \mu\text{L h}^{-1}$ beziehungsweise $5,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und des höheren minimalen Zugabevolumens ($25 \mu\text{L}$) betrug die Zugabefrequenz nur $4,1 \text{ h}^{-1}$ in der konstanten Phase

in beiden Kultivierungsläufen in Abbildung 5.5 und 5.6. Dadurch verringerte sich auch der Einfluss von konkurrierenden Operationen des Pipettierroboters. Bei 18,5 h und 25 h wurde der Pipettierroboter für manuelle pH-Messungen pausiert, was an dem pO_2 -Signal zu erkennen ist (Abbildung 5.5 E). In der konstanten Zulaufphase (II) und Expressionsphase (III) fiel der pO_2 nach jeder Zugabe auf kritische Werte, wohingegen die Werte der Ansätze mit enzymatischer Freisetzung deutlich stabiler waren. Die enzymatische Freisetzung kam damit einer kontinuierlichen Substratversorgung sehr nahe. Dennoch veränderten sich die pO_2 -Werte im Verlauf der Kultivierung. Bereits geringe Änderungen des pH (Abbildung 5.5 D) wirken sich stark auf die Invertase-Aktivität und damit die Substratfreisetzung und den Stoffwechsel aus.

In sehr ähnlichen parallelen Kultivierungen wurde die Expression von eGFP ebenfalls mit zwei Zulaufstrategien untersucht (Abbildung 5.6). Die enzymatische Freisetzung ermöglichte hier eine deutlich bessere Proteinproduktion verglichen mit dem intermittierenden Zulauf. Die eGFP-Konzentration, die mit dem intermittierenden Zulauf nach 36 h erzielt wurde, lag bei $1,5 \text{ g L}^{-1}$ und wurde hier zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 % normiert. Die eGFP-Konzentration war mit der enzymatischen Freisetzung nach 33 h um 33 % höher und nach 36 h um 37 % höher ($p < 0,001$ und $p = 0,002$ für 33 und 36 h).

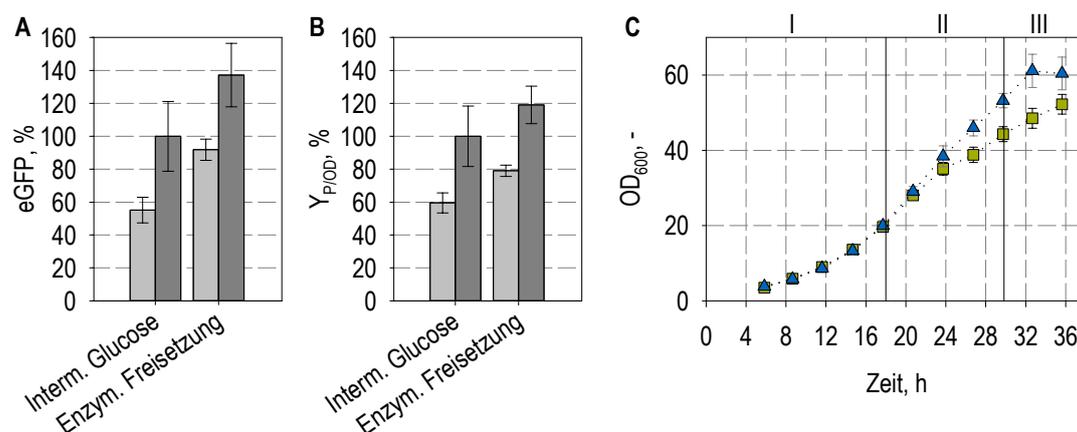


Abbildung 5.6: Expression des *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) mit zwei verschiedenen Zulaufstrategien in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab: Intermittierender Glucosezulauf (\square) und ein enzymatisches Freisetzungssystem (\blacktriangle). Die eGFP-Konzentrationen (A) und der zellspezifische eGFP-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) wurden bei der Prozesszeit von 33 h (hellgrau) und 36 h (dunkelgrau) gemessen. Zudem sind mittlere optische Dichten für beide Zulaufstrategien im Prozessverlauf gezeigt (OD_{600} , C). Die Kultivierung erfolgte mit einer exponentiellen (I) und konstanten Zulaufphase (II), gefolgt von der Produktionsphase (III). Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 7–8 parallelen Kultivierungen.

Da auch hier die optischen Dichten für die enzymatische Freisetzung höher waren (Abbildung 5.6 C), sollen die $Y_{P/OD}$ -Werte betrachtet werden (Abbildung 5.6 B). Die $Y_{P/OD}$ -Werte unterscheiden sich um 33 % nach 33 h und 19 % nach 36 h ($p < 0,001$ und $p = 0,017$ für 33 und 36 h). Ein signifikanter Unterschied konnte auch in weiteren parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab reproduziert werden.

Diskussion

Der Einfluss der Zulaufstrategie auf das Wachstum war in beiden Expressionsversuchen in Abbildung 5.5 und 5.6 vergleichbar zu den Ergebnissen in Abschnitt 5.2.1. Trotz kritischer pO_2 -Werte war fast kein Unterschied in der Produktion von C16 zwischen den beiden Zulaufstrategien intermittierender Zulauf und enzymatische Freisetzung messbar. Im Gegensatz dazu konnte die eGFP-Expression durch Einsatz der enzymatischen Freisetzung deutlich verbessert werden.

Zudem wurden zwei Kultivierungen im Liter-Maßstab durchgeführt (Daten nicht gezeigt), bei denen ein intermittierender und ein nicht-intermittierender Zulauf jeweils mit Glucose realisiert wurde. Da sich auch hierbei eine bessere eGFP-Expression mit dem nicht-intermittierendem Zulauf zeigte, kann ausgeschlossen werden, dass der Effekt im Milliliter-Maßstab auf das Substrat (Saccharose statt Glucose) zurückzuführen ist.

Mehrere Unterschiede zwischen C16 und eGFP könnten für diese Beobachtungen verantwortlich sein. Es wurde dasselbe T7-Expressionssystem, aber unterschiedliche Stämme verwendet: *E. coli* BL21(DE3) für eGFP und *E. coli* HMS174(DE3) für C16. Außerdem ist eGFP ein lösliches, leicht faltbares Protein und scheint grundsätzlich keine große metabolisch Last für den Expressionswirt zu sein (Tsien, 1998; Albano et al., 1996). C16 ist hingegen nahezu unlöslich, neigt zur Selbstassemblierung in β -Faltblatt-reiche Nanofibrillen und bildet Einschlusskörperchen bei der Expression in *E. coli* (Huemmerich et al., 2004a; Slotta et al., 2007; Humenik et al., 2014).

Die Bildung des eGFP-Chromophors ist eine autokatalytische Cyclisierung, die keine Cofaktoren, jedoch Sauerstoff benötigt (Zimmer, 2002; Drepper et al., 2007). In aeroben Kultivierungen kann die eGFP-Expression *in vivo* detektiert werden (Albano et al., 1996), aber Sauerstofflimitierungen könnten einen schädlichen Einfluss auf die korrekte Faltung haben. Die eGFP-Konzentration wurde hier über die Fluoreszenz bestimmt und erfordert daher ein intaktes Chromophor. Die C16-Konzentration wurde hingegen mit einer Größenausschlusschromatographie bestimmt und ist unabhängig von der Proteinfaltung.

Der intermittierende Zulauf kann einem kontinuierlichen Zulauf im Produktionsmaßstab ähneln (Brognaux et al., 2012), da Substratinhomogenitäten einer der wichtigsten Störquellen während der Skalierung in den Produktionsmaßstab sind. Die relativ niedrige Zugabefrequenz von $4,1 \text{ h}^{-1}$ in den Kultivierungen in Abbildung 5.5 und 5.6 führte zu kritischen Sauerstoffkonzentrationen ($< 10 - 15 \% pO_2$) für 3–5 min nach jeder Zugabe. Die Mischzeiten in großen Bioreaktoren für mikrobielle Kultivierungen (12 m^3) werden mit 10–50 s angegeben, in noch größeren Reaktoren (30 m^3) mit bis zu 4 min (Lara und Galindo, 2006) beziehungsweise 2–5 min in Produktionsreaktoren (Sahm et al., 2013). Daher deuten die Ergebnisse aus diesem Abschnitt darauf hin, dass die Expression von eGFP bei einer Skalierung in den Produktionsmaßstab kritischer wäre als die Expression von C16. Hsu und Wu (2002) verfolgten einen ähnlichen Ansatz zur Maßstabsübertragung. Zuerst wird überprüft, ob eine Zustandsgröße (in ihrem Beispiel der pH) einen Einfluss auf die Kultivierung hat. Falls ja, wird im zweiten Schritt überprüft, ob pulsartige Veränderungen oder periodische Schwankungen dieser Zustandsgröße (zum Beispiel durch Zugabe von Titrationsmitteln) einen Effekt auf die Kultivierungen haben. Falls nicht, sollte diese Zustandsgröße bei der Maßstabsübertragung nicht kritisch sein.

Für eine bessere Reproduzierbarkeit wurden im Gegensatz zum Referenzprozess im Milliliter-Maßstab geringere Zelldichten eingesetzt. Der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/OD}$ (Abbildung 5.5 B) war mit 89 ± 14 % jedoch nahezu vergleichbar mit dem Referenzprozess. Daher war die Skalierbarkeit des Herstellungsprozesses in den Milliliter-Maßstab ausreichend gegeben. Insgesamt lässt sich zudem festhalten, dass die Zulaufstrategie einen signifikanten Einfluss auf Wachstum und Expression haben kann, dies jedoch von dem untersuchten Protein oder Stamm abhängig ist. Im Fall von C16 sind anscheinend beide Zulaufstrategien anwendbar. Damit sollten Ergebnisse aus dem Milliliter-Maßstab, die in Kultivierungen mit intermittierendem Zulauf gewonnen wurden, auf Zulaufkultivierungen im größeren Maßstäben übertragbar sein.

5.3 Satzkultivierung mit Autoinduktionsmedien

Eine Alternative zu einem Kultivierungsprozess mit intermittierendem Glucosezulauf wäre ein Satzverfahren mit einem Autoinduktionsmedium. Das Prinzip des Autoinduktionsmediums ist in Abschnitt 3.3.6 dargelegt. In Abbildung 5.7 sind parallele Kultivierungen im Milliliter-Maßstab zum einen mit intermittierendem Glucosezulauf und zum anderen mit zwei leicht unterschiedlichen Autoinduktionsmedien gezeigt.

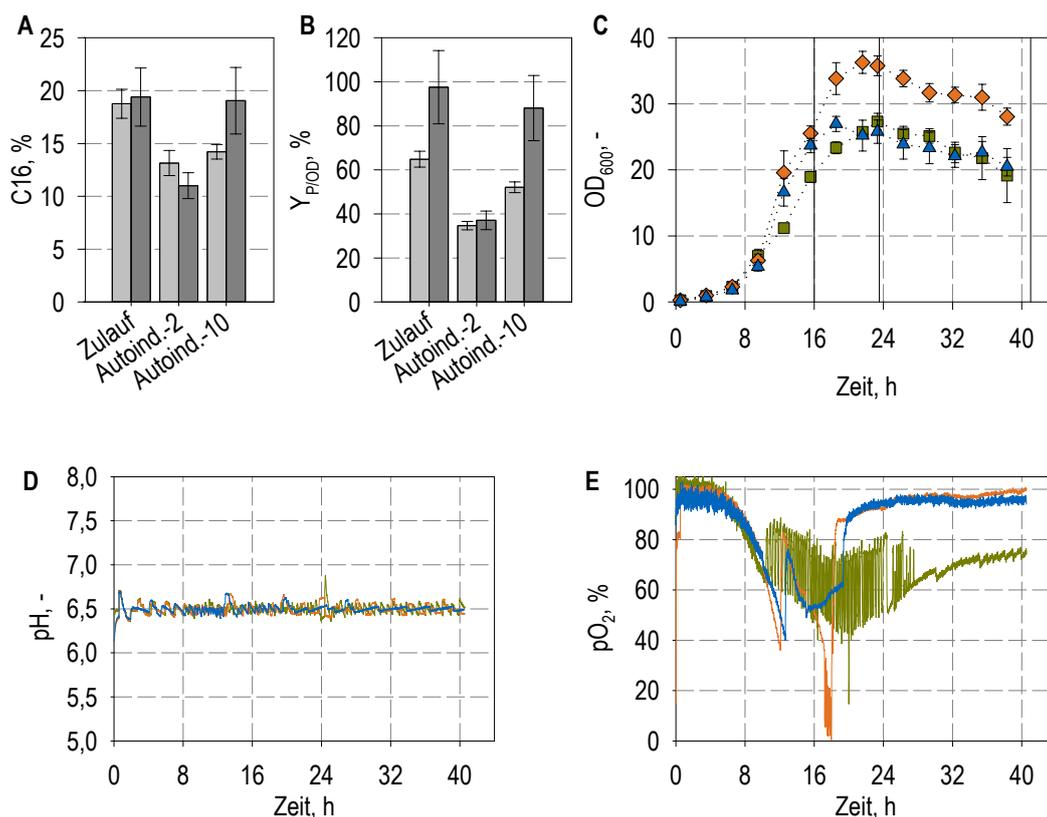


Abbildung 5.7: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab im Zulaufprozess (Zulauf, ■) und in Autoinduktionsmedien mit 2 g L^{-1} Lactose (Autoind.-2, ◆) und 10 g L^{-1} Lactose (Autoind.-10, ▲). Die vertikalen Striche markieren die Induktion der Zulaufkultivierungen nach 16 h sowie die Probenzeitpunkte. Die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) wurden bei der Prozesszeit von 23,8 h (hellgrau) und 41,1 h (dunkelgrau) gemessen. Zudem sind die mittleren optischen Dichten im Prozessverlauf (OD_{600} , C) sowie der pH (D) und Sauerstoffpartialdruck (E) für jeweils einen Reaktor mit Zulaufprozess (grün) sowie Autoinduktionsmedium mit 2 g L^{-1} Lactose (orange) und 10 g L^{-1} Lactose (blau) gezeigt. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von jeweils 5 parallelen Kultivierungen.

Für die Referenz-Zulaufkultivierung wurden wie in den Kultivierungen in Abbildung 5.5 2 g L^{-1} Glucose im Satzmedium vorgelegt und der exponentielle Zulauf direkt nach der Inokulation gestartet, mit $\mu_{set} = 0,15\text{ h}^{-1}$ und einer maximalen Zulauftrate nach 16 h von $80\text{ }\mu\text{L h}^{-1}$ beziehungsweise $4\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ bezogen auf das Startvolumen. Nach 16 h erfolgte die Induktion mit $1,52\text{ nIPTG}$ und die konstante Zulauftrate von $4\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ wurde beibehalten.

Die Glucosekonzentration beider Autoinduktionsmedien lag mit 25 g L^{-1} so hoch, dass

alle Ansätze bis zum Induktionszeitpunkt die gleiche Menge an Substrat zur Verfügung hatten. Das Autoinduktionsmedium mit 2 g L^{-1} Lactose enthielt 26 g L^{-1} Glycerol. Im zweiten Autoinduktionsmedium waren dagegen 10 g L^{-1} Lactose und 18 g L^{-1} Glycerol enthalten. Beide Medien enthielten demnach eine Gesamtsubstratkonzentration von 53 g L^{-1} . Im Zulaufprozess wurde bei einer Zulauftrate von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ diese Substratmenge sieben Stunden nach Induktion und bei einer Gesamtprozesszeit von etwa 23 h erreicht.

Im Referenzprozess wurde die Temperatur während der Produktionsphase auf 30°C verringert. Da beim Autoinduktionsmedium die Induktion nicht manuell erfolgt und die Temperatur nicht zeitlich genau verändert werden kann, wurde die Temperatur während des ganzen Kultivierungsprozesses auf 30°C eingestellt. Der pH wurde auf 6,5 geregelt (Abbildung 5.7 D).

Das Autoinduktionsmedium mit 2 g L^{-1} Lactose führte zu geringeren C16-Konzentrationen und $Y_{\text{P/OD}}$ als der Zulaufprozess (Abbildung 5.7 A+B). Dagegen waren die optischen Dichten in diesem Autoinduktionsmedium höher (Abbildung 5.7 C). Abgesehen von dem schnelleren Wachstum verliefen die optischen Dichten des zweiten Autoinduktionsmediums mit 10 g L^{-1} sehr ähnlich zur Zulaufkultivierung. Die Expression war nach dem ersten Probezeitpunkt zwar geringer, zum Ende aber vergleichbar mit dem Zulaufprozess.

Bei den beiden Ansätzen mit Autoinduktionsmedien lässt sich der Start der Produktion anhand der pO_2 -Verläufe abschätzen (Anstieg nach Verbrauch der Glucose) und liegt bei den parallelen Ansätzen zwischen 12,5 und 13,5 h (exemplarische pO_2 -Verläufe in Abbildung 5.7 E). Die Dauer der Wachstumsphase variiert im Gegensatz zum definiertem Zulauf wie zu erwarten. Zum Zeitpunkt der Probenahmen für die C16-Bestimmung lief die Expression bei den Autoinduktionsmedien entsprechend etwa 3 h länger. Allerdings war Glycerol nur etwa für 5,5–6,0 h Expression verfügbar, was anhand der steigenden pO_2 -Signale nach 18–19,5 h zu erkennen ist.

Ausgehend vom pO_2 war das Glycerol bei der ersten Probenahme bereits aufgebraucht. Dennoch stieg die C16-Konzentration beim Autoinduktionsmedium mit 10 g L^{-1} von $14 \pm 1 \%$ auf $19 \pm 3 \%$ zwischen der ersten und zweiten Messung an. Die Expression mit dem zweiten Autoinduktionsmedium wurde auch im Liter-Maßstab reproduziert, wenngleich mit etwas geringerer Produktkonzentration (17 %).

Diskussion

Die von Studier (2005) entwickelten Autoinduktionsmedien enthalten neben $0,5\text{--}5 \text{ g L}^{-1}$ Glucose und 5 g L^{-1} Glycerol nur 2 g L^{-1} Lactose. Die Medien sind jedoch für die Expression in Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten mit sehr geringen Zelldichten ausgelegt. Durch den höheren Sauerstoffeintrag in den Rührkesselreaktoren im Bioreaktorblock konnten erfolgreich Autoinduktionsmedien mit deutlich höheren Substratkonzentrationen eingesetzt werden.

Es zeigte sich, dass in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab auch eine Erhöhung des Induktors Lactose notwendig wird, da mit 2 g L^{-1} Lactose eine schwächere Expression erzielt wurde im Vergleich zum IPTG induziertem Zulaufprozess mit ähnlich hohen

Zelldichten. Mit 10 g L^{-1} Lactose wurden mit dem Autoinduktionsmedium im Milliliter- und auch Liter-Maßstab vergleichbare (zellspezifische) Proteinkonzentrationen erreicht. Somit sind die Autoinduktionsmedien für die Expression von C16 grundsätzlich anwendbar. In der Literatur werden mit Autoinduktionsmedien ebenfalls vergleichbare Expressionsleistungen für andere Proteine erzielt (Tyler et al., 2005). Zudem wurden in den Zulaufkultivierung in Abbildung 5.7 im Gegensatz zum Referenzprozess und zu den Kultivierung in Abbildung 5.5 geringere Zelldichten eingesetzt. Der zellspezifische C16-Protingehalt $Y_{P/OD}$ (Abbildung 5.7 B) war jedoch mit $98 \pm 17 \%$ vergleichbar mit dem Referenzprozess und damit die Zulaufkultivierung mit intermittierendem Zulauf skalierbar.

Laut Studier (2005) ist bei einer niedrigeren Begasung weniger Lactose erforderlich ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) als bei einer hohen Begasung (mindesten $0,5 \text{ g L}^{-1}$ für eine gute Induktion). Dies könnte neben den höheren Biomassekonzentrationen ein Grund sein, warum im Bioreaktorblock noch höhere Lactosekonzentrationen vorzuziehen sind.

Autoinduktionsmedien ermöglichen ein vergleichsweise einfaches Satzverfahren. Der größte Vorteil liegt in der Anwendung von Autoinduktionsmedien in Mikrotiterplatten oder Schüttelkolbenversuchen, die über Nacht laufen und bei denen weniger der Prozessverlauf oder die Prozesssteuerung, sondern vor allem die Endproteinkonzentration von Interesse ist. Außerdem wurden Autoinduktionsmedien erfolgreich für Markierungsexperimente eingesetzt (Tyler et al., 2005).

Viele Aspekte eines Hochzelldichte-Expressionsprozesses können mit Autoinduktionsmedien nicht oder nicht zufriedenstellend untersucht werden. Die Substratmengen, Zelldichten und die Dauer der Wachstums- beziehungsweise Produktionsphasen sind nicht getrennt voneinander zu betrachten. Der Induktionszeitpunkt ist über die Glucosemenge festgelegt und bei gleichen Zelldichten nicht variierbar.

Es lassen sich keine unterschiedlichen Wachstumsraten oder verschiedene Wachstumsphasen betrachten, da die Wachstumsphase nur aus dem unlimitierten Wachstum auf Glucose besteht. Dadurch können im Vergleich zu Hochzelldichtekultivierungen nur relativ geringe Zelldichten realisiert werden. Außerdem lassen sich auch das Ende des Satzwachstums und der Beginn der Expression im Vergleich zu einem Zulaufprozess weniger genau vorhersagen. Die Dauer der Expression lässt sich auch nicht beliebig verändern oder verlängern, da das komplette Substrat hierfür vorgelegt werden muss. Eine Substratlimitierung während der Expression ist genauso wenig möglich wie während des Wachstums.

Hinzu kommt, dass nach dem Stand des Wissens zu Beginn der Arbeit nur Lactose als Induktor möglich war. IPTG ist für Autoinduktionsmedien nicht geeignet, weil es ohne spezifischen Transporter in die Zelle eindringt und die Expression induziert (Studier, 2014). Schließlich können die Selektion von Stämmen und reaktionstechnische Optimierungen in Satzverfahren andere Ergebnisse liefern als in Zulaufverfahren (Jeude und Dittrich, 2006; Wilming et al., 2014; Scheidle et al., 2010).

5.4 Einfluss des Leistungs- und Sauerstoffeintrags

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 dargestellt, gibt es für den Transfer vom Labor- in den Produktionsmaßstab unterschiedliche Auslegungskriterien, die einzeln oder in Kombination konstant gehalten werden können, wie Leistungseintrag, Sauerstofftransfer, Rührerspitzen geschwindigkeit oder Belüftung. Hier sollte zunächst untersucht werden, welche physikalischen Gegebenheiten die für den Prozess maßgebliche Größen sind und somit berücksichtigt werden müssen.

Leistungseintrag im Liter-Maßstab

Der Leistungseintrag hängt vom Drehmoment und der Rührerdrehzahl ab (vgl. Gleichung 4.1). Um den Einfluss des Leistungseintrags zu untersuchen, wurden vier parallele Kultivierungen mit niedrigen Zelldichten und unterschiedlichen Rührerdrehzahlen im Liter-Maßstab durchgeführt (Abbildung 5.8). Alle anderen Kultivierungsparameter waren identisch in den vier Reaktoren. Der untersuchte Drehzahlbereich lag bei 400–1000 U min⁻¹. Da im verwendeten Vierfach-Parallelsystem das Drehmoment der Rührwelle aufgezeichnet wird, lässt sich der volumetrische Leistungseintrag berechnen. Dieser lag bei 4,8–15,3 WL⁻¹.

Im Reaktor mit 400 U min⁻¹ trat eine Sauerstofflimitierung bereits in der Wachstumsphase etwa 6 h nach Inokulation ein (Abbildung 5.8 E) und spiegelt sich in einer geringen CO₂-Bildung im Abgas sowie einer geringen BTM wieder (7,2 g L⁻¹). Die Biotrockenmassekonzentrationen, der Stoffwechsel und die Produktkonzentration liegen deutlich unter den anderen Reaktoren (Abbildung 5.8 A, B, D). Die BTM dieses Reaktors ist zum Zeitpunkt der Induktion weniger als halb so hoch wie die der anderen Reaktoren und die C16-Konzentration am Ende bis zu sieben mal geringer.

Im zweiten Reaktor wurde die Drehzahl von anfangs 600 auf 700 U min⁻¹ erhöht, um eine Sauerstofflimitierung während des Wachstums zu vermeiden. Hier trat eine anhaltende Sauerstofflimitierung erst während der Produktion ein. In den ersten 1,5 h nach Induktion verstopfte der Abluftfilter des Reaktors mit 1000 U min⁻¹ und zwischen Stunde 3 und 6 der Abluftfilter des Reaktors mit 800 U min⁻¹, was jeweils zu einem Anstieg des Drucks und somit zu einem Anstieg des pO₂ führte. Nach dem Wechsel des Abluftfilters sank der pO₂ jeweils wieder.

Bei den Reaktoren mit 800 und 1000 U min⁻¹ trat keine Sauerstofflimitierung auf. Die Expression ist in diesen beiden Reaktoren nahezu gleich. Die unterschiedlich hohen pO₂ belegen den unterschiedlichen Sauerstoffeintrag (Abbildung 5.8 E), während die nahezu identischen Verläufe des CO₂ im Abgas auf die gleiche Stoffwechselaktivität hinweisen (Abbildung 5.8 D).

Außer im Reaktor mit 400 U min⁻¹ steigt der pO₂ in allen anderen Kultivierungen während der Produktionsphase, wohingegen der CO₂ sinkt. Der Stoffwechsel wird durch die Expression deutlich gebremst. Besonders deutlich ist dies beim sauerstofflimitierten Reaktor mit 700 U min⁻¹. Hier stoppt auch die Expression nach 8 h komplett.

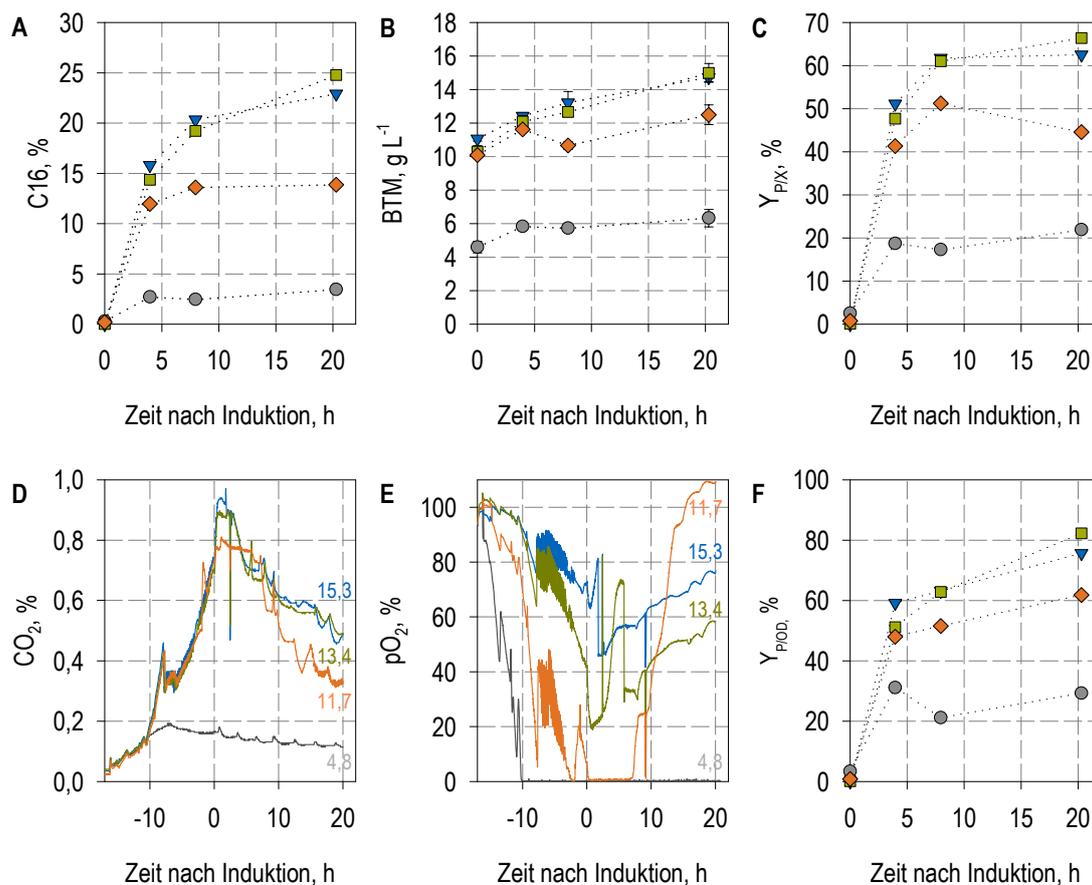


Abbildung 5.8: Vier parallele Kultivierung im Liter-Maßstab zur Expression von C16 mit verschiedenen Rührerdrehzahlen beziehungsweise Leistungseinträgen: 400 U min^{-1} ($4,8 \text{ WL}^{-1}$, ●), $600\text{--}700 \text{ U min}^{-1}$ ($11,7 \text{ WL}^{-1}$, ◆), 800 U min^{-1} ($13,4 \text{ WL}^{-1}$, ■), 1000 U min^{-1} ($15,3 \text{ WL}^{-1}$, ▼). Dargestellt sind im zeitlichen Verlauf ab Induktion die C16-Konzentrationen (A), Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, B), sowie der zellspezifische C16-Gehalt bezogen auf die Biotrockenmasse ($Y_{P/X}$, C) und bezogen auf die optische Dichte ($Y_{P/OD}$, F). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Zudem sind die *online*-Daten für die Messung von CO_2 im Abgas (D) und des Sauerstoffpartialdrucks $p\text{O}_2$ (E) im Medium gezeigt.

Sauerstoffeintrag im Milliliter-Maßstab

Unterschiedlicher Sauerstoffeintrag wurde im Milliliter-Maßstab durch Einsatz verschiedener Volumina erreicht (Abbildung 5.9). Der Zulauf wurde zwar dem Volumen angepasst, jedoch wurde beispielsweise die Verdunstung nicht volumenbezogen untersucht und der Volumenausgleich somit für alle Volumina gleich belassen. Durch Messung des Gewichtes am Ende der Kultivierung kann das Volumen geschätzt und damit die Konzentrationen und optischen Dichten korrigiert werden.

Für 8–12 mL waren die C16-Konzentrationen gleich und die optischen Dichten unterschieden sich nur sehr geringfügig für alle Volumina (Abbildung 5.9). Bezogen auf die optischen Dichten lagen die C16-Konzentrationen ebenfalls etwa gleich hoch für 8–12 mL (Daten nicht gezeigt). Bei 14 mL kam es im Gegensatz zu den geringeren Volumina zu Sauerstofflimitierungen (Abbildung 5.9 C). Dies wirkte sich nur gering auf die optische Dichte, aber deutlich auf die Proteinproduktion aus.

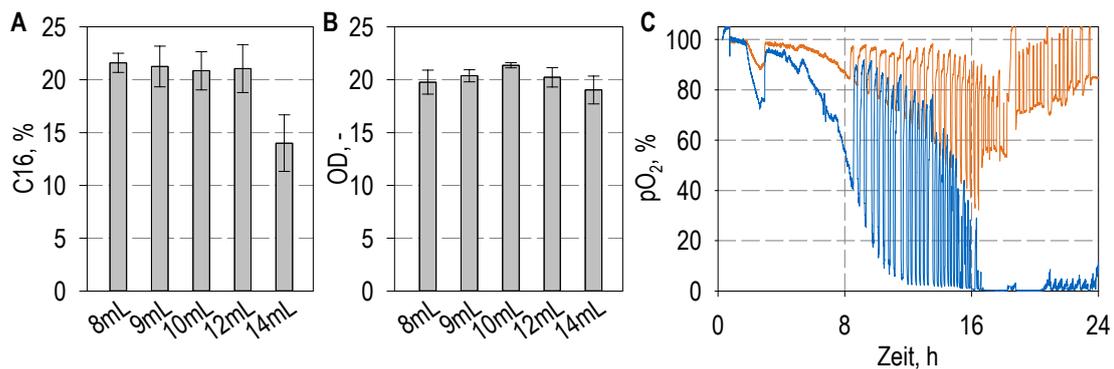


Abbildung 5.9: Expression von C16 mit verschiedenen Volumina im Milliliter-Maßstab. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und die optischen Dichten (B) nach 8 h Expressionszeit sowie die zeitlichen Verläufe des pO₂ (C) von einem Reaktor mit 8 mL (orange) und einem Reaktor mit 14 mL Volumen (blau). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus jeweils 5 parallelen Kultivierungen.

Diskussion

Bei ausreichender Sauerstoffversorgung hat der Leistungs- und Sauerstoffeintrag kaum Auswirkungen auf die Produktion von C16.

Der in den Kultivierungen in Abbildung 5.8 eingestellte Leistungseintrag von 4,8–15,3 W L⁻¹ entspricht den Leistungseinträgen, die in Rührkesselreaktoren des Labor- und Produktionsmaßstabs mit Scheibenblattrührern gemessen werden (Hortsch, 2011). Im Bioreaktorblock werden bei Rührerdrehzahlen von 2700–2800 min⁻¹ Leistungseinträge von 15–17 W L⁻¹ erreicht (Hortsch, 2011; Bendig, 2012), während im Liter-Maßstab diese Leistungseinträge nur bei Rührerdrehzahlen über 1300 min⁻¹ realisierbar sind. Der Gaseintrag im Liter-Maßstab erfolgte durch ein Begasungsrohr. Eine höhere Drehzahl führt zu besserer Dispergierung der Gasblasen. Die Phasengrenzfläche und die Verweilzeit der Blasen in der Flüssigkeit wird erhöht, was zu einem verbesserten Sauerstofftransfer führt. Zwar können hohe Leistungseinträge das Zellvolumen und gleichzeitig auch den Na- und K-Gehalt in den Zellen erhöhen (Wase und Patel, 1985; Wase und Ratwatte, 1985), jedoch konnten Hewitt et al. (1998) in kontinuierlichen Kultivierungen von *E. coli* mit Rührerdrehzahlen von 400 bis 1200 U min⁻¹ (1–30 W L⁻¹) keine Veränderung in der Abgasanalytik, der optischen Dichte oder der Zellstruktur anhand von SEM und TEM-Aufnahmen messen. Einzig bei dem höchstem Leistungseintrag verloren die Zellen die äußerste Polysaccharid-Schicht.

Eine Sauerstofflimitierung verringerte die C16-Produktion deutlich, jedoch abhängig davon, wie stark die Limitierung ist. Bei der Kultivierung in Abbildung 5.8, in der die Sauerstofflimitierung erst zur Produktionsphase eintritt, ist die Proteinproduktion weniger als um den Faktor zwei reduziert im Vergleich zu den Kultivierungen mit ausreichender Sauerstoffversorgung. Eine stärkere Sauerstofflimitierung, die schon während des Wachstums auftritt, hat hingegen wie zu erwarten starke negative Auswirkungen auf das Wachstum und damit auch auf die Expression.

Im Milliliter-Maßstab wurden unterschiedliche Sauerstoffeintragsraten durch unterschiedliche Reaktionsvolumina erreicht. Die Abhängigkeit des Sauerstoffeintrags vom Re-

aktionsvolumen im Bioreaktorblock wurde bereits von Puskeiler und Weuster-Botz (2004) gezeigt. Der Sauerstoffeintrag hatte, wie im Liter-Maßstab, auch im Milliliter-Maßstab keinen Einfluss auf die C16-Proteinproduktion, solange eine Limitierung vermieden wurde. Ist der Sauerstoffeintrag zu gering, wirkt sich dies negativ auf die Proteinproduktion aus, während die Zelldichte nur wenig abweicht. Durch die Sauerstoffunterversorgung kommt es zur gemischten Säuregärung und Bildung von organischen Säuren wie Acetat und Lactat (Xu et al., 1999). Diese können wiederum negativ auf das Wachstum und die Proteinproduktion wirken.

Neben vielen anderen Faktoren kann auch die Antischaumkonzentration Einfluss auf den Sauerstoffeintrag haben (Morao und Maia, 1999). In parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab mit vier Antischaummittelkonzentrationen von $0,2 \text{ mL L}^{-1}$, 1 mL L^{-1} , 5 mL L^{-1} und 10 mL L^{-1} zeigte sich jedoch kein Einfluss auf das Wachstum oder die Proteinproduktion (Daten nicht gezeigt).

Für den Transfer des Prozesses in den Produktionsmaßstab und für den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Labormaßstäben müssen weder der Leistungseintrag noch der Sauerstoffeintrag genau konstant gehalten werden. Wichtiger für die Proteinproduktion ist die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff, um Sauerstofflimitierungen und Säuregärung zu vermeiden. Die gelöste Sauerstoffkonzentration sollte nicht auf 0 % Luftsättigung absinken. Bei großen Maßstäben und langen Durchmischungszeiten muss der minimale $p\text{O}_2$ daher höher gewählt werden als in kleinen Maßstäben oder noch besser an mehreren Stellen im Reaktor gemessen werden, wo eine niedrige Sauerstoffkonzentration erwartet wird. In Abschnitt 5.2 zeigte sich zudem, dass sich kurze vorübergehende Sauerstofflimitierungen nicht negativ auf die Expression auswirken, weswegen selbst lange Durchmischungszeiten in Produktionsreaktoren für die C16-Expression nicht sehr schädlich sein sollten.

5.5 Einfluss möglicher Nebenprodukte

Ist der Sauerstoffeintrag zu niedrig oder die Substratversorgung zu hoch, so bilden sich Nebenprodukte durch die gemischte Säuregärung oder den Überflussmetabolismus. Die Sauerstofflimitierung ist zudem negativ für die Proteinproduktion, wie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Daher wird nun der Frage nachgegangen, ob die während der gemischten Säuregärung gebildeten Metabolite eine Ursache für schlechtere Proteinproduktion bei Sauerstofflimitierung sind.

Produkte der gemischten Säuregärung

In Abschnitt 3.3.1 sind die typischen Produkte der gemischten Säuregärung und deren Mengenverhältnis beschrieben.

Hier wurde nun angenommen, dass 25 g L^{-1} beziehungsweise $0,139 \text{ mol L}^{-1}$ Glucose in gemischter Säuregärung verbraucht werden. Daraus sollten folgende Mengen an Metaboliten gebildet werden: $0,117 \text{ mol L}^{-1}$ Lactat, $0,061 \text{ mol L}^{-1}$ Acetat, $0,058 \text{ mol L}^{-1}$ Ethanol, $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ Succinat und $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ Formiat. Alle Säuren wurden bei parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab mit niedrigen Zelldichten entweder einzeln oder zusammen im Medium vorgelegt (Abbildung 5.10).

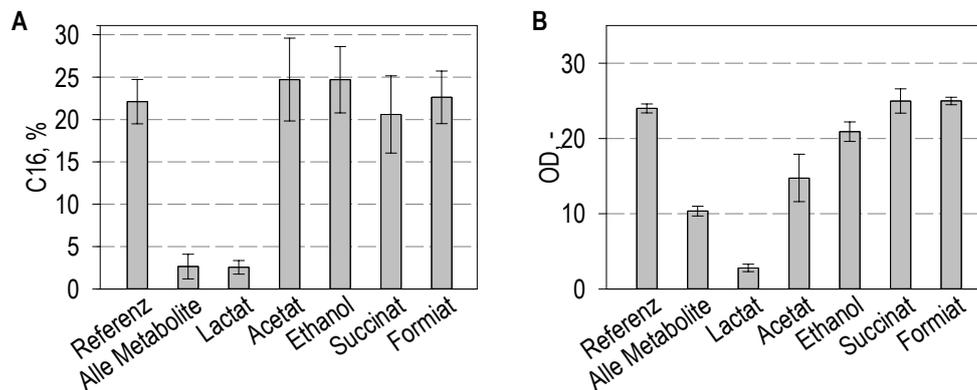


Abbildung 5.10: Expression von C16 mit Zusatz von Produkten der gemischten Säuregärung im Milliliter-Maßstab. Dargestellt sind C16-Konzentrationen (A) und die optischen Dichten (OD_{600} , B) nach 8 h Expressionszeit. Es wurden $0,117 \text{ mol L}^{-1}$ Lactat ($10,3 \text{ g L}^{-1}$), $0,061 \text{ mol L}^{-1}$ Acetat ($3,6 \text{ g L}^{-1}$), $0,058 \text{ mol L}^{-1}$ Ethanol, $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ Succinat, $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ Formiat im Medium vorgelegt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus jeweils 3 parallelen Kultivierungen.

Es zeigte sich, dass Succinat und Formiat den Zellen in den eingesetzten Konzentrationen nicht schaden. Ethanol verringerte zwar etwas die optische Dichte, aber nicht die Expression. Lactat hingegen verhinderte als Hauptprodukt der gemischten Säuregärung Wachstum und Produktion sehr effektiv. Lactat ist hier im Medium ausgefallen. Daher wurde von Beginn an eine OD_{600} von 3,9 im Ansatz mit Lactat und eine OD_{600} von 3,8 im Ansatz mit allen Metaboliten gemessen. Die optischen Dichten sind auf 2,8 gefallen beziehungsweise auf 10,3 (alle Metabolite) gestiegen. Bei Acetat ist ebenfalls ein deutlicher, wenn auch schwächerer negativer Effekt auf die optische Dichte zu beobachten. Allerdings sind die Zellen zu einer gleich guten Expression in der Lage wie ohne Acetat.

Lactat und Acetat

Nachdem Lactat und Acetat die stärksten Wirkungen auf das Wachstum gezeigt hatten, wurden diese Komponenten in zwei Konzentration zur Reproduktion und genaueren Untersuchung nochmals in parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab eingesetzt (Abbildung 5.11). Es wurden von beiden Säuren jeweils 2 g L^{-1} und 5 g L^{-1} von Anfang an dem Medium zugegeben. Damit war deutlich weniger Lactat enthalten als in den Kultivierungen in Abbildung 5.10. Ein weiterer Unterschied war, dass bei höheren Zelldichten mit nur $0,60\text{ nIPTG}$ induziert und eine längere Produktion nach 20 und 40 h gemessen wurde. Damit wurde im Milliliter-Maßstab eine C16-Konzentration von knapp 100 % und ein zellspezifischer C16-Gehalt von über 100 % erreicht.

Lactat wirkte sich bei beiden Konzentrationen negativ auf den Verlauf der optischen Dichten aus, stärker als Acetat. Nach 20 h Expression sind die OD_{600} in beiden Lactat-Ansätzen geringer, nach 40 h hingegen ähnlich hoch wie in den Kultivierungen ohne Zusätze.

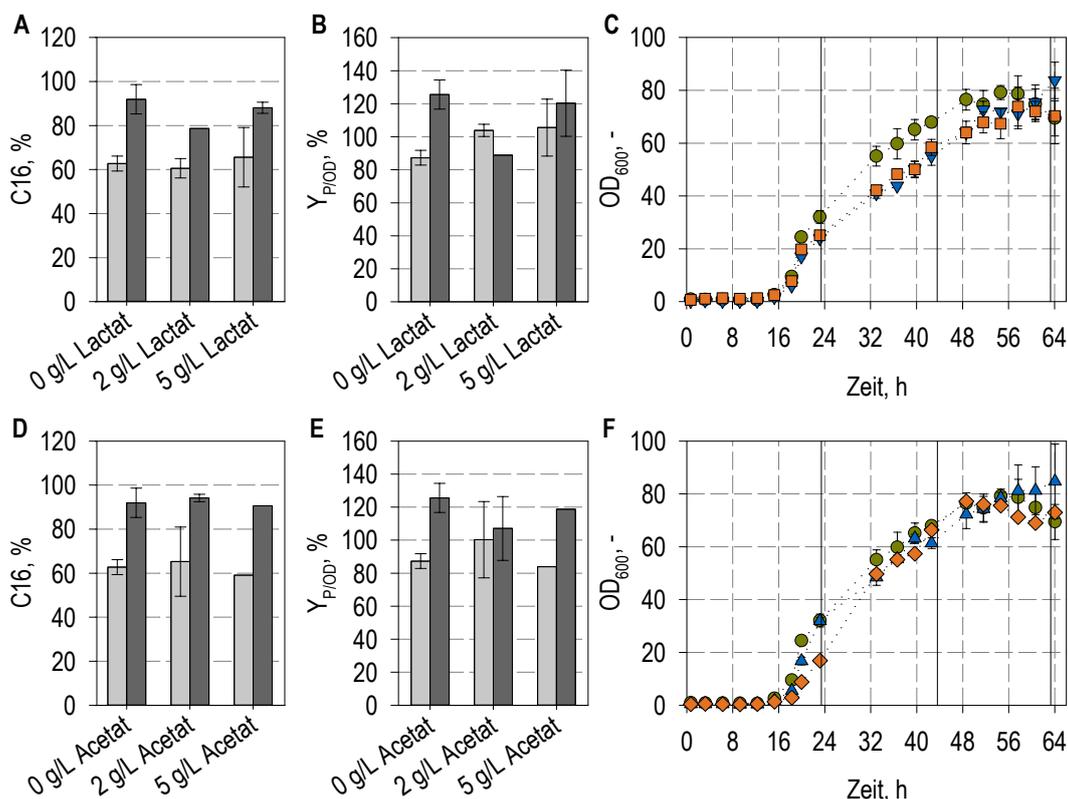


Abbildung 5.11: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab ohne Zusätze 0 g L^{-1} (●) oder mit Zusatz von 2 g L^{-1} (▼) und 5 g L^{-1} (■) Lactat beziehungsweise 2 g L^{-1} (▲) und 5 g L^{-1} (◆) Acetat im Medium. Dargestellt sind C16-Konzentrationen (A+D) und zellspezifischen C16-Konzentrationen ($Y_{P/OD}$, B+E) nach 43,6 h (hellgrau) und 63,3 h (dunkelgrau). In (C+F) sind die optischen Dichten (OD_{600}) im Prozessverlauf aufgetragen. Die vertikalen Striche in (C+F) markieren die Induktion ($0,60\text{ nIPTG}$) bei 23,4 h sowie die Probenentnahmen zur C16-Bestimmung. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus jeweils 3–6 parallelen Kultivierungen. Für den Ansatz mit 5 g L^{-1} Acetat sowie für den zweite Probenzeitpunkt von 2 g L^{-1} Lactat wurden nur zwei parallele Reaktoren ausgewertet.

Die geringere Acetatkonzentration (2 g L^{-1}) zeigte nur in der Wachstumsphase einen geringen negativen Effekt. Die 5 g L^{-1} Acetat hingegen beeinträchtigten das Wachstum deutlich länger. Nach etwa 40 h sind jedoch auch hier keine Unterschiede mehr auszumachen. Die Expression wurde durch Acetat bei beiden Konzentrationen nicht verringert.

Zum Ende des Prozesses wurde kein Acetat in den Reaktoren gemessen, in denen 2 g L^{-1} Acetat vorgelegt wurden. In den Reaktoren, in denen 5 g L^{-1} Acetat vorgelegt wurden, konnten zum Prozessende nur maximal $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gemessen werden. Auch Lactat wurde während der Kultivierung verstoffwechselt und es wurde nur maximal $0,2$ – $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Lactat am Ende gemessen. Außerdem kam es in diesem Versuch zum Prozessende zur vermehrten Ablösung der pH-Sensorfilme, was den Ausfall einzelner Reaktoren begründet.

