

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung von Einzelstrang DNA mit dem Bakteriophagen M13

Benjamin Franziskus Kick

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. Hendrik Dietz

Die Dissertation wurde am 15.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 02.03.2017 angenommen.

Wichtig ist, dass man nie aufhört zu fragen.

(Albert Einstein)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation 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 dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, dem Vertrauen in meine Arbeit, die Freiräume bei der Bearbeitung des Projekts und die hilfreichen Anmerkungen und Ratschläge. Ich möchte mich bedanken, dass Sie mir dieses spannende und interdisziplinäre Thema angeboten haben.

Bei dem Coreferenten Prof. Dr. Hendrik Dietz und dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Oliver Lieleg bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Projektpartnern, Prof. Dr. Hendrik Dietz und Florian Praetorius für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Hendrik, du hast durch deine konstruktive Kritik, deine motivierende und fokussierte Art und Weise essentiell zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei dir Flo möchte ich mich für die hervorragenden Diskussionen, die intensive Zusammenarbeit und den guten Kaffee bedanken.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, sowie der Fachgebiete für Selektive Trenntechnik und Systembiotechnologie bedanke ich mich für das großartige Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei Andi und Sammy für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation und die hilfreichen Anmerkungen bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die festangestellten Kollegen Gabriele, Ellen, Markus, Florian, Georg und Norbert für die großartige Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Angelegenheiten.

Bei Janina, Nam, Samantha, Pervin, Karl, Nicolas und Felix möchte ich mich für die hervorragende Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die private Unterstützung während der Doktorarbeit bedanken. Dankeschön Kerstin, dass du immer für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Problemstellung und Zielsetzung | 3 |
| 3 | Theoretische Grundlagen | 7 |
| 3.1 | Desoxyribonukleinsäure | 7 |
| 3.1.1 | Produktionsmethoden einzelsträngiger DNA | 8 |
| 3.1.2 | <i>Scaffolded</i> DNA Origami..... | 11 |
| 3.2 | Biologische Systeme | 14 |
| 3.2.1 | <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| 3.2.2 | Bakteriophage M13 | 22 |
| 3.3 | Kultivierung von Mikroorganismen..... | 29 |
| 3.3.1 | Kinetik von Wachstum und Produktbildung..... | 29 |
| 3.3.2 | Betriebsweisen mikrobiologischer Prozesse..... | 33 |
| 3.3.3 | Rheologisches Verhalten von Biosuspensionen | 45 |
| 4 | Material und Methoden | 51 |
| 4.1 | Medien..... | 51 |
| 4.1.1 | <i>Lysogeny broth</i> Medium | 51 |
| 4.1.2 | M9 Mineralmedium | 52 |
| 4.1.3 | Riesenberg Mineralmedium..... | 53 |
| 4.1.4 | Zulaufmedium für die Hochzelldichtekultivierung..... | 54 |
| 4.2 | Mikroorganismen und molekularbiologische Arbeiten..... | 55 |
| 4.2.1 | Mikroorganismen, Phagemid und Helferphage | 55 |
| 4.2.2 | Molekularbiologische Arbeiten..... | 57 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3 | Verwendete Reaktorsysteme | 58 |
| 4.3.1 | Rührkesselreaktor im Litermaßstab | 58 |
| 4.3.2 | Miniaturisierte Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab..... | 62 |
| 4.4 | Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> mit Bakteriophagen M13 | 65 |
| 4.4.1 | Herstellung der Stammlösung an Bakteriophagen | 65 |
| 4.4.2 | Satzkultivierung..... | 66 |
| 4.4.3 | Hochzelldichtekultivierung im Zulaufverfahren | 66 |
| 4.4.4 | Kontinuierliche Kultivierung mit <i>Escherichia coli</i> | 68 |
| 4.5 | Reinigung der Einzelstrang DNA | 70 |
| 4.5.1 | Prozessbegleitende Reinigung der Einzelstrang DNA im Millilitermaßstab | 71 |
| 4.5.2 | Reinigung der Einzelstrang DNA im Litermaßstab..... | 72 |
| 4.6 | Analytische Methoden | 73 |
| 4.6.1 | Bestimmung der Zellkonzentration | 73 |
| 4.6.2 | Bestimmung des Phagentiters..... | 73 |
| 4.6.3 | Rheologische Messung der dynamischen Viskosität..... | 74 |
| 4.6.4 | Quantifizierung der Einzelstrang DNA Konzentration | 75 |
| 4.6.5 | Bestimmung der Qualität der Einzelstrang DNA | 75 |
| 4.6.6 | Bestimmung der Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration | 76 |
| 4.6.7 | Bestimmung der Phosphatkonzentration | 76 |
| 4.6.8 | Bestimmung der Magnesiumkonzentration..... | 76 |
| 4.7 | Berechnungen und Modelle | 77 |
| 4.7.1 | Bestimmung der Phagenbildungsrate | 77 |
| 4.7.2 | Adsorptionsrate der Bakteriophagen | 78 |
| 4.7.3 | Anteil an infizierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion..... | 78 |
| 4.7.4 | Identifikation der formalkinetischen Parameter | 79 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| 5 | Satzprozess mit dem Bakteriophagen M13..... | 83 |
| 6 | Hochzelllichtprozess zur Produktion von einzelsträngiger DNA | 91 |
| 6.1 | Etablierung eines Hochzelllichtprozesses mit <i>Escherichia coli</i> | 91 |
| 6.2 | Zulaufprozess mit Bakteriophageninfektion zur Einzelstrang DNA Produktion.. | 97 |
| 6.2.1 | Einfluss der Bakteriophageninfektion auf den Hochzelllichtprozess..... | 97 |
| 6.2.2 | Vergleichende Untersuchung zweier Wirtsstämme zur Phagenproduktion | 110 |
| 6.2.3 | Produktion einzelsträngiger DNA für die DNA Origami Technologie | 113 |
| 6.3 | Reaktionstechnische Untersuchung des Hochzelllichtprozesses mit dem Bakteriophagen M13 | 119 |
| 6.3.1 | Einfluss der Phosphatkonzentration..... | 119 |
| 6.3.2 | Variation des Infektionszeitpunktes..... | 122 |
| 6.3.3 | Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Phagenbildungsrate | 125 |
| 6.3.4 | Einfluss der Multiplizität der Infektion auf die Einzelstrang DNA Produktion | 131 |
| 7 | Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit infizierten <i>Escherichia coli</i>..... | 135 |
| 7.1 | Identifikation von formalkinetischen Modellparametern im Millilitermaßstab.. | 135 |
| 7.2 | Kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab und Erhöhung der Substrat- konzentration | 149 |
| 8 | Produktion von artifizieller Einzelstrang DNA für DNA Origami | 155 |
| 8.1 | Einfluss der Multiplizität der Infektion bei der Zulaufkultivierung mit dem Helferphagen M13KO7 | 156 |
| 8.2 | Selbstassemblierungsreaktion im Millilitermaßstab | 161 |
| 9 | Zusammenfassung..... | 163 |
| 10 | Ausblick..... | 169 |
| 11 | Literaturverzeichnis..... | 171 |
| Anhang | | 202 |

1 Einleitung

Richard P. Feynman führte im Jahr 1959 in seinem berühmten Vortrag mit dem Titel *“There’s Plenty of Room at the Bottom“* den Begriff der Nanotechnologie ein. Dieser hatte die Idee, Strukturen im Nanometermaßstab, auf der Ebene von Atomen und Molekülen, zu verändern (Sanchez und Sobolev 2010). Den heiligen Gral der Nanotechnologie stellt hierbei die vollständige und präzise Kontrolle der Nanomaterialien auf atomarer Ebene dar (Di Lee et al. 2016). Die Nanotechnologie gilt als ein sehr zukunftsreicher Forschungsbereich über die Grenzen einzelner Gebiete in Chemie, Physik, Ingenieurwissenschaften und Biologie hinaus. Dies zeigt sich auch in der diesjährigen Vergabe des Nobelpreises in Chemie an Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart und Bernard L. Feringa für die Entwicklungen und Synthese von molekularen Maschinen (Nobel Media AB 2016).

Grundsätzlich wird Nanotechnologie dadurch definiert, dass die Bildung von Materialien mit fundamental neuen Eigenschaften und Funktionen im Nanometermaßstab (< 100 nm) verstanden, kontrolliert und neu strukturiert wird (Sanchez und Sobolev 2010). Dabei lassen sich allgemein zwei Ansätze unterscheiden: beim *top-down* Ansatz werden größere Strukturen in den Nanomaßstab überführt, ohne die Eigenschaften zu ändern oder die Kontrolle auf atomarer Ebene zu ermöglichen. Beim *bottom-up* Ansatz hingegen werden Nanostrukturen ausgehend von atomaren oder molekularen Komponenten in einem Assemblierungs- oder Selbstassemblierungsprozess gebildet (Drexler et al. 1991). Die *bottom-up* Ansätze bergen großes Potential in den Materialwissenschaften, in den Bereichen Elektronik, Medizin, Energie, Biotechnologie und der Informationstechnologie. Die Übertragung dieses Potentials in marktfähige Anwendungen ist heutzutage jedoch noch limitiert (Sanchez und Sobolev 2010).

2006 wurde von Paul Rothemund die *bottom-up* Methode des *scaffolded* DNA Origami beschrieben, eine Methode zur Bildung von Nanostrukturen, die aus einzelsträngigen DNA Molekülen gebildet werden (Douglas et al. 2009; Linko und Dietz 2013). Eine Herausforderung für potentielle Anwendungen der vielseitig einsetzbaren Nanopartikel ist die kostengünstige Bereitstellung der einzelsträngigen DNA Moleküle über dem Milligramm Maßstab hinaus.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Bei der *scaffolded* DNA Origami Technologie (Rothemund 2006) werden aus langen und kurzen DNA Molekülen in einer Selbstassemblierungsreaktion zwei- und dreidimensionale Nanostrukturen gebildet. Darin können individuelle Positionen mit einer Präzision im Nanometerbereich zielgerichtet modifiziert werden. Die Selbstassemblierungsreaktion findet zwischen einem langen, einzelsträngigen DNA (ssDNA) Molekül, das als Grundgerüst dient, und kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden statt. Beispiele für biotechnologische Anwendungen der DNA Origami Nanostrukturen reichen von Einzelmolekülanalyse, über Trägermaterialien in der Biosensorik oder Enzymkatalyse, hin zu Transportvehikeln für Medikamente (Chandrasekaran 2016). Trotz dieser vielversprechenden Anwendungen bleiben einige Herausforderungen bestehen, um den Übergang dieser Konzeptstudien zu marktfähigen Anwendungen zu ermöglichen. Eine Anwendung im medizinischen Bereich benötigt neben Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Biodistribution die deutliche Reduktion der Synthesekosten und die Möglichkeit zur Skalierung der Faltungsreaktion (Chen et al. 2015). In dieser Hinsicht konnten bereits erhebliche Fortschritte bei der Synthese und Aufreinigung der Nanostrukturen erzielt werden. So konnte gezeigt werden, dass bei einer optimierten konstanten Temperatur die DNA Nanostrukturen innerhalb von Minuten mit nahezu 100 % Ausbeute falten (Sobczak et al. 2012). Weiterhin wurde eine einfache und skalierbare Methode zur Reinigung der gefalteten DNA Origami Nanostrukturen beschrieben (Stahl et al. 2014). Dennoch kostet die Synthese von 1 g DNA Origami Struktur bisher mehrere 100.000 €. Die Synthese würde weiterhin mehrere Monate mit den bisher verwendeten Methoden und Geräten in Anspruch nehmen (Linko und Dietz 2013).

Die kostengünstige Bereitstellung der zwei ssDNA Edukte, des Gerüststrangs und der Klammern, im Gramm Maßstab und darüber hinaus stellt dementsprechend ein grundsätzliches Problem dar, das bisher unter anderem eine marktfähige Anwendung der DNA Origami Strukturen verhindert. Dabei besteht die Herausforderung in der Ausarbeitung eines Verfahrens, das sowohl die hohen Anforderungen an Qualität und Quantität der ssDNA, als auch die Möglichkeit zur einfachen Maßstabsvergrößerung umfasst. Aus diesem Grund ist es Ziel dieser Arbeit, die biotechnologische Produktion von ssDNA zu ermöglichen.

Als Grundgerüst für die *scaffolded* DNA Origami Technologie wird häufig das zirkuläre, einzelsträngige Genom des Bakteriophagen M13 verwendet. Dazu wird der Bakteriophage M13 bisher in Satzverfahren im Schüttelkolben durch die Infektion des Gram-negative (Gram⁻) Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) amplifiziert. Durch die Verwendung geeigneter Reinigungsmethoden können bisher ssDNA Mengen von 1-14 mg aus einem Liter Reaktionsvolumen isoliert werden (Bellot et al. 2013; Sambrook et al. 2001). Für industrielle Anwendungen wurden bereits die Stabilität der Bakteriophagen (Branston et al. 2011), aber auch neue Methoden zur Reinigung untersucht (Branston et al. 2012; Branston et al. 2015; Dong et al. 2013a). Im Gegensatz dazu ist die Produktion der Bakteriophagen in Rührkesselreaktoren wenig untersucht. Dabei stellt der Rührkesselreaktor den am häufigsten eingesetzten Reaktortyp in der Bioverfahrenstechnik dar und ermöglicht unter vergleichbaren physikalischen Bedingungen die Skalierung vom Labormaßstab in einen industriellen Maßstab (Weuster-Botz et al. 2007).

Hierfür soll zunächst die Etablierung eines Satzverfahrens zur Herstellung des Bakteriophagen M13 mit *E. coli* im Rührkesselreaktor erfolgen. Dafür soll ein Minimalmedium verwendet werden, um möglichst definierte Prozessbedingungen zu erreichen.

Zulaufprozesse stellen industriell die bedeutendste Prozessführung für die mikrobielle Produktion dar, und werden bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts als Alternative zum Satzverfahren eingesetzt (Weuster-Botz 1999). Die entscheidenden Vorteile im Gegensatz zum Satzverfahren sind die Vermeidung von Substratüberschussinhibierungen, die hohe Biomasse- und/oder Produktkonzentration am Prozessende, sowie die hohe volumetrische Produktivität durch die Verlängerung der Produktionsphase (Lee 1996; Riesenberg und Guthke 1999; Weuster-Botz 1999). Die hohe Biomasse- und/oder Produktkonzentration

birgt den Vorteil, dass der Aufwand in der anschließenden Aufarbeitung der Produkte reduziert wird (Choi et al. 2006). Bisher ist die Produktion des Bakteriophagen M13 in Zulaufprozessen jedoch noch nicht beschrieben.

Aufbauend auf den Satzprozessen mit Bakteriophagen soll daher ein Zulaufverfahren zur Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* und anschließender Produktion der Bakteriophagen untersucht werden, um die Produktkonzentration an Bakteriophagen und ssDNA im Vergleich zum Satzverfahren steigern zu können. Weiterhin sollen die Auswirkungen der Infektion auf Zustandsgrößen wie Biomassekonzentration im Reaktor, spezifische Wachstumsrate von *E. coli* und die dynamische Viskosität untersucht werden. Da stabförmige Partikel in Suspensionen zu einem Anstieg der Viskosität führen können (Ganani und Powell 1985), soll die dynamische Viskosität der Zellsuspension und des Reaktionsüberstandes, in den die filamentösen M13 Bakteriophagen sekretiert werden, untersucht werden. Durch die Verwendung eines chemisch definierten Mediums im Zulaufverfahren soll die Identifikation von möglichen Limitierungen und Inhibierungen durch Medienbestandteile ermöglicht werden. Die Qualität der prozessierten und gereinigten ssDNA soll jeweils durch die Anwendung als Gerüststrang in der *scaffolded* DNA Origami Technologie für verschiedene Nanostrukturen validiert werden.

Die reaktionstechnische Charakterisierung des neu erarbeiteten Zulaufprozesses zur Bakteriophagenproduktion sollte auch die Identifikation von Zustandsgrößen umfassen, die die Phagenbildungsrate, die maximale Produktkonzentration oder die Qualität der ssDNA beeinflussen. Hierbei könnte die Medienzusammensetzung, der Zeitpunkt der Infektion, die Menge an zugegebenen Bakteriophagen und die spezifische Wachstumsrate der Wirtszellen eine Einflussgröße darstellen.

Bei kontinuierlichen Prozessen wird durch einen identischen Zu- und Ablaufvolumenstrom ein konstantes Reaktionsvolumen erreicht. Darmit können Fließgleichgewichtszustände erreicht werden, bei denen alle Konzentrationen und Flüsse im Reaktor konstant sind (Chmiel 2011). Im Fließgleichgewichtszustand kann die Wachstumskinetik von Mikroorganismen unter zeitlich konstanten Bedingungen bestimmt werden (Hoskisson und Hobbs 2005). Weiterhin ist durch diese Prozessführung eine kontinuierliche extrazelluläre Produktbildung möglich, bei der im Vergleich zu Satz- und Zulaufverfahren auf Totzeiten durch den regelmäßigen Abbruch und das erneute Anfahren der Reaktoren verzichtet werden kann. Durch das exponentielle Wachstum der Zellen, im

Optimum nahe der maximalen spezifischen Wachstumsrate, können in kontinuierlichen Prozessen prinzipiell hohe Produktivitäten erreicht werden (Pirt 1975).

Nachdem die kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* mit dem Bakteriophagen M13 noch nicht beschrieben ist, soll auch diese Betriebsweise zur ssDNA Produktion reaktionstechnisch untersucht werden. Hierzu sollen Fließgleichgewichtszustände bei verschiedenen Durchflussraten in kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren eingestellt werden. Das Hauptaugenmerk liegt bei diesen Forschungsarbeiten auf dem Einfluss der Infektion mit Bakteriophagen auf den Kinetiken von Wachstum und Produktbildung. Mit diesen Daten können Betriebszustände identifiziert werden, die eine hohe Produktivität an ssDNA ermöglichen.

Durch die Fokussierung auf den Bakteriophagen M13 beschränkt sich die ssDNA Produktion auf den Gerüststrang für die DNA Origami Technologie. Zudem ist auch das Strukturdesign durch die genomische ssDNA des Bakteriophagen M13 eingeschränkt, wengleich bereits Längenvarianten zur Erhöhung der Freiheitsgrade generiert wurden (Douglas et al. 2009). Um sowohl hohe Freiheitsgrade im Design der Strukturen, als auch die Produktion der Oligonukleotide zu ermöglichen, soll in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München die Kombination aus Phagemid und Helferphagen verwendet werden, um die Produktion von artifizieller ssDNA zu ermöglichen. Die beiden Komponenten der *scaffolded* DNA Origami Technologie, der Gerüststrang und die kurzen Oligonukleotide, die als Klammern dienen, sollen auf dem Phagemid enthalten sein. Die Infektion mit den Helferphagen führt zur Produktion von Phagenpartikeln, die die artifizielle ssDNA des Phagemids tragen, und neuen Helferphagen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Produktion dieser artifiziellen ssDNA mit dem Helferphagen M13K07 im Rührkesselreaktor. Die artifizielle ssDNA soll im Anschluss für die Faltung von DNA Origami Nanostrukturen verwendet werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Desoxyribonukleinsäure

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein in allen Lebewesen und vielen Viren vorkommendes Biomolekül und dient als Träger der Erbinformation. Die DNA Sequenz, die aus der Kombination der vier unterschiedlichen Nukleinbasen gebildet wird, bestimmt hierbei die genetische Information. Entdeckt wurde die DNA bereits im Jahre 1869 von Friedrich Mischer, die chemische Zusammensetzung konnte allerdings erst 1919 identifiziert werden (Levene 1919). Die genaue Strukturaufklärung der doppelsträngigen DNA und der Bildung einer Doppelhelix erfolgte im Jahre 1953 durch Watson und Crick mittels Röntgenbeugung (Watson und Crick 1953). Einzelsträngige DNA besteht aus vier unterschiedlichen Nukleotiden, die kovalent verbunden eine Polynukleotid Kette bilden. Dabei besteht jedes Nukleotid aus den drei Bausteinen Desoxyribose, Phosphat und einer der vier aromatischen Nukleinbasen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin). Die Nukleinbasen sind über eine glykosidische Bindung an das 1'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose gebunden, während die Phosphatgruppe über eine Esterbindung an das 5'-Kohlenstoffatom kovalent gebunden ist. Die einzelnen Nukleotide sind über Phosphodiesterbindungen vom 5'- zum 3'-Kohlenstoffatom miteinander verbunden und bilden so das Rückgrat der einzel- und doppelsträngigen DNA aus alternierenden Desoxyribose- und Phosphatgruppen. Doppelsträngige DNA wird aus zwei komplementären Polynukleotidketten gebildet, die sich in Lösung spontan in die von Watson und Crick beschriebene Doppelhelix assemblieren. Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen im Inneren der Helix zwischen den Nukleinbasen Adenin und Thymin, oder Cytosin und Guanin gebildet. Ohne komplementäre Polynukleotidkette bildet einzelsträngige DNA im

Lösemittel Wasser Sekundärstrukturen aus, bei denen sich komplementäre Regionen innerhalb des eigenen Stranges aneinander anlagern (Berg et al. 2014).

3.1.1 Produktionsmethoden einzelsträngiger DNA

Im Folgenden sollen einige biotechnologische Methoden zur Produktion von Einzelstrang-DNA beschrieben werden. Die Entwicklung hauptsächlich chemischer Methoden zur *de novo* DNA Synthese von beispielsweise Oligonukleotiden oder ganzen Genen wird hier nicht diskutiert (Kosuri und Church 2014).

PCR basierte Methoden

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Synthese von einzelsträngiger DNA (ssDNA) wird in vielen verschiedenen Methoden angewandt. In diesem zellfreien Ansatz wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) mit gereinigten Enzymen (Polymerasen) durch Zugabe von Primern und der vier Desoxynukleosidtriphosphate im geeigneten Puffer vervielfältigt. Dabei stellt die Trennung von doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA bei den PCR-basierten Methoden die entscheidende Herausforderung dar (Schmidt et al. 2015). Im Folgenden sollen ausgewählte Beispiele kurz vorgestellt werden.

Die asymmetrische Polymerase-Kettenreaktion ist eine weit verbreitete Methode zur Bildung von ssDNA (Gyllensten und Erlich 1988). Bei der Reaktion werden unterschiedliche Konzentrationen der beiden verwendeten Primer eingesetzt, um die Produktion von einzelsträngiger DNA zu ermöglichen. Dabei lässt sich die Reaktion in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase wird zunächst doppelsträngige DNA produziert, bei der die DNA Amplifikation einem exponentiellen Verlauf folgt. Durch den Überschuss eines Primers kommt es in der zweiten Phase zur Produktion von einzelsträngiger DNA, wobei hier eine lineare Amplifikation auftritt (Engels und Lottspeich 2012). Ein wichtiger Aspekt für eine hohe Konzentration an Einzelstrang-DNA ist das Verhältnis der beiden Primer zueinander. Zur Produktion von ssDNA in einem 100 μ L Ansatz verwendete Citartan et al. (2012a) die asymmetrische PCR mit einem Primerverhältnis von 100 pmol:10 pmol, wodurch 0,4-0,5 μ g ssDNA produziert werden konnten. Die Trennung von doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA erfolgt bei dieser Methode durch Gelextraktion nach der

Auftrennung in der nativen Polyacrylamid Gelelektrophorese (Citartan et al. 2012a; Harwood 1996).

Bei der Methode des Lambda-Exonuklease Verdaus ist einer der beiden verwendeten Primer am 5'-Ende phosphoryliert. Anschließend wird die aus dem Bakteriophagen I stammende λ -Exonuklease verwendet, die eine 20-fach höhere Affinität zu einem phosphorylierten als zu einem unphosphorylierten 5'-Ende hat. Durch die Exonuklease wird selektiv der mit einer Phosphatgruppe markierte Strang abgebaut. Das Enzym zeigt außerdem eine stark reduzierte Aktivität gegenüber ssDNA. Dadurch ist eine schnelle und effiziente Methode zur Produktion von ssDNA möglich, bei der beispielsweise 2,2 μg ssDNA aus 100 μL isoliert werden konnten (Avci-Adali et al. 2010). Ein Problem stellen hierbei Inhomogenitäten in der Länge durch den unvollständigen Verdau des phosphorylierten Stranges durch die Exonuklease dar (Citartan et al. 2011).

Die Bildung von einzelsträngiger DNA mit Hilfe der Separation über die starke, nichtkovalente Bindung zwischen Biotin und Streptavidin lässt sich in zwei große Prozessschritte unterteilen. Zunächst wird durch die PCR DNA amplifiziert, bei der ein Primer mit Biotin markiert ist. Anschließend wird die mit Biotin markierte DNA über die Wechselwirkung mit Streptavidin, das beispielsweise an magnetische Partikel immobilisiert ist, gebunden. Die restlichen Bestandteile im Reaktionsansatz (Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate) können dadurch abgetrennt werden. Durch basische Bedingungen können die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA gelöst und die gewünschte einzelsträngige DNA von der Säule eluiert werden. Die Behandlung mit einer basischen Lösung kann neben der gewünschten Auftrennung der dsDNA auch zu einer Schwächung der Bindung zwischen Streptavidin und Biotin führen. Dadurch kann es zum Ablösen des mit Biotin markierten Einzelstranges kommen, sowie zur Reassemblierung und Verunreinigung der Elution mit dsDNA (Citartan et al. 2012b; Paul et al. 2009).

Bei der Verwendung von denaturierenden Urea-Polyacrylamidgelen wird die Amplifikation des DNA-Edukts ebenfalls mittels PCR durchgeführt. Dabei wird ein Primer so verändert, dass die entstehenden Stränge sich in der Größe bzw. Länge unterscheiden. Dazu kann beispielsweise in einen Primer eine selektive Schnittstelle für Ribonukleasen eingebaut werden (Walder et al. 1993) oder ein Primer über Hexaethylenglykol um zusätzliche 20 Nukleotide verlängert werden (Williams und Bartel 1995). Durch denaturierende Bedingungen wird die dsDNA getrennt und die unterschiedlich langen

Einzelstränge im Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion von DNA aus Gelen ist jedoch grundsätzlich nur mit niedriger Ausbeute möglich und auf den Labormaßstab beschränkt (Chen et al. 2013).

Alle aufgezählten Beispiele benutzen die PCR zur Amplifikation der dsDNA, die in einem Thermocycler mit einem Arbeitsvolumen von 50-100 μL durchgeführt wird. Dieses niedrige Reaktionsvolumen und der Wechsel der Reaktionstemperatur im Bereich von 50-95 $^{\circ}\text{C}$ innerhalb von Sekunden verhindern eine Skalierung in den Milliliter oder Litermaßstab (Schmidt et al. 2015). Eine Alternative, diese Temperaturzyklen zu umgehen, stellt die Verwendung der *rolling circle* Amplifikation *in vitro* dar.

Rolling circle Amplifikation

Die *rolling circle* Amplifikation (RCA) ist ein isothermischer Prozess, bei dem kurze DNA oder RNA Primer in lange ssDNA oder RNA Moleküle verlängert werden. Dabei kommen spezielle DNA Polymerasen (Phi29, Bst und Vent) oder T7 RNA Polymerasen zum Einsatz, die anhand einer zirkulären ssDNA Vorlage den Primer um die komplementären Nukleotide verlängern. Im Gegensatz zur PCR werden kein Thermocycler oder thermostabile Polymerasen benötigt, die RCA kann bei konstanten Temperaturen (20-37 $^{\circ}\text{C}$) *in vitro* oder in einer komplexen biologischer Umgebung durchgeführt werden (Ali et al. 2014). Dabei können durch die gezielte Konstruktion der DNA Vorlage funktionale Sequenzen wie DNA Aptamere (Zhao et al. 2012), DNAzyme (Ali und Li 2009; Dong et al. 2013b) und Restriktionsschnittstellen (Dahl et al. 2004) eingebaut werden. Ducani et al. (2013) zeigten die Kombination aus RCA und den Einbau von Restriktionsschnittstellen für die Produktion von ssDNA Oligonukleotiden zur Anwendungen in der DNA Nanotechnologie. Durch die Zugabe eines ssDNA bindenden Enzyms konnte weiterhin der Abbruch und die Bildung von dsDNA während der RCA verhindert werden (Ducani et al. 2014).

Ein weiteres Beispiel für die Herstellung von kurzen ssDNA Oligonukleotiden ist die Kombination von RCA und selbstschneidender DNAzyme. Dabei wird über die RCA einzelsträngige DNA produziert und durch die Zugabe von Zink die Hydrolyse der ssDNA begünstigt (Gu et al. 2013; Gu und Breaker 2013).

Phagen basierende Einzelstrang-DNA Produktion

Für die Produktion von Einzelstrang-DNA können neben rein enzymatischen auch zellbasierte Ansätze verwendet werden. Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die Verwendung des filamentösen Bakteriophagen M13, der *E. coli* Stämme infizieren kann, die über ein F-Plasmid verfügen. In den Bakteriophagen M13 liegt das genetische Material als einzelsträngige DNA vor. Über ein Oberflächenprotein der Proteinhülle lagert sich der Phage an den F-Pilus von *E. coli* an und infiziert die Zelle mit der ssDNA. In der Zelle wird die DNA in eine doppelsträngige, replikative Form prozessiert. Die Phagenproteine werden exprimiert und die ssDNA nach dem *rolling circle* Prinzip amplifiziert. Die neu synthetisierten Phagen werden aus der Zelle sekretiert, ohne die Zelle zu lysieren (Calendar 2006; Sambrook et al. 2001). Durch geeignete Separationsmethoden lassen sich die im Medium befindenden Phagen von den Wirtszellen trennen, wodurch es nach Aufreinigung der ssDNA zu keiner Verunreinigung mit dsDNA aus *E. coli* kommt. Mit diesem Ansatz können ssDNA Mengen von 1-14 mg aus einem Liter Reaktionsvolumen isoliert werden (Bellot et al. 2013; Sambrook et al. 2001).

3.1.2 Scaffolded DNA Origami

Die Nutzung von DNA Molekülen als programmierbares Ausgangsmaterial zur Bildung von Nanostrukturen wurde erstmals von dem Kristallographen Nadrian Seeman in den frühen 1980ern beschrieben. Das grundlegende Strukturelement ist hierbei die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen nach Watson und Crick zwischen den Nukleinbasen der DNA Moleküle. Nach der Bildung einer DNA Nanostruktur in Form eines Würfels und der Entdeckung des doppelten *crossovers* als ein wichtiges Strukturelement gilt Seeman als der Gründungsvater der DNA Nanotechnologie (Chen und Seeman 1991; Fu und Seeman 1993; Linko und Dietz 2013; Seeman 1982). Ein vielversprechender Ansatz, um komplexe Nanopartikel mit einer Präzision im Nanometermaßstab zu konstruieren, ist die *scaffolded* DNA Origami Methode, die erstmals von Paul Rothemund beschrieben wurde (Rothemund 2006). In dieser *bottom-up* Methode wird eine langes einzelsträngiges DNA (ssDNA) Molekül mit Hilfe von kurzen Oligonukleotiden (<100 Nukleotide) in einer selbstassemblierenden Reaktion in eine Nanostruktur gefaltet. Dabei dient das lange, einzelsträngige DNA Molekül als Grundgerüst (engl. *scaffold*), das durch die vielen, kurzen Oligonukleotide, die als Klammern (engl. *staples*) dienen, zu zwei- und dreidimensionalen

Nanostrukturen geformt werden kann (Douglas et al. 2009). Als Grundgerüst wird häufig das zirkuläre, einzelsträngige Genom des Bakteriophagen M13 verwendet, wobei auch andere ssDNA Moleküle als Grundgerüst denkbar sind (Said et al. 2013; Zhang et al. 2012). Eine Besonderheit der *scaffolded* DNA Origami Technologie stellt die Tatsache dar, dass aus einem ssDNA *scaffold*, der in seiner Sequenz festgelegt ist, durch die computergestützte Konstruktion der *staple* Sequenzen viele verschiedene Nanostrukturen gebildet werden können (Linko und Dietz 2013). Eine weitere Besonderheit in dieser *bottom-up* Methode ist, dass jedes einzelne Nukleotid individuell verändert werden kann, wodurch beispielsweise Modifikationen wie Thiolgruppen, Farbstoffe oder Biotin eingefügt oder ortsspezifisch Proteine gebunden werden können (Rinker et al. 2008).

Die Anwendungen der *scaffolded* DNA Origami Technologie erstrecken sich über interdisziplinäre Bereiche von der NMR Spektroskopie (Berardi et al. 2011; Douglas et al. 2007), über Einzelmolekül-Messungen (Derr et al. 2012; Kopperger et al. 2015; Pfitzner et al. 2013; Wei et al. 2012), Plasmonik (Kuzyk et al. 2012), bis hin zur Zellbiologie (Shaw et al. 2014). Eine weitere Anwendung, die eine industrielle Produktion im Gramm- bis Kilogrammmaßstab nötig macht, ist der Einsatz als Transportvehikel von Pharmaka im medizinischen Bereich. Hier konnten Douglas et al. (2012) einen Nanoroboter in Form eines hexagonalen Zylinders mit Dimensionen von 35 x 35 x 45 nm bilden. In den Nanoroboter konnten Antikörperfragmente und Goldpartikel mit einem Durchmesser von 5 nm über Verbindungsmoleküle verankert werden. Als weitere Besonderheit besitzt der Nanoroboter einen selektiven Verschlussmechanismus, bestehend aus Aptameren. Aptamere sind kurze DNA oder RNA Oligonukleotide, die durch Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur spezifische Moleküle binden können. Durch die Zugabe eines spezifischen Moleküls kommt es zu einer Änderung der Struktur der Aptamere, der Nanoroboter wird geöffnet und die Ladung wird freigesetzt. Dies dient als anschauliches Beispiel für Transportvehikel von Medikamenten, dargestellt in Abbildung 3.1 A.

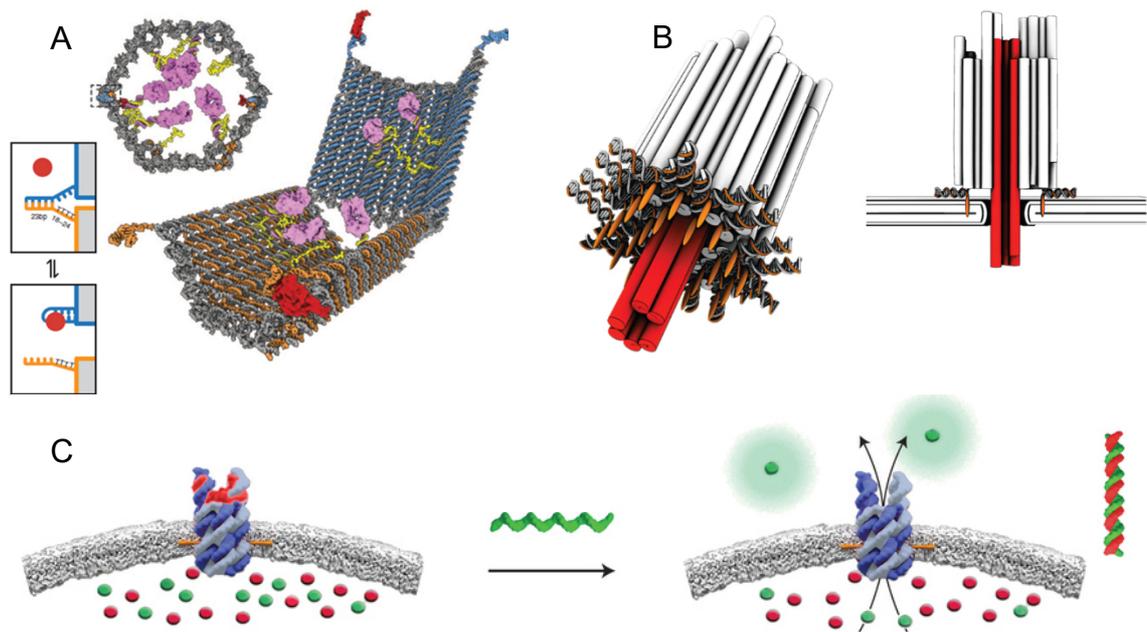


Abbildung 3.1 DNA Nanostrukturen gebildet nach der *scaffolded* DNA Origami Technologie. A: Nanoroboter in Form eines hexagonalen Zylinders aus DNA, mit selektivem Verschlussmechanismus (entnommen aus Douglas et al. (2012)). B: Synthetischer Ionenkanal aus DNA, der in Lipidmembranen inseriert (entnommen aus Langecker et al. (2012)). C: DNA basierter Ionenkanal mit Verschlussmechanismus, der einen diffusionsgetriebenen, selektiven Transport ermöglicht (entnommen aus Burns et al. (2016)).

Ein weiteres Beispiel, dass die Produktion von DNA Nanostrukturen in einem industriellen Maßstab nötig macht, ist die Entwicklung eines synthetischen Ionenkanals aus DNA, der in Membranen inseriert (Langecker et al. 2012). Diese Idee wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen weitergeführt und Burns et al. (2016) konnten zeigen, dass es möglich ist einen Ionenkanal zu konstruieren, der einen Verschlussmechanismus enthält, dargestellt in Abbildung 3.1 C. Weiterhin konnte durch gezielte Konstruktion des Ionenkanals ein selektiver, diffusionsgetriebener Transport durch den Kanal realisiert werden. Der in dieser Veröffentlichung gezeigte Ionenkanal wurde so entworfen, dass zwei Farbstoffmolekülen anhand einer negativen, beziehungsweise positiven Ladung unterschieden werden. Die erfolgreiche Kombination dieser DNA basierten Ionenkanäle mit Polymersomen stellt eine vielsprechende Anwendung als Nanoreaktor in der Biokatalyse oder als Transportvehikel für Medikamente dar (Messenger et al. 2016).

3.2 Biologische Systeme

3.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium und wird der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Es wurde erstmals im Jahre 1895 von Theodor Escherich beschrieben. Als Suspensionszellen wachsen *E. coli* in definierten Nährlösungen aus Kohlenstoff, Stickstoff, verschiedenen Salzen und Spurenelementen, aber auch in Medien mit komplexen Bestandteilen. Weiterhin ist adhärentes Wachstums auf festen Nährmedium möglich (Carnes 2005; Storhas 2013). Unter optimalen Wachstumsbedingungen, mit einer Temperatur von 37 °C und in einem pH Bereich von pH 6,5 - pH 7,3, können Verdopplungszeiten von 20 bis 25 Minuten erreicht werden (Suerbaum et al. 2012). Die einfache Handhabung des Bakteriums sowie die Möglichkeit der genetischen Veränderung machte es zu einem der wichtigsten Modellorganismen für Untersuchungen des Stoffwechsels, der Enzymregulationen und der Signaltransduktion. Zudem ermöglichte die einfache genetische Modifizierung die rekombinante Proteinexpression, weshalb es einen beliebten Wirtsorganismus für biotechnologische Anwendungen darstellt (Keseler et al. 2013; Marisch et al. 2013; Storhas 2013).

Der Bakteriophage M13 infiziert spezifisch *E. coli* Stämme, die einen Fertilitätspilus (F-Pilus) auf der Zelloberfläche exprimieren. Aus diesem Grund wird *E. coli* als Wirtsorganismus für die Amplifizierung der Bakteriophage M13 verwendet. Im Folgenden soll auf Teile des zentralen Metabolismus von *E. coli* genauer eingegangen werden.

Aspekte des zentralen Metabolismus von *Escherichia coli*

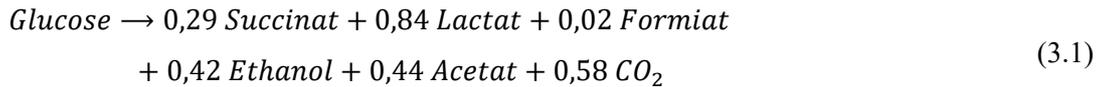
Als Kohlenstoffquellen kann *E. coli* verschiedene fünf- und sechsfach Zucker oder Glycerin verstoffwechseln (Xia, 2012). Dennoch wird hauptsächlich Glucose als einzige Kohlenstoff und Energiequelle in definierten Medien verwendet, weshalb in der Folge auf die Glucoseaufnahme, die Glykolyse und den Citratzyklus eingegangen werden soll.

Die Aufnahme von Glucose erfolgt hauptsächlich über das glucosespezifische Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (Glucose-PTS). Nach dem aktiven Transport über die Zellmembran ins Cytosol wird Glucose phosphoryliert. Der Phosphatrest wird von Phosphoenol, das zu Pyruvat umgewandelt wird, über eine mehrstufige

Proteinkaskade von Kinasen auf Glucose übertragen (Deutscher et al. 2006). Ähnlich zum Glucose-PTS, kann Glucose auch über das Mannose-PTS unter aeroben Bedingungen aufgenommen werden (Hunter und Kornberg 1979). Glucose kann weiterhin über die ABC Transporter (*ATP binding cassette*, ABC) für Galactose oder Maltose unter glucoselimitierenden Bedingungen im Chemostaten aufgenommen werden. Die ABC Transportern setzen Glucose unphosphoryliert in das Cytosol frei, die Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat erfolgt anschließend unabhängig von den Membranproteinen, katalysiert durch eine Glucokinase unter Adenosintriphosphat (ATP) Verbrauch (Notley und Ferenci 1995; Steinsiek und Bettenbrock 2012).

Glucose-6-Phosphat wird in der anschließenden Glykolyse in das zentrale Metabolit Pyruvat umgewandelt. Dabei werden zwei Mol ATP und zwei Mol Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) pro Mol Glucose generiert. In der oxidativen Decarboxylierung reagiert Pyruvat mit dem Coenzym A (CoA) unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu Acetyl-CoA und NADH. Die oxidative Decarboxylierung stellt die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus her. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA vollständig in Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidiert und die freigesetzte Energie in ATP, GTP, NADH und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) umgewandelt. Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden unter aeroben Bedingungen über die Atmungskette regeneriert. Die Elektronen werden dabei über mehrere membranständige Redoxsysteme auf den Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen, bei gleichzeitigem Aufbau eines Protonengradientens. Dieser dient als treibende Kraft zur Bildung von ATP, katalysiert durch die ATP-Synthase (Berg et al. 2014). Unter aeroben Bindungen können über die Glykolyse, die oxidative Decarboxylierung, den Citratzyklus und die anschließende Atmungskette 26 Mol energiereiche Mononucleotid-Triphosphate aus einem Mol Glucose gewonnen werden (Abröll et al. 2008).

Unter anaeroben Bedingungen können aufgrund des fehlenden Elektronenakzeptors Sauerstoff die Reduktionsäquivalente für den Citratzyklus nicht mehr über die Atmungskette regeneriert werden, wodurch der Citratzyklus inaktiv wird. Die in der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente müssen regeneriert werden, indem Metabolite der Glykolyse wie Phosphoenolpyruvat und Pyruvat reduziert werden, weshalb unter anaeroben Bedingungen Gärung stattfindet. *E. coli* verstoffwechselt hierbei Glucose in der sogenannten gemischten Säuregärung zu Succinat, Lactat, Formiat, Ethanol, Acetat und Kohlenstoffdioxid (Fuchs et al. 2014). Die Stöchiometrie der gemischten Säuregärung ist in Gleichung 3.1 dargestellt.



Im Vergleich zur vollständigen Oxidation von Glucose zu Kohlenstoffdioxid unter aeroben Bedingungen ist die ATP Bildung in der Gärung sehr ineffizient. Hierbei werden aus einem Mol Glucose nur 2,44 Mol ATP durch die Substratkettenphosphorylierung generiert. Neben dieser Ineffizienz ist die Bildung von sauren Stoffwechselprodukten wie Acetat in Hochzelllichtverfahren unerwünscht, da sowohl das Wachstums als auch die rekombinante Proteinproduktion inhibiert werden können (Eiteman und Altman 2006; Fuchs et al. 2014).

Zusätzlich kann es unter aeroben Bedingungen bei Glucoseüberschuss oder hohen Wachstumsraten zur Acetatbildung kommen. Dies wird als Überschussmetabolismus bezeichnet. Dabei übersteigen die Glucoseaufnahmerate und die Glykolyse die maximale Kapazität des Citratzyklus und der Atmungskette, wodurch Acetyl-CoA nicht in den Citratzyklus eintreten kann. In Abhängigkeit der Wachstumsphase werden zwei Stoffwechselwege beschrieben, die die Akkumulation von Acetyl-CoA verhindern. Im exponentiellen Wachstum ist der AckA-Pta Stoffwechselweg aktiv, während in der stationären Phase der PoxB Weg aktiv ist (Dittrich et al. 2005). Die Phosphotransacetylase (Pta) katalysiert die reversible Reaktion von Acetyl-CoA und anorganischem Phosphat zu CoA und Acetylphosphat, das unter Bildung von ATP zu Acetat weiterreagiert, katalysiert durch die Acetatkinase (AckA). Die Pyruvatoxidase (PoxB) katalysiert die Bildung von Acetat aus Pyruvat.

Die Wachstumsrate von *E. coli* beeinflusst ebenfalls die Acetatbildung. Die kritische spezifische Wachstumsrate, die zur Acetatbildung führt, hängt dabei vom verwendeten Stamm und Medium ab. In definierten Medien liegt mit Glucose als Substrat die kritische Wachstumsrate bei $0,35 \text{ h}^{-1}$, in komplexen Medien bei $0,2 \text{ h}^{-1}$, wobei das gebildete Acetat unter Glucoselimitierung von *E. coli* wieder abgebaut wird (Choi et al. 2006; Luli und Strohl 1990).

Hochzelldichtekultivierung im Zulaufverfahren

Zulaufverfahren stellen industriell die bedeutendste Prozessführung für die mikrobielle Produktion dar, und werden bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts als Alternative zum Satzverfahren eingesetzt (Weuster-Botz 1999). Die entscheidenden Vorteile im Gegensatz zum Satzverfahren sind die Vermeidung von Substratüberschussinhibierungen, die hohe erreichbare Biomasse-, die hohe Produktkonzentration und volumetrische Produktivität durch die Verlängerung der Produktionsphase. Diese ermöglicht eine Induktion der Produktbildung zum optimalen Zeitpunkt (Lee 1996; Riesenberg und Guthke 1999; Weuster-Botz 1999). Die hohe Biomasse- und Produktkonzentration birgt den weiteren Vorteil, dass der Aufwand in der anschließenden Aufarbeitung der Produkte verringert wird (Choi et al. 2006).

Die ersten Hochzelldichtekultivierungen mit Biomassekonzentrationen über 100 g L^{-1} wurden für Hefen zur Produktion von Ethanol gezeigt (Riesenberg und Guthke 1999). Weitere mesophile Mikroorganismen wie *Streptomyces* zur Antibiotikumproduktion (Suzuki et al. 1987) und methylotrophe Mikroorganismen zur Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (Lee und Chang 1994) konnten in Zulaufverfahren bei hohen Zelldichten kultiviert werden. Die Kombination aus den Fortschritten in der molekularbiologischen Zugänglichkeit von Mikroorganismen und der prozesstechnischen Entwicklung von Hochzelldichteverfahren ermöglichten die intrazelluläre, periplasmatische und extrazelluläre Produktion von rekombinanten Proteinen, oder anderen Produkten wie beispielsweise Aminosäuren, Biopolymeren oder aromatischen Verbindungen (Choi et al. 2000; Choi et al. 2006; Choi und Lee 2004; Gavit und Better 2000; Riesenberg und Guthke 1999; Weiner et al. 2014). Neben geeigneten, alternativen Wirtsorganismen kommt *E. coli* aufgrund gut untersuchter Genetik, Regulation und Stoffwechsel häufig in der Hochzelldichtekultivierung zum Einsatz. Dabei konnten mit *E. coli* unter Vermeidung von Sauerstoffeintragslimitierungen und Substratüberschussinhibierungen maximale Bio-trockenmassekonzentrationen von 110 g L^{-1} (Riesenberg et al. 1991) bis 183 g L^{-1} (Hu et al. 2004) im Rührkesselreaktor erreicht werden. Eine weitere Steigerung der Biomassekonzentration auf 190 g L^{-1} war durch die Verwendung einer Dialysemembran möglich, die eine Zellrückhaltung bei gleichzeitiger Abtrennung von inhibitorischen Stoffwechselnebenprodukten erzielte (Nakano et al. 1997). Damit konnte annähernd die

maximale theoretische Biomassekonzentration von 200-220 g L⁻¹ erreicht werden, bei der sich das Fließverhalten der Bakteriensuspension drastisch ändert (Shiloach und Fass 2005).

Neben den Vorteilen birgt die Hochzelldichtekultivierung einige Probleme und Nachteile, die berücksichtigt werden müssen. Zu nennen sind hierbei die Löslichkeit von festen und gasförmigen Substraten in Wasser, die Limitierung oder Inhibierung durch Substrate und Produkte, die Anreicherung von unerwünschten Stoffwechselnebenprodukten, die hohen Kohlenstoffdioxidpartialdrücke, die starke Wärmeentwicklung, der hohe Sauerstoffbedarf und der Anstieg der Viskosität bei hoher Zelldichte (Choi et al. 2006; Lee 1996; Riesenberg und Guthke 1999). Einige dieser Probleme und Limitierungen können durch prozesstechnische und molekularbiologische Anpassungen gemindert werden, die im Folgenden erläutert werden.

Um Limitierungen und Inhibierungen durch die Substrate zu umgehen, ist für die Hochzelldichtekultivierungen die arbeitsintensive Entwicklung eines auf den Prozess und Mikroorganismus angepassten Mediums unumgänglich. Dabei können definierte, semi-definierte und komplexe Medien verwendet werden. Definierte Medien, die auf die Elementarzusammensetzung von *E. coli* angepasst wurden, ermöglichen hohe Zelldichten bei gleichzeitiger Kontrolle der Nährstoffkonzentrationen im Zulaufverfahren (Paalme et al. 1990; Riesenberg et al. 1991; Yee und Blanch 1992). Dabei können definierte Medien zu einer langsameren Wachstumsrate und geringeren Proteinkonzentrationen im Vergleich zu komplexen Medien führen (Zanette et al. 1998). Medienbestandteile wie Hefeextrakt werden in komplexen oder semi-definierten Medien hinzugegeben, um die zellspezifische Produktausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen, oder falls essentielle Nährstoffbestandteile des Mikroorganismus unbekannt sind (Manderson et al. 2006). Weiterhin verringert Hefeextrakt die negativen Folgen der Acetatbildung auf Wachstum und rekombinante Proteinproduktion. Die Nachteile von komplexen Bestandteilen sind jedoch die variierende Zusammensetzung und Qualität, die Bildung von Stoffwechselnebenprodukten wie Acetat und die aufwendigere Aufarbeitung des Zielproteins im Vergleich zu definierten Medien (Riesenberg und Guthke 1999; Tripathi 2009).