Diskussion

Höhere Acetatkonzentrationen von über 5 g L^{-1} bei pH 7 verringert die Wachstumsrate, die Biomasseausbeute und die maximale Biomasse in Hochzelldichtekultivierungen sowie die Bildung von rekombinanten Proteinen (Lee, 1996). Bereits 2 – 8 g L^{-1} Acetat verringern die Wachstumsrate (Pan et al., 1987) und Jensen und Carlsen (1990) zeigten in Chemostat-Versuchen, dass $6,1 \text{ g L}^{-1}$ Acetat die optische Dichte stark beeinflusst und bereits $2,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat die Proteinexpression signifikant verringert. Jedoch trat hier kein signifikanter Effekt bei einer Zulaufkultivierung auf. Laut Roe et al. (2002) entsteht die Acetat-Inhibierung durch den Abbau beziehungsweise Mangel an intrazellulärem Methionin mit der einhergehenden Anreicherung des toxischen Zwischenproduktes Homocystein.

Acetat wird bei anaeroben und sauerstofflimitiertem Wachstum gebildet, sowie bei Glucoseüberschuss – wenn der Kohlenstofffluss im zentralen Metabolismus höher ist als der biosynthetische Bedarf und die Kapazität der Energieerzeugung (Holms, 1996; Lee, 1996). Acetat wird jedoch während einer Glucoselimitierung abgebaut (Luli und Strohl, 1990), was auch hier beobachtet wurde. Bei einer längeren glucoselimitierten Produktionsphase haben geringe Acetatkonzentrationen daher kaum negative Effekte auf die Proteinproduktion.

Lactat, das eine antimikrobielle Wirkung haben kann (Alakomi und Skyttä, 2000; Ibrahim et al., 2008), wirkt sich noch stärker auf das Wachstum aus und kann die Proteinproduktion verschlechtern. Eine Anreicherung von Lactat beispielsweise durch eine gemischte Säuregärung bei Sauerstoffmangel ist daher zu vermeiden. Bemerkenswerterweise scheint Lactat allein schädlicher für die Zellen zu sein als in Kombination mit den anderen Produkten der gemischten Säuregärung, da nur im letzteren Fall geringfügiges Wachstum stattfand. Geringe Konzentrationen von Lactat oder Acetat haben jedoch bei einer langen, glucoselimitierten Produktionsphase nur einen geringen bis keinen Effekt auf die Expression.

5.6 Verdünnung des Mediums zum Einsatz verringerter Zelldichten

Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 dargestellt, sind Hochzelldichtekultivierungen im Milliliter-Maßstab schwer robust genug darzustellen. Wird die Zelldichte für eine robustere Prozessführung um ein Vielfaches verringert, von $OD_{600} = 140-150$ im ursprünglichen Referenzprozess auf $OD_{600} = 15-20$ im Milliliter-Maßstab zum Induktionszeitpunkt, das Medium hingegen beibehalten, so stehen pro Zellmenge mehr Mediumbestandteile zur Verfügung. Limitierungen, die bei hohen Zelldichten auftreten könnten, blieben bei geringen Zelldichten unbemerkt.

Es wurde daher der Ansatz verfolgt, auch das Medium entsprechend zu verdünnen, das heißt die Salz- und Spurenelement- sowie die Magnesiumsulfatkonzentrationen. In parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab wurden neben einem unverdünnten Medium die Verdünnungsstufen $1/7$, $1/10$ und $1/14$ untersucht (Abbildung 5.12). Da eine Verdünnung der Medienbestandteile eine Verringerung der Pufferkapazität des Mediums zur Folge hat und infolge dessen eine verstärkte Oszillation des pH auftritt (dies konnte in zuvor durchgeführten Kultivierungen gezeigt werden, Daten nicht gezeigt), wurden die oben genannten Verdünnungen zusätzlich bei Zugabe von 50 mM und 200 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure) untersucht, um diesen Effekt zu vermeiden.

Abgesehen von den Ansätzen mit 200 mM MOPS wuchsen die Zellen in der Satzphase im verdünnten Medium langsamer als im unverdünnten Medium und erreichten nach 6 h eine geringere OD_{600} (Abbildung 5.12 B). Kurz vor der Induktion hatte die Verdünnung jedoch keinen Einfluss auf die optische Dichte (Abbildung 5.12 C). Hier zeigten jedoch die Ansätze mit 200 mM MOPS eine geringere OD_{600} im Vergleich zu 50 mM oder 0 mM (OD_{600} 16 statt 19). Die optischen Dichten während der Expression verhielten sich nochmals anders. Hier hat zwar auch die höchste MOPS-Konzentration einen negativen Effekt, wesentlicher ist jedoch die Verdünnung.

Die Produktkonzentrationen der $1/7$ -Verdünnung ohne MOPS sind sehr gut mit der Referenz vergleichbar. Erst bei stärkeren Verdünnungen ($1/10$ und $1/14$) sind verringerte Produktkonzentrationen und optische Dichten messbar. Eine Erhöhung der MOPS-Konzentration zeigt im unverdünnten Medium keinen Effekt. Dagegen scheint eine hohe MOPS-Konzentration bei verdünnten Medien negativ für die Expression zu sein.

Der Effekt von MOPS zur Stabilisierung der pH-Regelung ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Während bei normalem Medium die pH-Schwankungen unter 0,2 pH-Einheiten in dem dargestellten Abschnitt liegen, schwankt der pH bei dem $1/14$ verdünnten Medium zwischen 5,8 und 7,2. Wird derselben Mediumkonzentration 50 mM MOPS zugegeben, so verringern sich die Schwankungen fast auf das Niveau des unverdünnten Mediums.

Wie in Abbildung 5.13 zu sehen ist, zeigen sich deutliche Unterschiede der NH_3 -Zugabe zwischen MOPS-freien und MOPS-haltigen verdünnten Medien. Zwischen Medien mit 50 mM oder 200 mM MOPS ist die NH_3 -Zugabe hingegen fast gleich hoch.

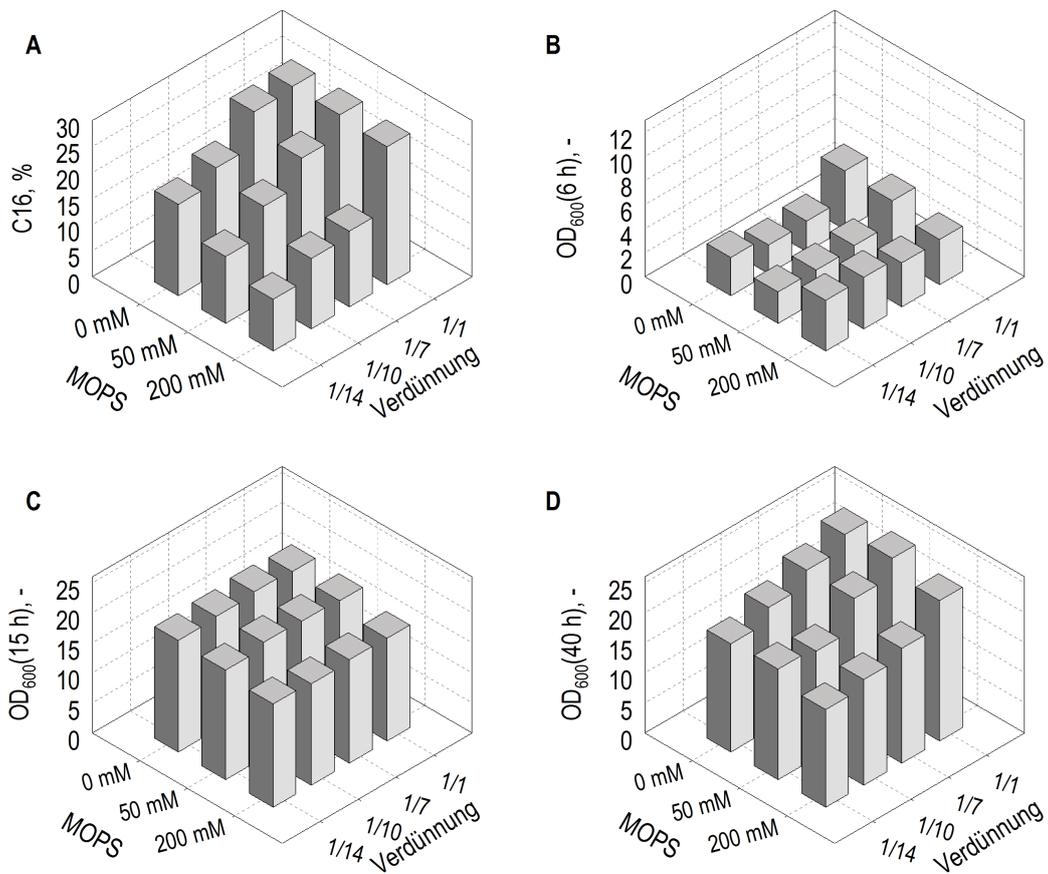


Abbildung 5.12: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab bei verschiedenen Mediumverdünnungen und MOPS-Konzentrationen. Dargestellt sind C16-Konzentrationen (A) und optische Dichten (OD₆₀₀) nach 6 h (Ende der Satzphase, B), nach 15 h (Induktion, C) und nach 40 h (24 h Expression, D).

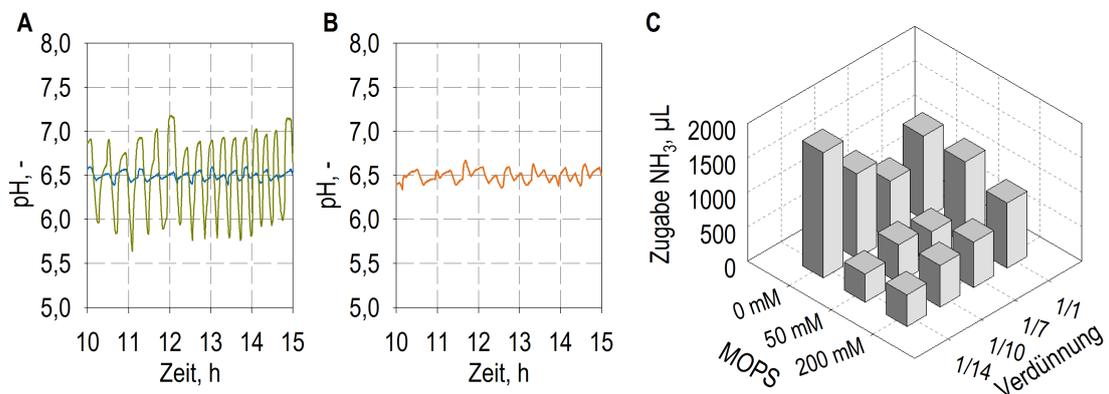


Abbildung 5.13: pH-Verlauf während Kultivierung im Milliliter-Maßstab mit 1/1 (= unverdünnt, blau) und 1/14 (gruen) Medium ohne MOPS (A) und mit 1/14 Medium und 50 mM MOPS (orange, B). In (C) ist die Zugabe von NH₃ zum Prozessende abhängig von der Medium- und MOPS-Konzentration gezeigt.

Diskussion

Zwischen den unverdünnten (1/1) und 1/7-verdünnten Medien bestand kaum ein Unterschied in Wachstum und Expression. Bei Kultivierungen im Liter-Maßstab konnte dies reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Mit unverdünntem Medium und geringen Zelldichten (OD_{600} 16) wurden nach 36 h eine C16-Konzentration von 18 % und ein zellspezifischer Proteingehalt ($Y_{P/X}$) von 58 % erreicht; mit 1/7-verdünntem Medium nach 38 h eine C16-Konzentration von 18 % und $Y_{P/X}$ von 54 %.

Jedoch fiel die Proteinproduktion im Milliliter-Maßstab bei der 1/10- und 1/14-Verdünnung deutlich geringer aus als in den konzentrierteren Medien. Daraus lässt sich ableiten, dass das Satzmedium für Hochzelldichtekultivierungen mit $OD_{600} = 140-150$ gut geeignet ist. Keiner der vorhandenen Komponenten ist inhibierend oder limitierend für Wachstum und Expression. Jedoch kommt es voraussichtlich zu Limitierungen, wenn noch höhere Zelldichten erreicht werden.

Eine Veränderung des Satzmediums beispielsweise durch Reduktion der Phosphatsalze wäre problematisch, da dadurch Pufferkapazität verloren geht. Dies könnte zwar mit MOPS, zumindest im Labormaßstab, ausgeglichen werden. Höhere MOPS-Konzentration von 200 mM zeigten jedoch negative Effekte auf das Wachstum von *E. coli*. Die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration war trotz gleicher zugeführter Glucosemenge verringert.

Eine starke Mediumverdünnung und die höchste MOPS-Konzentration führt zu einer besonders schlechten Expression. Hier ist auch die Ammoniumzugabe geringer als in den Ansätzen ohne MOPS oder mit schwächerer Verdünnung.

6 Medium

Im Referenzprozess wird ein definiertes Medium nach Korz et al. (1995) eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2). Die Reduktion der Einsatzstoffe (Medienbestandteile) ist besonders unter ökonomischen Gesichtspunkten von Interesse. Die Hauptkomponenten des Satzmediums, insbesondere die Ammonium- und Kaliumphosphatsalze sind ein erster Ansatzpunkt. Darüber hinaus kann geprüft werden, ob weitere Ionen und Spurenelemente notwendig oder limitierend sind. Magnesium, Ammonium und Komplexbestandteile sind im Hinblick auf eine möglichst einfache Zusammensetzung des Zulaufmediums zu analysieren.

6.1 Hauptkomponenten im Satzmedium

Das im Satzmedium vorgelegte Diammoniumhydrogenphosphat $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ könnte durch das günstigere Ammoniumsulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ersetzt werden. Statt Natronlauge (NaOH) könnte zur pH-Einstellung Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) eingesetzt werden, um gleichzeitig die zum Referenzprozess entsprechende molare Phosphatkonzentration zur Verfügung zu stellen. Da Citronensäure von *E. coli* nicht verstoffwechselt wird, ist schließlich von Interesse, ob auf Citronensäure verzichtet werden kann. Um diese Änderungen zu untersuchen und mögliche Einflüsse der einzelnen Komponenten zu identifizieren, wurde ein 2^3 -vollfaktorieller Versuchsplan angewendet. Das modifizierte Medium wird mit *M* abgekürzt, während das bisherige Medium nach Korz et al. (1995) mit *K* bezeichnet wird. Der Versuchsplan ist in Tabelle 6.1 dargestellt. Jeder der Ansätze wurde in 6 parallelen Zulaufkultivierungen im Milliliter-Maßstab durchgeführt. In Abbildung 6.1 sind die C16-Konzentrationen nach 24 h Produktionszeit und die Biotrockenmassenkonzentrationen zum Versuchsende dargestellt. Alle acht Ansätze unterschieden sich nur relativ gering in Wachstum und C16-Produktion.

Mit Hilfe der *Statistic Toolbox* von MATLAB 2014a (The Mathworks Inc., Natick, MA) wurden lineare Regressionsmodelle berechnet. Die C16-Konzentration und die BTM wurden als Zielgröße verwendet. Es erfolgte eine schrittweise Vereinfachung ausgehend von einem linearen Modell mit 2fach-Wechselwirkungen:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4AB + b_5AC + b_6BC \quad (6.1)$$

Für C16 wird nur das Ammoniumsalz signifikant, aber nur knapp ($p = 0.047$). Dabei ist Ammoniumsulfat geringfügig besser als Diammoniumhydrogenphosphat. Der Effekt ist jedoch sehr gering. Der Unterschied in der C16-Konzentration zwischen dem Einsatz von Ammoniumsulfat und Diammoniumhydrogenphosphat liegt nur bei 2 %-Punkten.

Für die BTM sind zwei Wechselwirkungen signifikant: Citronensäure mit Ammoniumsalz und Citronensäure mit Kaliumphosphatsalzen. Auch hier sind die Effekte gering, mit maximal $1,5 \text{ g L}^{-1}$ BTM.

Tabelle 6.1: Darstellung des gewählten Versuchsschemas zur Untersuchung der Hauptbestandteile des Satzmediums: K = Medium nach Korz et al. (1995), M = modifiziertes Medium. Die eingesetzten Konzentrationen waren $4,0 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $7,5 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $13,3 \text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 + $2,4 \text{ g L}^{-1}$ NaOH oder $6,0 \text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 + $10,0 \text{ g L}^{-1}$ K_2HPO_4 sowie $1,7 \text{ g L}^{-1}$ Citronensäure.

Bezeichnung	Faktor A	Faktor B	Faktor C
KKK	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4 + NaOH	Citronensäure
MKK	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4 + NaOH	Citronensäure
KMK	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4 + K_2HPO_4	Citronensäure
MMK	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4 + K_2HPO_4	Citronensäure
KKM	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4 + NaOH	-
MKM	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4 + NaOH	-
KMM	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4 + K_2HPO_4	-
MMM	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4 + K_2HPO_4	-

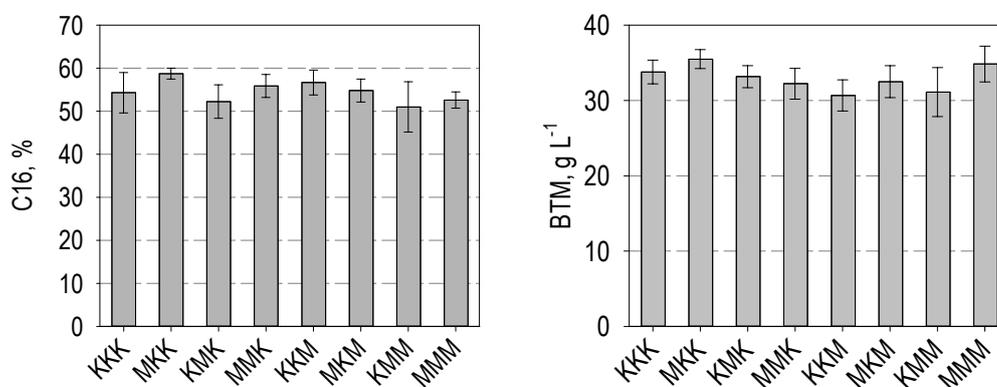


Abbildung 6.1: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit acht Variationen der Hauptbestandteile des Satzmediums (vgl. Tabelle 6.1). Links sind die C16-Konzentrationen nach 24 h Produktionsphase aufgetragen. Rechts finden sich die Biotrockenmassekonzentrationen (BMT) zum Versuchsende. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–6 parallelen Kultivierungen.

Diskussion

Bei der Variation der Hauptbestandteile des Satzmediums wurden insgesamt nur relativ geringe Effekte und Unterschiede zwischen den Ansätzen beobachtet. Je nachdem, welcher Parameter untersucht wurde, entstanden unterschiedliche Ergebnisse. Alle Koeffizienten (beziehungsweise Regressionsgewichte) der Einflussgrößen sind jedoch im Vergleich zu den Regressionskonstanten sehr klein, auch wenn sie signifikant sind.

Die Induktion erfolgte mit $0,60 \text{ nIPTG}$ und die Produktionsphase dauerte in diesem Versuch insgesamt 48 h. Aufgrund zahlreicher Ausfälle mit ablösenden pH-Sensorfilmen ist die Auswertung weiterer Probenzeitpunkte der C16-Konzentrationen schwierig. Da hierdurch keine zusätzlichen Erkenntnisse gewonnen werden können, wird hier auf die Darstellung verzichtet.

Zur Replikation der Ergebnisse wurden Kultivierungen im Liter-Maßstab mit 1/7-verdünntem Medium und geringen Zelldichten (Induktion bei OD_{600} 16) mit der Variante nach Korz (KKK) und der modifizierten Variante (MMM) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Sowohl die C16-Konzentrationen (18 % und 19 %) als auch der zellspezifische

C16-Gehalt $Y_{P/X}$ (54 % und 50 %) waren vergleichbar. Die modifizierte Variante wurde auch in einem Hochzellichteprozess im Rührkesselreaktor mit 16 L Startvolumen erfolgreich untersucht, mit einer C16-Konzentration von 99 %, und ist damit vergleichbar einsetzbar wie das Referenzmedium.

Um den ökonomischen Vorteil der modifizierten Mediumvariante einzuschätzen, wurden die Kosten aller Einsatzstoffe in Laborqualität betrachtet. Hierfür wurde bei einem Anbieter (Carl Roth GmbH & Co. KG) jeweils die Preise pro Kilogramm der größten verfügbaren Gebinde möglichst gleicher Qualität herangezogen (siehe Tabelle A8 im Anhang). Der größte Kostenanteil geht bei dieser Betrachtung mit 59 % auf Glucose zurück. Durch den Verzicht auf Citronensäure sowie Natriumhydroxid und vor allem durch den Ersatz von Diammoniumhydrogenphosphat durch das günstigere Ammoniumsulfat können die Kosten für die Einsatzstoffe auf 85 % (exklusive Glucose) beziehungsweise 94 % (inklusive Glucose) im Vergleich zum Referenzmedium gesenkt werden.

6.2 Zulaufmedium: Magnesium, Ammonium, Komplexbestandteile

Das Zulaufmedium nach Korz et al. (1995) enthält neben der Glucose zusätzlich 20 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (hier bezeichnet als Magnesiumsulfat) und verschiedene Spurenelemente (siehe Abschnitt 4.2). Einerseits könnte die zusätzliche Zugabe von Ammoniumsulfat oder einer Komplexquelle wie Trypton mögliche Limitierungen von Ammonium oder anderen in der Komplexquelle enthaltenen Bestandteilen vermeiden. Andererseits ist aber im Produktionsmaßstab ein möglichst einfaches Zulaufmedium aus technischen und wirtschaftlichen Gründen vorzuziehen. Daher wird in diesem Abschnitt untersucht, inwieweit das Zulaufmedium vereinfacht werden kann und welche Bestandteile tatsächlich notwendig sind.

Magnesium im Satz- oder Zulaufmedium

In den parallelen Kultivierungen in Abbildung 6.2 wurde mit 1/7 verdünntem modifiziertem Medium und geringen Zelldichten exprimiert. Die Zelldichten wurden im Vergleich zum Ausgangsprozess auch etwa um den Faktor 7 verringert. Die Magnesiumsulfatkonzentration wurde ebenfalls 1/7 im Satzmedium verdünnt ($0,17 \text{ g L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Im zweiten und dritten Ansatz wurde das Magnesiumsulfat im Zulaufmedium komplett weggelassen, während im dritten Ansatz die Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium auf 5/7 im Vergleich zur ursprünglichen Konzentration eingestellt wurde ($0,86 \text{ g L}^{-1}$ statt $1,2 \text{ g L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Relativ zur Zelldichte wurde die Magnesiumsulfatkonzentration hier folglich erhöht.

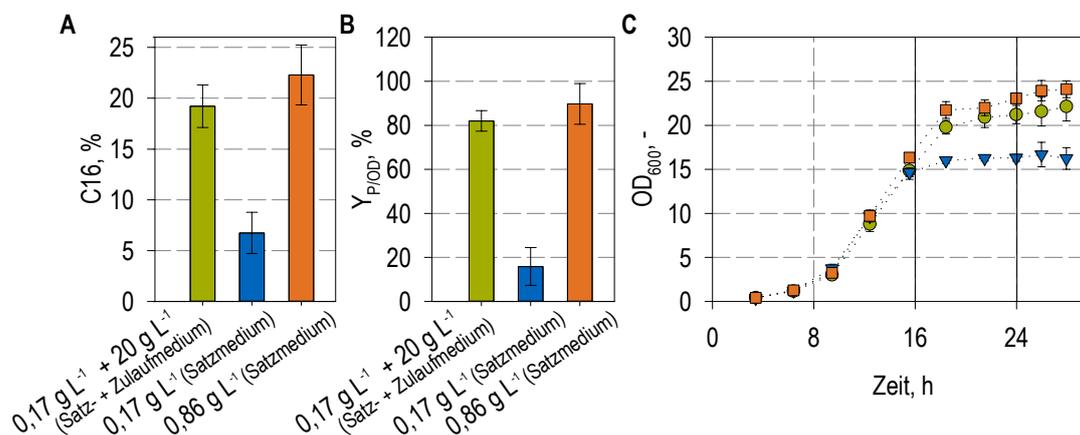


Abbildung 6.2: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen Konzentrationen von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zur Vereinfachung des Zulaufmediums. Entweder wurde Magnesium wie ursprünglich vorgesehen zusätzlich zum Satzmedium auch im Zulaufmedium verwendet (●) oder nur im Satzmedium mit einer 1/7 verdünnten Konzentration (▼) beziehungsweise einer relativ zur OD_{600} erhöhten Konzentration (■). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) und die optischen Dichten (OD_{600} , C). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–6 parallelen Kultivierungen.

Die geringste Magnesiumkonzentration führte zu geringeren Zell- und Produktkonzentrationen.

trationen (Abbildung 6.2 C). Die optischen Dichten sind deutlich geringer, vor allem im Verlauf der Expression, und die C16-Konzentration ist um ein Vielfaches niedriger. Wird hingegen das fehlende Magnesium im Zulaufmedium durch eine erhöhte Konzentration im Satzmedium kompensiert, so ist die Expression vergleichbar (Abbildung 6.2 A+B). Eine deutlich bessere Expression mit $0,86 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat im Vergleich zu $0,17 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat konnte bei zwei parallelen Kultivierungen im Liter-Maßstab mit ähnlichen Bedingungen reproduziert werden (verdünntes Medium und geringe Zelldichten, Daten nicht gezeigt).

Ammoniumversorgung

Neben Magnesium ist Ammoniumsulfat ein Ansatzpunkt zur Vereinfachung des Zulaufmediums. Welche Ammoniummenge für die Expression notwendig beziehungsweise optimal ist, lässt sich schwer eindeutig betrachten, wenn Ammoniak als Titrationsmittel eingesetzt wird. In einem zweistufigen Versuch mit der Wachstumsphase im Liter-Maßstab und der Expressionsphase im Milliliter-Maßstab wurde daher während der Expression Natronlauge statt Ammoniak als Titrationsmittel eingesetzt und verschiedene Ammoniumsulfat-Mengen im Zulauf untersucht (Abbildung 6.3). Als Referenzansatz wurde Ammoniak auch während der Expression als Titrationsmittel verwendet. Es wurde ein 1/7 verdünntes modifiziertes Medium eingesetzt mit $1,1 \text{ g L}^{-1}$ Ammoniumsulfat im Satzmedium.

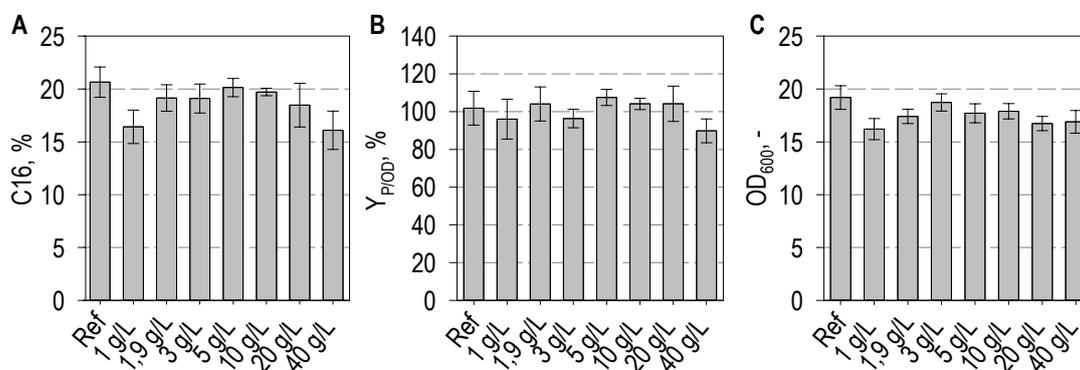


Abbildung 6.3: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlicher Ammoniumversorgung. Die Wachstumsphase erfolgte im Liter-Maßstab. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten (OD_{600} , C) nach 8 h Expressionszeit. Bei der Referenz wurde Ammoniak und bei den weiteren Bedingungen Natronlauge als Base während der Expression eingesetzt. Über den Zulauf wurden unterschiedliche Ammoniumsulfat-Mengen zugegeben um eine Konzentration von 1 bis 40 g L^{-1} im Reaktor nach 8 h zu erreichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus 5–6 parallelen Kultivierungen.

Um auch sehr hohe Ammoniumsulfatkonzentrationen einstellen zu können und für die fehlende Base zu kompensieren, wurde für die Ammoniumzugabe ein zweites Zulaufmedium verwendet und hierfür im Vergleich zum Glucosezulauf eine höhere Zulauftrate eingestellt (100 statt $80 \mu\text{L h}^{-1}$). Die Konzentration von Ammoniumsulfat im zweiten Zulaufmedium wurde so gewählt, dass innerhalb der gewählten Produktionszeit (8 h)

kumuliert zwischen 1 und 40 g L^{-1} Ammoniumsulfat im Reaktor zur Verfügung standen. Dabei entspricht die Konzentration 30 g L^{-1} Ammoniumsulfat im Zulaufmedium $1,9 \text{ g L}^{-1}$ im Reaktor. Beim Referenzansatz wurde dieselbe Menge an Ammoniumsulfat im Zulaufmedium verwendet und zusätzlich Ammoniak als Base eingesetzt.

Die C16-Konzentrationen waren für die Ansätze mit $1,9\text{--}20 \text{ g L}^{-1}$ Ammoniumsulfat vergleichbar hoch (Abbildung 6.3). Nur die niedrigste und höchste Konzentration wirkten sich auf die Proteinproduktion und auch auf die optischen Dichten aus. Daher waren, abgesehen von der höchsten Ammoniumkonzentration, $Y_{P/OD}$ für alle Ansätze vergleichbar.

Zulaufmedium bei Hochzelldichtekultivierungen

Die Vereinfachung des Zulaufmediums wurde schließlich auch in vier parallelen Hochzelldichtekultivierungen im Liter-Maßstab untersucht, wobei mehrere Fragestellungen verfolgt wurden (Tabelle 6.2): Zum einen wurde überprüft, ob eine Anreicherung des Zulaufmediums mit der Komplexquelle Trypton oder der anorganischen Stickstoffquelle Ammoniumsulfat und Spurenelementen die Expression verbessert. Zum anderen sollte geklärt werden, ob auf Magnesium im Zulaufmedium verzichtet werden kann – bei Hochzelldichtekultivierungen mit schwacher Induktion ($0,60 \text{ nIPTG}$), langer Expressionszeit und hohen Zelldichten. In zwei Reaktoren wurde die von Korz et al. (1995) publizierte Magnesium-Zugabe verwendet: $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat im Satzmedium und 20 g L^{-1} im Zulaufmedium. Einer dieser Reaktoren enthielt zudem 20 g L^{-1} Trypton als zusätzliche Stickstoffquelle. Dieser Ansatz wird als *Mg+Trypton* bezeichnet, während der Ansatz mit Glucose und Magnesium als Zulaufmedium als *Mg* bezeichnet wird. In zwei weiteren Reaktoren war kein Magnesium im Zulaufmedium enthalten und stattdessen die Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium um den Faktor 5 auf 6 g L^{-1} erhöht. Einer dieser Reaktoren enthielt zusätzlich Spurenelemente und Ammoniumsulfat im Zulaufmedium (*SE+NH₄⁺*) während das Zulaufmedium des anderen Ansatzes nur aus *Glucose* bestand.

Tabelle 6.2: Zusammensetzung des Satz- und Zulaufmediums der vierfach parallelen Kultivierung aus Abbildung 6.4. Die Spurenelementlösung entspricht der Zusammensetzung nach Korz et al. (1995).

Versuchsbezeichnung	Magnesium im Satzmedium	Zulaufmedium
1) Mg+Trypton ♦	$1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat	500 g L^{-1} Glucose 20 g L^{-1} Magnesiumsulfat 20 g L^{-1} Trypton
2) Mg (Ref) ■	$1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat	500 g L^{-1} Glucose 20 g L^{-1} Magnesiumsulfat
3) SE+NH ₄ ⁺ ▼	6 g L^{-1} Magnesiumsulfat	500 g L^{-1} Glucose Spurenelementlösung 20 g L^{-1} Ammoniumsulfat
4) Glucose ○	6 g L^{-1} Magnesiumsulfat	500 g L^{-1} Glucose

Die Biotrockenmassekonzentrationen (Abbildung 6.4 C) waren zum Induktionszeitpunkt in allen Reaktoren sehr ähnlich, veränderten sich aber im Verlauf der Produktionsphase unterschiedlich stark. Die beiden Ansätze mit Magnesium im Zulaufmedium

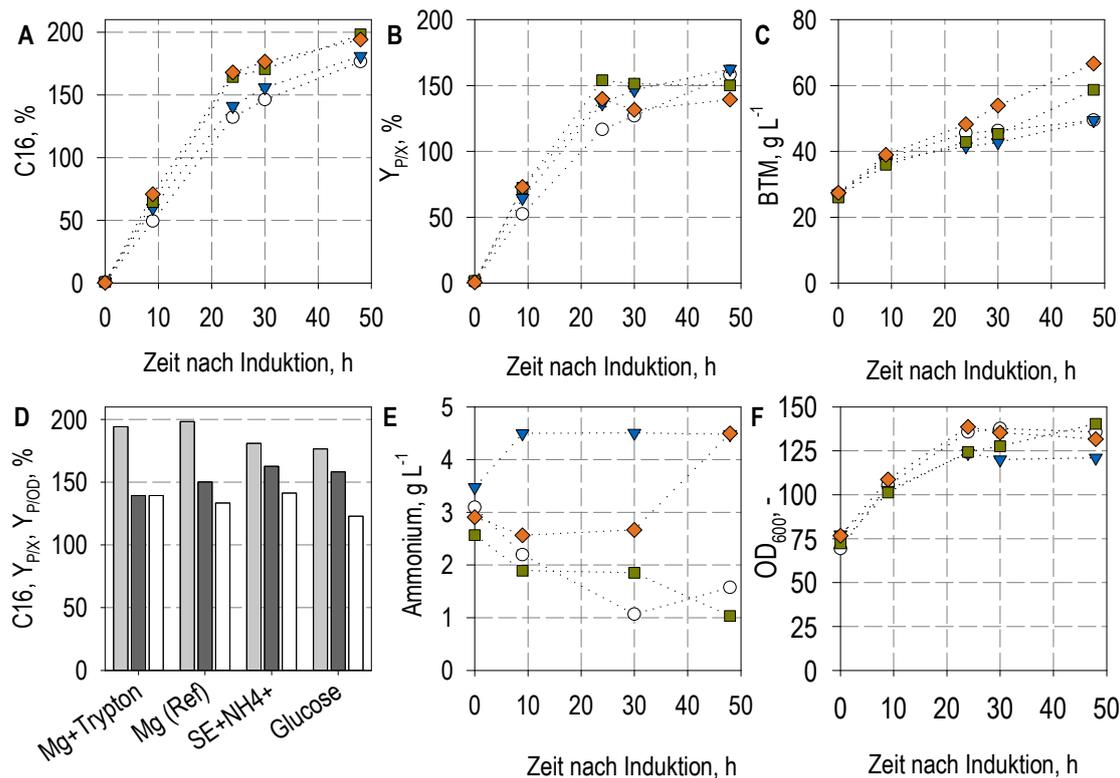


Abbildung 6.4: Expression von C16 im Liter-Maßstab zur Vereinfachung des Zulaufmediums. Die Zusammensetzung der Satz- und Zulaufmedien für die vier parallelen Kultivierungen sind der Tabelle 6.2 zu entnehmen: Mg+Trypton (◆), Mg (■), SE+NH₄⁺ (▼), Glucose (○). In (D) sind für den letzten Probenzeitpunkt 48 h nach Induktion die C16-Konzentration (▣) sowie der zellspezifische C16-Gehalt Y_{P/X} (■) und Y_{P/OD} (□) als Balkendiagramm dargestellt.

hatten zum Versuchsende deutlich höhere Biotrockenmassekonzentrationen als die zwei Ansätze, in denen Magnesium nur im Satzmedium enthalten war. Ammonium und Spurenelemente zeigen kaum einen Effekt auf die BTM, während der Reaktor mit Trypton die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen erreichte. Hier muss einschränkend hinzugefügt werden, dass die Verdunstung in diesem Reaktor deutlich höher war als in den anderen drei Reaktoren. Während das Volumen der anderen drei Reaktoren am Ende sich um höchstens 10 mL unterschied, waren in dem Reaktor mit Trypton im Zulauf am Ende etwa 100 mL weniger Volumen enthalten – bei etwa 850 mL zu erwartendem Endvolumen. Dies ist auf eine deutlich stärkere Verdunstung zurückzuführen. Diese wurde wiederum durch eine schlechtere Kühlung des Abgases beziehungsweise Undichtigkeit im Reaktor verursacht. Wird die Verdunstung berücksichtigt, so sind die Biotrockenmassekonzentrationen von *Mg+Trypton* und *Mg* vergleichbar.

Wird die C16-Konzentrationen der beiden Reaktoren ohne Magnesium im Zulauf verglichen (Abbildung 6.4 A), so waren in dem Ansatz *SE+NH₄⁺* die Produktkonzentrationen in den ersten 30 h nur minimal höher und nach 48 h in beiden Ansätzen nahezu gleich (176 % und 181 %). Das gleiche gilt für den zellspezifischen C16-Gehalt Y_{P/X} (158 % und 163 % nach 48 h). In den beiden Reaktoren mit Magnesium im Zulauf lagen die C16-Konzentration bereits nach 24 h bei 164 % und 168 % und stiegen bis zum Ende

auf 198 % und 194 % an. Damit wurden hier bis zu 22 %-Punkte C16 mehr produziert, bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen. Beim zellspezifischen Proteingehalt ($Y_{P/X}$, Abbildung 6.4 B) liegt der Ansatz *Mg* bereits nach 24 h bei 154 %. Zwar steigt nach 24 h die C16-Konzentration hier noch weiter, durch den ebenfalls relativ hohen Anstieg der BTM liegt der $Y_{P/X}$ am Ende jedoch mit 150 % etwas niedriger als in den Ansätzen *Glucose* (158 %) und *SE+NH₄⁺* (163 %).

Bei den optischen Dichten (OD_{600} , Abbildung 6.4 F) liegen nach 40 h Prozesszeit (24 h Expression) die Ansätze *Mg+Trypton* und *Glucose* etwas höher. Die optischen Dichten des Ansatzes *Mg* steigen bis zum Ende am stärksten und sind nach 48 h Expression mit den anderen beiden Reaktoren vergleichbar. Die optischen Dichten des Ansatzes *SE+NH₄⁺* liegen jedoch niedriger zum Prozessende. Gleichzeitig ist in diesem Ansatz wie zu erwarten die Ammoniumkonzentration (Abbildung 6.4 E) schon früh während der Expression deutlich höher als in den anderen Ansätzen.

Diskussion

Magnesium spielt für die Proteinproduktion eine entscheidende Rolle. Sogar in vielen klassischen Medien wie LB (Lysogeny Broth) oder auch TB (Terrific Broth) mangelt es an Magnesium (Studier, 2005). Für die Expression von C16 zeigte sich, dass Magnesium im Zulauf durch eine erhöhte Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium ersetzt werden kann. Während damit mit geringen Zelldichten sogar eine geringfügig bessere Expression erzielt wurde, war bei Hochzelldichtekultivierungen mit schwacher Induktion die Variante Magnesium im Zulaufmedium etwas besser.

Der Magnesiumgehalt von Bakterien wird mit 0,1–0,5 % (Chmiel, 2011) angegeben. Die obere Grenze entspricht auch den Messungen von Chang et al. (1986) in *E. coli*. In der Kultivierung in Abbildung 6.2 wurden zum Induktionszeitpunkt nach 16 h etwa 25 g L^{-1} Glucose zugeführt. Damit ist eine BTM von bis zu 10 g L^{-1} zu erwarten. Es werden für das Wachstum daher $0,05 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium benötigt. Im Kurz-Satzmedium liegen $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat vor, wovon $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium sind. Wird das Medium aber 1/7 verdünnt, so sind es nur noch $0,02 \text{ g L}^{-1}$ und damit weniger als die benötigten $0,05 \text{ g L}^{-1}$. Durch das Magnesium aus dem Zulaufmedium würden bis zum Induktionszeitpunkt nochmals $0,09 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium hinzukommen. Die Erhöhung des Magnesiums auf 5/7 und damit $0,09 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium ist vergleichbar mit der über das Zulaufmedium zugegebenen Menge und etwas geringer als Zulaufmedium und 1/7-Satzmedium kombiniert, jedoch offensichtlich ausreichend hoch. In weiteren Kultivierungen im Milliliter-Maßstab (Daten nicht gezeigt) wurden höhere Magnesiumsulfatkonzentrationen von $1–3 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat bei geringen Zelldichten (OD_{600} 20–25) eingesetzt, jedoch ohne messbaren Einfluss auf OD_{600} oder C16-Konzentration. Während der Expression, zumindest in den ersten 8 h bei einer starken Induktion mit 1,52 nIPTG ist die Magnesiumsulfatkonzentration ebenfalls von untergeordneter Bedeutung. Bei einem zweistufigen Versuch mit Wachstum im Liter- und Produktion im Milliliter-Maßstab (Daten nicht gezeigt) wurden in dem Medium im Milliliter-Maßstab für die Expression drei verschiedene Magnesiumsulfatkonzentration ($0–2 \text{ g L}^{-1}$) vorgelegt, jedoch ohne signifikanten Einfluss auf die Proteinproduktion.

Bei Hochzelldichtekultivierungen ohne Magnesium im Zulauf und mit 6 g L^{-1} Magnesiumsulfat im Satzmedium wurden Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu $49,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Bei einem Magnesiumanteil von 0,5 % wären es $0,25 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium. Mit 6 g L^{-1} Magnesiumsulfat liegen jedoch mit $0,59 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium deutlich mehr vor. Dennoch lässt sich aus den parallelen Kultivierungen ableiten, dass hier mehr Magnesium benötigt wird. Durch die Zugabe von Magnesiumsulfat im Zulauf stieg die BTM auf bis zu 59 g L^{-1} . Hier hatten die Zellen deutlich mehr Magnesium zur Verfügung. Mit den vorgelegten $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat und bei einer eingestellten konstanten Zulauftrate von 15 mL h^{-1} und 20 g L^{-1} Magnesiumsulfat im Zulaufmedium sind bereits nach 16 h Zulauf die im Satzmedium sonst vorgelegten 6 g L^{-1} überschritten. Über den gesamten Prozess wurde somit in den *Mg*-Ansätzen fast drei Mal so viel Magnesium zugegeben. Eine so starke Erhöhung ist voraussichtlich nicht erforderlich. Sehr hohe Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium vorzulegen, ist jedoch problematisch. Bereits bei 6 g L^{-1} entstehen unlösliche Präzipitate, die sich im Verlauf der Kultivierung nur langsam zurückbilden.

Die verfügbaren Ammoniummenge während der Expression hat nur einen geringen Einfluss auf die Proteinproduktion und zeigt ein flaches Optimum. In drei unabhängigen Kultivierungen mit geringen Zelldichten im Milliliter-Maßstab wurde während der ersten 8 h Produktionszeit eine Ammoniakmenge zur pH-Regelung automatisch zugegeben, die $4\text{--}8 \text{ g L}^{-1}$ Ammoniumsulfat entspricht. Die Ammoniumversorgung über die Base ist folglich ausreichend hoch für eine optimale Proteinproduktion und höher als durch 30 g L^{-1} Ammoniumsulfat im Zulaufmedium zudosiert wird. Sehr hohe Ammoniumsulfatkonzentrationen können die Expression verschlechtern. Nach Thompson et al. (1985) wirken Ammoniakkonzentrationen von über 170 mM beziehungsweise 3 g L^{-1} wachstumsinhibierend. Ein Zulauf mit Ammoniumsulfat in Kombination mit NH_3 als Titrationsmittel könnte daher sogar kontraproduktiv sein. Entsprechend war auch im Hochzelldichteprozess kein Ammoniummangel feststellbar. Stattdessen kam es zu einer starken Ammoniumanreicherung von über 4 g L^{-1} , wenn Ammoniumsulfat im Zulaufmedium enthalten war. Eine Auswirkung auf die Expression war aber nicht feststellbar. Allerdings könnten die vergleichsweise niedrigen optischen Dichten in der Produktionsphase mit dem Ammoniumüberschuss zusammenhängen.

Bei der rekombinanten Expression von Proteinen, die sich in der Zusammensetzung stark von den *E. coli*-Proteinen unterscheiden, kann es zu einem Aminosäuremangel kommen (Sørensen und Mortensen, 2005). Dadurch kommt es zu einer *stringenten Antwort* (vgl. Abschnitt 3.3.4), die eine Anpassung auf eine Unterversorgung mit erhöhter Stressresistenz ist und unter anderem zur Verringerung der Aminosäurebiosynthese führt. Die Zugabe von Aminosäuren soll diese stringente Antwort verringern können (Sørensen und Mortensen, 2005; Chang et al., 2002). Allgemein finden sich Hinweise, dass die Zugabe von Komplexbestandteilen wie Hefeextrakt und Trypton, Aminosäuregemischen oder einzelner Aminosäuren wie L-Glutaminsäure die Expression von Proteinen in *E. coli* verbessert (Zhang et al., 2010; Jung et al., 2004). In den in Abbildung 6.4 dargestellten Kultivierungen hatte die Zugabe von Spurenelementen oder Trypton im Zulaufmedium jedoch offensichtlich keinen positiven Effekt. Dies stimmt mit weiteren Ergebnissen mit

geringen Zelldichten im Liter-Maßstab überein (Daten nicht gezeigt). Trotz des hohen Glycin-Gehaltes von Spinnenseidenproteinen konnte die Zugabe von Glycin zum Medium auch bei Xia et al. (2010) die Expression nicht verbessern. Die Spurenelemente und Trypton können für die C16-Expression aus dem Zulaufmedium weggelassen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen liegen auch keine weiteren Limitierungen während der Expression vor.

Insgesamt lässt sich das Zulaufmedium deutlich vereinfachen. Wenn die Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium erhöht wird, ist allein Glucose als Zulaufmedium ausreichend. Nur bei Hochzelldichteprozessen mit schwacher Induktion, langer Expressionszeit und damit sehr hohen Biomassen sind jedoch 6 g L^{-1} Magnesiumsulfat im Satzmedium nicht ganz ausreichend und die Anreicherung des Zulaufmediums mit Magnesium kann die Expression etwas verbessern. Werden jedoch nur 6 g L^{-1} Magnesiumsulfat im Satzmedium vorgelegt und kein Magnesiumsulfat mehr zugegeben, so verringert sich die eingesetzte Menge an Magnesium deutlich. Zusätzlich zu der Kostenreduktion auf 85 % (exklusive Glucose) beziehungsweise 94 % (inklusive Glucose) durch die modifizierten Ammonium- und Kaliumsalze (Abschnitt 6.1) können durch die Verringerung der Magnesiumsulfatkonzentration die Kosten auf 75 % (exklusive Glucose) beziehungsweise 90 % (inklusive Glucose) im Vergleich zum Referenzprozess gesenkt werden. Die Spurenelemente im Zulaufmedium, die im Referenzprozess zusätzlich zu den Spurenelementen im Satzmedium verwendet werden, tragen nur gering zu den gesamten Kosten für die Einsatzstoffe bei (0,2 %). Für den Herstellungsprozess von C16 sind diese zusätzlichen Spurenelemente aber nicht erforderlich. Damit kann das Zulaufmedium komplett vereinfacht werden. Alle Komponenten werden im Satzmedium vorgelegt und nur noch Glucose zudosiert.

6.3 Weitere Komponenten im Satzmedium

6.3.1 Calcium- und Natriumsalze

Während bei dem Referenzprozess LB-Medium als Vorkulturmedium verwendet wurde, sind für den Produktionsmaßstab nur definierte Medien vorgesehen. Das LB-Medium enthält neben Pepton und Hefeextrakt auch Natriumchlorid. Mit den modifizierten Salzbestandteilen aus Abschnitt 6.1 und mit einer definierten Vorkultur ist Natrium (Na) jedoch nur in Spuren enthalten. Für die Zusammensetzung von Bakterien wird jedoch ein Natriumgehalt von 0,5–1,0 % genannt (Chmiel, 2011). Zudem enthalten Bakterien auch Calcium (Ca), welches ebenfalls nicht in dem definierten Medium enthalten ist. Außerdem soll die Spurenelementzusammensetzung vereinfacht beziehungsweise die Spurenelemente aus dem Zulaufmedium entfernt werden.

In den Kultivierungen in Abbildung 6.5 wurde bereits auf Spurenelemente im Zulaufmedium verzichtet. Es wurde die modifizierte Mediumvariante 1/7 verdünnt und mit 50 mM MOPS eingesetzt. LB-Medium wurde für die Vorkultur verwendet. Neben Calcium und Natrium wurde in diesen parallelen Kultivierungen zusätzlich Eisen (Fe) untersucht. Durch Fe(III)-citrat im Satzmedium stehen nur etwa 0,04 % Fe pro erwartete Biomasse zur Verfügung. Dies liegt an der unteren Grenze der Angaben von Chmiel (2011) mit 0,02–0,2 %. Daher wurde neben 24 mM NaCl ($1,43 \text{ g L}^{-1}$) und 2,7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) in dem Versuch in Abbildung 6.5 zusätzlich $0,14 \text{ g L}^{-1}$ Fe(III)-citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ins Satzmedium zugegeben.

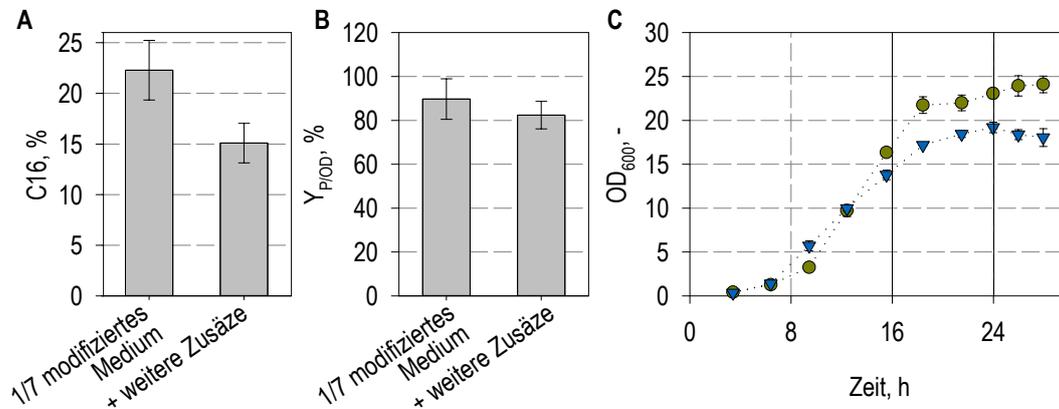


Abbildung 6.5: Untersuchung weiterer Zusätze im Satzmedium bei der Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit 1/7 verdünntem modifiziertes Medium (●). Verschiedene weitere Komponenten wurden im zweiten Ansatz ins Satzmedium gegeben (▼): CaCl_2 , NaCl und Fe(III)citrat. Dargestellt sind nach 8 h Expression die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten im Prozessverlauf (OD_{600} , C). Die vertikalen Striche markieren die Induktion bei 16 h und die Probenahme bei 24 h. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–6 parallelen Kultivierungen.

Das unlimitierte Wachstum zu Beginn war in dem Ansatz mit den zusätzlichen Bestandteilen zwar etwas schneller, was in einer höheren OD_{600} nach 9,4 h resultierte (Abbildung 6.5 C). Allerdings war die optische Dichte schon vor der Induktion und vor allem während der Expression geringer als im Referenzansatz. Der negative Effekt der zusätz-

lichen Bestandteile auf die C16-Konzentration war noch größer, womit auch die $Y_{P/OD}$ -Werte geringer ausfielen.

Der Einfluss von Calcium und Natrium wurde in einer weiteren Kultivierung im Milliliter-Maßstab genauer untersucht (Abbildung 6.6). Ein unverdünntes Medium mit höheren optischen Dichten und ein definiertes Vorkulturmedium wurden eingesetzt, um einen eventuell auftretenden Natriummangel deutlicher zu beobachten. Die längere Produktionszeit von bis zu 40 h resultiert aus der schwächeren Induktion mit 0,60 nIPTG. Einzeln oder als Kombination wurden 7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ beziehungsweise 10 mM Natriumdihydrogenphosphat + Dinatriumhydrogenphosphat eingesetzt.

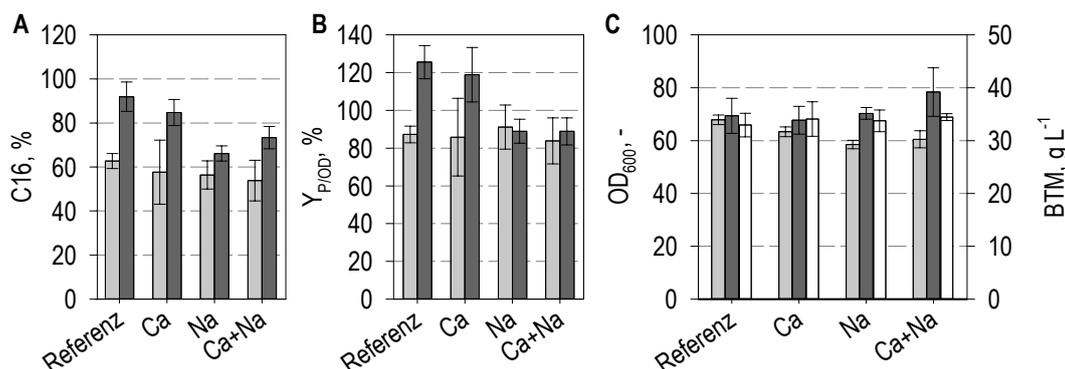


Abbildung 6.6: Untersuchung von Calcium (Ca) und Natrium (Na) als zusätzliche Bestandteile des Satzmediums im Milliliter-Maßstab. 7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 20 mM Natriumdihydrogenphosphat + Dinatriumhydrogenphosphat wurden einzeln oder zusammen im Satzmedium vorgelegt. Dargestellt sind nach 20 h (hellgrau) und 40 h (dunkelgrau) Expression die C16-Konzentrationen (A), die C16-Konzentrationen relativ zur optischen Dichte $Y_{P/OD}$ (B) und die optischen Dichten sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, weiß, C). Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–6 parallelen Kultivierungen.

Die optischen Dichten (Abbildung 6.6 C) waren durch die Zugabe von Calcium und Natrium zum Probezeitpunkt 20 h nach Induktion geringer, glichen sich jedoch zum Ende des Prozesses für alle Ansätze an (unter der Berücksichtigung der Standardabweichungen). Auch die Biotrockenmassekonzentrationen waren für alle Ansätze nahezu gleich. Die Proteinproduktion zeigte deutlichere Unterschiede und war ohne die Zusätze am besten. Mit Calcium war die Expression etwas geringer, mit Natrium nochmals deutlich niedriger. Die Kombination Natrium+Calcium war zwar etwas besser als Natrium allein, aber schlechter als Calcium oder die Referenz.

Diskussion

Der Calciumgehalt von Bakterien wird mit 0,01–1,1 % und der Natriumgehalt mit 0,5–1,0 % angegeben (Chmiel, 2011). Chang et al. (1986) konnten für den *E. coli* B einen cytoplasmatischen Calcium- beziehungsweise Natriumanteil an der BTM abhängig von der Wachstumsphase im Bereich von 0,01 %–0,13 % beziehungsweise 0,34 %–0,92 % messen. Beide Ionen werden von *E. coli* aufgenommen und verwendet. Die Zugabe der Ionen in das Satzmedium hatte jedoch für die Produktion von C16 einen leicht negativen

(Calcium) oder einen stark negativen Einfluss (Natrium). Die Ursache hierfür ist unklar. Da Natriumchlorid in dem häufig verwendeten LB-Medium enthalten ist, ist ein negativer Effekt von Natriumphosphat auf die Proteinproduktion in *E. coli* überraschend. Lu et al. (2009) zeigte, dass sich für die Herstellung von Bernsteinsäure in *E. coli* als Titrationsmittel Kalium- und Natriumhydroxid ähnlich gut und Calciumhydroxid besser eignete. Die Gegenionen Calcium oder Natrium können demnach den Stoffwechsel von *E. coli* beeinflussen. Ausgehend von den hier erzielten Ergebnissen ist eine Anreicherung des verwendeten definierten Mediums mit diesen Bestandteilen offensichtlich nicht nur überflüssig, sondern möglichst zu vermeiden.

6.3.2 Spurenelemente Mangan und Cobalt

Im Gegensatz zu den Hauptbestandteilen des Satzmediums und dem Zulaufmedium wurde die Spurenelementzusammensetzung nicht verändert und entspricht den Angaben von Korz et al. (1995). Allerdings sind vor allem die Spurenelemente Cobalt (Co) und Mangan (Mn) giftig und für eine industrielle Produktion unerwünscht.

Für die Untersuchung der Spurenelemente wurde, anders als für alle anderen Parameter, eine kontinuierliche Kultivierung als Ansatz gewählt. In einem kontinuierlichen Prozess kann die Spurenelementkonzentration durch Wechseln der Zulauflösung langsam verändert werden. Die enthaltenen Cobalt- oder Manganionen werden dadurch ausgespült. Im zeitlichen Verlauf kann so nachvollzogen werden, ob und ab wann eine Limitierung durch die beiden fehlenden Ionen eintritt. Sinkt die Biomassekonzentration sofort nach dem Wechsel der Zulauflösung, ist bereits die im Medium vorgelegte Konzentration an Cobalt und Mangan limitierend. Nimmt die Biomassekonzentration erst zu einem späteren Zeitpunkt ab, können die Konzentrationen von Cobalt und Mangan reduziert werden. Tritt keine Veränderung der Biomassekonzentration auf, so können die beiden Ionen vollständig aus der Lösung entfernt werden.

In mehreren Kultivierungen wurde eine kontinuierliche Betriebsweise in einem 1 L-Rührkesselreaktor etabliert. Im Gegensatz zu Zulaufkultivierungen wurde hier eine Ammoniumlimitierung festgestellt. Daraufhin wurde die Ammoniumkonzentration im Zulaufmedium von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,9 \text{ g L}^{-1}$ erhöht. Zudem wurden 10 g L^{-1} Glucose vorgelegt und die Verdünnungsrate auf $0,1 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Damit konnte ein stabiler Betriebspunkt erreicht werden, mit optischen Dichten von $\text{OD}_{600} = 9-10$ (Abbildung 6.7). Nach etwa fünf Verweilzeiten mit einem Medium mit vollständiger Spurenelementzusammensetzung wurde auf ein Zulaufmedium umgestellt, das weder Cobalt noch Mangan enthielt (bei 94 h Prozesszeit). Abgesehen von kurzen technischen Problemen mit der Zulaufpumpe (bei 100 und 120 h Prozesszeit in Abbildung 6.7), wurde eine annähernd stabile optische Dichte und ein stabiler Stoffwechsel, zu sehen an den CO_2 - und O_2 -Signalen der Abgasanalytik, über mehr als fünf hydraulische Verweilzeiten nach Mediumwechsel aufrechterhalten.

In Abbildung 6.8 sind zwei parallele Hochzelldichtekultivierungen im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Spurenelementen gezeigt. Für beide Kultivierungen wurde ein definiertes Vorkulturmedium ohne Co und Mn eingesetzt. Das Zulaufmedium bestand jeweils nur aus Glucose. Im Satzmedium enthielt ein Reaktor die komplette Spurenelement-

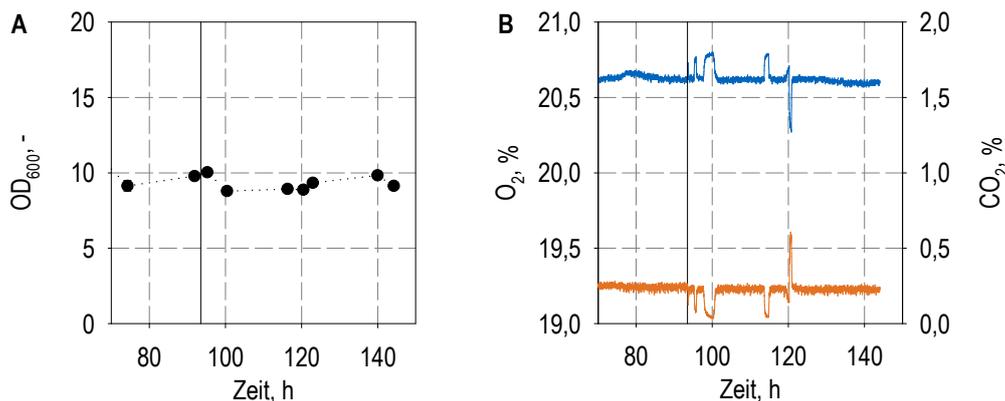


Abbildung 6.7: Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* im Liter-Maßstab zur Reduktion der Spurenelement-Zusammensetzung. Dargestellt sind die optischen Dichten (A) und die Werte der Abgasanalytik für O_2 (blau) und CO_2 (orange) im Prozessverlauf (B).

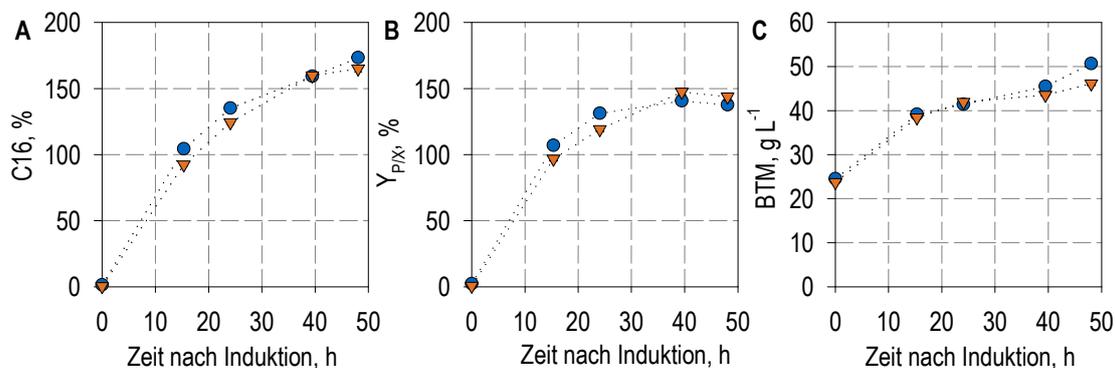


Abbildung 6.8: Zwei parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Reduktion der Spurenelement-Zusammensetzung: Referenzkultivierung mit kompletter Spurenelementlösung (●) und Kultivierung ohne Cobalt und Mangan (▼). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/X}$ (B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) im Prozessverlauf (C).

Zusammensetzung, während beim anderen auf Co und Mn verzichtet wurde. Die C16-Konzentrationen unterschieden sich nur sehr gering nach 24 und 30 h Produktionsphase und waren nach 40 h gleich (Abbildung 6.8 A). Auch die BTM und der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/X}$ unterschieden sich nur gering. Die BTM und C16-Konzentration waren beim Referenzprozess nach 48 h etwas höher, was jedoch beides vor allem auf eine etwas höhere Verdunstung in diesem Reaktor zurückzuführen ist. $Y_{P/X}$ waren nach 40 und 48 h Expression hier gleich hoch. Bei zwei weiteren Kultivierungen im Liter-Maßstab mit geringen Zelldichten konnte ebenfalls kein Einfluss von Cobalt und Mangan auf die Expression entdeckt werden (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Die beiden Spurenelemente Cobalt und Mangan können anscheinend problemlos aus dem Satzmedium entfernt werden. Da zudem keine Spurenelemente im Zulaufmedium oder im definierten Vorkulturmedium verwendet wurden, ist *E. coli* nicht auf Co und Mn

angewiesen. Es wurde kein messbarer Einfluss auf das Wachstum oder die Expression festgestellt. Abelson und Aldous (1950) konnten zeigen, dass bei ausreichenden Magnesiumsulfatkonzentration *E. coli* nicht auf Cobalt und Mangan angewiesen ist und hohe Magnesiumsulfatkonzentration sogar vor toxischen Effekten durch Cobalt schützen. Obwohl kein Cobalt oder Mangan zugegeben wurden, lässt sich nicht sicher ausschließen, dass durch Verunreinigungen beispielsweise von den Kaliumphosphatsalzen vor allem Spuren von Cobalt im Reaktionsmedium enthalten waren.

Für die Untersuchung des Wachstums, abhängig von der Spurenelementzusammensetzung, wurde eine kontinuierliche Kultivierung etabliert. C16 wird in dem verwendeten Stamm intrazellulär exprimiert. Durch die intrazelluläre Anreicherung und Bildung von Einschlusskörperchen ist eine kontinuierliche Expression nicht durchführbar. Die kontinuierliche Betriebsweise eignet sich daher nur für die Untersuchung des Wachstums. Durch verschiedene versuchstechnische Schwierigkeiten (Stabilität der Sonden für pH und pO_2 sowie Kontaminationsgefahr) schien der Aufwand kontinuierlicher Kultivierungen unverhältnismäßig zum Erkenntnisgewinn bei der reaktionstechnischen Untersuchung von intrazellulären Expressionsprozessen. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

7 Wachstum

Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, besteht der Referenzprozess zur Herstellung des Spinnenseidenproteins C16 mit *E. coli* aus einer dreigeteilten Wachstumsphase und einer Produktionsphase. Das Wachstum findet in einer Satzphase, einer exponentiellen Zulaufphase und einer konstanten Zulaufphase statt. Prozesstechnisch sinnvoll ist eine Verkürzung der gesamten Wachstumsphase, um Prozesszeit zu sparen und damit die Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute) zu erhöhen. Eine Verkürzung der Wachstumsphase bedeutet eine Erhöhung der Wachstumsrate. Dabei ist zu klären, welchen Einfluss die Wachstumsrate auf die spätere Proteinproduktion hat.

7.1 Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion

Schnelles oder unlimitiertes Wachstum spielt bei einer Hochzelldichtekultivierung vor allem zu Prozessbeginn, insbesondere in der Satzphase, eine Rolle. Vor der Induktion können jedoch bei Hochzelldichtekultivierungen keine beliebig hohen Wachstumsraten eingestellt werden, da der Sauerstoffbedarf entsprechend steigen würde und es somit zur Sauerstofflimitierung und gemischten Säuregärung käme. Die entstehenden Stoffwechselnebenprodukte hätten wiederum einen negativen Einfluss auf die Proteinproduktion, wie in den Abschnitten 5.4 und 5.5 gezeigt wurde. Um dennoch niedrige und höhere Wachstumsraten bei möglichst vergleichbaren Bedingungen zu betrachten, wurde das Wachstum und der Einfluss des Wachstums auf die Proteinproduktion zunächst bei niedrigen Zelldichten untersucht.

Einfluss der Wachstumsphase auf die Proteinproduktion

Im Milliliter-Maßstab wurden fünf unterschiedlich gestaltete Wachstumsphasen realisiert (Tabelle 7.1 und Abbildung 7.1): mit oder ohne Satzphase, verschieden hohe Glucosekonzentrationen im Satzmedium, verschiedene Inokulationsverhältnisse sowie exponentieller und konstanter oder ausschließlich exponentieller Zulauf. Insgesamt wurde in allen Ansätzen die gleiche Glucosemenge in der Wachstumsphase zugegeben und daher die gleiche OD_{600} zum Induktionszeitpunkt von etwa 14–15 erreicht.

In Abbildung 7.1 (B) und (E) sind die optischen Dichten für die fünf Bedingungen dargestellt. Trotz gleicher Zulauftrate während der Expression für alle Bedingungen wuchsen die Zellen nach der Induktion unterschiedlich stark weiter. Die Bedingungen mit der kurzen Wachstumsphase erreichten deutlich höhere optische Dichten. Allerdings sanken die OD_{600} in den Ansätzen mit kürzerer Wachstumsphase im späteren Verlauf der Produktionsphase wieder.

Tabelle 7.1: Übersicht über die verschiedenen Wachstumsphasen der Kultivierungen aus Abbildung 7.1

Gesamtdauer der Wachstumsphase	Wachstumsphasen	Inokulumvolumen/ Kulturvolumen	Glucose im Satzmedium
8 h	exponentieller Zulauf	1/5	6 g L ⁻¹
10 h	exponentieller Zulauf	1/10	4 g L ⁻¹
11 h	exponentieller und konstanter Zulauf	1/20	4 g L ⁻¹
19 h	Satzphase, exp. und konst. Zulauf	1/20	4 g L ⁻¹
26 h	Satzphase, exp. und verringerter konstanter Zulauf	1/20	2 g L ⁻¹

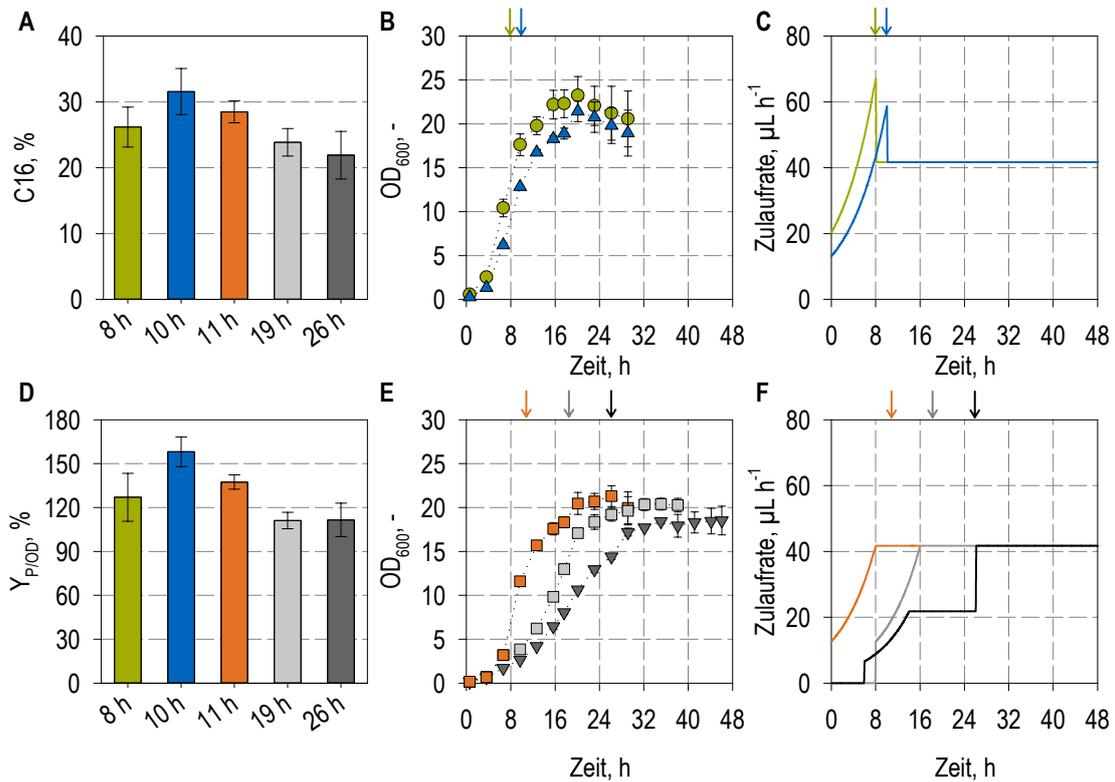


Abbildung 7.1: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlich gestalteten Wachstumsphasen (Dauer zwischen 8 und 26 h). In (A) sind die C16-Konzentrationen und in (D) der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/OD}$ aufgetragen. In (B) und (E) sind für die fünf Ansätze die optischen Dichten im Prozessverlauf gezeigt: 8 h (●), 10 h (▲), 11 h (◆), 19 h (◻), 26 h (▼). Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Zeitpunkte der Induktion. In (C) und (F) sind die Zulaufprofile aufgetragen. $40 \mu\text{L h}^{-1}$ entsprechen $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bezogen auf das Startvolumen. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 3–5 parallelen Kultivierungen.

Die Ansätze mit einer Wachstumsphase von 10 h oder 11 h führten zu der höchsten Proteinproduktion. Stark verlangsamtes oder nahezu unlimitiertes Wachstum wirkten sich negativ auf die Expression aus. In dem Ansatz mit 8 h kam es zum Ende des Wachstums teilweise zu Sauerstofflimitierungen.

Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion

Um den Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion zu untersuchen, wurden vier parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab ($0,5\text{ L}$ Startvolumen) mit vier verschiedenen Wachstumsraten durchgeführt. Das Satzmedium enthielt jeweils 2 g L^{-1} Glucose und der exponentielle Zulauf wurde direkt nach der Inokulation gestartet. Für das Zulaufprofil wurden Wachstumsraten μ_{set} von $0,10\text{ h}^{-1}$ bis $0,20\text{ h}^{-1}$ eingestellt. Damit die gleiche Zelldichte zum Induktionszeitpunkt (10 g L^{-1} BTM) erreicht wurde, ergaben sich Wachstumsphasen von 12 h , 16 h , 20 h und 24 h (Abbildung 7.2). Dabei wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten inokuliert, sodass zur selben Zeit mit $1,52\text{ nIPTG}$ induziert werden konnte.

In den ersten 8 h der Produktionsphase sind nur geringe Unterschiede in der Proteinproduktion zu sehen (Abbildung 7.2 A-C). Niedrigere Wachstumsraten zeigten insgesamt nur einen geringen Einfluss auf die Proteinproduktion. Im Reaktor mit dem kürzesten Wachstum von 12 h produzierten die Zellen jedoch deutlich langanhaltender als in den anderen drei Reaktoren und erreichten am Ende eine mehr als doppelt so hohe Proteinkonzentration.

Je kürzer die Wachstumsphase, desto geringer war die Ammoniumkonzentration zum Induktionszeitpunkt (Abbildung 7.2 E). Sie fiel jedoch in allen Reaktoren während der Produktionsphase schnell ab. Hier wurde ein $1/7$ -verdünntes Medium eingesetzt (vgl. Abschnitt 5.6). Der Glucoseverbrauch während der Produktion (Abbildung 7.2 F) war trotz vergleichbarer Zelldichten und gleichem Zulauf in den Reaktoren unterschiedlich. Bei der höchsten Wachstumsrate reicherte sich Glucose schneller an, war am Ende jedoch vergleichsweise niedrig. Beim Ansatz mit 16 h Wachstum reicherte sich Glucose hingegen zu Beginn der Produktion kaum an, erreichte jedoch am Ende den höchsten Wert.

Die pO_2 -Aufzeichnungen zeigen auch (Abbildung 7.2 D), dass der Stoffwechsel während der Produktion unterschiedlich ausfiel. In den drei Ansätzen mit der längeren Wachstumsphase stieg der pO_2 während der Produktion deutlich, was auf einen verringerten Stoffwechsel hindeutet. Bei dem Ansatz mit dem schnellsten Wachstum war dies erst zum Ende der Produktionsphase der Fall und die Zellen waren länger zu hohem Stoffwechsel in der Lage.

Um die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit dieser Ergebnisse zu zeigen, wurden analog vier Kultivierungen im Liter-Maßstab mit 2 L Startvolumen durchgeführt – mit sehr ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 7.3). Nach 8 h Produktion war bei den längeren Wachstumsphasen keine oder nur eine geringe Steigerung der C16-Konzentration zu sehen. Bei der Kultivierung mit 12 h Wachstumsphase wurde jedoch eine Erhöhung der C16-Konzentration nach 8 h Produktion gemessen. Auch die Ammoniumkonzentrationen zum Induktionszeitpunkt zeigten ein ähnliches Verhalten mit niedrigeren Werten für die kürzeren Wachstumsphasen. Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen stieg die OD_{600}

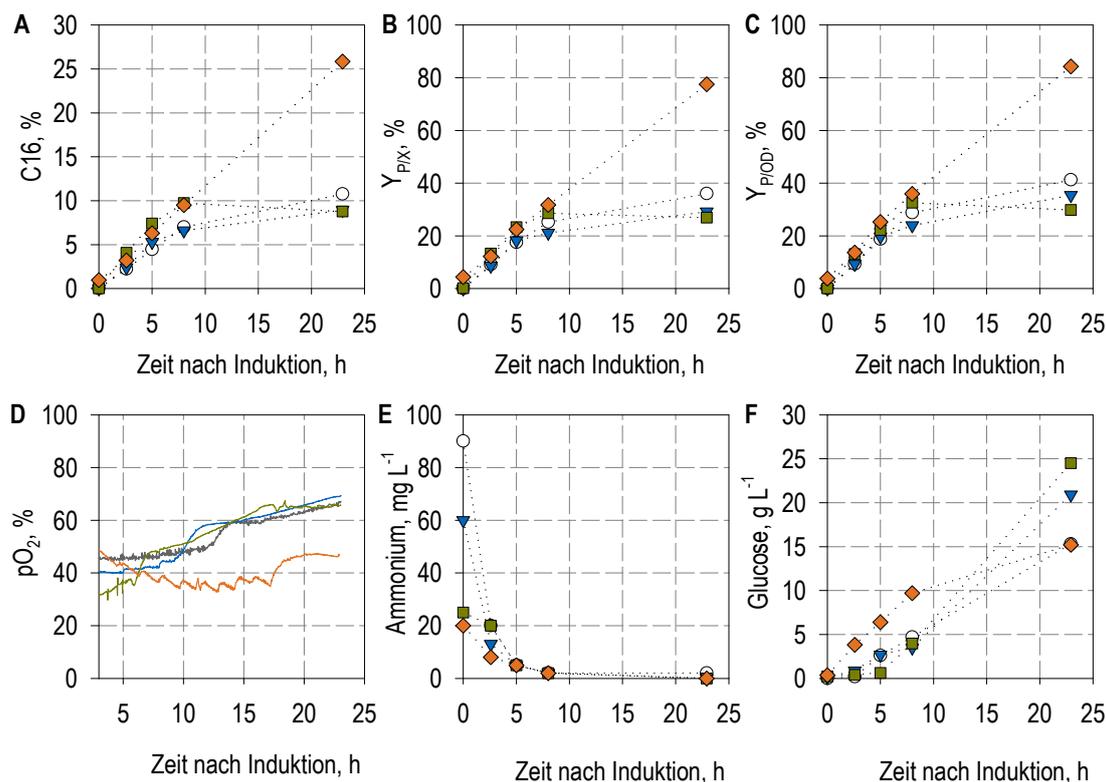


Abbildung 7.2: Vier parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab (0,5 L Startvolumen) zur Expression von C16 mit vier verschiedenen Wachstumsraten μ_{set} von 0,1 bis 0,2 h⁻¹. Daraus ergaben sich unterschiedlich lange Wachstumsphasen von 24 h (○), 20 h (▼), 16 h (■) und 12 h (◆). In (A) sind die C16-Konzentrationen und in (B) und (C) der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/X}$ beziehungsweise $Y_{P/OD}$ aufgetragen. In (D) sind die Verläufe des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 gezeigt und in (E) und (F) die Konzentrationen von Ammonium und Glucose.

und BTM bei der Kultivierung mit dem schnellsten Wachstum während der gesamten Produktionsphase (Daten nicht gezeigt). Auch das pO_2 -Signal fiel bei dieser Kultivierung während der gesamten Produktion, im Gegensatz zu den Kultivierungen mit langsameren Zulaufzeiten.

Diskussion

Insgesamt kann sich schnelles Wachstum der Zellen positiv auf die Proteinproduktion auswirken, was reproduzierbar für niedrige Zelldichten gezeigt wurde. Die kürzeste Wachstumsphase von 12 h resultierte im vollständig unlimitierten Wachstum (Abbildung 7.3) oder einer Limitierung durch den exponentiellen Zulauf erst in den letzten zwei Stunden vor Induktion (Abbildung 7.2). Dies führte entsprechend zur Bildung von Acetat. Es wurden jeweils zum Induktionszeitpunkt 2,2 g L⁻¹ und 2,4 g L⁻¹ Acetat in den Kultivierungen in Abbildung 7.2 und 7.3 gemessen (Daten nicht gezeigt). Dies wirkte sich jedoch nicht direkt negativ auf die Proteinproduktion aus. Bei den längeren Wachstumsphasen wurde keine Acetatbildung beobachtet.

Für den Einfluss der Wachstumsrate finden sich unterschiedliche Belege in der Literatur. Einerseits wurde kein Zusammenhang festgestellt. Für die Produktion des huma-

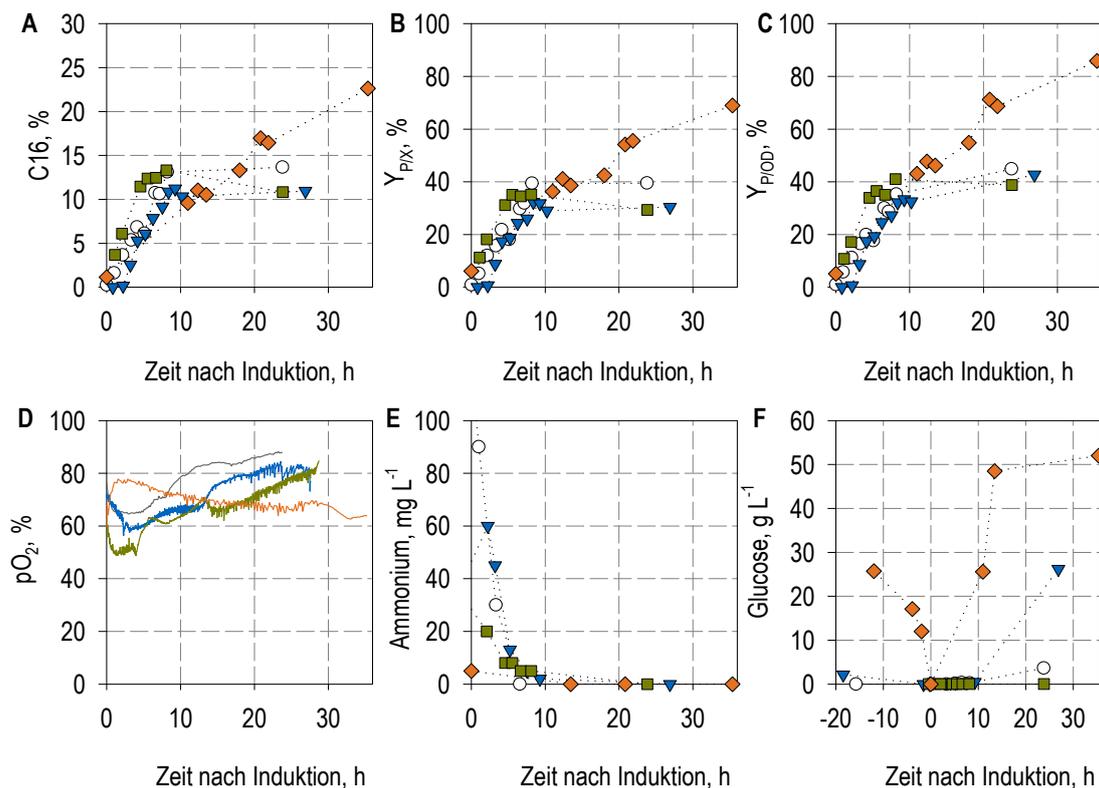


Abbildung 7.3: Vier serielle Kultivierungen im Liter-Maßstab (2 L Startvolumen) mit vier verschiedenen Wachstumsraten zur Reproduktion der Ergebnisse aus Abbildung 7.2. Es wurde ebenfalls unterschiedlich lange Wachstumsphasen von 24 h (○), 20 h (▼), 16 h (■) und 12 h (◆) eingestellt. In (A) sind die C16-Konzentrationen und in (B) und (C) ist der zellspezifische C16-Gehalt bezogen auf die BTM ($Y_{P/X}$) oder OD₆₀₀ ($Y_{P/OD}$) aufgetragen. In (D) sind die Verläufe des Sauerstoffpartialdruckes pO₂ gezeigt und in (E) und (F) die Konzentrationen von Ammonium und Glucose.

nen Mini-Proinsulins in einem *E. coli* BL21(DE3) beispielsweise konnte keine Korrelation zwischen der Proteinsynthese und der Wachstumsphase vor Induktion gefunden werden (Shin et al., 1997).

Andererseits waren eher niedrige Wachstumsraten von $\mu < 0,20 \text{ h}^{-1}$ vorteilhaft. Die Expression von IFN- α (Alpha-Interferon) war bei der niedrigeren Wachstumsrate $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ höher als bei der maximalen Wachstumsrate $\mu_{max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$ (Riesenberg et al., 1990). Hellmuth et al. (1994) konnten eine höhere spezifische Aktivität von β -Galactosidase bei $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$ als bei $\mu = 0,11$ und $0,16 \text{ h}^{-1}$ messen, während sich die Proteinkonzentration nur gering zwischen den Wachstumsraten veränderte. Die Expression des Enzyms DERA (2-Deoxyribose-5-Phosphat-Aldolase) war am effizientesten bei $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ verglichen zu $\mu_{set} = 0,20$ oder $0,10 \text{ h}^{-1}$ (Pei et al., 2010).

Oder aber eher höhere Wachstumsraten von $\mu \geq 0,20 \text{ h}^{-1}$ zeigten sich am geeignetsten. Bei der Expression von 6xHis-MBP-RI (RNase A-Inhibitor) war eine Wachstumsrate bei Induktion von $\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$ besser als $\mu = 0,33$ und $0,10 \text{ h}^{-1}$ (Siurkus et al., 2010). Eine ähnliche Wachstumsrate von $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ war auch für die Expression von Chloramphenicol und β -Lactamase vorteilhaft (Bentley et al., 1990). Ähnlich war auch die Produktion von TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) bei $\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$ höher als bei $0,05$ – $0,1 \text{ h}^{-1}$ und $0,3$ –

$0,4 \text{ h}^{-1}$ (Luo et al., 2006). Es wurde schließlich als letztes Beispiel eine höhere Expression von β -Galactosidase nach der Induktion mit IPTG im Zulaufprozess bei $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$ als bei $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ gemessen (Sandén et al., 2003).

Der Einfluss der Wachstumsrate könnte von dem verwendeten Expressionssystem, dem produzierten Protein und dem Produktionsprozess abhängen. Eine mögliche Ursache für die bessere Proteinproduktion mit dem schnellsten Wachstum in den Kultivierungen in den Abbildungen 7.2 und 7.3 könnte die Ammoniumversorgung sein. Das schnellere Wachstum führte zur größerer Ammoniumzugabe während des Wachstums (nicht gezeigt) und gleichzeitig geringeren Ammoniumkonzentrationen zum Ende der Wachstumsphase, insgesamt also einem höheren Ammoniumbedarf. Der höhere Ammoniumbedarf könnte zu einer stärkeren Ammoniumlimitierung führen. Eine Ammoniumlimitierung könnte von Vorteil sein, da bei Stickstoffmangel die Expressionsrate verringert werden sollte. Dadurch würde sich auch die metabolische Last reduzieren und die Zellen könnten ihren eigenen Stoffwechsel länger aufrecht halten. Limitierende Ammoniumkonzentrationen wurden allerdings auch bei den geringeren Wachstumsraten gemessen, da hier jeweils 1/7-verdünnte Medien verwendet wurden. Zudem wurde bei den Kultivierungen in Abbildung 7.1 das Medium unverdünnt, also mit wesentlich mehr Ammonium, eingesetzt und ebenfalls der Einfluss des Wachstums beobachtet. Daher kann die Ammoniumversorgung nicht allein für die veränderte Proteinproduktion verantwortlich sein.

Das Wachstum hat einen nicht vernachlässigbaren Einfluss auf die Proteinproduktion. Die Übertragung der Ergebnisse in den Produktionsmaßstab ist leider nicht direkt möglich. Ein Hochzellichteprozess mit hohem exponentiellen Wachstum würde einen sehr hohen Sauerstoffeintrag erfordern. Ein zu langsames Wachstum könnte jedoch auch bei hohen Zelldichten die Proteinproduktion beeinflussen.

7.2 Wachstum bei Hochzelldichtekultivierungen

Expression in verschiedenen Wachstumsphasen

Wie bereits beschrieben, durchlaufen die Zellen in der Referenz-Hochzelldichtekultivierung verschiedene Wachstumsphasen mit unterschiedlichen Wachstumsraten (unlimitiert, $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ und $\mu < 0,15 \text{ h}^{-1}$). Da die Wachstumsrate einen Einfluss auf die Proteinproduktion zeigte, könnte sich demnach die Fähigkeit zur Expression im Verlauf einer Hochzelldichtekultivierung ändern. Um dies zu untersuchen, wurde eine Kultivierung im Liter-Maßstab mit den beschriebenen Wachstumsphasen durchgeführt (Abbildung 7.4): Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose, exponentielle Zulaufphase mit $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ und eine konstante Zulaufphase mit etwa $10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Zellen geerntet, in den Milliliter-Maßstab überführt und die Expression durch Zugabe von $1,52 \text{ nIPTG}$ gestartet. Die Zellen wurden beim Transfer verdünnt, um im Milliliter-Maßstab ähnliche Zelldichten zu erreichen.

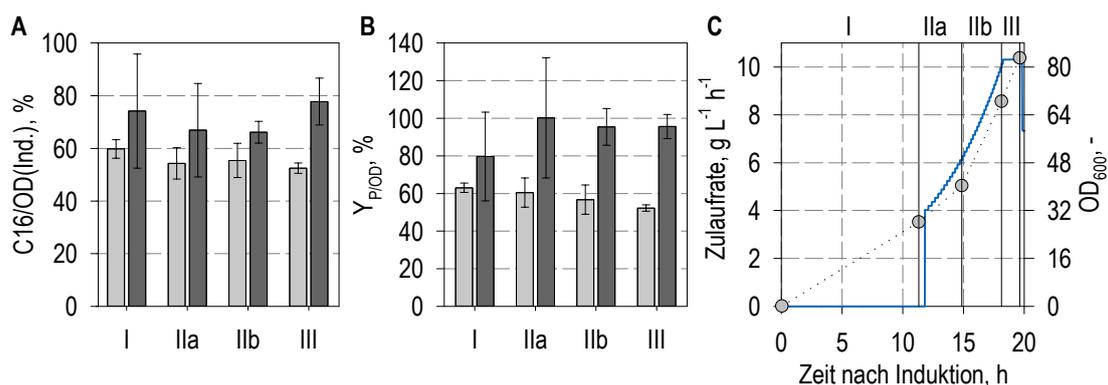


Abbildung 7.4: Änderung der Proteinproduktion im Verlauf einer Zulaufkultivierung mit hohen Zelldichten. Die Zellen wurden im Liter-Maßstab kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet: nach der Satzphase (I, 11,3 h), in der exponentiellen Zulaufphase (IIa, 14,9 h und IIb, 18,1 h) sowie nach einer konstanten Zulaufphase (III, 19,7 h). Die geernteten Zellen wurden in den Milliliter-Maßstab transferiert, verdünnt und induziert. Hier wurde die Expression nach 8 h (■) und 24 h (■) bestimmt. Da trotz Verdünnung unterschiedliche Zelldichten eingesetzt wurden, sind die C16-Konzentrationen auf die optische Dichte zur Induktion (A) oder zum Zeitpunkt der Probenahme ($Y_{P/OD}$, B) normiert. In (C) ist das Zulaufprofil (—) sowie die optischen Dichten (●) der Kultivierung im Liter-Maßstab aufgetragen. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 5–6 parallelen Kultivierungen.

Nach 8 h Produktion erreichten die früher geernteten Zellen leicht höhere C16-Konzentrationen sowie spezifische C16-Konzentration $Y_{P/OD}$ (Abbildung 7.4 A-B). Um die C16-Konzentrationen vergleichbarer zu machen, wurden die Werte auf die optische Dichte zum Induktionszeitpunkt normiert und somit die unterschiedlichen Verdünnungen berücksichtigt. Nach 24 h Expression ist keine klare Tendenz mehr auszumachen. Die Varianzen zwischen parallelen Reaktoren innerhalb einer Bedingung sind hierfür zu groß.

Substratkonzentration im Satzmedium

Eine lange Satzphase mit hoher Glucosekonzentration und unlimitiertem Wachstum führt zur Bildung von Acetat und zu einer undefinierten Prozessführung, da die Dauer der Satzphase stärker von der Zelldichte der Vorkultur abhängig ist. Durch den Verzicht auf die Satzphase und eine Wachstumslimitierung von Beginn an könnte die Biomassebildung robuster gestaltet werden (Jenzsch et al., 2006). In Abbildung 7.5 sind zwei Zulaufprofile gezeigt, für den Prozess mit 25 g L^{-1} Glucose und langer Satzphase sowie für den Prozess mit 1 g L^{-1} Glucose im Satzmedium und einer exponentiellen Zulaufphase von Beginn an.

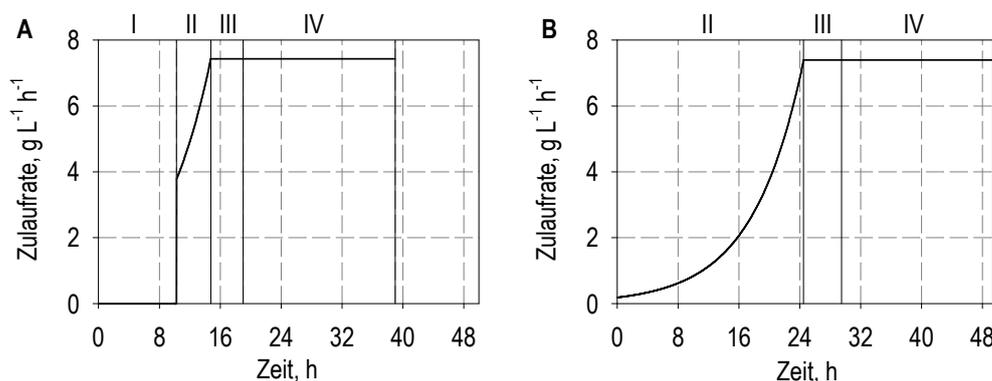


Abbildung 7.5: In (A) ist das Zulaufprofil für den Referenzprozess mit 25 g L^{-1} Glucose im Satzmedium und vier Phasen dargestellt: Satzphase (I), exponentielle Zulaufphase (II, $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$), konstante Zulaufphase (III) und Produktionsphase mit konstantem Zulauf (IV). In (B) ist das Zulaufprofil für den Prozess mit 1 g L^{-1} Glucose und ohne Satzphase gezeigt.