Acetat wird als ein Stoffwechselnebenprodukt von *E. coli* unter anaeroben oder sauerstofflimitierenden Bedingungen bei der gemischten Säuregärung produziert. Zusätzlich kann es unter Glucoseüberschuss ebenfalls zu Acetatbildung bei ausreichender

Sauerstoffversorgung kommen, was als Überflussmetabolismus bezeichnet wird. Im Folgenden sollen einige Strategien vorgestellt werden, die einzeln oder in Kombination die Bildung und Akkumulation von Acetat vermeiden.

Die ausreichende Sauerstoffversorgung ist für das Erreichen hoher Zelldichten und die Vermeidung der gemischten Säuregärung essentiell, beeinflusst jedoch weiterhin die Genexpression und den Oxidationszustand von vielen Enzymen (Castan und Enfors 2000; Maré et al. 2005). Die niedrige Löslichkeit von Sauerstoff ($\sim 7 \text{ mg L}^{-1}$ bei Atmosphärendruck und $25 \text{ }^\circ\text{C}$) im wässrigen Reaktionsmedium macht eine hohen Sauerstoffeintragsrate notwendig. Diese kann über den Leistungseintrag, die Gasleerrohrgeschwindigkeit, und die Anreicherung der Prozessluft mit reinem Sauerstoff erhöht werden. Eine kostengünstige Steigerung der Sauerstoffeintragsrate kann zudem durch die Erhöhung des Systemdrucks erzielt werden (Garcia-Ochoa und Gomez 2009). Dabei ist zu berücksichtigen, dass mit dem Systemdruck auch die Kohlenstoffdioxidkonzentration erhöht wird. Bei einem Partialdruck an Kohlenstoffdioxid über 0,3 bar wird die Wachstumsrate reduziert und vermehrt Acetat gebildet (Pan et al. 1987). Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung sicherzustellen, kann die spezifische Wachstumsrate und damit der Sauerstoffbedarf der Zellen reduziert werden. Dies wird häufig angewendet, da eine reduzierte Wachstumsrate unter substratlimitierenden Bedingungen ebenso die Bildung des Stoffwechselnebenprodukts Acetat vermindert (Korz et al. 1995; Lee 1996; Luli und Strohl 1990; Riesenberg und Guthke 1999).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die für *E. coli* optimale Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $26\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ zu reduzieren. Einerseits werden dadurch die Wachstumsrate und Glucoseaufnahme reduziert und die Bildung von Nebenprodukten und der Sauerstoffbedarf verringert. Andererseits steigt die Löslichkeit von Sauerstoff mit sinkender Temperatur an und die Sauerstoffeintragsrate wird erhöht. Da eine niedrigere Temperatur zusätzlich Vorteile für die Faltung der nativen Struktur von rekombinanten Proteine birgt, wird die Temperaturreduktion häufig während der Hochzelldichtekultivierung angewendet (Lee 1996; Maré et al. 2005; Tripathi 2009).

Für Hochzelldichtekultivierungen werden in der Industrie hauptsächlich Rührkesselreaktoren aufgrund der einfachen und robusten Anwendung von Zulaufverfahren und der weiten Verbreitung benutzt (Riesenberg und Guthke 1999). Dennoch werden vor allem in der Forschung verschiedene Reaktorsysteme verwendet, die eine Akkumulation der

inhibitorischen Nebenprodukte vermindern, oder hohe Sauerstoffeintragsraten ermöglichen. Die Versorgung der Zellen mit frischem Medium bei gleichzeitigem Ablauf des verbrauchten Mediums bei vollständiger Zellrückhaltung konnte im Rührkesselreaktor mit externen und internen Hohlfaser-, Filter- oder Keramikmembranmodulen für die Hochzelldichtekultivierung erreicht werden (Chang et al. 1993; Lee und Chang 1990; Suzuki 1996). Weiterhin werden Dialysemembranreaktoren eingesetzt, die sich für Hochzelldichtekultivierungen mit Biomassekonzentrationen bis zu 190 g L^{-1} als sehr geeignet erwiesen haben (Nakano et al. 1997). Andere Reaktorsysteme, die eine Erhöhung der Massentransferrate an gasförmigen Substraten erzielen, sind beispielsweise Airliftreaktoren und Zyklonreaktoren (Hartbrich et al. 1996; Holst et al. 1997). Für eine genauere Beschreibung wird auf den Übersichtsartikel von Riesenberg und Guthke (1999) verwiesen.

Eine weitere Möglichkeit die Produktion von Acetat zu reduzieren, ist die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle. Im Vergleich zu Glucose wird Glycerin langsamer von *E. coli* aufgenommen, wodurch der Kohlenstofffluss durch den Zentralstoffwechsel und der Überschussmetabolismus reduziert werden (Korz et al. 1995; Lee 1996).

Neben den beschriebenen prozesstechnischen Möglichkeiten zur Vermeidung der Acetatbildung, sind auch molekularbiologische Ansätze denkbar und veröffentlicht. Zum einen können Gene deletiert werden, die unter aeroben Bedingungen für die Acetatbildung verantwortlich sind. Ein Phosphotransacetylase (Pta) defizitärer *E. coli* Stamm erreichte hohe Zelldichten und eine erhöhte Lipasekonzentration (Hahm et al. 1994). Zum anderen kann der überschüssige Kohlenstofffluss gezielt in weniger schädliche Nebenprodukte wie Ethanol oder Acetoin umgeleitet werden (Aristidou et al. 1994; Ingram et al. 1987).

Zur Etablierung von Hochzelldichtekultivierungen können verschiedene Zulaufstrategien durchgeführt werden, wobei grundsätzlich zwischen konstantem, linear bzw. stufenweise ansteigendem und exponentiellem Zulauf unterschieden werden kann. Bei einer konstanten Zulauftrate kommt es zum kontinuierlichen Anstieg des Reaktionsvolumens und die spezifische Wachstumsrate sinkt über die Zeit. Bei der stufenweisen Erhöhung der Zulauftrate in Abhängigkeit der Zellkonzentration können die Zellen durchgehend exponentiell wachsen. Die Verwendung von exponentiellen Zulaufprofilen ermöglicht hingegen die Kontrolle der spezifischen Wachstumsrate. Dabei kann zwischen gesteuerten und geregelten Zulaufstrategien unterschieden werden. Einfache, gesteuerte

Zulaufstrategien verwenden ein vorgegebenes Zulaufprofil, welches über die Kopplung von Formalkinetik und Massenbilanzen berechnet wird (Korz et al. 1995). Bei geregelten Zulaufprofilen wird die Zulauftrate über direkte oder indirekte, *on-line* zugängliche Messgrößen geregelt. Zu den indirekten Methoden gehören beispielsweise die Messgrößen der Gelöstsauerstoffkonzentration, des pH, der Kohlenstoffdioxidbildungsrate oder der Zellkonzentration, die alle direkt mit dem Wachstum assoziiert sein müssen. Bei der direkten Methode muss das limitierende Substrat *on-line* messbar sein (Konstantinov et al. 1990; Lee 1996).

Für die Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* werden häufig definierte Medien verwendet, die an die Elementarzusammensetzung angepasst sind. Dabei dürfen Medienbestandteile wie Glucose, Ammonium oder Magnesium weder limitierend noch inhibierend sein. Eine Glucosekonzentration von 50 g L^{-1} inhibiert das Wachstum von *E. coli* und wird aus diesem Grund häufig als limitierendes Substrat in Zulaufkultivierungen verwendet (Riesenberg et al. 1991). Die schnelle Aufnahme der Glucose über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System kann zum Überschussmetabolismus und zur Acetatproduktion führen. Acetatkonzentrationen zwischen $2,0\text{-}10,0 \text{ g L}^{-1}$ wirken sich dabei negativ auf Wachstums und Produktion rekombinanter Proteine aus (Pan et al. 1987; Shiloach und Fass 2005).

Die pH Regelung wird bei der Hochzelldichte mit *E. coli* meist mit konzentrierter Ammoniumlösung durchgeführt, wodurch es selten zu Limitierungen durch die Stickstoffquelle kommt. Ab einer Konzentration von $3,1 \text{ g L}^{-1}$ wirkt Ammonium inhibierend auf *E. coli* (Thompson et al. 1985). Definierte Medien, die auf die Elementarzusammensetzung von *E. coli* angepasst sind, enthalten als Mineralien Magnesium, Phosphat, Sulfat und Kalium (Carnes 2005). Die inhibierenden Konzentrationen von Magnesium und Phosphor liegen bei $8,7 \text{ g L}^{-1}$ und 10 g L^{-1} (Riesenberg 1991). Die weiteren Bestandteile, die als Spurenelemente zusammengefasst werden, sollten ebenfalls die inhibitorische Konzentration nicht überschreiten. Molybdän sollte nicht über $0,8 \text{ g L}^{-1}$, Bor nicht über 44 mg L^{-1} , Kupfer nicht über $4,2 \text{ mg L}^{-1}$, Mangan nicht über 68 mg L^{-1} , Cobalt nicht über $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, Zink nicht über 38 mg L^{-1} und Eisen nicht über $1,15 \text{ mg L}^{-1}$ im Reaktionsmedium vorliegen (Riesenberg 1991).

3.2.2 Bakteriophage M13

Bakteriophagen sind eine Gattung von Viren, die Prokaryoten als Wirtsorganismen infizieren. Entsprechend aller Viren, sind Bakteriophagen nicht extrazellulär metabolisch aktiv und können sich nur intrazellulär nach Infektion eines geeigneten Wirts vermehren, angewiesen auf den Stoffwechsel des Wirts. Der Bakteriophage M13 wurde erstmals in München im Jahre 1963 entdeckt (Hofschneider 1963). M13 wird zu den filamentösen Phagen gezählt und besitzt eine 98,5 % homologe DNA Sequenz zu den fd und fl Bakteriophagen, wodurch er für die meisten Anwendungen als identisch angesehen werden kann. Zusammenfassend werden sie oftmals als F-spezifische, filamentöse Phagen (Ff-Phage) bezeichnet, da sie selektiv F-Pilus tragende Gram-negative (Gram⁻) Mikroorganismen infizieren und eine filamentöse Struktur aufweisen (Clackson und Lowman 2004; Marvin et al. 2014). Durch Röntgenstrukturanalyse können filamentöse Bakteriophagen in zwei Klassen eingeteilt werden. Die Ff-Phagen können der Klasse 1 zugeordnet werden, aber auch andere Phagen wie Ike und If1, die andere Hüllproteine besitzen und nicht F-spezifische sind (Marvin et al. 1974). Filamentöse Phagen der Klasse 1 infizieren *Escherichia coli* als Wirtsorganismus. Die Pf1, Pf3 und Xf Phagen können in die zweite Klasse eingeordnet werden, die andere Gram⁻ Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa* infizieren (Rakonjac et al. 2011).

Aufbau und Struktur des Bakteriophagen M13

Der Bakteriophage M13 zeichnet sich durch seine filamentöse Struktur mit einer Länge von 900 nm und 6,5 nm im Durchmesser aus (Berkowitz und Day 1976; Calendar 2006). Er hat ein Molekulargewicht von $1,2 \cdot 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ (Rasched und Oberer 1986) und ein Trockengewicht von $2,0 \cdot 10^{-17} \text{ g}$ (Salivar et al. 1964). Der M13 Bakteriophage verfügt über ein 6,6 kb langes, einzelsträngiges Genom, das 9 Gene enthält und für 11 Proteine codiert. Die einzelstränge DNA, die in Lösung eine zufällige, doppelsträngige Struktur mit einzelsträngigen Haarnadelkurven bildet (Marvin et al. 2014), liegt verpackt in der Proteinhülle als doppelsträngige Struktur unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vor, bei der die Phosphatreste mit der Proteinhülle interagieren. Die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich jedoch nur zu 25 % nach der von Watson und Crick beschriebenen Struktur aus (Day et al. 1988). Die Länge der ssDNA definiert dabei die Länge des Bakteriophagen M13, wodurch kürzere oder deutlich längere

Genome in die Phagen verpackt werden können und eine hohe genetische Modifikation möglich ist (Rakonjac et al. 2011; Specthrie et al. 1992).

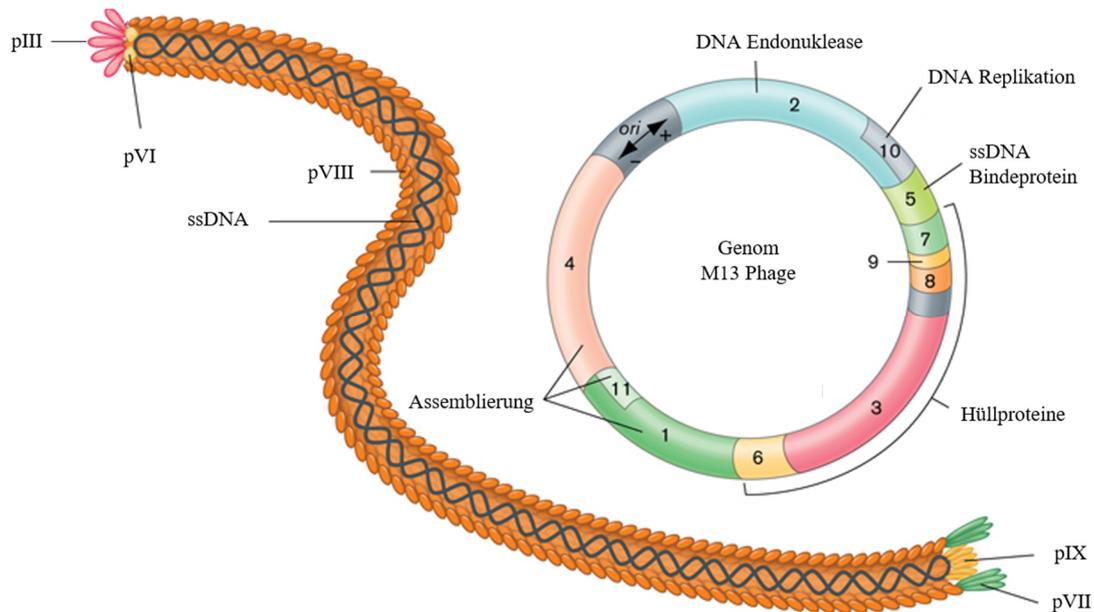


Abbildung 3.2 Schematische Abbildung der filamentösen Struktur und des Genoms des M13 Bakteriophagen (modifiziert nach Slonczewski und Foster (2012)).

Die genomische ssDNA des Bakteriophagen M13 codiert für 11 Proteine, von denen fünf Proteine (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX) die Hülle des Phagen bilden, während die anderen sechs für die DNA Replikation und die Assemblierung der Phagen notwendig sind, dargestellt in Abbildung 3.2. In Tabelle 3.1 sind diese 11 Proteine aufgelistet, mit kurzen Informationen zur Funktion und Position. Das pVIII Protein (5 kDa) stellt mit bis zu 2700 Kopien pro M13 Phage das Haupthüllprotein dar. Die helikale Anordnung seiner Untereinheiten definiert die filamentöse Struktur des Phagen (Marvin et al. 2006). Das pVIII Protein ist ein im Cytosol schlecht lösliches Membranprotein, dass über eine C-terminale, hydrophobe Transmembranhelix in der inneren Membran verankert wird (Papavoine et al. 1998). Die anderen vier Hüllproteine kommen in deutlich niedrigerer Kopienzahl vor. Die distale Spitze wird von jeweils ungefähr 5 Proteinen pVII (3,6 kDa) und pIX (3,5 kDa) gebildet, die essentiell für die Initiation der Phagenfreisetzung sind und mit dem Packungssignal der ssDNA interagieren. Beide Proteine befinden sich vor der Assemblierung der Phagen in der inneren Zellmembran, wobei sie über keine Signalsequenz für die Insertion in die Membran verfügen und somit spontan inserieren müssen (Endemann

und Model 1995; Russel und Model 1989). Die proximale Spitze wird von jeweils fünf pIII (45 kDa) und pVI (13 kDa) Proteinen gebildet, die am Ende der Assemblierung der Phagen hinzugefügt werden. Diese Proteine sind für die strukturelle Stabilität und die Terminierung der Phagenassemblierung verantwortlich. Beide Proteine liegen auch als Membranproteine in der inneren Membran vor der Phagenassemblierung vor. Das pIII ist weiterhin für die Infektion von *E. coli* und die Adsorption an den F-Pilus entscheidend (Endemann und Model 1995; Rakonjac und Model 1998).

Tabelle 3.1 Proteine und Gene des M13 Bakteriophagen, sowie die Funktion und Position der Phagenproteine, entnommen aus Mai-Prochnow et al. (2015).

| Protein (Gen) | Funktion | Position |
|---------------|---|------------------|
| pI (g1) | Phagenassemblierung, interagiert mit pIV | innere Membran |
| pII (g2) | Endonuklease, essentielle Rolle in der viralen DNA Replikation | Cytoplasma |
| pIII (g3) | Hüllprotein, essentiell für die Adsorption an Wirtszellen und Freisetzung der Phagen | proximale Spitze |
| pIV (g4) | Assemblierung und Export der Phagen, interagiert mit pI und pIV | äußere Membran |
| pV (g5) | ssDNA bindendes Protein, Replikation und Export | Cytoplasma |
| pVI (g6) | Hüllprotein, interagiert mit pIII, essentiell für Freisetzung der Phagen | proximale Spitze |
| pVII (g7) | Hüllprotein, Initiierung des Phagenexports bei Interaktion mit pIX und Packungssignal der ssDNA | distale Spitze |
| pVIII (g8) | Haupthüllprotein, ummantelt ssDNA als eine Art helikales, filamentöses Kapsid | Phagenfilament |
| pIX (g9) | Hüllprotein, Initiierung des Phagenexports bei Interaktion mit pVII und Packungssignal der ssDNA | distale Spitze |
| pX (g2) | Replikation, dsDNA bindendes Protein, verhindert Hydrolyse durch Nukleasen | Cytoplasma |
| pXI (g1) | Phagenassemblierung, interagiert mit pI und pIV als Transmembrankomplex und verhindert Abbau von pI durch Proteasen | innere Membran |

Vermehrungszyklus eines M13 Bakteriophagen

Der Vermehrungszyklus der Ff-Bakteriophagen unterscheidet sich grundsätzlich vom lytischen und temperenten Zyklus von Viren und Bakteriophagen, da die Wirtszellen bei der Freisetzung der Nachkommen nicht lysiert werden. Durch die extrazelluläre Sekretion der M13 Bakteriophagen bleiben die Zellmembran und die Zellwand intakt, und der Wirtsorganismus ist weiterhin teilungsfähig. Lediglich die spezifische Wachstumsrate der Wirtszellen wird durch die höhere metabolische Last durch die Phageninfektion verringert und es kommt zur Freisetzung von Lipopolysacchariden der Zellwand (Brissette und Russel 1990; Karlsson et al. 2005; Roy und Mitra 1970a, 1970b).

Der Vermehrungszyklus von Bakteriophagen kann im Allgemeinen eindeutig in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden: die Adsorption, die Infektion, die Multiplikation und die Freisetzung, dargestellt in Abbildung 3.3 (Sulakvelidze und Kutter 2005).

Bei dem M13 Phagen findet die Adsorption zwischen der Domäne N2 des pIII Proteins und dem F-Pilus von *E. coli* statt. Die Bindung führt nach aktueller Meinung zu spontanen, oszillierenden Dehnungs- und Stauchungszyklen des F-Pilus (Clarke et al. 2008), wodurch der M13 Bakteriophage durch die äußere Membran in den periplasmatischen Raum der Zelle gezogen wird. Auch wenn dieser Prozess noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kommt es anschließend zur Interaktion der Domäne N1 des pIII Proteins mit einem zweiten Rezeptor, dem TolA Protein. Das TolA Membranprotein gehört zum Transmembrankomplex aus TolQRA in *E. coli*, das die äußere und innere Membran verbindet und essentiell für die Infektion mit Ff-Phagen ist (Marvin 1998; Rakonjac et al. 2011; Riechmann und Holliger 1997). Die Interaktion aus TolQRA und der pIII Proteindomänen N1, N2 und C1 ist essentiell für die Aufnahme der ssDNA in das Cytoplasma, obwohl noch kein genaues mechanistisches Modell vorliegt (Bennett und Rakonjac 2006; Click und Webster 1998). Während des Transports der ssDNA über die innere Zellmembran werden die Hüllproteine des Phagen in die innere Membran aufgenommen.

Nach dem Eindringen der als (+)-Strang bezeichneten ssDNA wird zunächst die doppelsträngige, replikative Form (RF) über die Wirtsenzyme RNA, DNA Polymerase und Topoisomerase gebildet (Pratt und Erdahl 1968). Der negative Replikationsursprung formt Strukturen ähnlich zu den -35 und -10 Promotersequenzen, die zur Anlagerung der wirtseigenen RNA Polymerase und der Bildung eines RNA Primers mit definierter Länge führen (Higashitani et al. 1997; Zenkin et al. 2006). Dieser Primer wird von der DNA

Polymerase III von *E. coli* als Start zur Synthese des (-)-Stranges verwendet, wodurch die RF-DNA nach Ligieren der freien Enden entsteht (Rasched und Oberer 1986).

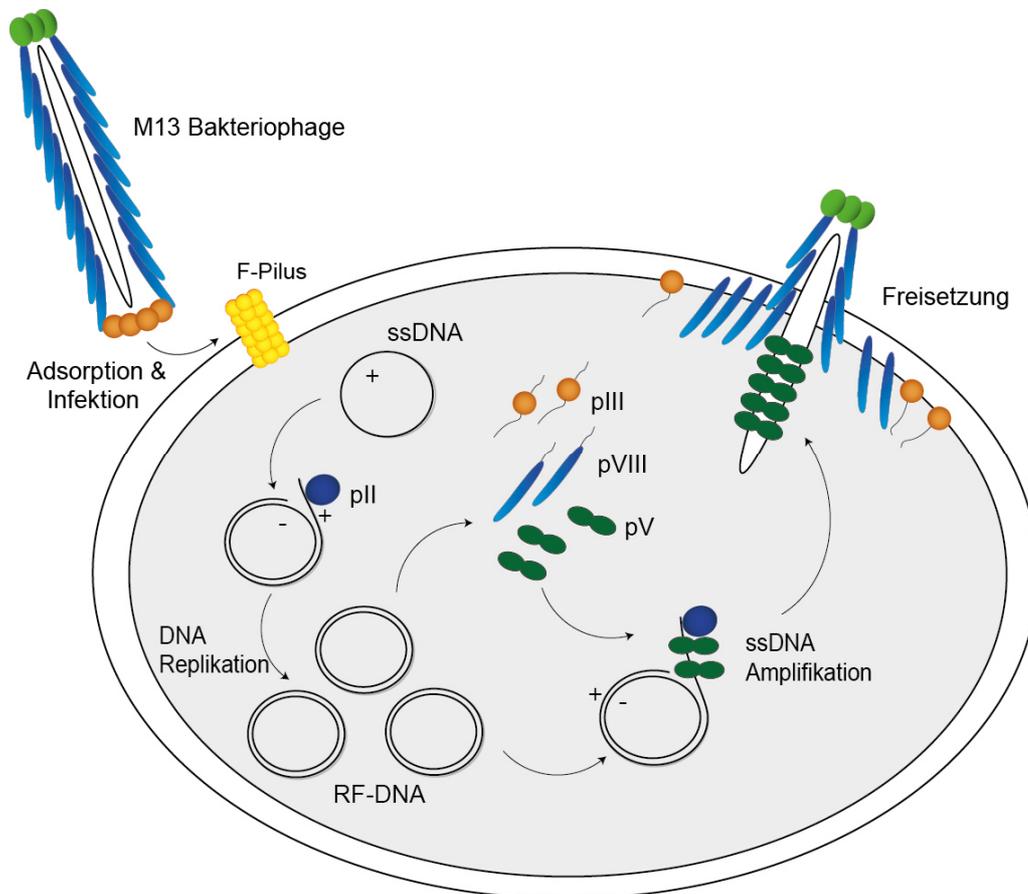


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus des Bakteriophagen M13 in *E. coli*. Dargestellt sind die vier essentiellen Phasen der Adsorption, der Infektion, der intrazellulären Multiplikation und der Freisetzung der Bakteriophagen. Die wichtigsten Phagenproteine pII, pIII, pV und das Haupthüllprotein pVIII sind ebenfalls schematisch dargestellt (vgl. Tabelle 3.1).

Der (+)-Strang der RF-DNA dient anschließend als Vorlage für die Transkription der Phagengene, die entscheiden sind für die folgende Replikation. Die M13 DNA Replikation erfolgt über einen *rolling circle* Mechanismus, der durch das pII Protein des Phagen initiiert wird. Das pII Protein weist eine hohe strang- und sequenzspezifische Endonuklease- sowie Topoisomeraseaktivität auf. Es liegt in 1000 Kopien im Cytoplasma des Bakteriums vor und führt einen Einzelstrangbruch des (+)-Stranges durch und bindet kovalent an das 5' Ende (Asano et al. 1999; Rasched und Oberer 1986). Das freie 3' Ende des (+)-Stranges dient der wirtseigenen DNA Polymerase III als Primer und ein neuer (+)-Strang wird synthetisiert, wodurch der alte (+)-Strang verdrängt wird. Nach einer Runde, bei der der (-)-Strang als Vorlage dient, schneidet das kovalent gebundene pII Proteine die Verbindung zwischen

altem und neuem (+)-Strang und ligiert beide Enden des alten (+)-Stranges. Diese Reaktion wird als Strangtransferase Reaktion bezeichnet (Asano et al. 1999; Rakonjac et al. 2011). In einer frühen Phase der Infektion dient der einzelstränge (+)-Strang als Vorlage zur Synthese neuer RF-DNA bis zu 50-200 Kopien (Hohn et al. 1971; Rakonjac et al. 2011), wodurch die Expression der Phagenproteine beschleunigt wird. Die Anlagerung des ssDNA bindenden pV Proteins an den (+)-Strang verhindert in der späteren Phase der Infektion die Konvertierung in die RF-DNA. Das pV Protein liegt in bis zu 10^5 Kopien im Cytoplasma vor, ermöglicht die intrazelluläre ssDNA Akkumulation und reguliert weiterhin die Expression des pII Proteins (Rasched und Oberer 1986). Der über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen gebildete Komplex aus (+)-Strang und ungefähr 1.500 pV Proteinen ist 800-900 nm lang, mit einem Durchmesser von 8 nm. In einer Zelle liegen mehrere hundert dieser Komplexe vor, die bereits 4 Minuten nach Infektion detektiert werden können (Forsheit et al. 1971; Marvin 1998).

Die Freisetzung erfolgt, indem während die ssDNA über die Zellmembran extrudiert, gleichzeitig die Proteinhülle assembliert wird und es dadurch nicht zur Lyse der Wirtszellen kommt. Die Freisetzung der Bakteriophagen kann in drei Schritten beschrieben werden: Initiation, Elongation und Termination. Zunächst bildet sich ein Komplex aus den Proteinen pI, pXI und pIV. Die Proteine pI und pXI befinden sich in der inneren Membran, wobei das pI Protein über eine ATPase Aktivität verfügt und ATP zur Assemblierung der Phagen hydrolysiert (Feng et al. 1997; Horabin und Webster 1988). Ein Oligomer aus 12-14 pIV Untereinheiten bildet die Pore durch die äußere Membran, mit einem Porendurchmesser von 6-8,8 nm, die aus drei übereinander angeordneten Ringen besteht (Opalka et al. 2003). Die Initiation der Phagenassemblierung erfolgt durch die Interaktion der distalen Hüllproteine pVII und pIX mit einer freiliegenden Haarnadelkurve, dem Packungssignal der ssDNA, im ssDNA/pV Komplex und Thioredoxin (Feng et al. 1999; Russel und Model 1989). Das Packungssignal interagiert weiterhin mit dem membrangebundenen Komplex aus pI, pXI und pIV, worauf die Assemblierung der distalen Spitze startet. Während der Elongation der Phagen, wird die ssDNA über die Zellmembranen durch die gebildete Pore extrudiert. Dabei werden an der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran die ssDNA bindenden pV Proteine abgestreift, und durch die Haupthüllproteine pVIII ersetzt, die sich helikal um die ssDNA anordnen. Die Elongation der Phagenassemblierung wird bis zum Ende der ssDNA durchgeführt. Anschließend wird der membrangebundene Komplex aus den Proteinen pIII und pVI in die proximale Spitze der Phagen eingebaut. Durch eine Konformationsänderung

stabilisiert der Komplex pIII/pVI den M13 Bakteriophagen und lösen ihn von der Zellmembran in den extrazellulären Raum ab (Calendar 2006; Rakonjac et al. 1999). Die ersten neuen Phagen werden unter geeigneten Bedingungen nach 15-20 Minuten sekretiert (Karlsson et al. 2005; Staudenbauer und Hofschneider 1972).

Phagemid und Helferphagen

Zur Produktion von artifizieller ssDNA kann die Kombination aus Phagemid und geeigneten Helferphagen verwendet werden (Lin et al. 2008). Phagemide kombinieren Eigenschaften von filamentösen Bakteriophagen und Plasmiden. Sie stellen Plasmide mit einer hohen Kopienzahl dar, die eine modifizierte Variante des intergenen Bereichs (*intergenic region*) von filamentösen Bakteriophagen tragen. Dieser Bereich codiert für keine Proteine, enthält jedoch alle nötigen Sequenzen für die Initiation und Termination der DNA Synthese und Morphogenese des Bakteriophagen. In die Phagemide kann rekombinante DNA kloniert werden, die sich in Zellen transformiert wie Plasmide vervielfältigen. Kommt es zur Infektion mit einem geeigneten Helferphagen, wird die Phagemid DNA identisch zur Amplifikation im Phagenzyklus vermehrt. Die Endonuklease pII katalysiert einen Einzelstrangbruch im intergenen Bereich des Phagemids, wodurch über *rolling circle* Amplifikation ein Strang der Phagemid DNA vervielfältigt wird, identisch zum Lebenszyklus eines filamentösen Bakteriophagen (Beck und Zink 1981; Dotto et al. 1981a). Diese einzelsträngige Phagemid DNA wird aufgrund des Packungssignals, das ebenso im intergenen Bereich enthalten ist, in neue Bakteriophagen verpackt und ins Medium extrudiert. Dadurch ist die extrazelluläre Produktion der rekombinanten Phagemid DNA möglich (Dente et al. 1983; Dotto et al. 1981b; Levinson et al. 1984).

Zur extrazellulären Bildung der rekombinanten Phagemid DNA sind einige Helferphagen verfügbar, die gentechnisch verändert wurden, um die Ausbeute an einzelsträngiger Phagemid DNA zu maximieren und die gleichzeitige Bildung des Helferphagen zu minimieren. Ein Beispiel hierfür ist der von Vieira und Messing (1987) konstruierte Helferphage M13K07. Dieser Helferphage ist eine Variante des Bakteriophagen M13, der einen Replikationsursprung eines Plasmids, ein Resistenzgen gegen Kanamycin und ein mutiertes Gen 2 aus dem M13mpl Bakteriophagen trägt. Nach Infektion mit dem Helferphagen M13K07 wird die einzelsträngige DNA in die replikative Form prozessiert und die Proteine des Bakteriophagen werden gebildet. Die gentechnisch veränderte

Endonuklease pII (Produkt des mutierten Gen 2) interagiert schwächer mit dem intergenen Bereich der replikativen Form des Helferphagen als mit der des Phagemids. Dadurch wird mehr ssDNA des Phagemids produziert, das anschließend über die Zellmembran extrudiert wird. Unter optimalen Bedingungen wird hierbei ein Verhältnis von 20:1 zu Gunsten der Bakteriophagen erreicht, die die ssDNA des Phagemids tragen (Sambrook et al. 2001).

3.3 Kultivierung von Mikroorganismen

Neben geeigneten Bedingungen, wie Temperatur und pH, ist eine ausreichende Versorgung der heterotrophen Mikroorganismen mit organischen Kohlenstoffverbindungen, Stickstoffverbindungen, Mineralsalzen, Spurenelementen, Vitaminen und Sauerstoff unabdingbar für das Wachstums. Die Versorgung der Zellen, die einen Wasseranteil von 80-90 % besitzen, erfolgt über den gezielten Stoffaustausch mit der flüssigen Phase. Die Beschreibung der Bioprozesse erfolgt mit vereinfachenden Annahmen über mathematische Modelle, die aus der Kombination von Massenbilanzen der verwendeten Prozessführung und formalkinetischer Ansätze bestehen. Die im folgenden Abschnitt verwendeten mathematischen Beschreibungen sind vorwiegend aus Chmiel (2011) und Katoh und Yoshida (2009) entnommen.

3.3.1 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Zur Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen kann ein unsegregiertes und unstrukturiertes Modell verwendet werden. Es wird vereinfachend von keinen Subpopulationen oder heterogenen Zellen (unsegregiert) ausgegangen, die Eigenschaften der Zellen werden als Mittelwerte betrachtet. Weiterhin werden die Zellen vereinfachend ohne unterscheidbare Kompartimentierung (unstrukturiert) angesehen. Zudem wird das Wachstum der Mikroorganismen über die Massenzunahme beschrieben, die unter der Annahme eines mittleren Zellvolumens mit der Zunahme der Zellzahl bei der Vermehrung übereinstimmt (Bergter 1983).

Das Wachstum stellt hierbei eine autokatalytische Reaktion dar, bei der eine direkte Proportionalität zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Biomassekonzentration beobachtet werden kann, gezeigt in Gleichung 3.2.

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad (3.2)$$

| | | |
|-------|-----|---|
| r_X | ... | Wachstumsgeschwindigkeit, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| t | ... | Zeit, h |
| μ | ... | spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |
| c_X | ... | Biomassekonzentration, g L^{-1} |

Daraus ergibt sich folgende Definition der spezifischen Wachstumsrate μ :

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.3)$$

Durch die Integration der Gleichung 3.3 über die Zeit ergibt sich folgende exponentielle Wachstumskinetik in Abhängigkeit der initialen Biomassekonzentration $c_{X,0}$:

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (3.4)$$

| | | |
|-----------|-----|---|
| $c_{X,0}$ | ... | initiale Biomassekonzentration, g L^{-1} |
|-----------|-----|---|

Bei der Verwendung eines synthetischen oder definierten Mediums ist die Zusammensetzung qualitativ und quantitativ definiert. Das Wachstum ist oftmals nur von der Kohlenstoffverbindungen abhängig, die als limitierendes Substrat betrachtet wird. Die anderen, für das Wachstum essentiellen Komponenten wie Stickstoffverbindungen oder Sauerstoff sind dabei im geringen Überschuss vorhanden, ohne inhibierend zu wirken. Monod (1949) beschrieb den formalen Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate und dem limitierenden Substrat, graphisch dargestellt in Abbildung 3.4, der in Analogie zur Adsorptionsisotherme nach Langmuir oder zu der Michaelis-Menten-Kinetik einer Enzymreaktion mit einem Substrat steht.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.5)$$

| | | |
|-------------|-----|--|
| μ_{max} | ... | maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |
| c_S | ... | Substratkonzentration, g L^{-1} |
| K_S | ... | Affinitätskonstante des Substrats, g L^{-1} |

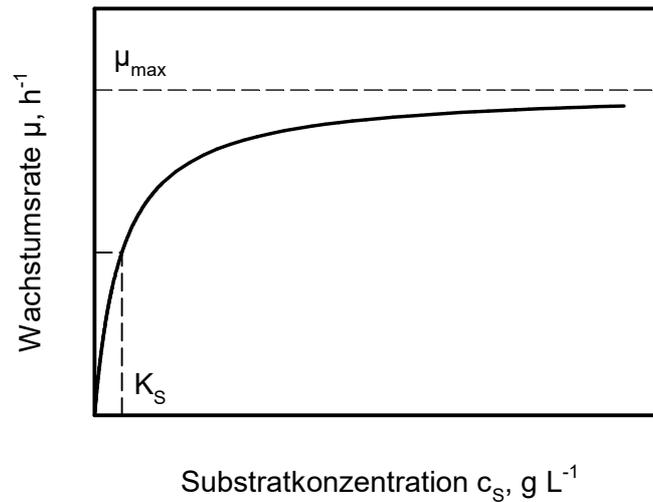


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Sättigungskinetik nach Monod.

Die maximale spezifische Wachstumsrate ist ein Parameter des Monod Modells, die theoretisch bei absolutem Substratüberschuss erreicht wird, wenn alle anderen Mediumkomponenten nicht inhibierend oder limitierend sind. Sie stellt eine wichtige Kenngröße für Mikroorganismen dar. Die Affinitätskonstante des Substrats ist diejenige Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird. Ein niedriger Modellparameter K_S kennzeichnet eine hohe Affinität des Mikroorganismus zum limitierenden Substrat (Schmid 2016).

Analog zur Wachstumsgeschwindigkeit werden die volumetrische und spezifische Substrataufnahmerate (r_S , q_S) und Produktbildungsrate (r_P , q_P) folgendermaßen definiert:

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = q_S \cdot c_X \quad (3.6)$$

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = q_P \cdot c_X \quad (3.7)$$

| | | |
|-------|-----|---|
| 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, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| c_P | ... | Produktkonzentration, g L^{-1} |
| q_P | ... | spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ |

Der Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} setzt die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen mit der Substrataufnahmerate für das Zellwachstum in Beziehung und gibt die gebildete Biomasse pro verbrauchtem Substrat wieder. Entsprechend ist die Produktselektivität Y_{PS} über die Produktbildungsrate und die Substrataufnahmerate definiert.

$$Y_{XS} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu}{q_{S,\mu}} \quad (3.8)$$

$$Y_{PS} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{q_P}{q_S} \quad (3.9)$$

- Y_{XS} ... Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1}
 $q_{S,\mu}$... spezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
 Y_{PS} ... Produktselektivität, g g^{-1}

Die in Gleichung 3.8 dargestellte Beziehung für die spezifische Substrataufnahmerate gilt unter der Annahme, dass ausschließlich Wachstum vorliegt. Wird zusätzlich Substrat für den Erhaltungsstoffwechsel und die Produktbildung benötigt, ergibt sich Gleichung 3.10 für die spezifische Substrataufnahmerate q_S .

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P} = \frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P} \quad (3.10)$$

- m_S ... Substrataufnahmerate des Erhaltungsstoffwechsels, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
 $q_{S,P}$... Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels erweitert sich die Modellvorstellung nach Monod in Gleichung 3.5 um das Produkt aus der Substrataufnahmerate des Erhaltungsstoffwechsels und des Biomasseertragskoeffizienten.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS} \quad (3.11)$$

Die spezifische Produktbildungsrate wird allgemein über die Summe aus wachstumsassoziierter Produktbildung und konstanter Produktbildungsrate definiert und ist in Gleichung 3.12 dargestellt.

$$q_P = \mu \cdot Y_{PX} + k_P \quad (3.12)$$

Y_{PX} ... Produktausbeutekoeffizient, g g^{-1}
 k_P ... konstante Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Dabei können theoretische drei Fälle unterschieden werden. Ist die Produktbildung wachstumsassoziiert, wird sie über das Produkt aus spezifischer Wachstumsrate und dem Produktausbeutekoeffizienten definiert (Schügerl und Bellgardt 2000). Für eine nicht-wachstumsassoziierte Produktbildung ergibt sich die konstante Produktbildungsrate k_P . Der dritte Fall stellt die teilweise wachstumsassoziierte Produktbildung dar, die in Gleichung 3.12 dargestellt ist.

3.3.2 Betriebsweisen mikrobiologischer Prozesse

Die in dieser Arbeit verwendeten Rührkesselreaktoren stellen das wichtigste Reaktionssystem für biotechnologische Produktionsprozesse dar (Weuster-Botz 2006). Als Rührorgane werden vorwiegend radial fördernde Scheibenblattrührer verwendet, die im Grenzfall eine ideale Durchmischung erreichen. Die Hauptaufgaben des Rührkesselreaktors sind das Homogenisieren, das Suspendieren von Feststoffen und das Dispergieren der Gasphase. Weiterhin stellt der Bioreaktor eine Sterilbarriere dar. Zur Bilanzierung von Bioprozessen werden die Eigenschaften eines idealen Rührkesselreaktors angenommen: Die Konzentration aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung und die Reaktionsgeschwindigkeiten sind räumlich konstant. Für ideale Rührkesselreaktoren lässt sich die in Gleichung 3.13 dargestellte allgemeine Massenbilanzgleichung aufstellen:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad (3.13)$$

| | | |
|-------------|-----|---|
| m_i | ... | Masse der Komponente i , g |
| c_i | ... | Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L ⁻¹ |
| F_{ein} | ... | Zulaufvolumenstrom, L h ⁻¹ |
| $c_{i,ein}$ | ... | Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L ⁻¹ |
| F_{aus} | ... | Ablaufvolumenstrom, L h ⁻¹ |
| $c_{i,aus}$ | ... | Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L ⁻¹ |
| r_i | ... | Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , g L ⁻¹ h ⁻¹ |
| V_R | ... | Reaktionsvolumen, L |

Unter der Annahme eines ideal durchmischten Rührkesselreaktors kann die Konzentration der Komponente i im Ablauf und Reaktor gleich gesetzt werden. Weiterhin sollen die Reaktionsgeschwindigkeiten r_i für Substrate negativ, für Biomasse und Produkte positiv definiert sein.

Bei der Betriebsweise von mikrobiologischen Prozessen kann zwischen offenen Systemen (kontinuierliche Prozesse) mit Zu- und Ablauf, halboffenen Systemen (Zulaufprozesse) ohne Ablauf und geschlossenen Systemen (Satzprozesse) unterschieden werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Betriebsweisen sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

Satzprozesse

Satzprozesse werden als geschlossene Systeme ohne Zu- und Ablauf der Flüssigphase durchgeführt. Die Begasung zur Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, die Zugabe von Titrationsmittel zur pH Regelung und die Volumenreduktion durch die Probenahme werden dabei nicht betrachtet. Nach Inokulation des vorgelegten Mediums wird von einem näherungsweise konstanten Reaktionsvolumen ausgegangen. Bei dieser Betriebsweise kann die Massenbilanzgleichung folgendermaßen vereinfacht werden:

$$\frac{d(c_i)}{dt} = r_i \quad (3.14)$$

Unter geeigneten, unlimitierten Bedingungen lassen sich im Satzprozess sechs Wachstumsphasen beschreiben, die in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt sind. Nach Inokulation der Zellen kommt es zunächst zur Adaption der Zellen an die Reaktionsbedingungen (Verzögerungsphase). Anschließend wachsen die Zellen mit steigender Wachstumsrate (Übergangsphase), bis die maximale spezifische Wachstumsrate unter den gewählten Reaktionsbedingungen erreicht wird (exponentielle Wachstumsphase). Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase kommt es zur Reduktion der Wachstumsrate durch die unzureichende Versorgung mit dem limitierenden Substrat (Substratlimitierungsphase) oder zur Inhibierung durch Stoffwechselnebenprodukte. Die exponentielle Wachstumsphase und die Substratlimitierungsphase können über das Monod Modell in Gleichung 3.5 beschrieben werden. In der stationären Phase stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen wachsenden und sterbenden Zellen ein, wodurch die Zellkonzentration konstant bleibt. In der Absterbephase überwiegt die Sterberate und die Zellkonzentration sinkt.

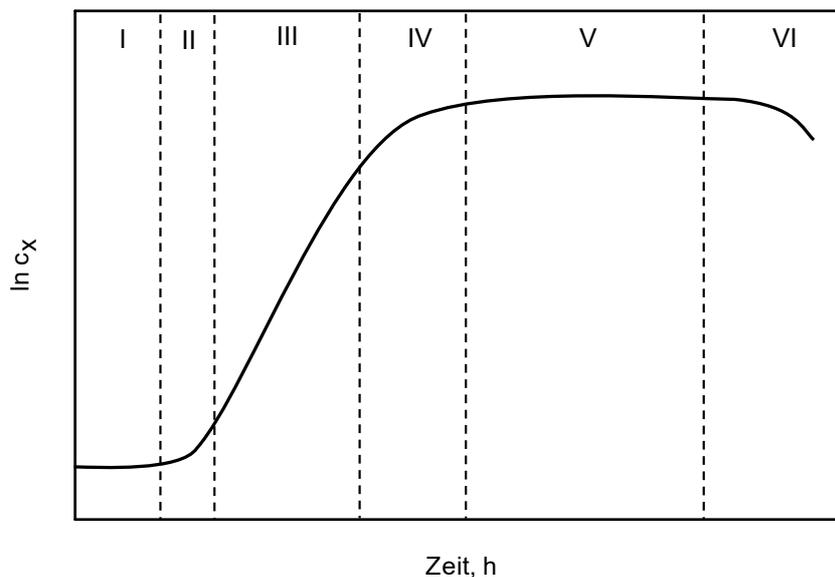


Abbildung 3.5 Wachstumsphase von Mikroorganismen im Satzprozess. Verzögerungsphase (I), Übergangsphase (II), exponentielle Wachstumsphase (III), Substratlimitierungsphase (IV), stationäre Phase (V) und Absterbephase (VI).

Zulaufprozesse

Zulaufprozesse werden als halboffene Systeme betrieben. Nach einer Satzphase wird durch die Dosierung von konzentrierter Substratlösung die Zulaufphase gestartet. Im Gegensatz zum kontinuierlichen Prozess wird auf einen Ablauf verzichtet. Im Vergleich zu Satzprozessen kann durch eine geeignete Zulaufstrategie eine substratlimitierende Versorgung erreicht werden. Dadurch können Inhibierungen und Toxizitäten bei hohen Substratkonzentration sowie Sauerstoffeintragslimitierungen vermieden werden. In Zulaufprozessen können hohe Biomassekonzentrationen und damit einhergehend hohe volumetrische Produktivitäten erreicht werden, weshalb sie industriell häufig Anwendung finden (Hewitt et al. 2000; Weuster-Botz et al. 2007).

Bei Zulaufprozessen nimmt das Reaktionsvolumen über die Prozesszeit zu. Die Massenbilanz in Gleichung 3.13 vereinfacht sich durch den fehlenden Ablaufvolumenstrom folgendermaßen:

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

Im Gegensatz zum Satzprozess muss aufgrund des Anstiegs des Reaktionsvolumens V_R dessen zeitliche Änderung betrachtet werden. Unter Anwendung der Produktregel ist eine getrennte Beschreibung der Zustandsgrößen c_i und V_R möglich.

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

Die zeitliche Änderung des Reaktionsvolumens wird dabei über den Zulaufvolumenstrom F_{ein} beschrieben.

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

Durch Einsetzen der Gleichung 3.17 in 3.16 und Umformung lässt sich die zeitliche Änderung der Reaktionskomponente i folgendermaßen beschreiben:

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

Zulaufprozesse können mit verschiedenen konstanten, linear ansteigenden oder exponentiellen Zulaufstrategien durchgeführt werden. Exponentielle Zulaufstrategien ermöglichen die Einstellung einer konstanten Wachstumsrate während der Zulaufphase. Um dies zu erreichen, kann die Substratkonzentration im Reaktionsmedium auf einen festgelegten Wert geregelt werden. Diese Strategie, die einen komplexen apparativen Aufbau mit *on-line* Messung der Substratkonzentration und einem Regelkreis benötigt, wird unter anderem für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* eingesetzt (Horn et al. 1996). Eine apparativ einfachere Methode ohne Analytik und Regelung ist die Verwendung eines vorgegebenen exponentiellen Zulaufprofils, das die Wachstumsrate auf einen konstanten Wert begrenzt (Korz et al. 1995). Dabei soll die eingestellte Wachstumsrate unter der maximalen Wachstumsrate liegen, um Substratakkumulation und Nebenproduktbildung zu vermeiden (Jenzsch et al. 2006; Riesenberg et al. 1991). In beiden Strategien kann eine zeitlich konstante Substratkonzentration ($dc_S(dt)^{-1} = 0$) angenommen werden und der Zulaufvolumenstrom folgendermaßen berechnet werden:

$$F_{ein} = \frac{-V_R \cdot r_S}{(c_{S,ein} - c_S)} \quad (3.19)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung 3.6 und 3.10 für die Substrataufnahmerate und Vernachlässigung der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel und die Produktbildung erfolgt die Kopplung von Stoffbilanz und Formalkinetik. Die Verwendung einer konzentrierten Substratlösung als Zulaufmedium ermöglicht die Annahmen, dass die Substratkonzentration im Zulauf um ein Vielfaches größer ist als im Reaktor ($c_{S,ein} \gg c_S$) und, dass das Reaktionsvolumen annähernd konstant ist. Dadurch ist die Beschreibung der zeitlichen Änderung der Biomassekonzentration über die exponentielle Wachstumskinetik (Gleichung 3.4) wie im Satzverfahren möglich. Unter der Voraussetzung, dass eine konstante Wachstumsrate eingestellt wird, ist folgende Beschreibung des Zulaufvolumenstroms möglich:

$$F_{ein} = \frac{\mu_{set}}{c_{S,ein} \cdot Y_{XS}} \cdot c_{X,0} \cdot e^{(\mu_{set} \cdot \Delta t)} \cdot V_{R,0} \quad (3.20)$$

μ_{set} ... vorgegebene spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

$V_{R,0}$... initiales Reaktionsvolumen, L

Bei Berücksichtigung der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel und die Produktbildung ergibt sich folgendes Zulaufprofil:

$$F_{ein} = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P} \right) \cdot \frac{c_{X,0} \cdot V_{R,0}}{c_{S,ein}} \cdot e^{(\mu_{set} \cdot \Delta t)} \quad (3.21)$$

Der in Gleichung 3.20 und 3.21 beschriebene Zulaufvolumenstrom ermöglicht ein exponentielles Zulaufprofil mit vorgegebener, konstanter Wachstumsrate. Dieses Zulaufprofil kann aufrechterhalten werden, solange kein weiterer Medienbestandteil wie die Stickstoff- oder Phosphatquelle limitierend sind oder es zur Inhibierung durch Nebenprodukte kommt. Die entscheidende Einflussgröße ist jedoch die maximale Sauerstoffeintragsrate, die bei zu hohen Zulaufvolumenströmen den Sauerstoffbedarf der Zellen nicht mehr decken kann. Aus diesem Grund wird in der Praxis eine Kombination aus exponentiellen und anschließenden linearen, bzw. konstanten Zulaufprofilen verwendet (Chmiel 2011).

Eine wichtige Kenngröße zum Vergleich von Bioprocessen bei unterschiedlichen Betriebsweisen ist die Raum-Zeit-Ausbeute RZA , die für Satz- und Zulaufprozesse folgendermaßen definiert wird:

$$RZA = \frac{\Delta c_P}{\Delta t} \quad (3.22)$$

RZA ... Raum-Zeit-Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Dabei wird die gebildete Produktkonzentration auf die gesamte Prozesszeit bezogen, wodurch der Vergleich von Bioprocessen mit unterschiedlichen Betriebsweisen möglich ist.