Einerseits könnte die Biomassebildung zwar mit einer kurzen Satzphase robuster gestaltet sein. Andererseits wirken sich hohe Wachstumsraten, wie in Abschnitt 7.1 gezeigt, positiv auf die Expression aus, zumindest bei niedrigen Zelldichten. In einem Hochzell-dichteprozess können hohe Zulaufzeiten nur zu Beginn der Wachstumsphase realisiert werden, da hier der Sauerstoffbedarf noch nicht zu hoch ist. Daher wurde hier untersucht, ob sich unterschiedlich hohe Glucosekonzentrationen im Satzmedium und damit unterschiedlich langes unlimitiertes Wachstum auf die Produktion auswirken.

In Abbildung 7.6 sind Zulaufkultivierungen im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Satzmedium zu sehen. Es wurde hier dieselbe Vorkultur verwendet und alle Ansätze gleichzeitig inokuliert. Die unterschiedlichen Glucosemengen aus dem Satzmedium wurden durch entsprechend angepasste Zulaufzeiten kompensiert.

Im Ansatz mit 40 g L^{-1} kam es zum Ende der Satzphase zu einer vorübergehenden Sauerstofflimitierung (etwa 1 h; Daten nicht dargestellt). Zudem entfiel hier im Gegensatz zu den anderen Ansätzen die exponentielle Zulaufphase. Nach der Satzphase startete gleich die konstante Zulaufphase mit einer Zulaufzeit von $5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. In den Ansätzen mit $1-25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose startete nach der Satzphase eine exponentielle Zulaufphase bis die maximale Zulaufzeit von $5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht wurde und die exponentielle Zulaufphase in die konstante überging. Es wurde mit $1,52 \text{ nIPTG}$ induziert und nach 20 h die Produktkonzentration bestimmt. Durch die unterschiedlich lange Zulaufphase unterschieden sich die Volumina deutlich zwischen den Ansätzen. Daher wurde die C16-Konzentration

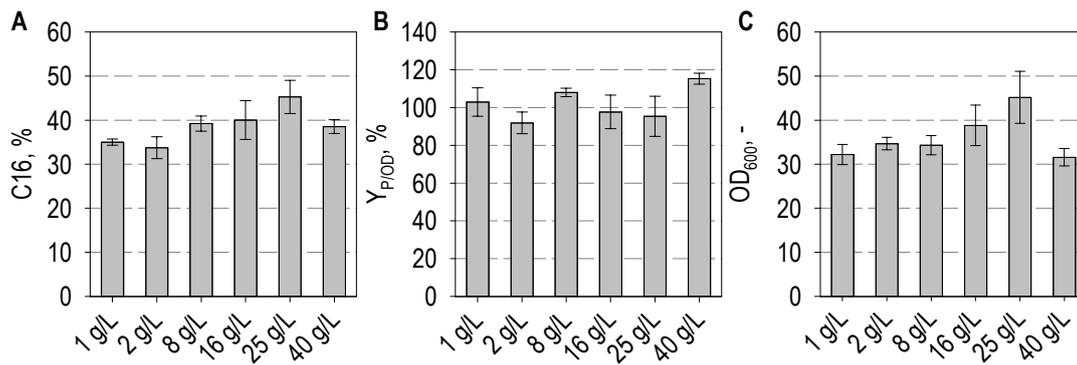


Abbildung 7.6: Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Satzmedium. Es sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten (C) nach 20 h Expression dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus 3–6 parallelen Kultivierungen.

und die optische Dichte entsprechend korrigiert, um die Ansätze besser vergleichen zu können.

Für die C16-Konzentration und die optische Dichte ergab sich dadurch ein eindeutiges Maximum bei 25 g L^{-1} Glucose im Satzmedium. Höhere und niedrigere Glucosekonzentration verschlechterten die Expression und das Wachstum. Für den zellspezifischen C16-Gehalt $Y_{P/OD}$ (Abbildung 7.6 B) war hingegen keine klare Tendenz erkennbar.

Verschiedene Glucosekonzentrationen im Satzmedium wurden zusätzlich im Liter-Maßstab ($0,5 \text{ L}$ Startvolumen) untersucht. Hier konnten deutlich höhere Zelldichten und höhere Zulaufraten realisiert werden.

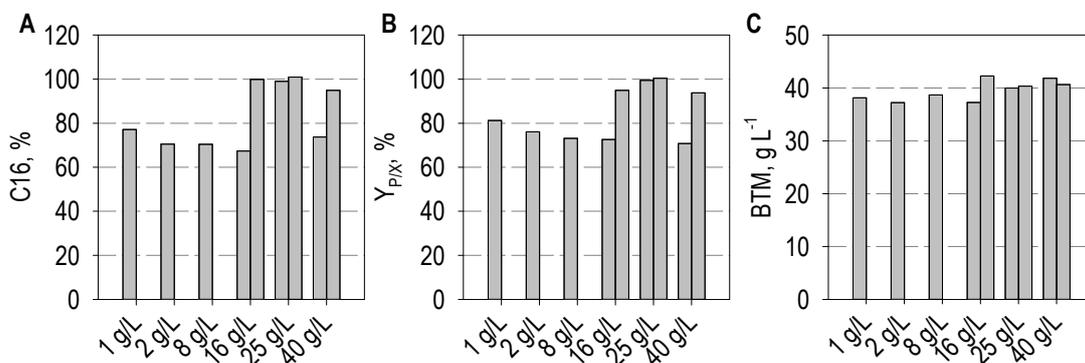


Abbildung 7.7: Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Satzmedium. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C) nach 20 h Expression. Für die Ansätze mit 16 , 25 und 40 g L^{-1} sind jeweils die Ergebnisse aus zwei Kultivierungen gezeigt.

In Abbildung 7.7 sind Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchsläufen mit je 2–4 parallelen Kultivierungen dargestellt. Der erste Kultivierungslauf enthielt zwei Reaktoren mit 2 und 25 g L^{-1} Glucose, der zweite Lauf die Reaktoren mit 1 , 8 , 16 und 40 g L^{-1} und der dritte Reaktoren mit 16 , 25 und 40 g L^{-1} . Während die Reproduzierbarkeit für den Ansatz mit 25 g L^{-1} Glucose gegeben war, war dies für die Ansätze mit 16 und 40 g L^{-1}

Glucose weniger der Fall. Jedoch lässt sich festhalten, dass die Proteinproduktion mit 25 g L^{-1} Glucose im Satzmedium deutlich höher ausfiel als mit Konzentrationen von $1\text{--}8 \text{ g L}^{-1}$ Glucose.

Vereinfachung des Zulaufprofil

In der Satzphase wachsen die Zellen unlimitiert und werden in der zweiten Wachstumsphase durch ein exponentielles Zulaufprofil auf eine Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ gebremst. Da schnelles Wachstum für die Expression nicht unbedingt schädlich ist, wie in Abschnitt 7.1 gezeigt, wurde untersucht, ob die exponentielle Zulaufphase mit einem langsamen Wachstum überhaupt notwendig ist. Ohne eine exponentielle Zulaufphase könnte das Zulaufprofil deutlich vereinfacht werden, indem direkt nach der Satzphase ein konstanter Zulauf gestartet wird (Abbildung 7.8).

Das vereinfachte Zulaufprofil wurde in parallelen Kultivierungen im Milliliter- und Liter-Maßstab untersucht (Abbildung 7.9 und 7.10). Die Proteinproduktion nach 20 h war in beiden Maßstäben jeweils zwischen dem vereinfachten und dem ursprünglichen Zulaufprofil vergleichbar. Im Milliliter-Maßstab waren die optischen Dichten zum Ende der Produktionsphase etwas geringer mit dem vereinfachten Zulaufprofil (Abbildung 7.9 C). Im Liter-Maßstab hingegen fielen die optischen Dichten mit dem vereinfachten Zulaufprofil zwischen 20 und 24 h Expression im Gegensatz zum Referenzansatz nicht ab (Abbildung 7.10 F). Zudem stieg auch die C16-Konzentration in diesem Zeitabschnitt mit dem vereinfachten Zulaufprofil stärker an (Abbildung 7.10 A) und lag mit 122 % C16 deutlich über dem Referenzprozess mit 104 % C16. Für die Normierung der Produktkonzentration dienten die Werte nach 20 h Produktion im Referenzprozess als Basis. Nach 24 h Produktion, also 4 h später war die C16-Konzentration im Referenzansatz nur geringfügig höher.

Zusätzlich wurde die Prozesszeit geringfügig verkürzt. So wurde beim konstanten Zulauf nach 20,9 h statt 21,9 h induziert.

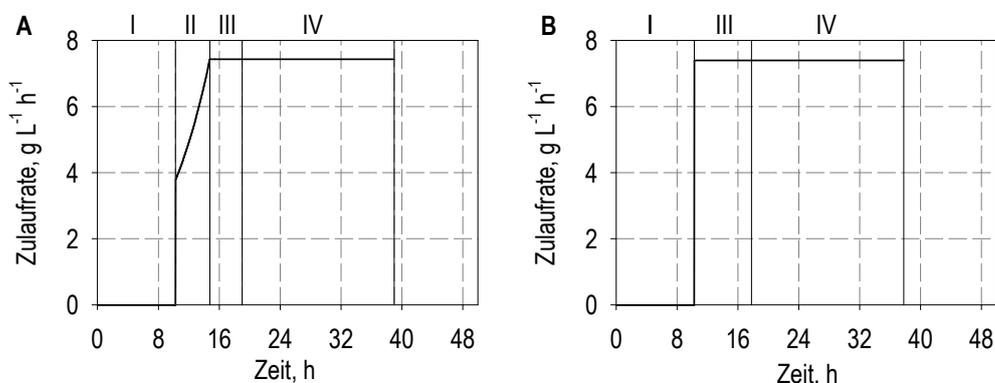


Abbildung 7.8: In (A) ist zum Vergleich nochmals das Zulaufprofil für den Referenzprozess mit den vier Phasen dargestellt. In (B) ist ein vereinfachtes Zulaufprofil aus Satzphase (I), konstanter Zulaufphase (III) und Produktionsphase (IV) gezeigt. Die exponentielle Zulaufphase (II) fehlt hier.

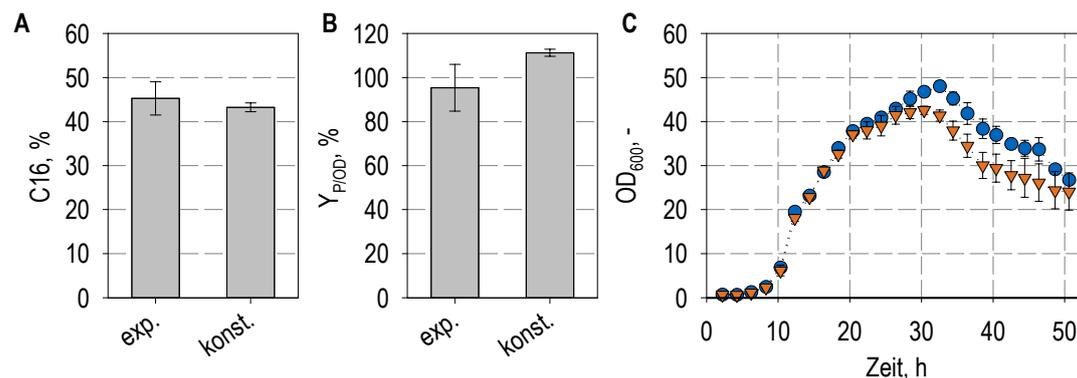


Abbildung 7.9: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Zulaufprofilen: mit exponentieller Zulaufphase (exp., ●) oder ausschließlich konstanter Zulaufphase (konst., ▼). Es sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) nach 24 h Produktion sowie die optischen Dichten (OD_{600} , C) im Prozessverlauf dargestellt. Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus 3–6 parallelen Kultivierungen.

Diskussion

Ausgehend von der Expression nach 8 h Stunden in Abbildung 7.4 verlieren Zellen während einer Hochzelldichtekultivierung geringfügig an der Fähigkeit zur Proteinproduktion. Die Zellen sind zu Beginn, also während oder kurz nach dem schnellen Wachstum, „fitter“. Dies würde mit den Ergebnissen aus Abschnitt 7.1 übereinstimmen, dass Zellen nach schnellem Wachstum besser produzierten. Allerdings sind diese Effekte nach einer längeren Expressionszeit nicht mehr messbar, vor allem aufgrund relativ hoher Standardabweichungen nach 24 h Produktionsphase in Abbildung 7.4. Die Instabilität der pH-Messung war hier problematisch.

Die Satzphase zeigte bei Kultivierungen mit hohen Zelldichten eine Auswirkung auf die deutlich spätere Produktionsphase. In Abbildung 7.6 ist erkennbar, dass höhere Glucosekonzentrationen bis 25 g L^{-1} zu einer besseren Proteinproduktion führen können. Eine Glucosekonzentration von 40 g L^{-1} jedoch verursachte bereits Sauerstofflimitierungen und somit eine schlechtere Proteinproduktion.

Die Biotrockenmassekonzentrationen der Vorkultur beziehungsweise Anfangsbiomasse nach Inokulation sowie die anfängliche spezifische Wachstumsrate, üblicherweise unlimitiert in industriellen Prozessen, haben einen starken Einfluss auf die gesamte Wachstumsphase (Jenzsch et al., 2006). Da diese Variablen nur ungenau bestimmt werden können, stört dies eine zuverlässige Prozessführung. Durch eine kontrollierte Wachstumsrate deutlich unter der maximalen Wachstumsrate von Beginn der Kultivierung an wäre die Prozessführung robuster und der Einfluss der Vorkultur voraussichtlich geringer. Allerdings hatte eine Verringerung der Glucosekonzentration im Satzmedium keinen Vorteil für die Expression von C16. Stattdessen verlängert es nur den Prozess und verringert dadurch zusätzlich die Produktivität. Wie in Abbildung 7.5 zu erkennen, ist ein Prozess mit 25 g L^{-1} Glucose im Satzmedium um rund 10 h kürzer im Vergleich zu 1 g L^{-1} Glucose und $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Die maximale Wachstumsrate in dem definierten Medium wurde hingegen bei $\mu_{max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ gemessen (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Verkürzung der Prozesszeit um etwa 1 h konnte mit der Vereinfachung des

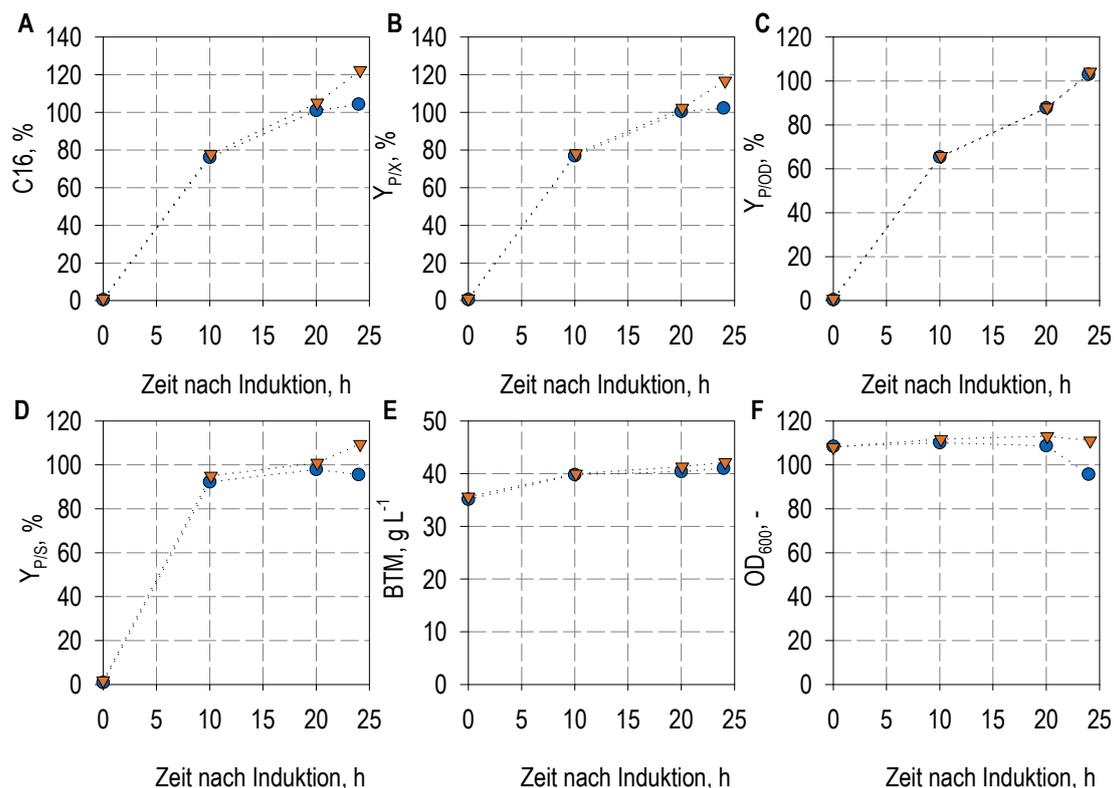


Abbildung 7.10: Zulaufkultivierungen zur Expression von C16 im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Zulaufprofilen: mit exponentieller Zulaufphase (●, Referenz) oder ausschließlich konstanter Zulaufphase (▼). Es sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) und ($Y_{P/OD}$, C), die Produktausbeuten ($Y_{P/S}$ D), die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, E) und die optischen Dichten (OD_{600} , F) gezeigt.

Zulaufprofil erreicht werden (Abbildung 7.8). Auf die exponentielle Zulaufphase kann komplett verzichtet und gleich nach der Satzphase die konstante Zulaufphase gestartet werden. Dadurch ist die Wachstumsrate direkt nach der Satzphase deutlich höher als $0,15 \text{ h}^{-1}$ und sinkt kontinuierlich im weiteren Verlauf. Khalilzadeh et al. (2003) konnte ebenfalls mit einer variablen Wachstumsrate ($\mu = 0,12 - 0,52 \text{ h}^{-1}$) eine höhere Expression von hIFN- γ (humanes Gamma-Interferon) erzielen als mit einer vergleichsweise niedrigen konstanten Wachstumsrate von $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Beim konstanten Zulauf nach der Satzphase ist neben der kürzeren Prozesszeit vor allem die vereinfachte Prozessführung ein entscheidender Vorteil.

8 Induktion und Expression

Während im letzten Kapitel die Wachstumsphase untersucht wurde, soll hier nun auf die Produktionsphase genauer eingegangen werden. Die Expression wird durch Zugabe eines Induktors (IPTG) gestartet und daher kann die Identifizierung geeigneter Induktionszeitpunkte und Induktorkonzentrationen zur Prozessintensivierung und insbesondere zur Erhöhung des zellspezifischen Produktgehalts beitragen. Zunächst wird der Zusammenhang zwischen IPTG-Konzentration und Zelldichte betrachtet. Daraufhin wird die IPTG-Konzentration im Zusammenhang mit der Zulauftrate untersucht. Verschiedene Induktionszeitpunkte beziehungsweise Induktionsstrategien werden abgeleitet. Eine besonders geeignete Induktionsstrategie wird in größeren Maßstab übertragen und basierend auf den Ergebnissen die Autoinduktion weiterentwickelt.

8.1 Optimierung der Induktion

8.1.1 IPTG-Konzentration und Zelldichte

Starke Induktion und Zelldichte

Zur Optimierung der IPTG-Konzentration und Untersuchung des Zusammenhangs mit der Zelldichte wurde im Milliliter-Maßstab zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1,00 bis 1,52 nIPTG induziert (Abbildung 8.1).

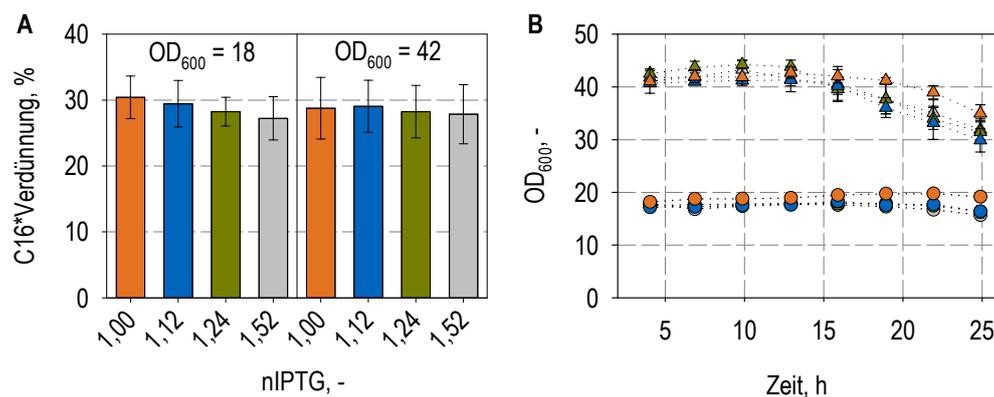


Abbildung 8.1: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit zwei unterschiedlichen Zelldichten und vier IPTG-Konzentrationen. Die Wachstumsphase wurde im Liter-Maßstab durchgeführt, mit zwei verschiedenen Zelldichten (OD_{600} von 18 und 42) in den Milliliter-Maßstab überführt und mit jeweils vier verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1,00 – 1,52 nIPTG) induziert. Die höhere Zelldichte wurde direkt verwendet, die niedrigere mit sterilem VE-Wasser verdünnt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen nach 8 h multipliziert mit der Verdünnungsrate (A) sowie die optische Dichten OD_{600} im Prozessverlauf (B). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–5 parallelen Kultivierungen.

Die Wachstumsphase wurde im Liter-Maßstab durchgeführt, die Zellen dann in den Milliliter-Maßstab zur Produktion überführt und ein Teil davon 1/3 verdünnt. Die Verdünnung hatte das Ziel, Zellen zu verwenden, die dieselbe Wachstumsphase durchlaufen haben, aber in unterschiedlicher Zelldichte vorliegen. Würde hingegen die Induktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten und damit verschieden hohen Zelldichten miteinander verglichen werden, so könnte die Wachstumsphase sowie das Verhältnis Mediumkomponenten/Zelldichte eine Rolle spielen.

In Abbildung 8.1 ist zu erkennen, dass sowohl bei den niedrigen Zelldichten als auch bei den hohen Zelldichten die Proteinproduktion unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration verlief. In beiden Fällen ist auch kein Unterschied beim Verlauf der optischen Dichten zwischen 1,12 bis 1,52 nIPTG zu sehen (Abbildung 8.1 B), während die Ansätze mit 1,00 nIPTG den stabilsten OD_{600} -Verlauf zeigten. Der zellspezifische C16-Gehalt $Y_{P/OD}$ war höher bei den Ansätzen mit $OD_{600} = 42$ als bei $OD_{600} = 18$ (nicht dargestellt), da sich die höheren OD_{600} -Werte während der Produktion stärker verringerten als die niedrigeren OD_{600} -Werte. Wird jedoch die C16-Konzentration auf die Verdünnung der Zellen zum Induktionszeitpunkt normiert, so zeigt sich, dass die zellspezifische Produktion unabhängig von der Zelldichte zum Induktionszeitpunkt ist.

Einschränkung der notwendigen minimalen IPTG-Konzentration

Offensichtlich ist eine IPTG-Konzentration von 1,52 nIPTG nicht notwendig. Da IPTG im Referenzprozess ein nicht vernachlässigbarer Kostenfaktor ist, wurde eine Reduktion der IPTG-Konzentration angestrebt. Daher war nun die untere Grenze der IPTG-Konzentration mit einer einsetzenden Expression unter Prozessbedingungen von Interesse. Hierfür wurde eine Kultivierung im Liter-Maßstab durchgeführt (Abbildung 8.2), bei der nacheinander mit 0,33, 0,60 und 0,88 nIPTG induziert wurde.

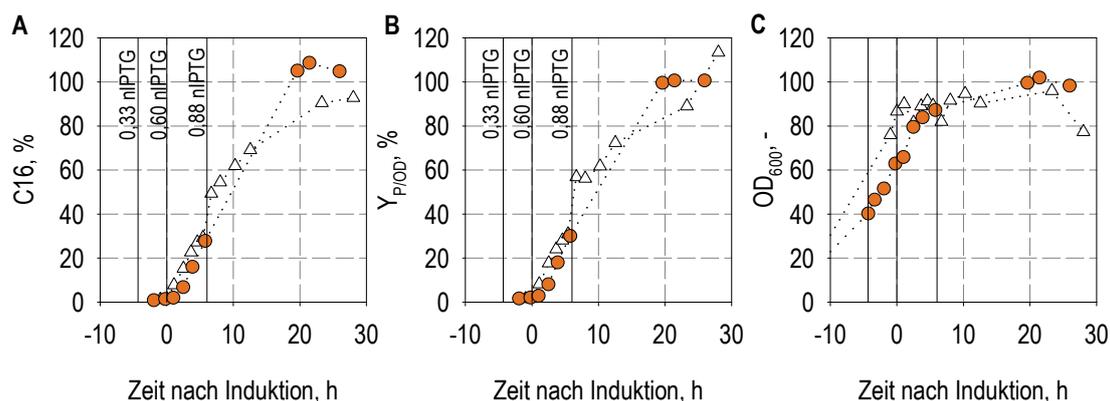


Abbildung 8.2: Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Expression von C16 mit minimaler IPTG-Konzentration. In der als Referenz gezeigten Kultivierung (Δ) wurde einmalig mit 1,00 nIPTG induziert. In der zweiten Kultivierung (\bullet) wurde sequenziell drei Mal induziert, mit 0,33 nIPTG (-4,3 h), 0,60 nIPTG (0 h) und 0,88 nIPTG (6 h). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) und die optischen Dichten (OD_{600} , C). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Zugabe von 1,00 nIPTG beziehungsweise 0,60 nIPTG als Induktionsstart (= 0 h) gesetzt. Die vertikalen Striche markieren die Zeitpunkte der IPTG-Zugaben.

Während in den 4,3 h nach 0,33 nIPTG-Zugabe keine Expression messbar war ($<2\%$ C16), war die Produktion nach knapp 6 h mit 0,60 vergleichbar wie bei der Induktion mit 1,00 nIPTG (in einer weiteren Kultivierung im Liter-Maßstab). Da das Wachstum der Zellen durch 0,60 nIPTG kaum beeinträchtigt wurde, wurde während der Kultivierung nicht davon ausgegangen, dass die Induktion bereits so stark erfolgt war. Daher wurde die IPTG-Konzentration auf insgesamt 0,88 nIPTG erhöht. Es wurden C16-Konzentrationen von über 100 % erreicht. Eine erfolgreiche Induktion fand bei wesentlich geringeren IPTG-Konzentration statt, als erwartet wurde. Daher wurde der zu untersuchende Bereich für die Optimierung der IPTG-Konzentrationen in den nächsten Schritten entsprechend angepasst.

Schwache Induktion und Zelldichte

Nachdem bereits etwa 0,60 nIPTG für die Induktion ausreichend waren und keine Abhängigkeit der Zelldichte von der Induktion in Abbildung 8.1 beobachtet wurde, wurden in einer weiteren Kultivierung im Milliliter-Maßstab drei sehr geringe IPTG-Konzentrationen (0,33–0,72 nIPTG) bei drei unterschiedlichen Zelldichten eingesetzt (Abbildung 8.3).

Für die Induktion mit 0,33 nIPTG konnte keine Produktbildung gemessen werden, unabhängig von der Zelldichte. Dies stimmt mit der Kultivierung aus Abbildung 8.2 überein. Die beste Proteinproduktion wurde hier mit 0,72 nIPTG erzielt. Hier waren die $Y_{P/OD}$ (B) des Ansatzes mit den höchsten optischen Dichten (1/1) etwas höher als bei den geringeren Zelldichten. Wird jedoch die C16-Konzentration mit der Verdünnung multipliziert (A), so war die Produktion bei allen drei Zelldichten vergleichbar. Die Induktion mit 0,52 nIPTG führte bei den drei untersuchten Zelldichten zu unterschiedlicher Produktbildung ohne klaren Trend, da die mittlere Zelldichte die höchste C16-Konzentration aufwies.

Abbildung 8.3 (D) veranschaulicht die Zunahme der Zelldichte während der Produktionsphase, indem das Verhältnis der OD_{600} nach 23 h Produktionsphase zu der OD_{600} zum Induktionszeitpunkt gebildet wurde. Die relative OD_{600} -Zunahme war bei den Verdünnungen 1/9 und 1/3 vergleichbar und bei den unverdünnten Zellen (1/1) geringer. Vor allem bei hohen Zellkonzentrationen scheint der intermittierende Zulauf im Milliliter-Maßstab zu einer vergleichsweise geringeren OD_{600} zu führen. Wie auch beim Verlauf der optischen Dichten (C) ist außerdem zu erkennen, dass die Zelldichten nach Induktion mit 0,33 und 0,52 nIPTG deutlich stärker zunahmen als nach Induktion mit 0,72 nIPTG.

Diskussion

Bei IPTG-Konzentrationen von 0,72 bis 1,52 nIPTG konnte reproduzierbar kein Zusammenhang zwischen Zelldichte zum Induktionszeitpunkt und der Produktion von C16 festgestellt werden. Zwar sind $Y_{P/OD}$ höher für höhere Zelldichten, allerdings ist dies darauf zurück zu führen, dass im Milliliter-Maßstab bei hohen Zelldichten die optische Dichten einen verhältnismäßig geringeren Anstieg zeigen beziehungsweise während der Produktion stärker fallen.

Bei den höheren Zelldichten in Abbildung 8.1 und 8.3 waren die Zulaufzeiten im Milliliter-Maßstab entsprechend höher, wodurch es bei dem intermittierenden Zulauf zu stär-

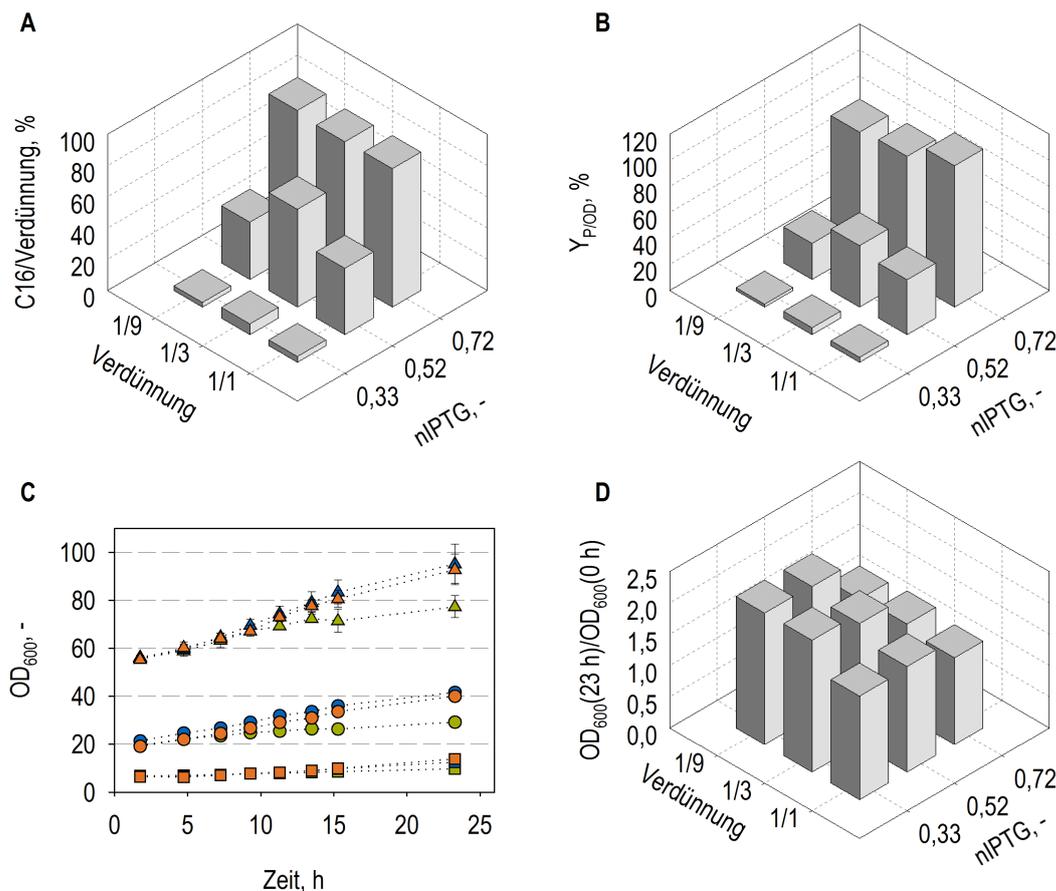


Abbildung 8.3: Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen Zelldichten und IPTG-Konzentrationen. Die Wachstumsphase wurde im Liter-Maßstab durchgeführt, in drei verschiedenen Zelldichten in Milliliter-Maßstab überführt und mit jeweils drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert: 0,33 nIPTG (\blacktriangle ■●), 0,52 nIPTG (\blacktriangle ■●) und 0,72 nIPTG (\blacktriangle ■●). Die höchste Zelldichte wurde direkt verwendet (\blacktriangle ■●), die niedrigeren mit sterilem VE-Wasser 1/3 (\bullet ●●) und 1/9 (\blacksquare ■●) verdünnt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen multipliziert mit der Verdünnung (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) nach 23 h Produktion, die optischen Dichten im Produktionsverlauf (C) und die relative Zunahme der OD_{600} während der Produktion (D). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 3–6 parallelen Kultivierungen.

keren Oszillationen des pO_2 und kurzzeitigen kritischen Sauerstoffkonzentrationen kam. Dies war allem Anschein nach für den stärkeren Abfall (Abbildung 8.1) beziehungsweise den geringeren Anstieg (Abbildung 8.3) der optischen Dichten verantwortlich, wirkte sich jedoch nicht auf die Produktbildung aus. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen aus Abschnitt 5.2 überein.

Striedner et al. (2003) entwickelten für *E. coli* HMS174(DE3) ein Induktionsverfahren mit einem konstanten Verhältnis von Induktor zu Biomasse. Das Induktionsverfahren basiert auf der Annahme, dass die Repressorkonzentration proportional zur Biomasse ist und dass die Repressormenge durch den Induktor titriert werden muss. Zudem müsste IPTG unabhängig von der Konzentration ungehindert in die Zellen diffundieren können, was nach neueren Erkenntnissen für geringe IPTG-Konzentrationen nicht der Fall ist (Fernández-Castané et al., 2012a). Modell-basiert wurde ein IPTG zu BTM Verhältnis

von $1,15 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ermittelt, ab dem die metabolische Last zu einer messbaren Verringerung der BTM führt. Bei der Validierung des Modells kam es jedoch trotz Einhaltung des Verhältnisses zu einer, wenn auch späteren, Verlangsamung des Wachstums.

Fernández-Castané et al. (2012a) verglichen die Induktion mit $20 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ IPTG bei Biotrockenmasskonzentrationen von 20 g L^{-1} und 40 g L^{-1} . Die zellspezifische Produktion von Rhamnose-1-Phosphat-Aldolase (RhuA) war bei 20 g L^{-1} BTM für beide IPTG-Konzentrationen jeweils etwa doppelt so hoch wie bei 40 g L^{-1} und damit abhängig von der Zelldichte zum Induktionszeitpunkt. Die Biomassebildung fand in einem zweiphasigen Prozess mit Satzphase (20 g L^{-1} Glucose) und exponentieller Zulaufphase ($\mu_{\text{set}} = 0,22 \text{ h}^{-1}$) statt. Die exponentielle Zulaufphase musste für die verschiedenen Zelldichten unterschiedlich lang sein, womit grundsätzlich Effekte durch das Wachstum nicht auszuschließen sind. Im Gegensatz dazu wurden bei den Versuchen in Abbildung 8.1 und 8.3 die Zellen für die unterschiedlichen Zelldichten verdünnt. Die durchlaufene Wachstumsphase war jeweils gleich und somit können Effekte des Wachstums ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass LacY eine aktive Rolle beim Transport von IPTG spielt und IPTG im Cytosol angereichert wird, wenn geringe Konzentrationen im Medium vorliegen, spricht gegen einen einfachen linearen Zusammenhang von IPTG und Zelldichte.

Die IPTG-Konzentration kann wie gezeigt deutlich verringert werden. Aus Sicht von Studier (2005) gehört zu den Nachteilen des T7-Expressionssystems, dass es sehr effektiv (hohe Produktbildung) und nicht ganz „dicht“ ist. Selbst ohne Zugabe eines Induktors kann deutliche Expression stattfinden, zum Beispiel wenn geringe Lactosekonzentrationen in komplexhaltigen Medien vorliegen. In den Kultivierungen in diesem Abschnitt wurden definierte Medien verwendet, die keine Lactose enthalten. Jedoch konnte mit nur $1,00 \text{ nIPTG}$ eine zum Referenzprozess ($1,52 \text{ nIPTG}$) vergleichbare C16-Produktion erzielt werden, was auch im Liter-Maßstab reproduziert werden konnte. Bei $0,72 \text{ nIPTG}$ wurden sogar $Y_{\text{P/OD}}$ -Werte von 109% erreicht – bei gleichzeitig deutlicher Zunahme der Zelldichte während der Produktion. $0,33 \text{ nIPTG}$ hingegen ist zu gering für eine Induktion, selbst bei sehr niedrigen Zelldichten (OD_{600} von etwa 6 in Abbildung 8.3). Auch im Liter-Maßstab wurde mit $0,33 \text{ nIPTG}$ keine Produktbildung gemessen. Allerdings war die C16-Konzentration mit $0,60 \text{ nIPTG}$ nach knapp 6 h nahezu gleich wie bei der Induktion mit $1,00 \text{ nIPTG}$. Damit erfolgte die anscheinend vollständige Induktion bereits mit nur $0,60 \text{ nIPTG}$. Zudem ist bemerkenswert, dass die Temperatur bei der Kultivierung in Abbildung 8.2 nicht auf 30°C für die Produktionsphase verringert wurde, sondern im ganzen Prozess bei 37°C konstant geregelt wurde. Ein negativer Effekt der erhöhten Temperatur für Wachstum und Produktion war nicht festzustellen. Insgesamt waren $0,60 \text{ nIPTG}$ anscheinend ausreichend für die Induktion im Liter-Maßstab.

Im Milliliter-Maßstab waren $0,52 \text{ nIPTG}$ zwar ausreichend um eine Produktbildung zu messen, allerdings war diese nach 23 h geringer im Vergleich zum Ansatz mit $0,72 \text{ nIPTG}$. Die unterschiedliche Produktion mit $0,52 \text{ nIPTG}$ bei unterschiedlichen Zelldichten ist schwierig zu deuten, da keine klare Tendenz erkennbar ist. Aus späteren Versuchen ist bekannt, dass die Produktion mit $0,52$ nach den hier betrachteten 23 h nicht abgeschlossen war. Zudem ist die Produktbildungsrate in diesem Konzentrationsbereich stark von

geringen Unterschieden der IPTG-Konzentration abhängig. Geringe Variationen der zugegebenen IPTG-Menge können daher die unterschiedliche Produktion bewirkt haben. Anscheinend liegt bei etwa 0,52 nIPTG ein Schwellenwert vor, ab dem die Induktion erfolgt. Mit 0,33 nIPTG ist dieser Schwellenwert schon unterschritten.

Diese minimal erforderliche IPTG-Konzentration von 0,52 nIPTG verringerte im Vergleich zu der geringsten Konzentration von 0,33 nIPTG das Wachstum während der Produktion nicht. Mit bereits 0,72 nIPTG wurden hingegen deutlich geringere optische Dichten nach 23 h Produktion gemessen. Das heißt, dass die Induktion mit 0,72 nIPTG das Wachstum der Zellen bereits deutlich verlangsamt, während bei einer (zu) schwachen Induktion mit 0,52 nIPTG die Zellen nahezu ungehindert wachsen können.

8.1.2 IPTG-Konzentration und Zulaufrate

Untersuchungen im Milliliter-Maßstab

Das Wachstum nach der Induktion mit geringen IPTG-Konzentration ist deutlich höher oder sogar kaum limitiert im Gegensatz zur Induktion mit hohen IPTG-Konzentrationen. Das heißt, die Versorgung mit Glucose während der Produktion sollte entscheidend sein für die Zunahme der Biomasse und damit auch für die Produktkonzentration.

In zwei Kultivierungsläufen im Milliliter-Maßstab wurde die Abhängigkeit der Produktbildung von der Zulaufrate und der Induktion mit geringen IPTG-Konzentrationen untersucht. Abbildung 8.4 zeigt sechs parallele Ansätze mit drei IPTG-Konzentrationen (0,60, 0,66 und 0,72 nIPTG) und zwei Zulaufraten (45 und 60 $\mu\text{L h}^{-1}$ beziehungsweise 2,3 und 3 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ bezogen auf das Startvolumen). In Abbildung 8.5 sind zusätzlich neun parallele Ansätze mit drei IPTG-Konzentrationen (0,52, 0,60 und 0,66 nIPTG) und drei Zulaufraten (60, 70 und 80 $\mu\text{L h}^{-1}$ beziehungsweise 3–4 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ bezogen auf das Startvolumen) dargestellt. Die Induktion fand jeweils bei optischen Dichten (OD_{600}) von etwa 22–23 statt. Im Gegensatz zu den bisherigen Kultivierungen wurde hier eine lange Produktionszeit von 48 h betrachtet.

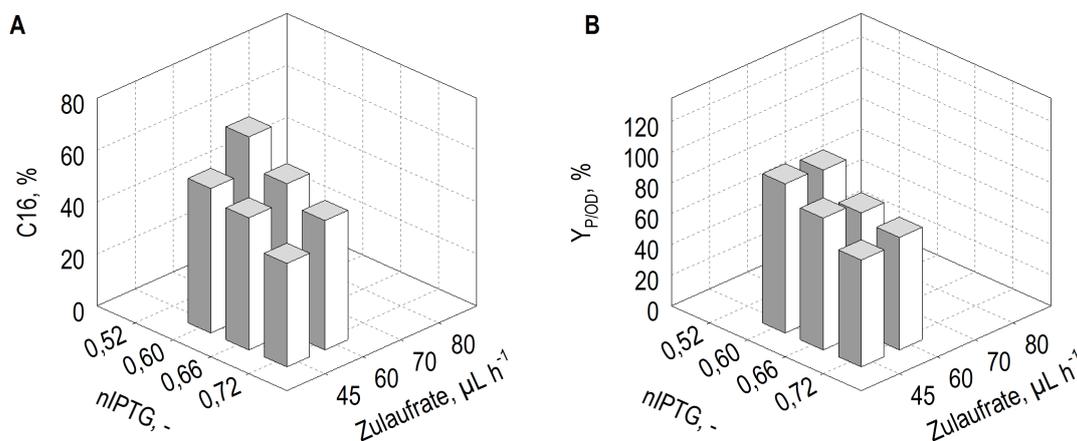


Abbildung 8.4: Sechs Ansätze mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) nach 48 h Produktion.

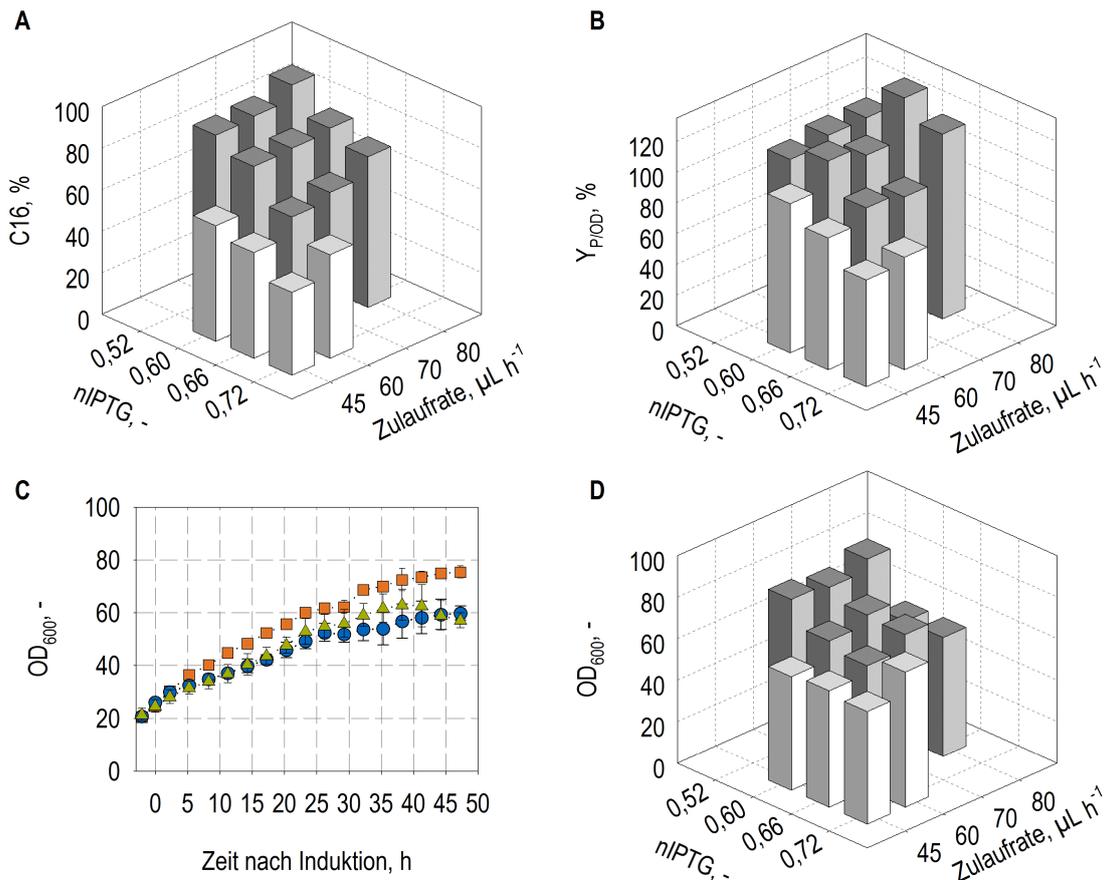


Abbildung 8.5: Weitere neun Ansätze (dunkelgrau) mit niedrigen IPTG-Konzentrationen und Zulaufzeiten zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) nach 48 h Produktion. Zudem sind die optischen Dichten (OD_{600}) für die Ansätze mit 0,52 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ (■), 0,66 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ (●) und 0,66 nIPTG+80 $\mu\text{L h}^{-1}$ (▲) in (C) sowie die optischen Dichten nach 48 h Produktion in (D) gezeigt. Die hellgrauen Balken sind die Ergebnisse aus Abbildung 8.4. Auf die erneute Darstellung der Produktkonzentrationen für die beiden Bedingungen 0,60 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ und 0,66 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ wurde aufgrund einer guten Reproduzierbarkeit verzichtet.

Die Produktion nach 24 h unterschied sich nur minimal zwischen den Ansätzen und ließ keine eindeutige Tendenzen erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Produktion nach 48 h hingegen zeigte ein eindeutigeres Bild. Die C16-Konzentrationen und $Y_{P/OD}$ waren sowohl beim höheren Zulauf als auch bei niedriger IPTG-Konzentration höher. Die höchste C16-Konzentration lag bei 91 % für 0,52 nIPTG+80 $\mu\text{L h}^{-1}$, die niedrigste bei 50 % für 0,72 nIPTG+45 $\mu\text{L h}^{-1}$.

Die optischen Dichten sind bei niedrigen IPTG-Konzentrationen und hohen Zulaufzeiten ebenfalls höher. Allerdings fallen die optischen Dichten für die Ansätze mit 80 $\mu\text{L h}^{-1}$ und 0,60 bis 0,66 nIPTG zum Ende der Produktionsphase wieder ab (Abbildung 8.5 C). Trotz gleicher Zulaufzeiten hat allein die IPTG-Konzentration in dem Bereich zwischen 0,52 und 0,66 nIPTG einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum (Abbildung 8.5 C).

Untersuchungen im Liter-Maßstab

Parallel zu den Untersuchungen der IPTG-Konzentration im Milliliter-Maßstab wurden auch Kultivierungen im Liter-Maßstab durchgeführt, um die Anwendbarkeit von sehr niedrigen IPTG-Konzentrationen bei hohen Zelldichten unter produktionsähnlichen Bedingungen zu klären. In Abbildung 8.6 sind insgesamt vier Kultivierungen mit 0,52 bis 0,72 nIPTG bei je 0,5 L Startvolumen dargestellt.

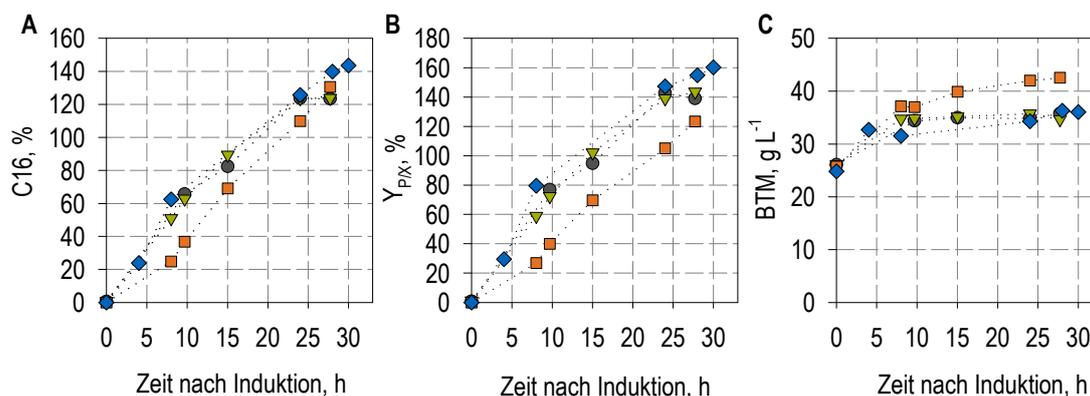


Abbildung 8.6: Vier Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Expression von C16 mit niedrigen IPTG-Konzentrationen: 0,52 (■), 0,60 (◆), 0,66 (▼) und 0,72 nIPTG (●). Der Ansatz mit 0,60 stammt aus einer separaten Kultivierung, die anderen drei wurden parallel kultiviert. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C).

Zwischen 0,66 und 0,72 nIPTG ist hier bei den (zellspezifischen) C16-Konzentrationen und Biomassen kein Unterschied feststellbar. Der Ansatz mit 0,60 nIPTG verläuft ebenfalls sehr ähnlich. Hier wurde die Kultivierung nur etwas verlängert und somit nach 30 h Produktion mit 144 % C16 die höchsten C16-Konzentrationen erreicht.

Interessant ist insbesondere die Kultivierung mit 0,52 nIPTG. Vor allem in den ersten 10 h ist die C16-Konzentration deutlich geringer; die Produktbildung startet anscheinend verzögert. Nach 28 h hingegen ist die C16-Konzentration annähernd vergleichbar mit den Kultivierungen mit 0,66 bis 0,72 nIPTG. Die Zunahme der BTM ist bei 0,52 nIPTG deutlich höher als bei höheren IPTG-Konzentrationen, weswegen die $Y_{P/X}$ -Werte geringer ausfallen.

Diskussion

Eine sehr geringe IPTG-Konzentration von nur 0,52 nIPTG führte bei langen Produktionszeiten zu den höchsten C16-Konzentrationen. Höhere Zulaufsraten ermöglichen während der Produktion ein stärkeres Wachstum und damit ebenfalls höhere C16-Konzentrationen. Aufgrund zahlreicher Reaktorausfälle wegen sich ablösender pH-Sensoren konnten leider nicht alle Bedingungen in Abbildung 8.4 im Mehrfachansatz bis zum Ende kultiviert werden. Bei der zweiten Kultivierung in Abbildung 8.5 wurden zwei Bedingungen wiederholt, die die sequenzielle Reproduzierbarkeit der C16-Produktion unter diesen Bedingungen zeigten. Für 0,60 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ wurden 69 ± 10 % beziehungsweise 76 ± 3 % und für 0,66 nIPTG+60 $\mu\text{L h}^{-1}$ wurden 58 % (n=2) beziehungsweise 60 ± 6 % erzielt.

Die eingestellten Zulaufzeiten entsprechen 2,3; 3,0; 3,5 und 4,0 g L⁻¹ h⁻¹. Ausgehend von den optischen Dichten liegt eine BTM von etwa 10 g L⁻¹ zum Induktionszeitpunkt vor. Damit betragen die Zulaufzeiten 0,23–0,40 g_{Glucose} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹.

Shin et al. (1997) zeigten ebenfalls, dass die Zulaufzeit während der Proteinproduktion die Ausbeute beeinflusst, mit einem Optimum bei 0,22 g_{Substrat} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹. Als Zulaufmedium wurden allerdings 274 g L⁻¹ Glucose und 211 g L⁻¹ Hefeextrakt eingesetzt.

Bei ähnlichen Zelldichten zeigte sich für die Expression von C16 in zuvor durchgeführten Versuchen (Daten nicht gezeigt), dass Zulaufzeiten von 4 g L⁻¹ h⁻¹ während der Produktion zur Anreicherung von Glucose führen und dass die Zulaufzeiten auf 1–2 g L⁻¹ h⁻¹ ohne Einbußen bei der Produktion verringert werden können. Allerdings wurde in diesen Versuchen mit 1,52 nIPTG induziert. Mit der Verringerung der IPTG-Konzentration sind hingegen höhere Zulaufzeiten während der Produktion vorteilhaft.

Auf einen Hochzelldichteprozess lassen sich sehr hohe Zulaufzeiten jedoch nicht problemlos übertragen. Ausgehend von der besten Produktion bei 0,40 g_{Glucose} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (80 µL h⁻¹) und der Induktion bei 30–50 g L⁻¹ BTM, müssten Zulaufzeiten von 12–20 g L⁻¹ h⁻¹ realisiert werden. Dies ist in den eingesetzten Glas-Rührkesselreaktoren aufgrund des erforderlichen Sauerstoffeintrags leider nicht darstellbar und schwierig in den industriellen Maßstab übertragbar (vgl. Abschnitt 5.1). Falls der Sauerstoffeintrag im späteren Produktionsmaßstab höhere Zulaufzeiten zulässt, wäre dies eine Möglichkeit, die Zelldichten und damit die maximal mögliche Produktkonzentration etwas zu erhöhen.

Für die Kultivierungen in Abbildung 8.6 wurde eine konstante Zulaufzeit von etwa 7,5 g L⁻¹ h⁻¹ eingestellt, was 0,3 g_{Glucose} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ bei 25 g L⁻¹ BTM entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion mit 0,60 nIPTG und sogar 0,52 nIPTG bei relativ hohen Zelldichten anwendbar ist. Im Gegensatz zu den Kultivierungen in Abbildung 8.4 und 8.5 wurde in den Kultivierungen in Abbildung 8.6 die Produktionsphase nur bis maximal 30 h verlängert. Es lässt sich jedoch an den Verläufen der C16-Konzentration vor allem für die Ansätze mit den beiden niedrigsten IPTG-Konzentrationen erkennen, dass die Produktionszeit noch weiter verlängert werden sollte. Dennoch wurden bereits hier mit 144 % C16 eine deutliche Steigerung gegenüber dem Referenzprozess (100 % nach 20 h Produktion) erreicht.

Für den Effekt geringer IPTG-Konzentrationen lassen sich in der Literatur – ähnlich wie für die Wachstumsrate – uneinheitliche Belege finden. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde bei der Expression mit einem P_{trc}-Promoter in *E. coli* HB101 um mehr als das vierfache erhöht, indem die IPTG-Konzentration von 1000 µM auf 10 µM reduziert wurde (Choi et al., 2000). In *E. coli* KS272 betrug hingegen die Steigerung nur das 1,55-fache. Für die Induktion des GFP-Fusionsproteins CheY::GFP in einem *E. coli* BL21(DE3) wurde eine optimale IPTG-Konzentration von 8 µM berichtet (Sevastyanovich et al., 2009). Damit konnte eine Stagnation des Wachstums nach der Induktion verhindert werden. Die IPTG-Konzentration war so gering, dass die T7-RNA-Polymerase mit einer Western Blot-Analyse nicht detektiert werden konnte.

Andererseits führte die Verringerung von 1000 µM auf 5 µM zu keiner Verbesserung der Expression von Glycoprotein-Impfstoffen (Ihssen et al., 2010). Hier wurde allerdings der P_{tac}-Promoter verwendet. In *E. coli* BL21(DE3) wurde für die Expression von Mini-

Proinsulin ein optimales IPTG/BTM-Verhältnis von $30 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bestimmt (Shin et al., 1997), was bei 30 g L^{-1} BTM $909 \mu\text{M}$ entspricht. Die Reduktion der IPTG-Konzentration um etwa den Faktor 10 führte zu einer etwas geringeren Ausbeute. Eine nur vierstündige Produktion von einem Antigen des Hepatitis C-Virus in *E. coli* BL21(DE3) konnte durch die sehr hohe Konzentration von 10 mM IPTG um ein vielfaches erhöht werden (Gurramkonda et al., 2012). Neben einzelnen Induktoren wurden auch Kombinationen von IPTG und Lactose erfolgreich für die Induktion des T7-Expressionssystem eingesetzt, wobei hier etwa $210 \mu\text{M}$ eine höhere Expression ergaben als $84 \mu\text{M}$ (Weng et al., 2006).

Die optimale IPTG-Konzentration ist offensichtlich von vielen Faktoren abhängig. Darunter fallen das Expressionssystem, der Promoter, die Repressorgene, der Zielort der Expression (intra-/extrazellulär), die Reaktion der Zellen auf die heterologen Proteine (Stress/metabolische Last), die Löslichkeit und die Zusammensetzung der Proteine (Donovan et al., 1996). Daher muss die Induktion für jedes heterolog produzierte Protein neu untersucht werden.

8.1.3 Induktionszeitpunkt

Vier unterschiedliche Induktionsstrategien

Aufgrund des deutlich besseren Wachstums bei sehr schwacher Induktion stellte sich die Frage, ob die Induktion nicht zu einem früherem Zeitpunkt bei geringeren Zelldichten zu einem effizienteren Prozess führen würde. Vier verschiedene Konzepte der Induktion wurden im Liter-Maßstab mit $0,35 \text{ L}$ Startvolumen parallel im Zulaufprozess untersucht (Abbildung 8.7) und dabei die Expressionszeit weiter verlängert. In drei Ansätzen erfolgte die Induktion durch einmalige Zugabe von $0,52 \text{ nIPTG}$. Neben der bisher eingesetzten Induktion nach einer Satz- und Zulaufphase (*Ref*) wurde zum einen direkt zu Beginn bei der Inokulation IPTG zugegeben (*Inokulation*). Die dritte Induktionsart fand direkt nach der Satzphase (*Satzphase*) statt und als vierte Induktionsart wurde dem Zulaufmedium (500 g L^{-1} Glucose) so viel IPTG zugegeben, dass nach 6 h im Reaktor eine Konzentration von $0,52 \text{ nIPTG}$ vorlag (*Zulaufmedium*). Für alle Ansätze wurde eine konstante Zulaufphase mit etwa $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose bezogen auf das Startvolumen nach der Satzphase gestartet.

Die bisher durchgeführte Induktion in der Zulaufphase (*Ref*) zeigt eine deutlich bessere Expression als die Induktionsarten *Inokulation* und *Satzphase*, insbesondere bei langen Produktionszeiten. Nach 59 h Prozesszeit und damit 44 h Produktionszeit wurden hier mit 232% C16 sehr hohe Werte gemessen, bei 58 g L^{-1} BTM und einem $Y_{\text{P/X}}$ von 161% . Während die substratspezifische Produktausbeute $Y_{\text{P/S}}$ zwischen 24 und 44 h Produktion (39 und 59 h Prozesszeit) etwa konstant blieb, sank die Produktivität nach 24 h Produktion (Abbildung 8.7 D+E).

Es wurde erwartet, dass die Induktionsart *Inokulation* die Satzphase verlängert. Die Satzphasen dauerten in den vier Reaktoren jedoch mit $10,8$ – $11,3 \text{ h}$ ähnlich lang. Die Produktkonzentrationen und vor allem $Y_{\text{P/X}}$ sind für die beiden Ansätze *Inokulation* und *Satzphase* nahezu gleich.

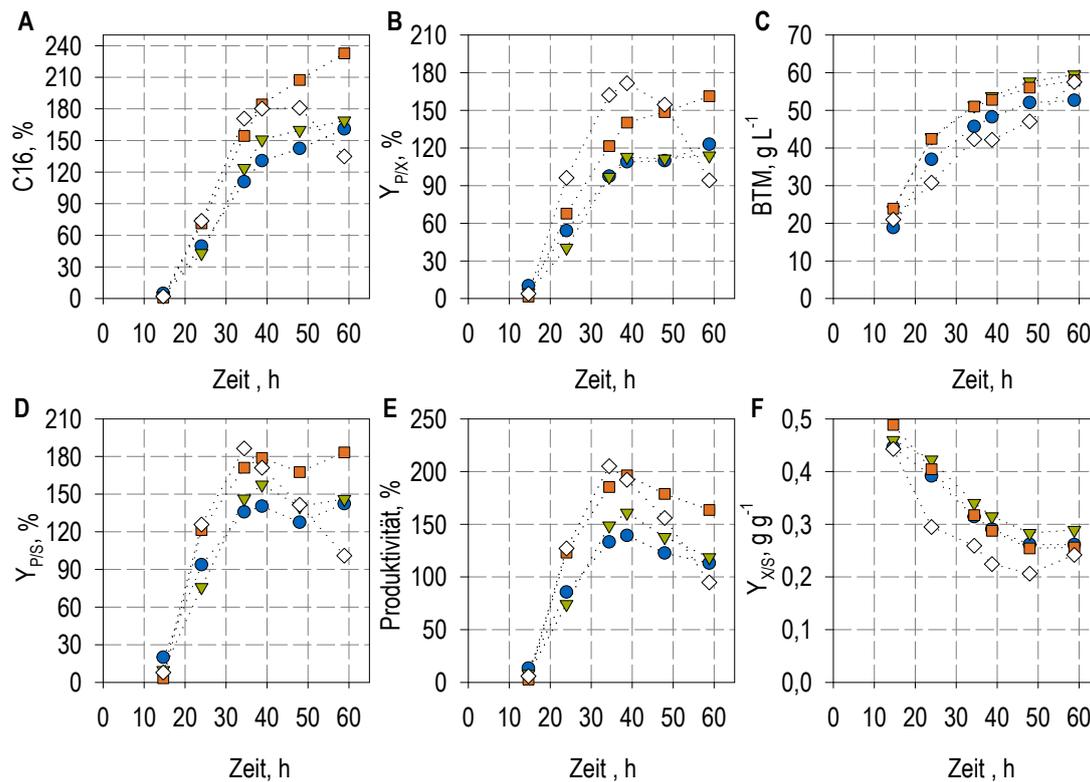


Abbildung 8.7: Expression von C16 im Liter-Maßstab zur Untersuchung des Induktionszeitpunktes: Induziert wurde zur *Inokulation* (●), zum Ende der *Satzphase* (▼), nach 3,5 h Zulaufphase (*Ref*, ■) sowie über das *Zulaufmedium* (◇, IPTG zur Glucose so zugegeben, sodass nach 6 h Zulauf 0,52 nIPTG im Reaktor erreicht wurden). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), zellspezifischer C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) und die Biotrockenmasskonzentrationen (BTM, C) sowie die substratspezifischen Produktausbeuten ($Y_{P/S}$, D), die Produktivitäten (E) und die Biomasseausbeuten ($Y_{X/S}$, F). Die Verbindungslinien dienen als visuelle Hilfe.

Für die Induktionsart *Zulaufmedium* wurden mit bis zu 181 % höhere C16-Konzentrationen erreicht als bei den Ansätzen *Inokulation* und *Satzphase*, jedoch geringere als bei *Ref*. Die C16-Konzentration erreichte allerdings schon nach 39 h Prozesszeit das Maximum, blieb für 9 h konstant und sank zum Schluss deutlich ab. In dieser Zeit kam es zu einer starken Schaumbildung in dem Bioreaktor. Die Induktionsart *Zulaufmedium* erreichte in den ersten 40 h Prozesszeit die höchsten $Y_{P/X}$. Im Vergleich zu der Induktionsart *Ref* ist dies auf die geringeren BTM zurückzuführen (Abbildung 8.7 C). Auch die Biomasseausbeuten (Abbildung 8.7 F) liegen für diesen Ansatz deutlich unter den parallelen Kultivierungen. Mit der Induktionsart *Zulaufmedium* wurde nach 34 h Prozesszeit beziehungsweise 22 h Produktionszeit mit 205 % die höchste Produktivität und mit 186 % der höchste substratspezifische Produktausbeute $Y_{P/S}$ erreicht. Die Unterschiede zu dem Ansatz *Ref* sind jedoch gering, da damit die maximale Produktivität von 196 % nach 39 h Prozesszeit (24 h Produktionszeit) und 183 % $Y_{P/S}$ nach 59 h Prozesszeit (44 h Produktionszeit) erreicht wurden.

Diskussion

Der Induktionszeitpunkt spielt für die rekombinante Expression eine entscheidende Rolle (Donovan et al., 1996). Für die Erzielung einer möglichst hohen C16-Konzentration ist die Induktion nach Satz- und mehrstündiger Zulaufphase am besten geeignet. Mit 232 % C16 wurde hier die bisher höchste Produktkonzentration erreicht.

Die Induktion über das Zulaufmedium funktionierte ebenfalls sehr effektiv und könnte je nach Zielsetzung noch weiter optimiert werden. Es ließen sich damit höhere Produktivitäten und $Y_{P/X}$ -Werte bei Produktionszeiten von etwa 20–30 h erzielen als mit einer einmaligen Induktion mit 0,52 nIPTG. Eine längere Produktion, die grundsätzlich noch höhere Produktkonzentrationen ermöglicht, lässt sich durch die Induktion über das Zulaufmedium wegen der stetigen IPTG-Zugabe nicht erreichen. Im Vergleich zu der einmaligen Induktion wird insgesamt eine größere Menge IPTG zugegeben. Der Einsatz verschiedener IPTG-haltiger und IPTG-freier Zulaufmedien wäre auch denkbar, die Prozessführung hierdurch aber aufwendiger. Dass eine Induktion über einen kontinuierlichen Zulauf zu einer höheren Produktbildung führen kann, wurde bereits für die humane Superoxid-Dismutase (hSOD) in *E. coli* HMS174(DE3) gezeigt (Striedner et al., 2003). Auch Pinsach et al. (2008) erzielten mit einer kontinuierlichen IPTG-Zugabe hohe Konzentrationen von Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase (RhuA).

Bemerkenswert ist, dass die beiden Ansätze *Inokulation* und *Satzphase* sich sehr ähnlich verhalten. Zusammen mit der Tatsache, dass vor Ende der Satzphase bei dem Ansatz *Inokulation* keine Produktbildung messbar war, deutet dies stark darauf hin, dass die Induktion hier trotz früherer Zugabe erst nach dem Ende der Satzphase stattfand. Bei Zugabe von Lactose wäre dies zu erwarten, da die Katabolitrepression durch Glucose die Aufnahme von Lactose verhindert (Bettenbrock et al., 2006). Wie bereits erwähnt, belegen neuere Arbeiten von Fernández-Castané et al. (2012a,b), dass die Lactose-Permease (LacY) vor allem bei geringen IPTG-Konzentrationen für eine Anreicherung von IPTG im Zellinneren sorgt, während bei Mutation von *lacY* IPTG nur diffusiv ins Cytoplasma gelangt. Die Lactose-Permease unterliegt jedoch der Katabolitrepression durch Glucose. Das heißt, dass bei Anwesenheit von Glucose und geringer IPTG-Zugabe nur sehr geringe IPTG-Konzentrationen im Cytoplasma erreicht werden, die für eine Induktion anscheinend nicht ausreichend sind. Erst nach dem Ende der Satzphase kann das IPTG aufgenommen werden und die Induktion erfolgen. Dieses Verhalten erinnert an die Autoinduktion (vgl. Abschnitt 3.3.6).

8.1.4 Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit der schwachen Induktion

Die zwei niedrigsten aussichtsreichen IPTG-Konzentrationen wurden schließlich in größere Maßstäbe übertragen. Es wurden Kultivierungen in einem Glas-Rührkesselreaktor mit 2 L Startvolumen (Abbildung 8.8) und in einem Edelstahl-Rührkesselreaktor mit 10 L Startvolumen (Abbildung 8.9) durchgeführt. Zudem wurden für die Kultivierungen wesentliche Änderungen des Produktionsprozesses angewendet, die in Abbildung 8.10 zusammengefasst sind. Das in Kapitel 6 modifizierte Satzmedium mit 25 g L^{-1} Glucose und 6 g L^{-1} Magnesiumsulfat wurde eingesetzt und nur 500 g L^{-1} Glucose dosiert. Nach der

Satzphase wurde ein konstanter Zulauf mit $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gestartet (ohne exponentielle Zulaufphase). Während diese konstante Zulaufphase bei den anderen Kultivierungen bis zu 6 h Stunden dauerte, erfolgte die Induktion bei der Kultivierung in Abbildung 8.9 mit $0,52 \text{ nIPTG}$ nach nur $3,4 \text{ h}$ konstanter Zulaufphase und bei einer geringeren BTM (20 g L^{-1}). In den ersten 24 h Stunden war die Produktbildung mit $0,60 \text{ nIPTG}$ gleich oder höher als mit $0,52 \text{ nIPTG}$. Die höchste C16-Konzentration wurde jedoch in beiden Maßstäben nach 48 h mit $0,52 \text{ nIPTG}$ erreicht, jeweils über 200% . Der biomassespezifische C16-Gehalt lag bei bis zu 189% im Vergleich zum Referenzprozess.

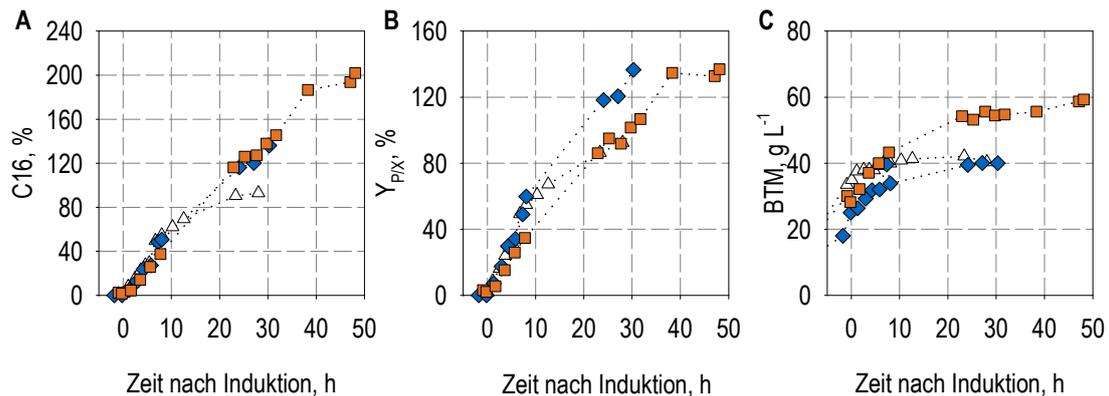


Abbildung 8.8: Drei Kultivierungen mit 2 L Startvolumen und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen zur Expression von C16: $0,52$ (■), $0,60$ (◆) und zum Vergleich mit $1,00 \text{ nIPTG}$ (△). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C).

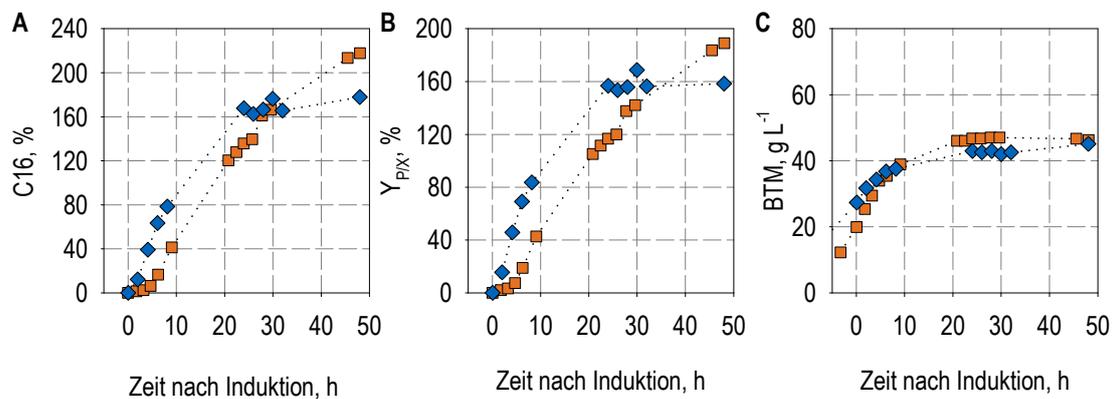
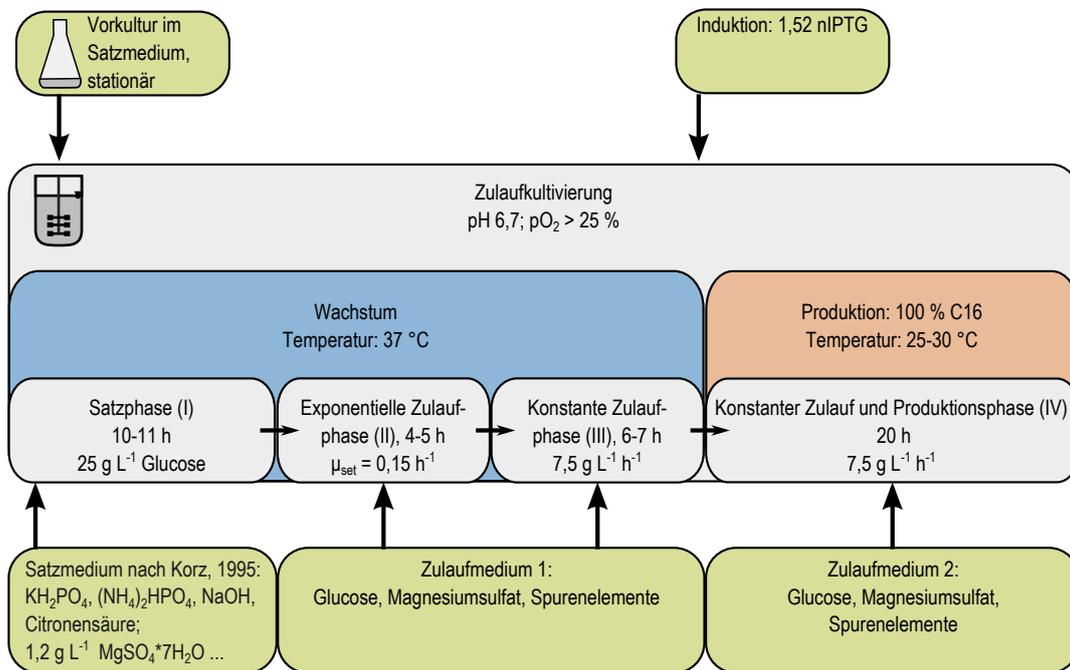


Abbildung 8.9: Zwei Zulaufkultivierungen mit 10 L Startvolumen und geringen IPTG-Konzentrationen zur Expression von C16: $0,52$ (■) und $0,60 \text{ nIPTG}$ (◆). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C).

Diskussion

Die C16-Produktion mit $0,52 \text{ nIPTG}$ und $0,60 \text{ nIPTG}$ funktioniert effizient und ist in den Liter-Maßstab (2 oder 10 L Startvolumen) übertragbar. Mit über 200% C16 wurde reproduzierbar mehr als doppelt so viel Produkt gebildet wie im Referenzprozess (vgl.

A: Referenzprozess



B: In der vorliegenden Arbeit weiterentwickelter Prozess

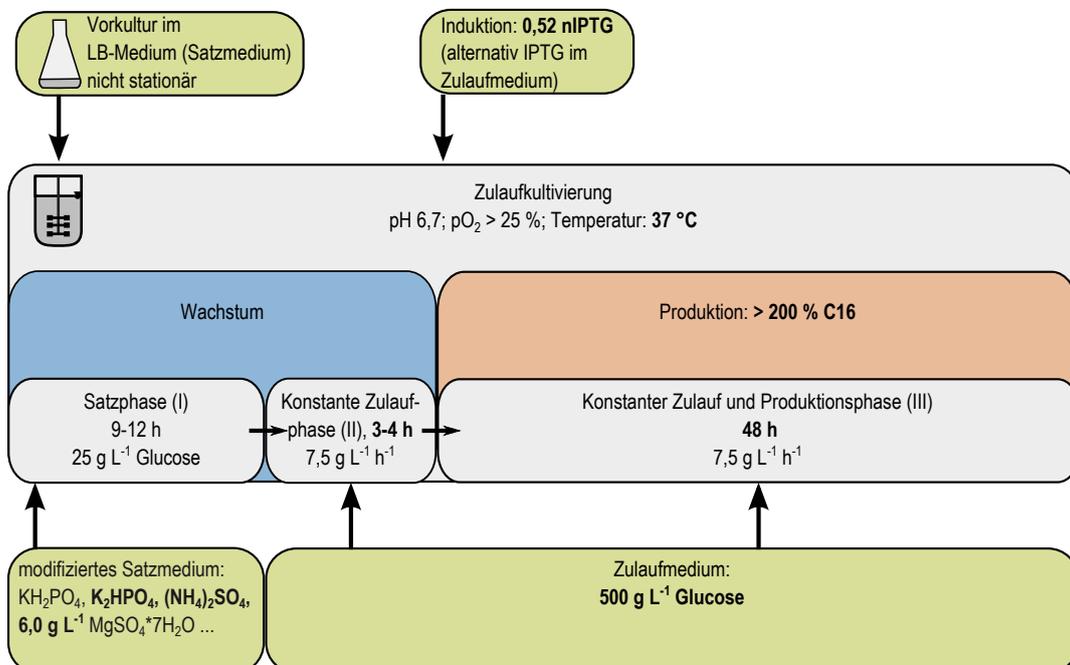


Abbildung 8.10: Schematische Darstellung des Ausgangsprozesses und des in dieser Arbeit optimierten Prozesses für die Herstellung von C16 in *E. coli*. Die wichtigen Änderungen sind fett gedruckt, alternative Vorgehen in Klammern genannt. Im optimierten Prozess fehlt zudem die exponentielle Zulaufphase.

Abbildung 5.2) oder in einer Kultivierung mit 1,00 nIPTG (Abbildung 8.8). Durch das stärkere Wachstum war die Steigerung des zellspezifischen C16-Gehalts zwar etwas geringer, jedoch wurden in Abbildung 8.9 mit 0,52 nIPTG die höchsten $Y_{P/X}$ von bis zu 189 % erreicht. Hier wurde zum einen bei der geringsten BTM induziert. Zum anderen stieg die BTM zum Prozessende im Gegensatz zu der Kultivierung mit 0,52 nIPTG und 2 L Startvolumen nicht mehr an, was ebenfalls den höheren $Y_{P/X}$ begründet. Aufgrund des hohen zellspezifischen Produktgehalts ist eine weitere Prozessintensivierung nur noch durch Erhöhung der Zelldichte und damit einer höheren Sauerstoffeintragsleistung des Bioreaktors wahrscheinlich.

Neben der IPTG-Konzentration wurden auch weitere in dieser Arbeit angepasste Prozessparameter erfolgreich im Edelstahl-Rührkesselreaktor mit 10 L Startvolumen reproduziert. Darunter fallen die Veränderung und Vereinfachung des Satz- und Zulaufmediums sowie die Wachstumsphase mit 25 g L^{-1} Glucose mit anschließendem konstanten Zulauf. Auch ein Überdruck von 0,5 bar und ein CO_2 -Gehalt im Abgas von bis zu 2,5 % in der Produktionsphase bei der Kultivierung mit 0,52 nIPTG in Abbildung 8.9 beeinträchtigen wie zu erwarten die Expression nicht, da sie deutlich unter den für das Wachstum von *E. coli* negativen Konzentrationen liegen (vgl. Abschnitt 3.2.3).

Der Einsatz sehr geringer IPTG-Konzentrationen ist damit zwischen verschiedenen Maßstäben von 10 mL bis 10 L übertragbar und eine schwache Induktion sollte daher auch im technischen Maßstab beziehungsweise im Produktionsmaßstab anwendbar sein.

Allein durch die Optimierung der Induktion konnte die C16-Konzentration mehr als verdoppelt werden. Bei einer Optimierung der IPTG-Konzentration für die eGFP-Expression mit einem T7-Expressionssystem konnte die Produktkonzentration nur um 14 % gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied zwischen den Proteinen lässt sich mit der Primärstruktur erklären. Bei C16 kommt es bei einer starken Induktion anscheinend, wie in Abschnitt 3.3.4 dargelegt, zu einer stringenten Antwort aufgrund einer zu hohen metabolischen Last. Die hohe Häufigkeit der Aminosäuren Glycin und Alanin in C16 führt zu einem großen Bedarf der entsprechenden tRNAs (Lammel et al., 2008; Xia et al., 2010). So konnte durch die Überproduktion von Glycin-tRNAs bereits die Expression eines Spinnenseidenproteins deutlich verbessert werden (Xia et al., 2010).

Wird nun die maximale Produktbildungsrate durch eine schwache Induktion verringert, so kann die Zelle die benötigten Ressourcen besser bereitstellen und gleichzeitig den eigenen Stoffwechsel aufrecht halten. Dadurch kann die Produktionsphase deutlich verlängert und auch die maximal möglichen Produktkonzentrationen erhöht werden. Ein ähnlicher Ansatz wird bei den sogenannten *E. coli* „Walker“-Stämmen C41 und C43 verfolgt (vgl. Abschnitt 3.3.7, Miroux und Walker, 1996; Wagner et al., 2008). Mutationen in dem *lacUV5*-Promoter führen zu einer schwächeren Induktion durch IPTG. Besseres Wachstum und eine bessere und länger anhaltende Produktbildung vor allem von Membranproteinen lassen sich daher mit einer geringeren Aktivität der T7-RNA-Polymerase erklären. Anstelle den von IPTG induzierten *lacUV5*-Promoter durch Mutationen zu schwächen, war in dieser Arbeit der Ansatz erfolgreich, diesen *lacUV5*-Promoter einfach durch wesentlich weniger IPTG schwächer zu induzieren.

8.2 Autoinduktion

Expression von C16 in *E. coli* HMS174(DE3)

Ausgehend von den Ergebnissen aus Abschnitt 8.1.3 entstand die Vermutung, in einem Autoinduktionsmedium könnte Lactose durch IPTG in sehr geringen Konzentrationen ersetzt werden. Die grundsätzliche Anwendbarkeit von lactosehaltigen Autoinduktionsmedien für die C16-Expression wurde bereits in Abschnitt 5.3 gezeigt.

In Abbildung 8.11 ist die Autoinduktion mit acht verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0,72–1,08) sowie vier Lactosekonzentrationen dargestellt. Es wurden überall 5 g L^{-1} Glucose, $3,75 \text{ g L}^{-1}$ Bernsteinsäure und 5 g L^{-1} Ammoniumsulfat sowie je nach Lactosekonzentration $30\text{--}50 \text{ g L}^{-1}$ Glycerol vorgelegt. Dadurch lag die Konzentration von Glucose, Glycerol und Lactose insgesamt in allen Reaktoren bei 55 g L^{-1} .

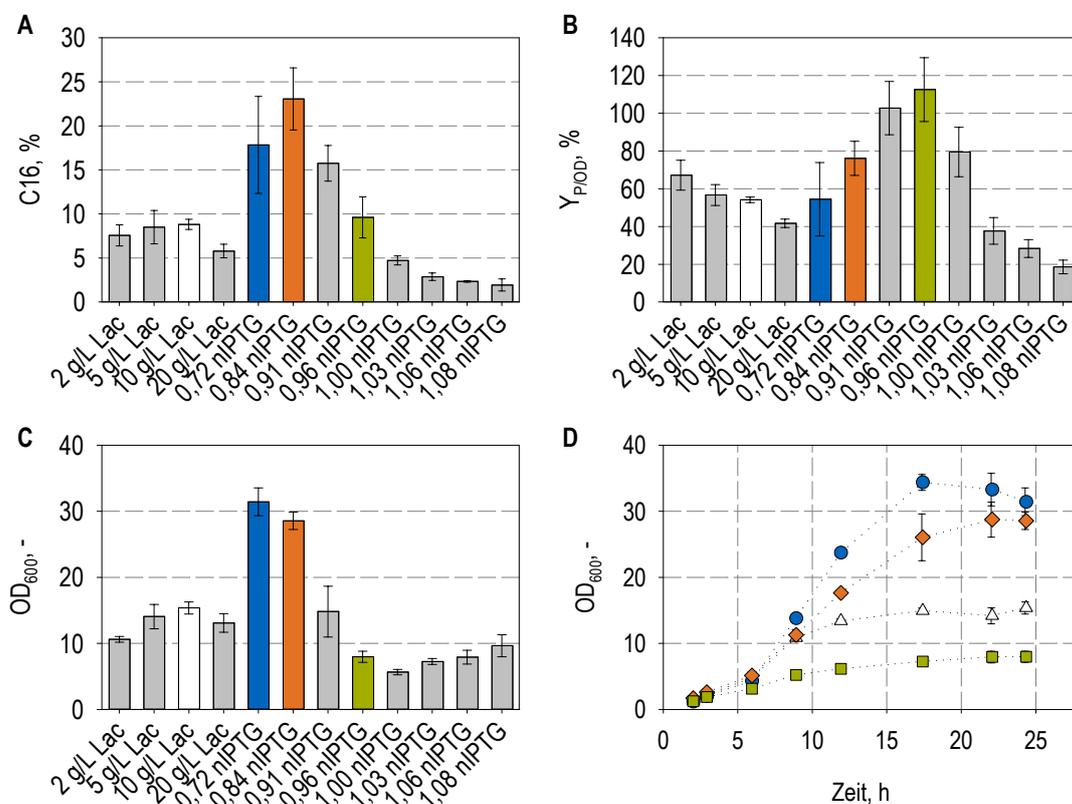


Abbildung 8.11: Autoinduktion mit Lactose und IPTG zur C16-Expression. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten nach 24 h Prozesszeit (OD_{600} , C). In (D) sind die optischen Dichten im Prozessverlauf für die folgende Bedingungen aufgetragen: 10 g L^{-1} Lactose (Δ), 0,72 nIPTG (\bullet), 0,84 nIPTG (\blacklozenge) und 0,96 nIPTG (\blacksquare). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei parallelen Kultivierungen.

Wachstum und Produktion sind stärker von der IPTG-Konzentration abhängig als von Lactose. Mit 0,84 nIPTG konnte die höchste C16-Konzentration erreicht werden (23 %), mit Lactose jedoch nur maximal 9 % bei 10 g L^{-1} . Für den zellspezifischen C16-Gehalt $Y_{P/OD}$ liegt das Optimum bei 0,91–0,96 nIPTG. Die C16-Konzentration ist bei

0,96 jedoch mit 10 % deutlich niedriger als bei 0,84 nIPTG, allerdings bei einer noch niedrigeren OD₆₀₀ (8 im Vergleich zu 29 bei 0,84).

Expression von C16 in den *E. coli* „Walker“-Stämmen

Um einzugrenzen, ob die optimale IPTG-Konzentration vom Stamm oder dem Protein abhängt, wurde die Expression von C16 mittels Autoinduktionsmedien in zwei weiteren Stämmen untersucht (Abbildung 8.12). Hierzu wurden die beiden *E. coli* „Walker“-Stämme C41(DE3) und C43(DE3) mit dem pET-C16-Plasmid transformiert. Wie zuvor wurden 5 g L⁻¹ Glucose, 3,75 g L⁻¹ Bernsteinsäure und 5 g L⁻¹ Ammoniumsulfat sowie je nach Lactose-Konzentration 40–50 g L⁻¹ Glycerol vorgelegt. *E. coli* C41(DE3) produzierte mit 10 g L⁻¹ Lactose geringfügig mehr als der sonst verwendete *E. coli* HMS174(DE3) (11 % statt 9 % C16, vgl. Abbildung 8.11), der *E. coli* C43(DE3) produzierte gleich viel (9 % C16). Im Vergleich zum *E. coli* HMS174(DE3) mit Lactose wurden bei *E. coli* C41(DE3) und *E. coli* C43(DE3) höhere optische Dichten erreicht: OD₆₀₀ 18 und 21 statt OD₆₀₀ 15. Dies wiederum führte zu teilweise geringeren Y_{P/OD}-Werten (58 und 42 % statt 54 %). Nur *E. coli* C41(DE3) produzierte mit 0,84 nIPTG; mit 5,4 % C16 jedoch nur halb so viel im Vergleich zur Lactose-Induktion. *E. coli* C43(DE3) zeigte hingegen kaum heterologe Proteinproduktion mit 0,84 nIPTG (1 % C16).

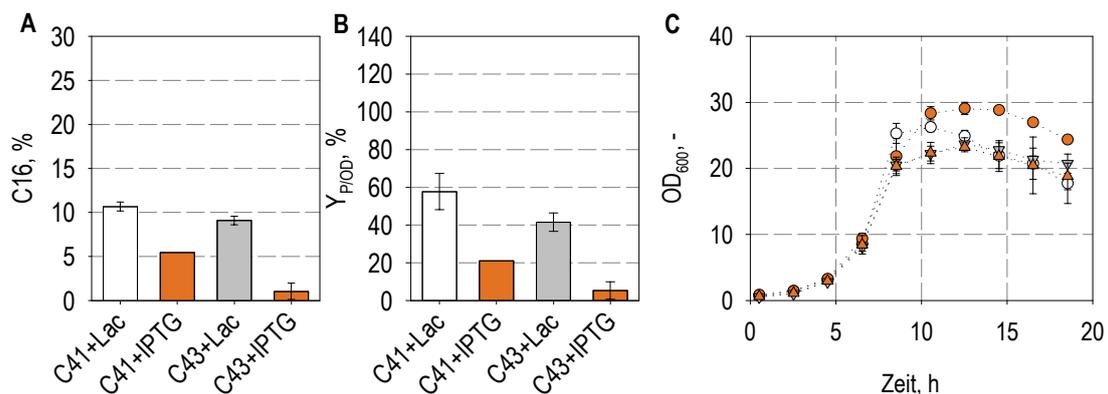


Abbildung 8.12: Autoinduktion von C16 in den *E. coli* „Walker“-Stämmen. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt (Y_{P/OD}, B) nach 19 h Prozesszeit. In (C) sind die optischen Dichten im Prozessverlauf aufgetragen: C41+10 g L⁻¹ Lactose (○), C41+0,84 nIPTG (●), C43+10 g L⁻¹ Lactose (▽) und C43+0,84 nIPTG (▲). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei parallelen Kultivierungen. Für C41+0,84 nIPTG (●) konnten nur zwei Reaktoren ausgewertet werden.

Expression von AQ24NR3 in *E. coli* HMS174(DE3)

Weiterhin wurde in dem für C16 sonst verwendeten *E. coli* HMS174(DE3) ein anderes Spinnenseidenprotein, das sogenannte AQ24NR3 exprimiert. Es sollte untersucht werden, ob die Autoinduktion mit IPTG für weitere Proteine anwendbar ist und ob die optimale IPTG-Konzentration vom Protein abhängt.

Das Protein AQ24NR3 wurde, abgesehen von den Kultivierungen in Abbildung 8.13 nur einmal in einer Zulaufkultivierung im Liter-Maßstab verwendet. Der Fokus dieser

Arbeit lag auf C16, da hierfür die meisten Anwendungsformen entwickelt wurden und C16 daher wirtschaftlich am interessantesten ist (vgl. Abbildung 3.6). Für die genannte Fragestellung bietet sich das AQ24NR3-Protein jedoch sehr an, da hier wie bei C16 auch ein *E. coli* HMS174(DE3) mit dem T7-Expressionssystem vorlag und AQ24NR3 so wie C16 ein rekombinantes Spinnenseidenprotein ist. Außerdem konnte die aktuelle HPLC-Analytik zur Produktbestimmung von C16 zufriedenstellend auf das AQ24NR3-Protein übertragen werden.

Das AQ24NR3-Protein wurde im Autoinduktionsprozess produziert, mit einem Optimum bei 0,91 nIPTG für die AQ24NR3-Konzentration und bei 0,96 nIPTG für den zellspezifischen AQ24NR3-Gehalt $Y_{P/OD}$ (Abbildung 8.13 A+B). Mit 0,91–0,96 nIPTG wurde eine bessere Proteinproduktion erreicht als mit 10 g L^{-1} Lactose. Das Wachstum von AQ24NR3 war vergleichsweise niedrig bei Lactose-Induktion und 0,91–1,00 nIPTG. Bei den Ansätzen mit 0,72–0,84 nIPTG wurde zwar höheres Wachstum beobachtet, allerdings war die Expression schwach (0,84 nIPTG) bis sehr schwach (0,72 nIPTG).