Kontinuierliche Prozesse

Kontinuierliche Prozesse sind offene Systeme, bei denen durch einen identischen Zu- und Ablaufvolumenstrom ($F_{ein} = F_{aus} = F$) ein zeitlich konstantes Reaktionsvolumen ($dV_R (dt)^{-1} = 0$) erreicht wird. Dadurch kann ein sogenannter Fließgleichgewichtszustand, oder quasistationärer Zustand erreicht werden, bei dem alle Konzentrationen und Flüsse im Reaktor konstant sind ($dc_i (dt)^{-1} = 0$). Weiterhin ist eine kontinuierliche Produktbildung möglich, bei der im Vergleich zu Satz- und Zulaufverfahren auf Totzeiten durch den regelmäßigen Abbruch und das erneute Anfahren der Prozesse verzichtet werden kann. Die allgemeine Gleichung für die Massenbilanz 3.13 vereinfacht sich im Fließgleichgewichtszustand folgendermaßen:

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

F ... Volumenstrom, $L h^{-1}$

Ein kontinuierlicher Prozess im idealen Rührkesselreaktor ist unter stationären Bedingungen zeit- und ortsunabhängig. Die Konzentration der Komponente i im Reaktor ist identisch zur Konzentration im Ablauf unter der Annahme einer idealen Durchmischung im Rührkesselreaktor.

Das Verhältnis des Volumenstroms zum Reaktionsvolumen wird als Durchflussrate D definiert (Weuster-Botz 1999).

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

D ... Durchflussrate, h^{-1}

Der Kehrwert der Durchflussrate wird im idealen Rührkesselreaktor als hydraulische Verweilzeit τ definiert.

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

τ ... hydraulische Verweilzeit, h

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i lässt sich unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.23 und 3.24 vereinfacht beschreiben.

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

Die Bilanzgleichung der Biomasse für den stationären Zustand lässt sich nun nach Gleichung 3.27 beschreiben, unter der Annahme, dass steriles Zulaufmedium verwendet wird und die Wachstumsgeschwindigkeit eine autokatalytische Reaktion nach Gleichung 3.2 ist.

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

Die in Gleichung 3.27 dargestellte Beziehung ermöglicht zwei Lösungen. Zum einen die triviale Lösung für $c_X = 0$, die unerwünscht ist, da ohne Biokatalysator keine Reaktion stattfindet. Die zweite Lösung mit $\mu = D$ stellt den Fließgleichgewichtszustand dar, bei dem die Wachstumsrate gleich der Durchflussrate ist. Unter Verwendung des Monod Modells und der Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel (Gleichung 3.11) definiert sich die maximale Durchflussrate, bei der die Zellen aus dem Reaktionsraum ausgewaschen werden.

$$D_{max} = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS} \quad (3.28)$$

D_{max} ... maximale Durchflussrate, h^{-1}

Durch die Wahl der Durchflussrate mit $D < D_{max}$ werden stabile Werte für die Biomasse größer Null im Fließgleichgewicht erreicht. Für $D \geq D_{max}$ kommt es zur trivialen Lösung des Auswaschens der Zellen. Die Raum-Zeit-Ausbeute für die kontinuierliche Prozessführung definiert sich im Fließgleichgewichtszustand folgendermaßen:

$$RZA_i = D \cdot c_i \quad (3.29)$$

Die Kopplung von Massenbilanz und Formalkinetik lässt sich für den Fließgleichgewichtszustand bei der kontinuierlichen Kultivierung folgendermaßen übersichtlich zusammenfassen, unter der Berücksichtigung der Gleichungen 3.23, 3.10, 3.11 und 3.12.

$$0 = D \begin{pmatrix} -c_X \\ c_{S,ein} - c_S \\ -c_P \end{pmatrix} + c_X \cdot \begin{pmatrix} \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS} \\ -\left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P}\right) \\ \mu \cdot Y_{PX} + k_P \end{pmatrix} \quad (3.30)$$

In Abbildung 3.6 sind die Biotrockenmassekonzentration, die Substratkonzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute der Zellen für den Fließgleichgewichtszustand über die auf die maximale Wachstumsrate bezogene Durchflussrate schematisch dargestellt. Diese Auftragsform wird als xD -Diagramm bezeichnet.

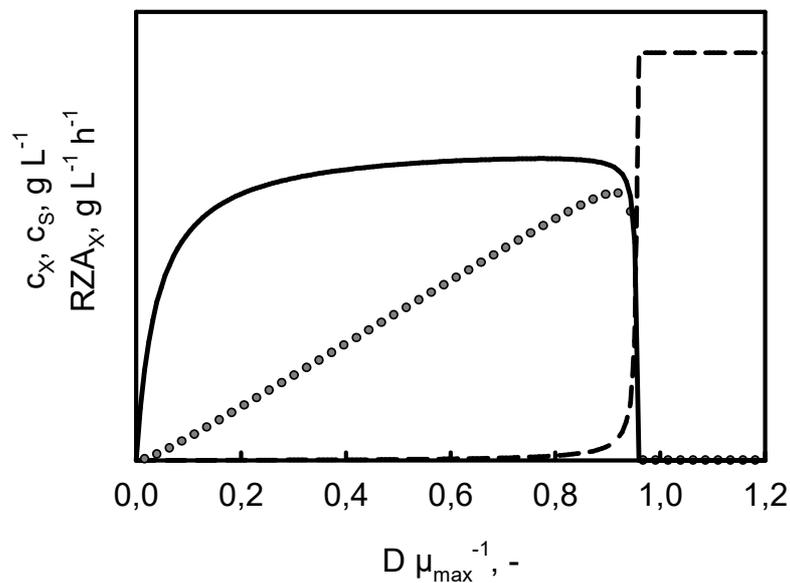


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung des xD -Diagramms für die kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels. Dargestellt ist die Biomassekonzentration (c_X , durchgezogene Linie), Substratkonzentration (c_S , gestrichelte Linie) und die Raum-Zeit-Ausbeute der Zellen (RZA_X , gepunktete Linie) über die Durchflussrate, normiert auf die maximale Wachstumsrate.

Die Biomassekonzentration steigt unter Berücksichtigung der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel mit steigender normierter Durchflussrate bis zu einem Maximum an. Die Annäherung an die maximale Durchflussrate führt zur Reduktion der Biomassekonzentration und dem Anstieg der Substratkonzentration. Die Raum-Zeit-Ausbeute der Zellen erreicht ein Maximum bei der optimalen Durchflussrate D_{opt} , die nach Gleichung 3.31 berechnet wird.

$$D_{opt} = \mu_{max} \cdot \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + c_{S,0}}} \right) \quad (3.31)$$

D_{opt} ... optimale Durchflussrate, h^{-1}

Kontinuierliche Prozesse können als Chemostat betrieben werden, bei dem durch die Vorgabe einer konstanten Durchflussrate die Wachstumsrate der Zellen im Reaktor eingestellt werden kann. Im Bereich zwischen der optimalen Durchflussrate und der maximalen Durchflussrate ist die kontinuierliche Kultivierung sehr sensitiv. Kleine Änderungen in der Durchflussrate führen zu Instabilitäten des Chemostaten in Bezug auf die Biomasse- und Substratkonzentration. Diese Störungen können zum Auslenken des Fließgleichgewichtszustandes und eventuell zum Auswaschen der Zellen führen. Der Chemostat ist aus diesem Grund für die Einstellung eines Fließgleichgewichtszustandes nahe der maximalen Durchflussrate weniger geeignet, wird jedoch aufgrund des einfachen apparativen Aufbaus häufig verwendet. Eine Alternative ist die Prozessführung über einen Auxostaten, bei dem die Konzentration der Komponenten i im Reaktor die Regelgröße ist und über die Durchflussrate als veränderbare Variable geregelt wird. Die Regelgröße muss dabei eindeutig mit der spezifischen Wachstumsrate korrelieren und messtechnisch einfach *on-line* zugänglich sein, wie der pH (pH-Auxostat), die Gelöstsauerstoffkonzentration (DO-stat) oder die Zelldichte (Turbidostat) (Gostomski et al. 1994; Weuster-Botz 1999). Bei der Betriebsweise des Turbidostaten wird die optische Dichte als Maß für die Zellkonzentration verwendet, die über *on-line* Trübungsmessung zur Verfügung steht. Dabei lassen sich stabile Fließgleichgewichtszustände nahe der maximalen Durchflussrate einstellen. Wie in Abbildung 3.6 ersichtlich, ändert sich im substratlimitierten Bereich die Biomassekonzentration kaum, weshalb hierfür der Turbidostat ungeeignet ist. Eine weitere Alternative ist der Nutristat, bei dem die Konzentration des limitierenden Substrats als Regelgröße verwendet wird und damit die Stabilität und Kontrollierbarkeit der

kontinuierlichen Prozessführung sichergestellt ist. Die Herausforderung stellt hierbei die *on-line* Analyse des limitierenden Substrats dar (Agrawal und Lim 1984; Weuster-Botz 1999).

Die Produktbildung kann allgemein formalkinetisch in einen wachstumsassoziierten und einen konstanten Teil aufgespalten werden, beschrieben in Gleichung 3.12. Durch die Kopplung von Massenbilanz und Formalkinetik, dargestellt in Gleichung 3.30, lässt sich die Produktkonzentration im Fließgleichgewichtszustand theoretisch berechnen. Unter der Annahme eines konstanten Produktausbeutekoeffizientens Y_{PX} ist die Produktkonzentration über die Durchflussrate, normiert auf die maximale Wachstumsrate, in Abbildung 3.7 dargestellt.

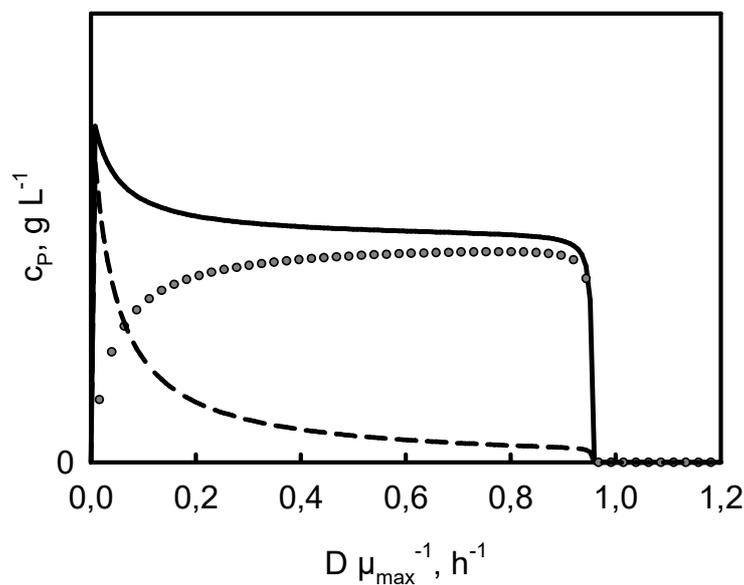


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der wachstumsassoziierten und konstanten Produktbildung bei der kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen. Dargestellt ist die wachstumsassoziierte Produktbildung (gepunktete Linie), die konstante Produktbildung (gestrichelte Linie) und die Summe aus beiden (durchgezogene Linie) über die Durchflussrate, normiert auf die maximale Wachstumsrate.

Eine konstante Produktbildungsrate, unabhängig der Wachstumsrate der Mikroorganismen, führt zu einer abnehmenden Produktkonzentration bei steigender Durchflussrate. Die Raum-Zeit-Ausbeute ist hierbei nur von der Biomassekonzentration abhängig und dementsprechend über einen großen Bereich der eingestellten Durchflussrate konstant. Bei der wachstumsassoziierten Produktbildung zeigt sich der Anstieg der Produktkonzentration mit steigender Durchflussrate. Die Summe zeigt den theoretischen Verlauf der Produktkonzentration bei konstanter und wachstumsassoziierte Produktbildung

mit den gewählten Werten für den Produktausbeutekoeffizienten Y_{PX} und die konstante Produktbildungsrate k_P .

Die in Gleichung 3.25 beschriebene mittlere hydraulische Verweilzeit beschreibt die Verweilzeit eines einzelnen Volumenelements nur im idealen Rohrreaktor ohne Rückvermischung korrekt. Die effektiven Verweilzeiten im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor sind über ein Spektrum von Verweilzeiten verteilt, das mit Hilfe der Verweilzeitssummenkurve $F(t)$ in Gleichung 3.32 beschrieben wird. Die Summenkurve der Verweilzeit $F(t)$ ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Reaktor in Abhängigkeit der Zeit.

$$\tau = \int_0^1 t dF(t) \quad (3.32)$$

$F(t)$... Verweilzeitssummenkurve, -

Die hydraulische Voraussetzung, bis sich in einem kontinuierlich betriebenen idealen Rührkesselreaktor ein Fließgleichgewichtszustand theoretisch einstellt, kann über die Anwendung einer Sprungfunktion und die Verweilzeitssummenkurve betrachtet werden. Bei der Sprungfunktion wird am Eingang des zu untersuchenden Reaktors die Konzentration der Komponente i sprunghaft bei $t=0$ gewechselt. Die Antwort wird am Reaktorausgang gemessen. Die Sprungfunktion und die Verweilzeitssummenkurve sind in Abbildung 3.8 für den kontinuierlich betriebenen, idealen Rührkesselreaktor dargestellt.

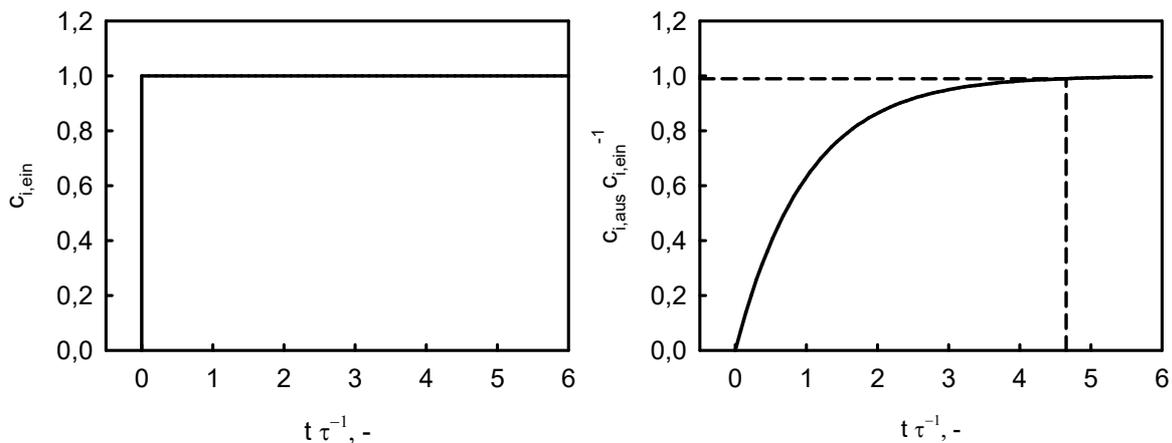


Abbildung 3.8 Verweilzeitssummenkurve für den idealen Rührkesselreaktor. Links: Sprungfunktion der Konzentration einer Komponente im Zulauf. Rechts: Verweilzeitssummenkurve $F(t)$ der gleichen Komponente bei kontinuierlicher Betriebsweise über der auf die Verweilzeit normierten Zeit. Die gestrichelte Linie zeigt den Austausch von 99 % des Mediums nach 4,6 Verweilzeiten.

Mathematisch lässt sich das Verhalten der Konzentration der Komponente i am Ausgang mit der Verweilzeitsummenkurve beschreiben.

$$c_{i,aus} = F(t) \cdot c_{i,ein} \quad (3.33)$$

Für den kontinuierlich betriebenen, idealen Rührkesselreaktor lässt sich die Verweilzeitsummenkurve aus der Massenbilanz im nicht stationären Betrieb berechnen.

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot (c_{i,ein} - c_{i,aus}) + r_i \quad (3.34)$$

r_i ... Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i im Reaktor, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Unter der Annahme, dass die Komponente i , die als Markierungssubstanz eingesetzt wird, chemisch inert ist, kann der Reaktionsterm vernachlässigt werden. Nach Lösen der inhomogenen Differentialgleichung erster Ordnung ergibt sich folgende Beziehung:

$$\frac{c_{i,aus}}{c_{i,ein}} = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} = F(t) \quad (3.35)$$

Der vollständige Austausch des Reaktorvolumens entspricht der hydraulischen Voraussetzung für das Einstellen eines Fließgleichgewichtszustandes. Dies wird lediglich theoretisch bei $F(t) = 1$ erreicht, weshalb in der Praxis als Kriterium $F(t) \geq 0,99$ angenommen wird, das nach 4,6 Verweilzeiten erfüllt ist. Daher werden kontinuierliche Prozesse mindestens 5 Verweilzeiten betrieben, bis von einem vollständigen Fließgleichgewicht ausgegangen werden kann (Baerns 2012).

3.3.3 Rheologisches Verhalten von Biosuspensionen

In vielen Bioprozesse ist ein Anstieg der dynamischen Viskosität über die Zeit zu verzeichnen. Dies kann im Anstieg der Biomassekonzentration, der Änderung der Morphologie der Zellen, der extrazellulären Produktion von Polysacchariden (Xanthan, Pullulan) oder in der Zelllyse und Freisetzung von intrazellulären Makromolekülen wie DNA begründet liegen. Der Anstieg der Viskosität verändert die Hydrodynamik, den Massentransfer zwischen Gas- und Flüssigphase und den Wärmetransport im Reaktor. Im Gegensatz zu Rührkesselreaktoren im Labormaßstab, in denen von annähernd idealen

Bedingungen bezüglich der Durchmischung ausgegangen werden kann, führen nicht newtonsche Fluide in großen Bioreaktoren zu inhomogener Durchmischung und zur Ausbildung von Gradienten. Dies stellt vor allem für die Übertragung von Bioprozessen in industrielle Maßstäbe eine nicht zu vernachlässigende Schwierigkeit dar (McNeil und Harvey 1993; Newton et al. 2016).

Die Viskosität einer Flüssigkeit, bzw. die innere Reibung, kann durch zwei planparallele Platten mit gleicher Fläche A und dem Abstand y , zwischen denen sich eine Flüssigkeit befindet, beschrieben und definiert werden. Die obere Platte bewegt sich mit konstanter Geschwindigkeit v gegen die untere Platte und diese Bewegung führt zu einem linearen Geschwindigkeitsprofil, aufgrund der inneren Kräfte (Reibung) der Flüssigkeitsschichten zueinander. Diese Modellvorstellung ist in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt.

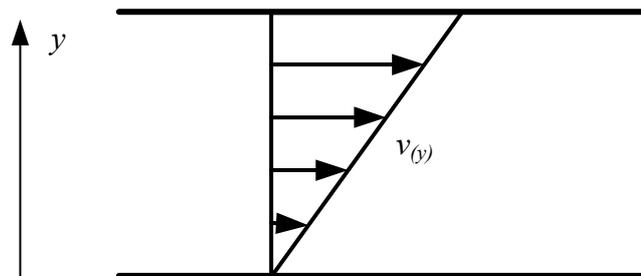


Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der Scherbeanspruchung einer Flüssigkeit zwischen zwei planparallelen Platten.

Unter der Voraussetzung, dass die Flüssigkeit an der Wand haftet und Randeﬀekte vernachlässigbar sind, ergibt sich nahe der oberen Platte eine Geschwindigkeit gleich v , und nahe der unteren Platte gleich null, bei laminarer Strömung. Die zur Verschiebung der Platten notwendige Kraft F pro Flächeneinheit $\tau(\gamma)$ (Schubspannung) ist proportional zur Geschwindigkeitsänderung senkrecht der Verschiebungsrichtung. Der Proportionalitätsfaktor wird als dynamische Viskosität η bezeichnet (Tipler und Gerlich 2004).

$$\tau(\gamma) = \frac{F}{A} = \eta \cdot \frac{dv}{dy} = \eta \cdot \gamma \quad (3.36)$$

| | |
|--------------------|-----------------------------|
| $\tau(\gamma)$... | Schubspannung, Pa |
| η ... | dynamische Viskosität, Pa s |
| γ ... | Scherrate, s^{-1} |

Gilt für ein Fluid die Beziehung, dass der Quotient aus Schubspannung und Scherrate konstant ist, liegt ein newtonsches Fluid beziehungsweise Fließverhalten vor. Die Viskosität kann dabei als Stoffkonstante angesehen werden, die hauptsächlich von der Temperatur abhängig ist. Fluide, bei denen sich die Viskosität mit zunehmender Scherrate ändert, werden als nicht newtonsche Fluide bezeichnet, dargestellt in Abbildung 3.10. Dilatante Fluide, wie beispielsweise Stärkelösungen, zeigen einen Anstieg in der Viskosität mit steigender Scherrate, während bei strukturviskosen Fluiden die Viskosität mit steigender Scherrate sinkt. Biosuspensionen zeichnen sich oftmals durch ein strukturviskoses Fließverhalten aus.

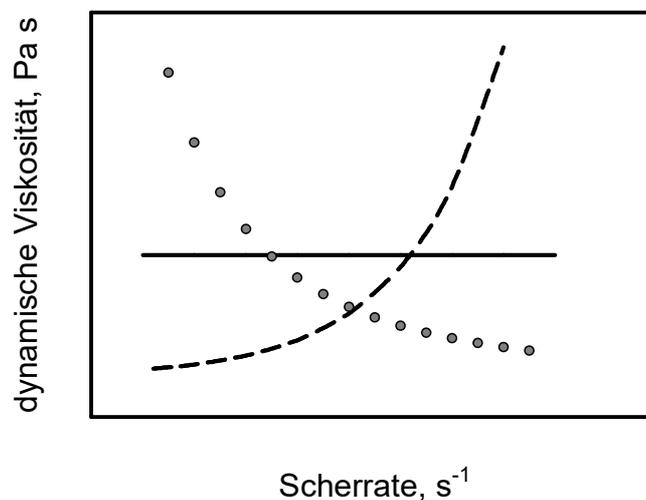


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung des Fließverhaltens verschiedener Fluide. Dargestellt sind das newtonsche (durchgezogene Linie), das strukturviskose (gepunktete Linie) und das dilatante Verhalten (gestrichelte Linie) der dynamischen Viskosität über die Scherrate von verschiedenen Fluiden.

Das rheologische Verhalten von Fluiden lässt sich mit dem modifizierten Carreau-Ansatz in Gleichung 3.37 beschreiben (Henzler 2007).

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{\sqrt{1 + \left(\frac{\gamma^{1/(1-m)} \cdot \eta_0}{K}\right)^2}} + \eta_\infty \quad (3.37)$$

- η_0 ... dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow 0$, Pa s
- η_∞ ... dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow \infty$, Pa s
- m ... Fließindex, -
- K ... Konsistenzindex, Pa s^m

Unter Vernachlässigung der in der Praxis nicht relevanten und messtechnisch schwer darstellbaren Randbereiche vereinfacht sich der Carreau-Ansatz zu folgender Gleichung:

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{m-1} \quad (3.38)$$

Die in Gleichung 3.38 beschriebene mathematische Beziehung wird als Ostwald-de-Waele Gesetz bezeichnet. Für strukturviskose Fluide ergibt sich ein Fließindex kleiner als eins, wohingegen für dilatante Fluide der Fließindex größer als eins ist. Das newtonsche Fluid wird bei einem Fließindex von eins erreicht, bei dem die dynamische Viskosität unabhängig von der Scherrate ist. Fluide können weiterhin noch ein zeitliches und elastisches Verhalten aufweisen, die in dieser Arbeit jedoch nicht betrachtet werden.

Berechnung der effektiven Scherrate

Die zur Festlegung des Strömungszustandes und Leistungscharakteristik wichtige Reynolds-Zahl kann in nicht-newtonschen Fluiden aufgrund der Änderung der Viskosität in Abhängigkeit der Beanspruchung oder Zeit nicht direkt bestimmt werden (Kraume 2005). Bei der Verwendung von strukturviskosen Fluiden muss entsprechend der Beanspruchung eine repräsentative, integrale Scherrate zugeordnet werden und über die Fließfunktion nach Gleichung 3.38 eine effektive Viskosität.

Die Berechnung der effektiven Scherrate beziehungsweise Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}_{eff}$ erfolgt meist über empirische Korrelationen, die sich teilweise stark unterscheiden und für verschiedene Strömungsregime oder Rührer erstellt wurden. Im Folgenden sollen ausgewählte Verfahren dargestellt werden.

Das bekannteste Verfahren wurde bereits 1957 von Metzner/Otto vorgestellt (Metzner und Otto 1957).

$$\gamma_{eff} = k_{MO} \cdot n \quad (3.39)$$

k_{MO} ... Metzner/Otto Konstante, -

n ... Rührerdrehzahl, min^{-1}

Dieses Verfahren ist definitionsgemäß auf den laminaren Strömungsbereich beschränkt, ermöglicht aber auch im Übergangsbereich gute Näherungen. Trotz der Einschränkung auf den laminaren Strömungsbereich, wird diese Methode in vielen Arbeiten für unterschiedliche Rührer eingesetzt. Es wurden Metzner/Otto Konstanten für wandferne Rührer im Bereich von 10-13 bestimmt (Kraume 2005) und Ducla et al. (1983) gibt für Scheibenblattrührer eine Metzner/Otto Konstante von 11,5 an. Dennoch konnte gezeigt werden, dass diese Methode die effektive Schergeschwindigkeit im turbulenten Strömungszustand stark unterschätzt (Campesi et al. 2009; Henzler 2007; Kelly und Gigas 2003; Sánchez Pérez et al. 2006).

Mit Hilfe eines *Computational Fluid Dynamics* (CFD) Modells konnten von Kelly und Gigas (2003) empirische Gleichungen für strukturviskose Fluide bestätigt werden, bei dem neben der Rührerdrehzahl ebenso der Fließindex die Scherrate beeinflusst. Diese Gleichungen wurden für vorwiegend axial fördernde Rührer im Übergangsbereich zwischen laminarer und turbulenter Strömung erstellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Metzner/Otto Gleichung die effektive Schergeschwindigkeit im Übergangsbereich zwischen laminar und turbulenter Strömung unterschätzt.

Die von Sánchez Pérez et al. (2006) beschriebene Gleichung 3.40 ist für 6-Blatt-Scheibenrührern in Rührkesselreaktoren mit der geometrischen Beziehung von Reaktordurchmesser gleich Füllhöhe abgeleitet. Weiterhin entspricht der Reaktordurchmesser dem dreifachen Wert des Rührerdurchmessers. Diese Beziehung gilt zudem für turbulente Strömungen, und unter Berücksichtigung des Konsistenzindex und des Fließindex, auch für strukturviskose Fluide.

$$\gamma_{eff} = \left(\frac{4 \cdot Ne \cdot \rho \cdot d^2}{\pi \cdot 3^3 \cdot K} \right)^{\frac{1}{1+m}} \cdot (n)^{\frac{3}{1+m}} \quad (3.40)$$

| | | |
|--------|-----|---------------------------------------|
| Ne | ... | Newtonzahl $Ne = f(Re, Fr)$, - |
| ρ | ... | Dichte des Fluids, kg m^{-3} |
| d | ... | Durchmesser Rührer, m |
| K | ... | Konsistenzindex, Pa s^m |
| m | ... | Fließindex, - |

Der als Leistungskonzept bezeichnete Ansatz nach Henzler und Kauling stellt dabei nicht ausschließlich eine Beziehung zwischen Scherrate und Rührerdrehzahl dar, sondern bezieht die mittlere Energiedissipation mit ein, dargestellt in Gleichung 3.41 (Kraume 2005).

$$\gamma_{eff} = \left(A^2 \cdot \frac{\varepsilon \rho}{K} \right)^{\frac{1}{m+1}} \quad (3.41)$$

| | | |
|---------------|-----|---|
| ε | ... | mittlere Energiedissipation, $\text{m}^2 \text{s}^{-3}$ |
| A | ... | rührerspezifische Konstante, - |

4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden werden im Folgenden dargestellt. Dabei sind standardmäßig verwendete Materialien und Lösungen im Anhang aufgeführt. Dazu gehören die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und selbst hergestellte Puffer und Lösungen. Außerdem sind im Anhang weitere Informationen und Sicherheitsmaßnahmen zum Arbeiten mit Bakteriophagen beschrieben.

4.1 Medien

4.1.1 *Lysogeny broth* Medium

Im Folgenden wird das für die Vorkultur und zur Stammhaltung von *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-blue MRF' verwendete *Lysogeny broth* (LB) Medium beschrieben. In Tabelle 4.1 ist die Zusammensetzung aufgelistet.

Tabelle 4.1 Zusammensetzung des *Lysogeny broth* Mediums

| Chemikalie | Summenformel | Endkonzentration, g L ⁻¹ |
|-------------------|--------------|-------------------------------------|
| Pepton aus Casein | | 10 |
| Hefeextrakt | | 5 |
| Natriumchlorid | NaCl | 5 |

Die Komponenten für das LB Medium wurden in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst und mit 10 M Kaliumhydroxid auf einen pH von 7,0 eingestellt. Das Medium wurde

20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung von LB-Agar Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g L⁻¹ Agar zugefügt. Die sterile Zugabe von 0,1 % (v/v) Antibiotikum (Kanamycin, Carbencillin, Stammlösung siehe Tabelle A.1) erfolgte bei 50 °C unter der Sicherheitswerkbank. Nach homogener Durchmischung wurden jeweils 25 mL in Petrischalen überführt und unter der Sicherheitswerkbank 20 Minuten ausgehärtet. Anschließend wurden die LB-Agar Platten bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.1.2 M9 Mineralmedium

Bei der Verwendung des *E. coli* Stammes JM 109 wird von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) das chemisch definierte M9 Mineralmedium empfohlen. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.2 aufgelistet. Dabei wurde die Komponente Prolin anders als empfohlen nicht zugegeben, um den Selektionsdruck für das F-Plasmid zu erhalten.

Tabelle 4.2 Zusammensetzung des M9 Mineralmediums

| Chemikalie | Summenformel | Endkonzentration, g L ⁻¹ |
|--|---|-------------------------------------|
| Dinatriumphosphat | Na ₂ HPO ₄ | 6,0 |
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH ₂ PO ₄ | 3,0 |
| Ammoniumchlorid | NH ₄ Cl | 1,0 |
| Natriumchlorid | NaCl | 0,5 |
| Zusätze als sterile Stammlösungen nach dem Autoklavieren zugegeben | | |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat (250 g L ⁻¹) | MgSO ₄ 7 H ₂ O | 0,25 |
| Calciumchlorid (0,1 M) | CaCl ₂ 7 H ₂ O | 0,015 |
| Thiamin-HCl (1 M) | C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₄ S HCl | 0,38 |
| Glucose (500 g L ⁻¹) | C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O | 5 |

Zur einfacheren Handhabung wurde eine Mineralienstammlösung in 10x Konzentration hergestellt, mit 10 M Natronlauge auf einen pH von 7,4 eingestellt und separat autoklaviert (121 °C, 20 min). Zur Herstellung des M9 Mediums für die Vorkultur wurden die Stammlösungen auf die in Tabelle 4.2 beschriebenen Endkonzentrationen hinzugefügt und mit sterilem VE-Wasser aufgefüllt.

Zur Herstellung von M9-Agar Platten wurden der Mineralienlösung 20 g L⁻¹ Agar zugefügt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nach aseptischem Zufügen der restlichen Bestandteile und bei Bedarf Zugabe von Antibiotikum (Kanamycin, Carbencillin, Stammlösung siehe Tabelle A.1) bei 50 °C, wurden jeweils 25 mL in Petrischalen zum Aushärten überführt. Die Lagerung der M9-Agar Platten erfolgte anschließend bei 4 °C.

4.1.3 Riesenberg Mineralmedium

Die Zusammensetzung des für Hochzelldichtekultivierungen entwickelten, definierten Mineralmediums nach Riesenberg et al. (1991) ist in Tabelle 4.3 aufgelistet. Zur einfacheren Handhabung wurde wiederum eine Stammlösung der Spurenelemente in 50x Konzentration erstellt. Dabei wurden die unter Spurenelemente in Tabelle 4.3 aufgelisteten Komponenten in dieser Reihenfolge in VE-Wasser unter Rühren bei einer Temperatur von 60 °C gelöst. Anschließend wurde die Spurenelementlösung für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Die Herstellung der weiteren Stammlösungen ist in Tabelle A.1 aufgelistet. Der pH der Mineralienlösung wurde vor dem Autoklavieren mit 10 M Kaliumhydroxid auf 6,7 eingestellt.

Tabelle 4.3 Zusammensetzung des Mineralmediums nach Riesenberg (pH 6,7)

| Chemikalie | Summenformel | Endkonzentration, g L ⁻¹ |
|--|---|-------------------------------------|
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH ₂ PO ₄ | 13,3 |
| Diammoniumhydrogenphosphat | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 4 |
| Citronensäure | C ₆ H ₈ O ₇ | 1,7 |
| Zusätze als sterile Stammlösungen nach dem Autoklavieren zugegeben | | |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat (250 g L ⁻¹) | MgSO ₄ 7 H ₂ O | 1,2 |
| Glucose (500 g L ⁻¹) | C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O | variabel |
| Thiamin-HCl (1 M) | C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS HCl | 0,38 |
| Spurenelemente (als 50x Stammlösung verwenden) | | |
| Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat | CoCl ₂ 6 H ₂ O | 0,0025 |
| Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat | MnCl ₂ 4 H ₂ O | 0,015 |
| Kupfer(II)chlorid-Dihydrat | CuCl ₂ 2 H ₂ O | 0,0015 |
| Borsäure | H ₃ BO ₃ | 0,003 |
| Dinatriummolybdat-Dihydrat | Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O | 0,0025 |
| Ethylendiamintetraacetat | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ | 0,0084 |
| Zinkacetat-Dihydrat | ZnC ₄ H ₆ O ₄ 2 H ₂ O | 0,008 |
| Eisen(III)citrat | FeC ₆ H ₅ O ₇ | 0,06 |

4.1.4 Zulaufmedium für die Hochzelldichtekultivierung

Für das Zulaufverfahren zur Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* wurde das in Tabelle 4.4 aufgelistete Zulaufmedium verwendet.

Tabelle 4.4 Zusammensetzung des Zulaufmediums für die Hochzelldichtekultivierung

| Chemikalie | Summenformel | Endkonzentration, g L ⁻¹ |
|--|---|-------------------------------------|
| Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 750 |
| Zusätze als sterile Stammlösungen nach dem Autoklavieren zugegeben | | |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat (250 g L ⁻¹) | MgSO ₄ 7*H ₂ O | 20 |
| Diammoniumsulfat (370 g L ⁻¹) | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 18,5 |

Zur Herstellung des Zulaufmediums wurden 825,7 g D-Glucose-Monohydrat in 200 mL VE-Wasser für 20 Minuten bei 121 °C dampfsterilisiert. Unter der Sicherheitswerkbank wurden die zusätzlichen Komponenten Magnesiumsulfat-Heptahydrat (250 g L⁻¹) und Diammoniumsulfat (370 g L⁻¹) aseptisch hinzugefügt und unter Rühren homogenisiert. Das Zulaufmedium wurde bis zur Verwendung für die Zulaufphase der Hochzelldichtekultivierung bei Raumtemperatur gelagert.

4.2 Mikroorganismen und molekularbiologische Arbeiten

4.2.1 Mikroorganismen, Phagemid und Helferphage

Für die Arbeiten mit Bakteriophagen wurden zwei *E. coli* Stämme ausgewählt, die beide das Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) tragen, wodurch die Bildung eines F-Pilus ermöglicht wird. F-Plasmid tragende Stämme fungieren beim horizontalen Gentransfer der Konjugation als Spender. Der F-Pilus ist essentiell für die Infektion der Wirtszellen, da die Bakteriophagen zunächst an den Pilus adsorbieren, bevor die Einzelstrang DNA (ssDNA) in das Cytoplasma injiziert wird. Die Stämme und der Genotyp sind in Tabelle 4.5 beschrieben. Beide Stämme können für Klonierungsexperimente eingesetzt werden, da sie durch verschiedene Mutationen den Verdau von fremder DNA oder eine ungewünschte Rekombination verhindern. Dabei sind vor allem die Mutation der nicht spezifischen Endonuclease I (*endA1*) und einer Rekombinase (*recA1*) nennenswert. Aus diesen Gründen sind sie ebenfalls für die Arbeiten mit Bakteriophagen M13 geeignet. Beide haben eine Deletion in der Thiaminsynthese (*thi-1*), daher wurde für die Kultivierung in definiertem Medium Thiamin zugesetzt.

Tabelle 4.5 Verwendete Mikroorganismen

| Stamm | Genotyp |
|--|---|
| <i>E. coli</i> XL1-blue MRF ⁺ | $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1}$ $recA1 \text{ gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn5 (Kan}^r\text{)]}$ |
| <i>E. coli</i> JM 109 | $recA1 \text{ endA1 gyr96A thi-1 hsdR17 supE44 relA1 } \lambda \Delta(lac-$ $proAB) (F' traD36 proAB laqI^qZ \Delta M15)$ |

Der *E. coli* Stamm XL1-blue codiert Gene für eine Kanamycinresistenz auf dem F-Plasmid. Aus diesem Grund wurde bei der Kultivierung von *E. coli* XL1-blue der Selektionsdruck mittels Kanamycin benötigt, um den Verlust des F-Plasmids zu verhindern. Der *E. coli* Stamm JM 109 weist eine chromosomale Deletion ($\Delta(lac-proAB)$) auf, wodurch der Stamm auxotroph bezüglich Prolin ist. Diese Auxotrophie wird durch das F-Plasmid kompensiert. Zur Aufrechthaltung eines Selektionsdrucks, der den Verlust des F-Plasmids verhindert, ist die Kultivierung in definierten Mineralmedien notwendig.

Für die Stammhaltung wurde zunächst ein Einzelkolonieausstrich auf den jeweiligen Agarplatten (JM 109, M9-Agar; XL1-blue, LB-Agar Kan⁺) durchgeführt. Eine Kolonie wurde gepickt, anschließend in 5 mL des jeweiligen Mediums in sterilen Vorkulturröhrchen überführt und für 12-16 Stunden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde 1 mL in 20 mL LB-Medium (Tabelle 4.1) in einem 250 mL Schüttelkolben überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Schüttelinkubator ohne Selektionsdruck kultiviert (37 °C, 250 rpm). Die Zellsuspension wurde anschließend im Verhältnis 4:1 mit 60 % (w/v) Glycerin (Endkonzentration 15 %) gemischt und in 1 mL Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Produktion von artifizieller ssDNA wurde vom Projektpartner des Lehrstuhls für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München das Phagemid pBSG74 zur Verfügung gestellt, das auf dem kommerziell erhältlichen Vektor pBlueScript II (SK+) (Stratagene, San Diego, USA) basiert. Die intergene Region ist dem filamentösen Bakteriophagen ϕ 1 entnommen und M13K07 stellt einen geeigneten Helferphagen für die extrazelluläre ssDNA Produktion des Phagemids dar (Short et al. 1988). Das Phagemid pBSG74 (6813 bp) trägt lediglich ein Resistenzgen gegen Carbenicillin, den intergenen Bereich und artifizielle DNA. Diese artifizielle DNA enthält weiterhin zinkabhängige, selbstschneidende DNAszyme, die die Hydrolyse der produzierten

ssDNA ermöglicht. Der Helferphage M13K07 wurde kommerziell als Phagenstammlösung erworben (New England Biolabs®, Ipswich, USA) und identisch zum M13mp18 Bakteriophagen vermehrt.

4.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die für die Transformation benötigten chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen wurden für beide Stämme folgendermaßen hergestellt. Es wurde eine 5 mL Vorkultur mit einer einzelnen Kolonie im entsprechenden Medium (JM 109, M9 Medium; XL1-blue, LB-Medium) mit Selektionsdruck angeimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. 50 mL LB-Medium ohne Zugabe von Antibiotikum wurden mit 2 % (v/v) der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,3-0,6 in einem Schüttelkolben ohne Schikanen (500 mL) kultiviert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 3.260 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL CaCl₂ (0,1 M, 4 °C, steril) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 3.260 rcf, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 5 mL 0,1 M CaCl₂ mit 20 % (w/v) Glycerin (4 °C, steril) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden aliquotiert (90 µL) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Transformation

Die genomische ssDNA der Bakteriophagen M13mp18 und der Längensvarianten mit 7560 und 8064 Basen (Douglas et al. 2009) wurde von den Kooperationspartnern des Lehrstuhls für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München in einer Konzentration von 100 nM zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der ssDNA erfolgte bei -20 °C. Zur Herstellung von Bakteriophagen wurden chemisch-kompetente *E. coli* XL1-blue Zellen mit der ssDNA transformiert, wodurch der Phagenzyklus intrazellulär beginnt und neue Bakteriophagen gebildet werden. Dafür wurden chemisch-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µL der ssDNA (100 nM) hinzu pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und anschließender

Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 300 μL LB-Medium ohne Selektionsdruck wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Der Ansatz wurde in sterilem LB-Medium um die Faktoren 1, 5 und 10 verdünnt und es wurden jeweils 200 μL der Verdünnungen auf den LB-Agar Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Nach der Inkubation für 24-48 Stunden bei 37 °C waren einzelne Plaques im Bakterienrasen zu erkennen.

Zur Transformation der *E. coli* JM 109 Zellen mit dem auf dem pBluescript II Vektor basierenden Phagemid pBSG74, das am Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München erstellt wurde, wurde folgendes Protokoll verwendet. Es wurde 1 μL Phagemid DNA (100 ng μL^{-1}) zu 90 μL chemisch-kompetenten *E. coli* JM 109 Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 60 Sekunden. Nach 2 Minuten auf Eis wurden 500 μL LB-Medium ohne Antibiotikum hinzu gegeben und die Zellen wurden für 60 Minuten bei 300 rpm inkubiert. Nach der Zentrifugation für 3 Minuten (1700 rcf, 20 °C) wurden 300 μL des Überstands verworfen. Die Zellen wurden in dem verbleibenden Überstand resuspendiert und 200 μL wurden auf LB-Agar Platten mit Carbenicillin ausgestrichen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C waren transformierte Zellen als Kolonien erkennbar.

4.3 Verwendete Reaktorsysteme

4.3.1 Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Die Verwendung eines Rührkesselreaktors zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* erfüllt die Aufgaben Homogenisieren, Supendieren und Dispergieren. Nach Rutherford et al. (1996) beeinflusst die Positionierung der Scheibenblattrührer die Ausbildung eines parallelen Strömungsbildes, bei dem die einzelnen Scheibenblattrührer unabhängig voneinander das charakteristische, radiale Strömungsbild ausbilden. Um diesen Zustand zu erreichen, müssen folgende geometrische Abstände und Voraussetzungen im Rührkesselreaktor eingehalten werden:

$$h_1 > 0,2 D \quad (4.1)$$

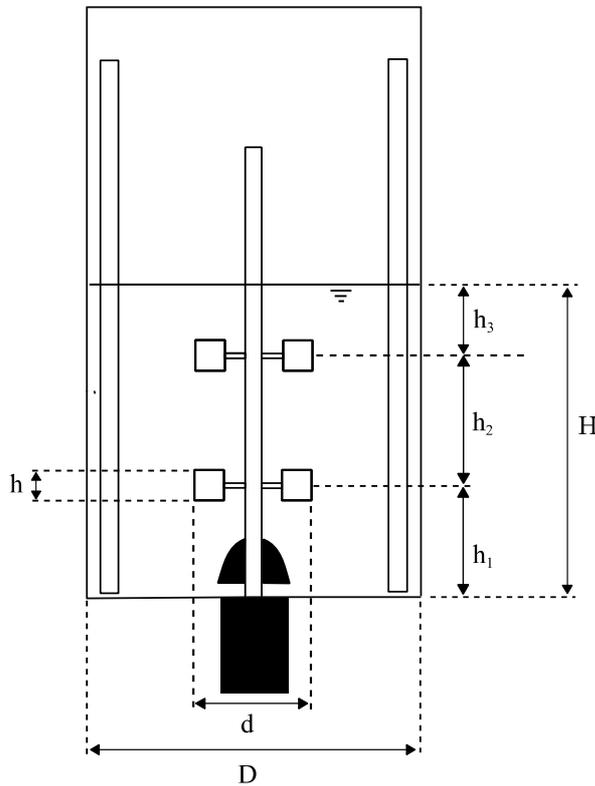
$$h_2 > 0,385 D \quad (4.2)$$

$$h_3 < 0,415 D \quad (4.3)$$

$$H = D \quad (4.4)$$

In Abbildung 4.1 ist der verwendete Rührkesselreaktor schematisch abgebildet. Hier sind die in den Gleichungen 4.1-4.4 verwendeten geometrischen Größen eingezeichnet. Als minimales Startvolumen für einen Kultivierungsprozess wurden 1,6 L, bzw. eine Füllhöhe (H) von 131 mm gewählt. Dadurch wurde das, in Gleichung 4.4 verlangte, Höhe zu Durchmesser Verhältnis von 1 annähernd erreicht. Mit der dargestellten Positionierung der Scheibenblattrührer lassen sich auch alle Anforderungen unter Gleichung 4.1-4.3 erfüllen. Der Abstand h_3 wurde dabei möglichst klein gewählt, um im späteren Zulaufprozess bei Erhöhung des Reaktionsvolumens die Durchmischung im oberen Bereich des Reaktors zu gewährleisten.

Für die Kultivierungen im Litermaßstab wurde der in-situ sterilisierbare Kleinlaborfermenter (KLF 3.6, W30522, 2013) der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz) verwendet. Der Rührkesselreaktor verfügt über ein maximales Arbeitsvolumen von 2,5 L, bei einem Nominalvolumen von 3,6 L und einem maximalen Systemdruck von 2,5 bar. Der zylindrische Glaskörper wird von zwei planaren Edelstahlplatten als Boden und Deckel über O-Ring Dichtungen abgeschlossen. Die Rührwelle des Rührkesselreaktors ist von unten über zwei Gleitringdichtungen als Sterilbarriere eingefügt, an der zwei 6-Blatt-Scheibenrührer angebracht sind. Die geometrischen Abmessungen der verwendeten Scheibenblattrührer und die Positionierung im Rührkesselreaktor sind ebenfalls in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Rührwelle wird von einem unter dem Rührkesselreaktor montierten Elektromotor (250 W) stufenlos angetrieben.



| Komponente | Abmessung, mm |
|------------|---------------|
| D | 125 |
| d | 48 |
| H | 131 |
| h | 12 |
| h1 | 50 |
| h2 | 66 |
| h3 | 15 |

Abbildung 4.1 Schematische Abbildung des Rührkesselreaktors und Positionierung der Scheibenblattrührer.

Der Rührkesselreaktor wurde grundsätzlich mit 4 senkrechten Strömungsbrechern als Bewehrung betrieben, damit ein turbulentes Strömungsbild erreicht wird. An den Strömungsbrechern war das Begasungsrohr befestigt, welches unterhalb der Rührblätter als Begasungsring die Gasphase in die Flüssigphase eintrug. Die Prozessluft wurde mit einem Vordruck von 2,5 bar über einen Keramikfilter geleitet und über das ringförmige Begasungsrohr in Bodennähe in die Flüssigphase dispergiert. Der Volumenstrom wurde dabei manuell über einen Schwebekörper-Durchflussmesser eingestellt. Die Abluft wurde zunächst über einen im Deckel eingebauten Abluftkondensator und einen weiteren Keramikfilter geleitet. Da in der Abluft theoretisch Phagenpartikel als Aerosole enthalten sein können, wurde diese abschließend durch eine Waschflasche befüllt mit 0,02 % (v/v) Formaldehyd, das in dem Flächendesinfektionsmittel Pursept FD enthalten ist, geleitet und von der Sonderabluft abgezogen. Über die Edelstahl Bodenplatte sind der Heizstab (800 W), der Kühlstab, das Erntesystem und der Temperaturfühler (pt100) eingebracht. Über den Reaktordeckel können die Sonden für die *on-line* Messung des pH und die amperometrische pO_2 -Sonde zur Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration eingebaut werden. Weiterhin wurde eine Antischaum Sonde in den Kopfraum des Rührkesselreaktors eingebaut, um die

Zugabe von Antischaum zu regeln. Zur Kontrolle des Systemdrucks wurde ein Manometer über dem Deckel angebracht und ein mechanisches Sicherheitsventil, das sich bei der Überschreitung eines Systemdrucks von 2,5 bar öffnet. In den Deckel konnten zudem über Septen aseptische Zuführungen von Säure, Base, Antischaum, Zulaufmedium und zusätzlichen Medienkomponenten eingebaut werden. Über ein weiteres Septum konnten nach der Sterilisation temperatursensitive Medienkomponenten, das Inokulum und die Bakteriophagen aseptisch über Spritzen und Kanülen zugegeben werden. Zur Probenahme wurde das am Lehrstuhl entwickelte Probenahmesystem (Schnellprobenahmesystem ohne Totvolumen, Prototyp, Patent DE 102005049226, 2 mag AG) verwendet, das ebenfalls über den Reaktordeckel eingebaut wurde. Die Verwendung dieses Systems ermöglichte die Probenahme ohne Totvolumen in sterile Milliliterreaktionsgefäße (Vacutainer). Über 3 Peristaltikpumpen konnten die Titrationsmittel Säure, Base und der Antischaum nach Bedarf bei konstanter Drehzahl zugegeben werden. Eine weitere Peristaltikpumpe mit variabler Drehzahl wurde für die Dosierung des Zulaufmediums verwendet.

Mit dem Programm BioScada der Firma Bioengineering konnte der Reaktor über die Steuereinheit betrieben werden. Die Software ermöglichte die Kontrolle der Prozessparameter Rührerdrehzahl, Temperatur, Sauerstoffsättigung, pH, Zuluft und Antischaumdosierung. Dabei wurde der pH über das Ansteuern der Säure- und Basepumpe geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde während der Kultivierung über eine pO_2 -Kaskade geregelt, bei der in Abhängigkeit der gewählten PID-Parameter und der Auslenkung um den Sollwert ein Regelausgang ermittelt wurde, der die Rührerdrehzahl steuerte. In der pO_2 -Kaskade war über den Regelausgang ein individuell definierbares Profil der Rührerdrehzahl hinterlegt. Der exponentielle Zulauf wurde als Profil für die Peristaltikpumpe mit variabler Drehzahl hinterlegt. Neben der Kontrolle der Prozessparameter wurden ebenso die gemessenen Daten und Bearbeitungsprotokolle aufgezeichnet.

Zur Dampfsterilisation wurde das in Tabelle 4.3 beschriebene Minimalmedium nach Riesenberg verwendet, wobei lediglich die Mineralienlösung im Rührkesselreaktor autoklaviert wurde. Vor dem Autoklavieren wurde eine Zweipunktkalibrierung der pH-Elektrode mit Pufferlösungen bei pH 4 und pH 7 bei Raumtemperatur durchgeführt. Weiterhin wurde bei jeder zweiten Kultivierung oder nach längeren Standzeiten von über 2 Wochen die Elektrolytlösung der amperometrischen Gelöstsauerstoffsonde gewechselt und der Membrankorb optisch überprüft. Nach dem Einbau aller für die Kultivierung nötigen

Komponenten und dem Einfüllen der Mineralienlösung wurde das Temperaturprofil zur Sterilisation für 20 Minuten bei 121 °C gestartet. Das Temperaturprofil steigt zunächst bis auf 96 °C an, bevor das Abluftventil manuell geschlossen werden muss. Die Temperatur steigt im Anschluss auf 121 °C, bei einem Systemdruck zwischen 2,0-2,2 bar und wird für 20 Minuten gehalten. Beim Erreichen der 121 °C wird das Abluftventil manuell leicht geöffnet, um einen Schleichdampf über den Abluftkondensator, Abluftfilter und die weitere Abluftstrecke einzustellen. Beim Abkühlen des Reaktionsmediums unter 100 °C wird durch den aseptischen Anschluss der Zuluftstrecke und einer Begasung mit niedrigem Volumenstrom von 50 NL h⁻¹ die Bildung von Unterdruck im Reaktor vermieden. Nach dem Abkühlen auf 40 °C ist die Schrittkette der Sterilisation beendet und der Reaktor wird bei niedriger Drehzahl und Temperatur (200 rpm, 25 °C) über nach steril betrieben, um die Polarisation der Gelöstsauerstoffsonde zu ermöglichen.

Die restlichen Medienbestandteile wurden aseptisch über das Septum zugegeben und der pH auf 6,7 über die angeschlossene Ammoniumlösung (25 %) einseitig geregelt. Die Zweipunktkalibrierung der Gelöstsauerstoffsonde erfolgte bei 800 rpm und 37 °C mit allen Medienbestandteilen mit 50 NL h⁻¹ von 100 % Stickstoff als Tiefpunkt und 200 NL h⁻¹ Druckluftbegasung mit 20,95 % Sauerstoff als Hochpunkt. Als Prozessbedingungen wurde der pH auf 6,7 einseitig mit Ammoniumlösung, die Temperatur auf 37 °C und die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 25 % über die pO₂-Kaskade geregelt. Die Begasungsrate war konstant bei 200 NL h⁻¹. Zur Erhöhung der Sauerstoffeintragsrate wurde der Systemdruck bei Bedarf manuell erhöht. Die Zugabe der Antischaumdispersion wurde über die Antischaumsonde geregelt, die in den Kopfraum des Reaktors eingebaut war.

4.3.2 Miniaturisierte Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab

Zur kontinuierlichen Kultivierung im Millilitermaßstab wurden die parallelen miniaturisierten Rührkesselreaktoren des bioREACTOR 48 (2mag AG, München, Deutschland) verwendet. Die Einweg-Rührkesselreaktoren werden aus Polystyrol mit vier Strömungsbrechern gefertigt und verfügen über ein Arbeitsvolumen zwischen 8-12 mL. Weiterhin sind in den Boden der Rührkesselreaktoren fluorometrische Sensorfilme für die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) eingebracht, die über spezielle Sensorriegel nach der

Dual-Lifetime-Referencing (DLR) Methode ausgelesen werden (Janzen et al. 2015; Kusterer et al. 2008).

Im bioREACTOR 48 können 48 Rührkesselreaktoren parallel betrieben werden, wobei in dieser Arbeit grundsätzlich die gasinduzierenden Rührer verwendet wurden, die auf einer Hohlachse gelagert sind. Die 48 Hohlachsen sind über Steckverbindungen im Deckel angebracht, der zugleich als Sterilgasabdeckung fungiert, dargestellt in Abbildung 4.2. Die im gasinduzierenden Rührer integrierten Dauermagneten ermöglichen einen magnetisch-induktiv Antrieb über den Elektromagneten des bioREACTOR 48. Durch die Drehbewegung werden Reaktormedium vom Reaktorboden und Gas aus dem Kopfraum über die Hohlachse angesaugt und im Reaktionsmedium dispergiert. Dabei können für aerobe Prozesse hohe Sauerstofftransferraten mit einem maximalen k_{La} von $0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht werden (Puskeiler, 2015a). Sterile Prozessluft, die beim Durchströmen von einem Liter sterilen VE-Wasser gesättigt wurde, wird über die Sterilgasabdeckung in den Kopfraum der Rührkesselreaktoren geleitet und entweicht über die Öffnungen für Pipettiernadeln. Durch einen hohen Gasvolumenstrom werden Kontaminationen über diese Öffnungen vermieden. Weiterhin wird auf die Sterilgasabdeckung noch eine Abgaseinheit mit 48 Öffnungen für die Pipettiernadeln angebracht, die über eine Vakuumpumpe betrieben wird und welche die Abluft der Reaktoren in die Sonderabluft leitet. Die Temperierung der Rührkesselreaktoren erfolgt über Wärmetauscher des bioREACTOR48 mit einem externen Wasserbad. Um Verdunstung zu minimieren, wird der Kopfraum der miniaturisierten Rührkesselreaktoren ebenfalls über einen Wärmetauscher mit externem Wasserbad gekühlt.

Für die kontinuierliche Prozessführung wurden zwei Winkelrohre für den Zu- und Ablauf über einen neu konstruierten Polyetheretherketon Aufsatz in die Rührkesselreaktoren eingefügt, dargestellt in Abbildung 4.2. Der Aufsatz ermöglicht die Verwendung von bis zu drei gebogenen Winkelrohren bei gleichzeitiger Versorgung mit Titrationsmittel und Probenahme aus den Rührkesselreaktoren über die Pipettiernadel des Laborroboters. Das Winkelrohr für den Zulauf taucht dabei 1 cm in das Reaktionsmedium ein und ermöglicht dadurch eine tropfenfreie Versorgung mit sterilem Medium am Auslass des Winkelrohrs, auch bei niedrigen Volumenströmen. Für den Ablauf wird das Winkelrohr auf einer definierten Höhe fixiert, wodurch ein konstantes Volumen von 10 mL im Rührkesselreaktor bei 3000 min^{-1} erreicht wurde.

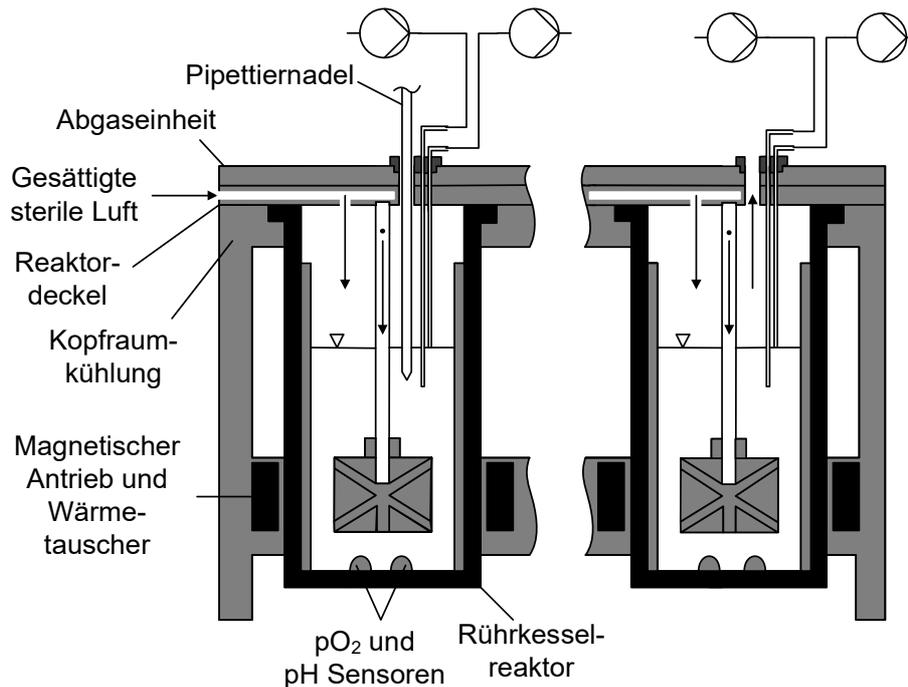


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der parallelen miniaturisierten Rührkesselreaktoren. Dargestellt sind zwei Rührkesselreaktoren, die für die kontinuierliche Prozessführung um zwei Winkelrohre erweitert wurden (modifiziert nach Schmideder et al. (2015)).

Der Zulauf wurde über eine Peristaltikpumpe mit acht individuell steuerbaren Pumpenköpfen (Mehrkanalschlauchpumpe MP8, DASGIP, Jülich, Deutschland) und über Pumpenschläuche (Maprene Schläuche mit 0,25 mm Innendurchmesser, Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland) gefördert. Die Winkelrohre und die verwendeten Schläuche besitzen einen Innendurchmesser von 0,25 mm, wodurch auch bei niedrigen Volumenströmen von 1 mL h^{-1} eine hohe Leerrohrgeschwindigkeit von $1,4 \text{ mm s}^{-1}$ erreicht und ein Zurückwachsen der Zellen aus dem Reaktor in die Vorlageflasche verhindert wird. Die abführenden Pumpschläuche wurden mit zwei Peristaltikpumpen (4x Mehrkanalschlauchpumpe Reglo ICC, Cole-Palmer, Wertheim, Deutschland) bei höherer Förderrate betrieben. Mit diesem Aufbau war eine vollständige kontinuierliche Betriebsweise der miniaturisierten Rührkesselreaktoren möglich.

Die miniaturisierten Rührkesselreaktoren können durch einen Laborroboter vollautomatisiert mit Titrationsmittel, Zulaufmedium und/oder Induktionslösung versorgt werden. Weiterhin ist eine automatisierte Probenahme über den Laborroboter möglich. Für die Kultivierung mit dem Bakteriophagen M13 konnte dieser Laborroboter aufgrund der Kontaminationsgefahr für andere Bioprozesse jedoch nicht verwendet werden, da die Pipettiernadeln nicht autoklaviert werden können. Aus diesem Grund wurde ein weiteres

Winkelrohr für die intermittierende Zugabe der 6,25 (v/v) Ammoniumlösung eingebaut und über Maprene-Schläuche mit einer weiteren Peristaltikpumpe mit 8 individuell steuerbaren Pumpenköpfen (Mehrkanalschlauchpumpe MP8, DASGIP, Jülich, Deutschland) das Titrationsmittel gefördert.

4.4 Kultivierung von *Escherichia coli* mit Bakteriophagen M13

4.4.1 Herstellung der Stammlösung an Bakteriophagen

Die Herstellung der Bakteriophagenstammlösung wurde in Satzprozessen im Schüttelkolben mit *E. coli* XL1-blue durchgeführt. Hierfür wurden in einem 500 mL Schüttelkolben ohne Schikane 50 mL LB-Medium (vgl. Tabelle 4.1) mit Kanamycin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit 2 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-blue aseptisch angeimpft und bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) wurde mit einem Plaque, aus der zuvor wie unter Kapitel 4.2.2 beschriebenen Transformation, infiziert. Nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 3.260 rcf bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Der Phagentiter im Überstand wurde über den Plaque Test quantifiziert. Als Qualitätskontrolle wurden 1,5 mL gereinigt und über das Migrationsverhalten bei der Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.6.5) analysiert.

Für die unter Kapitel 6.3.4 beschriebene Variation der Multiplizität der Infektion waren zudem Bakteriophagenstammlösungen mit höherem Phagentiter notwendig. Aus diesem Grund wurden aus einer Zulaufkultivierung 6 Stunden nach Infektion mit Bakteriophagen 50 mL Probe entnommen und bei 3.260 rcf für 30 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend mit der 6x Lösung von sterilfiltriertem ($0,2 \mu\text{m}$) Polyethylenglykol 8.000 (PEG 8.000) und NaCl (vgl. Tabelle A.1) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Die präzipitierten Bakteriophagen wurden für 10 Minuten bei 3.260 rcf zentrifugiert und in sterilem Riesenbergmedium (vgl. Tabelle 4.3) resuspendiert. Der Phagentiter wurde über den Plaque Test bestimmt, die Qualität der isolierten ssDNA über Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.6.5) verifiziert.

4.4.2 Satzkultivierung

Zur Vorkulturherstellung für die Satzkultivierung von *E. coli* XL1-blue (JM 109) im Rührkesselreaktor wurden als erste Stufe 20 mL LB-Medium (M9-Medium) mit 200 μL der jeweiligen Stammkultur ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) inokuliert und für 8 Stunden (12-14 Stunden) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm in einem 250 mL Schüttelkolben inkubiert. Für die Kultivierung von *E. coli* XL1-blue wurde allen Vorkulturen $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin zugefügt. Als zweite Stufe wurden viermal 100 mL Riesenbergmedium (vgl. Tabelle 4.3) mit 5 g L^{-1} Glucose in 1 L Schüttelkolben ohne Schikanen mit 4 % (v/v) aus der ersten Stufen inokuliert und für 12-14 Stunden bis zum Erreichen der stationären Phase bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellsuspension wurde in sterilen 50 mL Reaktionsgefäßen für 10 Minuten bei 3.260 rcf und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 mL Überstand resuspendiert, in sterilen Spritzen mit Kanülen aufgezogen und aseptisch über ein Septum im Deckel zum Inokulieren des vorbereiteten Kultivierungsmediums im Rührkesselreaktor (vgl. Kapitel 4.3.1) verwendet.

Die Prozessbedingungen beim Start der Satzkultivierung waren eine Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ein pH von 6,7, ein Gasvolumenstrom an Druckluft von 200 NL h^{-1} (2,1 vvm), eine Gelöstsauerstoffkonzentration von annähernd 100 % und eine Rührerdrehzahl von 500 rpm. In verwendetem Riesenbergmedium wurde für die Satzkultivierung 25 g L^{-1} Glucose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle vorgelegt, bei der Verwendung von *E. coli* XL1-blue wurde zusätzlich Kanamycin ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) zugegeben. Der pH wurde während der Satzkultivierung einseitig mit 25 % Ammoniumlösung geregelt, die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 25 % durch Erhöhung der Rührerdrehzahl, wobei das Minimum bei 500 rpm lag. Das Wachstum der Zellen wurde durch Probenahme im Stundentakt verfolgt, bis die Glucose vollständig verbraucht war, was durch den sprunghaften Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH angezeigt wurde. Die Bakteriophagen wurden mit der gewünschten Infektionsdichte bei einer optischen Dichte von 6,9 (OD_{600}) über das Septum aseptisch zugegeben. Die Herstellung der Phagenstammlösung ist in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

4.4.3 Hochzelldichtekultivierung im Zulaufverfahren

Für die Zulaufverfahren zur Hochzelldichtekultivierung wurde eine dreistufige Vorkulturherstellung mit den beiden Stämmen *E. coli* XL1-blue und JM 109 durchgeführt,

um zum Zeitpunkt der Inokulation exponentiell wachsende Zellen aus dem Schüttelkolben in den Rührkesselreaktor zu transferieren. Für die Kultivierung von *E. coli* XL1-blue wurden in allen Vorkulturen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin zugefügt. Für den Stamm JM 109 sind abweichende Medien und Zeiten in Klammern angegeben. In der ersten Stufe wurden 5 mL LB-Medium (M9-Medium) mit 200 μL Stammkultur ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) inokuliert und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm für 9 Stunden (24 Stunden) im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Vorkultur (1 mL) wurde in der nächsten Stufe zum Inokulieren von 100 mL LB-Medium (M9-Medium) in 1 L Schüttelkolben ohne Schikanen verwendet und für 12-14 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm inkubiert. Diese stationären Zellen wurden in der dritten Vorkulturstufe zum Animpfen der Schüttelkolben mit Riesenbergmedium verwendet. Vier 1 L Schüttelkolben ohne Schikanen, die jeweils 100 mL Riesenbergmedium mit 5 g L^{-1} Glucose enthielten, wurden mit 10 % (v/v) aus Stufe zwei angeimpft. Durch regelmäßige Probenahme wurde die Zunahme der Zellkonzentration über die optische Dichte verfolgt, und bei einer OD_{600} von 2 wurde die Zellsuspension in sterilen 50 mL Reaktionsgefäßen für 10 Minuten bei 3.260 rpm und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 mL Überstand resuspendiert und zum Inokulieren des vorbereiteten Riesenbergmediums im Rührkesselreaktor verwendet. Für den Stamm XL1-blue wurde eine optische Dichte von 0,4-0,5 als Inokulationsdichte im Rührkesselreaktor angestrebt, wobei der Stamm JM 109 mit einer optischen Dichte von 0,1 inokuliert wurde. Bei der Vorkulturherstellung für den *E. coli* Stamm JM 109_pBSG74 wurde lediglich die erste Stufe auf 62 Stunden in M9-Medium verlängert. Für diesen Stamm wurden in alle Vorkulturen und Kultivierungen im Rührkesselreaktor $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin zugefügt.

Die Satzphase im definierten minimalen Riesenbergmedium wurde bei einer Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} gestartet. Die Prozessbedingungen waren identisch zur Satzkultivierung, es wurde jedoch ein Systemdruck von 1,2 bar eingestellt. Nach Verbrauch der Glucosekonzentration stieg die gelöste Sauerstoffkonzentration sprunghaft an. Beim Anstieg der gelösten Sauerstoffkonzentration über 40 % wurde die Zulaufphase automatisch gestartet. Die Zusammensetzung und Herstellung des Zulaufmediums ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Nach der Satzphase wurde zunächst ein exponentielles Zulaufprofil mit einer definierten Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ für 12,5 Stunden gestartet. Das exponentielle Zulaufprofil wurde über die Gleichung 3.20 berechnet. Der Zulaufmassenstrom an Glucose stieg exponentiell von $3,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $20,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an. Um eine Massentransferlimitierung an Sauerstoff zu vermeiden, wurde nach linearer Reduktion des Zulaufmassenstroms innerhalb von 1,5 Stunden auf $7,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine konstante Zulaufrate von 23 mL h^{-1}

eingestellt. Durch den Anstieg des Reaktionsvolumens ist der Zulaufmassenstrom linear auf $6,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 37 Stunden Zulaufphase gesunken. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde während der Zulaufphase über die pO_2 -Kaskade, mit einer Rührerdrehzahl zwischen $500\text{-}1500 \text{ min}^{-1}$, auf 25 % geregelt. Zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags wurde bei Bedarf manuell der Systemdruck auf bis zu 2,0 bar erhöht. Die Zugabe des Antischaum (Antifoam AF 204, 10 % (v/v)) erfolgte nach Bedarf, sobald über den gebildeten Schaum ein Kontakt zwischen Antischaumsonde und Reaktorboden hergestellt wurde. Die Bakteriophagen wurden als Stammlösung (vgl. Kapitel 4.4.1) während der exponentiellen Zulaufphase über das Septum zugegeben. Bei Stagnation der Zelldichte, gemessen über die optische Dichte, wurden die Zulaufkultivierungen beendet und das Kultivierungsmedium über das Ernteventil abgelassen. Anschließend wurde die Reinigung der ssDNA mit dem ersten Schritt des Aufarbeitungsprozesses gestartet, beschrieben in Kapitel 4.5.2.

4.4.4 Kontinuierliche Kultivierung mit *Escherichia coli*

Kontinuierliche Kultivierung im Millilitersystem

Für die kontinuierliche Kultivierung mit *E. coli* JM 109 wurde eine zweistufige Vorkultur durchgeführt. Zunächst wurden 20 mL M9 Minimalmedium (vgl. Tabelle 4.2) in einem 250 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit 500 μL Stammkultur inokuliert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der stationären Phase bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm inkubiert. In der zweiten Stufe wurden 100 mL Riesenbergmedium (vgl. Tabelle 4.3) mit 5 g L^{-1} Glucose in einem 1 L Schüttelkolben mit 1 % der stationären Zellen inokuliert und für 12-16 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension in sterile 50 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 3.260 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 mL Überstand resuspendiert und es wurde 1 mL zum Inokulieren der Milliliterreaktoren verwendet.

Die kontinuierliche Kultivierung wurde bei einer konstanten Rührerdrehzahl von 3000 min^{-1} mit gasinduzierendem Rührer bei einer Begasungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1}$ pro Reaktor durchgeführt. Die Reaktortemperatur wurde auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über ein externes Wasserbad geregelt und die Kopfraumkühlung auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Die miniaturisierten Rührkesselreaktoren wurden mit 10 mL definiertem Riesenbergmedium befüllt, wobei eine Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} im Satz- und Zulaufmedium verwendet wurde. Den Medien wurde zusätzlich 0,1 % Antischaum (AF 204, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

zugesetzt. Die Satzphase wurde durch die Zugabe der konzentrierten Zellsuspension mit einer optischen Dichte von 0,9 gestartet. Der pH wurde bei der Kultivierung ohne Bakteriophagen durch die Zugabe von 12,5 % Ammoniaklösung über die Pipettiernadeln des Laborroboters geregelt. Da der Laborroboter bei der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen nicht verwendet werden konnte, wurde hier über eine weitere externe Peristaltikpumpe 6,25 % Ammoniaklösung zur einseitigen pH Regelung zudosiert. Für die Kultivierung mit Bakteriophagen wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 10 (OD₆₀₀) durch Zugabe von 100 µL einer Phagenstammlösung (10¹⁰ pfu mL⁻¹) infiziert. Nach dem sprunghaften Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration am Ende der Satzphase, wurde durch den Start der Peristaltikpumpen für Zu- und Ablauf die kontinuierliche Prozessführung gestartet. Die kontinuierlichen Prozesse wurden für mindestens 5 Verweilzeiten betrieben, bei der in den rückvermischten Rührkesselreaktoren 99,9 % des Mediums ausgetauscht wurden. Dies wurde als hydraulische Voraussetzung für das Erreichen einen Fließgleichgewichtszustandes festgelegt. Das Erreichen eines stabilen Betriebspunktes wurde *on-line* am konstanten Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration und *at-line* anhand einer konstanten optischen Dichte bestimmt. Zur Bestimmung der optischen Dichte und der Glucosekonzentration wurden 200 µL (2 % des Reaktionsvolumens) über sterile Spritzen entnommen. Für die Bestimmung der Biotrockenmasse- und ssDNA Konzentration wurde 1 mL Zellsuspension aus dem Ablauf der Rührkesselreaktoren entnommen, da ein geringeres Probenvolumen nicht ausreichend ist und eine direkte Probenahme aus den Rührkesselreaktoren das Reaktionsvolumen um mindestens 10 % verringert hätte. Aus diesem Grund dauerte die Probenahme jeweils 0,1 Verweilzeiten. Zur präzisen Bestimmung der Durchflussrate, wurde die Vorlageflasche mit Medium vor und nach der kontinuierlichen Kultivierung gewogen. Ebenso wurden die Milliliterreaktoren gefüllt und entleert gewogen, um über die jeweilige Dichte das Volumen genau zu bestimmen.

Kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab

Die Vorkultur für die kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab wurde vergleichbar mit dem Millilitermaßstab, in zwei Stufen durchgeführt. Es wurden lediglich vier 1 L Schüttelkolben mit jeweils 100 mL Riesenbergmedium verwendet, um beim Start der Satzphase im Rührkesselreaktor eine optische Dichte von 0,9 zu erreichen. Die Zellen wurden in 50 mL Reaktionsgefäßen für 10 Minuten bei 3.260 rcf zentrifugiert und in 20 mL

Überstand resuspendiert. Die konzentrierte Zellsuspension wurde zum Inokulieren des Riesenbergmediums im Rührkesselreaktor verwendet.

Die Satzphase wurde mit 1,6 L Riesenbergmedium mit 20 g L^{-1} Glucose im in-situ sterilisierbaren Rührkesselreaktor, bei einem pH von 6,7 und einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$, gestartet. Die Begasung erfolgte mit steriler Prozessluft (20,95 % Sauerstoff) bei einem Volumenstrom von 210 NL h^{-1} (2,2 vvm). Während der Satzphase wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration über die pO_2 -Kaskade geregelt, wobei zu Beginn eine Rührerdrehzahl von 500 rpm eingestellt wurde. Die Infektion mit Bakteriophagen erfolgte identisch zum Millilitersystem bei einer optischen Dichte von 10 mit einem Phagentiter von 10^9 pfu mL^{-1} . Nach Verbrauch der Satzglucose und dem einhergehenden Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration wurde die kontinuierliche Prozessführung gestartet. Dafür wurde die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration über die pO_2 -Kaskade ausgeschaltet und eine konstante Rührerdrehzahl von 1.400 rpm eingestellt. Über den Deckel war ein Tauchrohr eingebaut, wodurch ein konstantes Reaktionsvolumen von 1,49 L im Reaktor erreicht wurde. Das hohe Reaktionsvolumen ermöglichte weiterhin die Probenahme direkt aus dem Reaktor, bei der die optische Dichte, die Biotrockenmasse-, Glucose-, und ssDNA Konzentration analysiert wurde.

Die Raum-Zeit-Ausbeute der ssDNA sollte bei der kontinuierlichen Kultivierung im Litermaßstab gesteigert werden. Aus diesem Grund wurde bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ die Glucosekonzentration im Zulaufmedium auf 70 g L^{-1} erhöht. Dafür wurde nach einer Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose in definiertem Riesenbergmedium ein exponentielles Zulaufprofil mit einer definierten Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Bei einem Massenstrom an Glucose von $21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ während der exponentiellen Zulaufphase wurde die kontinuierliche Prozessführung gestartet.

4.5 Reinigung der Einzelstrang DNA

In Abbildung 4.3 ist der Reinigungsprozess zur Isolierung von ssDNA schematisch dargestellt. Zunächst erfolgte die fest-flüssig Separation der Wirtszellen und der extrazellulär produzierten Bakteriophagen mittels Zentrifugation. Anschließend wurden die Bakteriophagen durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) und Natriumchlorid präzipitiert. Durch diesen Schritt wurde das Aufarbeitungsvolumen drastisch reduziert. Im

Anschluss wurden die präzipitierten Bakteriophagen resuspendiert, chemisch lysiert und die freigesetzte ssDNA mit Ethanol präzipitiert. Als abschließender Schritt erfolgte die Formulierung der ssDNA in das gewünschte Puffersystem.

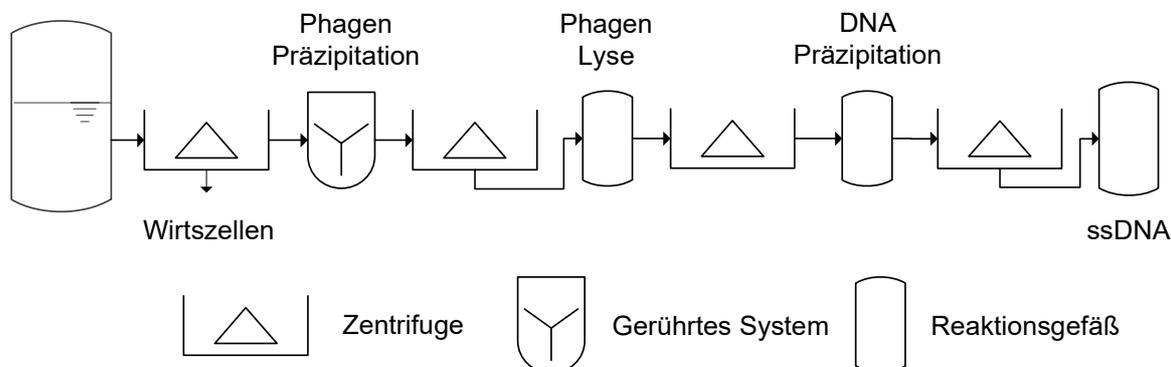


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung des Reinigungsprozesses zur Isolierung von ssDNA.

Die Isolierung der ssDNA aus den Reaktionsansatz wurde einerseits prozessbegleitend zur Quantifizierung der produzierten ssDNA aus jeweils 2 mL durchgeführt, andererseits wurde zu Prozessende die ssDNA aus dem gesamten Reaktionsvolumen isoliert, um deren Qualität und Quantität zu bestimmen. Zudem wurde die produzierte ssDNA an den Kooperationspartner vom Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie geliefert und für die *scaffolded* DNA Origami Technologie als Gerüststrang eingesetzt. Die genaue Durchführung ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.5.1 Prozessbegleitende Reinigung der Einzelstrang DNA im Millilitermaßstab

Bei den Zulaufkultivierungen wurde ein Probenvolumen von 2 mL über das Probenahmesystem entnommen, und für 10 Minuten bei 13.000 rcf und 20 °C zentrifugiert. Für die Isolierung der ssDNA bei der kontinuierlichen Kultivierung in den miniaturisierten Rührkesselreaktoren wurde ein Probenvolumen von 1 mL verwendet. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die Bakteriophagen wurden durch Zugabe von 300 µL, bzw. 150 µL 6x Polyethylenglykol 8.000 (PEG) und Natriumchlorid (vgl. Tabelle A.1) präzipitiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Bakteriophagen bei 20 °C und 13.000 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakteriophagen in 200 µL 1x TRIS EDTA Puffer (TE-Puffer, pH 8,5 vgl. Tabelle A.1) resuspendiert. Durch die Zugabe von 400 µL Lysepuffer (Tabelle A.1) und anschließendes Invertieren, wurden die Bakteriophagen chemisch lysiert.

Die Reaktion wurde 1 Minute später durch die Zugabe von 300 μL Neutralisationspuffer (Tabelle A.1) gestoppt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 10 Minuten bei 13.000 rcf und 20 °C zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 900 μL Ethanol (99 %, -20 °C) wurde die ssDNA für 30 Minuten auf Eis präzipitiert. Die ssDNA wurde für 10 Minuten bei 13.000 rcf und 20 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die ssDNA mit 500 μL Ethanol (75 %, -20 °C) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 13.000 rcf, 20 °C) 100 μL TE-Puffer zugegeben und die ssDNA über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach vollständigem Lösen der ssDNA wurde die Quantifizierung der ssDNA, wie in Kapitel 4.6.5 beschrieben, durchgeführt.

4.5.2 Reinigung der Einzelstrang DNA im Litermaßstab

Nach der Zulaufkultivierung wurde die Zellsuspension in vier 1 L Zentrifugenbecher überführt und für 60 Minuten bei 3.260 rcf und 20 °C (Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei 1 L Zentrifugenbecher transferiert und bei gleichen Bedingungen nochmals für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei 1 L Zentrifugenbecher überführt, mit 25 g L⁻¹ PEG 8.000 und 30 g L⁻¹ NaCl versetzt und bei 800 rpm für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf wurden die Bakteriophagen für 30 Minuten bei 3.260 rcf und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die präzipitierten Bakteriophagen in 200 mL TE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 400 mL Lysepuffer, wurde der Zentrifugenbecher invertiert und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Die chemische Lyse wurde durch die Zugabe von 300 mL Neutralisationspuffer gestoppt und anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 30 Minuten bei 3.260 rcf und 4 °C, wurde der Überstand in 50 mL Reaktionsgefäße verteilt und im Verhältnis 1:1 mit Ethanol (99 %, -20 °C) versetzt. Die Präzipitation der ssDNA erfolgte für 60 Minuten auf Eis, bevor die ssDNA für 10 Minuten bei 3.260 rcf und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entsorgt und die ssDNA mit 75 % Ethanol (-20 °C) für 10 Minuten gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 3.260 rcf, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die ssDNA in 1x TE-Puffer bei 4 °C gelöst. Der gesamte Reinigungsprozess wurde ohne zeitliche Unterbrechung durchgeführt.

4.6 Analytische Methoden

4.6.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte über die *at-line* Messung der optischen Dichte und der gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in einem Einstrahl UV-Vis-Photometer (Genesys™ 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) gegen phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, vgl. Kapitel A1) bestimmt. Der lineare Messbereich des Photometers wurde zwischen 0,0-0,3 angenommen, und bei Bedarf die Zellsuspension mit PBS verdünnt. Die Analyse wurde im Dreifachansatz durchgeführt.

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurde 2 mL Zellsuspension in getrocknete (mindestens 48 Stunden, bei 80 °C) und gewogene 2 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 13.000 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet. Nach Bestimmung des finalen Gewichts des Reaktionsgefäßes mit Zellpellet konnte die Biotrockenmassekonzentration berechnet werden. Dies wurde ebenso im Dreifachansatz durchgeführt.

4.6.2 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung der infektiösen M13 Phagenpartikel im Überstand wurde die Methode des direkten Ausstreichens nach Clokie und Kropinski (2009) geringfügig modifiziert. Es wurde 2 mL Zellsuspension für 10 Minuten bei 13.000 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand bis zu der weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für den Plaque Test werden nicht infizierte Wirtszellen benötigt, weshalb eine Satzkultivierung im Schüttelkolben mit *E. coli* XL1-blue MRF' durchgeführt wurde. Es wurden 10 mL LB-Medium mit Kanamycin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit einer Einzelkolonie inokuliert und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 2 bei 37 °C inkubiert. Die Zellen müssen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Phagensuspension wurde in 10-100er Schritten um einen Faktor zwischen 10^2 - 10^{11} in LB-Medium verdünnt. 1 mL der verdünnten Phagensuspension wurde mit 100 μL nicht infizierter Zellsuspension ($OD_{600} > 2$) versetzt und für 20 Minuten bei 150 rpm und 37 °C inkubiert. 100-200 μL der Probe wurde

anschließend im Dreifachansatz auf LB^{Kan}-Agarplatten ausgestrichen. Da die Infektion mit der Bakteriophage M13 die Wirtszellen nicht lysiert, sondern nur die maximale Wachstumsrate verringert, können Plaques anhand unterschiedlich schnell wachsender Zellen auf dem Rasen nach circa 16-24 Stunden bei 37 °C identifiziert werden. Die Zahl der zählbaren Plaques sollte zwischen 30-300 liegen, um eine eindeutige Bestimmung zu ermöglichen (Clokic und Kropinski 2009).

Die artifiziellen Phagenpartikel können F-Pilus tragende Stämme infizieren, jedoch intrazellulär den Replikationsmechanismus nicht mehr starten. Aus diesem Grund ist eine Bestimmung über den Plaque Test nicht mehr durchführbar. Als Alternative wurde die Übertragung der Carbenicillinresistenz als Selektions- und Quantifizierungsmerkmal verwendet. Es wurde XL1-blue MRF' Zellen mit den artifiziellen Bakteriophagen, die ein Resistenzgen gegen Carbenicillin tragen, infiziert und auf LB-Agar Platten mit Kanamycin und Carbenicillin ausplattiert. Die Vorgehensweise war identisch zur Bestimmung des Phagentiters mit dem Plaque Test.

4.6.3 Rheologische Messung der dynamischen Viskosität

Zur Bestimmung der dynamischen Viskosität wurde eine Rheometer mit Doppelspalt-Messsystem (RheolabQC, Anton Paar, Graz, Österreich) verwendet. Die dynamische Viskosität wurde in einem Bereich der Scherrate zwischen 1-3000 s⁻¹ mit 500 Messpunkten (lineare Verteilung) bei einer Messpunktdauer von 2 Sekunden aufgenommen (Software RHEOPLUS/32, Anton Paar, Graz, Österreich). Die Messung wurde bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Dafür wurden 13 mL Bakteriensuspension blasenfrei in den Doppelspalt pipettiert und im Rheometer zunächst auf 37 °C temperiert (5 Minuten, Drehzahl 20 min⁻¹). Nach Erreichen des Temperatursollwerts wurde die Messung durchgeführt. Für die Analyse des zellfreien Überstandes wurde die Zellsuspension 15 Minuten bei 3.260 rcf bei 20 °C zentrifugiert. Die Fließkurve wurde analog zur Bakteriensuspension aufgezeichnet.

4.6.4 Quantifizierung der Einzelstrang DNA Konzentration

Die Bestimmung der ssDNA Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (GenesysTM 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in UV-Küvetten mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes bestimmt. Die Konzentration wurde über den Extinktionskoeffizienten ε der verschiedenen ssDNA Varianten berechnet (ssDNA 7.249 Basen: Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 7,12 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 7.560 Basen: $\varepsilon = 7,43 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 8.064 Basen: $\varepsilon = 7,91 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 6.813 Basen: $\varepsilon = 6,69 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Neben der photometrischen Absorptionsmessung bei 260 nm wurde die ssDNA Konzentration mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®]-Gold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Der Farbstoff zeigt eine um den Faktor 1000 erhöhte Fluoreszenz bei der Interkalation mit doppel- oder einzelsträngiger DNA. Die Intensität ist dabei abhängig von der Konzentration der DNA. Der Linearitätsbereich lag für die verwendete ssDNA zwischen 0,1-5,0 nM. Die ssDNA wurde mit TE-Puffer in diesen Bereich verdünnt und anschließend wurden 20 μL ssDNA Probe, 20 μL 10x SYBR[®]-Gold und 160 μL TE-Puffer in Mikrotiterplatten (Greiner 96 flat black) gemischt. Die Lösung wurde für 3 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend wurde im Mikrotiterplatten Photometer (Infinite M2000, Tecan, Männedorf, Schweiz) die Fluoreszenz gemessen. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 495 nm, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen (Verstärkung: 100, Integrationszeit: 100 μs). Die Konzentration der unbekanntes ssDNA Probe wurde über die Standardgerade zwischen 0,1-5 nM bestimmt.

4.6.5 Bestimmung der Qualität der Einzelstrang DNA

Die Qualität der ssDNA wurde über das Migrationsverhalten bei der Agarosegelelektrophorese bewertet. Dafür wurde ein 2 prozentiges Agarosegel hergestellt, indem 2,5 g UltraPure Agarose in insgesamt 125 g TBE-Puffer (0,5x, pH 8,4) gelöst wurde. Der Lösung wurden 1 mL MgCl_2 (1,375 M) und 5 μL Ethidiumbromid (0,04 $\mu\text{L g}^{-1}$) zugesetzt, bevor das Gel gegossen wurde. 20 μL der zu analysierenden ssDNA Proben wurden in einer Konzentration von 20 nM mit 4 μL Ladungspuffer (Ficoll 400) versetzt. 13 μL dieser Suspension wurden auf das Gel aufgetragen, welches für 90 Minuten bei 90 V und 500 mA an die Stromversorgung angeschlossen wurde. Das Gel wurde anschließend bei

einer Empfindlichkeit von 550 V und einer Auflösung von 50 μm durch einen Typhoon 9.500 FLA Laser Scanner (GE Healthcare) gescannt.

4.6.6 Bestimmung der Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration

Die Messung der Glucose, Acetat und Ammoniumkonzentration erfolgte nach Entfernung der Zellen (10 Minuten, 13.000 rcf, 20 °C) im Überstand durch die enzymbasierten Absorptionstests (D-Glucose: 10 716 251 035, Ammonium: 11 112 732 035, Acetate: 10 148 261 035 R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die verwendeten Volumina wurden für die Messung in Mikrotiterplatten skaliert.

4.6.7 Bestimmung der Phosphatkonzentration

Die Phosphatkonzentration wurde mit dem Phosphate Colorimetric Kit (MAK030-1KT Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bestimmt. Die Bestimmung der Phosphationen erfolgte im Überstand nach Zentrifugation der Zellen (10 Minuten, 13.000 rcf, 20 °C). Phosphat reagierte hierbei mit einem chromogenen Bestandteil im Phosphatreagenz zu einem Farbkomplex, der bei 650 nm das Absorptionsmaximum aufweist. In dieser kolorimetrischen Quantifizierungsmethode ist die Absorption des Farbkomplexes direkt proportional zur Phosphatmenge. Zur Quantifizierung des Phosphats wurde eine Standardreihe aus einer 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung im Konzentrationsbereich von 0,005 mM bis 0,100 mM erstellt. Die Messung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.6.8 Bestimmung der Magnesiumkonzentration

Die Magnesiumkonzentration im Überstand der Zellsuspension wurde mit dem Magnesium Fluid Monoreagenz (MF01000100-2, Centronic GmbH, Wartenberg, Deutschland) nachgewiesen. Magnesium formte hierbei einen Farbkomplex mit Xylidylblau, der ein Absorptionsmaximum bei 546 nm besitzt. Als Standard wurde eine Magnesiumsulfat-Heptahydrat Lösung (0,1 g L⁻¹) erstellt, wobei die Standardgerade im Bereich von 0,005 g L⁻¹ bis 0,030 g L⁻¹ lag. Die Messung wurde nach Herstellerangaben im Einstrahl UV-Vis-Photometer (GenesysTM 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) durchgeführt.

4.7 Berechnungen und Modelle

4.7.1 Bestimmung der Phagenbildungsrate

Für die reaktionstechnische Charakterisierung der Zulaufkultivierungen mit Bakteriophagen war die Berechnung der Phagenbildungsrate essentiell. Dafür wurden die ermittelten Phagentiter halblogarithmisch über der Prozesszeit aufgetragen und mit verschiedenen Funktionen interpoliert. Dabei wurden verschiedene sigmoidale Funktionen, beispielsweise nach Gompertz, Richards und Stannard, untersucht und anhand des Konfidenzintervalls (95 %) miteinander verglichen (Zwietering et al. 1990). Der zeitliche Verlauf des Phagentiters (dekadischer Logarithmus) wurde am besten mit einem logistischen Modell mit 4 Parametern beschrieben, dessen Funktion in Gleichung 4.5 dargestellt ist.

$$y(t) = y_0 + \frac{a}{1 + \exp\left(-\left(\frac{t-c}{b}\right)\right)} \quad (4.5)$$

- $y(t)$... Phagentiter in Abhängigkeit von t , -
 y_0 ... Phagentiter zum Zeitpunkt der Phageninfektion, -
 a, b, c ... Parameter der Ausgleichsfunktion, -

Die Wahl des logistischen Modells mit 4 statt 3 Parametern liegt darin begründet, dass die Infektionsdichte an Bakteriophagen über einen Bereich von 10^2 - 10^{11} pfu mL⁻¹ eingestellt werden kann und im Modell mit dem Parameter y_0 implementiert ist.

Die Phagenbildungsrate wurde über die Differentialrechnung der angenäherten Ausgleichsfunktion bestimmt. Aus der ersten Ableitung des in Gleichung 4.5 beschriebenen logistischen Modells ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$y(t)' = \frac{\frac{a}{b} \cdot \exp\left(-\left(\frac{t-c}{b}\right)\right)}{\left(1 + \exp\left(-\left(\frac{t-c}{b}\right)\right)\right)^2} \quad (4.6)$$

Der in Gleichung 4.6 beschriebene Zusammenhang in Verbindung mit den über das logistische Modell bestimmten Parametern ermöglicht eine Bestimmung der Phagenbildungsrate über die Zeit.

4.7.2 Adsorptionsrate der Bakteriophagen

Im Jahr 1931 wurde von Krueger die Bindung von Phagenpartikeln an lebende oder tote Bakterienzellen beschrieben. Die Adsorption folgt dabei einer Kinetik erster Ordnung und kann mit Gleichung 4.7 folgendermaßen beschrieben werden (Kasman et al. 2002):

$$\ln \frac{P}{P_0} = -k \cdot C \cdot t \quad (4.7)$$

| | | |
|-------|-----|--|
| P | ... | Konzentration an freien Bakteriophagen, pfu mL ⁻¹ |
| P_0 | ... | Konzentration an Bakteriophagen zum Zeitpunkt $t = 0$, pfu mL ⁻¹ |
| k | ... | Adsorptionsrate, mL min ⁻¹ |
| C | ... | Zellkonzentration, cfu mL ⁻¹ |
| t | ... | Zeit, min |

Unter Verwendung der Gleichung 4.7 kann die Adsorptionsrate k der Bakteriophagen an einen geeigneten Wirt experimentell bestimmt werden.

4.7.3 Anteil an infizierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion

Die Multiplizität der Infektion (MOI) gibt das Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen wieder und wird nach Gleichung 4.8 definiert:

$$MOI = \frac{P}{C} \quad (4.8)$$

| | |
|-----------|--|
| MOI ... | Multiplizität der Infektion, pfu cfu ⁻¹ |
|-----------|--|

Mit der Multiplizität der Infektion und unter Annahme einer Poissonverteilung lässt sich die theoretische Wahrscheinlichkeit mit Gleichung 4.9 berechnen, dass n Phagenpartikel ein Infektionsziel infizieren (Ellis und Delbrück 1938):

$$P(n_p) = \frac{MOI^{n_p} \cdot e^{-MOI}}{n_p!} \quad (4.9)$$

| | |
|--------------|--|
| $P(n_p)$... | Wahrscheinlichkeit, dass n_p Phagenpartikel eine Zelle infizieren, - |
| n_p ... | Anzahl Phagenpartikel, - |

Der Anteil an Zellen ($P(n_P > 0)$), die in Abhängigkeit der MOI zum Zeitpunkt der Zugabe an Bakteriophagen infiziert werden, kann mit Gleichung 4.10 berechnet werden:

$$P(n_P > 0) = 1 - P(0) = 1 - e^{-MOI} \quad (4.10)$$

4.7.4 Identifikation der formalkinetischen Parameter

Mit Hilfe der parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Millilitermaßstab konnten die formalkinetischen Parameter von *E. coli* basierend auf den Massenbilanzen für kontinuierliche Bioprozesse im idealen Rührkesselreaktor identifiziert werden. Für die Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit Bakteriophagen wurden für die Beschreibung der Biomasse-, Glucose- und ssDNA Konzentration die Gleichungen 4.11-4.13 verwendet.

$$\frac{dc_X}{dt} = D \cdot (0 - c_X) + \mu \cdot c_X \quad (4.11)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = D \cdot (c_{S, \text{ein}} - c_S) - \left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P} \right) \cdot c_X \quad (4.12)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = D \cdot (0 - c_P) + (\mu \cdot Y_{PX} + k_P) \cdot c_X \quad (4.13)$$

| | | |
|---------------------|-----|--|
| D | ... | Durchflussrate, h^{-1} |
| c_X | ... | Biomassekonzentration, g L^{-1} |
| μ | ... | spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |
| $c_{S, \text{ein}}$ | ... | Glucosekonzentration im Zulauf, g L^{-1} |
| c_S | ... | Glucosekonzentration, g L^{-1} |
| Y_{XS} | ... | Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1} |
| m_S | ... | Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| $q_{S,P}$ | ... | Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| c_P | ... | ssDNA Konzentration, g L^{-1} |
| Y_{PX} | ... | Produktausbeutekoeffizient, g g^{-1} |
| k_P | ... | konstante Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ |

Die Wachstumsrate wurde dabei durch das Monod-Modell für bakterielles Wachstum unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Infektion mit Bakteriophagen mit Gleichung 4.14 beschrieben:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS} - k_P \cdot Y_{PS} \quad (4.14)$$

Y_{PS} ... Produktselektivität, g g⁻¹

Unter Fließgleichgewichtsbedingungen ($dc_i dt^l = 0$) lassen sich die Gleichungen 4.11-4.13 vereinfachen und die Biomasse-, Glucose- und ssDNA Konzentration lassen sich folgendermaßen beschreiben:

$$c_X = \frac{D(c_{S,ein} - c_S)}{\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S + \frac{k_P}{Y_{PS}}} \quad (4.15)$$

$$c_S = \frac{K_S \cdot (D + m_S \cdot Y_{XS} + k_P \cdot Y_{PS})}{\mu_{max} - D - m_S \cdot Y_{XS} - k_P \cdot Y_{PS}} \quad (4.16)$$

$$c_P = \frac{c_X \cdot k_P}{D} \quad (4.17)$$

Dies gilt für Durchflussraten, die kleiner als die maximale Wachstumsrate sind. Für Durchflussraten, die größer als die maximale Wachstumsrate sind, ergibt sich die triviale Lösung für $c_X = 0$ und $c_S = c_{S,ein}$. Weiterhin wurde lediglich von einer konstanten Produktbildung ausgegangen. Mit Hilfe der nichtlinearen Optimierungsroutine aus der *Optimization Toolbox* in MATLABR2015b (MathWorks, Natick, MA, USA) mit dem *Trust-Region-Reflection* Algorithmus wurden die Parameter bestimmt, indem die Restfunktion r in Gleichung 4.18 minimiert wurde. Dabei wird die Differenz aus gemessener Konzentrationen $c_{i,mess}$ und simulierter Konzentration $c_{i,sim}$ der drei Zustandsgrößen j (Biotrockenmassekonzentration, Substratkonzentration, Produktkonzentration) über die Quadratsumme minimiert:

$$r = \min \sum_{j=1}^3 \sum_{i=1}^n (c_{i,mess} - c_{i,sim})^2 \quad (4.18)$$

Die gemessenen Konzentrationen wurden aus insgesamt 16 verschiedenen Fließgleichgewichtsuntersuchungen generiert, die aus 3 sequentiell durchgeführten, parallelen Experimenten stammten. Um die Standardabweichungen der ermittelten Parameter abschätzen zu können, wurde eine *Monte Carlo Bootstrap* Analyse durchgeführt (Kremling 2014). Hierbei wurden Messwerte *in silico* generiert, die einen normalverteilten Fehler mit einer Abweichung von 5 % hatten. Dieses Verfahren wurde 50.000 Mal wiederholt und ermöglichte die Angabe der formalkinetischen Parameter mit Mittelwert und Standardabweichung.

5 Satzprozess mit dem Bakteriophagen M13

Seit seiner Entdeckung von Hofschneider im Jahre 1963 in München wird der Bakteriophage M13 unter anderem für die Produktion von einzelsträngiger DNA und die Phagen-Display Technologie verwendet. Aufgrund seiner Struktur von 900 nm Länge und 6-8 nm Breite wird er zu den filamentösen Bakteriophagen gezählt. Als Wirtszellen werden gram negative Enterobakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) mit Fertilitätspilus (F-Pilus) infiziert, wobei die infizierten Bakterienzellen bei der Extrusion der Bakteriophagen nicht lysiert werden und während der Produktion der Nachkommen des Bakteriophagen teilungsfähig sind. Die Kultivierung von *E. coli* zur Bakteriophagenproduktion wird hauptsächlich im Schüttelkolben in angereicherten komplexen Medien basierend auf *lysogeny broth* (LB) in Satzprozessen durchgeführt. Die Amplifikation der Bakteriophagen in Satzprozessen im Schüttelkolben weist Vorteile wie eine einfache Handhabung und ein geringes Kontaminationsrisiko im Vergleich zu Kultivierungen in Rührkesselreaktoren auf. Die Prozesskontrolle ist jedoch aufgrund fehlender Sensoren für den pH und die Gelöstsauerstoffkonzentration nur eingeschränkt möglich.