Der pH war zum Prozessende teilweise deutlich niedriger als bei der C16-Expression. Die Werte sanken bei 0,72 und 0,84 auf 4,3 und 4,4; bei Lactose auf 4,9. Bei 0,91–0,96 nIPTG lag der pH am Ende jedoch bei 6,6–7,0. Bei 0,72 nIPTG kam es außerdem zu einer Sauerstofflimitierung und später zu starker Schaumbildung. Dies erklärt den Abfall der optischen Dichte ab etwa 12 h in Abbildung 8.13 (C).

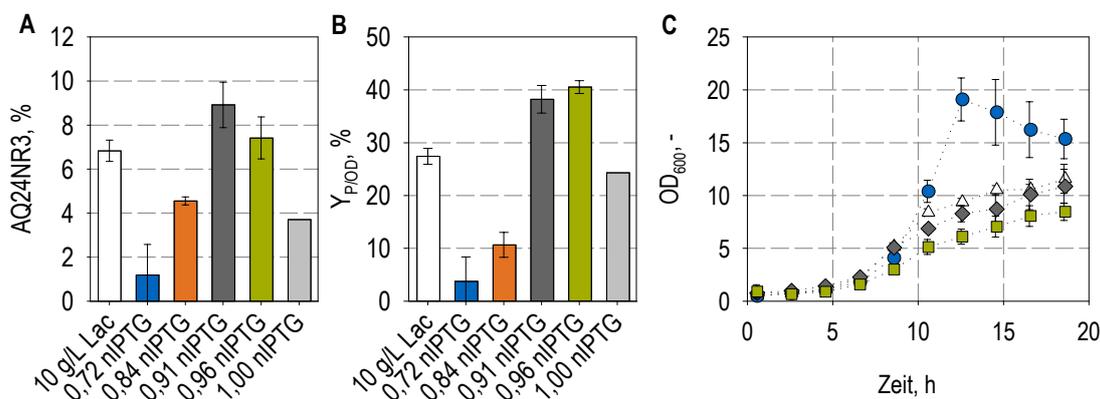


Abbildung 8.13: Autoinduktion mit Lactose und IPTG zur Expression von AQ24NR3. Dargestellt sind die AQ24NR3-Konzentrationen (A) und der zellspezifische AQ24NR3-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) nach 20 h Prozesszeit. In (C) sind die optischen Dichten OD_{600} im Prozessverlauf für die folgende Bedingungen aufgetragen: 10 g L^{-1} Lactose (Δ) sowie 0,72 (\bullet), 0,91 (\blacklozenge) und 0,96 (\blacksquare) nIPTG. Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei parallelen Kultivierungen.

Diskussion

IPTG gilt nach dem aktuellen Stand der Literatur als nicht geeignet für Autoinduktionsmedien, da es ohne spezifischen Transporter in die Zelle eindringen kann: „*IPTG is not suitable for use in auto-induction because it can enter the cell and induce expression without a specific transporter, and cultures cannot grow uninduced in the presence of IPTG*“ (Studier, 2014). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Autoinduktion mit gerin-

gen IPTG-Konzentrationen durchaus möglich ist und je nach Prozessbedingung, Stamm oder Protein zu deutlich höherer Produktbildung führt als mit Lactose. Während bei hohen Konzentrationen IPTG vor allem diffusiv in die Zelle eindringt, spielt bei niedrigen Konzentrationen die Lactosepermease (LacZ) eine entscheidende Rolle, sodass es sogar zu einer intrazellulären Anreicherung von IPTG bei Konzentrationen von unter 20 μM kommen kann (Fernández-Castané et al., 2012a,b).

Die größte Verbesserung mit IPTG im Vergleich zu Lactose wurde mit der Expression von C16 in *E. coli* HMS174(DE3) erzielt. Wie schon bei der Optimierung der IPTG-Konzentration im Zulaufprozess (Abschnitt 8.1) konnte eine mehr als doppelt so hohe Produktkonzentration mit der besten IPTG-Konzentration erzielt werden. Interessanterweise lag die optimale IPTG-Konzentration für Autoinduktionsmedien mit 0,84 nIPTG deutlich über der optimalen IPTG-Konzentration für Zulaufprozesse (0,52 nIPTG). Damit sind die Ergebnisse aus Autoinduktionskultivierungen nicht direkt auf Zulaufkultivierungen übertragbar.

Die Stamm- beziehungsweise Proteinabhängigkeit der IPTG-Autoinduktion wurde anhand der Expression von C16 in weiteren *E. coli*-Stämmen, den sogenannten *E. coli* „Walker“-Stämmen C41 und C43 sowie anhand der Expression des Spinnenseidenproteins AQ24NR3 in *E. coli* HMS174(DE3) gezeigt. Die bessere Expression von C16 mit 0,84 beim *E. coli* HMS174(DE3) war nicht auf die *E. coli* C41(DE3) und *E. coli* C43(DE3) übertragbar. Während bei *E. coli* C41(DE3) die Produktbildung geringer ausfiel als mit Lactose, zeigte *E. coli* C43(DE3) mit IPTG fast gar keine Produktbildung. Sevastysyanovich et al. (2009) konnten bei der Optimierung der Expression des Fusionsproteins Che::GFP mit *E. coli* C43(DE3) eine vergleichbare und mit *E. coli* C41(DE3) eine höhere Expression erreichen als mit einem stark induzierten *E. coli* BL21(DE3). Durch den Einsatz von schwacher Induktion wurde jedoch die höchste Proteinproduktion mit dem *E. coli* BL21(DE3) erzielt. Für Che::GFP war daher, ähnlich wie für C16, die schwache Induktion des nicht-mutierten T7-Expressionssystems die bessere Alternative im Vergleich zu den *E. coli* Walker-Stämmen mit den abschwächenden Mutationen im T7-Expressionssystem.

Die IPTG-Autoinduktion funktionierte auch für die Expression von AQ24NR3. Der Einfluss der IPTG-Konzentration war ebenfalls zu beobachten, allerdings in geringerem Ausmaß und bei etwas höherer Konzentration im Vergleich zu C16. Das IPTG-Optimum lag bei 0,91 statt 0,84 nIPTG. Der Einsatz von IPTG erhöhte die Produktkonzentration nur von 7 auf 9 % AQ24NR3 statt von 9 auf 23 % C16.

Offensichtlich ist der Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Expression mit Autoinduktionsmedien allein schon stark abhängig von dem exprimierten Protein. Faktoren wie die „Fitness“ beziehungsweise Teilungsfähigkeit der Zellen während der Produktionsphase sind ebenfalls stark vom Protein abhängig und beeinflussen wiederum den gesamten Autoinduktionsprozess.

9 Alternative Kohlenstoffquellen

Die Reduktion der Substratkosten ist einer der aussichtsreichsten Ansatzpunkte zur Verringerung der Produktionskosten. Vor allem nach der deutlichen Verringerung der IPTG-Einsatzmenge stellt die Kohlenstoffquelle den nächst wichtigen Ansatz dar. Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, gibt es zahlreiche alternative Kohlenstoffquellen für *E. coli*. Allen voran sind Glycerol und Saccharose aufgrund der günstigen Preise interessant. Die Verwendung von Saccharose erfordert jedoch entweder Stämme wie *E. coli* W, die im Gegensatz zu *E. coli* B oder *E. coli* K zur Saccharose-Verwertung in der Lage sind (Lee und Chang, 1993) oder das gentechnische Einbringen von Saccharose-Verwertungssystemen in *E. coli* (Bruschi et al., 2012; Jahreis et al., 2002; Lee et al., 2010). In diesem Kapitel wird untersucht, inwieweit sich alternative Kohlenstoffquellen, insbesondere Glycerol und Saccharose, für den Herstellungsprozess von C16 eignen.

9.1 Glycerol, Fructose und Arabinose

Glycerol und Fructose mit starker Induktion und geringen Zelldichten

Zunächst wurde ermittelt, ob sich Glucose durch Glycerol oder Fructose substituieren lässt. Ein Fructosezulauf sowie ein Fructose-Glucose- und ein Glycerolzulauf wurden in zwei unabhängigen Kultivierungsexperimenten im Milliliter-Maßstab jeweils einer Glucose-Referenzkultivierung gegenübergestellt (Abbildung 9.1).

Bei den optischen Dichten ist in Abbildung 9.1 kein Unterschied zwischen Fructose oder Glucose im Zulaufmedium zu erkennen. Die Proteinproduktion mit Fructose ist ebenfalls nur geringfügig schlechter im Vergleich zu Glucose mit 16 ± 1 % statt 18 ± 1 % C16.

Das Gemisch aus Fructose und Glucose zeigte ebenfalls eine sehr ähnliche Expression wie Glucose alleine, mit 18 ± 2 % statt 19 ± 1 % C16. Mit Glycerol hingegen wurde eine niedrigere C16-Konzentration von 11 ± 2 % erreicht. Zwar waren mit Glycerol auch die optischen Dichten geringer als mit Glucose. Jedoch ist an $Y_{P/OD}$ (Abbildung 9.1 E) erkennbar, dass mit Glycerol die Produktkonzentration und die Expression pro Zelle schlechter ausfielen.

Glycerol und Arabinose als Auxiliarsubstrat mit schwacher Induktion

Wie in Abbildung 9.2 dargestellt, wurde als nächstes untersucht, ob unter optimierten Induktionsbedingungen Glycerol als Kohlenstoffquelle eine Alternative zu Glucose darstellt. Es wurde eine längere Produktionsphase nach schwacher Induktion mit höheren Zelldichten angewendet. In Versuchen mit Autoinduktionsmedien zur Expression von GFP (Daten nicht gezeigt) deutete sich an, dass Arabinose einen Einfluss auf die Induktion hat und die Proteinproduktion verbessern kann. Dabei stand auch Glycerol als

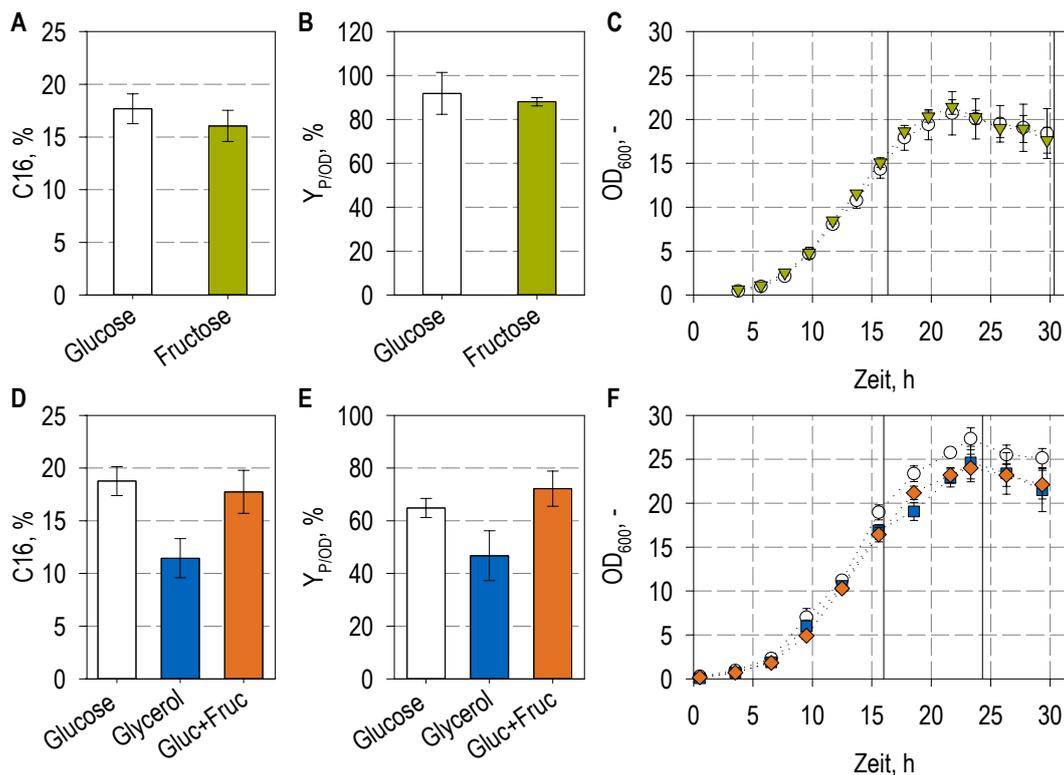


Abbildung 9.1: Untersuchung von Glycerol und Fructose als alternative Kohlenstoffquellen für die C16-Expression. In (A-C) wurde Fructose (\blacktriangledown) parallel zu Glucose als Referenz (\circ) verwendet, während in (D-F) Glycerol (\blacksquare) und ein 1:1 Gemisch aus Fructose und Glucose (\blacklozenge) eingesetzt wurde. Fructose und Fructose+Glucose wurden in Wachstums- und Produktionsphase als Zulaufmedium verwendet, Glycerol hingegen nur in der Produktionsphase. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A+D), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B+E) sowie die optischen Dichten (OD_{600} , C+F). Die Linien dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 5–6 parallelen Kultivierungen.

Kohlenstoffquelle in der Produktionsphase zur Verfügung. Glucose und Glycerol wurden in Abbildung 9.2 einzeln eingesetzt (Ansätze *Gluc-Ref* und *Gly*) sowie jeweils zur Hälfte mit Arabinose angereichert (*Gluc+Ara* und *Gly+Ara*). Zudem wurde eine Kombination aus Glucose, Glycerol und Arabinose verwendet (*Gly+Gluc+Ara*).

Die erreichten optischen Dichten (Abbildung 9.2 C-E) waren mit *Gluc-Ref* deutlich höher als mit *Gly*. Die Zugabe von Arabinose zu Glycerol (*Gly+Ara*) führte im Vergleich zu *Gly* zu höheren optischen Dichten zum Prozessende. Die Kombination aller drei Substrate (*Gly+Gluc+Ara*) zeigte keinen Einfluss auf die OD_{600} im Vergleich zu *Gly+Ara*. Die Ansätze *Gluc-Ref* und *Gluc+Ara* erreichten schließlich höhere Zelldichten als die Ansätze mit Glycerol, wobei der Referenzansatz *Gluc-Ref* am besten abschnitt.

Bei der Proteinproduktion zeigte sich dieser Trend noch deutlicher. Die Produktion bei *Gluc-Ref* war am besten. Die Zugabe von Arabinose verschlechterte die Expression, die weitere Zugabe von Glycerol nochmals. Ohne Glucose (*Gly+Ara*) war die C16-Produktion nochmals schlechter und am schlechtesten mit Glycerol als einziges Substrat (*Gly*). Da die Unterschiede in der Produktion deutlicher ausfallen als in der Zelldichte, zeigt sich der gleiche Trend auch im zellspezifischen C16-Gehalt $Y_{P/OD}$.

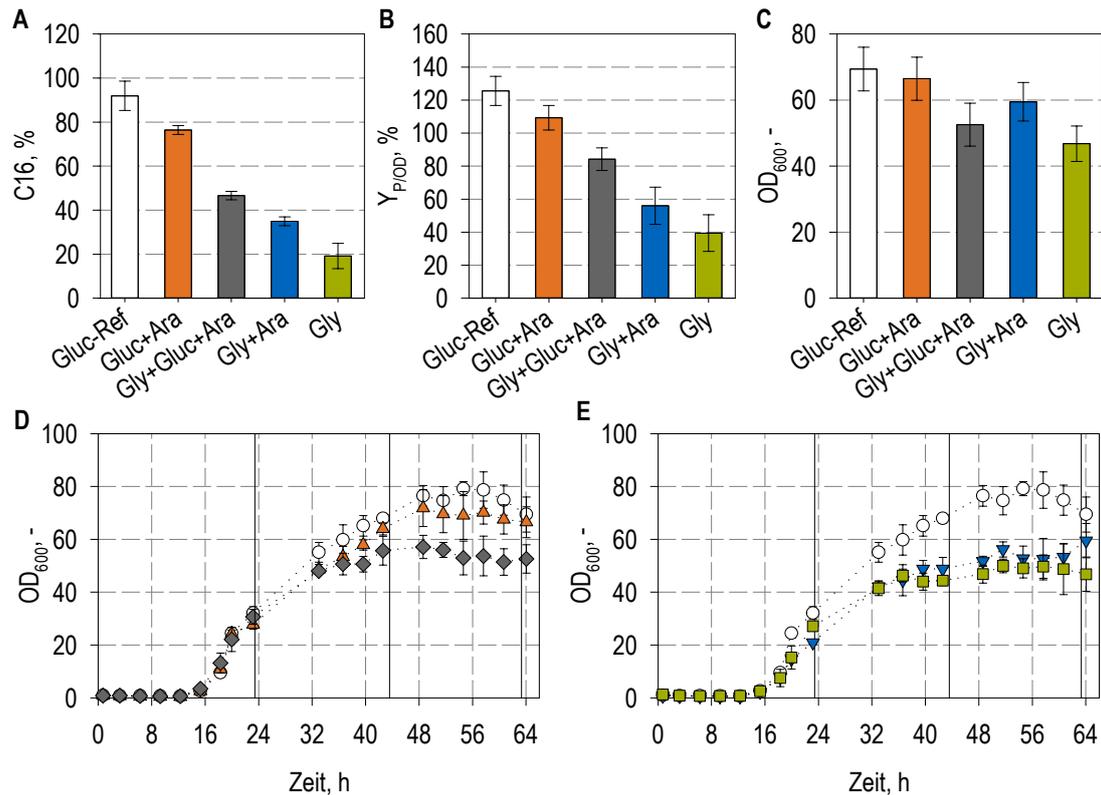


Abbildung 9.2: Untersuchung von Glycerol und Arabinose als Auxiliarsubstrat im Milliliter-Maßstab. Die fünf Zulaufmedien bestanden aus:

- Gluc-Ref: 100 % Glucose (○)
- Gluc+Ara: 50 % Glucose + 50 % Arabinose (▲)
- Gly+Gluc+Ara: 40 % Glycerol + 40 % Glucose + 20 % Arabinose (◆)
- Gly+Ara: 50 % Glycerol + 50 % Arabinose (▼) sowie
- Gly: 100 % Glycerol (■)

Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten (OD_{600} , C) nach 40 h Produktionsphase sowie der Verlauf der optischen Dichten (OD_{600} , D+E). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 4–6 parallelen Kultivierungen.

Diskussion

Bei geringen Zelldichten und starker Induktion ist Fructose in Kombination mit Glucose im gleichem Maße für die Expression geeignet wie Glucose allein. Fructose allein führt zu einer geringfügig schlechteren Produktbildung. Glycerol hingegen verschlechtert die Proteinproduktion deutlich. Es konnten nur geringe Effekte auf das Wachstums beobachtet werden, wobei die höchsten optischen Dichten jeweils mit Glucose erreicht wurden. In der Literatur finden sich positive Effekte von Fructose und Glycerol. So kann durch die Verwendung von Fructose anstelle von Glucose die Acetatbildung verringert sowie der Zellertrag und die Expression von β -Galactosidase erhöht werden (Aristidou et al., 1999). Lugert et al. (2006) verbesserten die Expression von TRIAL (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) durch die Verwendung von Glycerol anstelle von Glucose während der Produktionsphase.

Das sogenannte Auxiliarsubstratkonzept postuliert, dass durch „Mischen und simultane Verwertung von energiedefizienten und energieüberschüssigen Substraten die Ausbeute beim Wachstum gesteigert werden kann, was auch für Produktsynthesen gelten soll“ (Babel, 1992). So konnte beispielsweise die Herstellung des Carotinoids Lacopin in *E. coli* durch Zugabe von Arabinose und/oder Glucose zusätzlich zum Hauptsubstrat Glycerol verbessert werden (Kim et al., 2011).

Eine höhere Produktion von C16 mit Glycerol oder Fructose konnte nicht beobachtet werden. Umgekehrt ist Glycerol sogar deutlich schlechter für die Expression geeignet. Arabinose kann tatsächlich die Expression als Auxiliarsubstrat verbessern, wenn Glycerol eingesetzt wird. Bei Glucose hingegen ist Arabinose nicht vorteilhaft. Glucose ist als Substrat alleine am besten geeignet und die Proteinproduktion wird durch den Zusatz von Arabinose sogar verringert.

Die Proteinproduktion wurde durch Glycerol im Vergleich zu Glucose in den Kultivierungen in Abbildung 9.2 deutlich stärker verringert (C16-Konzentration um 79 % geringer) als in den Kultivierungen in Abbildung 9.1 (C16-Konzentration um 39 % geringer). Die Unterschiede zwischen den Versuchen liegen vor allem in der IPTG-Konzentration mit 0,60 oder 1,52 nIPTG und der längeren Produktionszeit bei der schwachen Induktion. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich das Substrat auf die Induktion auswirkt. Bei IPTG-Autoinduktionsversuchen mit GFP wurde durch Zugabe von Arabinose eine Veränderung der Induktion festgestellt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Aufnahme von IPTG durch Verwendung der Substrate Glucose oder Glycerol unterschiedlich. Bei Autoinduktionsversuchen mit C16 (Abschnitt 8.2) ist aufgefallen, dass das Optimum für die Expression bei 0,84 nIPTG lag. Hier diente auch Glycerol als Substrat während der Expression. In Zulaufprozessen mit Glucose konnten jedoch mit 0,52 – 0,60 nIPTG die besten Ergebnisse erzielt werden (Abschnitt 8.1). Vermutlich kann die C16-Produktion mit Glycerol noch gesteigert werden, indem die IPTG-Konzentration spezifisch optimiert wird. Da jedoch bereits das Wachstum im Vergleich zu Glucose deutlich schlechter war und die Expression bei starker Proteinbildung ebenfalls geringer ausfiel, ist keine Verbesserung gegenüber dem Zulaufprozess mit Glucose zu erwarten.

9.2 Saccharose-verwertender *Escherichia coli*

Vom Kooperationspartner wurde ein Saccharose-verwertender Stamm zur C16-Expression bereitgestellt („Sacch-Stamm“). Hierfür wurde eine *E. coli*-Invertase (*cscA*) in ein zweites Plasmid kloniert und in den bestehenden *E. coli* HMS174(DE3)-C16 transformiert. Über eine zweite Antibiotikaresistenz (Chloramphenicol zusätzlich zu Kanamycin) sollen die beiden kompatiblen Plasmide erhalten bleiben. Der bisher verwendete Stamm mit nur einem Plasmid und ohne die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung wird vereinfacht als „Gluc-Stamm“ bezeichnet.

9.2.1 Vergleich mit Referenzstamm

Insgesamt wurden vier Kultivierungen im Liter-Maßstab mit vergleichbaren Bedingungen zum Glucose-Referenzprozess durchgeführt (Abbildung 9.3). Zwei Kultivierungen wurden parallel mit 0,5 L Startvolumen und zwei weitere unabhängig mit je 2 L Startvolumen betrieben. In allen Saccharoseansätzen konnte eine vergleichbare BTM erreicht werden wie im Referenzprozess (Abbildung 9.3 C). Die Proteinproduktion hingegen war reproduzierbar deutlich schlechter, mit maximal 17 % bei 2 L Startvolumen und 24 % bei 0,5 L Startvolumen. Bemerkenswert ist auch, dass abgesehen von einer Kultivierung das Wachstum nach Induktion bei dem Sacch-Stamm fast sofort zum Erliegen kam. Dadurch wurden auch geringere BTM erreicht. $Y_{P/X}$ lag bei maximal 23 % beziehungsweise 28 %.

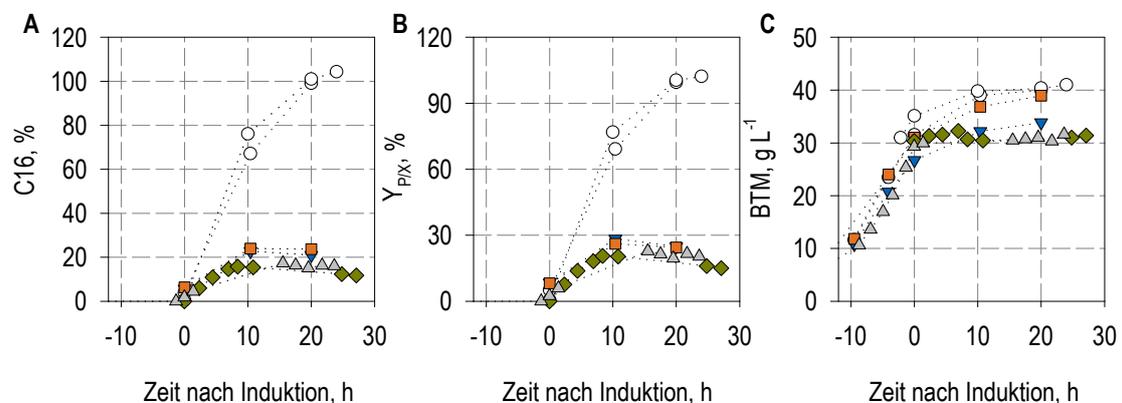


Abbildung 9.3: Vier Zulaufkultivierungen des Sacch-Stamms im Vergleich zum Gluc-Stamm (○). Zwei Kultivierungen des Sacch-Stamms wurden parallel mit 0,5 L Startvolumen und unterschiedlichen Substratkonzentrationen im Satzmedium durchgeführt: 25 g L⁻¹ Saccharose (■) und 2 g L⁻¹ Saccharose (▼). Zwei weitere Kultivierungen wurden unabhängig mit 2 L Startvolumen durchgeführt, mit 2 g L⁻¹ Saccharose (◇) und 5 g L⁻¹ Saccharose (▲) im Satzmedium. Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

Diskussion

Zwar waren Zulaufkultivierungen mit über 30 g L⁻¹ BTM mit dem Sacch-Stamm problemlos durchführbar, allerdings war die Proteinproduktion reproduzierbar wesentlich schlechter. Zwei Kultivierungen des Sacch-Stamms wurden parallel zu einer Glucose-Referenzkultivierung durchgeführt. Während mit dem Gluc-Stamm 99 % C16 nach 20 h

Produktionsphase erreicht wurden, waren es beim Sacch-Stamm etwa vier mal weniger. Es wurde dasselbe Medium und jeweils die gleiche Zulaufkonzentration verwendet. Die OD_{600} , BTM und Ammoniakzugaben waren ebenfalls vergleichbar. Enzymatische Messungen der Ammonium- und Acetatkonzentration zeigten keine auffälligen Unterschiede zwischen den parallel durchgeführten Kultivierungen des Sacch- und des Gluc-Stamms. Während der Expression lag keine Ammoniumlimitierung vor. Die Acetatkonzentration war zwar bei den zwei Saccharosekultivierungen etwas höher, jedoch maximal bei 113 mg L^{-1} und damit unproblematisch (vgl. Abschnitt 5.5). Zum Versuchsende nach 20 h Produktion lag die Acetatkonzentration bei allen parallelen Ansätzen zwischen 24 und 56 mg L^{-1} . Es konnte keine Saccharose- oder Fructoseanreicherung nachgewiesen werden. Glucose wurde nur in der letzten Probe nach 20 h Produktion mit maximal 108 mg L^{-1} gemessen werden, was die deutlich schlechtere Expression ebenfalls nicht begründet. Die geringe C16-Bildung des Sacch-Stamm war auch in zwei weiteren unabhängigen Kultivierungen mit je 2 L Startvolumen reproduzierbar.

Der Sacch-Stamm verfügt im Vergleich zum Gluc-Stamm über ein zusätzliches Plasmid (abgeleitet von pACYC184) mit einer weiteren Antibiotikumresistenz. Die gebildete Invertase wird außerdem konstitutiv ins Medium sekretiert. Eine zusätzliche Resistenz und Selektion durch ein Antibiotikum sowie die Expression und Sekretion eines weiteren heterologen Proteins könnten indirekten Einfluss auf die C16-Produktion haben, da hierdurch die metabolische Last deutlich erhöht wird. Dies würde gegen den verwendeten Sacch-Stamm beziehungsweise gegen das darin verwendete Saccharose-Verwertungssystem sprechen. Im nächsten Abschnitt wird die Ursache für die schlechte Expression eingegrenzt.

9.2.2 Eingrenzung der Ursache für die schlechte Expression von C16 mit dem Saccharose-verwertenden Stamm

Substrat

Zunächst wurde untersucht, ob die schlechtere Proteinproduktion des Sacch-Stamm durch das Substrat (Saccharose) bedingt ist. In parallelen Versuchen im Milliliter-Maßstab wurde der Gluc- und der Sacch-Stamm mit je zwei Substraten kultiviert (Abbildung 9.4).

Als Referenzansatz wurde zum einen der Gluc-Stamm komplett mit Glucose während der Wachstums- und Produktionsphase kultiviert (*G:Gluc+Gluc*). In zwei weiteren Ansätzen mit dem Gluc-Stamm wurde entweder nur während der Produktionsphase Fructose verwendet (*G:Gluc+Fru*) oder während der Wachstums- und Produktionsphase (*G:Fru+Fru*). Ein möglicher negativer Einfluss von Fructose sollte nachgewiesen beziehungsweise die Ergebnisse aus Abbildung 9.1 mit höheren Zelldichten reproduziert werden.

Für drei weitere Ansätze wurde der Sacch-Stamm verwendet. Dieser wurde zum einen komplett mit Saccharose kultiviert (*S:Sacch+Sacch*) oder mit Saccharose während der Wachstumsphase und Glucose während der Produktionsphase (*S:Sacch+Gluc*) beziehungsweise komplett mit Glucose (*S:Gluc+Gluc*). Falls tatsächlich Saccharose für die Expression negativ wäre, sollte der Einsatz von Glucose dies zeigen. Die C16-Konzentra-

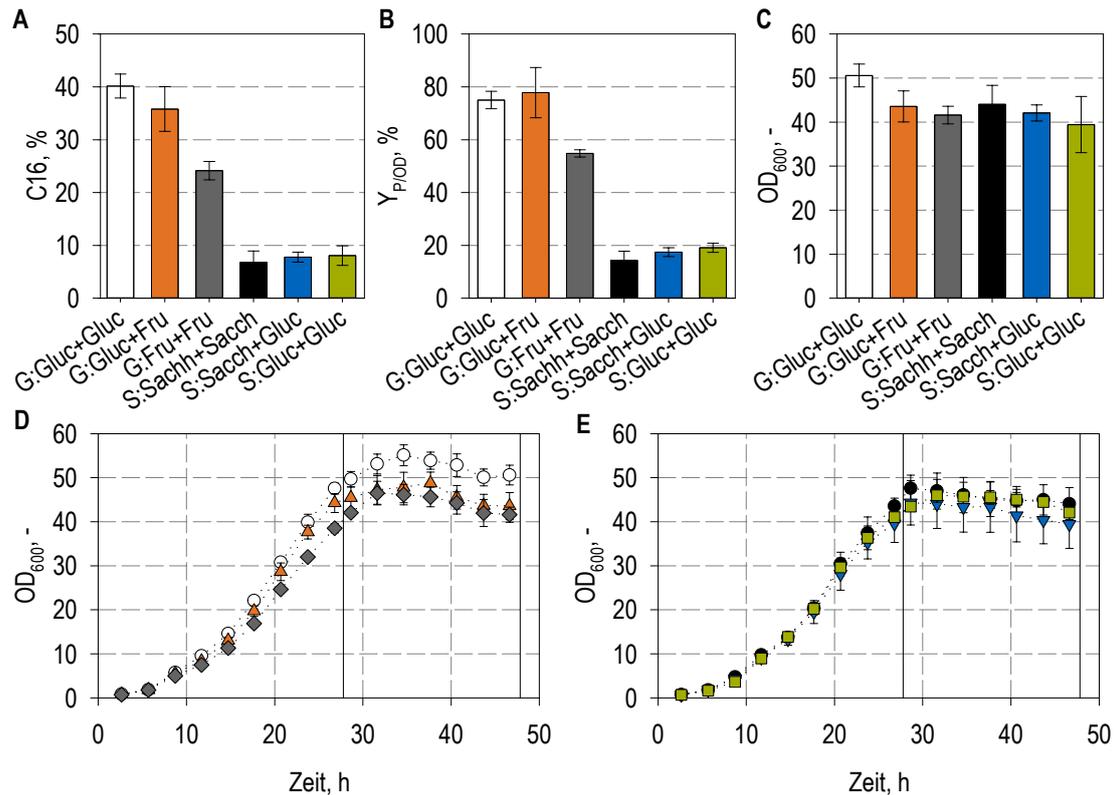


Abbildung 9.4: Parallele Kultivierungen im Milliliter-Maßstab zur C16-Expression mit dem Gluc-Stamm (G) und dem Sacch-Stamm (S) sowie jeweils verschiedenen Substraten. Für den Gluc-Stamm wurde Glucose während Wachstum und Produktion (G:Gluc+Gluc, ○), Glucose während Wachstum und Fructose während Produktion (G:Gluc+Fru, ▲) oder Fructose während Wachstum und Produktion verwendet (G:Fru+Fru, ◆). Analog wurde für den Sacch-Stamm Saccharose während Wachstum und Produktion (S:Sacch+Sacch, ●), Saccharose während Wachstum und Glucose während Produktion (S:Sacch+Gluc, ▼) oder Glucose während Wachstum und Produktion (S:Gluc+Gluc, ■) als Zulaufmedium eingesetzt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A), der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) sowie die optischen Dichten (OD_{600} , C) 20h nach Induktion mit 1,52 nIPTG. In (D) und (E) sind die optischen Dichten im Prozessverlauf aufgetragen. Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe, die vertikalen Linien zeigen den Induktions- und Probezeitpunkt. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus vier parallelen Kultivierungen.

tionen, der zellspezifische C16-Gehalt sowie die optischen Dichten sind in Abbildung 9.4 dargestellt.

Die optischen Dichten unterschieden sich nur relativ gering, wobei der Gluc-Stamm auf Glucose etwas besser wuchs als auf Fructose (OD_{600} -Werte zur Induktion von 44–48 im Vergleich zu 39). Der Sacch-Stamm erreichte auf Glucose und Saccharose ebenfalls geringfügig niedrigere optische Dichten ($OD_{600} = 41–44$).

Nach 20h Produktionsphase zeigte der Referenzansatz *G:Gluc+Gluc* die höchsten Produktkonzentrationen. Wurde Fructose nur während der Produktionsphase verwendet (*G:Gluc+Fru*), verringerte dies die Produktkonzentration geringfügig, der zellspezifische C16-Gehalt hingegen nicht, da gleichzeitig auch die optischen Dichten etwas geringer ausfielen. Der Einsatz von Fructose während der Wachstums- und der Produktionsphase (*G:Fru+Fru*) führte hingegen zu einer deutlich schlechteren Expression im Vergleich zu

Glucose. Die Proteinproduktion im Sacch-Stamm auf der anderen Seite war unabhängig vom Substrat nochmals deutlich niedriger. Ähnlich wie bei den Kultivierungen im Liter-Maßstab in Abbildung 9.3 produzierte der Sacch-Stamm etwa 4–5 Mal weniger C16 als der Gluc-Stamm. Damit kann das Substrat nicht allein für die unterschiedliche C16-Produktion zwischen den beiden Stämmen verantwortlich sein.

Antibiotikum

Abgesehen vom Substrat ist die Zugabe eines zweiten Antibiotikums der wesentliche Unterschied in der Prozessführung bei dem Sacch-Stamm. In Abbildung 9.5 sind zwei Kultivierungen im Liter-Maßstab gezeigt, bei denen auf Chloramphenicol im Hauptkulturmedium verzichtet wurde. Dadurch sollte ein möglicher negativer Einfluss des Antibiotikums als Selektionsdruck ausgeschlossen werden.

Mit maximal 25–32 % C16 wurden nur geringfügig höhere Konzentrationen als bei vergleichbaren Kultivierungen des Sacch-Stamms erreicht. Es wurde bei etwas höheren BTM induziert (34–36 g L⁻¹ statt etwa 30 g L⁻¹) und ein stärkerer Anstieg der BTM während der Produktionsphase beobachtet (Abbildung 9.5 C). Die maximalen $Y_{P/X}$ -Werte lagen bei 26–31 % und damit nur geringfügig über den vier Kultivierungen aus Abbildung 9.3, die mit Chloramphenicol durchgeführt wurden. In Abbildung 9.5 sind diese vier Kultivierungen in grau sowie zwei Glucose-Referenzkultivierungen in weiß zum Vergleich nochmals dargestellt.

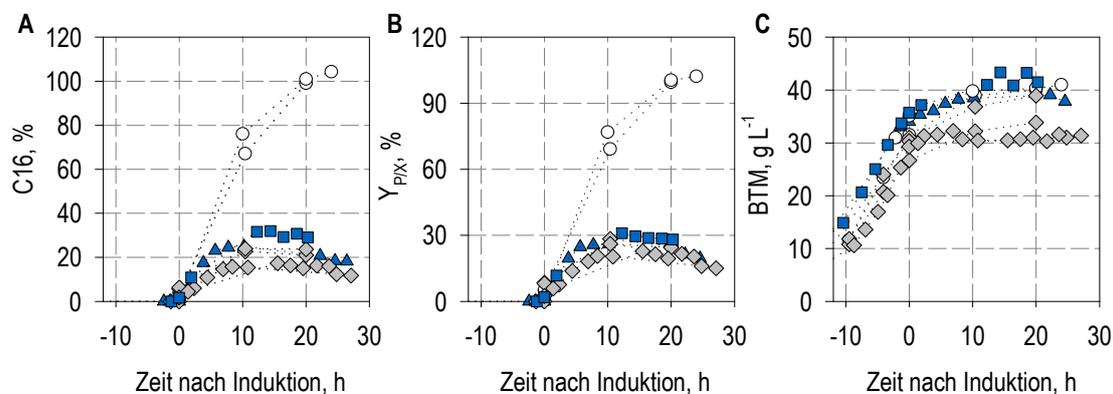


Abbildung 9.5: Zwei Kultivierungen des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab ohne Chloramphenicol (▲, ■) im Vergleich zu Kultivierungen mit Chloramphenicol (◆) beziehungsweise zum Gluc-Stamm (○). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifischer C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

Plasmid

Ein weiterer Erklärungsansatz für die schlechte Expression ist, dass bei der Herstellung des Sacch-Stamms der *E. coli* unabhängig vom Plasmid während der zweiten Transformation unbeabsichtigt verändert oder beispielsweise ein ungünstiger Klon nach der Transformation ausgewählt worden war. Um dies zu überprüfen, wurde der Sacch-Stamm von dem Plasmid pAMS001 befreit. Dies gelang durch mehrere aufeinander folgende Kul-

tivierungen im Schüttelkolben bei 40 °C mit LB-Medium und Kanamycin, aber ohne Chloramphenicol. Es konnten Kolonien isoliert werden, die keine Resistenz mehr gegen Chloramphenicol trugen. Der vom zweiten Plasmid befreite Stamm wurde daraufhin in einer Zulaufkultivierung im Liter-Maßstab kultiviert (Abbildung 9.6).

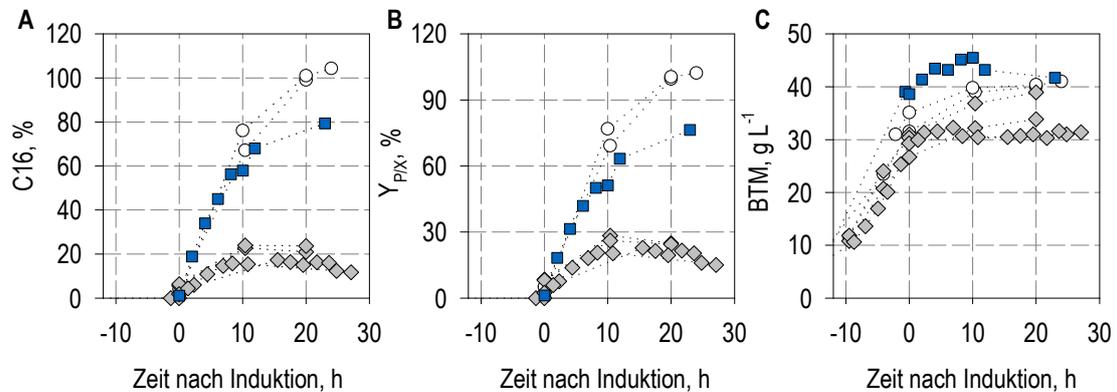


Abbildung 9.6: Kultivierung des ehemals Saccharose-verwertenden und nun vom Plasmid pAMS001 befreiten *E. coli*-Stamms im Vergleich zu Kultivierungen des Sacch-Stamm (◇) beziehungsweise zum Gluc-Stamm (○). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifischer C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C). Die Verbindungen der Messpunkte dienen nur als visuelle Hilfe.

Nach 12 h Produktion lag die C16-Konzentration mit 68 % fast so hoch wie bei den Glucose-Kultivierungen (67–76 % C16 nach 10 h). Zum Versuchsende lag C16 bei 79 % und damit deutlich über dem Sacch-Stamm, jedoch geringer als bei den Gluc-Stamm-Kultivierungen. Nach etwa 20 h Produktion und damit 3 h vor der letzten Probe kam es zu einer starken Schaumbildung. Die BTM (Abbildung 9.6 C) sowie die optischen Dichten (nicht gezeigt) fielen zum Prozessende hin ab, wodurch wahrscheinlich die C16-Konzentration niedriger ausfiel als maximal möglich gewesen wäre.

Diskussion

Ausgehend von mehreren Ansatzpunkten wurde versucht, die Ursache für die schlechtere Expression des Sacch-Stamms einzugrenzen. Bei der Betrachtung des Substrats konnte festgestellt werden, dass Fructose für die Produktion weniger gut geeignet ist als Glucose. Allerdings ist die schlechtere Expression des Sacch-Stamms nicht darauf zurückzuführen, da auch bei Verwendung von Glucose der Sacch-Stamm kaum besser exprimierte als mit Saccharose. Zudem zeigten die Verwendung eines Fructose-Glucose-Gemisches sowie die extrazellulär enzymatisch gespaltene Saccharose aus den Kultivierung in Abschnitt 5.2 keine Nachteile gegenüber der Verwendung von Glucose. Das Substrat kann daher nicht (allein) für die schlechtere Expression verantwortlich sein.

Der zweite Ansatzpunkt war das zweite Antibiotikum. Zwar wurde bei einer Kultivierung ohne Chloramphenicol eine minimal höhere C16-Konzentration von maximal 25–32 % im Vergleich zu maximal 24 % C16 erreicht. Dies ist jedoch auch auf die etwas höheren BTM zurückzuführen. Daher unterscheiden sich die maximalen $Y_{P/X}$ von 26–31 % kaum von den maximalen $Y_{P/X}$ von 28 % aus den Kultivierungen des Sacch-

Stamms mit Chloramphenicol. Der fehlende Selektionsdruck könnte zwar die Kopienzahl von pAMS001 reduziert und damit die Belastung der Zellen verringert haben. Ein Ausstrich der Zellen auf Chloramphenicol-freien und -haltigen Agarplatten ergab jedoch keinen messbaren Totalverlust des Plasmids (Daten nicht gezeigt). Die Belastung durch das zweite Antibiotikum kann folglich ebenfalls nicht für die schlechtere Expression des Sacch-Stamms verantwortlich sein. Zudem wurde die Invertase-Aktivität halbquantitativ über einen Glucoseschnelltest ermittelt (Daten nicht gezeigt). So wurde bei einer der Kultivierungen ohne Chloramphenicol zum Induktionszeitpunkt eine etwa drei Mal höhere Enzymaktivität gemessen, als für die eingesetzten Zulaufstraten erforderlich wäre und zum Ende des Versuchs war die Aktivität etwa nochmal doppelt so hoch. Folglich wird Invertase parallel zu C16 in einem zu hohen Maße exprimiert. Zudem werden die Gene für Resistenzen gegen Kanamycin und Chloramphenicol auf einem relativ hohen Level exprimiert, was die gesamte metabolische Last in dem Sacch-Stamm weiter erhöht (Glick, 1995).

Schließlich wurde der Sacch-Stamm von dem zweiten Plasmid befreit. Hierdurch verlor er folglich die Fähigkeit zur Saccharosespaltung und die Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Es sollte untersucht werden, ob der Stamm durch die Transformation mit dem Plasmid pAMS001 unbeabsichtigt verändert beziehungsweise ob eventuell ein ungeeigneter Klon nach der Transformation ausgewählt worden war. Der vom Plasmid pAMS001 befreite Stamm sollte hinsichtlich des Genotyps sowie von seiner Fähigkeit zur Proteinproduktion dem ursprünglichen Gluc-Stamm entsprechen. Es konnte daher auch keine Invertaseaktivität gemessen werden. Mit dem neu erhaltenen Stamm konnte eine wesentlich höhere Produktbildung gemessen werden, als mit dem Sacch-Stamm. Daher ist davon auszugehen, dass der Sacch-Stamm intakt ist und die schlechte Expression hauptsächlich durch das Plasmid pAMS001 verursacht wird.

Als Folge daraus sollte die Invertase von einem anderen, möglichst induzierbaren und nicht konstitutiven Promoter exprimiert werden. Alternativ oder zusätzlich wäre die chromosomale Integration der Invertase erstrebenswert, um einen zweiten Selektionsdruck zu vermeiden und die gesamte Expression der Invertase zu verringern.

9.2.3 Einfluss der Induktion

Die Verringerung der IPTG-Konzentration bei dem Gluc-Stamm hat mutmaßlich zu einer geringeren Belastung der Zellen durch die Expression und zu einem stärkeren Wachstum und einer besseren Zellvitalität geführt. Die metabolische Belastung durch die Induktion mit 1,52 nIPTG ist im Falle des Sacch-Stamms durch die zusätzliche Expression der Invertase noch größer. Darauf deutet auch der Stopp der C16-Produktion nach bereits 10 h hin (vgl. Abbildung 9.3). Eine Verringerung der IPTG-Konzentration sollte folglich im Falle des Sacch-Stamms ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der Expression führen.