Aus diesem Grund wurde der Satzprozess mit dem Bakteriophagen M13mp18 in einem *in-situ* sterilisierbaren Rührkesselreaktor mit Mess- und Regelungstechnik für den pH und die Gelöstsauerstoffkonzentration durchgeführt. Des Weiteren wurden die Wirtszellen in einem definierten Medium nach Riesenberg et al. (1991) bei einem pH von 6,7 kultiviert, wobei eine Glucosekonzentration von 27 g L^{-1} als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle vorgelegt wurde. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde über die Rührerdrehzahl und eine Begasungsrate von 2 vvm Druckluft auf 25 % Luftsättigung geregelt. In den Satzkultivierungen wurden die *E. coli* Stämme XL1-blue MRF' und JM 109 als Wirtsorganismen verwendet. Die Selektion auf F-Pilus tragende Wirtszellen erfolgte bei

dem Stamm XL1-blue, der ein Kanamycin Resistenzgen auf dem F-Plasmid codiert, durch die Zugabe von Kanamycin A. Der Stamm JM 109 weist eine chromosomale Deletion der Prolinsynthese auf, die auf dem F-Plasmid codiert ist. Durch die Verwendung des definierten Mediums ohne zusätzliche Prolinquelle wurde auf F-Pilus tragende Zellen selektiert. Die Konzentrationsverläufe der Satzkultivierung mit Bakteriophageninfektion sind zunächst für den Stamm *E. coli* XL1-blue MRF' in Abbildung 5.1 dargestellt.

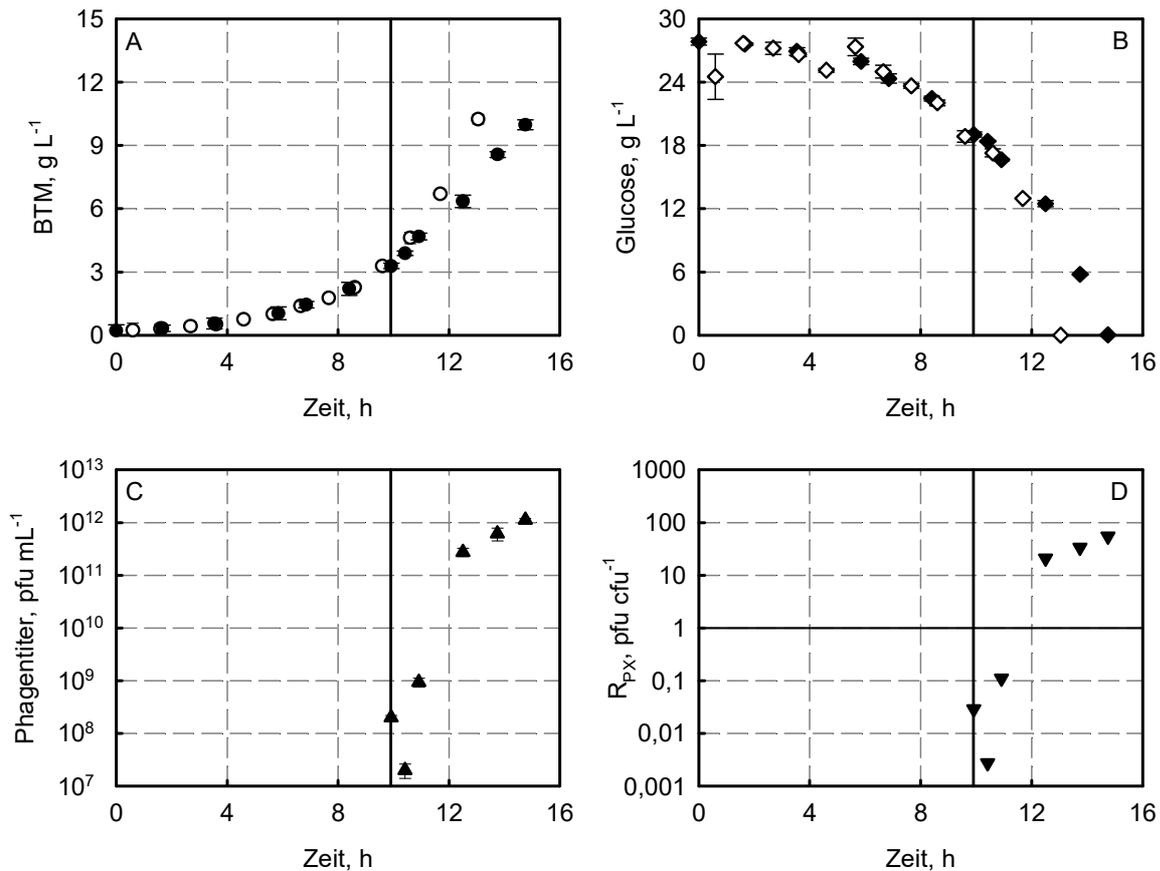


Abbildung 5.1 Satzkultivierung von *E. coli* XL1-blue MRF' mit dem Bakteriophagen M13mp18. Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse (BTM) (A), des Substrates Glucose (B) und der Bakteriophagen M13mp18 (C) über die Zeit. Weiterhin ist das Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen (R_{PX}) über die Zeit aufgetragen (D). Die Satzkultivierungen mit Bakteriophageninfektion (schwarze Symbole) und als Referenz ohne Infektion (weiße Symbole) wurden in definiertem Medium nach Riesenberg et al. (1991) bei pH 6,7 und einer Temperatur von 37 °C im Rührkesselreaktor durchgeführt. Die vertikale Linie nach 9,9 Stunden symbolisiert die Zugabe der Bakteriophagen M13mp18. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration zeigte das zu erwartende exponentielle Wachstumsverhalten von Mikroorganismen unter unlimitierten Bedingungen auf. Dabei wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $10,3 \text{ g L}^{-1}$ ohne Bakteriophagen und

10,0 g L⁻¹ mit Bakteriophageninfektion erreicht. Nach Zugabe der Bakteriophagen war die Zunahme der Biotrockenmasse reduziert und die Glucoseaufnahme verlangsamte sich im Vergleich zur Referenzkultivierung, dargestellt in Abbildung 5.1 (A, B). Die Infektion führte dementsprechend zu einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate um 29 %, von 0,34 h⁻¹ auf 0,24 h⁻¹ im Satzverfahren. Dahingegen kam es zu keiner signifikanten Änderung des Ertragskoeffizienten $Y_{XS,\mu}$ (0,43 g g⁻¹).

Nach 9,9 Stunden wurde mit $2,0 \cdot 10^8$ pfu mL⁻¹ Bakteriophagen bei einer optischen Dichte von 6,9 bei 600 nm (OD₆₀₀) infiziert. Dies entsprach einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,03 pfu cfu⁻¹. Die MOI stellt das Verhältnis von Phagenpartikel zur Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion dar. Der über den Plaque Test bestimmte Phagentiter sank nach 30 Minuten um eine Größenordnung ab, bevor nach einer Stunde $9,3 \cdot 10^8$ pfu mL⁻¹ detektiert wurden. Nach 12,5 Stunden war ein verringerter Anstieg des Phagentiters bei ausreichender Substratversorgung erkennbar. Beim vollständigen Verbrauch der Glucose zum Ende der Satzkultivierung nach 14,8 Stunden wurde ein Phagentiter von $1,1 \cdot 10^{12}$ pfu mL⁻¹ erreicht. Das Verhältnis von Phagen zu Wirtszellen sank entsprechend zum Phagentiter ab und erreichte 2,6 Stunden nach Zugabe der Bakteriophagen ein Verhältnis von 21 pfu cfu⁻¹.

Identische Satzkultivierungen wurden mit dem *E. coli* Stamm JM 109 durchgeführt, dargestellt in Abbildung 5.2. Dabei wurden neben den Prozessbedingungen auch die MOI von 0,03 pfu cfu⁻¹ und die Zelldichte zum Infektionszeitpunkt von 6,9 (OD₆₀₀) identisch gewählt. Die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse verdeutlichten das zu erwartende exponentielle Wachstum unter unlimitierten Bedingungen. Die infizierten Zellen erzielten eine maximale spezifische Wachstumsrate von 0,64 h⁻¹, die nicht infizierten Zellen 0,66 h⁻¹. Die Infektion mit Bakteriophagen führte unter diesen Bedingungen im Satzverfahren zu keiner signifikanten Reduktion der maximalen Wachstumsrate. Weiterhin wurde der Biomassertragskoeffizient Y_{XS} mit 0,45 g g⁻¹ für beide Zustände bestimmt. Nach der Infektion mit den Bakteriophagen M13mp18 war ein Rückgang des Phagentiters zu erkennen. Anschließend stieg der Phagentiter innerhalb von 2 Stunden um 3 Größenordnungen auf $2,3 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ bis zum Verbrauch der vorgelegten Glucose an.

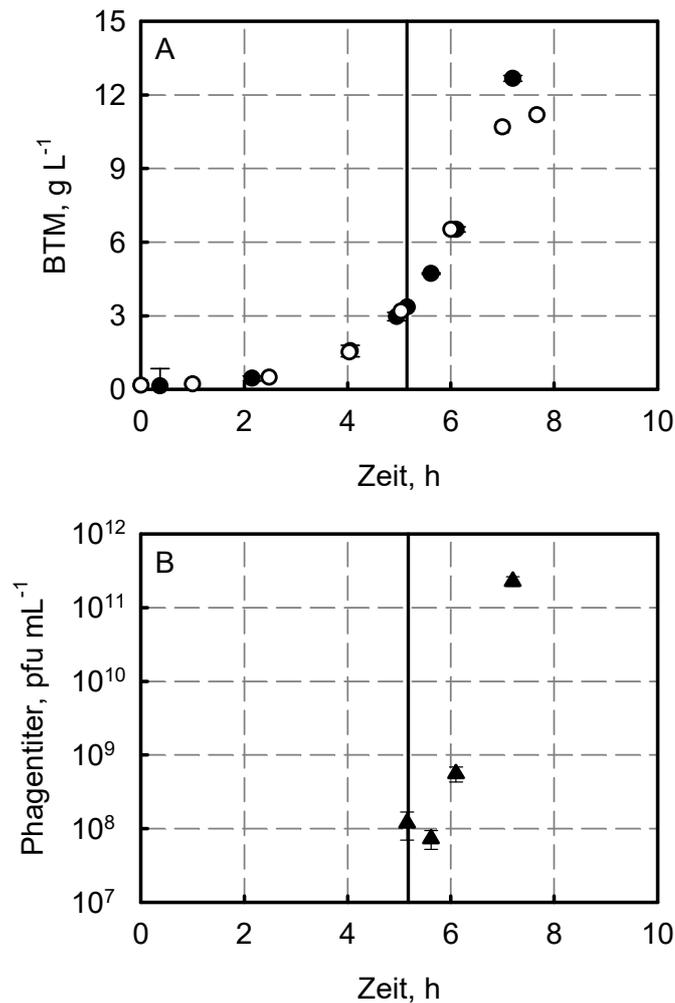


Abbildung 5.2 Satzkultivierung von *E. coli* JM 109 mit dem Bakteriophagen M13mp18. Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse (BTM) von infizierten (●) und nicht infizierten (○) *E. coli* JM 109 (A) und der Bakteriophagen (B). Die Satzkultivierungen wurden im definierten Medium nach Riesenberg et al. (1991) bei pH 6,7 und einer Temperatur von 37 °C im Rührkesselreaktor durchgeführt. Die vertikale Linie nach 5,2 Stunden symbolisiert die Zugabe der Bakteriophagen M13mp18. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

In Tabelle 5.1 wird der stammspezifische Einfluss der Bakteriophageninfektion auf die maximale spezifische Wachstumsrate im Satzverfahren verglichen.

Tabelle 5.1 Einfluss der Bakteriophageninfektion auf die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} im Satzverfahren

| Wirtsstamm | μ_{\max} (nicht infiziert), h ⁻¹ | μ_{\max} (infiziert), h ⁻¹ | Reduktion μ_{\max} , % |
|------------------------------|---|---|----------------------------|
| <i>E. coli</i> JM 109 | 0,66 | 0,64 | 3 % |
| <i>E. coli</i> XL1-blue MRF' | 0,34 | 0,24 | 29 % |

Die Infektion des Stammes XL1-blue MRF' mit Bakteriophagen führte zu einer Reduktion der Wachstumsrate um 29 %, wohingegen bei dem Stamm JM 109 mit 3 % keine signifikante Reduktion unter diesen Reaktionsbedingungen im definierten Medium zu erkennen war.

Diskussion

Im definierten Medium nach Riesenberg mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle werden maximale spezifische Wachstumsraten unter unlimitierten Bedingungen von 0,45 - 0,67 h⁻¹ für *E. coli* beschrieben (Jenzsch et al. 2006; Puskeiler und Weuster-Botz 2004; Riesenberg et al. 1991). Die niedrige maximale spezifische Wachstumsrate von 0,34 h⁻¹ des Stammes XL1-blue MRF' in Minimalmedium ist in einer Punktmutation im Gen *purB* begründet, die während der Stammentwicklung aufgetreten sein muss. Diese Punktmutation führte zu einem Aminosäureaustausch der Glutaminsäure zu Lysin an der Position 115 in der Adenylosuccinatlyase (EC 4.3.2.2). Durch die Wiederherstellung der Glutaminsäure an Position 115 konnte die spezifische Wachstumsrate auf 0,50 h⁻¹ gesteigert werden (Jung et al. 2010). Dadurch erklärt sich der signifikante Unterschied in den maximalen Wachstumsraten der untersuchten Stämme ohne Bakteriophageninfektion.

In der Literatur wird beschrieben, dass eine Infektion von *E. coli* mit dem Bakteriophagen M13 zu einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate führt (Grieco et al. 2009; Salivar et al. 1964; Sambrook et al. 2001). Auch die Quantifizierung der Phagenpartikel über den Plaque Test beruht auf unterschiedlichen Wachstumsraten von infizierten und nicht infizierten Zellen auf LB-Agarplatte, da die Bakteriophagen die

infizierten Zellen nicht lysieren. Die Reduktion der Wachstumsrate wurde hierbei in Medien mit Komplexbestandteilen wie Hefeextrakt untersucht, in denen maximale Wachstumsraten von 2 h^{-1} erreicht werden können. Für eine Reduktion der Wachstumsrate durch die Infektion mit Bakteriophagen müssen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Zellwachstums beeinflusst werden. Bei der Verwendung des Stammes XL1-blue MRF' im definierten Medium stellt die von der Adenylsuccinatlyase (EC 4.3.2.2) katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Jung et al. 2010). Die Reaktion von Inosin-5'-monophosphat (IMP) zu Adenylosuccinat wird durch die Adenylosuccinatsynthase katalysiert, bevor die Umsetzung zu Adenosinmonophosphat (AMP) durch die Adenylsuccinatlyase katalysiert wird. Die Adenylsuccinatlyase katalysiert damit eine Reaktion in der Purinbiosynthese und ist ausschlaggebend für die Produktion eines zentralen Bausteines für die RNA und DNA Synthese. Die Infektion mit M13 Bakteriophagen führt zur intrazellulären Produktion der replikativen Form des Phagengenoms (*replicative form*, RF-DNA), ssDNA und Transkription der Phagene zu mRNA. Dieser erhöhte Bedarf an zentralen Bausteinen im Zellzyklus bei Infektion mit Phagen führt zur Reduktion der maximalen Wachstumsrate bei der Satzkultivierung mit XL1-blue MRF' in definiertem Medium. Der Einfluss der Phageninfektion auf die maximale spezifische Wachstumsrate des Stammes JM109 konnte nicht beziffert werden. Die Reduktion der Wachstumsrate nach Phageninfektion sollte aus diesem Grund in Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Chemostaten (vgl. Kapitel 7.1) untersucht werden.

Der Rückgang des Phagentiters nach Infektion ist in der Analysemethode mit Hilfe des Plaque Tests begründet. Hierbei werden lediglich infektiöse Phagenpartikel im zellfreien Überstand detektiert. Bei der Infektion durch den Bakteriophagen M13 kommt es zur Adsorption an die Wirtszelle, Injektion der genomischen ssDNA in das Cytoplasma und die Einlagerung der Hüllproteine in die Plasmamembran (Mai-Prochnow et al. 2015). Dadurch sinkt die Anzahl der infektiösen Phagenpartikel im Überstand innerhalb der ersten 30 Minuten.

In Satzkultivierungen im Schüttelkolben werden die Wirtszellen bei einer optischen Dichte von 0,5 oder niedriger mit Bakteriophagen M13 infiziert (Douglas et al. 2007; Sambrook et al. 2001). Durch die Verwendung eines Satzverfahrens im Rührkesselreaktor mit einer Glucosekonzentration von 27 g L^{-1} im Minimalmedium, pH Regelung und optimaler Sauerstoffversorgung, konnte die Infektion bei einer deutlich höheren Zelldichte von 6,9 (OD_{600}) durchgeführt werden. Dies zeigt eine Unabhängigkeit der Infektion von der

Zelldichte und ermöglicht in folgenden Zulaufprozessen einen frei wählbaren Infektionszeitpunkt.

In Abbildung 5.3 sind die maximal erzielten Phagentiter mit den *E. coli* Stämmen JM 109 und XL1-blue in Satzprozessen zur Einordnung mit Literaturangaben verglichen. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen konnten maximale Phagentiter von $1,1 \cdot 10^{12}$ pfu mL⁻¹ mit *E. coli* XL1-blue und $2,3 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ mit *E. coli* JM 109 erzielt werden.

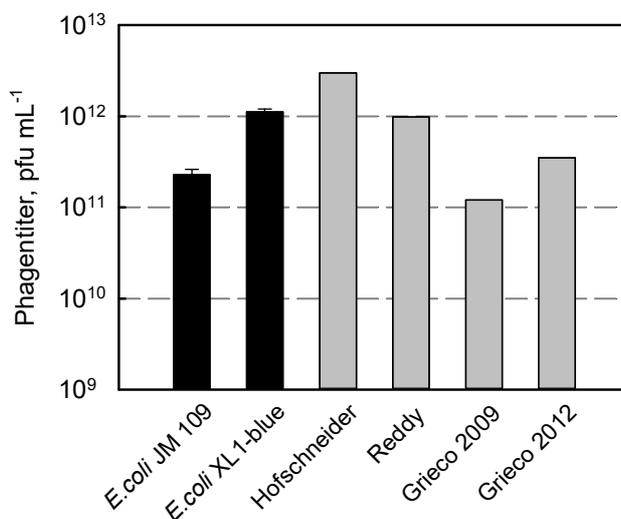


Abbildung 5.3 Maximale Phagentiter in Satzprozessen mit *E. coli*. Dargestellt sind die maximalen Phagentiter, die mit den *E. coli* Stämmen JM 109 und XL1-blue im Satzverfahren im Rührkesselreaktor in definiertem Medium nach Riesenberg et al. (1991) erzielt wurden. Im Vergleich dazu sind die beschriebenen Phagentiter in Schüttelkolben von Hofschneider (1963) in M9 Minimalmedium mit 0,5 % Aminosäuren und Reddy und McKenney (1996) in komplexem Medium aufgetragen. Die beschriebenen Phagentiter von Grieco et al. (2009, 2012) wurden in Rührkesselreaktoren in komplexem Medium erzielt.

Grieco et al. (2009) veröffentlichten erstmals die Produktion von genetisch veränderten filamentösen M13 Bakteriophagen im Rührkesselreaktor, wobei unter Verwendung eines komplexen Mediums maximale Phagentiter von $1,2 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ erreicht wurden. Durch Optimierung der Prozessbedingungen Temperatur, pH und Gelöstsauerstoffkonzentration mit Hilfe statistischer Versuchsplanung nach der *response surface methodology* wurde ein maximaler Phagentiter von $3,5 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ erreicht (Grieco et al. 2012). Durch die Variation der Multiplizität der Infektion konnten Reddy und McKenney (1996) maximale Phagentiter von $1,0 \cdot 10^{12}$ pfu mL⁻¹ in Schüttelkolbenexperimenten erreichen, wobei Hofschneider bei der Entdeckung 1963 einen Titer von $3 \cdot 10^{12}$ pfu mL⁻¹ beschrieb

(Hofschneider 1963). Die mit den *E. coli* Stämmen JM109 und XL1-blue im Satzprozess erreichten Phagentiter befinden sich innerhalb einer Größenordnung zu den Literaturangaben, unabhängig des verwendeten Mediums oder der Kultivierung im Schüttelkolben oder Rührkesselreaktor.

Die Unterschiede in den erreichten maximalen Phagentitern bei der Kultivierung von *E. coli* JM109 und XL1-blue lassen sich in der Versuchsplanung begründen. Die Infektion wurde bei einer identischen Biotrockenmassekonzentration und MOI durchgeführt. Aus der höheren spezifischen Wachstumsrate von *E. coli* JM 109 ergab sich eine kürzere Produktionsphase des Bakteriophagen bis zum Verbrauch der vorgelegten Glucose. Aus diesem Grund beeinflusst die Versuchsplanung den maximal erreichbaren Phagentiter und verhindert dahingehend eine eindeutige Schlussfolgerung. Daher werden beide *E. coli* Stämme für die reaktionstechnische Charakterisierung im Zulaufprozess verwendet.

Die von Grieco et al. (2012) durchgeführte Optimierung, basierend auf statistischer Versuchsplanung, erzielte erhöhte Phagentiter für den genetisch veränderten M13 Bakteriophagen. Diese sind jedoch niedriger als bereits veröffentlichte Literaturdaten. Aus diesem Grund wurde von einer Optimierung der Prozessparameter wie pH, Temperatur und Gelöstsauerstoffkonzentration im Satzprozess abgesehen und zunächst die Übertragung in den Zulaufprozess angestrebt.

6 Hochzelllichteprozess zur Produktion von einzelsträngiger DNA

Die Verwendung von Zulaufverfahren im Gegensatz zu Satzverfahren weisen einige Vorteile wie hohe Biomasse-, hohe Produktkonzentrationen und hohe volumetrische Produktivitäten durch die Verlängerung der Produktionsphase auf. Weiterhin kann die Induktion der Produktbildung über einen größeren Zeitraum variiert werden. Durch die hohe Biomasse- und Produktkonzentrationen wird ebenso der Aufwand in der anschließenden Aufarbeitung der Produkte verringert.

6.1 Etablierung eines Hochzelllichteprozesses mit *Escherichia coli*

Zur Etablierung eines Hochzelllichteprozesses wurde ein vorgegebenes, exponentielles Zulaufprofil mit einer eingestellten konstanten Wachstumsrate nach Gleichung 3.20 (vgl. Kapitel 3.3.2) verwendet. Aufbauend auf den in Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor ermittelten zellspezifischen Parametern, der maximalen spezifischen Wachstumsrate und des Biomasseertragskoeffizientens von *E. coli* JM 109, wurde eine konstante Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ unter substratlimitierenden Bedingungen in der exponentiellen Phase definiert. Die Zulaufkultivierung wurde in einem definierten Mineralmedium (vgl. Tabelle 4.3) nach Riesenberg et al. (1991) mit einer vorgeschalteten Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Durch eine reduzierte Wachstumsrate und die Verwendung eines chemisch definierten Mediums ohne Komplexbestandteile wird die Bildung von Stoffwechselnebenprodukten wie Acetat, durch den Überschussmetabolismus reduziert. Der pH wurde dabei einseitig mit einer 25 % Ammoniumlösung (v/v) auf pH 6,7 geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde

über den Gasvolumenstrom (sterile Prozessluft mit 2 vvm), den Systemdruck (bis zu 2 bar) und die Rührerdrehzahl ($500-1500 \text{ min}^{-1}$) auf 25 % Luftsättigung geregelt. In Anlehnung an das von Riesenberg et al. (1991) beschriebene Zulaufmedium, wurde eine konzentrierte Substratlösung an Glucose (750 g L^{-1}) und Magnesiumsulfat ($9,7 \text{ g L}^{-1}$) verwendet. Die Ergebnisse der Zulaufkultivierungen sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

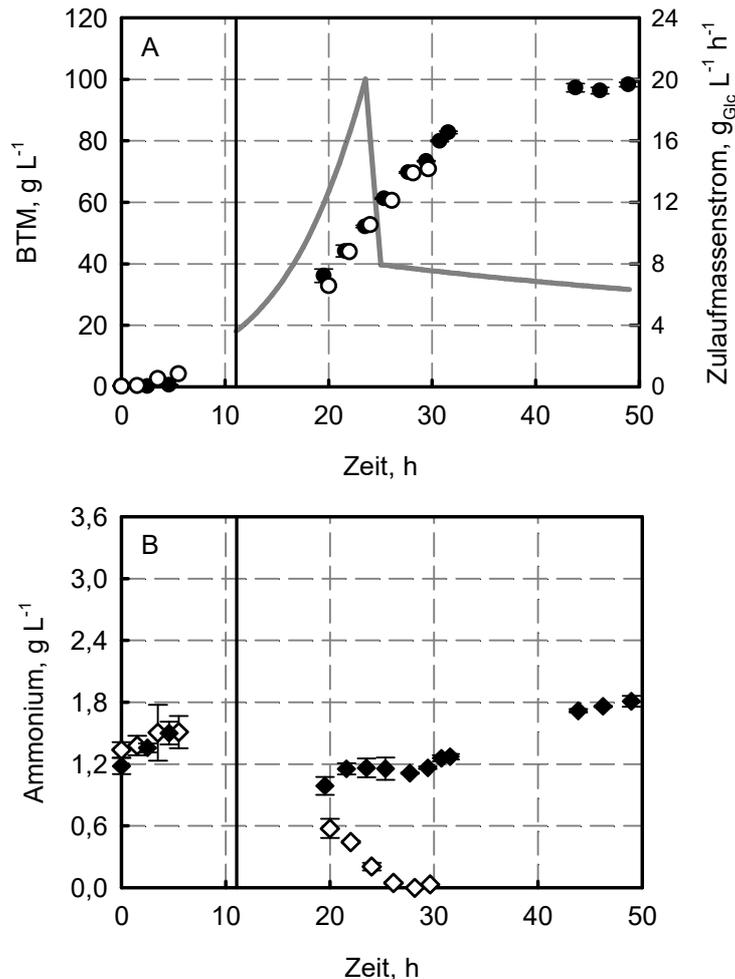


Abbildung 6.1 Etablierung einer Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* JM 109. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (BTM) (A), des Zulaufmassenstroms an Glucose (A) und der Ammoniumkonzentration im Überstand (B). Die weißen Symbole stellen die Zulaufkultivierung mit dem von Riesenberg et al. (1991) vorgeschlagenen Zulaufmedium dar, die schwarzen Symbole das modifizierte Zulaufmedium mit zusätzlicher Stickstoffquelle in Form von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Beide Zulaufkultivierungen wurden mit dem identischen Zulaufprofil (A) durchgeführt. Die durchgezogene vertikale Linie nach 11,1 Stunden symbolisiert den Übergang von Satz- auf Zulaufverfahren. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Nach 11,1 Stunden wurde die Zulaufphase automatisiert nach Verbrauch der vorgelegten Glucose und dem damit einhergehenden sprunghaften Anstieg der Gelöstsauerstoff-

konzentration gestartet. Der Zulaufmassenstrom an Glucose stieg während einer 12,5 stündigen exponentiellen Phase von $3,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $20,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an. Um eine Massentransferlimitierung an Sauerstoff zu vermeiden, wurde nach linearer Reduktion des Zulaufmassenstroms innerhalb von 1,5 Stunden auf $7,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine konstante Zulauftrate von 23 mL h^{-1} eingestellt. Durch den Anstieg des Reaktionsvolumens ist der Zulaufmassenstrom kontinuierlich auf $6,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 49 Stunden gesunken, dargestellt in Abbildung 6.1 A. Die vorgegebene Wachstumsrate wurde mit $0,14 \text{ h}^{-1}$ in der exponentiellen Phase und eine Biotrockenmassekonzentration von $52,1 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ am Ende des exponentiellen Zulaufs erreicht. Bei der Verwendung des von Riesenberg et al. (1991) beschriebenen Zulaufmediums kam es nach 28,1 Stunden zu einer Auszehrung der einzigen Stickstoffquelle Ammonium, dargestellt in Abbildung 6.1 B. Damit einhergehend wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $70,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht und die Zulaufkultivierung beendet. Obwohl zur Regelung des pH eine 25 % Ammoniumlösung (v/v) verwendet wurde, konnte dies der Auszehrung nicht entgegenwirken.

Aus diesem Grund wurde das Zulaufmedium durch das Hinzufügen einer zusätzlichen Stickstoffquelle in Form von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($18,5 \text{ g L}^{-1}$) modifiziert. Unter identischen Prozessbedingungen konnte durch diese Modifikation eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $98,7 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 49 Stunden erreicht werden, dargestellt in Abbildung 6.1 A. Die Ammoniumkonzentration lag zu den Probenahmezeitpunkten in einem Bereich zwischen $1-1,8 \text{ g L}^{-1}$. Zudem konnte die maximale Biotrockenmassekonzentration um 39,2 % gesteigert und eine Hochzelllichtkultivierung mit *E. coli* JM 109 etabliert werden.

Das modifizierte Zulaufmedium sollte ebenso für die Hochzelllichtkultivierung mit *E. coli* XL1-blue mit identischem Zulaufprofil mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ verwendet werden, dargestellt in Abbildung 6.2.

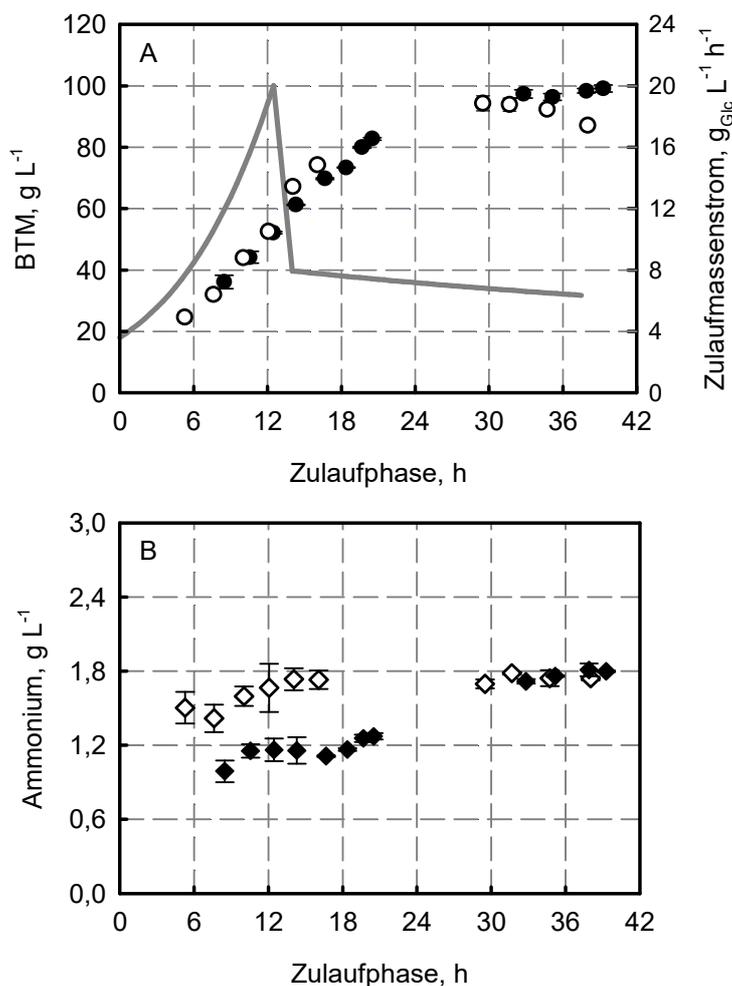


Abbildung 6.2 Übertragung des Hochzelldichteprozesses auf den *E. coli* Stamm XL1-blue. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (BTM) (A), des Zulaufmassenstroms an Glucose (A) und der Ammoniumkonzentration im Überstand (B) der Hochzelldichteprozesse mit *E. coli* XL1-blue (weiße Symbole) und *E. coli* JM 109 (schwarze Symbole) über die Zulaufphase. Beide Zulaufkultivierungen wurden mit dem um die Komponente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erweiterten Zulaufmedium in definiertem Medium nach Riesenberg et al. (1991) durchgeführt. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Entsprechend dem vorgegebenen Zulaufprofil wurde eine spezifische Wachstumsrate von $0,14 \text{ h}^{-1}$ während der exponentiellen Zulaufphase mit *E. coli* XL1-blue erreicht. Am Ende der exponentiellen Zulaufphase konnte in Übereinstimmung mit dem *E. coli* Stamm JM 109 eine Biotrockenmassekonzentration von $52,6 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ mit *E. coli* XL1-blue erzielt werden. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde für *E. coli* XL1-blue unter diesen Prozessbedingungen mit $94,2 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$ 29,5 Stunden nach Start der Zulaufphase bestimmt. Die Ammoniumkonzentration, dargestellt in Abbildung 6.2 B, konnte zu den Probenahmezeitpunkten zwischen $1,4 - 1,8 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden.

Diskussion

Durch die Anpassung des Zulaufmediums mit *E. coli* JM 109 konnte eine Stickstofflimitierung verhindert und eine Hochzelldichtekultivierung etabliert werden. Die Konzentration an Ammonium in der Flüssigphase lag weiterhin unter der inhibierenden Konzentration von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ für die Kultivierung mit *E. coli* (Lee 1996). Die Modifikation des Zulaufmediums konnte ebenso für die Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* XL1-blue ohne Limitierung oder Inhibierung durch Ammonium etabliert werden. Dabei konnte mit *E. coli* XL1-blue MRF` unter diesen Bedingungen eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $94,2 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Dies zeigt die Anwendbarkeit des etablierten Hochzelllichteprozesses für unterschiedliche *E. coli* Stämme. Weiterhin führte die Zulaufkultivierung mit reduzierter Wachstumsrate in definiertem Minimalmedium in Übereinstimmung mit Literaturdaten zu einer Acetatproduktion unter $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (Riesenberg et al. 1991).

Die Verwendung eines vorgegebenen Zulaufprofils mit konstanter Wachstumsrate konnte in der Literatur bereits erfolgreich für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* TG1 etabliert werden (Korz et al. 1995). Die in der vorliegenden Arbeit erzielte Biotrockenmassekonzentration von maximal $98,7 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ ist vergleichbar mit den von Pan et al. (1987) beschriebenen Daten zur Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* B unter sauerstoffunlimitierten Bedingungen. Riesenberg et al. (1991) erreichte durch eine konstante, geregelte Wachstumsrate von $0,11 \text{ h}^{-1}$ über die gesamte Zulaufphase eine Biotrockenmassekonzentration von 95 g L^{-1} mit *E. coli* TG 1. Durch die vereinfachte Methode mit vorgegebener konstanter Wachstumsrate nach Korz et al. (1995) konnte eine Biotrockenmassekonzentration von 128 g L^{-1} erreicht werden, wobei hier dem Zulaufmedium noch Spurenelemente zugesetzt und eine Sauerstofflimitierung durch Anreicherung der Zuluft mit reinem Sauerstoff vermieden wurde. Die Modifikation des Zulaufmediums mit den Spurenelementen Cobalt, Mangan, Kupfer, Molybdän, Zink, Eisen und dem Vitamin Thiamin konnte die maximale Biotrockenmassekonzentration mit dem Stamm JM 109 in dieser Arbeit nicht erhöhen und wurde dementsprechend als Limitierung ausgeschlossen.

In der Literatur sind für Zulaufprozesse mit *E. coli* noch höhere Biotrockenmassekonzentrationen beschrieben. Dabei wurde mit *E. coli* RV308 eine Biotrockenmassekonzentration von 145 g L^{-1} in Rührkesselreaktoren erreicht (Horn et al. 1996). In der von Horn und

Mitarbeitern veröffentlichten Arbeit wurde die Glucosekonzentration auf $1,5 \text{ g L}^{-1}$ im Reaktionsmedium geregelt. Dadurch wachsen die Zellen in der Zulaufphase bei maximaler Wachstumsrate, da diese Glucosekonzentration die Affinitätskonstante K_S ($0,04\text{-}99 \text{ mg L}^{-1}$) von *E. coli* zu Glucose deutlich übersteigt (Bergter 1983; Horn et al. 1996; Senn et al. 1994). Durch den Überschuss an Glucose kann es unter aeroben Bedingungen aufgrund des Überschussmetabolismus zur Acetatakkumulation kommen, die durch die Verwendung des Stammes RV308 jedoch unter 2 g L^{-1} lag (Chmiel 2011; Horn et al. 1996). Aus diesem Grund konnte in der von Horn et al. (1996) veröffentlichten Arbeit auf die Standardmethode der Hochzelllichtekultivierung mit reduzierter Wachstumsrate ($\mu > \mu_{\max}$) verzichtet werden, ohne mögliche negative Auswirkungen der Acetatakkumulation auf das Zellwachstum und die Produktion rekombinanter Proteine zu riskieren (Kleman und Strohl 1994; Korz et al. 1995; Lee 1996; Riesenberg 1991). In der von Hu et al. (2004) veröffentlichten Arbeit wurden Biotrockenmassekonzentration von 183 g L^{-1} im Rührkesselreaktor erreicht, indem ein exponentielles Zulaufprofil mit einer Wachstumsrate von $0,057 \text{ h}^{-1}$ in einem semidefinierten Medium mit 20 g L^{-1} Hefeextrakt und 30 g L^{-1} N-Z-Amin Caseinhydrolysat durchgeführt wurde. Weiterhin wurde als Zulaufmedium eine konzentrierte Lösung an Glukose, Mineralien und komplexen Bestandteilen verwendet und die Zulauftrate über den Anstieg des pH geregelt. Eine weitere Steigerung der Biotrockenmassekonzentration ist durch die Verwendung eines Dialysereaktors möglich. Dabei wurde eine maximale Zelldichte von 190 g L^{-1} durch den stetigen Austausch des Mediums und die Zellrückhaltung erzielt (Nakano et al. 1997). Mit diesem Reaktor konnte sich an das theoretische Maximum von 200 g L^{-1} bei der Kultivierung mit *E. coli* angenähert werden, bei der das Reaktionsmedium die Fließfähigkeit drastisch ändert (Rosano und Ceccarelli 2014).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag nicht in der weiteren Optimierung der Hochzelllichtekultivierung mit *E. coli*, sondern in der Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von einzelsträngiger DNA für die *scaffolded* DNA Origami Technologie. Aus diesem Grund wurde die hier dargestellte Zulaufkultivierung mit *E. coli* als Referenz für die Entwicklung einer Hochzelllichtekultivierung mit der Bakteriophagen M13 verwendet.

6.2 Zulaufprozess mit Bakteriophageninfektion zur Einzelstrang DNA Produktion¹

6.2.1 Einfluss der Bakteriophageninfektion auf den Hochzelllichteprozess

Aufbauend auf dem etablierten Hochzelllichteprozess mit *E. coli* XL-1 blue erfolgte im Folgenden die Infektion mit dem Bakteriophage M13mp18 im Zulaufprozess unter identischen Prozessbedingungen. Die genaue Versuchsdurchführung findet sich in Kapitel 4.4.3. Aus den Satzprozessen im Rührkesselreaktor war bekannt, dass eine Infektion auch bei höheren Zelldichten ($OD_{600} = 6,9$) möglich ist. Daher wurde die Infektion während der exponentiellen Zulaufphase durchgeführt. Die Ergebnisse der Zulaufkultivierung mit dem Bakteriophage M13mp18 sind in Abbildung 6.3 dargestellt, und vergleichend dazu eine Zulaufkultivierung ohne Infektion.

Der Zulaufmassenstrom an Glucose stieg beginnend bei $3,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ exponentiell bis zum Erreichen einer maximalen Rate von $20,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 12,5 Stunden an. Aufgrund einer eintretenden Massentransferlimitierung an Sauerstoff bei maximalem Leistungseintrag und einem Systemdruck von bis zu 2 bar wurde der Zulaufmassenstrom linear innerhalb 1,5 Stunden auf $7,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ reduziert. Anschließend wurde mit konstanter Förderrate bis zum Ende der Zulaufkultivierung dosiert. Nach 5 Stunden wurde auf einen Titer von $1,7 \cdot 10^8 \text{ pfu mL}^{-1}$ mit Bakteriophagen M13mp18 bei einer Biotrockenmassekonzentration von 26 g L^{-1} infiziert. Dies entsprach einer Multiplizität der Infektion (MOI) von $0,003 \text{ pfu cfu}^{-1}$. Mit den infizierten *E. coli* wurde nach 30 Stunden Zulaufphase eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $66,5 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Im Vergleich dazu wurden in der Referenzkultivierung unter identischen Bedingungen ohne Bakteriophageninfektion $94,2 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, dies entspricht einer Reduktion um 29 %, dargestellt in Abbildung 6.3 A. Nach Infektion mit Bakteriophagen kam es zunächst zu keiner signifikanten Reduktion des Zellwachstums, erst 6,5 Stunden nach Zugabe der

¹ Teile dieses Abschnitts sind bereits publiziert in: Kick B, Praetorius F, Dietz H, Weuster-Botz D (2015) Efficient production of single-stranded phage DNA as scaffolds for DNA origami. Nano Letters 15 (7): 4672 - 4676.

Bakteriophagen war die Biotrockenmassekonzentration der infizierten Zellen 10,5 % niedriger.

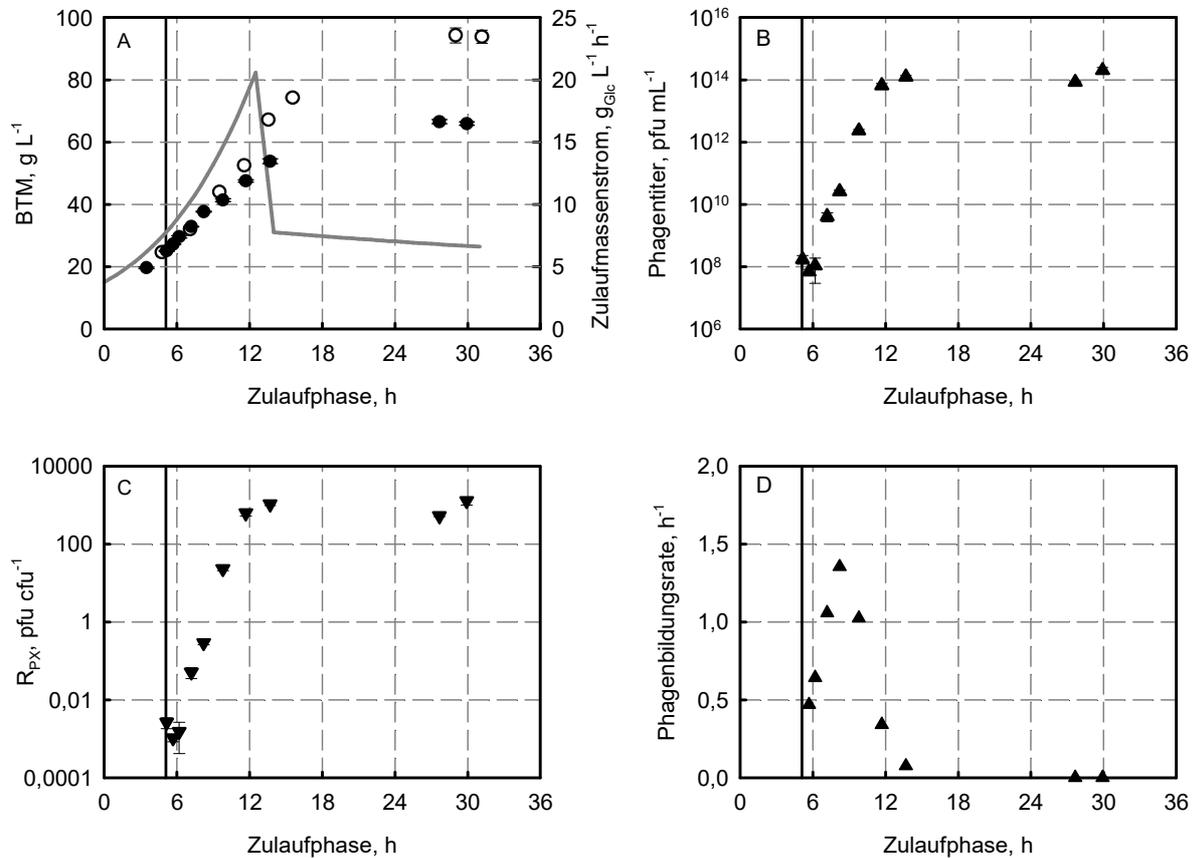


Abbildung 6.3 Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue mit Bakteriophageninfektion. A: Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse nicht infizierter (○) und infizierter (●) Zellen über die Zulaufphase. Zusätzlich ist der Zulaufmassenstrom an Glucose (graue Linie) aufgetragen. B: Auftragung des Phagentiters über die Zulaufphase. C: Das Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen (R_{PX}) ist über die Zulaufphase dargestellt. D: Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Phagenbildungsrate. Die Zulaufkultivierung wurde mit definiertem Medium und modifiziertem Zulaufmedium bei pH 6,7 und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Phageninfektion. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Nach Zugabe der Bakteriophagen sank der Phagentiter zunächst um 60 % in 30 Minuten ab, bevor ein starker Anstieg um 6 Größenordnungen auf $1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ innerhalb von 8 Stunden zu verzeichnen war. Ein maximaler Phagentiter von $2,0 \pm 0,4 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ wurde nach 30 Stunden Zulaufphase erreicht. Im Vergleich dazu stieg die Zellzahl nach Infektion von $6,6 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$ cfu mL⁻¹ auf $1,6 \pm 0,2 \cdot 10^{11}$ cfu mL⁻¹ (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen ist von 0,001 pfu cfu⁻¹ auf 1068 pfu cfu⁻¹ innerhalb von 8 Stunden angestiegen, dargestellt in

Abbildung 6.3 C. 4,6 Stunden nach Infektion wurde ein Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen von 23 erreicht, bei dem sich erstmals mehr Bakteriophagen als Zellen im Reaktionsansatz befanden.

Zur Berechnung der Phagenbildungsrate wurde der dekadische Logarithmus des Phagentiters über die Zeit aufgetragen. Anschließend wurde der Verlauf über eine sigmoidale Modellgleichung mit 4 Parametern nach Gleichung 4.5 angenähert. Die Phagenbildungsrate wurde anschließend nach Gleichung 4.6 mit den erhaltenen Parametern der Ausgleichsfunktion berechnet. Der Verlauf der Phagenbildungsrate ist in Abbildung 6.3 D dargestellt. Die Phagenbildungsrate stieg innerhalb der ersten 3 Stunden nach Zugabe der Phagen an und erreichte bei $1,35 \text{ h}^{-1}$ ein Maximum. Anschließend sank die Phagenbildungsrate, wobei 8,5 Stunden nach Phageninfektion eine Phagenbildungsrate von $0,07 \text{ h}^{-1}$ bei einem Phagentiter von $1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{14} \text{ pfu mL}^{-1}$ erreicht wurde.

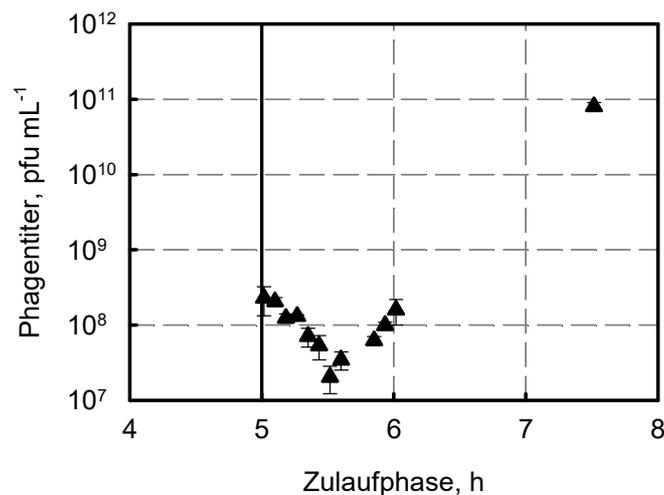


Abbildung 6.4 Zeitliche Auflösung der Phageninfektion während einer Hochzelllichtekultivierung. Dargestellt ist der Konzentrationsverlauf der Bakteriophagen zwischen 4-8 Stunden nach Start der Zulaufphase. Die Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen wurde in definiertem Medium bei pH 6,7 und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Infektion erfolgte während der exponentiellen Zulaufphase mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ mit einer Multiplizität der Infektion von $0,003 \text{ pfu cfu}^{-1}$. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Phageninfektion. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Die Abnahme des Phagentiters nach Zugabe der Bakteriophagen sollte innerhalb der ersten Stunde mit einem Zeitintervall von 5 Minuten analysiert werden. Aus diesem Grund wurde unter identischen Versuchsbedingungen 5 Stunden nach Start des Zulaufs mit $2,3 \pm 0,9 \cdot 10^8 \text{ pfu mL}^{-1}$ Bakteriophagen infiziert, dies entsprach einer MOI von

0,003 pfu cfu⁻¹. Die genaue zeitliche Auflösung der Infektion mit Bakteriophagen ist in Abbildung 6.4 dargestellt.

Nach Zugabe der Bakteriophagen M13mp18 zu exponentiell wachsenden Zellen sank der Phagentiter zunächst von $2,3 \pm 0,9 \cdot 10^8$ pfu mL⁻¹ auf $2,0 \pm 0,8 \cdot 10^7$ pfu mL⁻¹ innerhalb von 30 Minuten ab. Dementsprechend blieben nur 8,7 % der zugegebenen Bakteriophagen M13 im Zellüberstand und konnten über den Plaque Test quantifiziert werden. Die restlichen Bakteriophagen adsorbierten an die Zelloberfläche und infizierten die Wirtszellen. Aus der Abnahme der nicht adsorbierten Bakteriophagen lässt sich unter Berücksichtigung der Zellzahl die Adsorptionsrate k mit $7,5 \cdot 10^{-13}$ mL min⁻¹ nach Gleichung 4.7 berechnen. Nach 30 Minuten stieg der Phagentiter kontinuierlich an, wobei 60 Minuten nach Phageninfektion $1,6 \pm 0,5 \cdot 10^8$ pfu mL⁻¹ erreicht wurden.

Nach der Etablierung einer Hochzelllichtekultivierung mit Bakteriophageninfektion und Beschreibung der Phagenadsorption, sollte untersucht werden, ob eine mögliche Limitierung oder Inhibierung durch Medienbestandteile oder Stoffwechselnebenprodukte vorliegt. Eine Medienlimitierung oder Inhibierung könnte sowohl das Stagnieren des Phagentiters, als auch die um 29 % niedrigere Biotrockenmassekonzentration der infizierten Zellen zum Prozessende begründen. Hierfür wurden die Konzentrationsverläufe des limitierenden Substrates Glucose, der Komponenten Ammonium, Magnesium und Phosphat und des theoretischen Stoffwechselnebenproduktes Acetat analysiert. Ausgewählte Bestandteile sind in Abbildung 6.5 aufgetragen.

Während der Zulaufphase war die Glucosekonzentration, entsprechend dem limitierenden Zulaufprofil, für beide Kultivierungen unter 39 ± 14 mg L⁻¹. Die Ammoniumkonzentration der Zulaufkultivierung ohne Bakteriophagen war zu jeder Probenahme höher als im Vergleichsprozess mit Bakteriophagen, dennoch lag für beide Prozesse die Ammoniumkonzentration über die gesamte Zulaufphase im Bereich von 1,1-2,5 g L⁻¹, dargestellt in Abbildung 6.5 A. Eine Stickstofflimitierung lag demzufolge weder für das Wachstum von *E. coli*, noch für die Produktion der Bakteriophagen vor. Anhand der zeitlichen Verläufe der Magnesiumkonzentration wurde zudem keine Limitierung durch diesen Medienbestandteil sichtbar. Die Konzentration an Magnesium ist über die Zulaufphase von 0,05 g L⁻¹ auf 0,2 g L⁻¹ für beide Zulaufkultivierungen angestiegen. Die Konzentration an Magnesiumsulfat im Zulaufmedium lag bei 9,7 g L⁻¹. Der in Abbildung 6.5 C aufgetragene Konzentrationsverlauf für Phosphat zeigt eine deutliche

Abnahme für beide Zulaufkultivierungen. Zum Zeitpunkt der Infektion waren im Reaktionsmedium vergleichbare Phosphatkonzentration von $10,2 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ für die Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen und $10,9 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ ohne Bakteriophagen vorhanden. Nach 31 Stunden Zulaufphase ist die Phosphatkonzentration für die Kultivierung ohne Bakteriophagen auf $0,7 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ gesunken, mit Phagen auf $1,7 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$. In Abbildung 6.5 D ist die Acetatkonzentration über die Zulaufphase aufgetragen. Diese lag zu jedem Probenahmezeitpunkt unter der Nachweisgrenze des enzymatischen Tests von 50 mg L^{-1} und wird somit als eine mögliche Inhibierung ausgeschlossen.

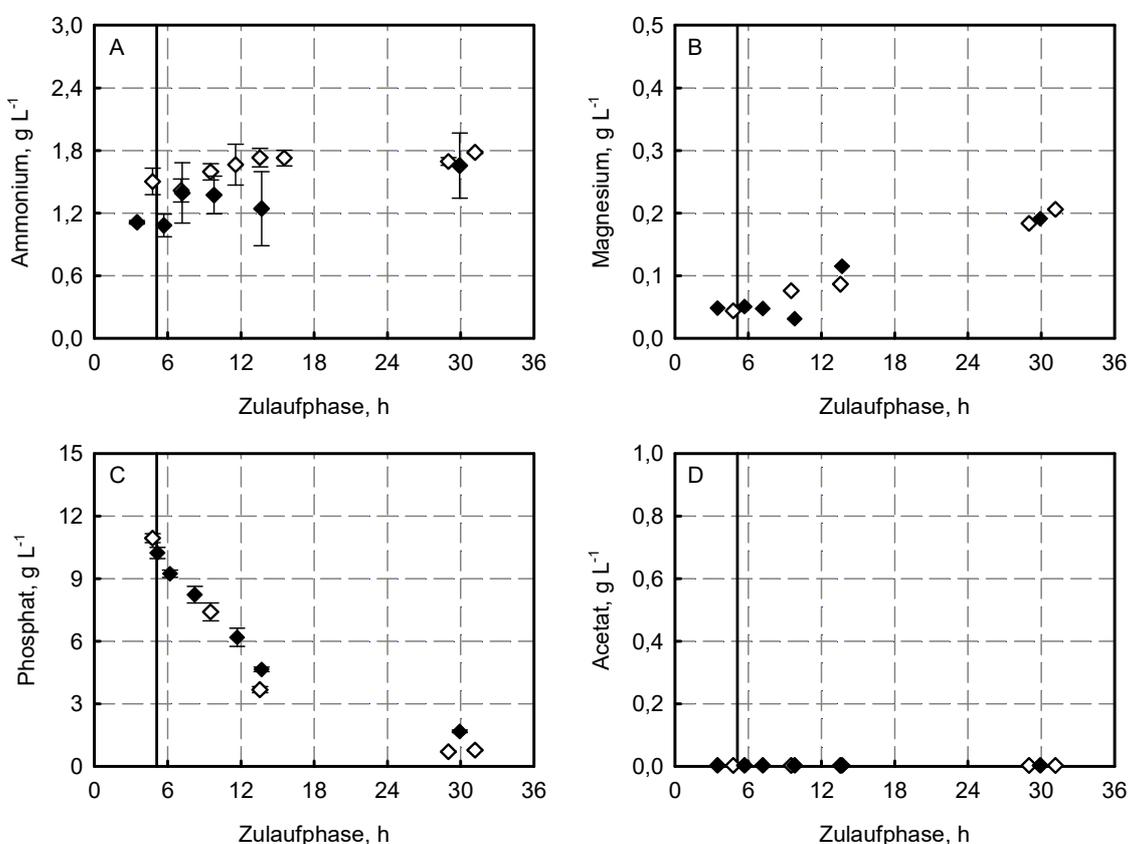


Abbildung 6.5 Charakterisierung ausgewählter Medienbestandteile während einer Hochzelllichtkultivierung mit Bakteriophagen. Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe für Ammonium (A), Magnesium (B), Phosphat (C) und Acetat (D) über die Zulaufphase. Verglichen werden Zulaufkultivierungen mit (schwarze Symbole) und ohne (weiße Symbole) Bakteriophageninfektion. Die Zulaufkultivierungen wurden in definiertem Medium bei einem pH von 6,7 und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Infektion erfolgte während der exponentiellen Zulaufphase mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ mit einer Multiplizität der Infektion von $0,003 \text{ pfu cfu}^{-1}$. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Phageninfektion. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Die Bakteriophagen M13 weisen eine filamentöse Struktur mit bis zu 900 nm Länge und 6-8 nm Breite auf und könnten daher die Viskosität der Reaktionslösung verändern. Ein Anstieg der Viskosität verändert die Hydrodynamik, den Massentransfer zwischen Gas- und Flüssigphase und den Wärmetransport im Reaktionssystem. Daher wurde der Einfluss der extrazellulären Bakteriophagenproduktion auf die dynamische Viskosität der Biosuspension untersucht.

Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde während einer Hochzelllichtekultivierung mit und als Referenz ohne Bakteriophagen das Fließverhalten der Zellsuspension und des zellfreien Überstandes untersucht. Das Fließverhalten am Ende der Zulaufkultivierung bei einer Biotrockenmassekonzentration von $66,2 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ (mit Bakteriophagen) und $90,9 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ (ohne Bakteriophagen) ist beispielhaft in Abbildung 6.6 (A und B) dargestellt. Dabei wurde die dynamische Viskosität doppellogarithmisch über die Scherrate aufgetragen.

Die Auftragung der dynamischen Viskosität über die Scherrate der Zellsuspensionen mit und ohne Bakteriophagen zeigte ein strukturviskoses Fließverhalten, wobei die dynamische Viskosität bei der Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen bei gleicher Scherrate höher war. Der zellfreie Überstand mit Bakteriophagen wies ebenso ein strukturviskoses Verhalten auf, wohingegen der zellfreie Überstand ohne Bakteriophagen ein newtonsches Fließverhalten zeigte, dargestellt in Abbildung 6.6 B.

Für die zeitliche Betrachtung der Viskosität während einer Zulaufkultivierung wurde die effektive Scherrate im Rührkesselreaktor anhand der theoretische Beziehung nach Sánchez Pérez et al. (2006), beschrieben unter Gleichung 3.40, berechnet. Diese Beziehung gilt für 6-Blatt-Scheibenrührer bei turbulenten Strömungsbedingungen im Rührkesselreaktor. Unter Berücksichtigung des Konsistenzindex und des Fließindex gilt sie weiterhin für strukturviskose Fluide. Mit Hilfe der berechneten effektiven Scherrate wurde die gemessene Viskosität der Zellsuspension und des zellfreien Überstandes der Hochzelllichtekultivierung über die Prozesszeit bestimmt, dargestellt in Abbildung 6.6 (C und D).

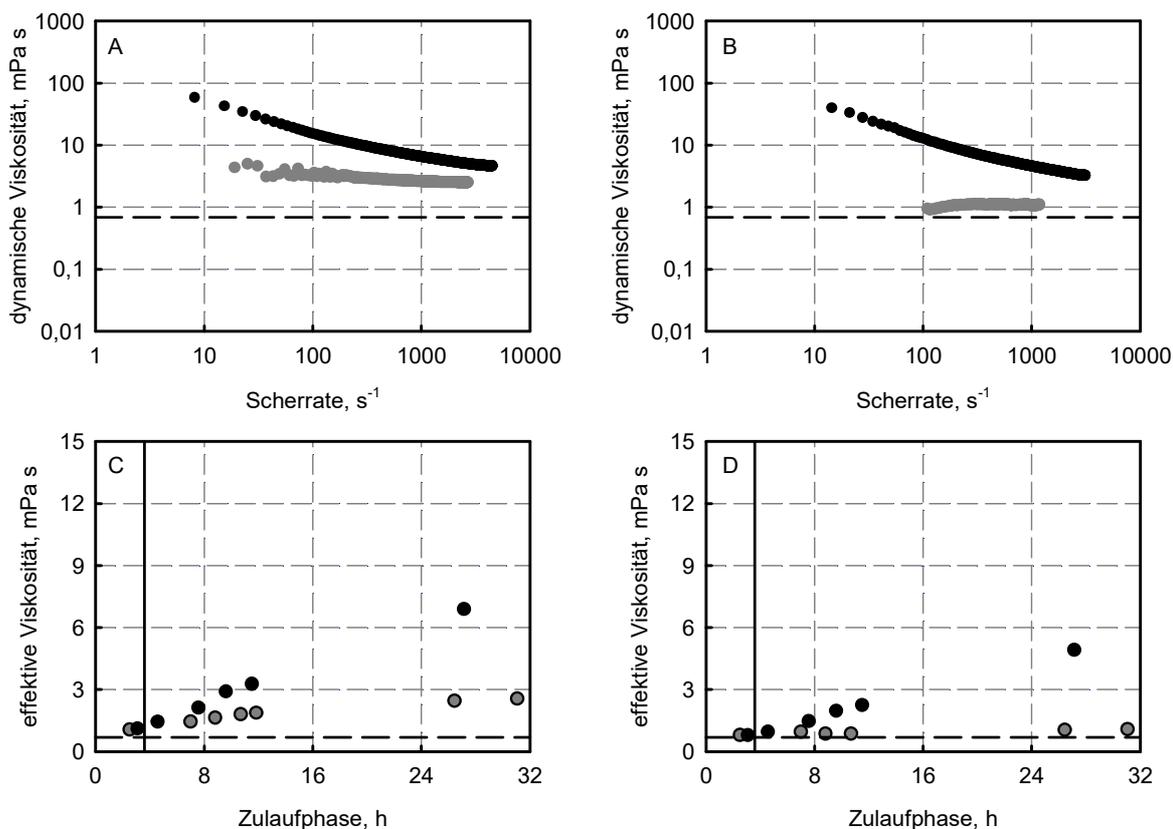


Abbildung 6.6 Untersuchung zum Fließverhalten und zur effektiven Viskosität während der Hochzelllichtekultivierung mit Bakteriophagen. A: Doppellogarithmische Auftragung der dynamischen Viskosität der Zellsuspension mit (●) und ohne (○) Bakteriophagen am Ende einer Hochzelllichtekultivierung über die Scherrate. B: Darstellung des Fließverhaltens des zellfreien Überstandes am Ende einer Hochzelllichtekultivierung mit (●) und ohne (○) Bakteriophagen. C: Auftragung des zeitlichen Verlaufs der effektiven Viskosität der Zellsuspension für die Hochzelllichtekultivierung mit (●) und ohne (○) Bakteriophagen für die jeweilige, zu diesem Zeitpunkt berechnete Scherrate nach Sánchez Pérez et al. (2006). D: Auftragung der effektiven Viskosität des zellfreien Überstandes mit (●) und ohne (○) Bakteriophagen. Die horizontale, gestrichelte Linie symbolisiert die theoretische dynamische Viskosität von Wasser bei 37 °C. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Zugabe der Bakteriophagen.

Die effektive Viskosität der Zellsuspension der Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen stieg kontinuierlich von 1,1 mPa s vor Bakteriophageninfektion auf 6,9 mPa s nach 27 Stunden Zulaufphase an. Hierbei wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $66,2 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die Referenzkultivierung ohne Bakteriophagen zeigte einen flacheren Anstieg der effektiven Viskosität über die Zulaufphase, bei der nach 31 Stunden eine effektive Viskosität von 2,6 mPa s vorlag. Ohne Bakteriophagen wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $90,9 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die Betrachtung des zellfreien Überstandes zeigte, dass die Produktion der Bakteriophagen zu einer Erhöhung der Viskosität von 0,8 mPa s vor der Infektion auf 4,9 mPa s führte. Im Gegensatz dazu stieg die

effektive Viskosität ohne Bakteriophageninfektion von 0,8 mPa s auf 1,1 mPa s an. Die Infektion mit Bakteriophagen führte zu einer Steigerung der Viskosität im zellfreien Überstand um den Faktor 4,4.

Diskussion

Für die Produktion von Bakteriophagen M13 werden wachsende Wirtszellen benötigt, weshalb in Schüttelkolbenkultivierungen aufgrund des begrenzten Substrats und der kurzen Prozesszeit bei niedriger Zelldichte infiziert wird (Sambrook et al. 2001). Aus diesem Grund wurde bei der Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen die Wachstums- und Produktionsphase nicht entkoppelt und während der exponentiellen Zulaufphase bei einer Zelldichte von 26 g L⁻¹ infiziert.

Die Zugabe der Bakteriophagen mit einer Multiplizität der Infektion von 0,003 pfu cfu⁻¹ zu den exponentiell wachsenden Zellen hatte innerhalb der ersten 4,6 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum. Die mit Hilfe der limitierenden Zugabe an Glucose eingestellte Wachstumsrate von 0,15 h⁻¹ wurde erreicht. Dies war in Übereinstimmung mit den in Satzverfahren erhaltenen zellspezifischen Daten für den infizierten Stamm *E. coli* XL1-blue. Die Infektion mit Bakteriophagen reduzierte die maximale spezifische Wachstumsrate von 0,34 h⁻¹ auf 0,24 h⁻¹ (vgl. Kapitel 5). Aus diesem Grund kam es während der exponentiellen Zulaufphase zu keiner Akkumulation der Kohlenstoffquelle Glucose.

Am Ende der exponentiellen Zulaufphase war die Biotrockenmassekonzentration der infizierten Zellen mit 10,5 % signifikant niedriger als im Referenzprozess. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen von 625 pfu cfu⁻¹ erreicht, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass mehr als 99,9 % der Zellen mit Bakteriophagen infiziert wurden. Einer Poisson Verteilung folgend sind ab einem Verhältnis von 7 pfu cfu⁻¹ 99,9 % der Zellen mit mindestens einem Bakteriophagen infiziert (Ellis und Delbrück 1938). Die Biotrockenmassekonzentration zum Prozessende war ebenso niedriger als im Referenzprozess. Die Infektion mit Bakteriophagen führt zur Hochregulation von Wirtsgenen, die für das Prozessieren der Transkription und Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen wie dem Chaperon DnaK codieren (Karlsson et al. 2005). Durch die Integration des Sekretin p4 Proteins in die Cytoplasmamembran von infizierten Zellen kommt es zur Induktion des Phagen Schock Protein A, dass die Integrität der Zellmembran

aufrecht erhält und einen Leistungsverlust des Protonengradienten verhindert (Brissette et al. 1990; Darwin 2005; Model et al. 1997; Rakonjac et al. 2011). Des Weiteren kommt es zur intrazellulären Produktion von ssDNA, Phagenproteinen und der energieintensiven Extrusion der Phagen bei gleichzeitiger Assemblierung über die Zellmembranen. Der erreichte maximale Phagentiter von $2,0 \pm 0,4 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ entspricht hierbei einer Phagenkonzentration von 4,0 g L⁻¹, unter Berücksichtigung der Masse eines Phagenpartikels von $2,0 \cdot 10^{-17}$ g (Salivar et al. 1964). Die im Vergleich zur Zulaufkultivierung ohne Bakteriophagen reduzierte Biotrockenmassekonzentration ist neben der produzierten Masse an Bakteriophagen, in den genannten Auswirkungen einer Infektion auf die Genregulation, die Änderungen im Stoffwechsel, Transkription und Translation und in dem energieintensiven Ausschleusen der Bakteriophagen begründet.

Durch die Übertragung der Kultivierung mit Bakteriophagen vom Satzverfahren auf einen Hochzellichteprozess konnte der maximale Phagentiter von $1,1 \cdot 10^{12}$ pfu mL⁻¹ auf $2,0 \pm 0,4 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ erhöht werden. Dies entsprach einer Steigerung um den Faktor 181. Der in Satzprozessen in Rührkesselreaktoren unter optimierten Reaktionsbedingungen von Grieco et al. (2012) beschriebene maximale Phagentiter von $3,5 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ konnte um einen Faktor von 570 gesteigert werden. Durch die Annäherung des Konzentrationsverlaufs mit einer sigmoidalen Ausgleichskurve konnte zudem der Anstieg des Phagentiters über mehrere Größenordnungen über die Phagenbildungsrate beschrieben werden. Zur Berechnung der Phagenbildungsrate wird der dekadische Logarithmus des Phagentiters verwendet. Dadurch gibt die Phagenbildungsrate den Anstieg des Phagentiters in der Einheit Größenordnungen pro Stunde wieder. Eine einzelne infizierte *E. coli* Zellen kann innerhalb einer Stunde bis zu 1000 Bakteriophagen produzieren, wobei in Satzverfahren reproduzierbar ein Anstieg um 2 Größenordnungen pro Stunde zu verzeichnen ist (Barbas III et al. 2001; Derda et al. 2010). Dementsprechend werden Phagenbildungsraten von 2-3 h⁻¹ erreicht, die um bis zu 1,65 Größenordnungen höher sind als die in dieser Arbeit im Zulaufverfahren erreicht wurden. Diese langsamere Phagenbildungsrate kann durch den limitierten Glucosezulauf und der damit einhergehenden Begrenzung der Wachstumsrate im Zulaufverfahren erklärt werden. Im Gegensatz dazu wachsen Mikroorganismen im Satzprozess bei maximaler Wachstumsrate. Diese Hypothese soll durch die Variation der spezifischen Wachstumsrate während der exponentiellen Zulaufphase untersucht werden. Grundsätzlich ist die in dieser Arbeit durchgeführte Beschreibung des Verlaufs des Phagentiters mit Hilfe der Phagenbildungsrate ein essentieller Grundstein für die

reaktionstechnische Charakterisierung von Einflussfaktoren auf die Hochzelllichtekultivierung mit Bakteriophagen.

Bei der zeitlichen Auflösung der Phageninfektion im Abstand von 5 Minuten wurde ersichtlich, dass der Phagentiter innerhalb der ersten 30 Minuten aufgrund der Adsorption und Infektion der Zellen abnimmt und anschließend neue Bakteriophagen produziert werden. Dieser Verlauf ist durch den Phagenzyklus zu erklären. Das Anheften der Bakteriophagen und die Injektion der ssDNA findet innerhalb von Minuten statt (Forsheit et al. 1971). Anschließend wird die ssDNA in die doppelsträngige, replikative Form (RF-DNA) konvertiert. Ausgehend von dieser RF-DNA kommt es zur Transkription und Translation von Phagenen und der Amplifizierung der RF-DNA innerhalb von 10 Minuten auf 100 bis 200 Kopien über einen *rolling circle* Mechanismus (Hohn et al. 1971). Die Produktion des ssDNA bindenden Phagenproteins P5 in ausreichender Konzentration führt zur Inhibierung der Konvertierung der über den *rolling circle* Mechanismus produzierten ssDNA in die doppelsträngige RF (Marvin 1998). Nach 15-20 Minuten kommt es zur ersten Sekretion von neuen Phagen (Hofschneider und Preuss 1963; Karlsson et al. 2005).

Die Infektion mit einer Multiplizität der Infektion von $0,003 \text{ pfu cfu}^{-1}$ bei einer Zellkonzentration von 26 g L^{-1} ($6,6 \pm 0,1 \cdot 10^{10} \text{ cfu mL}$) in der exponentiellen Zulaufphase führte zu einer Adsorptionsrate von $7,5 \cdot 10^{-13} \text{ mL min}^{-1}$. Für den Bakteriophagen M13 sind Adsorptionsraten von $3 \cdot 10^{-11} \text{ mL min}^{-1}$ beschrieben (Kasman et al. 2002). Dies zeigt, dass die Phagenadsorption unter den gewählten Reaktionsbedingungen während der exponentiellen Zulaufphase in der Hochzelllichtekultivierung deutlich langsamer stattfindet. Die empirische Bestimmung der Adsorptionsrate vereint dabei Unterschiede im ausgewählten Phagen-Wirt System bezüglich Phagenbindungsstellen pro Zelle, die Diffusionskonstanten des Phagen und die Effizienz, mit der Kollisionen zwischen Phagen und Zellen in einer Adsorption und Infektion resultieren. T-Phagen, die bis zu 300 Bindestellen pro Wirtszelle nutzen können, besitzen eine deutlich höhere Adsorptionsrate von $2,4 \cdot 10^{-9} \text{ mL min}^{-1}$, im Vergleich zum filamentösen M13 Bakteriophagen, bei dem nur 2-3 Bindestellen pro Zelle vorliegen (Kasman et al. 2002). Es gibt weiterhin eine Vielzahl von Faktoren, die die Adsorptionsrate beeinflussen. Dazu gehören die Wachstumsphase der Zellen, die Konzentration an zweiwertigen Ionen, die Durchmischung, die Temperatur und die Zellgröße (Adams 1959; Delbrück 1940). Die im Rührkesselreaktor vorliegende turbulente Strömung mit der hohen mittleren Energiedissipation bei der Verwendung von Scheibenblattrührern sollte dazu führte, dass die Häufigkeit von Kollisionen zwischen

Phagen und Zellen erhöht wurde. Die Adsorption hingegen, die auf intermolekularen Wechselwirkungen des P3 Proteins und des F-Pilus beruht, wird möglicherweise verringert. Dies ist ein möglicher Faktor für die niedrigere Adsorptionsrate der M13 Bakteriophagen während der Hochzelllichtekultivierung. Aufgrund der Vielzahl an Einflussfaktoren auf Adsorptionsrate und der nicht verfügbaren Parallelisierbarkeit der Hochzelllichtekultivierung wurde von einer genaueren Charakterisierung der Adsorptionsrate Abstand genommen.

Die Untersuchungen zu einer möglichen Limitierung oder Inhibierung durch Medienbestandteile zeigte, dass die Glucosekonzentration entsprechend dem limitierenden Zulaufprofil in der Zulaufphase unter $39 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$ lag. Diese Konzentration liegt innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs für die Affinitätskonstante bei Glucose von $0,04\text{-}99 \text{ mg L}^{-1}$ (Senn et al. 1994). Hierbei wird nach dem Monod Modell die halbmaximale Wachstumsrate erreicht. Der Verlauf der Ammoniumkonzentration zeigte, dass weder eine Limitierung noch eine Inhibierung aufgrund der Stickstoffquelle vorlag, da die in der Literatur beschriebene inhibitorische Konzentration von $3,1 \text{ g L}^{-1}$ nicht überschritten wurde (Thompson et al. 1985). Zur Erklärung der niedrigeren Ammoniumkonzentration bei der Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen, ist eine Stickstoffbilanzierung über das Reaktionssystem notwendig. Hierfür muss der Austrag von Ammoniak über die Abluft mit Hilfe einer Abgasanalytik bestimmt werden, die jedoch in dem verwendeten Reaktionsaufbau nicht zur Verfügung stand.

Zweiwertige Magnesiumionen sind essentielle Elemente für biologische Systeme. Durch den zeitlichen Verlauf der Magnesiumkonzentration während der Zulaufkultivierung mit Bakteriophagen konnte eine Limitierung ausgeschlossen werden. Bei Prozessende lag eine Magnesiumkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ vor, die Summe aus vorgelegter und zugegebener Menge an Magnesium lag zu Prozessende bei $0,71 \text{ g L}^{-1}$. Chmiel (2011) gibt für die Elementarzusammensetzung von *E. coli* in Bezug auf Magnesium einen Bereich von 0,1-0,5 % an. Der Verbrauch von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Magnesium ermöglicht unter der Annahme einer Elementarzusammensetzung von 0,5 % eine theoretische Biotrockenmassekonzentration von 100 g L^{-1} . Für die Zulaufkultivierung ohne Bakteriophagen stimmte diese theoretische Abschätzung, während die Produktion von Bakteriophagen zu einem vergleichbaren Verbrauch an Magnesium bei niedrigerer Biotrockenmassekonzentration führte.

In Übereinstimmung mit den von Korz et al. (1995) gezeigten Ergebnissen, nimmt die Phosphatkonzentration bei der Hochzelllichtekultivierung mit *E. coli* über die Prozesszeit ab, und kann zum limitierenden Substrat werden. Dies geht mit der Akkumulation von Glucose einher, da die Aufnahme über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PEP-PTS) phosphatlimitiert ist. Zu Prozessende konnten Phosphatkonzentrationen von $0,7 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ ohne Bakteriophagen, und $1,7 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ mit Bakteriophagen nachgewiesen werden. Es kam ebenfalls zu keiner nachweisbaren Glucoseakkumulation, weshalb nicht von einer wie bei Korz et al. (1995) beschriebenen Phosphatlimitierung ausgegangen werden muss. Durch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und die niedrige Glucosekonzentration im Bereich der Werte der Affinitätskonstante kam es durch die exponentielle Zulaufstrategie mit reduzierter spezifischen Wachstumsrate zu Acetatkonzentrationen unterhalb von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (Riesenberg et al. 1991). Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass für das Zulaufverfahren mit Bakteriophagen keine Limitierung oder Inhibierung durch Medienbestandteile vorlag.

Für die Berechnung der effektiven Scherrate sind in der Literatur viele meist empirische Gleichungen zu finden, die sich teilweise stark unterscheiden (Hortsch 2011). Dabei ist zu beachten, dass diese empirischen Gleichungen oftmals für verschiedene Rührertypen und Reaktionssysteme, wie beispielsweise Schüttelkolben oder Rührkesselreaktoren, erstellt wurden. So stellen Kelly und Gigas (2003) Gleichungen für vorwiegend axial fördernde Rührern auf. Die von Sánchez Pérez et al. (2006) beschriebene Gleichung 3.40 ist für 6-Blatt-Scheibenrührern in Rührkesselreaktoren mit der geometrischen Beziehung von Reaktordurchmesser gleich Füllhöhe abgeleitet. Weiterhin entspricht der Reaktordurchmesser dem dreifachen Wert des Rührerdurchmessers. Diese Beziehung gilt zudem für turbulente Strömungen, und unter Berücksichtigung des Konsistenzindex und des Fließindex, für strukturviskose Fluide. Aus diesen Gründen ist die Berechnung der effektiven Scherrate mit dieser Gleichung belastbar und in Übereinstimmung mit empirisch bestimmten Gleichungen (Sánchez Pérez et al. 2006).

Eine experimentelle Methode zur Berechnung der effektiven Scherrate wird von Peter et al. (2004) beschrieben. Unter der Annahme, dass zwei Flüssigkeiten (newtonsch und strukturviskos) die gleiche effektive dynamische Viskosität besitzen, wenn bei gleicher Rührerdrehzahl ein identischer Leistungseintrag erreicht wird, kann durch Messung des Leistungseintrags und der rheologischen Eigenschaften, eine Korrelation von Rührerdrehzahl und effektiver Scherrate ermittelt werden. Diese experimentelle Berechnung

wurde für die Bestimmung der Scherrate in Schüttelkolben etabliert, wobei hierbei von einer Abweichung von $\pm 50\%$ ausgegangen werden muss, da vor allem bei hohen Scherraten die Schnittpunkte der Kurven flach und daher fehlerbehaftet sind (Peter 2006). Im Zulaufprozess mit Bakteriophagen war speziell das Prozessende mit hohen Biotrockenmasse- und Bakteriophagenkonzentrationen von großem Interesse, bei dem hohe Rührerdrehzahlen und damit einhergehend hohe Scherrate vorlagen. Aus diesen Gründen wurde auf eine experimentelle Bestimmung verzichtet und die von Sánchez Pérez et al. (2006) validierte theoretische Berechnung verwendet.

Der Anstieg der Viskosität konnte eindeutig der extrazellulären Produktion von Bakteriophagen zugeordnet werden. Die filamentösen M13mp18 Bakteriophagen sind bis zu 900 nm lang und 6-8 nm breit. Aufgrund der polaren Struktur verfügen sie über selbstassemblierenden Eigenschaften zu kolloidalen Membranen (Dogic und Fraden 2006; Sharma et al. 2014). Die selbstassemblierenden Eigenschaften und die filamentöse, stabförmige Struktur, sind Gründe für den Anstieg der Viskosität. Stabförmige Partikel führen in Suspension zum Anstieg der Viskosität (Ganani und Powell 1985). Die Viskosität der Bakteriensuspension ohne Bakteriophagenproduktion war in Übereinstimmung mit Literaturdaten zu *E. coli*, die bei einer optische Dichte von 200 zu Beginn der stationären Phase eine Viskosität zwischen 2 und 3 mPa s beschreiben (Newton et al. 2016). Erst bei einsetzender Zellyse, 45 Stunden nach Induktion, steigt die Viskosität auf 5-7 mPa s an. Dieser Anstieg ist in der Freisetzung intrazellulärer Bestandteile wie chromosomaler DNA, Proteinen und weiteren Bestandteilen begründet und kann dementsprechend als qualitative Analytik für den Beginn der Absterbephase genutzt werden (Newton et al. 2016).

6.2.2 Vergleichende Untersuchung zweier Wirtsstäme zur Phagenproduktion

Nachdem die Infektion mit Bakteriophagen während der Hochzelllichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue erfolgreich war und hohe maximale Phagentiter erreicht wurden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Ergebnisse mit einem anderen F-Plasmid tragenden Stamm reproduziert werden können. Dafür wurde der Stamm *E. coli* JM 109 verwendet, der als verbesserter Wirtsstamm für die Infektion mit M13mp Varianten entwickelt wurde. Neben molekularbiologischen Verbesserungen ist hierbei die F-Plasmid Selektion ohne Antibiotikum über eine Prolinauxotrophie möglich. Das F-Plasmid enthält die codierenden Regionen für die Prolinsynthese. Um einen Selektionsdruck zu erzeugen, wurde daher die Kultivierung in definiertem Minimalmedium ohne Komplexbestandteile wie Hefeextrakt oder anderen Prolinquellen durchgeführt.

Die Zulaufkultivierung mit *E. coli* JM 109 und anschließende Infektion mit Bakteriophagen M13mp18 wurde wie in Kapitel 6.1 durchgeführt. Der Vergleich zwischen der Hochzelllichtekultivierung der Stämme *E. coli* JM 109 und *E. coli* XL1-blue ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Der Konzentrationsverlauf der Biotrockenmasse war entsprechend dem limitierenden Zulaufprofil innerhalb der ersten 12 Stunden vergleichbar. Zu Prozessende wurde bei der Zulaufkultivierung mit dem Stamm *E. coli* JM 109 eine Zellkonzentration von $77,5 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Diese war um 16 % höher als in der Referenzkultivierung mit dem Stamm *E. coli* XL1-blue. Der zeitliche Verlauf des Phagentiters war für die Zulaufkultivierung mit beiden Stämmen vergleichbar, dies spiegelt sich in der berechneten Phagenbildungsrate, dargestellt in Abbildung 6.7 B, wider. Es wurden maximale Phagenbildungsraten von $1,25 \text{ h}^{-1}$ bei der Infektion des Stammes *E. coli* XL1-blue und $1,21 \text{ h}^{-1}$ mit dem Stamm *E. coli* JM 109 erreicht.

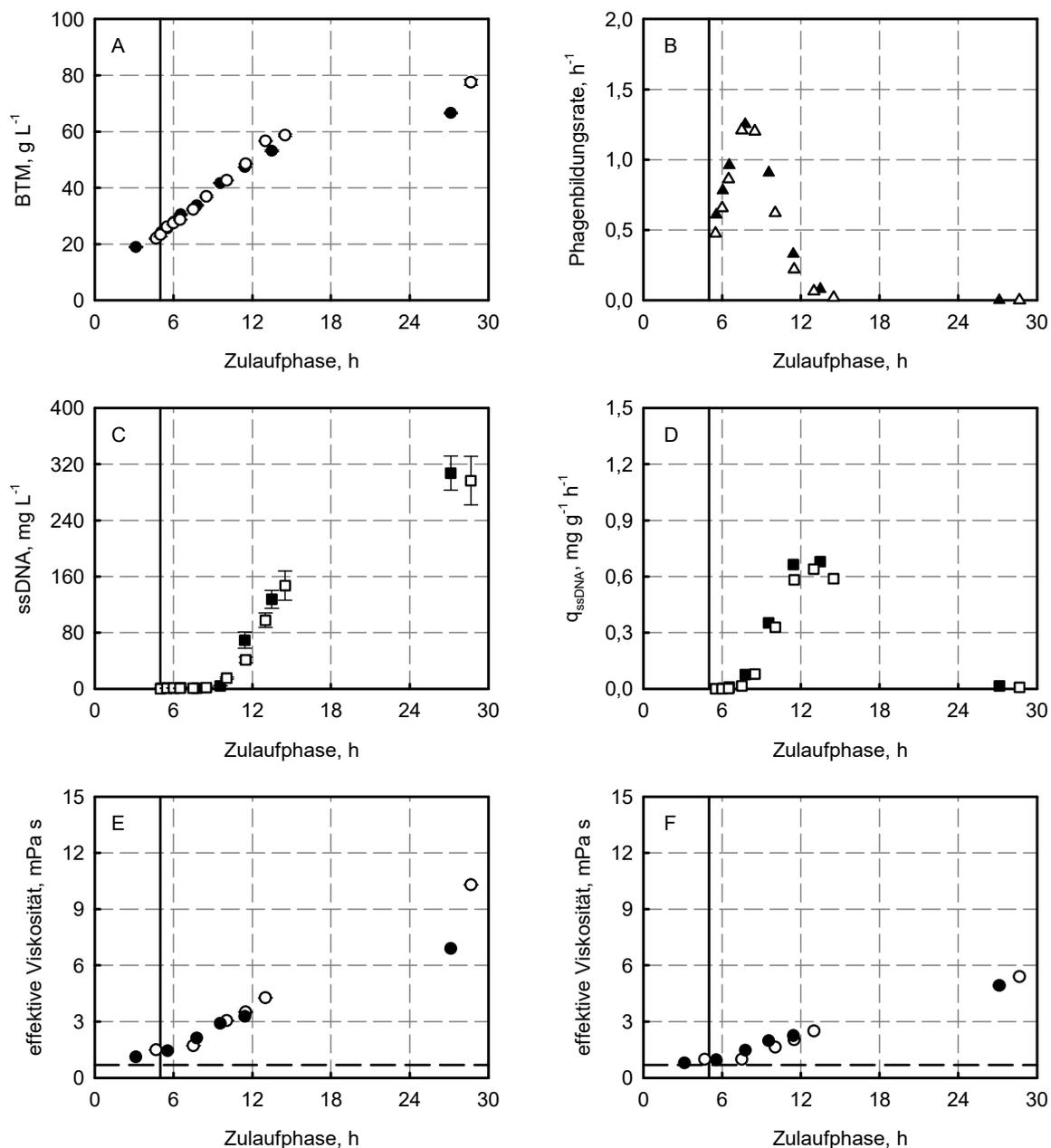


Abbildung 6.7 Hochzellichtekultivierung mit zwei Wirtsstämmen zur Phagenproduktion. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (A), der Phagenbildungsrate (B) und der isolierten ssDNA (C) für die Hochzellichtekultivierung mit Bakteriophageninfektion der Stämme *E. coli* XL1-blue (schwarze Symbole) und JM 109 (weiße Symbole). Des Weiteren sind die biomassespezifische ssDNA Bildungsraten (q_{ssDNA}) (D), die effektive Viskosität der Zellsuspensionen (E) und der zellfreien Überstände (F) über die Zulaufphase aufgetragen. Die Zulaufkultivierung wurde unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer definierten Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Bakteriophageninfektion. Die horizontale, gestrichelte Linie symbolisiert die theoretische dynamische Viskosität von Wasser bei 37 °C . Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Der zeitliche Verlauf der isolierten ssDNA Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Wirtsstämmen. Nach 27 Stunden Zulaufphase wurden mit dem Stamm *E. coli* XL1-blue $307 \pm 24 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA produziert, während mit dem Stamm *E. coli* JM 109 nach 28 Stunden $296 \pm 34 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA isoliert werden konnten. Die Werte befanden sich innerhalb der Standardabweichung der verwendeten ssDNA Analytik. Dabei wurden maximale spezifische ssDNA Bildungsraten von $0,68 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*E. coli* XL1-blue) und $0,64 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*E. coli* JM 109) 8 Stunden nach Infektion mit Bakteriophagen erreicht.

Die effektive Viskosität der Zellsuspension und des zellfreien Überstandes der Hochzelllichtkultivierungen sind in Abbildung 6.7 E und F dargestellt. Die Viskosität der Zellsuspensionen zeigte innerhalb der ersten 12 Stunden der Zulaufphase keine stammspezifischen Unterschiede, am Prozessende wurde bei der Zulaufkultivierung mit *E. coli* JM 109 eine Viskosität von $10,3 \text{ mPa s}$ bestimmt. Dies stellte eine 49 % Erhöhung im Vergleich zur Zulaufkultivierung mit *E. coli* XL1-blue dar. Die Viskosität der zellfreien Überstände waren dahingegen vergleichbar.

Diskussion

Bezüglich des Wachstumsverhaltens nach Infektion mit Bakteriophagen, waren die zwei Wirtsstämme *E. coli* XL1-blue und *E. coli* JM 109 vergleichbar. Die Verläufe der Phagenbildungsrate, der isolierten ssDNA und der biomassespezifischen ssDNA Bildungsrate waren für beide Wirtsstämme identisch. Der zeitliche Unterschied zwischen dem Erreichen der maximalen Phagenbildungsrate und der maximalen biomassespezifischen ssDNA Bildungsrate war in der verwendeten Berechnungsmethode begründet. Für die Bestimmung der Phagenbildungsrate wurde der zeitliche Verlauf des dekadischen Logarithmus des Phagentiters verwendet, wohingegen aus der linearen Auftragung der ssDNA Konzentration die biomassespezifische ssDNA Bildungsrate berechnet wurde. Bei der Betrachtung der effektiven Viskosität der Zellsuspension zeigte sich ein signifikanter Unterschied zum Prozessende. Die höhere Viskosität der Zulaufkultivierung mit *E. coli* JM 109 kann in der zu diesem Zeitpunkt höheren Biotrockenmassekonzentration begründet sein. Die innerhalb der Standardabweichung identische Bakteriophagenkonzentration, ersichtlich an der identischen ssDNA, führt hingegen zu einer vergleichbaren Viskosität im zellfreien Überstand.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass der etablierte Hochzelllichteprozess auch mit verschiedenen Wirtsstämmen reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Dies spiegelte die hohe Robustheit des entwickelten Bioprozesses wider.

6.2.3 Produktion einzelsträngiger DNA für die DNA Origami Technologie

Für die selbstassemblierende Reaktion zur Bildung von Nanoobjekten aus DNA mit Hilfe der *scaffolded* DNA Origami Technologie werden unterschiedliche Gerüststränge verwendet. Diese Gerüststränge basieren auf dem Genom des Bakteriophagen M13mp18, besitzen jedoch Genominserts in der multiplen Klonierungsstelle, wodurch verschiedene Längenvarianten erstellt werden konnten (Douglas et al. 2009). Nachdem der etablierte Hochzelllichteprozess mit Bakteriophagen auch mit verschiedenen Wirtsstämmen reproduzierbar durchgeführt werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob ebenso verschiedene Längenvarianten der Bakteriophagen M13mp18 produziert werden können.

Der Bakteriophage M13mp18 (7249 Basen) diente als Referenz, während zwei weitere M13 Bakteriophagen mit einer Genomlänge von 7560 und 8064 Basen als Längenvarianten verwendet wurden. Die erhaltenen Ergebnisse der Zulaufkultivierung mit *E. coli* XL1-blue sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Der Konzentrationsverlauf der Biotrockenmasse war in guter Übereinstimmung zueinander, zu Prozessende wurde eine mittlere Biotrockenmassenkonzentration von $64,2 \pm 2,9 \text{ g L}^{-1}$ bei den drei Zulaufkultivierungen erreicht. Dies entsprach einer relativen Standardabweichung von 4,6 %. Das Verhältnis aus Bakteriophagen zu Zellen (R_{PX}) stieg über die Zulaufphase von 0,003 auf maximal $1303 \text{ pfu cfu}^{-1}$ an. Der Verlauf des Phagentiters konnte in den drei Zulaufkultivierungen reproduziert werden und es wurde eine mittlere maximale Konzentration von $1,5 \pm 0,6 \cdot 10^{14} \text{ pfu mL}^{-1}$, mit einer relativen Standardabweichung von 39 % aus drei Zulaufkultivierungen erreicht. Die maximale Phagenbildungsrate konnte für die drei Zulaufkultivierungen mit $1,4 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ (relative Standardabweichung von 3,8 %) bestimmt werden.

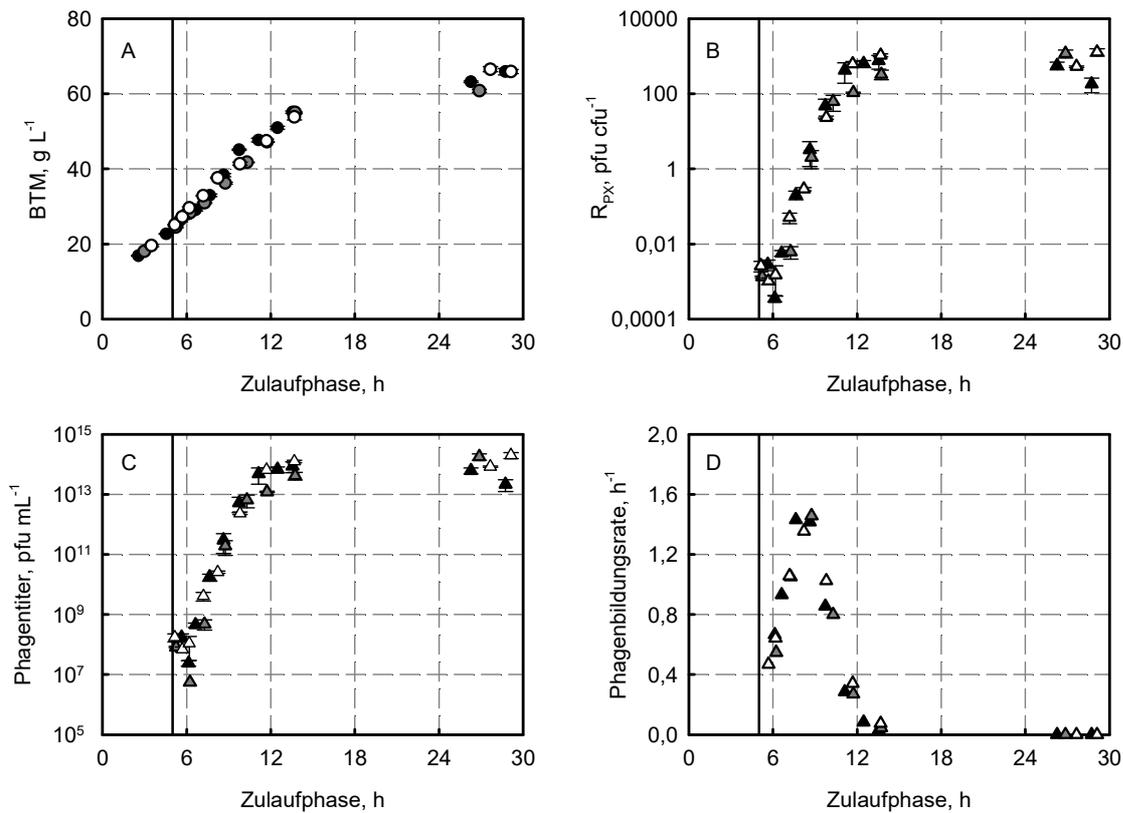


Abbildung 6.8 Produktion verschiedener Bakteriophagen M13 Varianten. Dargestellt sind die Zulaufkultivierungen von *E. coli* XL1-blue mit den M13 Varianten mit einer Genomlänge von 7249 (weiße Symbole), 7560 (schwarze Symbole) und 8064 (graue Symbole) Basen. Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (A), des Verhältnisses von Bakteriophagen zu Zellen (R_{PX}) (B), des Phagentiters (C) und der Phagenbildungsrate (D). Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer definierten Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Bakteriophageninfektion. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Nach 29 Stunden Zulaufphase wurde die Hochzelldichtekultivierung beendet und die Reinigung, sowie die Isolierung der genomischen ssDNA der Bakteriophagen durchgeführt. Das in der Literatur beschriebene Reinigungsprotokoll wurde auf die technische Ausstattung angepasst und, wie unter Kapitel 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden zunächst die extrazellulär produzierten Bakteriophagen von den Wirtszellen mit Hilfe der fest-flüssig Separation getrennt. Anschließend wurden die Bakteriophagen bei hoher Ionenstärke durch Zugabe von Polyethylenglykol präzipitiert, bevor die Bakteriophagen chemisch lysiert wurden. Die freigesetzte ssDNA wurde im Folgenden in 50 % Ethanol präzipitiert und nach einem weiteren Waschschrift in dem gewünschten Puffer gelöst. Die auf das

Reaktionsvolumen bezogene isolierte ssDNA Konzentration der drei Hochzelllichtekultivierungen ist in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Tabelle 6.1 Isolierte ssDNA Konzentration aus der Hochzelllichtekultivierung verschiedener M13 Bakteriophagenvarianten. Die Ausbeute berechnete sich aus der maximalen Phagenmenge im Zulaufprozess und der isolierten ssDNA Menge, unter der Annahme, dass in einem Bakteriophagen eine genomische ssDNA verpackt ist.

| ssDNA, Basen | max. BTM, g L ⁻¹ | Isolierte ssDNA, mg L ⁻¹ | Ausbeute, % |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------|
| 7249 | 65,9 ± 0,6 | 410 ± 12 | 55 |
| 7560 | 65,9 ± 0,8 | 372 ± 49 | 60 |
| 8064 | 60,8 ± 0,4 | 368 ± 13 | 50 |

Bei den Hochzelllichtekultivierungen konnten bezogen auf das Reaktionsvolumen im Mittel $384 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA isoliert werden. Dies entspricht einer relativen Abweichung von 6,1 % für die drei Zulaufkultivierung mit unterschiedlichen Bakteriophagenvarianten. Die Ausbeute für den gesamten Reinigungsprozess liegt bei $55 \pm 5 \%$ unter der Annahme, dass ein Bakteriophagenpartikel genau ein ssDNA Molekül enthält. Dabei konnte nach der Phagenpräzipitation mit Polyethylenglykol 0,004 % infektiöse M13 Phagen im Überstand nachgewiesen werden und nach der Phagenlyse 0,001 %.

Diskussion

Die Hochzelllichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue mit verschiedenen Bakteriophagen M13 Varianten konnte erfolgreich mit niedrigen Standardabweichungen unter 7 % in Bezug auf die maximale Biotrockenmassekonzentration, die Phagenbildungsrate und die isolierte ssDNA Konzentration reproduziert werden. Die hohe Standardabweichung des Phagentiters war auf die Analysemethode zurückzuführen. Für den hierfür verwendeten Plaque Test sind hohe Probenverdünnungen von bis zu 10^{-11} nötig, die zu hohen analytischen Standardabweichungen führen.

Die Produktion von ssDNA als Gerüst für die DNA Origami Technologie wurde bisher in Satzverfahren im Schüttelkolben mit dem Bakteriophagen M13mp18 durchgeführt. Dabei werden ssDNA Konzentration von $1\text{-}14 \text{ mg L}^{-1}$ isoliert (Bellot et al. 2013; Sambrook et al. 2001). In Satzverfahren mit *E. coli* XL1-blue mit Bakteriophageninfektion konnten

reproduzierbar 4 mg L^{-1} ssDNA isoliert werden. Die Produktion und Isolierung von $384 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$ während der Hochzelllichtkultivierung im Rührkesselreaktor stellte dementsprechend eine Steigerung um den Faktor 96 dar.

Neben der Quantität wurde die Qualität der isolierten ssDNA über das Migrationsverhalten in der Agarosegelelektrophorese bestimmt. Dazu wurde vergleichend kommerziell erhältliche und im Satzverfahren im Schüttelkolben selbst isolierte ssDNA untersucht. Des Weiteren wurde die isolierte ssDNA als Gerüst für die Selbstassemblierungsreaktion eingesetzt und zum Falten von zwei- und dreidimensionalen Strukturen verwendet. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Lehrstuhl für biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München durchgeführt und sind in Abbildung 6.8 dargestellt, entnommen aus Kick et al. (2015).

Die aus dem Hochzelllichtprozess isolierte ssDNA zeigte ein zu den Referenzproben aus der Satzkultivierung im Schüttelkolben vergleichbares Bandenmuster. Ebenso war die kommerziell erhältliche M13mp18 ssDNA (7249) im Migrationsverhalten vergleichbar, dargestellt in Abbildung 6.9 a. Die Abwesenheit von zusätzlichen Banden durch beispielsweise chromosomale DNA von *E. coli*, oder das intrazellulär vorliegende doppelsträngige Bakteriophagen genom, über und unter dem isolierten Produkt, deutet auf eine hohe Qualität hin.

Die Anwendung der isolierten ssDNA in der *scaffolded* DNA Origami Technologie wurde mit der von Rothemund publizierten zweidimensionalen rechteckigen und drei weiteren dreidimensionalen Strukturen überprüft, dargestellt in Abbildung 6.9 (c, d und e). Die verwendete rechteckige Struktur kann aus allen 3 Längensvarianten (7249, 7560 und 8064) gefaltet werden. Sie besitzt eine ssDNA Schleife, die das Genominsert in der multiplen Klonierungsstelle der Varianten 7560 und 8064 enthält. Das Migrationsverhalten der assemblierten Produkte zeigte definierte Banden, die auf eine gleichmäßige Faltung der Nanostrukturen hindeuten, unabhängig der Produktionsmethode für den Gerüststrang. Das verlangsamte Migrationsverhalten der längeren ssDNA Varianten war in der ausgebildeten DNA Schleife begründet. Eine Inkubation von infizierten *E. coli* von über 5 Stunden kann im Schüttelkolben zu Genomdeletionen, speziell in der multiplen Klonierungsstelle, führen (Sambrook et al. 2001). Durch die Abwesenheit von schneller migrierenden Banden in den Proben der Varianten 7560 und 8064 kann dies für die aus dem Bioreaktor isolierte ssDNA ausgeschlossen werden.