Abbildung 9.7 zeigt zusätzlich zu den Kultivierungen aus Abbildung 9.3 zwei parallele Kultivierungen des Gluc- und Sacch-Stamms, die jeweils mit 0,60 nIPTG induziert wurden. Nach 30 h Produktion wurde mit dem Ansatz *Sacch-Stamm + 0,60 nIPTG* eine C16-Konzentration von 89 % gemessen, die damit deutlich höher war als in den Kultivierung mit 1,52 nIPTG. Die Produktbildung dauerte bis zum Ende an und stoppte nicht

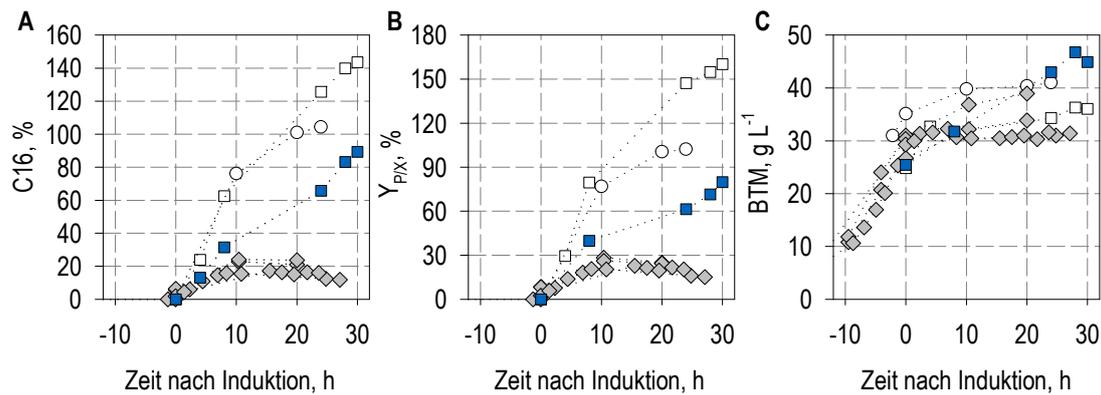


Abbildung 9.7: Expression von C16 im Sacch-Stamm mit 0,60 nIPTG (■). Parallel hierzu wurde auch der Gluc-Stamm mit 0,60 nIPTG induziert (□). Zum Vergleich sind zudem die Kultivierungen des Sacch-Stamms mit 1,52 nIPTG (◆) sowie des Gluc-Stamms mit 1,52 nIPTG (○) gezeigt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifischer C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

wie bei der Induktion mit 1,52 nIPTG bereits nach 10 h. Durch den deutlich höheren Anstieg der BTM des Ansatzes *Sacch-Stamm + 0,60 nIPTG* fielen die $Y_{P/X}$ -Werte verhältnismäßig gering aus. Auffällig ist zudem, dass die Produktion deutlich niedriger war als bei dem Gluc-Stamm mit 0,60 nIPTG. Hier wurde nach 30 h Produktion mit 144 % C16 nochmals deutlich mehr Produkt gebildet.

Das deutlich höhere Wachstum und der geringe zellspezifische C16-Gehalt beim Saccharoseansatz führten zu der Vermutung, dass hier die Induktion möglicherweise mit 0,60 nIPTG zu schwach war und die IPTG-Konzentration für den Sacch-Stamm separat optimiert werden müsste. Ähnlich zu den Optimierungen in Abbildung 8.5 wurde daher für den Sacch-Stamm im Milliliter-Maßstab die IPTG-Konzentration und Zulauftrate untersucht (Abbildung 9.8).

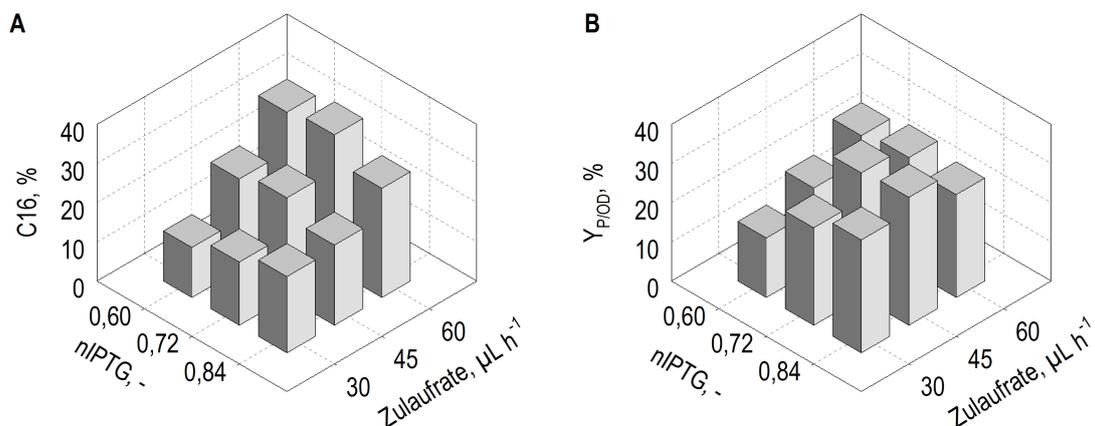


Abbildung 9.8: Expression von C16 im Sacch-Stamm im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) sowie der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/OD}$, B) 46 h nach Induktion. Während der Produktionsphase war jedoch aufgrund technischer Probleme der Zulauf für 13 h unterbrochen.

Die höchsten C16-Konzentration wurden mit der höchsten Zulauftrate ($60 \mu\text{L h}^{-1}$) und $0,60\text{--}0,72 \text{ nIPTG}$ erreicht. Für den höchsten zellspezifischen C16-Gehalt hingegen waren $0,72\text{--}0,84 \text{ nIPTG}$ bei $45 \mu\text{L h}^{-1}$ am besten geeignet.

Um die Produktbildungsrate und den maximalen zellspezifischen C16-Gehalt zu erhöhen, wurde auch eine zweistufige Induktion untersucht (Abbildung 9.9). Die erste Induktion erfolgte mit $0,60 \text{ nIPTG}$. Die IPTG-Konzentration wurde $6,5 \text{ h}$ später auf $0,79 \text{ nIPTG}$ erhöht. Dadurch konnte nach 30 h Produktion eine C16-Konzentration von 102% erzielt werden. Auch der zellspezifische C16-Gehalt lag mit 98% sehr nah am Glucose-Referenzprozess. Interessanterweise stieg $Y_{P/X}$ nach 24 h Produktion nicht mehr weiter an. Biomasse- und Proteinkonzentrationen veränderten sich in gleicher Weise.

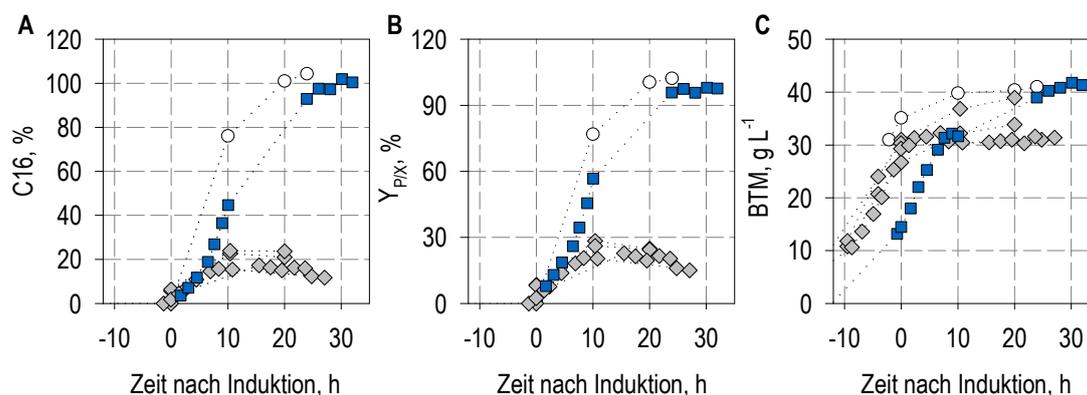


Abbildung 9.9: Kultivierung des Sacch-Stamms mit einer zweistufigen Induktion mit $0,60\text{--}0,72 \text{ nIPTG}$ (■). Bei 0 h wurden $0,60 \text{ nIPTG}$ zugegeben; $6,5 \text{ h}$ später erfolgte die Erhöhung auf $0,79 \text{ nIPTG}$. Zum Vergleich sind zudem die Kultivierungen des Sacch-Stamms mit $1,52$ (◇) sowie des Gluc-Stamms mit $1,52 \text{ nIPTG}$ (○) gezeigt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

In einer weiteren Kultivierung im Liter-Maßstab wurde einmalig mit $0,72 \text{ nIPTG}$ induziert (Daten nicht gezeigt). Hier lag C16 nach 24 h Produktion bei 98% und $Y_{P/X}$ bei 103% und damit vergleichbar zu der Kultivierung in Abbildung 9.9. Trotz der langen Produktionszeit von 54 h wurden nur maximal 111% C16 bei $Y_{P/X} = 97 \%$ erreicht.

Diskussion

Die Wahl der besten Bedingung bei der Kultivierung im Milliliter-Maßstab in Abbildung 9.4 fällt weniger eindeutig aus, als dies beim Gluc-Stamm der Fall war (vgl. Abbildung 8.5). Aufgrund technischer Probleme wurde bei diesem Versuch während der Produktionsphase für etwa 13 Stunden kein Substrat zugegeben (von insgesamt 46 h Produktionszeit), was die Aussagekraft dieser Ergebnisse möglicherweise reduzieren kann. Dennoch konnte ein Einfluss der IPTG-Konzentration und der Zulauftrate beobachtet werden. Analog zum Gluc-Stamm konnten höhere Produktkonzentrationen mit weniger Induktor (unter $0,84 \text{ nIPTG}$) und höherem Zulauf erzielt werden. Allerdings wurde im Gegensatz zum Gluc-Stamm keine Verbesserung zwischen $0,72$ und $0,60 \text{ nIPTG}$ beobachtet.

Durch die Verringerung der IPTG-Konzentration in Zulaufprozessen im Liter-Maßstab

konnte die Produktion von C16 im Sacch-Stamm deutlich verbessert werden. Die C16-Konzentration wurde um mehr als das vierfache von maximal 24 % auf bis zu 102–103 % C16 innerhalb von 30 h Produktionszeit erhöht – unabhängig davon, ob nacheinander mit 0,60 und 0,79 nIPTG oder einmalig mit 0,72 induziert wurde. Damit war die Steigerung hier nochmals deutlich höher als beim Gluc-Stamm, wo nur etwa eine Verdopplung von 100 % auf maximal 202–217 % erreicht wurde. Dennoch konnte mit dem Sacch-Stamm nur etwa das Niveau des Glucose-Referenzprozesses erzielt werden. Die maximale C16-Konzentration mit dem Sacch-Stamm ist nur etwa halb so hoch wie bei dem optimierten Glucoseprozess. Die Verwendung von Saccharose scheint daher weniger sinnvoll für die Herstellung von C16. Allerdings ermöglicht die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung den Einsatz weiterer Substrate, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

9.2.4 Zuckerrübenmelasse als Substrat

Noch günstiger als Saccharose sind weniger definierte Kohlenstoffquellen wie beispielsweise Zuckerrübenmelasse (vgl. Abschnitt 3.3.1). Um das Wachstum und die Produktion auf Zuckerrübenmelasse (im Folgenden „Melasse“) zu untersuchen, wurden zwei Kultivierungen des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab durchgeführt. Bei der Kultivierung in Abbildung 9.10 sollten 25 g L⁻¹ Saccharose aus der Melasse im Satzmedium vorgelegt werden. Hierfür wurden die Angaben auf der Verpackung verwendet. Im Nachhinein durchgeführte Messungen der Zuckerkonzentrationen ergaben jedoch, dass dadurch fast 40 g L⁻¹ Saccharose im Medium vorlagen. Durch die hohe Substratkonzentration reichte sich viel Acetat an (über 4 g L⁻¹) und die Zellen konnten das vorgelegte Substrat nicht verstoffwechseln. So wurde Fructose nicht verbraucht und reicherte sich schnell an. Anhand des Sauerstoffpartialdrucks lässt sich erkennen, dass die Zellen nach 10 h Prozesszeit den Stoffwechsel stark verringerten. Aufgrund des Überdrucks von 0,15 bar wurde ein Sauerstoffpartialdruck von über 100 % gemessen.

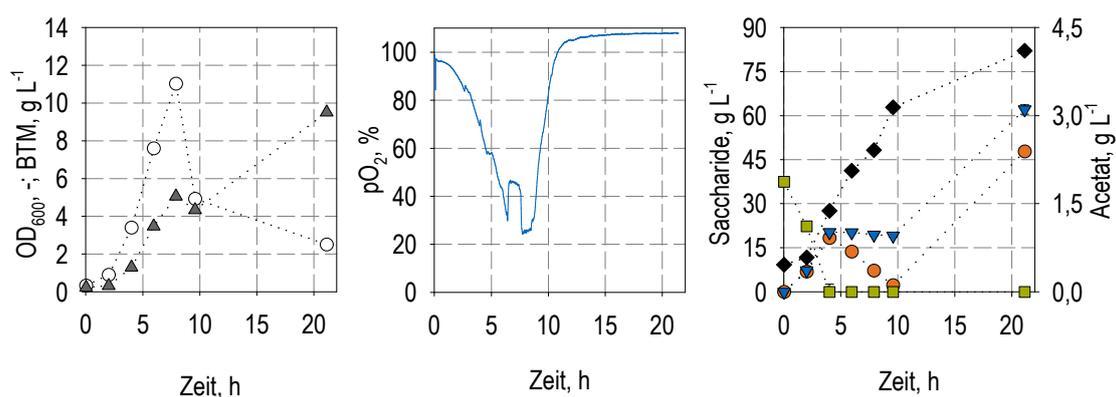


Abbildung 9.10: Kultivierung des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab mit Zuckerrübenmelasse als Kohlenstoffquelle. Es wurde nicht induziert. In (A) sind die optischen Dichten (OD_{600} , \circ) und Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, \blacktriangle) und in (B) der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. Rechts (C) sind die Acetat- (\blacklozenge) sowie die Zuckerkonzentrationen gezeigt: Saccharose (\blacksquare), Glucose (\bullet), Fructose (\blacktriangledown). Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

In der zweiten Kultivierung (Abbildung 9.11) wurde eine deutlich geringere Melasse-

Konzentration im Satzmedium vorgelegt (15 g L^{-1}). Der Zulauf wurde nicht automatisiert gestartet, sondern insgesamt eine lange Wachstumsphase von 26 h durchgeführt. Eine Anreicherung von Substraten wurde nicht beobachtet. Die Biomasseausbeute lag zum Induktionszeitpunkt bei $0,41 \text{ g g}^{-1}$ und ist damit mit anderen Kultivierungen mit Glucose oder Saccharose vergleichbar. Es wurde mit $0,72 \text{ nIPTG}$ induziert und eine C16-Konzentration von 121 % erzielt.

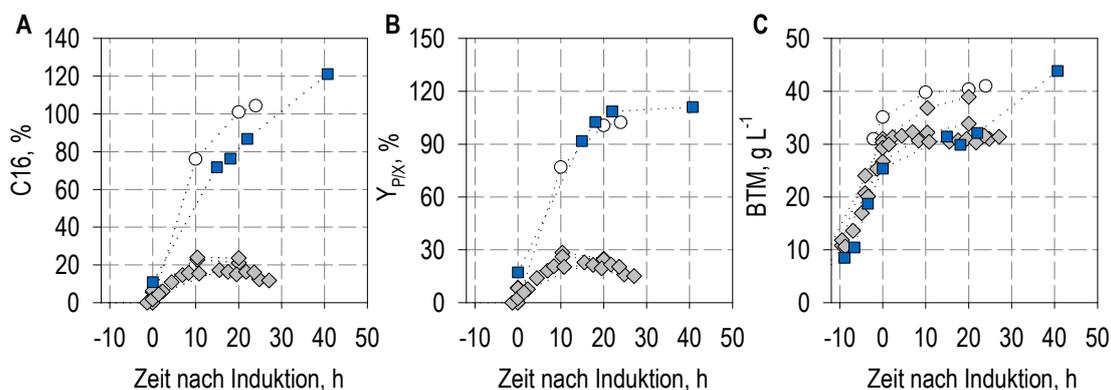


Abbildung 9.11: Kultivierung des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab mit Zuckerrübenmelasse als Kohlenstoffquelle, verringerter Substratkonzentration im Satzmedium und Induktion mit $0,72 \text{ nIPTG}$ (■). Zum Vergleich sind zudem Saccharose- (◇) sowie Glucosekultivierungen (○) mit jeweils $1,52 \text{ nIPTG}$ gezeigt. Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifischer C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C) Die Verbindungen der Messpunkte dienen als visuelle Hilfe.

Diskussion

Eine Substratübersversorgung ist bei Saccharose und vor allem bei Melasse für den Prozess kritischer als bei Glucose. Es liegen verschiedene Kohlenstoffquellen vor und Fructose unterliegt der Katabolitrepession durch Glucose (Andersson et al., 2007; Clark und Holms, 1976). Ist jedoch die Glucosekonzentration niedrig genug, um das Wachstums zu limitieren, wird Fructose parallel verstoffwechselt.

Durch lineare Regression der logarithmierten OD_{600} -Werte der ersten 6 h aus Abbildung 9.10 wurde eine Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,55 \text{ h}^{-1}$ bestimmt, während im definiertem Medium mit dem Gluc-Stamm zuvor eine Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ gemessen wurde. Damit können die Zellen mit Melasse als nicht-definierte Kohlenstoffquelle potentiell schneller wachsen. Dies führt aber auch zu einer stärkeren Acetatbildung. Aufgrund der Katabolitrepession wurde bei der Kultivierung in Abbildung 9.10 nur Glucose verbraucht und keine Fructose (zumindest in den ersten 10 h). Obwohl nur etwa 20 g L^{-1} Glucose verstoffwechselt wurden, sind über 3 g L^{-1} Acetat gebildet worden. Bei Glucosekultivierungen wurden hingegen weniger als $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Acetat bei bis zu 25 g L^{-1} Glucose beobachtet. Der Stoffwechsel stellte sich in der Kultivierung in Abbildung 9.10 nach etwa 8 h ein und die optischen Dichten sanken deutlich. Dies könnte auf das gebildete Acetat zurückzuführen sein.

Beim Einsatz von geringeren Melassekonzentrationen im Satzmedium und unter kon-

trolliertem Wachstum ist eine Zulaufkultivierung mit hohen Zelldichten realisierbar. Nach der Induktion mit 0,72 nIPTG und einer Produktionszeit von 41 h wurden mit 121 % C16 die höchste Produktkonzentration mit dem Sacch-Stamm erreicht. Auch $Y_{P/X}$ sowie die Produktausbeute $Y_{P/S}$ sind mit 111 und 126% etwas höher als in Kultivierungen mit Saccharose und höher als im Glucose-Referenzprozess. Die Proteinproduktion des optimierten Glucoseprozesses ist mit dem Sacch-Stamm jedoch nicht zu erreichen.

Die grundsätzliche Verwendbarkeit von Melasse wurde erfolgreich gezeigt. Abhängig von der Prozessführung sind vergleichbare oder bessere Ergebnisse als mit Saccharose zu erzielen. Eine im Einzelfall durchgeführte Kostenrechnung ist jedoch erforderlich, um abhängig von Substrat- und Anlagenkosten zu ermitteln, ob der günstigere Preis von Melasse die geringere C16-Produktion rechtfertigt.

Unter der Annahme, dass mit Glucose im Vergleich zu Melasse der doppelte C16-Ertrag möglich ist, müsste Melasse viermal günstiger sein, um dieselben Kosten/Produkt zu ergeben, wenn Glucose 2/3 der Kosten verursacht. Verursacht Glucose jedoch weniger als die Hälfte der Kosten, kann sich Melasse nicht mehr lohnen. Laut Peters (2006) lag der durchschnittliche Preis von Glucose bei 0,35–0,60 \$/kg. Zur besseren Vergleichbarkeit wird auch für die anderen Kohlenstoffquellen der Preis pro kg Hexose angegeben. Dieser lag für Saccharose bei 0,20–0,30 \$/kg und für Melasse bei 0,15–0,25 \$/kg. Damit ist Saccharose nur etwa halb so teuer wie Glucose. Melasse ist zwar neben roher Lactose das billigste Kohlenhydrat, aber im Schnitt nur etwas billiger als Saccharose. Ausgehend von diesen Zahlen kann sich der aktuelle Sacch-Stamm kaum lohnen. Dies könnte sich jedoch ändern, wenn der Stamm gentechnisch optimiert wird. Wie aus Abbildung 9.10 ersichtlich wird, ist die Invertaseaktivität viel zu hoch. Trotz der geringen Zelldichten ($OD_{600} < 4$) wurden innerhalb von 4 h die vorgelegten 40 g L^{-1} Saccharose vollständig zu Fructose und Glucose abgebaut. Die Expression der Invertase ist zu stark und stellt damit einen unnötige metabolische Last dar. Eine gentechnische Optimierung des Sacch-Stamms, beispielsweise durch eine chromosomal codierte induzierbare Expression der Invertase, könnte daher aussichtsreich sein, um die C16-Produktion deutlich zu verbessern.

10 Zusammenfassung

Spinnenseide hat herausragende mechanische Eigenschaften und kann vor allem sehr viel Energie aufnehmen, bevor sie reißt. Spinnenseidenproteine sind zudem biokompatibel und nicht immunogen und eignen sich daher neben vielen weiteren Beispielen auch für medizintechnische Anwendungen, wie die Beschichtung von Implantaten. Die Gewinnung von Spinnenseide aus Spinnen ist wegen dem Territorialverhalten und dem Kannibalismus der Spinnen nicht wirtschaftlich realisierbar. Im Gegensatz dazu ist eine biotechnologische Produktion von Spinnenseidenproteinen in Mikroorganismen möglich, gestaltet sich jedoch ebenfalls schwierig. Diese Proteine sind sehr groß, repetitiv und der Anteil einzelner Aminosäuren ist übermäßig hoch. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte synthetische Spinnenseidenprotein C16 ist zudem sehr unpolar, hydrophob und kaum wasserlöslich, gehört jedoch gleichzeitig zu den am besten untersuchten Spinnenseidenproteinen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die reaktionstechnische Untersuchung der Herstellung des Spinnenseidenproteins C16 mit *E. coli*, um damit Wege zur Prozessintensivierung aufzuzeigen. Ausgangslage hierfür war ein Referenzprozess mit einem T7-Expressionssystem in dem *E. coli*-Stamm HMS174(DE3). Bei der Prozessintensivierung steht in diesem Fall vor allem die Erhöhung der Produktkonzentration und Verringerung der Kosten für die Einsatzstoffe im Vordergrund.

Für eine schnelle Prozessentwicklung mit Hilfe vieler gleichzeitiger Kultivierungen wurde ein Bioreaktorblock mit 48 parallel betriebenen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab eingesetzt. Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich skalierbare Hochzell-dichtekultivierungen zur Proteinproduktion mit *E. coli* in diesem Parallelreaktorsystem realisieren lassen. Zulaufkultivierungen mit Biotrockenmassekonzentrationen von über 50 g L^{-1} wurden erstmalig im Milliliter-Maßstab sowohl mit einem intermittierenden Zulauf (8 Dosierstrecken eines Laborroboters bedienen 48 Parallelreaktoren) als auch mit einer neu entwickelten enzymatischen Freisetzung (intermittierend zudosierte Saccharose wird im Reaktor durch eine Invertase gespalten) realisiert. Allerdings war die Robustheit dieser Zulaufkultivierungen aufgrund der Eigenfluoreszenz von *E. coli* bei sehr hohen Zelldichten vor allem hinsichtlich der fluorimetrischen pH-Messung nicht ausreichend. Daher mussten für die Untersuchung der Proteinproduktion geringere Zelldichten im Milliliter-Maßstab verwendet werden. Unter der Berücksichtigung der Prozesszeit konnten damit ein zum Referenzprozess vergleichbarer zellspezifischer C16-Gehalt erzielt werden, womit eine Skalierbarkeit der Zulaufkultivierung in den Milliliter-Maßstab gegeben war. Der Herstellungsprozess von C16 war nicht empfindlich gegenüber Schwankungen der Substrat- und Sauerstoffverfügbarkeit bei intermittierender Dosierung. In einem weiteren Ansatz wurden als Alternative zu Zulaufprozessen mit IPTG-Induktion auch Autoinduktionsmedien als Ansatz für die reaktionstechnische Analyse von Expressionsprozessen im Milliliter-Maßstab untersucht. Autoinduktionsmedien waren für die Produktion von C16

im Liter- und Milliliter-Maßstab gleichermaßen anwendbar, boten aber weniger Möglichkeiten zur reaktionstechnischen Analyse im Vergleich zu Zulaufprozessen mit IPTG-Induktion. So lassen sich beispielsweise keine unterschiedlichen Wachstumsraten einstellen und die Dauer der Produktionsphase ist durch die vorgelegten Substrate begrenzt. Für die Maßstabsübertragung des Herstellungsprozesses von C16 war zudem von Interesse, welche Prozessgrößen Wachstum und Produktion maßgeblich beeinflussen. Es zeigte sich, dass weniger ein konstanter Leistungs- oder Sauerstoffeintrag, sondern vielmehr die Vermeidung von dauerhaften Sauerstofflimitierungen entscheidend ist. Folglich muss stets ein minimaler Sauerstoffpartialdruck im Reaktor aufrecht erhalten werden. Wenn nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht, führt dies bei *E. coli* zur gemischten Säuregärung. Von den gebildeten Nebenprodukten war vor allem Lactat schädlich für Wachstum und Proteinproduktion. Die so im Milliliter-Maßstab realisierten Zulaufkultivierungen stellten die Grundlage für weitere Ansätze zur Prozessintensivierung dar.

Im Referenzprozess wurde ein definiertes Medium nach Korz et al. (1995) eingesetzt, das für Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* entwickelt wurde. Zur Prozessintensivierung wurde untersucht, ob sich dessen Einsatzstoffe reduzieren lassen. Die Hauptsalzkomponenten des Satzmediums konnten praktisch ohne Einbußen in der Proteinproduktion vereinfacht werden, indem auf Citronensäure und Natriumhydroxid verzichtet wurde und Diammoniumhydrogenphosphat durch das günstigere Ammoniumsulfat ersetzt wurde. Damit konnten die Kosten für die Einsatzstoffe in Laborqualität auf 85 % (exklusive Glucose) beziehungsweise 94 % (inklusive Glucose) im Vergleich zum Referenzmedium gesenkt werden. Wenn die Magnesiumsulfatkonzentration im Satzmedium erhöht wurde, war kein Magnesiumsulfat im Zulaufmedium erforderlich. Dadurch konnte die erforderliche Gesamtmenge Magnesiumsulfat reduziert und die damit verbundenen Kosten der Einsatzstoffe weiter auf 75 % (exklusive Glucose) beziehungsweise 90 % (inklusive Glucose) im Vergleich zum Referenzmedium gesenkt werden. Aufgrund des hohen Kohlenstoffbedarfs bei Hochzelldichtekultivierungen nimmt Glucose mit 59 % in dem verwendeten definierten Medium den wesentlichen Teil der Kosten ein. Daher lassen sich diese durch Reduktion aller anderen Einsatzstoffe nicht noch weiter verringern. Beim Referenzprozess wurde im Zulaufmedium neben Glucose und Magnesiumsulfat weitere Spurenelemente zugegeben. Es wurde gezeigt, dass die im Referenzprozess von Beginn an vorgelegten Spurenelemente ausreichend sind und daher keine Spurenelemente mehr über das Zulaufmedium zugegeben werden müssen. Der Kostenanteil dieser Spurenelemente im Zulaufmedium war zwar gering, jedoch konnte nun ausschließlich Glucose während der Kultivierung zudosiert werden, während alle anderen Komponenten vorgelegt wurden. Dies stellt im Vergleich zum Referenzprozess eine deutliche Vereinfachung dar, da für das Zulaufmedium keine Komponenten mehr separat sterilisiert und aseptisch zusammengeführt werden müssen. Weitere untersuchte Einsatzstoffe wie Trypton, Calcium- oder Natriumsalze sowie zusätzliches Ammoniumsulfat förderten weder Wachstum noch Produktion und die vorgelegten Spurenelemente Cobalt und Mangan waren ebenfalls nicht erforderlich.

Das wichtigste Ziel der Prozessintensivierung in dieser Arbeit war die Erhöhung der Produktkonzentration. Hierfür sind aufgrund der intrazellulären Produktakkumulation

hohe Zelldichten von Vorteil. Es wurde daher untersucht, ob sich durch eine geeignete Prozessführung das Wachstum bei begrenzter Sauerstoffeintragsleistung des Bioreaktors beschleunigen lässt und inwieweit die Wachstumsphase die anschließende Proteinproduktion beeinflusst. Bei Zulaufkultivierungen mit niedrigen Zelldichten führten interessanterweise höhere Wachstumsraten vor der Induktion ($\mu_{set} = 0,20 \text{ h}^{-1}$) zu einer besseren Produktion als niedrige Wachstumsraten ($\mu_{set} \leq 0,15 \text{ h}^{-1}$). Die Wachstumsrate in der Wachstumsphase zeigte damit einen deutlichen Einfluss auf die spätere Proteinproduktion in der Produktionsphase. Grundsätzlich kann zwar eine Verringerung der vorgelegten Glucosekonzentration die Reproduzierbarkeit eines Zulaufprozesses erhöhen. Für die Herstellung von C16 hatte sich jedoch eine geringere vorgelegte Glucosekonzentration mit einer entsprechend längeren exponentiellen Zulaufphase als nicht zielführend erwiesen, da dies die Proteinbildung verringerte und den Prozess verlängerte. Stattdessen konnte die Wachstumsphase des Hochzelldichteprozesses deutlich vereinfacht werden, indem auf die exponentielle Zulaufphase verzichtet wurde. Die Proteinproduktion wurde dadurch nicht beeinträchtigt, sondern konnte sogar etwas länger aufrecht erhalten werden. Die Prozessführung hingegen vereinfachte sich deutlich, da nach der Satzphase nur noch eine konstante Zulauftrate (hier $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose bezogen auf das Startvolumen) eingestellt werden musste.

Die Produktbildung wird im T7-Expressionssystem durch die Zugabe des Induktors IPTG gestartet. Geeignete Induktionszeitpunkte und IPTG-Konzentrationen wurden untersucht, da sie dazu beitragen können, den Zielproteinanteil in den Zellen und damit auch die Produktkonzentration zu erhöhen. Die Proteinproduktion war aber unabhängig von der IPTG-Konzentration, solange Konzentrationen von 1,00 – 1,52 nIPTG eingesetzt wurden. Durch die Verringerung der IPTG-Konzentration auf 0,52 – 0,60 nIPTG konnte hingegen eine wesentliche Steigerung der Proteinproduktion erzielt werden. Bei der Übertragung in den Liter-Maßstab in einen Glas-Rührkesselreaktor mit 2 L Startvolumen und einen Edelstahl-Rührkesselreaktor mit 10 L Startvolumen wurden C16-Konzentrationen von über 200 % im Vergleich zum Referenzprozess erreicht (Abbildung 10-1). Die zellspezifischen C16-Konzentrationen ($Y_{P/X}$) lagen bei bis zu 189 %, ebenfalls im Vergleich zum Referenzprozess. Gleichzeitig verbesserte sich bei niedrigen IPTG-Konzentrationen auch das Wachstum während der Expression, sodass die Induktion nach einer kürzeren Wachstumsphase bei niedrigeren Zelldichten erfolgen konnte. Das bessere Wachstum der Zellen zeigt, dass im Vergleich zum Referenzprozess durch die schwache Induktion die metabolische Last verringert wurde. Trotz des hohen Bedarfs an Glycin und Alanin in C16 konnten die Zellen anscheinend die benötigten tRNAs bereitstellen und den eigenen Stoffwechsel und das Wachstum über einen längeren Zeitraum aufrecht halten. Da die Produktbildungsrate allerdings nicht gesteigert wird, ist für eine höhere Produktkonzentration auch eine längere Produktionsphase erforderlich. Trotz 48 h Produktion lag die Raum-Zeit-Ausbeute der Kultivierung mit 0,52 nIPTG in Abbildung 10-1 bezogen auf den Gesamtprozess bei 137 % im Vergleich zum Referenzprozess.

Bei der Untersuchung der Induktion wurde kein Zusammenhang zwischen der IPTG-Konzentration und der Zelldichte festgestellt. Höhere Substratzulaufraten nach schwacher Induktion verbesserten hingegen sowohl das Wachstum als auch die Proteinproduktion

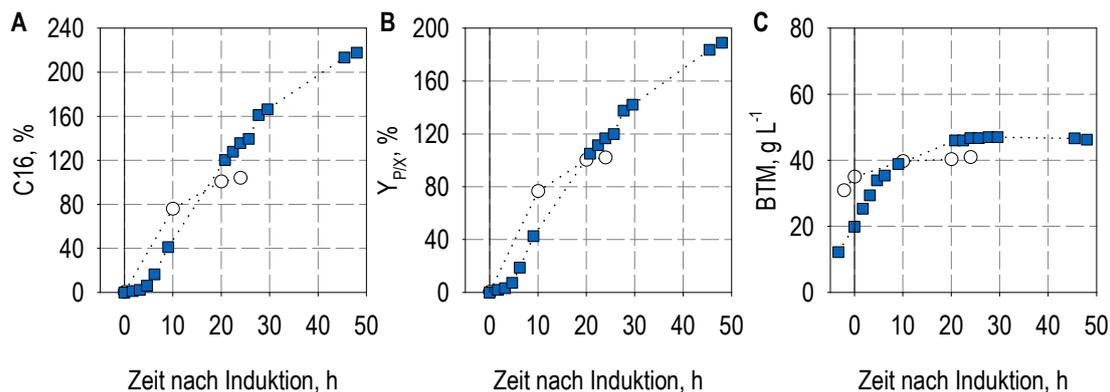


Abbildung 10-1: Zulaufkultivierungen mit 10 L Startvolumen und Induktion mit 0,52 nIPTG (■) im Vergleich zum Referenzprozess mit 1,52 nIPTG (○). Dargestellt sind die C16-Konzentrationen (A) und der zellspezifische C16-Gehalt ($Y_{P/X}$, B) sowie die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM, C).

während der Produktionsphase. Bei der Untersuchung eines geeigneten Induktionszeitpunkts wurde überraschender Weise festgestellt, dass mit niedrigen IPTG-Konzentrationen in Anwesenheit von Glucose keine Induktion stattfinden und diese erst während des glucoselimitierten Zulaufs erfolgt. Eine solche Katabolitrepression wird bei Autoinduktionsmedien mit Lactose genutzt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Autoinduktionsmedien auch mit IPTG funktionieren, wenn ausreichend niedrige IPTG-Konzentrationen eingesetzt werden. Die Proteinproduktion in Autoinduktionsmedien mit IPTG hing jedoch von dem eingesetzten Stamm und dem gebildeten Protein ab. Durch die Expression eines weiteren rekombinanten Spinnenseidenproteins, des AQ24NR3, konnte gezeigt werden, dass die optimale IPTG-Konzentration, bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen und demselben Expressionswirt, zwischen den exprimierten Proteinen variiert.

Glucose stellt als einzige Kohlenstoffquelle den größten Kostenanteil der Einsatzstoffe dar, weswegen schließlich alternative Kohlenstoffquellen untersucht wurden. Dabei stellte sich Fructose als geringfügig und Glycerol als deutlich schlechteres Substrat dar. Ein Glucose-Fructose-Gemisch (1:1) war hingegen mit Glucose vergleichbar bezüglich der C16-Produktion. Damit Saccharose verwertet werden kann, wurde ein modifizierter Stamm untersucht, der ein weiteres Plasmid mit einer konstitutiv exprimierten Invertase trägt. Obwohl das Wachstum mit diesem Stamm vergleichbar realisiert werden konnte, war die Proteinproduktion reproduzierbar um den Faktor 4 geringer. Als mögliche Ursachen konnten das Substrat Saccharose an sich, das zusätzliche Antibiotikum Chloramphenicol und unbeabsichtigte Mutationen des Stamms ausgeschlossen werden. Durch die Anpassung der Induktion beim Saccharose-Stamm konnte eine zum ursprünglichen Glucose-Referenzprozess vergleichbare Proteinproduktion erreicht werden. Auch die erfolgreiche Verwendung von Melasse mit Saccharose als hauptsächlicher Zuckerquelle wurde mit einer C16-Konzentration von 121 % im Vergleich zur Glucose-Referenz demonstriert.

Ausblick

Aufbauend auf dem in dieser Arbeit neu gestalteten Produktionsprozess zur Herstellung von C16 mit *E. coli* könnten weitere Ansätze zur Prozessintensivierung beitragen.

Beispielsweise könnte in weiterführenden Arbeiten der Saccharose-verwertende Stamm gentechnisch optimiert werden. Eine Anpassung der Promoterstärke für die Invertasebildung, die am besten chromosomal codiert und induzierbar sein sollte, erscheint vielversprechend, um die Produktion auf Saccharose wesentlich zu verbessern und auf das Niveau des Glucose-Stamms zu heben.

Des Weiteren gehört die Anpassung der Codonverwendung zu den molekularbiologischen Hauptstrategien zur Steigerung der Produktion von Fremdproteinen. In C16 sind zwar keine seltenen Codons von *E. coli* enthalten, allerdings sind aufgrund der einfachen Primärsequenz ein Glycin- und ein Serin-Codon 9 beziehungsweise 10 mal häufiger vertreten als im *E. coli*-Genom. Dagegen werden jeweils zwei Glycin- und drei Serin-Codons nicht in der C16-Sequenz verwendet. Damit ist grundsätzlich Potential für eine Codonoptimierung vorhanden.

Da ein deutlich höherer zellspezifischer Produktgehalt bei der intrazellulären C16-Produktion in *E. coli* nicht realistisch ist und die maximal erreichten Zelldichten eine Funktion der Sauerstoffeintragsleistung des eingesetzten Produktionsreaktors sind, könnte der Einsatz eines anderen Mikroorganismus mit einer besseren Fähigkeit zur Proteinsekretion sinnvoll sein. Mögliche Organismen hierfür wären das Bakterium *Bacillus subtilis* oder die Hefe *Komagataella pastoris* (ehemals *Pichia pastoris*), da beide oft industriell verwendet werden, sich gut zu hohen Zelldichten kultivieren lassen und bereits in der Forschung für die Produktion von Spinnenseidenproteinen eingesetzt wurden.

Literaturverzeichnis

- Abelson, P. H. und Aldous, E. (1950). Ion antagonisms in microorganisms; interference of normal magnesium metabolism by nickel, cobalt, cadmium, zinc, and manganese. *Journal of Bacteriology*, 60(4):401–413.
- Ackerschott, C. (2007). *Charakterisierung rekombinanter Flagelliform-Spinnenseidenproteine*. Dissertation, Technische Universität München.
- Alakomi, H. und Skyttä, E. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):2000–2005.
- Alam, P. (2014). Protein unfolding versus β -sheet separation in spider silk nanocrystals. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(1):015015.
- Albano, C., Randers-Eichhön, L., Chang, Q., Bentley, W., und Rao, G. (1996). Quantitative measurement of green fluorescent protein expression. *Biotechnology Techniques*, 10(12):953–958.
- Allmeling, C. (2006). Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(3):770–777.
- Allmeling, C., Reimers-Fadhlaoui, K., und Vogt, P. M. (2007). Spinnenseide in der plastischen Chirurgie. Wunderwerkstoff der Natur. *Chemie in unserer Zeit*, 41(6):428–434.
- Alves, L., Silva, J. B. A. e., und Giulietti, M. (2007). Solubility of D-glucose in water and ethanol/water mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52(6):2166–2170.
- AMSilk (2014a). Medical Devices for OTC Wound Care. URL <http://www.amsilk.com/produkte/medical-devices-for-otc-wound-care.html>. Letzer Zugriff: 27.07.2014.
- AMSilk (2014b). Spidersilk. URL <http://spidersilk.info/en>. Letzer Zugriff: 27.07.2014.
- Andersson, C., Hodge, D., Berglund, K. A., und Rova, U. (2007). Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 23(2):381–388.
- Aristidou, A. A., San, K. Y., und Bennett, G. N. (1999). Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnology Progress*, 15(1):140–145.
- Babel, W. (1992). Das Auxiliarsubstrat-Konzept, Grundlage zur Ermittlung und Ausschöpfung der Leistungsgrenzen von Mikroorganismen in biotechnischen Prozessen. *Chemie Ingenieur Technik*, 64(4):384–385.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5):411–421.

- Bareither, R., Bargh, N., Oakeshott, R., Watts, K., und Pollard, D. (2013). Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: a proof of concept study. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(12):3126–3138.
- Bareither, R. und Pollard, D. (2011). A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnology Progress*, 27(1):2–14.
- Bendig, C. (2012). *Reaktionstechnische Untersuchungen von Zulaufverfahren zur mikrobiellen Stoffproduktion im Parallelansatz*. Dissertation, Technische Universität München.
- Bendig, C. und Weuster-Botz, D. (2013). Reaction engineering analysis of cellulase production with *Trichoderma reesei* RUT-C30 with intermittent substrate supply. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(7):893–900.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., und Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7):668–681.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., und Gilles, E.-D. (2006). A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(5):2578–84.
- Betts, J. I. und Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 5(21):1–14.
- Bhushan, B. (2009). Biomimetics: lessons from nature - an overview. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 367(1893):1445–1486.
- Blackledge, T. a., Boutry, C., Wong, S.-C., Baji, A., Dhinojwala, A., Sahni, V., und Agnarsson, I. (2009). How super is supercontraction? Persistent versus cyclic responses to humidity in spider dragline silk. *The Journal of Experimental Biology*, 212(Pt 13):1981–1989.
- Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P., und Fox, B. G. (2007). Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnology Progress*, 23(3):585–598.
- Blüm, C., Nichtl, A., und Scheibel, T. (2014). Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Advanced Functional Materials*, 24(6):763–768.
- Borja, G. M., Meza Mora, E., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., und Lara, A. R. (2012). Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microbial Cell Factories*, 11(132).
- Bower, D. M., Lee, K. S., Ram, R. J., und Prather, K. L. J. (2012). Fed-batch microbioreactor platform for scale down and analysis of a plasmid DNA production process. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8):1976–1986.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Brognaux, A., Thonart, P., Delvigne, F., Neubauer, P., Twizere, J.-C., Francis, F., und Gorret, N. (2012). Direct and indirect use of GFP whole cell biosensors for the assessment of bioprocess performances: design of milliliter scale-down bioreactors. *Biotechnology Progress*, 29(1):48–59.

- Bruschi, M., Boyes, S. J., Sugiarto, H., Nielsen, L. K., und Vickers, C. E. (2012). A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing *Escherichia coli* strains. *Biotechnology Advances*, 30(5):1001–10.
- Busso, D., Peleg, Y., Heidebrecht, T., Romier, C., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Salim, L., Troesch, E., Schuetz, A., Heinemann, U., Folkers, G. E., Geerlof, A., Wilmanns, M., Polewacz, A., Quedenau, C., Büssow, K., Adamson, R., Blagova, E., Walton, J., Cartwright, J. L., Bird, L. E., Owens, R. J., Berrow, N. S., Wilson, K. S., Sussman, J. L., Perrakis, A., und Celie, P. H. N. (2011). Expression of protein complexes using multiple *Escherichia coli* protein co-expression systems: a benchmarking study. *Journal of Structural Biology*, 175(2):159–70.
- Castan, A., Näsman, A., und Enfors, S. (2002). Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7):847–854.
- CBC News (2012). 'Spider goats' display angers Ottawa professor. URL <http://www.cbc.ca/news/canada/ottawa/spider-goats-display-angers-ottawa-professor-1.1137229>.
- Chang, C. F., Shuman, H., und Somlyo, a. P. (1986). Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells. *Journal of Bacteriology*, 167(3):935–9.
- Chang, D.-E., Smalley, D. J., und Conway, T. (2002). Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Molecular Microbiology*, 45(2):289–306.
- Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, 3 Auflage.
- Choi, J. H., Jeong, K. J., Kim, S. C., und Lee, S. Y. (2000). Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus sp. endoxylanase* signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6):640–5.
- Choi, J. H., Keum, K. C., und Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3):876–885.
- Chou, C. H., Bennett, G. N., und San, K. Y. (1994). Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(8):952–60.
- Chung, H., Kim, T. Y., und Lee, S. Y. (2012). Recent advances in production of recombinant spider silk proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:957–964.
- Clark, B. und Holms, W. H. (1976). Control of the sequential utilization of glucose and fructose by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 96(2):191–201.
- Clark, D. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 63(3):223–234.
- Compton, S. J. und Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2):369–74.
- Contiero, J., Beatty, C., Kumari, S., DeSanti, C. L., Strohl, W. R., und Wolfe, a. (2000). Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(6):421–430.

- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., und Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173:33–38.
- Craig, C. L., Riekel, C., Herberstein, M. E., Weber, R. S., Kaplan, D., und Pierce, N. E. (2000). Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. *Molecular Biology and Evolution*, 17(12):1904–13.
- de Marco, A. (2007). Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nature Protocols*, 2(10):2632–9.
- Desai, T. a. und Rao, C. V. (2010). Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5):1524–32.
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2):87–93.
- Deutscher, J., Francke, C., und Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4):939–1031.
- Dittrich, C. R., Bennett, G. N., und San, K.-Y. (2003). Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 21(4):1062–7.
- Donahue, R. A. und Bebee, R. L. (1999). BL21-SI Competent Cells for Protein Expression in *E. coli*. *Focus*, 21(2):49–51.
- Dong, H., Nilsson, L., und Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, 177(6):1497–504.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., und Glick, B. R. (1996). Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3):145–54.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W., und Jaeger, K.-E. (2007). Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology*, 25(4):443–5.
- Eiteman, M. a. und Altman, E. (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, 24(11):530–6.
- Esser, P. (1985). Edge Effect in Thermo Scientific Nunc MicroWell ELISA. Technical report, Thermo Scientific Nunc Bulletin No. 01.
- Fahnestock, S. (1994). Novel, recombinantly produced spider silk analogs. WO Patent App. PCT/US1994/006,689.
- Fahnestock, S. R. und Bedzyk, L. a. (1997). Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(1):33–9.
- Ferenci, T. (1996). Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(4):301–17.
- Ferenci, T. (2001). Hungry bacteria - definition and properties of a nutritional state. *Environmental Microbiology*, 3(10):605–611.

- Fernández-Castané, A., Caminal, G., und López-Santín, J. (2012a). Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures. *Microbial Cell Factories*, 11(58).
- Fernández-Castané, A., Vine, C. E., Caminal, G., und López-Santín, J. (2012b). Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *Journal of Biotechnology*, 157(3):391–8.
- Follonier, S. und Panke, S. (2012). Pressure to kill or pressure to boost: a review on the various effects and applications of hydrostatic pressure in bacterial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5):1805–1815.
- Förster, A. H. und Gescher, J. (2014). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2:1–12.
- Fox, B. G. und Blommel, P. G. (2009). Autoinduction of protein expression. *Current Protocols in Protein Science*, 5:Unit 5.23.
- Fuchs, G. und Schlegel, H. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel*. Georg Thieme Verlag, 8. Auflage.
- Gebhardt, G., Hortsch, R., Kaufmann, K., Arnold, M., und Weuster-Botz, D. (2011). A new microfluidic concept for parallel operated milliliter-scale stirred tank bioreactors. *Biotechnology Progress*, 27(3):684–90.
- Gernaey, K. V., Baganz, F., Franco-Lara, E., Kensy, F., Krühne, U., Luebberstedt, M., Marx, U., Palmqvist, E., Schmid, A., Schubert, F., und Mandenius, C.-F. (2012). Monitoring and control of microbioreactors: An expert opinion on development needs. *Biotechnology Journal*, 7(10):1308–14.
- Gerritsen, V. B. (2002). The tiptoe of an airbus. *Protein Spotlight*, (24).
- Gill, R. T., Valdes, J. J., und Bentley, W. E. (2000). A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(3):178–89.
- Glick, B. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2):247–261.
- Gopal, G. J. und Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, 32(6):419–25.
- Gosline, J. M., Guerette, P. a., Ortlepp, C. S., und Savage, K. N. (1999). The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *The Journal of Experimental Biology*, 202:3295–303.
- Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R., und Osburne, M. S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, 209(1-2):95–103.
- Guinea, G., Elices, M., Pérez-Rigueiro, J., und Plaza, G. (2003). Self-tightening of spider silk fibers induced by moisture. *Polymer*, 44(19):5785–5788.