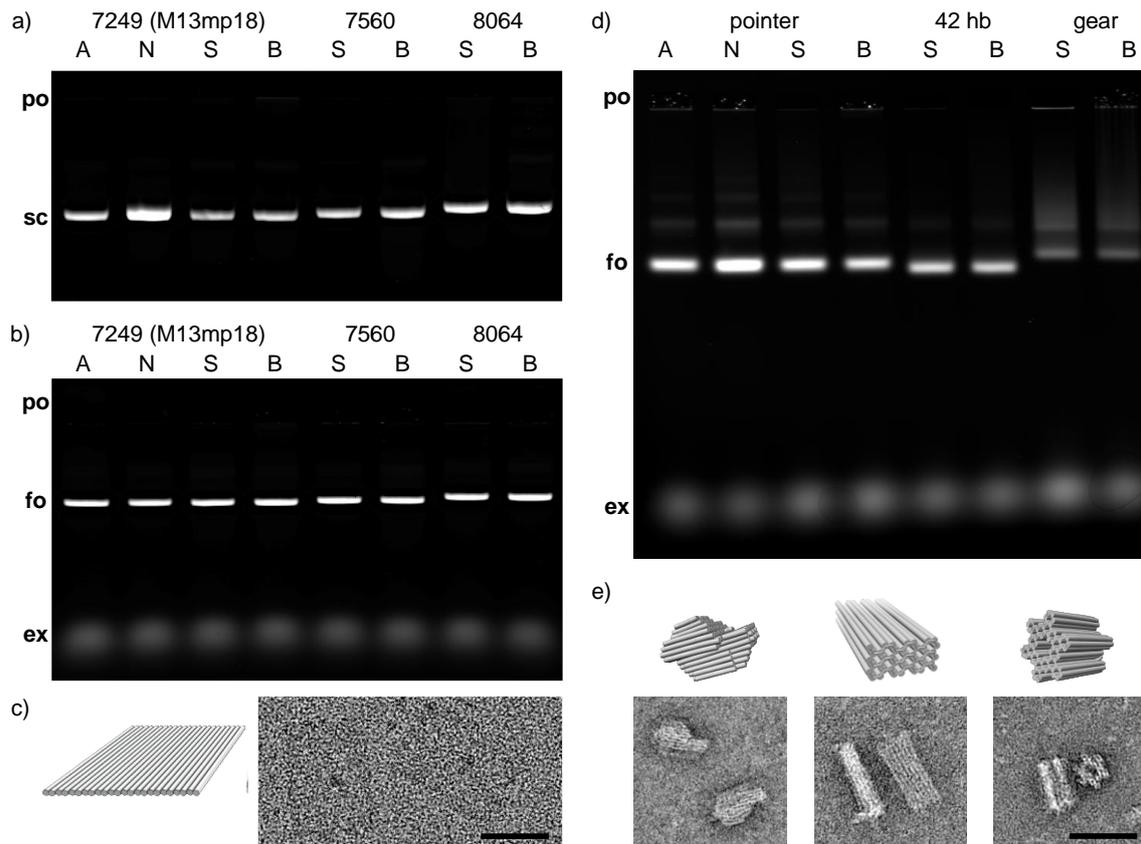


Abbildung 6.9 Bestimmung der Qualität und Anwendung der ssDNA in der *scaffolded* DNA Origami Technologie. a: Bild des Migrationsverhaltens der isolierten ssDNA Längenvarianten (7249, 7560, 8064 Basen) im Vergleich zu kommerziell erhältlicher ssDNA (7249 Basen). Beschriftung: A, Affymetrix; N, New England Biolabs (kommerzielle Anbieter); S, Schüttelkolben; B, Bioreaktor; po, Geltasche; sc, Gerüststrang ssDNA. b: Gelbild, auf dem das Produkt der selbstassemblierenden Reaktion zur Faltung eines zweidimensionalen Rechtecks nach Rothemund (2006) analysiert wurde. Dafür wurde die isolierte Gerüst ssDNA unter (a) verwendet. Zusätzliche Beschriftung: fo, gefaltete Struktur; ex, überschüssige Klammerstrukturen. c: Grafik und TEM Aufnahme des zweidimensionalen Rechtecks, produziert mit der aus dem Bioreaktorprozess isolierten ssDNA 7249. d: Gelbild, auf dem das Produkt der selbstassemblierenden Reaktion zur Faltung ausgewählter dreidimensionaler Nanostrukturen analysiert wurde. Zur Faltung des *pointer* wurde die ssDNA 7249, des 42-Helixbündels die ssDNA 7560 und die an ein Getriebe angelehnte Struktur (*gear*) die ssDNA 8064 verwendet. e: Mit CanDo erstellte Modelle (oben) (Castro et al. 2011; Kim et al. 2012) und TEM Aufnahme (unten) der drei Nanostrukturen aus (d). Maßstab: 50 nm. (entnommen aus Kick et al. (2015)).

Die Faltung von weiteren Nanostrukturen konnte erfolgreich mit der isolierten ssDNA durchgeführt werden, unabhängig vom Produktionsverfahren, dargestellt in Abbildung 6.9 (d, e). So konnte die an ein Getriebe angelehnte Nanostruktur vergleichbar zur Referenz ssDNA gefaltet werden. Bei dieser Struktur kommt es häufig zur Bildung von Aggregaten während der Selbstassemblierungsreaktion, erkennbar an dem ausgeprägten Bandenmuster über der gewünschten Bande.

Das homogene Migrationsverhalten der ssDNA und die Anwendbarkeit in der *scaffolded* DNA Origami Technologie verdeutlichen, dass der erarbeitete Hochzelllichtprozess im Litermaßstab zur Produktion reiner bakteriophagenbasierter ssDNA im Gramm-Maßstab verwendet werden kann (Kick et al. 2015).

6.3 Reaktionstechnische Untersuchung des Hochzelllichteprozesses mit dem Bakteriophagen M13²

6.3.1 Einfluss der Phosphatkonzentration

Durch die Verwendung eines chemisch definierten Mediums konnte eine mögliche Limitierung oder Inhibierung durch Medienbestandteile über enzymatische und kolorimetrische Quantifizierungsmethoden untersucht werden. Dabei wurde die vorhandene Glucosekonzentration, die Konzentration an Ammonium-, Phosphat- und Magnesiumionen und die Konzentration des Hauptnebenprodukts Acetat, über die Prozesszeit bestimmt, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben. Lediglich die Konzentration an Phosphat nahm über den Kultivierungszeitraum deutlich ab. Die Konzentrationen der anderen untersuchten Komponenten waren im Vergleich zu Literaturwerten weder limitierend noch inhibierend. Aus diesem Grund sollte eine mögliche Limitierung der Produktion von Bakteriophagen durch eine intermittierende Phosphatzugabe vermieden werden, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.10 dargestellt.

Die zusätzliche Phosphatdosierung führte zu keiner Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration bei der Zulaufkultivierung von *E. coli* XL1-blue mit Bakteriophageninfektion. Im Vergleich zu nicht infizierten Zellen war die Biotrockenmassekonzentration um 29 % reduziert. Durch die intermittierende Phosphatdosierung mit $0,35 \text{ g}_{\text{Phosphat}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab dem Zeitpunkt der Infektion mit Bakteriophagen lag die Phosphatkonzentration zwischen $8\text{-}12 \text{ g L}^{-1}$. Bei der intermittierenden Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus dem Zulaufmedium entfernt, um die Akkumulation von Ammonium im Medium zu verhindern. Die Ammoniumkonzentration wurde im Bereich zwischen $0,7\text{-}1,7 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt, wodurch eine Limitierung oder Inhibierung ausgeschlossen wurde (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Konzentration an Phosphationen im Kultivierungsmedium zeigte keinen signifikanten

² Teile dieses Abschnitts sind bereits publiziert in: Kick B, Hensler S, Praetorius F, Dietz H, Weuster-Botz D. Specific growth rate and multiplicity of infection affect high-cell-density fermentation with bacteriophage M13 for ssDNA production. *Biotechnology and Bioengineering* 114: 777-784.

Einfluss auf den Verlauf des Phagentiters und keine signifikante Erhöhung der maximalen ssDNA Konzentration zu Prozessende, dargestellt in Abbildung 6.10 (C und D).

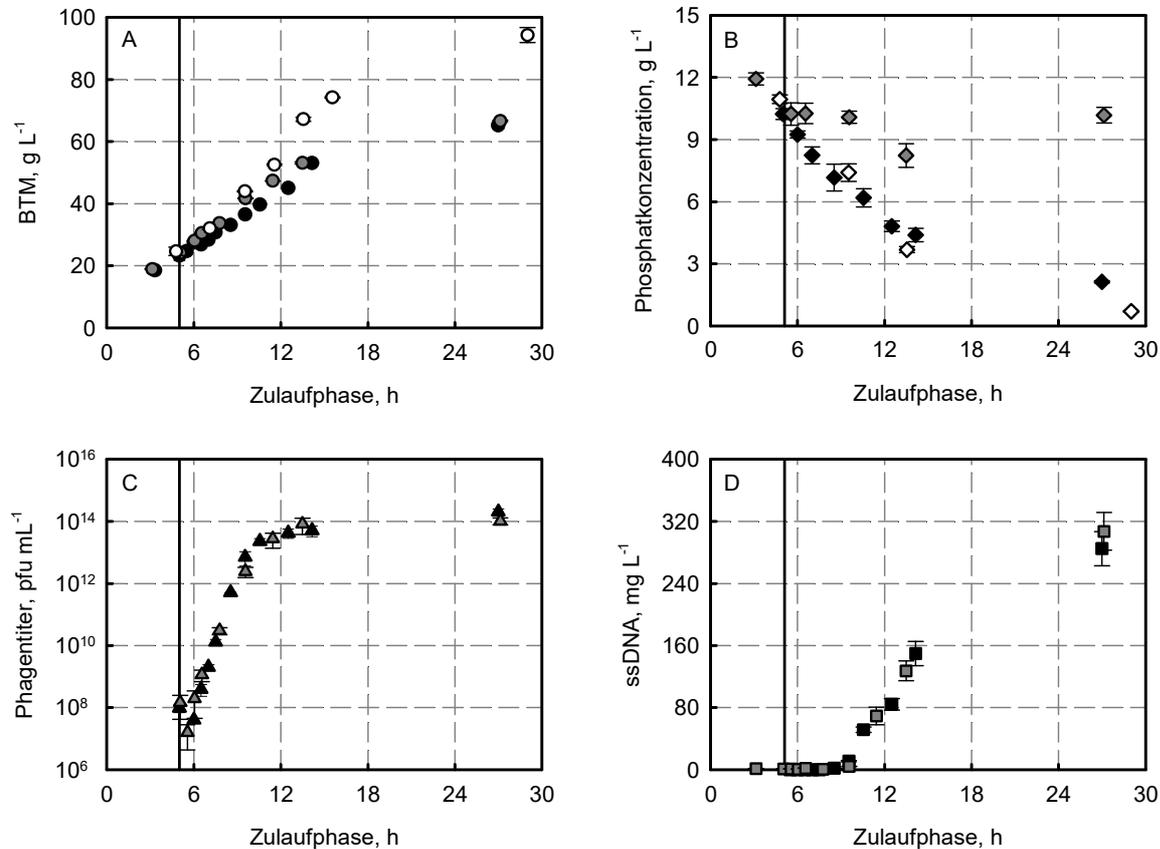


Abbildung 6.10 Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen. Vergleich der Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* XL1-blue MRF⁺ ohne (weiße Symbole) und mit Bakteriophageninfektion (schwarze Symbole). Die Zulaufkultivierung von infizierten *E. coli* mit zusätzlicher intermittierender Zugabe von (NH₄)₂HPO₄ (graue Symbole) ist ebenfalls aufgetragen. Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse (A), der Phosphationen (B), der Phagen (C) und der isolierten ssDNA über die Zulaufphase. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer definierten Wachstumsrate von 0,15 h⁻¹ im Rührkesselreaktor, in definiertem Medium durchgeführt. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Phageninfektion. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Für die Anwendung in der *scaffolded* DNA Origami Methode ist die Bestimmung der Qualität der ssDNA über Agarosegelelektrophorese unabdingbar, dargestellt in Abbildung 6.11. Identische Zulaufkultivierungen mit intermittierender Phosphatdosierung wurden ebenso mit KH₂PO₄, ein Medienbestandteil des definierten Mediums nach Riesenberg et al. (1991), durchgeführt. Bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens waren bei der isolierten ssDNA aus der Zulaufkultivierung mit KH₂PO₄ Verunreinigungen

über der Zielbande zwischen 1,5-2,0 kbp zu erkennen, die weder in der Referenz ssDNA, noch in der isolierten ssDNA aus der Zulaufkultivierung mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ auftraten.

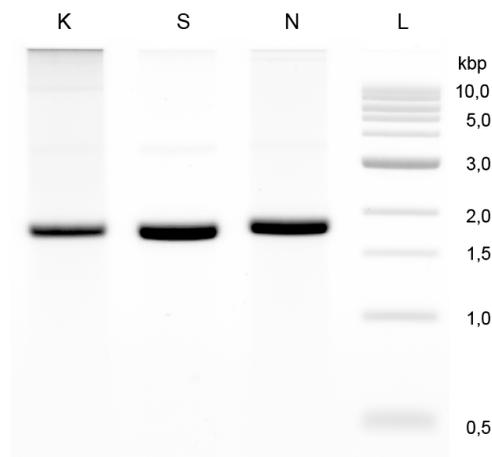


Abbildung 6.11 Untersuchung des Migrationsverhaltens der isolierten ssDNA in einem Agarosegel. Aufgetragen ist die isolierte ssDNA der Zulaufkultivierungen von *E. coli* XL1-blue mit zusätzlicher KH_2PO_4 (K, Variante 7249 Basen) und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (N, Variante 7560 Basen) Dosierung. Des Weiteren ist als Standard (S, 7249 Basen) die in Kapitel 6.2.3 produzierte ssDNA aufgetragen. Die 4. Linie enthält die 1 kbp Leiter (L). Bedingungen: 2 % Agarose, 11 mM MgCl_2 , 90 V, 500 mA.

Diskussion

Durch die zusätzliche Phosphatdosierung während der Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen konnte eine mögliche Phosphatlimitierung des Zellwachstums und der Produktion von Bakteriophagen ausgeschlossen werden. Dabei zeigte sich, dass die Wahl der Phosphatquelle einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der isolierten ssDNA hat. Bei der Verwendung von KH_2PO_4 kam es zu stärkeren Verunreinigungen, obwohl dies ein Medienbestandteil im definierten Medium nach Riesenberg et al. (1991) ist. Anderson et al. (1975) zeigten, dass es zu einer Dissoziation des Protein-DNA Komplexes aus pV Protein und ssDNA kommt, wenn eine Konzentration von 0,1 M divalenter oder 0,5 M monovalenter Kationen *in vitro* erreicht wird. Im Phagenzyklus verhindert der Komplex aus pV Protein und ssDNA die Umwandlung der ssDNA zur doppelsträngigen, replikativen Form (Stassen et al. 1995). Das ssDNA bindende Protein pV wird im Phagenzyklus bei der Extrusion der ssDNA und Assemblierung der Bakteriophagen durch das Hüllprotein pVIII ersetzt. Die zusätzliche KH_2PO_4 Dosierung führte zu einem theoretischen Anstieg der Kaliumkonzentration um 50 % auf 0,3 M am Ende der Zulaufkultivierung. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration kann theoretisch in Abhängigkeit der Osmolalität bis auf

$0,93 \pm 0,05 \text{ mol kg}^{-1}$ in *E. coli* ansteigen (Richey et al. 1987). Die Konzentrationsänderung einer Medienkomponente führte dementsprechend zur Verschlechterung der Qualität der isolierten ssDNA und zeigte die Sensitivität des Produktionsprozesses bezüglich dem verwendeten Medium. Die Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ konnte erfolgreich ohne Reduktion der ssDNA Qualität als zusätzliche Phosphatquelle eingesetzt werden. Dennoch zeigte sich keine signifikante Verbesserung bezüglich Biotrockenmasse- oder ssDNA Konzentration.

6.3.2 Variation des Infektionszeitpunktes

Bei Zulaufkultivierungen mit rekombinanter Proteinexpression mit *E. coli* ist die Wahl eines optimalen Induktionszeitpunktes von entscheidender Bedeutung. Dementsprechend wurde bei der Hochzelllichtkultivierung mit Bakteriophagen M13 der Infektionszeitpunkt in der exponentiellen Zulaufphase bei vergleichbarer spezifischer Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ variiert. Dabei wurde bei einer *E. coli* XL1-blue Biotrockenmassekonzentration von $15,1 \text{ g L}^{-1}$, $26,4 \text{ g L}^{-1}$ und $40,7 \text{ g L}^{-1}$ mit Bakteriophagen M13 infiziert, wobei eine mittlere Multiplizität der Infektion von $0,0025 \pm 0,0012 \text{ pfu cfu}^{-1}$ verwendet wurde. Die Ergebnisse der Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 6.12 dargestellt.

Die Infektion nach 9,9 Stunden führte zur höchsten Biotrockenmassekonzentration von $79,6 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$, dies entspricht einer Steigerung um 23 % im Vergleich zu den früheren Infektionszeitpunkten. Der Verlauf des Phagentiters zeigte bei allen Zulaufkultivierungen zunächst die in der Infektion der Zellen begründete Reduktion, bevor ein Anstieg um 6 Größenordnungen stattfand, dargestellt in Abbildung 6.12 (B). Dabei wurde eine mittlere Phagenbildungsrate von $1,58 \pm 0,13 \text{ h}^{-1}$ mit einer prozentualen Abweichung von 8,3 % erreicht, aufgelistet unter Tabelle 6.2.

Tabelle 6.2 Einfluss des Infektionszeitpunktes auf die maximale Phagenbildungsrate und ssDNA Konzentration.

| BTM bei Infektion, g L^{-1} | MOI, pfu cfu^{-1} | maximale Phagenbildungsrate, h^{-1} | ssDNA, mg L^{-1} | Normierte ssDNA, - |
|--------------------------------------|-----------------------------|--|---------------------------|--------------------|
| $15,1 \pm 0,3$ | $3,5 \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$ | $1,7 \pm 0,1$ | 242 ± 20 | 0,65 |
| $26,4 \pm 0,5$ | $2,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$ | $1,5 \pm 0,05$ | 372 ± 49 | 1,00 |
| $40,7 \pm 0,2$ | $1,1 \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$ | $1,6 \pm 0,09$ | 276 ± 10 | 0,76 |

Ein früher Infektionszeitpunkt führte zur Stagnation des Phagentiters innerhalb der exponentiellen Zulaufphase, wodurch ein Zusammenhang zwischen dem Ende der exponentiellen Zulaufphase und der Stagnation des Phagentiters ausgeschlossen werden konnte, dargestellt in Abbildung 6.12 (B).

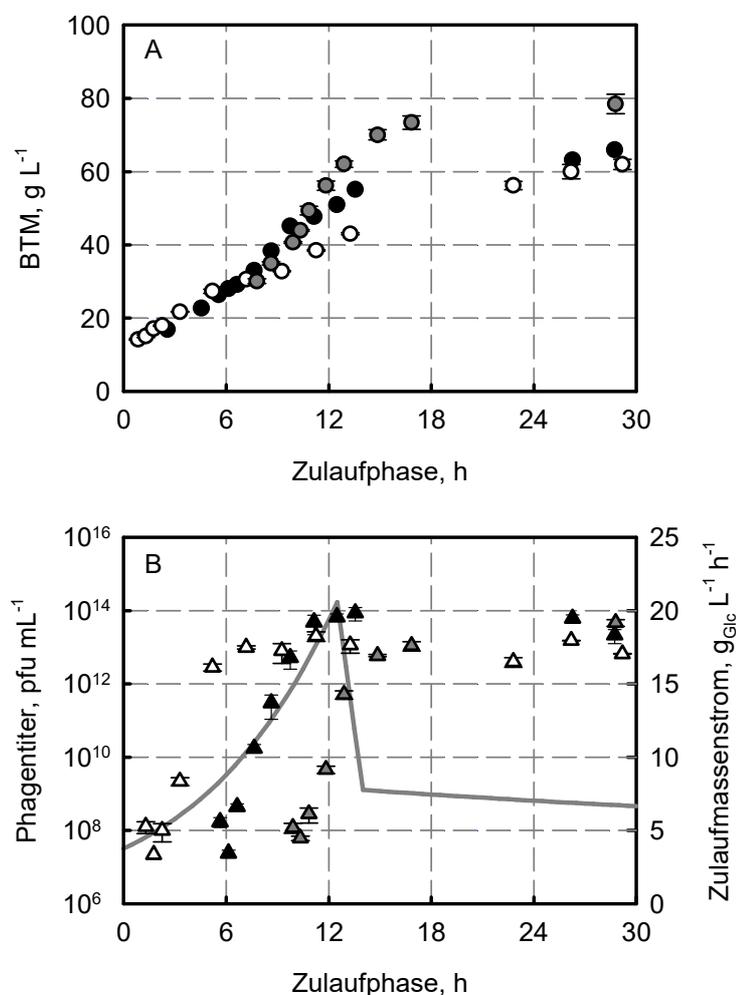


Abbildung 6.12 Variation des Infektionszeitpunktes während der Hochzelllichtekultivierung. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (BTM, A), des Phagentiters (B) und des Zulaufmassenstroms (B) für die Hochzelllichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue mit dem Bakteriophagen M13. Die Infektion wurde 1,3 Stunden (weiße Symbole), 5,3 Stunden (schwarze Symbole) und 9,9 Stunden (graue Symbole) nach Start der Zulaufphase mit einer mittleren Multiplizität der Infektion von $0,0025 \text{ pfu cfu}^{-1}$ durchgeführt. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Des Weiteren konnte nach 11,2 Stunden in der Zulaufphase bei der frühen Infektion eine Glucoseakkumulation von $11,7 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Nach 22,8 Stunden war die Glucosekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des enzymatischen Tests. Die Infektion mit dem Bakteriophage M13 bei einer Zelldichte von $26,4 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ führte zum höchsten Phagentiter und zu einer isolierten ssDNA Konzentration von $372 \pm 49 \text{ mg L}^{-1}$, dies entspricht einer Steigerung um mindestens 24 % im Vergleich zu den anderen Infektionszeitpunkten (vgl. Tabelle 6.2).

Diskussion

Der Einfluss des Infektionszeitpunktes auf die Phagenbildungsrate und die maximale ssDNA Konzentration muss differenziert betrachtet werden. Einerseits kann der Infektionszeitpunkt in Bezug auf die Phagenbildungsrate frei gewählt werden. Die maximale, mittlere Phagenbildungsrate weicht nur um 8,3 % ab, obwohl bis zu 8,6 Stunden zwischen der frühen und späten Infektion liegen. Die Phagenbildungsrate ist damit unabhängig von der Zellkonzentration zum Infektionszeitpunkt. In der Literatur wird empfohlen, die Infektion mit Bakteriophagen bereits bei niedriger Zelldichte in Satzprozessen im Schüttelkolben durchzuführen (Douglas et al. 2007; Sambrook et al. 2001). Die Substratzufuhr, die zu erreichende maximale Zelldichte und die längere Prozesszeit ermöglichen dagegen eine höhere Variabilität bei der Verwendung eines Zulaufverfahrens.

Wird hingegen die maximale ssDNA Konzentration als Bewertungskriterium verwendet, muss andererseits festgestellt werden, dass die Infektion nach 5,5 Stunden mit 372 mg L^{-1} die höchste ssDNA Konzentration liefert. Weiterhin führt eine frühe Infektion zu einer Glucoseakkumulation bei hohen Zulaufmassenströmen von $20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der hohe Bakteriophagentiter führte zu einer Reduktion der Wachstumsrate unter $0,15 \text{ h}^{-1}$, wodurch die zugefügte Glucose akkumuliert. In Übereinstimmung mit der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* ist die Wahl des Induktionszeitpunktes entscheidend für die maximale Produktkonzentration (Choi et al. 2006).

6.3.3 Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Phagenbildungsrate

Die Variation des Infektionszeitpunktes zeigte, dass die Infektion bei einer mittleren Zelldichte von $26,4 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ die höchste isolierte ssDNA Konzentration liefert. Die Infektion wurde dabei während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer definierten Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Aus diesem Grund sollte im Folgenden der Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Bakteriophagenbildung untersucht werden. Dabei wurde die spezifische Wachstumsrate von *E. coli* XL1-blue in der exponentiellen Phase auf $0,1 \text{ h}^{-1}$, $0,15 \text{ h}^{-1}$ und $0,2 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Um eine Vergleichbarkeit der Zulaufkultivierungen zu ermöglichen, wurden folgende Kriterien festgelegt. Einerseits wurde die exponentielle Zulaufphase beim Erreichen einer berechneten Biotrockenmassekonzentration von 60 g L^{-1} ohne Infektion mit Bakteriophagen beendet. Andererseits wurde bei allen drei Zulaufkultivierungen maximal 572 g Glucose verwendet. Dabei musste für die spezifische Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ die konstante Zulauftrate auf $11,1 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erhöht werden, um annähernd vergleichbare Prozesszeiten zu erreichen. Die Zulaufprofile und der zeitliche Verlauf der Biotrockenmassekonzentration bei den unterschiedlich vorgegebenen Wachstumsraten sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

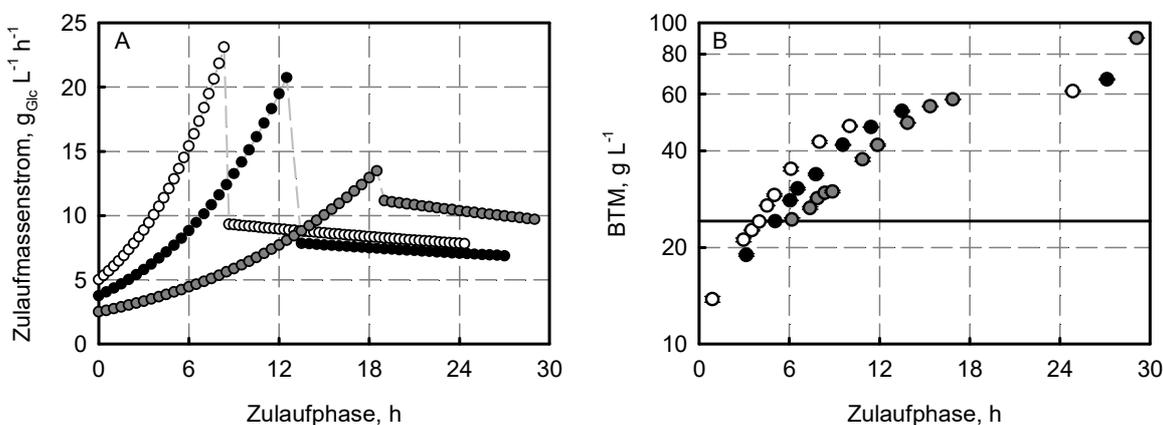


Abbildung 6.13 Variation der Zulaufprofile und Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration. Dargestellt sind die zur Variation der spezifischen Wachstumsrate eingestellten Zulaufmassenströme an Glucose (A) und der Verlauf der *E. coli* XL1-blue Biotrockenmassekonzentration (BTM, B) über die Zulaufphase. In der exponentiellen Zulaufphase wurden spezifische Wachstumsraten von $0,1 \text{ h}^{-1}$ (\bullet), $0,15 \text{ h}^{-1}$ (\bullet) und $0,2 \text{ h}^{-1}$ (\circ) vorgegeben. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt. Die horizontale Linie symbolisiert die Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt der Infektion.

Bei der Variation der spezifischen Wachstumsrate wurden maximale Zulaufmassenströme an Glucose von $13,5 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$), $20,7 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$) und $23,1 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\mu = 0,19 \text{ h}^{-1}$) erreicht. Die definierten Wachstumsraten spiegelten sich im linearen Anstieg der Biotrockenmassekonzentration in der halblogarithmischen Auftragung wider, dargestellt in Abbildung 6.13 (B). Die Infektion mit Bakteriophagen wurde bei einer mittleren Biotrockenmassekonzentration von $24,4 \pm 1,6 \text{ g L}^{-1}$ durchgeführt. Dabei wurden mit steigender Wachstumsrate in der exponentiellen Phase niedrigere maximale Biotrockenmassekonzentrationen erreicht. Die maximale Biotrockenmassekonzentration bei einer Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ war $61,3 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$, während bei $0,1 \text{ h}^{-1}$ maximal $89,7 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ bei gleicher Gesamtmenge an Glucose bestimmt wurde.

Der Verlauf des Phagentiters zeigte, dass mit steigender Wachstumsrate in einem identischen Zeitraum höhere Bakteriophagentiter erreicht werden, dargestellt in Abbildung 6.14 (A). 4,5 Stunden nach Infektion wurde bei der niedrigen Wachstumsrate ein Phagentiter von $1,3 \pm 0,4 \cdot 10^{11} \text{ pfu mL}^{-1}$, bei $0,14 \text{ h}^{-1}$ ein Phagentiter von $2,5 \pm 0,9 \cdot 10^{12} \text{ pfu mL}^{-1}$ und bei $0,19 \text{ h}^{-1}$ ein Phagentiter von $1,8 \pm 0,3 \cdot 10^{13} \text{ pfu mL}^{-1}$ erreicht. Die erzielten Phagentiter unterscheiden sich unter Berücksichtigung der Standardabweichung jeweils um eine Größenordnung. Die Steigerung der spezifischen Wachstumsrate führte dementsprechend zu einer Erhöhung der Phagenbildungsrate. Dabei wurde eine maximale Phagenbildungsrate von $2,2 \text{ h}^{-1}$ bei der Zulaufkultivierung mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ berechnet. Die niedrigste verwendete Wachstumsrate führte zu einer maximalen Phagenbildungsrate von $0,7 \text{ h}^{-1}$. Weiterhin zeigte sich, dass mit steigender Wachstumsrate der Verlauf der Phagenbildungsrate schmaler wurde. Zu Prozessende wurden für alle drei Zulaufkultivierungen Phagentiter innerhalb einer Größenordnung von $10^{14} \text{ pfu mL}^{-1}$ bestimmt.

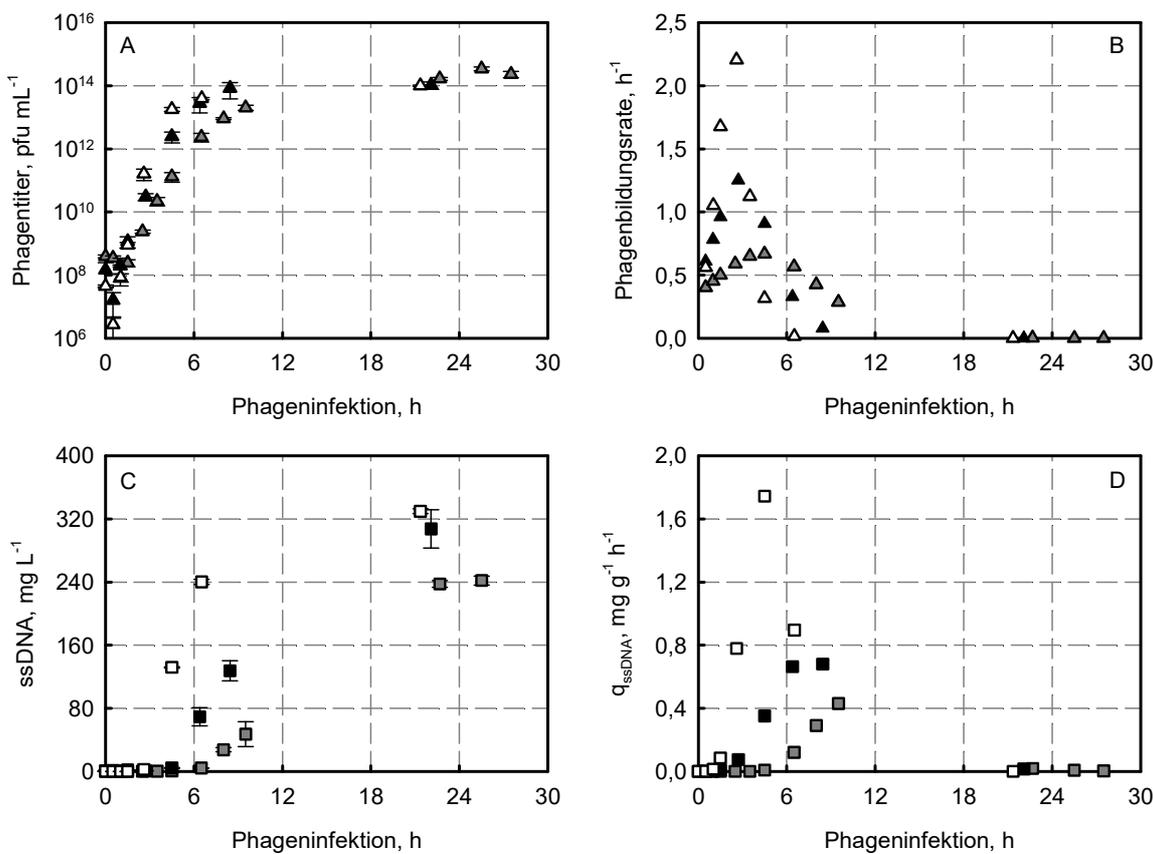


Abbildung 6.14 Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Bakteriophagenproduktion mit *E. coli* XL1-blue. Dargestellt sind die Verläufe des Phagentiters (A), der Phagenbildungsrate (B), der ssDNA Konzentration (C) und der zellspezifischen ssDNA Bildungsrate (q_{ssDNA} , D) über die Zeit ab Infektion mit dem Bakteriophagen M13. In der exponentiellen Zulaufphase wurden spezifische Wachstumsraten von $0,1 \text{ h}^{-1}$ (graue Symbole), $0,15 \text{ h}^{-1}$ (schwarze Symbole) und $0,2 \text{ h}^{-1}$ (weiße Symbole) vorgegeben. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Der Konzentrationsverlauf der isolierten ssDNA bestätigte den Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Bildung von Bakteriophagen. 6,5 Stunden nach Infektion wurde bei der höchsten Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ eine ssDNA Konzentration von $240 \pm 3,1 \text{ mg L}^{-1}$ nachgewiesen, wohingegen bei der niedrigen Wachstumsrate von $0,09 \text{ h}^{-1}$ $4,4 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA isoliert wurde, dargestellt in Abbildung 6.14 (C). Die niedrige Wachstumsrate führt des Weiteren zu einer Reduktion der maximalen ssDNA Konzentration um 27 %, im Vergleich zu den beiden anderen Zulaufkultivierungen. Die Erhöhung der Wachstumsrate über $0,14 \text{ h}^{-1}$ zeigte keinen signifikanten Einfluss in Bezug auf die maximale ssDNA Konzentration zu Prozessende. Die eingestellte Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ führte zu einer

maximalen spezifischen ssDNA Bildungsrate von $1,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer volumetrischen Produktivität von $74,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

In Abbildung 6.15 ist die Phagenbildungsrate nochmals über das Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen aufgetragen. Dabei wird ersichtlich, dass die maximale Phagenbildungsrate bei einem Verhältnis von $0,4\text{-}1,9 \text{ pfu cfu}^{-1}$ erreicht wurde. Unter der Annahme einer Poisson Verteilung der Infektion mit Bakteriophagen, waren zu diesem Zeitpunkt 33-85 % der Wirtszellen infiziert. Zudem zeigt sich mit steigendem Verhältnis über 20 pfu cfu^{-1} eine Annäherung der Phagenbildungsraten unabhängig der eingestellten Wachstumsrate.

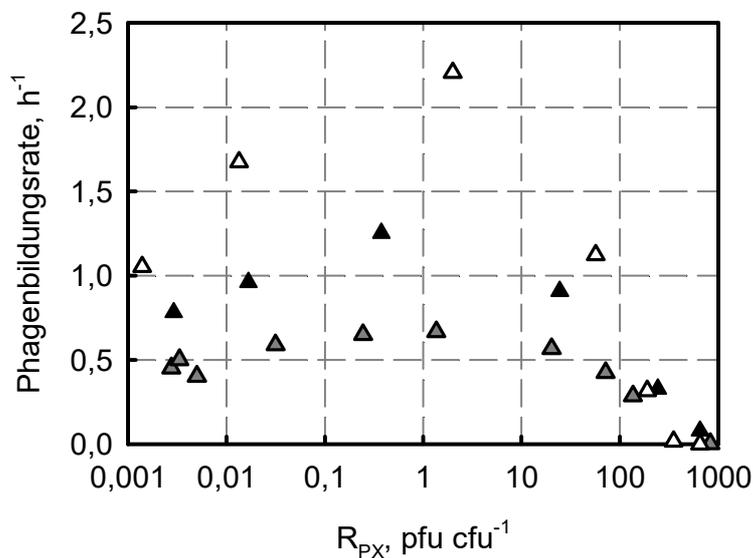


Abbildung 6.15 Phagenbildungsrate in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate. Dargestellt ist die Phagenbildungsrate über das jeweilig zu diesem Zeitpunkt vorherrschende Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen (R_{PX}). In der exponentiellen Zulaufphase wurden spezifische Wachstumsraten von $0,1 \text{ h}^{-1}$ (▲), $0,15 \text{ h}^{-1}$ (▲) und $0,2 \text{ h}^{-1}$ (△) vorgegeben. Die Zulaufkultivierungen mit *E. coli* XL1-blue wurden unter identischen Reaktionsbedingungen im Rührkesselreaktor in definiertem Medium durchgeführt.

Der Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Phagenbildungsrate wurde ebenso mit dem *E. coli* Stamm JM 109 untersucht. Aufgrund der höheren Wachstumsgeschwindigkeit der infizierten *E. coli* JM 109 Zellen in Satzprozessen wurde eine Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ eingestellt und $0,15 \text{ h}^{-1}$ als Referenzwert verwendet. Auf eine weitere Steigerung der Wachstumsrate wurde verzichtet, da dies zu verstärkter Nebenproduktbildung führen kann. Der direkte Zusammenhang zwischen spezifischer Wachstumsrate und Phagenbildungsrate konnte ebenfalls mit dem Stamm *E. coli* JM 109

bestätigt werden. Dabei wurde bei einer vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ eine maximale Phagenbildungsrate von $3,06 \text{ h}^{-1}$ erreicht und der Phagentiter stieg innerhalb einer Stunde um 3 Größenordnungen an. In Tabelle 6.3 sind die eingestellten Wachstumsrate, die maximalen Phagenbildungsrate und ssDNA Konzentration aufgelistet.

Tabelle 6.3 Maximale Phagenbildungsrate und ssDNA Konzentration in Abhängigkeit der eingestellten Wachstumsrate μ_{set} für zwei *E. coli* Stämme.

| <i>E. coli</i> Stamm | $\mu_{\text{set}}, \text{ h}^{-1}$ | maximale Phagenbildungsrate, h^{-1} | max. ssDNA, mg L^{-1} |
|----------------------|------------------------------------|--|--------------------------------|
| XL1-blue | 0,09 | 0,67 | 242 ± 6 |
| XL1-blue | 0,14 | 1,25 | 307 ± 24 |
| XL1-blue | 0,19 | 2,21 | 329 ± 13 |
| JM 109 | 0,15 | 1,21 | 297 ± 35 |
| JM 109 | 0,25 | 3,06 | 309 ± 15 |

Diskussion

Die spezifische Wachstumsrate wurde in einem Bereich zwischen $0,1$ - $0,2 \text{ h}^{-1}$ variiert, nachdem für den mit Bakteriophagen infizierten *E. coli* XL1-blue eine maximale Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ im Satzverfahren bestimmt wurde (vgl. Kapitel 5). Durch die Zulaufkultivierungen mit verschiedenen Wachstumsraten konnte gezeigt werden, dass eine höhere spezifische Wachstumsrate zu einer erhöhten Produktion an Bakteriophagen führt. Dies spiegelte sich einerseits in einer erhöhten Phagenbildungsrate, andererseits in der spezifischen ssDNA Bildungsrate wider. Die spezifische ssDNA Bildungsrate berücksichtigt dabei die vorliegende Biotrockenmassekonzentration, wodurch der beschriebene Zusammenhang eindeutig der spezifischen Wachstumsrate und nicht einer höheren Biotrockenmassekonzentration zuzuordnen ist. Des Weiteren wurde der Einfluss der spezifischen Wachstumsrate mit dem *E. coli* Stamm JM 109 reproduziert, um einen stammspezifischen Effekt auszuschließen. In Satzversuchen in Schüttelkolben wurde gezeigt, dass langsamer wachsende Wirtszellen eine höhere Produktivität an Bakteriophagen besitzen (Salivar et al. 1964). Dies widerspricht den hier dargestellten Ergebnissen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Satzprozesse zur Kontrolle der spezifischen Wachstumsrate bei gleichzeitigem Substratüberschuss ungeeignet sind.

Die intrazelluläre ssDNA Produktion wird von der Polymerase III von *E. coli* über den sogenannten *rolling circle* Mechanismus katalysiert, ausgehend von der doppelsträngigen, replikativen Form (RF) des M13 Genoms. Die intrazelluläre Konzentration der RF DNA ist unabhängig von der spezifischen Wachstumsrate der Wirtszellen (Hohn et al. 1971). Daraus lässt sich folgern, dass die intrazelluläre ssDNA Produktion unabhängig von der spezifischen Wachstumsrate ist und dementsprechend nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Phagenzyklus darstellt. Im Gegensatz dazu steigt die Konzentration an RNA Polymerasen und Ribosomen mit steigender spezifischer Wachstumsrate in *E. coli* an (Scott et al. 2010). Dies kann dementsprechend zu einer erhöhten Translation der Phagenproteine und der Erhöhung der Phagenbildungsrate führen.

Bei der Hochzelllichtekultivierung mit rekombinanter Proteinexpression wird oftmals die Wachstumsphase von der Produktbildungsphase entkoppelt. Aus diesem Grund ist der Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Proteinexpression während der Hochzelllichtekultivierung nur unzureichend untersucht. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die höhere spezifische Wachstumsrate vor Induktion zu einer erhöhten Produktivität des Alpha-Consensus-Interferons in *E. coli* führte (Curless et al. 1990). Pei et al. (2010) konnten zeigen, dass bei höherer spezifischer Wachstumsrate eine erhöhte volumetrische Produktivität der 2-Desoxyribose-5-Phosphat Aldolase vorliegt.

Eine einzelne infizierte *E. coli* Zelle kann innerhalb einer Stunde bis zu 1000 Bakteriophagen produzieren, wodurch der Phagentiter um bis zu 3 Größenordnungen ansteigt (Barbas III et al. 2001; Derda et al. 2010). Durch die Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate auf $0,25 \text{ h}^{-1}$ bei der Zulaufkultivierung mit dem *E. coli* Stamm JM 109 konnte eine maximale Phagenbildungsrate von $3,06 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Damit konnte ein Anstieg der Bakteriophagen um 3 Größenordnungen im Rührkesselreaktor innerhalb einer Stunde in Übereinstimmung mit der Literatur erzielt werden.

6.3.4 Einfluss der Multiplizität der Infektion auf die Einzelstrang DNA Produktion

Die Multiplizität der Infektion (MOI) ist das Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen zum Zeitpunkt der Infektion und stellt eine wichtige Zustandsgröße bei der Kultivierung mit Bakteriophagen dar. Aus diesem Grund sollte für die Hochzelllichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue der Einfluss von verschiedenen Multiplizitäten der Infektion untersucht werden. Dabei wurde die Infektion 5 Stunden nach Start der Zulaufphase bei einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Unter der Annahme einer Poisson Verteilung der Infektion mit Bakteriophagen lässt sich der Anteil an infizierten Zellen nach Gleichung 4.10 berechnen. Die zur Untersuchung des Einflusses des MOI verwendeten Phagentiter und der Anteil an infizierten Zellen sind in Tabelle 6.4 aufgelistet.

Tabelle 6.4 Phagentiter, Multiplizität der Infektion (MOI) und Anteil der theoretisch infizierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion.

| Phagentiter t_0 , pfu mL ⁻¹ | MOI, pfu cfu ⁻¹ | Anteil infizierter Zellen, % |
|--|----------------------------|------------------------------|
| $1,7 \pm 0,5 \cdot 10^8$ | $2 \cdot 10^{-3}$ | 0,3 |
| $3,2 \pm 0,9 \cdot 10^9$ | $5 \cdot 10^{-2}$ | 4,4 |
| $1,3 \pm 0,4 \cdot 10^{11}$ | 2,3 | 94,1 |

Bei einer MOI von $2,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$ und dementsprechend mehr Bakteriophagen als Zellen, werden theoretisch 94,1 % der Zellen mit mindestens einem Bakteriophagen infiziert. Der Einfluss von verschiedenen Infektionsternern auf die Phagen- und ssDNA Produktion während der Hochzelllichtekultivierung sind in Abbildung 6.16 vergleichend gegeneinander aufgetragen.

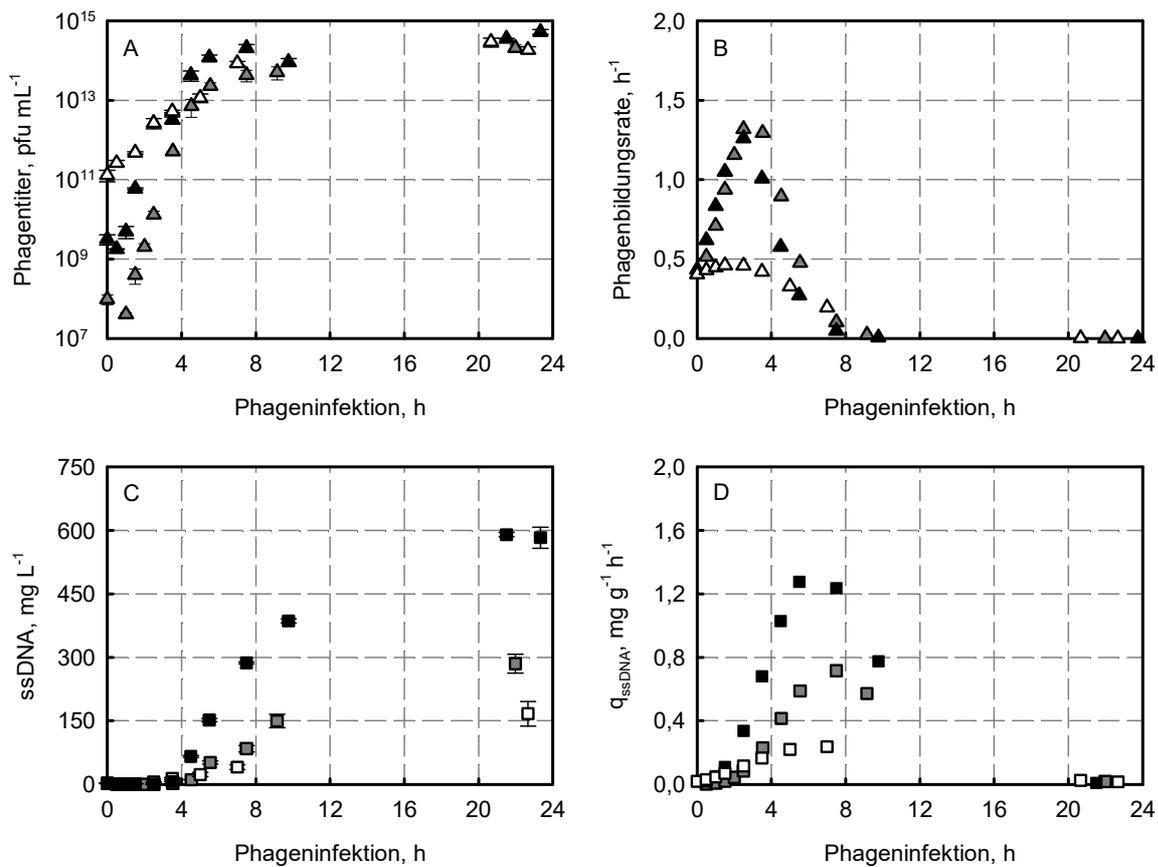


Abbildung 6.16 Einfluss der Multiplizität der Infektion von *E. coli* XL1-blue auf die ssDNA Produktion. Dargestellt sind die Verläufe des Phagentiters (A), der Phagenbildungsrate (B), der ssDNA Konzentration (C) und der spezifischen ssDNA Bildungsrate (q_{ssDNA} , D) über die Zeit nach Phageninfektion. Die Zulaufkultivierungen wurden mit *E. coli* XL1-blue durchgeführt, die 5 Stunden nach Start der Zulaufphase mit einer Multiplizität der Infektion von 0,002 pfu cfu⁻¹ (graue Symbole), 0,05 pfu cfu⁻¹ (schwarze Symbole) und 2,3 pfu cfu⁻¹ (weiße Symbole) mit dem Bakteriophagen M13 infiziert wurden. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von 0,15 h⁻¹ im Rührkesselreaktor in definierten Medium durchgeführt. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Die Verläufe der Phagentiter bei den niedrigen Infektionstitern waren vergleichbar. Dies spiegelte sich ebenso in einem vergleichbaren Verlauf der Phagenbildungsrate wider, mit einer maximalen Rate von 1,26 h⁻¹ (MOI 0,05 pfu cfu⁻¹) und 1,32 h⁻¹ (MOI 0,002 pfu cfu⁻¹). Im Gegensatz dazu war bei einer MOI von 2,3 pfu cfu⁻¹ ein deutlich geringerer Anstieg des Phagentiters detektierbar. Es wurde eine maximale Phagenbildungsrate von 0,46 h⁻¹ erreicht, dies entsprach einer Reduktion um 73 %. Hochzelldichtekultivierungen mit einer MOI von $4 \cdot 10^{-7}$ führten zu einer maximalen Phagenbildungsrate von 1,5 h⁻¹ und einem maximalen Phagentiter von $1,5 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ (Daten nicht dargestellt). Neben der Phagenbildungsrate beeinflusst die Infektionsdichte die ssDNA Produktion. Bei einer MOI von 0,05 pfu cfu⁻¹

konnte eine maximale ssDNA Konzentration von $590 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ isoliert werden. Die maximale spezifische ssDNA Bildungsrate lag dabei bei $1,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dies entsprach einer volumetrischen ssDNA Bildungsrate von $69,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Diskussion

Die Infektionsdichte an Bakteriophagen hat einen entscheidenden Einfluss auf die Phagenbildungsrate. Bei einer hohen Infektionsdichte mit einem MOI von $2,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$ wurde ein um 73 % niedrigeres Maximum erreicht. Unter diesen Bedingungen lagen zum Infektionszeitpunkt mehr Bakteriophagen als Zellen vor, wodurch theoretisch 94,1 % der Zellen infiziert werden. Die geringe Zunahme des Phagentiters könnte in der mit zunehmenden Verhältnis von Phagentiter zu Zellzahl abnehmenden Adsorptionsrate der Phagen an die Zellen liegen. Dabei wird bei einer MOI zwischen $0,007\text{-}0,7 \text{ pfu cfu}^{-1}$ die maximale Adsorptionsrate erreicht, wohingegen bei einer MOI von $3\text{-}7 \text{ pfu cfu}^{-1}$ die Adsorptionsrate abnimmt (Tzagoloff und Pratt 1964). Reddy und McKenney (1996) untersuchten den Einfluss der MOI zwischen $10^{-7}\text{-}10^{-4} \text{ pfu cfu}^{-1}$ in Satzverfahren im Schüttelkolben. Sie konnten darlegen, dass mit steigendem MOI höhere maximale Phagentiter erreicht werden konnten. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen im Zulaufverfahren mit einer MOI zwischen 10^{-7} bis $5 \cdot 10^{-2} \text{ pfu cfu}^{-1}$ bestätigt und erweitert. Eine hohe MOI von $2,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$ führte jedoch durch die geringere Adsorptionsrate zur Reduktion der Phagenbildungsrate und ssDNA Konzentration. Durch eine Multiplizität der Infektion von $0,05 \text{ pfu cfu}^{-1}$ konnte die maximal produzierte ssDNA um 54 % auf $590 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ gesteigert werden.