- Guldager, N. (2009). Next-generation facilities for monoclonal antibody production. *Pharmaceutical Technology*, July:68–73.
- Gurramkonda, C., Talha, S. M., Gudi, S. K., Gogineni, V. R., and Surya Sambasiva Rao, K. R. (2012). Fed-batch cultivation of *Escherichia coli* expressed designer hepatitis C virus diagnostic intermediate and its evaluation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(6):437–44.
- Hahm, D. H., Pan, J., and Rhee, J. S. (1994). Characterization and evaluation of a pta (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(1):100–7.
- Hardy, J. und Scheibel, T. (2009). Production and processing of spider silk proteins. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(16):3957–3963.
- Hardy, J. G., Leal-Egaña, A., und Scheibel, T. R. (2013). Engineered spider silk protein-based composites for drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 13(10):1431–7.
- Hardy, J. G., Pfaff, A., Leal-Egaña, A., Müller, A. H. E., und Scheibel, T. R. (2014). Glycopolymers Functionalization of Engineered Spider Silk Protein-based Materials for Improved Cell Adhesion. *Macromolecular Bioscience*, 14(7):936–42.
- Hardy, J. G., Römer, L. M., und Scheibel, T. R. (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, 49(20):4309–4327.
- Hartnett, J., Gracyalny, J., und Slater, M. (2006). The Single Step (KRX) Competent Cells : Efficient Cloning and High Protein Yields. *Promega Notes*, 94:27–30.
- Hauptmann, V., Weichert, N., Menzel, M., Knoch, D., Paege, N., Scheller, J., Spohn, U., Conrad, U., und Gils, M. (2012). Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. *Transgenic Research*, 22(2):369–77.
- Hayashi, C. Y., Shipley, N. H., und Lewis, R. V. (1999). Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(2-3):271–5.
- Heidebrecht, A. und Scheibel, T. (2013). Recombinant production of spider silk proteins. *Advances in Applied Microbiology*, 82:115–53.
- Heim, M., Keerl, D., und Scheibel, T. (2009). Spinnenseide: vom löslichen Protein zur außergewöhnlichen Faser. *Angewandte Chemie*, 121(20):3638–3650.
- Hellmuth, K., Korz, D. J., Sanders, E. a., und Deckwer, W.-D. D. (1994). Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *Journal of Biotechnology*, 32(3):289–98.
- Hewitt, C. J., Boon, L. a., McFarlane, C. M., und Nienow, a. W. (1998). The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5):612–20.
- Hewitt, C. J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., McFarlane, C. M., und Nienow, a. W. (2000). Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multi-parameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(4):381–90.

- Hoefel, T., Faust, G., Reinecke, L., Rudinger, N., und Weuster-Botz, D. (2012). Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnology Journal*, 7(10):1–11.
- Hoefel, T., Wittmann, E., Reinecke, L., und Weuster-Botz, D. (2010). Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2):477–84.
- Höfel, T. (2011). *Reaktionstechnische Analyse rekombinanter Mikroorganismen zur Herstellung von Hydroxyisobuttersäure*. Dissertation, Technische Universität München.
- Hoffmann, F. und Rinas, U. (2004). Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 89:73–92.
- Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(2):85–116.
- Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfer, U., Kujau, M., Wenderoth, R., Müller, K., Matzku, S., Plückthun, A., und Riesenberger, D. (1996). High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6):524–32.
- Horta, A. C. L., Sargo, C. R., da Silva, A. J., de Carvalho Gonzaga, M., Dos Santos, M. P., Gonçalves, V. M., Zangirolami, T. C., und de Campos Giordano, R. (2012). Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(8):1269–80.
- Hortsch, R. (2011). *Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen*. Dissertation, Technische Universität München.
- Hortsch, R., Stratmann, A., und Weuster-Botz, D. (2010). New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3):443–51.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. (2010a). Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:69–76.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. (2010b). Milliliter-Scale Stirred Tank Reactors for the Cultivation of Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 73:61–82.
- Hsu, Y. und Wu, W. (2002). A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, 11:123–130.
- Hu, S.-Y., Wu, J.-L., und Huang, J.-H. (2004). Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 107(2):161–171.
- Huber, R., Roth, S., Rahmen, N., und Büchs, J. (2011). Utilizing high-throughput experimentation to enhance specific productivity of an *E. coli* T7 expression system by phosphate limitation. *BMC Biotechnology*, 11(1):22.

- Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R., und Scheibel, T. (2004a). Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry*, 43(42):13604–12.
- Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., und Cohen, S. (2004b). Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current Biology*, 14:2070–2074.
- Humenik, M., Magdeburg, M., und Scheibel, T. (2014). Influence of repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins. *Journal of Structural Biology*, 186(3):431–7.
- Humenik, M., Smith, A. M., und Scheibel, T. (2011). Recombinant Spider Silks—Biopolymers with Potential for Future Applications. *Polymers*, 3(4):640–661.
- Ibrahim, S. a., Yang, H., und Seo, C. W. (2008). Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry*, 109(1):137–143.
- Ihssen, J., Kowarik, M., und Dilettoso, S. (2010). Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, 9(61):1–13.
- Inada, T., Kimata, K., und Aiba, H. (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in Escherichia coli: challenge to the cAMP model. *Genes to Cells: Devoted to Molecular and Cellular Mechanisms*, 1(3):293–301.
- Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., und Abo, T. (2011). Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in Escherichia coli. *PLoS One*, 6(12):e28413.
- Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeyer, J., und Lengeler, J. W. (2002). Adaptation of sucrose metabolism in the Escherichia coli wild-type strain EC3132. *Journal of Bacteriology*, 184(19):5307–16.
- Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., und Ingram, L. O. (2008). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of Escherichia coli C. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(5):881–93.
- Jensen, E. B. und Carlsen, S. (1990). Production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(1):1–11.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Beck, M., Kleinschmidt, M., Simutis, R., und Lübbert, A. (2006). Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *Journal of Biotechnology*, 127(1):84–94.
- Jeong, K. und Lee, S. (1999). High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant Escherichia coli and its purification. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7):3027–3032.
- Jeude, M. und Dittrich, B. (2006). Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(3):433–445.
- Jung, H.-m., Park, K.-h., Kim, S.-y., und Lee, J.-k. (2004). L-Glutamate Enhances the Expression of Thermus Maltogenic Amylase in Escherichia coli. *Biotechnology Progress*, 20:26–31.

- Junker, B. H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(6):347–64.
- Katoh, S. und Yoshida, F. (2009). *Biochemical Engineering: A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Keasling, J. (1999). Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. *Trends in Biotechnology*, 17(11):452–460.
- Kensy, F., Engelbrecht, C., und Büchs, J. (2009). Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microbial Cell Factories*, 8:68.
- Keten, S., Xu, Z., Ihle, B., und Buehler, M. J. (2010). Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk. *Nature Materials*, 9(4):359–367.
- Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. a., Bahrami, A., und Maghsoudi, N. (2003). Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 25(23):1989–1992.
- Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. a., Maghsoudi, N., Mohammadian-Mosaabadi, J., Mohammadi, M. R., Bahrami, A., Maleksabet, N., Nassiri-Khalilli, M. a., Ebrahimi, M., und Naderimanesh, H. (2004). Process development for production of recombinant human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(2):63–69.
- Kim, Y.-S., Lee, J.-H., Kim, N.-H., Yeom, S.-J., Kim, S.-W., und Oh, D.-K. (2011). Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2):489–497.
- Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P., und Aiba, H. (1997). cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24):12914–12919.
- Kleman, G. und Strohl, W. (1994). Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11):3952–3958.
- Klumpp, S., Zhang, Z., und Hwa, T. (2009). Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell*, 139(7):1366–75.
- Knoll, A., Bartsch, S., Husemann, B., Engel, P., Schroer, K., Ribeiro, B., Stöckmann, C., Seletzky, J., und Büchs, J. (2007). High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 132(2):167–179.
- Knorr, B., Schlieker, H., Hohmann, H.-P., und Weuster-Botz, D. (2007). Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3):263–274.
- Kocincová, A. S. (2007). *New pH Sensitive Sensor Materials. Luminescent Fiber- Optic Dual Sensors for Non-Invasive and Simultaneous Measurement of pH and pO₂ (Dissolved Oxygen) in Biological Systems*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Konz, J. O., King, J., und Cooney, C. L. (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress*, 14(3):393–409.

- Kornberg, H. L. (2001). Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(3):355–359.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., und Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 39(1):59–65.
- Kosinski, M., Rinas, U., und Bailey, J. (1992). Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36:782–784.
- Kovárová, K., Zehnder, A., und Egli, T. (1996). Temperature-dependent growth kinetics of *Escherichia coli* ML 30 in glucose-limited continuous culture. *Journal of Bacteriology*, 178(15):4530–4539.
- Krause, M., Ukkonen, K., Haataja, T., Ruottinen, M., Glumoff, T., Neubauer, A., Neubauer, P., und Vasala, A. (2010). A novel fed-batch based cultivation method provides high cell density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories*, 9:11.
- Kricka, L. J., Carter, T. J., Burt, S. M., Kennedy, J. H., Holder, R. L., Halliday, M. I., Telford, M. E., und Wisdom, G. B. (1980). Variability in the adsorption properties of microtitre plates used as solid supports in enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry*, 26(6):741–744.
- Kroll, D. J., Abdel-Malek Abdel-Hafiz, H., Marcell, T., Simpson, S., Chen, C. Y., Gutierrez-Hartmann, A., Lustbader, J. W., und Hoeffler, J. P. (1993). A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA and Cell Biology*, 12(5):441–453.
- Kusterer, A. (2007). *Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse*. Dissertation, Technische Universität München.
- Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M., und Weuster-Botz, D. (2008). Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(3):207–215.
- Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G., und Scheibel, T. (2011). Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 32(8):2233–2240.
- Lammel, A., Schwab, M., Slotta, U., Winter, G., und Scheibel, T. (2008). Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem*, 1(5):413–416.
- Lara, A. und Galindo, E. (2006). Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology*, 34:355–381.
- Lecina, M., Sarró, E., Casablancas, A., Gòdia, F., und Cairó, J. J. (2013). IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 70:78–83.
- Lee, H. L. T., Boccazzi, P., Ram, R. J., und Sinskey, A. J. (2006). Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-throughput experimentation with pH and dissolved oxygen control. *Lab on a Chip*, 6(9):1229–1235.
- Lee, J. W., Choi, S., Park, J. H., Vickers, C. E., Nielsen, L. K., und Lee, S. Y. (2010). Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4):905–913.

- Lee, S. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14(3):98–105.
- Lee, S. Y. und Chang, H. N. (1993). High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnology Letters*, 15(9):971–974.
- Lendenmann, U., Snozzi, M., und Egli, T. (2000). Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1):72–80.
- Lewicka, M., Hermanson, O., und Rising, A. U. (2012). Recombinant spider silk matrices for neural stem cell cultures. *Biomaterials*, 33(31):7712–7717.
- Li, X., Hirano, R., Tagami, H., und Aiba, H. (2006). Protein tagging at rare codons is caused by tmRNA action at the 3' end of nonstop mRNA generated in response to ribosome stalling. *RNA*, 12:248–255.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., und Zhao, X. (1997). Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 272:28545–28549.
- Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., und Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4):1203–1213.
- Lin, H., Bennett, G. N., und San, K.-Y. (2005). Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(3):87–93.
- Lindsley, D., Gallant, J., und Guarneros, G. (2003). Ribosome bypassing elicited by tRNA depletion. *Molecular Microbiology*, 48(5):1267–1274.
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D., und Gu, T. (1998). Production of poly-beta-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 20(4):345–348.
- Long, Q., Liu, X., Yang, Y., Li, L., Harvey, L., McNeil, B., und Bai, Z. (2014). The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. *Journal of Biotechnology*, Im Druck.
- Lu, S., Eiteman, M. A., und Altman, E. (2009). pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8):1101–1109.
- Lugert, R., Schettler, C., und Gross, U. (2006). Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses*, 49(4):298–304.
- Luli, G. W. und Strohl, W. R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4):1004–1011.
- Luo, Q., Shen, Y.-L., Wei, D.-Z., und Cao, W. (2006). Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2):184–191.

- Lützen, A. und Seibel, J. (2007). Saccharose. In *Thieme Römpf Online*. URL <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-19-00037>. Letzer Zugriff: 18.06.2014.
- Ma, X., Fan, D., Shang, L.-A., Cai, Q., Chi, L., Zhu, C., Mi, Y., und Luo, Y.-E. (2010). Oxygen transfer rate control in the production of human-like collagen by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(4):169–174.
- Madigan, M. T. und Martinko, J. M. (2006). *Brock Mikrobiologie*. Addison-Wesley Verlag, 11 Auflage.
- Makino, T., Skretas, G., und Georgiou, G. (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 10(32).
- Marisch, K., Bayer, K., Cserjan-Puschmann, M., Luchner, M., und Striedner, G. (2013a). Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*, 12(58).
- Marisch, K., Bayer, K., Scharl, T., Mairhofer, J., Krempl, P. M., Hummel, K., Razzazi-Fazeli, E., und Striedner, G. (2013b). A comparative analysis of industrial *Escherichia coli* K-12 and B strains in high-glucose batch cultivations on process-, transcriptome- and proteome level. *PLoS One*, 8(8):e70516.
- Matlock, R., Beringer, R., Ash, D., Page, A., und Allen, M. (2011). Differences in bacterial optical density measurements between spectrophotometers. *Thermo Scientific Technical Note: 52236*.
- Michal, C. A., Simmons, A. H., Chew, B. G., Zax, D. B., und Jelinski, L. W. (1996). Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. *Biophysical Journal*, 70(1):489–493.
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3):289–298.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, (XI):371–394.
- Morao, A. und Maia, C. (1999). Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Bioprocess Engineering*, 20:165–172.
- Nakamura, Y. (2007). Codon Usage Database. In *Kazusa DNA Research Institute*. URL <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Letzer Zugriff: 08.07.2014.
- Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., und Märkl, H. (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(5):597–601.
- Narayanan, A., Ridilla, M., und Yernool, D. A. (2011). Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator–repressor interactions. *Protein Science*, 20(1):51–61.
- Neubauer, P., Häggström, L., und Enfors, S. (1995). Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(2):139–146.
- Notley, L. und Ferenci, T. (1996). Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*? *Journal of Bacteriology*, 178(5):1465–1468.

- Omenetto, F. G. und Kaplan, D. L. (2010). New opportunities for an ancient material. *Science*, 329(5991):528–531.
- OpenWetWare (2014). E. coli genotypes. URL http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes. Letzer Zugriff: 30.07.2014.
- Pan, J., Rhee, J., und Lebeault, J. (1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of Escherichiacoli B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 94(2):89–94.
- Panula-Perälä, J., Siurkus, J., Vasala, A., Wilmanowski, R., Casteleijn, M. G., und Neubauer, P. (2008). Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 7(31).
- Pei, X., Wang, Q., Qiu, X., Ying, L., Tao, J., und Xie, T. (2010). The fed-batch production of a thermophilic 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) in Escherichia coli by exponential feeding strategy control. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5):1423–1434.
- Peters, D. (2006). Kohlenhydrate als Fermentationsrohstoff. *Chemie Ingenieur Technik*, 78(3):229–238.
- Pinsach, J., de Mas, C., López-Santín, J., Striedner, G., und Bayer, K. (2008). Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in Escherichia coli fed-batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(7):507–512.
- Porath, J. (1960). Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 39:193–207.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., und Weuster-Botz, D. (2005a). Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and Bioengineering*, 89(5):512–523.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T. G., und Weuster-Botz, D. (2005b). Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with Escherichia coli. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42:227–235.
- Puskeiler, R. und Weuster-Botz, D. (2004). Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab : Kultivierung von Escherichia coli. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(12):1865–1869.
- Ramirez, D. M. und Bentley, W. E. (1993). Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnology and bioengineering*, 41(5):557–565.
- Riedlberger, P. und Weuster-Botz, D. (2012). New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource technology*, 106:138–46.
- Riesenberg, D. und Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4):422–430.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., und K (1990). High cell density fermentation of recombinant Escherichia coli expressing human interferon alpha 1. *Applied Microbiology*, 34:77–82.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E., Roß, A., und Deckwer, W.-D. (1991a). High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*, 20(1):17–27.

- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E., Roß, A., und Deckwer, W.-D. (1991b). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*, 20(1):17–27.
- Rising, A. (2012). Spider silk – from catching spiders to industrial applications | Laboratory News. URL <http://www.labnews.co.uk/features/spider-silk>. Letzer Zugriff: 11.07.2014.
- Rising, A., Widhe, M., Johansson, J., und Hedhammar, M. (2011). Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(2):169–184.
- Roche, E. D. und Sauer, R. T. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *The EMBO Journal*, 18(16):4579–4589.
- Roe, A. J., O’Byrne, C., McLaggan, D., und Booth, I. R. (2002). Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148:2215–2222.
- Römer, L. und Scheibel, T. (2008). The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*, 2(4):154–161.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., und Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2):249–264.
- Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., und Takors, R. (2013). *Industrielle Mikrobiologie*. Ralf Takors.
- Sandén, A. M., Prytz, I., Tubulekas, I., Förberg, C., Le, H., Hektor, A., Neubauer, P., Pragai, Z., Harwood, C., Ward, A., Picon, A., De Mattos, J. T., Postma, P., Farewell, A., Nyström, T., Reeh, S., Pedersen, S., und Larsson, G. (2003). Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and bioengineering*, 81(2):158–66.
- Schacht, K. und Scheibel, T. (2014). Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 29:62–69.
- Scheibel, T. (2004). Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(14).
- Scheibel, T. (2009). Spinnenseide – was Spiderman wissen sollte. *Biospektrum*, 15:23–25.
- Scheidle, M., Jeude, M., Dittrich, B., Denter, S., Kensy, F., Suckow, M., Klee, D., und Büchs, J. (2010). High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale. *FEMS Yeast Research*, 10:83–92.
- Scheller, J., Gührs, K. H., Grosse, F., und Conrad, U. (2001). Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology*, 19(6):573–577.
- Schlottbom, C., Kleebank, S., Hauser, M., und Hans, S. (2013). Amino Acid Fermentation: Evaluation of Scale-Down Capabilities Using DASbox ® Mini Bioreactors. *ependorf Application Note No. 290*.
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(4):425–35.

- Schmidt, M., Römer, L., Strehle, M., und Scheibel, T. (2007). Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media. *Biotechnology Letters*, 29(11):1741–1744.
- Schmidt, M. und Weuster-Botz, D. (2012). Reaction engineering studies of acetone-butanol-ethanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Journal*, 7(5):656–661.
- Schweder, T., Krüger, E., Xu, B., Jürgen, B., Blomsten, G., Enfors, S. O., und Hecker, M. (1999). Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(2):151–159.
- Scott, A. (2014). Spider Silk Poised For Commercial Entry. *Chemical & Engineering News*, 92(9).
- Scott, C. (2008). Proactive Debottlenecking: Planing Ahead for the Downstream Bottleneck. *BioProcess International*, 6(9):18–23.
- Sevastyanovich, Y., Alfasi, S., Overton, T., Hall, R., Jones, J., Hewitt, C., und Cole, J. (2009). Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1):86–94.
- Shiloach, J. und Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnology advances*, 23(5):345–57.
- Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S., und Lee, J. (1997). Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, 13(3):249–257.
- Siurkus, J., Panula-Perälä, J., Horn, U., Kraft, M., Rimseliene, R., und Neubauer, P. (2010). Novel approach of high cell density recombinant bioprocess development: optimisation and scale-up from microliter to pilot scales while maintaining the fed-batch cultivation mode of *E. coli* cultures. *Microbial Cell Factories*, 9(35).
- Slotta, U., Hess, S., Spiess, K., Stromer, T., Serpell, L., und Scheibel, T. (2007). Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromolecular Bioscience*, 7(2):183–188.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, a., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., und Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85.
- Sørensen, H. P. und Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2):113–128.
- Sreenath, H. K., Bingman, C. a., Buchan, B. W., Seder, K. D., Burns, B. T., Geetha, H. V., Jeon, W. B., Vojtik, F. C., Aceti, D. J., Frederick, R. O., Phillips, G. N., und Fox, B. G. (2005). Protocols for production of selenomethionine-labeled proteins in 2-L polyethylene terephthalate bottles using auto-induction medium. *Protein Expression and Purification*, 40(2):256–267.
- Steinsiek, S. und Bettenbrock, K. (2012). Glucose transport in *Escherichia coli* mutant strains with defects in sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*, 194(21):5897–908.
- Storhas, W. (2000). *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen: Ein Leitfaden für die Hochschul-ausbildung, für Hersteller und Anwender*. Springer, 1994 Auflage.

- Striedner, G., Cserjan-Puschmann, M., Pötschacher, F., und Bayer, K. (2003). Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration. *Biotechnology Progress*, 19(5):1427–1432.
- Striedner, G., Pfaffenzeller, I., Markus, L., Nemecek, S., Grabherr, R., und Bayer, K. (2010). Plasmid-free T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(4):786–794.
- Studier, F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1):207–234.
- Studier, F. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Structural Genomics*, 1091:17–32.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. a. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1):113–130.
- Swanson, B. O., Anderson, S. P., Digiovine, C., Ross, R. N., und Dorsey, J. P. (2009). The evolution of complex biomaterial performance: The case of spider silk. *Integrative and Comparative Biology*, 49(1):21–31.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2):195–201.
- Tenson, T., Herrera, J. V., Kloss, P., Guarneros, G., und Mankin, a. S. (1999). Inhibition of translation and cell growth by minigene expression. *Journal of Bacteriology*, 181(5):1617–1622.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2):211–222.
- Teulé, F., Miao, Y.-G., Sohn, B.-H., Kim, Y.-S., Hull, J. J., Fraser, M. J., Lewis, R. V., und Jarvis, D. L. (2012). Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3):923–928.
- Thompson, B. G., Kole, M., und Gerson, D. F. (1985). Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(6):818–24.
- Tokareva, O., Jacobsen, M., Buehler, M., Wong, J., und Kaplan, D. L. (2014). Structure-function-property-design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomaterialia*, 10(4):1612–1626.
- Tokareva, O., Michalczechen-Lacerda, V. A., Rech, E. L., und Kaplan, D. L. (2013). Recombinant DNA production of spider silk proteins. *Microbial Biotechnology*, 6:651–663.
- Trevors, J. (1986). Plasmid curing in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 32(3-4):149–157.
- Tripathi, N. K., Sathyaseelan, K., Jana, A. M., und Rao, P. V. L. (2009). High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal*, 59(2):137–146.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67:509–44.
- Tyler, R., Sreenath, H., Singh, S., Aceti, D., Bingman, C., Markley, J., und Fox, B. (2005). Auto-induction medium for the production of [-N]- and [-C, -N]-labeled proteins for NMR screening and structure determination. *Protein Expression and Purification*, 40(2):268–278.

- Vallejo, L. F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, H. a., und Rinas, U. (2002). Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 94(2):185–194.
- Vemuri, G., Altman, E., Sangurdekar, D., Khodursky, A., und Eiteman, M. (2006). Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5):3653–3661.
- Vendrey, C., Ackerschott, C., Römer, L., und Scheibel, T. (2008). Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials. *Methods in Molecular Biology*, 474:3–14.
- Vendrey, C. und Scheibel, T. (2007). Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience*, 7(4):401–409.
- Vester, A., Hans, M., Hohmann, H.-P., und Weuster-Botz, D. (2009). Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1):71–76.
- Vogt, M. (2004). GenEthik: Grüne Gentechnik in ethischer Sicht. *Vortrag im Rahmen der Veranstaltung „Gemachte Natur? Chancen, Risiken und ethische Bewertung von Grüner Gentechnik“ am 19.11.2004*. URL <https://www.uni-bayreuth.de/forum-kirche-universitaet/tagungen/gruene-gentechnik/GenEthik.pdf>.
- Vollrath, F. (2000). Strength and structure of spiders' silks. *Journal of Biotechnology*, 74(2):67–83.
- Vollrath, F., Barth, P., Basedow, A., Engström, W., und List, H. (2002). Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo. *In Vivo*, 16(4):229–234.
- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, a. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P.-A., van Wijk, K. J., und de Gier, J.-W. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9):1527–1550.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., und de Gier, J.-W. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38):14371–14376.
- Wase, D. a. J. und Patel, Y. R. (1985). Variations in the Volumes of Microbial Cells with Change in the Agitation Rates of Chemostat Cultures. *Microbiology*, 131(4):725–736.
- Wase, D. a. J. und Ratwatte, H. a. M. (1985). Variation of intracellular sodium and potassium concentration with changes in agitation rate for chemostat-cultivated *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(5):325–328.
- Weng, Y.-P., Hsu, F.-C., Yang, W.-S., und Chen, H.-P. (2006). Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4):465–469.
- Werten, M. W. T., Moers, A. P. H. a., Vong, T., Zuilhof, H., van Hest, J. C. M., und de Wolf, F. a. (2008). Biosynthesis of an amphiphilic silk-like polymer. *Biomacromolecules*, 9(7):1705–11.
- Weuster-Botz, D. (2006). Mikro-Bioverfahrenstechnik. *Chemie Ingenieur Technik*, 78(3):256–260.

- Weuster-Botz, D., Hekmat, D., Puskeiler, R., und Franco-Lara, E. (2007). Enabling technologies: fermentation and downstream processing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105:205–247.
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T., und Arnold, M. (2005). Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(2):109–119.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D., und Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1):231–237.
- Wilmington, A., Bähr, C., Kamerke, C., und Büchs, J. (2014). Fed-batch operation in special microtiter plates: a new method for screening under production conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(3):513–525.
- Wise, D. H. (2006). Cannibalism, food limitation, intraspecific competition, and the regulation of spider populations. *Annual Review of Entomology*, 51:441–465.
- Xia, T., Eiteman, M. a., und Altman, E. (2012). Simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose in the presence of acetate by a consortium of Escherichia coli strains. *Microbial Cell Factories*, 11(77).
- Xia, X.-X., Qian, Z.-G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L., und Lee, S. Y. (2010). Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered Escherichia coli results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32):14059–14063.
- Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G., und Enfors, S.-O. S. (1999). Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5):564–571.
- Ye, Q., Li, X., Yan, M., Cao, H., Xu, L., Zhang, Y., Chen, Y., Xiong, J., Ouyang, P., und Ying, H. (2010). High-level production of heterologous proteins using untreated cane molasses and corn steep liquor in Escherichia coli medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2):517–525.
- Yoon, S. H., Kim, S. K., und Kim, J. F. (2010). Secretory production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Recent Patents on Biotechnology*, 4:23–29.
- Zeplin, P. und Maksimovikj, N. (2014). Spider silk coatings as a bioshield to reduce periprosthetic fibrous capsule formation. *Advanced Functional Materials*, 24(18):2658–2666.
- Zhang, G., Zhong, G., Wang, X., Wang, L., Qin, Y., und Yu, A. (2010). Optimization of fed-batch fermentation for a staphylokinase-hirudin fusion protein in Escherichia coli BL21. *African Journal of Biotechnology*, 9(32):5078–5083.
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102(3):759–781.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/Symbol	Beschreibung/Definition
ADF3	<i>Araneus diadematus</i> Fibroin 3
ADF4	<i>Araneus diadematus</i> Fibroin 4
ADP	Adenosindiphosphat
AF204	Antischaummittel 204 von Sigma-Aldrich
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure, verwendet im sogenannten BCA-Assay
BTM	Biotrockenmasse, g L ⁻¹
BL21	Ein <i>E. coli</i> -Stamm
c _i	Konzentration der Komponente i, g L ⁻¹
C16	von ADF4 abgeleitetes rekombinantes Spinnenseidenprotein mit 16-facher Wiederholung des C-Moduls
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DE3	Ein Phagenkonstrukt (Lysogen) in <i>E. coli</i> -Stämmen, mit dem die T7-RNA-Polymerase exprimiert wird
eADF4	<i>engineered</i> ADF4
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced</i> GFP
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren
Fru	Fructose
GC-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gluc	Glucose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
HCDC	Hochzelldichtekultivierungen, <i>high cell density cultivation</i>
HMS174	Ein <i>E. coli</i> -Stamm
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _S	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats im Monod-Modell
Lac	Lactose
k _{La}	Volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s ⁻¹
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium

Abkürzung/Symbol	Beschreibung/Definition
Mg	Magnesium
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OTR	Sauerstoffeintragsrate (<i>oxygen transfer rate</i>), mol L ⁻¹ s ⁻¹
OUR	Sauerstoffaufnahme rate (<i>oxygen uptake rate</i>), mol L ⁻¹ s ⁻¹
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
P	Produkt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferasesystem
<i>ptsG</i>	glucosespezifisches Phosphotransferasesystem
q _i	spezifische Reaktionsrate, h ⁻¹
r _i	volumetrische Reaktionsrate, g L ⁻¹ h ⁻¹
RNA	Ribonukleinsäure
S	Substrat
Sacch	Saccharose
SE	Spurenelemente
SEC	Größenausschlusschromatographie, <i>size exclusion chromatography</i>
SEM	Rasterelektronenmikroskop (<i>scanning electron microscope</i>)
t	Zeit, h
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UV	Ultraviolett
V	Volumen, L
V ₀	Startvolumen, L
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
X	Biomasse
Y _{P/S}	Produktausbeute, g g ⁻¹
Y _{X/S}	Biomasseausbeute, g g ⁻¹
Y _{P/X}	zellspezifische Produktkonzentration bezogen auf die Biomasse, g g ⁻¹
Y _{P/OD}	zellspezifische Produktkonzentration bezogen auf OD ₆₀₀ , g L ⁻¹
μ	spezifische Wachstumsrate, h ⁻¹

Abbildungsverzeichnis

3.1	Gartenkreuzspinne <i>Araneus diadematus</i>	7
3.2	Sieben verschiedene Spinnenseidenfäden Echter Webspinnen	8
3.3	Spannungs-Streckungs-Kurve	9
3.4	Von der Spinne zu C16	10
3.5	Mehrstufige Entfaltung von Spinnenseide	11
3.6	Verschiedene Morphologien aus C16	13
3.7	Ein Rührkesselreaktor	21
3.8	Typischer Wachstumsverlauf im Satzbetrieb	22
3.9	Glucoseaufnahme, Überflussmetabolismus und gemischte Säuregärung	31
3.10	Katabolitrepression und Lac-Operon	33
3.11	Das T7-Expressionssystem	38
4.1	Schematische Darstellung des Referenzprozesses für die Herstellung von C16 in <i>E. coli</i>	53
4.2	Aufbau des parallelen Kultivierungssystems im Milliliter-Maßstab	54
4.3	Schema des Prozessleitsystems im Bioreaktorblock	55
4.4	Emissionsspektren von Medien und Kulturbrühen sowie pH-Sigmoidfunktionen bei unterschiedlichen Zelldichten	56
4.5	Aufbau des parallelen Bioreaktorsystems im 500 mL-Maßstab	58
4.6	Aufbau des Glas-Rührkesselreaktors im Liter-Maßstab	60
4.7	Aufbau des Edelstahl-Rührkesselreaktors im Liter-Maßstab	61
5.1	Zulaufprofil für den Referenzprozess von C16 in <i>E. coli</i>	69
5.2	Zwei Referenz-Zulaufkultivierungen von <i>E. coli</i> HMS174(DE3) zur Expression von C16	70
5.3	Biotrockenmassekonzentrationen und optische Dichten aus Kultivierungen von <i>E. coli</i> mit zwei unterschiedlichen Zulaufstrategien	73
5.4	Sauerstoffpartialdruck aus Kultivierungen im Milliliter-Maßstab mit zwei unterschiedlichen Zulaufstrategien	73
5.5	Expression von C16 mit zwei verschiedenen Zulaufstrategien	76
5.6	Expression von eGFP mit zwei verschiedenen Zulaufstrategien	77
5.7	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab im Zulaufprozess und in Autoinduktionsmedien	80
5.8	Vier parallele Kultivierung im Liter-Maßstab mit verschiedenen Leistungseinträgen	84
5.9	Expression von C16 mit verschiedenen Volumina im Milliliter-Maßstab	85

5.10	Expression von C16 mit Zusatz von Produkten der gemischten Säuregärung im Milliliter-Maßstab	87
5.11	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit Zusatz Lactat oder Acetat im Satzmedium.	88
5.12	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab bei verschiedenen Mediumverdünnungen und MOPS-Konzentrationen.	91
5.13	pH-Verlauf und Zugabe von NH_3 bei der Kultivierung mit verschiedenen Mediumverdünnungen	91
6.1	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit acht Variationen der Hauptbestandteile des Satzmediums	94
6.2	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen Konzentrationen von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zur Vereinfachung des Zulaufmediums	96
6.3	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlicher Ammoniumversorgung.	97
6.4	Parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Vereinfachung des Zulaufmediums bei der Expression von C16	99
6.5	Untersuchung weiterer Zusätze im Satzmedium bei der Expression von C16 im Milliliter-Maßstab	103
6.6	Untersuchung von Calcium (Ca) und Natrium (Na) als Mediumbestandteile im Milliliter-Maßstab	104
6.7	Kontinuierliche Kultivierung von <i>E. coli</i> im Liter-Maßstab zur Reduktion der Spurenelement-Zusammensetzung	106
6.8	Zwei parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Reduktion der Spurenelement-Zusammensetzung.	106
7.1	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlich gestalteten Wachstumsphasen	110
7.2	Vier parallele Kultivierungen im Liter-Maßstab (0,5 L Startvolumen) zur Expression von C16 mit vier verschiedenen Wachstumsraten	112
7.3	Vier serielle Kultivierungen im Liter-Maßstab (2 L Startvolumen) mit vier verschiedenen Wachstumsraten	113
7.4	Änderung der Proteinproduktion im Verlauf einer Zulaufkultivierung mit hohen Zelldichten	115
7.5	Zulaufprofile für 25 g L^{-1} und 2 g L^{-1} Glucose im Satzmedium	116
7.6	Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Satzmedium	117
7.7	Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Satzmedium	117
7.8	Zulaufprofile mit und ohne exponentielle Zulaufphase	118
7.9	Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit unterschiedlichen Zulaufprofilen	119
7.10	Zulaufkultivierung zur Expression von C16 im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen Zulaufprofilen	120

8.1	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit zwei unterschiedlichen Zelldichten und vier IPTG-Konzentrationen	121
8.2	Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Expression von C16 mit minimaler IPTG-Konzentration.	122
8.3	Expression von C16 im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen Zelldichten und IPTG-Konzentrationen	124
8.4	Sechs Ansätze mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab	126
8.5	Weitere neun Ansätze mit niedrigen IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten zur Expression von C16 im Milliliter-Maßstab	127
8.6	Vier Kultivierungen im Liter-Maßstab zur Expression von C16 mit niedrigen IPTG-Konzentrationen	128
8.7	Expression von C16 im Liter-Maßstab zur Untersuchung des Induktionszeitpunktes	131
8.8	Drei Zulaufkultivierungen mit 2 L Startvolumen und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen zur Expression von C16	133
8.9	Zwei Kultivierungen mit 10 L Startvolumen und geringen IPTG-Konzentrationen zur Expression von C16	133
8.10	Schematische Darstellung des Ausgangsprozesses und des in dieser Arbeit optimierten Prozesses für die Herstellung von C16 in <i>E. coli</i>	134
8.11	Autoinduktion mit Lactose und IPTG zur C16-Expression	136
8.12	Autoinduktion von C16 in den <i>E. coli</i> „Walker“-Stämmen	137
8.13	Autoinduktion mit Lactose und IPTG zur Expression von AQ24NR3	138
9.1	Untersuchung von Glycerol und Fructose als alternative Kohlenstoffquellen	142
9.2	Untersuchung von Glycerol und Arabinose als Auxiliarsubstrat	143
9.3	Zulaufkultivierungen des Saccharose verwertenden Stamms im Liter-Maßstab im Vergleich zum Glucose-Stamm	145
9.4	Parallele Kultivierungen im Milliliter-Maßstab zur C16-Expression im Glucose-Stamm und im Sacch-Stamm mit jeweils verschiedenen Substraten	147
9.5	Zwei Kultivierungen des Sacch-Stamms ohne Chloramphenicol	148
9.6	Kultivierung des ehemals Saccharose-verwertenden und nun vom Plasmid pAMS001 befreiten <i>E. coli</i> -Stamms	149
9.7	Expression von C16 im Sacch-Stamm mit schwacher Induktion	151
9.8	Expression von C16 im Sacch-Stamm im Milliliter-Maßstab mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten	151
9.9	Kultivierung des Sacch-Stamms mit einer zweistufigen schwachen Induktion	152
9.10	Kultivierung des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab mit Zuckerrübenmelasse als Kohlenstoffquelle	153
9.11	Kultivierung des Sacch-Stamms im Liter-Maßstab mit Zuckerrübenmelasse als Kohlenstoffquelle und verringerter Substratkonzentration	154
10-1	Zulaufkultivierungen mit 10 L Startvolumen und schwacher Induktion im Vergleich zum Referenzprozess.	160

Tabellenverzeichnis

3.1	Mechanische Eigenschaften von Spinnenseide	9
3.2	Kommerzielle Entwicklung von Spinnenseidenproteinen	17
3.4	Hohe heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	38
4.1	In der vorliegenden Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	46
4.2	In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide	46
4.3	Zusammensetzung des Lysogeny-Broth (LB) Mediums	48
4.4	Stammlösungen für Zulauf- und Satzmedien	49
4.5	Komponenten und Konzentrationen der verwendeten Satzmedien	50
4.6	Komponenten und Konzentrationen der verwendeten Zulaufmedien	50
4.7	Zusätzliche Komponenten für Kultivierungen mit Autoinduktionsmedien und alternativen Kohlenstoffquellen	51
6.1	Darstellung des gewählten Versuchsschemas zur Untersuchung der Haupt- bestandteile des Satzmediums	94
6.2	Zusammensetzung des Satz- und Zulaufmediums der vierfach parallelen Kultivierung aus Abbildung 6.4	98
7.1	Übersicht über die verschiedenen Wachstumsphasen der Kultivierungen aus Abbildung 7.1	110

Anhang

Geräte

Tabelle A1: Komponenten, Verbrauchsmaterialien und Software des Bioreaktorblocks bioREACTOR48

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorblock	bioREACTOR 48	2mag AG, München
Rührersteuerung für Bioreaktoren	-	2mag AG, München
Optische Sensorriegel für pH- und pO ₂ -Messung	MCR 8pH-8oxygen	PreSens GmbH, Regensburg
Einwegbioreaktoren	Mini-Bioreaktoren HTBD mit HP81 und PSt3-HG Sensoren	PreSens GmbH, Regensburg
Laborroboter mit Pipettier- und Roboterarm	Freedom EVO	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
MTP-Photometer	infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
MTP-Waschstation	Columbus Pro	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Gasmischstation	MX4/4	DASGIP GmbH, Jülich
Wasserbad für Reaktortemperaturierung	Haake W15	PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld
Wasserbad für Kopfraumkühlung	Durchlaufkühler	Fryka-Kältetechnik GmbH, Esslingen
Zuluftfilter	Midisart 2000; 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Reinigungsflüssigkeiten für Laborroboter	Daily und Set Up Clean	LVL technologies GmbH, Crailsheim
Software für Laborroboter	Gemini V4.2.17.304	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Software für Prozesssteuerung	Fedbatch-XP 1.0.248	DASGIP GmbH, Jülich
Software für MTP-Photometer	Magellan V6.6	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Software für automatisierte Benutzereingaben	AutoIt	Freeware von Jonathan Bennett

Tabelle A2: Komponenten des parallelen Bioreaktorsystems von DASGIP

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Steuerungseinheit mit Reaktortemperierung und Abluftkühlung	CWD 4	DASGIP GmbH, Jülich
4x 1,5 L-Rührkesselreaktor mit zwei Seitenarmen und oben eintauchender Rührwelle, zwei 6-Blatt-Scheibenrührern	SR07000DLS	DASGIP GmbH, Jülich
4x Gasmischstation	MX4/4	DASGIP GmbH, Jülich
2x Pumpeinheit	MP8	DASGIP GmbH, Jülich
Sensoreinheit	PH4 PO4	DASGIP GmbH, Jülich
4x Abgasanalytik	EL2030+SCC-F	ABB Germany, Mannheim
Rührer- und Temperaturregelungseinheit	TC4 SC4	DASGIP GmbH, Jülich
4x pH-Elektrode	405 DPAS SC-K8S/225	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
4x pO ₂ -Elektrode	Visiform D12mm, L225mm, 78108032	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
4x Temperatursensor	Pt100/0	DASGIP GmbH, Jülich
4x Antischaumsonde	Level Sensor OD4mm, L275mm, Li235mm	DASGIP GmbH, Jülich
4x Rührer	RE40, Maxon Motor, 269872	DASGIP GmbH, Jülich
8x Zu- und Abluftfilter	Midisart 2000; 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Software	DASGIP Control V4.5	DASGIP GmbH, Jülich
Analysenwaage	XA204 DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Tabelle A3: Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
7,5 L-Glaskessel mit Doppelmantel, oben eintauchender Rührwelle, drei 6-Blatt-Scheibenrührern, Antischaumsonde, Begasungsrohr und Abluftkühlung	Labfors 2	Infors GmbH, Einsbach
Labforssteuerungseinheit mit Rührer, Temperaturfühler und Massendurchflussregler	Labfors, 103746	Infors GmbH, Einsbach
Prozesssteuerungssoftware	Iris V5.34.807.0997	Infors GmbH, Einsbach
pH-Elektrode	405 DPAS-SC-K85/425	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Tabelle A3: Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
pO ₂ -Elektrode	InPro 6800	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Drucksonde	Drucktransmitter Pr-25HT, 2 barg, 8931.A	Keller AG, Winterthur, Schweiz
Reaktorwaage	QC35EDE-S	Sartorius AG, Göttingen
Zulaufmedienwaage	IP65 Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Basenwaage	Scout Pro, 4000 g	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Schlauchpumpe	BVP easyloadII, Masterflex L/S, 77201-60	Ismatec, Wertheim
Abgasanalytik	Easy Line + Advance SCC-F	ABB Germany, Mannheim
Pumpenschläuche	Marprene, 0,4 mm Innendurchmesser	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen

Tabelle A4: Komponenten des Edelstahl-Rührkesselreaktors Techfors42

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Edelstahl-Rührkesselreaktor; Gesamtvolumen 42 L, Arbeitsvolumen 30 L	Techfors42	Infors GmbH, Einsbach
Abgasanalytik	Easy Line + Advance SCC-F	ABB Germany, Mannheim
Abluftfilter	0,2 µm, AB05PFR2PVH4	Pall, Crailsheim
Drucksonde	PR-25HT8931A	Keller AG, Winterthur, Schweiz
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
pO ₂ -Elektrode	InPro6820/25/080	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Schlauchpumpe	Ecoline VC-360	Ismatec, Wertheim
Software	Iris NT Pro 4.11	Infors GmbH, Einsbach
Steuerungseinheit mit Pumpenanschlüssen	Techfors 104541	Infors GmbH, Einsbach
Zuluftfilter	EMFLON II Gasfilter, AB02V0022PV	Pall, Crailsheim

Tabelle A5: Komponenten des HPLC-System

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Steuereinheit	Smartline Manager 5000	Knauer GmbH, Berlin
Software	Chromgare V3.1	Knauer GmbH, Berlin
Pumpe	Smartline Pump 1000	Knauer GmbH, Berlin
Autosampler mit Kühlung	Midas Autosampler 3900	Knauer GmbH, Berlin
Säulenofen	Jet Stream	Knauer GmbH, Berlin
Fluoreszenzmessgerät	RF-20A Prominence Fluorescence Detector	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Größenausschlusschroma- tographie(SEC)-Säule	TSK-Gel G4000 PW _{XL} (08022)	Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart
Vorsäule	TSK-Gel PW _{XL} Guard Column (08033)	Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart

Puffer, Lösungen und Kosten für Einsatzstoffe

Tabelle A6: Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Natriumchlorid, NaCl	8
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	1,44
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	0,24
Kaliumchlorid, KCl	0,2

Tabelle A7: Lösungen für die SEC-HPLC (vgl. Abschnitt 4.4.2)

Puffer/Lösung	Konzentration	Lösungsmittel, Behandlung
Tris-HCl, pH 8,0	1 M und 25 mM	in VE-H ₂ O gelöst, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt; 25 mM aus 1 M-Lösung hergestellt, sterilfiltriert
Natriumhydroxid	10 M und 10 mM	in VE-H ₂ O gelöst; 10 mM aus 10 M verdünnt und sterilfiltriert
Ethanol	20 % (v/v)	99 % Ethanol (HPLC Grade) mit VE-H ₂ O verdünnt, sterilfiltriert
Glycin/NaCl-Puffer	1 M	75,1 g L ⁻¹ Glycin und 58,4 g L ⁻¹ NaCl in VE-H ₂ O gelöst und mit HCl bzw. NaOH auf pH 9,0 eingestellt
Guanidiniumthiocyanat	4 M	in VE-H ₂ O gelöst

Tabelle A8: Artikelnummer, Preise und Qualität der Einsatzstoffe für die Kostenabschätzung in Kapitel 6. Es wurde jeweils die größten verfügbaren Gebinde bei Carl Roth GmbH & Co. KG am 16.08.2014 für die Preise pro Kilogramm herangezogen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde möglichst die gleiche Qualität gewählt. Bei einem Startvolumen von 1 L wurde ein Zulaufvolumen von 0,45 L angenommen (5 h exponentieller Zulauf, 7 h konstanter Zulauf und 20 h Produktionsphase) und die Kosten pro Liter auf insgesamt 1,45 L bezogen.

Komponente	Qualität	Art.- Nr.	€/kg	€/L Korz	€/L Kap. 6
Glucose	Mikrobiologie	6887.5	5,40	9,262	9,262
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	3904.5	26,96	2,480	1,119
Dikaliumhydrogenphosphat	p.a.	P749.5	25,56	-	1,768
Diammoniumhydrogenphosphat	p.a.	P736.3	58,00	1,604	-
Ammoniumsulfat	p.a.	3746.5	9,96	-	0,517
Citronensäure	p.a.	X863.5	11,96	0,141	-
Natriumhydroxid	p.a.	6771.5	8,60	0,143	-
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	p.a.	P027.3	21,96	1,537	0,911
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	p.a.	8043.5	25,96	0,003	0,002
Cobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat	p.a.	T889.1	571,60	0,017	0,010
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	p.a.	T881.2	48,90	0,009	0,005
Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat	p.a.	CN82.3	53,90	0,001	0,001
Borsäure	p.a.	6943.5	21,28	0,001	0,000
Natriummolybdat-Dihydrat	p.a.	0274.4	145,00	0,004	0,003
Zinkacetat-Dihydrat	p.a.	P035.2	57,00	0,008	0,005
Eisen(III)-citrat	Mikrobiologie	CN77.4	25,00	0,020	0,017
Kanamycin	Biochemie	T832.4	1300,00	0,449	0,449