7 Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit infizierten *Escherichia coli*

Die kontinuierliche Prozessführung ermöglicht die physiologische Charakterisierung von Zellen unter definierten und kontrollierten Bedingungen. Eine prozesstechnisch einfache Betriebsweise stellt hierbei der Chemostat dar, bei dem über die vorgegebene Durchflussrate die Wachstumsrate der Zellen im kontinuierlich betriebenen Bioreaktor eingestellt werden kann. Dabei kann nach fünf hydraulischen Verweilzeiten ein Fließgleichgewichtszustand erreicht werden, in dem der Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Phagenbildung untersucht werden soll. Durch die Einstellung von verschiedenen Wachstumsraten kann im Fließgleichgewichtszustand die Kinetik für die Produktion des Bakteriophagen und der Einfluss der Bakteriophageninfektion auf die spezifische Wachstumsrate identifiziert werden.

7.1 Identifikation von formalkinetischen Modellparametern im Millilitermaßstab

Zur Etablierung der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen sollte zunächst der nicht infizierte Wirtstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) JM 109 in miniaturisierten Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab kultiviert werden. Dabei wurde der Parallelbioreaktor bioREACTOR 48 verwendet, der für eine kontinuierliche Prozessführung erweitert wurde. Die kontinuierliche Kultivierung wurde in definiertem Medium mit einer Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} im Satz- und Zulaufmedium durchgeführt. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Die kontinuierliche Kultivierung von

E. coli JM 109 ohne Bakteriophagen wurde bei einer Durchflussrate von $0,39 \text{ h}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, dargestellt in Abbildung 7.1.

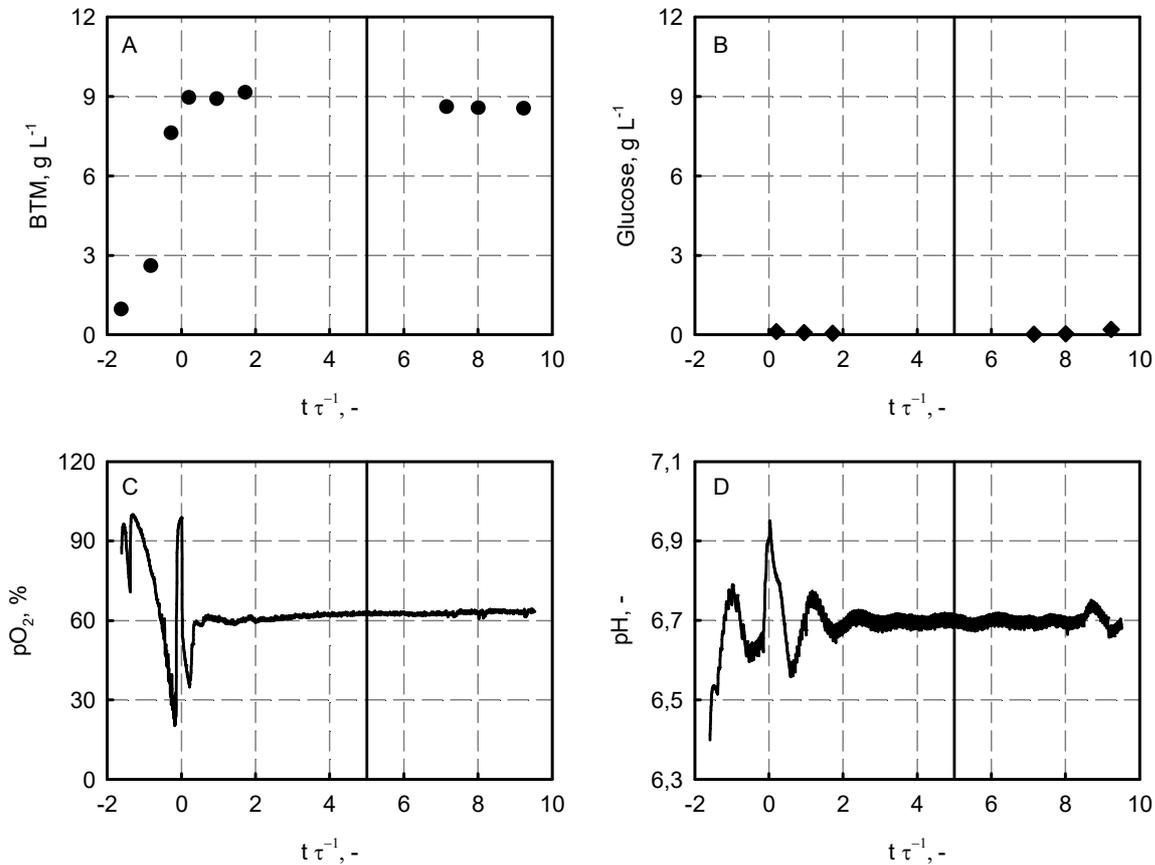


Abbildung 7.1 Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM 109 im miniaturisierten Rührkesselreaktor. Dargestellt sind die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (A), der Glucosekonzentration (B), der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) und des pH über die auf die Verweilzeit normierte Prozesszeit ($t\tau^{-1}$). Dabei wurde der Start der kontinuierlichen Prozessführung als $t\tau^{-1} = 0$ definiert. Es wurde eine Durchflussrate von $0,39 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 2,56 \text{ h}$) mit einer Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} in definiertem Medium (pH 6,7) verwendet. Die pH Regelung erfolgte mit 12,5 % Ammoniumlösung über einen Laborroboter. Die vertikale Linie markiert 5 Verweilzeiten, bei der die hydraulische Voraussetzung für das Erreichen eines Fließgleichgewichtszustandes erfüllt ist.

Das zu erwartende exponentielle Wachstums der Bakterien in der Satzphase zeigte sich sowohl im Anstieg der Biotrockenmassekonzentration, als auch im höheren Sauerstoffbedarf und dem damit einhergehenden Abfall der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium. Der sprunghafte Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH zeigten den vollständigen Verbrauch der Glucose im Satzverfahren an, wobei eine Biotrockenmassekonzentration von $9,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Anschließend wurde die kontinuierliche Prozessführung gestartet, wobei die Biotrockenmassekonzentration nach

über 5 Verweilzeiten im Mittel bei $8,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ lag und keine Glucoseakkumulation ($< 50 \text{ mg L}^{-1}$) auftrat, dargestellt in Abbildung 7.1 (A und B). Nach dem Start der kontinuierlichen Prozessführung fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration auf bis zu 34 % ab und stabilisierte sich nach 0,4 Verweilzeiten auf 60 %. Der pH konnte, nach der Auslenkung am Ende der Satzphase, nach 2 Verweilzeiten mit 12,5 % Ammoniumlösung einseitig auf pH 6,7 geregelt werden.

Zur kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen wurden die exponentiell wachsenden Zellen in der Satzphase mit Bakteriophagen infiziert. Der Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten *E. coli* JM 109 im Chemostaten ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Die Infektion mit Bakteriophagen führte zu einer signifikanten Reduktion der Biotrockenmassekonzentration innerhalb der ersten 5 Verweilzeiten. Nach 9,7 Verweilzeiten wurde eine konstante Biotrockenmassekonzentration von $8,7 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, dies zeigte sich zudem in einer konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration von 61 %, dargestellt in Abbildung 7.2 (A und C). Im zellfreien Überstand akkumulierte Glucose bis zu einer maximalen Konzentration von $4,3 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ bei 4,9 Verweilzeiten. Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration verdeutlichte in Übereinstimmung mit der reduzierten Biotrockenmassekonzentration und dem Anstieg der Glucosekonzentration einen verringerten Sauerstoffbedarf im Reaktionsmedium zwischen 2 - 7 Verweilzeiten. Die vergleichende Auftragung der kontinuierlichen Kultivierung ohne Bakteriophagen zeigte weder eine ausgeprägte Reduktion der Biotrockenmassekonzentration, noch eine Glucoseakkumulation. Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration erreichte bereits nach 0,4 Verweilzeiten einen stabilen Wert von 60 %.

Nach dem Anstieg der ssDNA Konzentration bei der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen bis zu $5,9 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ bei 3,2 Verweilzeiten war einhergehend mit dem Abfall der Biotrockenmassekonzentration eine Reduktion der ssDNA Konzentration zu beobachten, bis nach 9,7 Verweilzeiten eine stabile Konzentration von $5,5 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht wurde. Die spezifische ssDNA Bildungsrate erreichte nach 6,5 Verweilzeiten einen stabilen Wert von $0,21 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Das Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen war zum Start der kontinuierlichen Prozessführung bei 3 pfu cfu^{-1} . Es konnte ein maximales Verhältnis von Bakteriophagen zu Zellen von 90 pfu cfu^{-1} berechnet werden, wobei nach 9,7 Verweilzeiten ein stabiles Verhältnis von $66 \pm 5 \text{ pfu cfu}^{-1}$ erreicht wurde, dargestellt in Abbildung 7.2 (F).

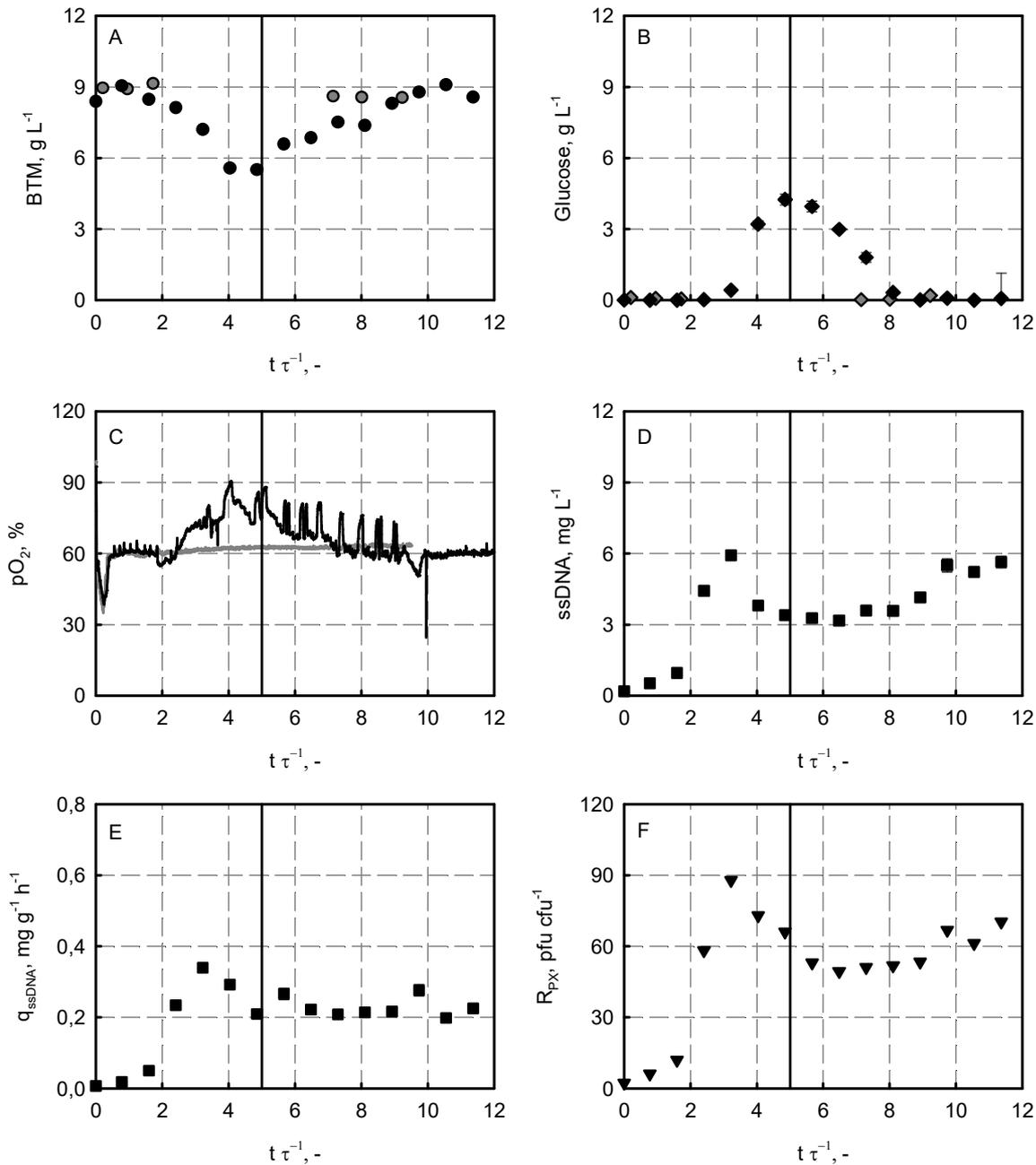


Abbildung 7.2 Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit und ohne Bakteriophagen M13. Dargestellt ist der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (A), der Glucosekonzentration (B), der Gelöstsauerstoffkonzentration (C), der ssDNA Konzentration (D), der biomassespezifischen Produktbildungsrate (q_{ssDNA} , E) und des Verhältnisses von Phagen zu Wirtszellen (R_{PX} , F) über die auf die jeweilige Verweilzeit normierte Prozesszeit ($t\tau^{-1}$). Dabei wird die kontinuierliche Kultivierung von JM 109 mit dem Bakteriophagen M13 (Durchflussrate $0,41 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 2,44 \text{ h}$, schwarze Symbole) mit dem nicht infizierten Zustand verglichen (Durchflussrate $0,39 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 2,56 \text{ h}$, graue Symbole). Die vertikale Linie markiert 5 Verweilzeiten, bei der die hydraulische Voraussetzung für einen Fließgleichgewichtszustand erfüllt ist.

Die kontinuierliche Kultivierung mit Bakteriophagen sollte bei verschiedenen vorgegebenen Durchflussraten untersucht werden. Vergleichend sind zwei kontinuierliche Kultivierungen bei Durchflussraten von $0,13 \text{ h}^{-1}$ und $0,41 \text{ h}^{-1}$ in Abbildung 7.3 dargestellt. Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration zeigte, dass es bei der niedrigeren Durchflussrate zu einer früheren Reduktion der Zellkonzentration bei der Auftragung über der auf die Verweilzeit normierten Prozesszeit kam. Bei der niedrigen Durchflussrate war weiterhin die Glucosekonzentration zu jedem Probenahmezeitpunkt unter der Nachweisgrenze von 50 mg L^{-1} , im Gegensatz zu der kontinuierlichen Kultivierung bei höherer Durchflussrate. Der Vergleich der Verläufe der Biotrockenmassekonzentration, der Glucosekonzentration und der Gelöstsauerstoffkonzentration bei einer Durchflussrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ verdeutlichte, dass nach 4 Verweilzeiten von einem Fließgleichgewichtszustand ausgegangen werden konnte. Die niedrigere Durchflussrate resultierte in einer erhöhten Gelöstsauerstoffkonzentration von 80 % im Fließgleichgewichtszustand. Dies kann durch den niedrigeren Massenstrom an Glucose bei niedrigerer Durchflussrate begründet werden. Bei einer Durchflussrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ wurde ein Massenstrom an Glucose von $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht, bei $0,41 \text{ h}^{-1}$ $8,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Daraus resultierte ein niedrigerer Sauerstoffbedarf bei gleicher Sauerstoffeintragsrate im Rührkesselreaktor.

Bei der niedrigeren Durchflussrate konnte im Reaktionsansatz eine höhere ssDNA Konzentration, im Fließgleichgewichtszustand $10,6 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$, bestimmt werden. Nach 4 Verweilzeiten konnte die biomassespezifische ssDNA Bildungsrate mit $0,20 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt werden, dargestellt in Abbildung 7.3. Es wurden vergleichbare biomassespezifische ssDNA Bildungsraten, unabhängig von der eingestellten Durchflussrate, und damit einhergehend unabhängig der Wachstumsrate der Wirtszellen erzielt. Das Verhältnis von Bakteriophagen zu Wirtszellen wurde mit $172 \pm 9 \text{ pfu cfu}^{-1}$ bei einer Durchflussrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ im Fließgleichgewicht berechnet.

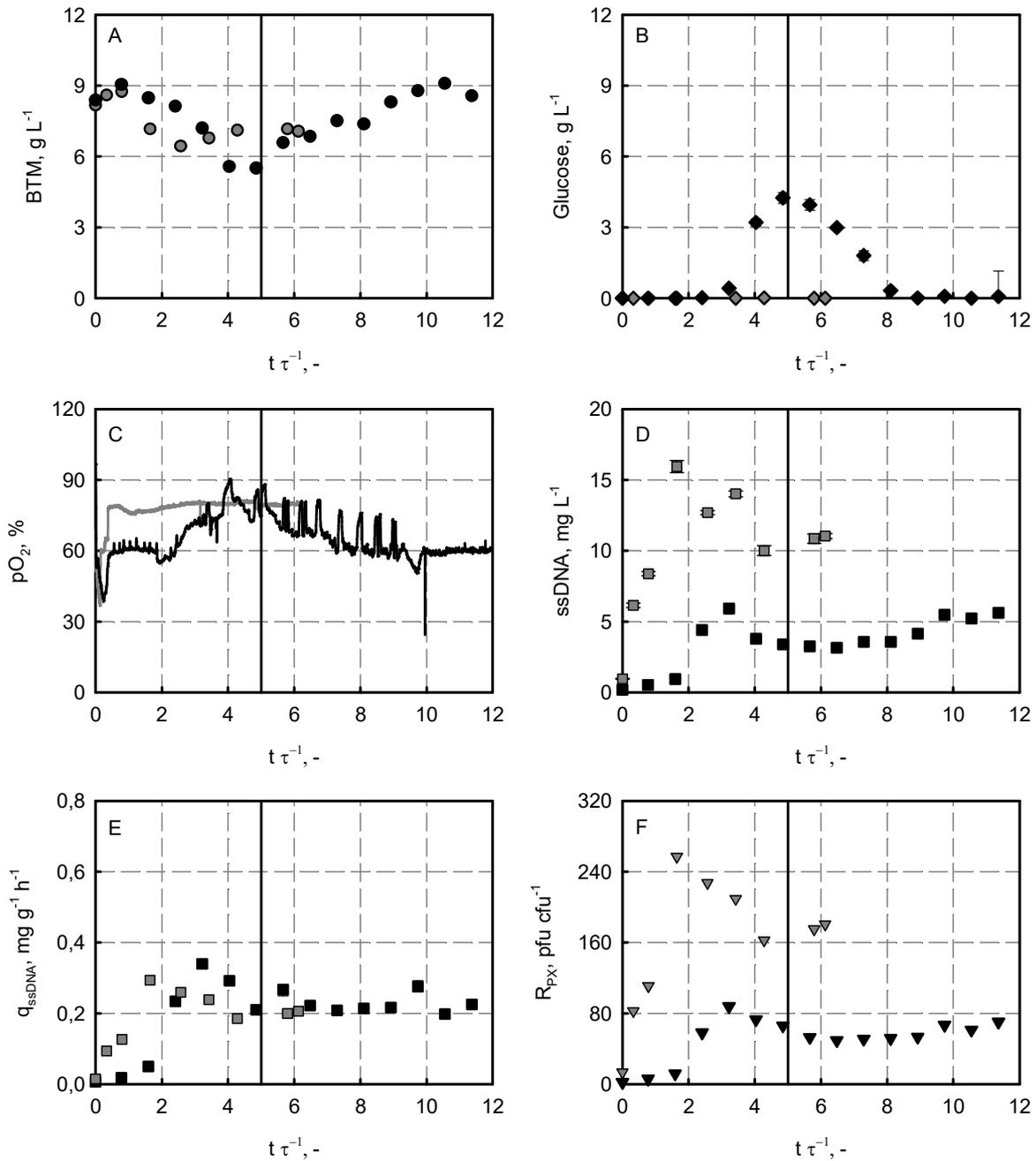


Abbildung 7.3 Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit dem Bakteriophagen M13 bei zwei unterschiedlichen Durchflussraten. Dargestellt ist der Verlauf der Biotrockenmassenkonzentration (BTM) (A), der Glucosekonzentration (B), der Gelöstsauerstoffkonzentration (C), der ssDNA Konzentration (D), der biomassespezifischen Produktbildungsrate (q_{ssDNA} , E) und des Verhältnisses von Phagen zu Wirtszellen (R_{PX} , F) über die auf die jeweilige Verweilzeit normierte Prozesszeit ($t \tau^{-1}$). Dabei wurde die kontinuierliche Kultivierung von JM 109 mit Bakteriophagen M13 bei einer Durchflussrate von $0,41 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 2,44 \text{ h}$, schwarze Symbole) und bei einer Durchflussrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 7,69 \text{ h}$, graue Symbole) durchgeführt. Die vertikale Linie markiert 5 Verweilzeiten, bei der die hydraulische Voraussetzung für einen Fließgleichgewichtszustand erfüllt ist.

Die Abhängigkeit der ssDNA Konzentration und der biomassespezifischen ssDNA Bildungsrate von der Wachstumsrate der Wirtszellen im Fließgleichgewicht wurde durch sechs Durchflussraten, die in einem Bereich von $0,13 \text{ h}^{-1}$ bis $0,6 \text{ h}^{-1}$ eingestellt wurden, untersucht, dargestellt in Abbildung 7.4. Die ssDNA Konzentration im Fließgleichgewicht war niedriger bei steigender Durchflussrate. Dementsprechend war die spezifische ssDNA Bildungsrate unabhängig der Durchflussrate, wobei mit steigender Durchflussrate die berechnete Standardabweichung zunahm.

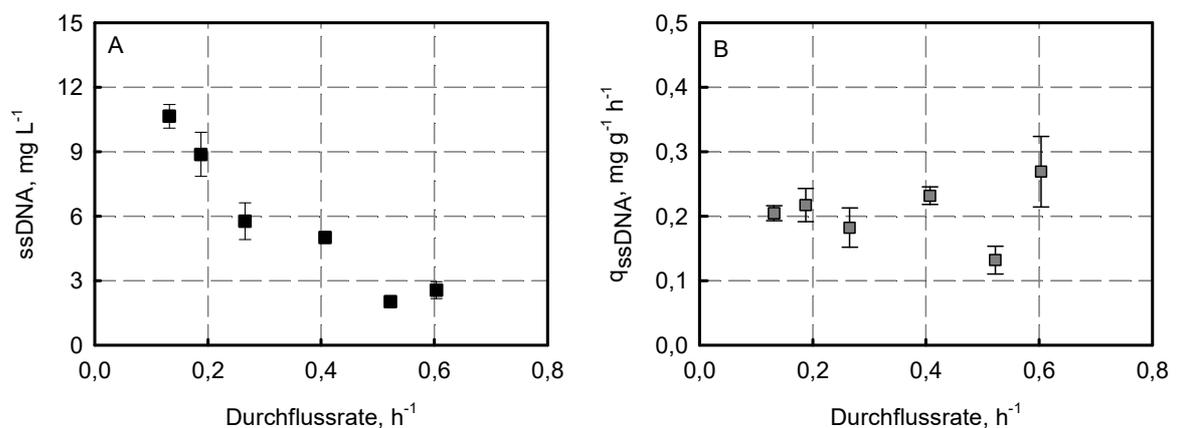


Abbildung 7.4 ssDNA Konzentration und spezifische ssDNA Bildungsrate im Fließgleichgewichtszustand. Dargestellt sind die ssDNA Konzentration (■, A) und die spezifische ssDNA Bildungsrate (■, B, q_{ssDNA}) im Fließgleichgewichtszustand über die Durchflussrate. Die Standardabweichungen der ssDNA wurden aus mindestens drei Datenpunkten ab dem Fließgleichgewicht bestimmt, die Standardabweichung der spezifischen ssDNA Bildungsrate wurde über Fehlerfortpflanzung berechnet.

Die erhaltenen Biotrockenmasse-, Glucose- und ssDNA Konzentrationen im Fließgleichgewichtszustand wurden zur Parameteridentifikation des formalkinetischen Modells (Gleichungen 4.14 - 4.17) verwendet und sind mit dem modellgestützten Verlauf in Abbildung 7.5 aufgetragen. Dabei zeigte sich für die Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration der charakteristische Verlauf in Abhängigkeit der Wachstumsrate (vgl. Kapitel 3.3.2), sowohl für die kontinuierliche Kultivierung ohne als auch mit Bakteriophagen. Unter Berücksichtigung der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel, konnte ein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration mit steigender Wachstumsrate identifiziert werden. Die Biotrockenmassekonzentration stieg dabei bis zu einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,52 \text{ h}^{-1}$ bei der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen an. Dabei lag die Glucosekonzentration unter $0,6 \text{ g L}^{-1}$ im Fließgleichgewichtszustand, dargestellt in Abbildung 7.5 (A und C).

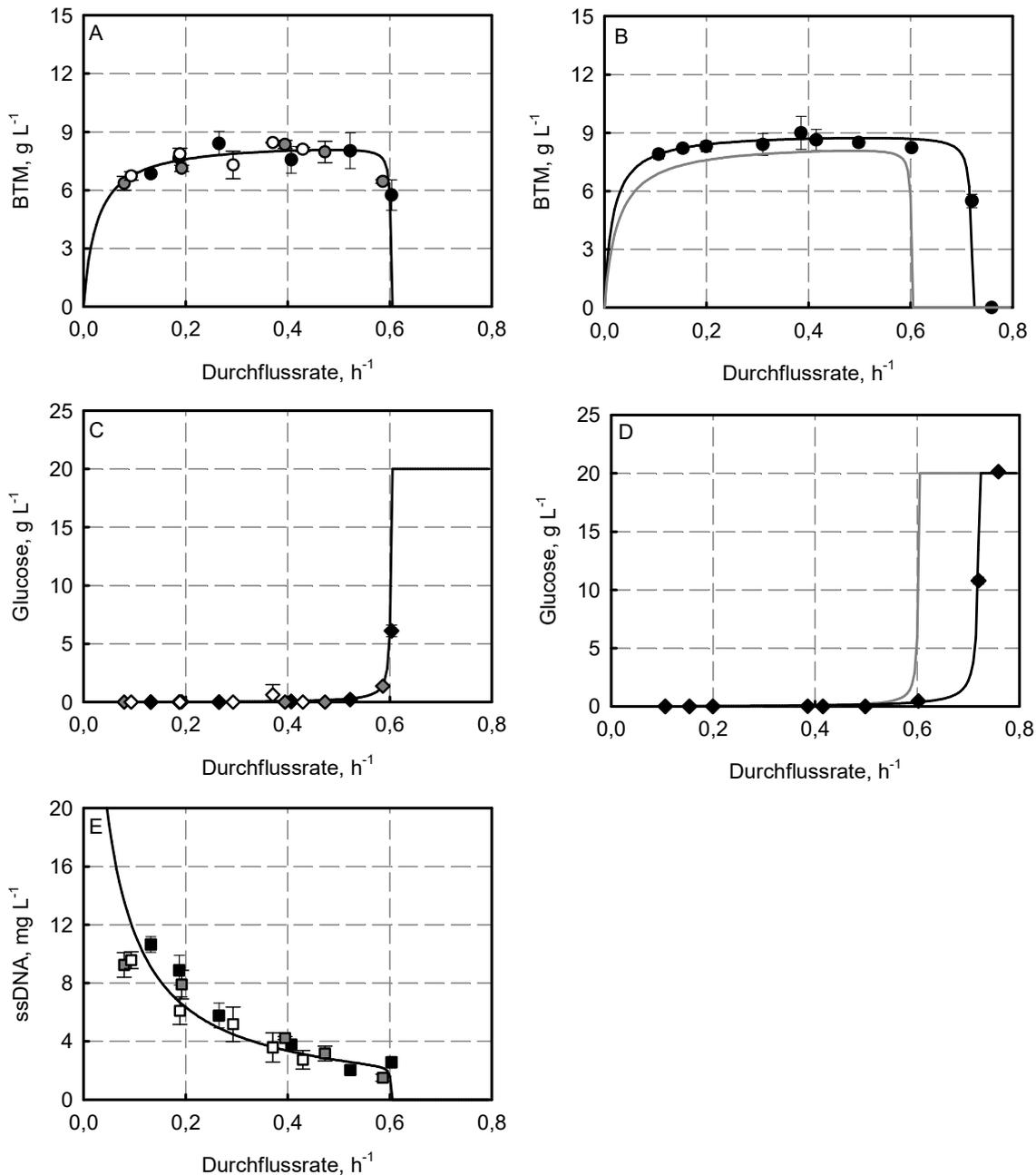


Abbildung 7.5 Fließgleichgewichtsuntersuchungen und Simulationen im Chemostaten. Dargestellt sind die Fließgleichgewichtskonzentrationen der kontinuierlichen Kultivierung mit *E. coli* JM109 mit Bakteriophagen (links, A, C, E) und ohne Bakteriophagen (rechts, B, D). Die gemessenen Konzentrationen sind als Punkte dargestellt, die auf Basis dieser Daten simulierten Konzentrationen als Linien. Dabei sind die Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) (A, B), die Glucosekonzentrationen (C, D) und die ssDNA Konzentrationen (E) über die Durchflussrate aufgetragen. Die Graphen B und D enthalten zum Vergleich zusätzlich nochmals die Simulationsergebnisse der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen. Die Fließgleichgewichtszustände der Kultivierungen mit Bakteriophagen wurden in drei sequentiell durchgeführten, parallelen Experimenten bestimmt (schwarze, graue und weiße Symbole).

Bei weiterer Erhöhung der Durchflussrate zeigten sich die Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und ein Anstieg der Glucosekonzentration bei der Annäherung an die kritische Durchflussrate, bei der die Durchflussrate die maximale Wachstumsrate übersteigt. Bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM 109 ohne Bakteriophagen konnten höhere Durchflussraten eingestellt werden, bis es zu einem Auswaschen der Zellen kam. Bei einer Durchflussrate von $0,72 \text{ h}^{-1}$ konnte eine Reduktion der Biotrockenmassekonzentration und ein Anstieg in der Glucosekonzentration identifiziert werden.

Die ssDNA Konzentration im Fließgleichgewicht nahm mit steigender Durchflussrate ab und konnte durch das formalkinetische Modell mit guter Übereinstimmung angenähert werden. Bei dem formalkinetischen Modell wurde eine konstante Produktbildungsrate unabhängig der Wachstumsrate definiert. Die ssDNA Konzentration im Fließgleichgewicht war dementsprechend nur von der Durchflussrate und der vorhandenen Biotrockenmassekonzentration abhängig.

In Tabelle 7.1 sind die modellgestützt identifizierten, formalkinetischen Parameter für die kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit und ohne Bakteriophagen aufgelistet. Dabei ergab sich eine maximale Wachstumsrate von $0,63 \text{ h}^{-1}$ für den infizierten Stamm, und nicht infiziert ein maximaler Wert von $0,74 \text{ h}^{-1}$. Die kontinuierliche Produktion von Bakteriophagen führt zu einer Reduktion der maximalen Wachstumsrate um 15 %. Die Werte für die maximale Wachstumsrate konnten dabei mit relativen Fehlern von maximal 2 % bestimmt werden.

Tabelle 7.1 Modellbasierte Identifikation der formalkinetischen Modellparameter bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit und ohne Bakteriophagen M13.

| Parameter | JM 109 (infiziert) | Relative Abweichung | JM 109 (nicht infiziert) | Relative Abweichung |
|---|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| $\mu_{max}, \text{ h}^{-1}$ | $0,63 \pm 0,005$ | 0,9 % | $0,74 \pm 0,02$ | 2,0 % |
| $K_S, \text{ mg L}^{-1}$ | 45 ± 4 | 8,5 % | 73 ± 16 | 23,0 % |
| $Y_{XS}, \text{ g g}^{-1}$ | $0,43 \pm 0,01$ | 2,4 % | $0,45 \pm 0,02$ | 3,5 % |
| $m_S, \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | 60 ± 11 | 19,4 % | 35 ± 17 | 48,5 % |
| $k_P, \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $0,17 \pm 0,007$ | 4,2 % | | |
| $Y_{PS}, \text{ mg g}^{-1}$ | $5,7 \pm 3,8$ | 68,0 % | | |

Die bestimmten Modellparameter des Wachstums der infizierten und nicht infizierten *E. coli* JM 109 Zellen sind in Abbildung 7.6 nochmals vergleichend gegeneinander aufgetragen.

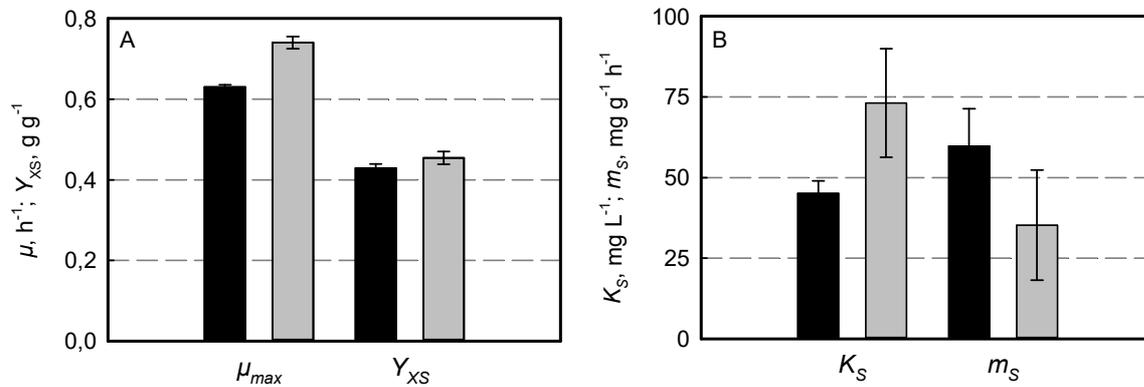


Abbildung 7.6 Vergleich der Modellparameter des Wachstums für infizierte und nicht infizierte *E. coli* JM 109. A: Dargestellt sind die maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}) und die Biomasseertragskoeffizienten (Y_{XS}) für infizierte (schwarze Balken) und nicht infizierte (graue Balken) *E. coli* JM 109. B: Auftragung der Substrataffinitätskonstante (K_S) und der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel (m_s) für infizierte (schwarze Balken) und nicht infizierte (graue Balken) *E. coli* JM 109.

Die Substrataffinitätskonstante konnte für die mit Bakteriophagen infizierten Zellen mit niedrigen relativen Abweichungen von 8,5 % auf 45 mg L^{-1} bestimmt werden. Es wurden innerhalb der Standardabweichung vergleichbare Werte für den Parameter K_S bestimmt, unabhängig davon, ob die Zellen mit Bakteriophagen infiziert wurden, dargestellt in Abbildung 7.6. Dies galt ebenso für den Ertragskoeffizienten (Y_{XS}) und die Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel (m_s), die lediglich mit einer relativen Abweichung von bis zu 48,5 % bestimmt werden konnte. Die konstante, biomassespezifische ssDNA Bildungsrate (k_P) wurde mit $0,17 \pm 0,007 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ identifiziert, mit einer geringen relativen Abweichung von 4,2 %. Im Gegensatz dazu konnte die Produktselektivität (Y_{PS}) lediglich mit einer hohen Abweichung von 68 % identifiziert werden.

Diskussion

Durch die Erweiterung der miniaturisierten Rührkesselreaktoren des bioREACTOR48 um Zu- und Ablaufvorrichtung konnte in vorausgegangenen Arbeiten eine kontinuierliche Prozessführung realisiert werden (Schmideder et al. 2015). Bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM 109 ohne Bakteriophagen wurde ein stabiler Betriebspunkt bereits nach weniger als 5 hydraulischen Verweilzeiten erreicht, abzulesen an dem stabilen Verhalten der Gelöstsauerstoffkonzentration und der Biotrockenmassekonzentration. 5 Verweilzeiten sind die hydraulische Voraussetzung, bis im ideal rückvermischten Rührkesselreaktor 99,3 % des Mediums ausgetauscht sind (vgl. Kapitel 3.3.2). Dieses stabile Verhalten der Biotrockenmasse- und Gelöstsauerstoffkonzentration vor Erreichen der hydraulischen Voraussetzung wurde ebenso mit *E. coli* beobachtet, die weder Bakteriophagen noch rekombinante Proteine produzierten (Schmideder et al. 2015).

Die kontinuierliche Kultivierung mit Bakteriophagen verlängerte das Erreichen eines Fließgleichgewichtszustandes in Abhängigkeit der eingestellten Durchflussrate auf bis zu 10,4 Verweilzeiten ($D = 0,52 \text{ h}^{-1}$). Im Vergleich zur Biotrockenmassekonzentration im Fließgleichgewichtszustand, war eine signifikante Reduktion der Zellkonzentration zu Beginn der kontinuierlichen Prozessführung in Abhängigkeit der Durchflussrate ersichtlich. Weiterhin war die Akkumulation von Glucose ebenso abhängig von der eingestellten Durchflussrate. Daraus lässt sich folgern, dass die Infektion mit Bakteriophagen die Wachstumsrate der Zellen reduziert und zum Austrag von Zellen in Abhängigkeit der Durchflussrate führt. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben, in der die Infektion von *E. coli* mit den Bakteriophagen M13 zu einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate führt (Grieco et al. 2009; Salivar et al. 1964; Sambrook et al. 2001). Anhand der kontinuierlichen Kultivierung mit Bakteriophagen im Chemostaten ist weiterhin ersichtlich, dass die Einstellung eines Fließgleichgewichts nicht ausschließlich über die hydraulische Voraussetzung ermittelt werden kann, sondern vom Metabolismus der Zellen abhängig ist (Rutgers et al. 1989; Weuster-Botz 1999).

Dennoch wurde für die infizierten Zellen mit der modellgestützten Analyse der Fließgleichgewichtszustände eine maximale Wachstumsrate von $0,63 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Diese hohe maximale Wachstumsrate steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass bereits bei einer Durchflussrate und somit vorgegebenen Wachstumsrate von $0,39 \text{ h}^{-1}$ eine Abnahme der Zellkonzentration aufgetreten ist, dargestellt in Abbildung 7.3. Im Verlauf der

kontinuierlichen Kultivierung kam es daher zur Adaption der Zellen an die kontinuierliche Produktion von Bakteriophagen und zur Selektion auf schnell wachsende, infizierte Zellen. Dies resultierte in dem Anstieg der Biotrockenmassekonzentration und dem Verbrauch der überschüssigen Glucose vor dem Einstellen des Fließgleichgewichtszustandes.

Diese Adaption und Selektion fand unabhängig von der eingestellten Durchflussrate statt, konnte jedoch bei höherer Durchflussrate an der Reduktion der Biotrockenmassekonzentration und dem Anstieg der Glucosekonzentration verfolgt werden. Diese These wird weiterhin durch die Tatsache gestützt, dass die spezifische Produktbildungsrate bereits nach 6 Verweilzeiten einen konstanten Wert annimmt, wohingegen die Biotrockenmasse- und die Glucosekonzentration erst nach 9,7 Verweilzeiten stabil werden, dargestellt in Abbildung 7.3. Dies verdeutlicht die Adaption der infizierten Zellen auf das Wachstum bei gleichzeitiger konstanter zellspezifischer Bakteriophagenproduktion. Die Selektion auf adaptierte, schnell wachsende Zellen ist ein bekanntes Problem bei Fließgleichgewichtsuntersuchungen in kontinuierlichen Rührkesselreaktoren bei hohen Durchflussraten (Dykhuisen und Hartl 1983; Weuster-Botz 1999).

Die kontinuierliche Kultivierung im Chemostaten lieferte unabhängig von der eingestellten Wachstumsrate eine konstante, biomassespezifische Produktbildungsrate von $0,17 \pm 0,007 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorherigen Ergebnissen, bei der eine höhere Wachstumsrate eine höhere spezifische Produktbildungsrate in Zulaufkultivierungen erzielte (vgl. Kapitel 6.3.3). In den Zulaufkultivierungen konnte, unabhängig vom verwendeten *E. coli* Stamm, reproduzierbar gezeigt werden, dass eine höhere spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Zulaufphase die Phagenbildungsrate und die zellspezifische ssDNA Bildungsrate erhöht. Beim grundlegenden Vergleich der zwei Betriebsweisen kann festgestellt werden, dass bei der kontinuierlichen Kultivierung im Chemostaten eine Selektion zu schnell wachsenden Zellen stattfindet, im Gegensatz zu Zulaufkultivierungen. Bei der kontinuierlichen Kultivierung ist weiterhin eine Adaption der Zellen an die Phagenproduktion denkbar. Dabei kann es nach der Zugabe der Bakteriophagen einen Zustand geben, in dem die Zellen viel Energie für die Produktion von Bakteriophagen verwenden und damit einhergehend weniger Energie für das Zellwachstum zur Verfügung steht. Durch die Selektion auf schnell wachsende Zellen im Chemostaten setzen sich lediglich die Zellen durch, die sich an die Phagenproduktion adaptiert haben und eine Gleichgewicht aus Phagenproduktion und Zellwachstum erreichen.

Diese Selektion findet in Zulaufkultivierungen nicht statt und stellt eine mögliche Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse im Zulauf- und kontinuierlichen Prozess dar.

Die formalkinetischen Modellparameter μ_{max} , Y_{XS} und k_P konnten durch die Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit geringen relativen Abweichungen von unter 4,2 % bestimmt werden. Dabei sind die Parameter μ_{max} und Y_{XS} in Übereinstimmung mit Literaturwerten für dieses Medium (Korz et al. 1995; Puskeiler und Weuster-Botz 2004; Riesenberg et al. 1991). Die Reduktion der maximalen Wachstumsrate bei der gleichzeitigen Produktion von Bakteriophagen stimmt ebenfalls mit Literaturangaben überein, wobei bisherige Untersuchungen in Satzverfahren durchgeführt wurden (Calendar 2006; Grieco et al. 2009; Salivar et al. 1964). Die in dieser Arbeit durchgeführten Satzprozesse von *E. coli* JM 109 mit und ohne Bakteriophageninfektion zeigten keinen signifikanten Unterschied in der maximalen Wachstumsrate. Die maximale Wachstumsrate wurde für infizierte Zellen in Satzprozessen mit $0,64 \text{ h}^{-1}$ bestimmt, die der nicht infizierten Zellen mit $0,66 \text{ h}^{-1}$, dargestellt in Tabelle 5.1. Im Vergleich zur kontinuierlichen Prozessführung wurde die maximale Wachstumsrate der nicht infizierten Zellen im Satzverfahren um 13,6 % unterschätzt. Die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate in Satzprozessen ist aufgrund der instationären Bedingungen nur eingeschränkt belastbar.

Die Infektion mit Bakteriophagen führte wie zu erwarten zu keinem Einfluss auf die Affinitätskonstante bezüglich Glucose. Die ermittelten Werte lagen in dem in der Literatur beschriebenen Bereich zwischen $0,04\text{-}99 \text{ mg L}^{-1}$ (Senn et al. 1994). Beim Vergleich der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel konnte unter Berücksichtigung der relativen Fehler ebenfalls kein Unterschied identifiziert werden. Die bestimmten Werte waren in Übereinstimmung mit Literaturdaten ($25\text{-}54 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Korz et al. 1995; Wunderlich et al. 2014).

Auffällig sind die hohen Parameterunsicherheiten bei der Bestimmung der Affinitätskonstante für Glucose der nicht infizierten Zellen und der Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Affinitätskonstante stark von den bestimmten Zustandsgrößen für die Biotrockenmassekonzentration und der Substratkonzentration nahe der maximalen Wachstumsrate beeinflusst wird. Diese Betriebspunkte sind im Chemostaten schwer stabil einzustellen, da bereits kleine Schwankungen in der Durchflussrate den Fließgleichgewichtszustand auslenken können. Die Verwendung eines Turbidostaten mit *on-line* Messung einer Zustandsgröße,

beispielsweise der Zellkonzentration, und Regelung der Durchflussrate als veränderbare Größe wäre hierfür besser geeignet. Die Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel kann bei der Einstellung sehr geringer Durchflussrate unter $0,1 \text{ h}^{-1}$ gut bestimmt werden. Dies war jedoch aus prozesstechnischen Gründen, aufgrund der zu geringen Förderraten der Peristaltikpumpen in den verwendeten miniaturisierten Rührkesselreaktoren nicht möglich.

7.2 Kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab und Erhöhung der Substratkonzentration

Damit die kontinuierliche Kultivierung mit Bakteriophagen eine Alternative zum entwickelten Zulaufverfahren darstellen kann, wurden die Ergebnisse aus den miniaturisierten Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab in den Litermaßstab übertragen. Als Übertragungskriterium diente dabei die maximale Sauerstoffeintragsrate. Die kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab wurde bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ unter sonst gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Der Vergleich der erzielten Konzentrationen für die Biotrockenmasse, Glucose und ssDNA im Fließgleichgewicht mit den im Millilitermaßstab identifizierten, simulierten Zustandsgrößen ist in Abbildung 7.7 dargestellt.

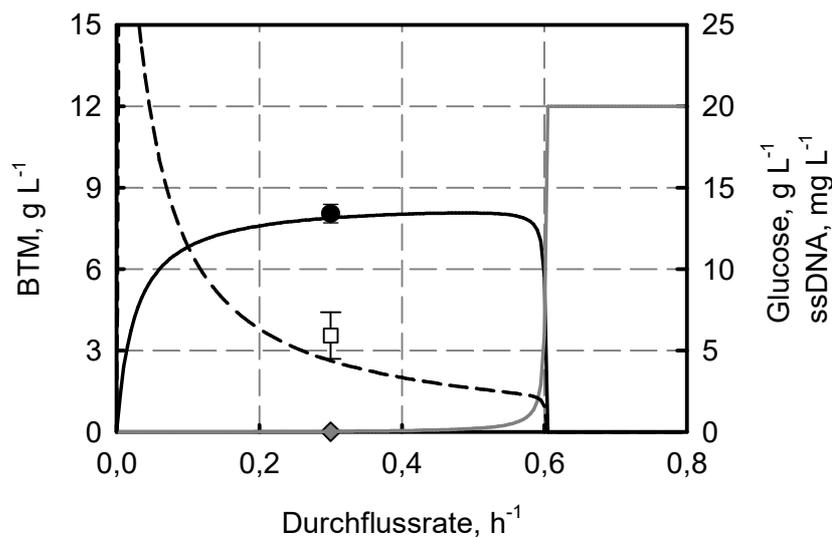


Abbildung 7.7 Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit dem Bakteriophagen M13 im Litermaßstab. Dargestellt sind die Biotrockenmassekonzentration (●), die Glucosekonzentration (✦) und die ssDNA Konzentration (□) im Fließgleichgewicht der kontinuierlichen Kultivierung im Rührkesselreaktor im Litermaßstab bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$. Im Vergleich dazu sind die simulierten Zustandsgrößen aus dem Millilitermaßstab eingezeichnet.

Die Biotrockenmasse-, Glucose- und ssDNA Konzentration konnte unter Berücksichtigung der Beobachtungsgenauigkeit in den Litermaßstab übertragen werden. Dabei wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $1,8 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer spezifischen ssDNA Bildungsrate von $0,22 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Aufgrund der Unabhängigkeit der Raum-Zeit-Ausbeute und der spezifischen ssDNA Bildungsrate von der Durchflussrate,

wurde nur ein Fließgleichgewichtszustand übertragen. Im Folgenden sollte die Substratkonzentration im Zulauf um den Faktor 3,5 auf 70 g L^{-1} erhöht werden, um somit die Biotrockenmassekonzentration und Raum-Zeit-Ausbeute zu erhöhen. Dabei wird ein Massenstrom von $21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ erreicht, wodurch der Sauerstoffbedarf der Zellen die maximale Sauerstoffeintragsrate des Reaktors unter den gewählten Prozessbedingungen erreicht. Nach einer Satzphase mit einer vorgelegten Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} wurde ein exponentielles Zulaufprofil mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ gestartet, bis bei einem Massenstrom von $21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose die kontinuierliche Prozessführung mit einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ gestartet wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 7.8 dargestellt.

Mit dem Verbrauch der vorgelegten Glucose in der Satzphase und dem damit einhergehenden Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wird automatisiert das exponentielle Zulaufprofil gestartet und die Infektion mit dem Bakteriophagen M13 bei einer Biotrockenmassekonzentration von $25,2 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ in der Zulaufphase durchgeführt. Zum Start der kontinuierlichen Prozessführung wurde am Ende der exponentiellen Zulaufphase eine Biotrockenmassekonzentration von $41,3 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ und eine ssDNA Konzentration von $20,2 \pm 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ erzielt, dargestellt in Abbildung 7.8. Anschließend war eine deutliche Reduktion in der Biotrockenmassekonzentration auf $9,6 \text{ g L}^{-1}$ zu beobachten, bei gleichzeitigem Anstieg der Glucosekonzentration auf $36,7 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 2,3 hydraulischen Verweilzeiten. Im Gegensatz dazu stieg die ssDNA Konzentration auf $85,3 \text{ mg L}^{-1}$ nach Start der kontinuierlichen Prozessführung an, bevor ebenso eine deutliche Reduktion zu verzeichnen war. Die biomassespezifische ssDNA Bildungsrate k_p erreicht ein Maximum von $1,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 1,1 Verweilzeiten.

Zwischen 6 - 9 Verweilzeiten war ein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration und entsprechend eine Reduktion der Glucosekonzentration zu beobachten. Nach 13,2 Verweilzeiten wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $25,5 \pm 0,9 \text{ g L}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von 3,5 % im Fließgleichgewicht bestimmt, dargestellt in Tabelle 7.2. Aus den simulierten Modellparametern in Tabelle 7.1 lässt sich eine Biotrockenmassekonzentration von $27,6 \text{ g L}^{-1}$ berechnen, dargestellt in Abbildung 7.8. Daraus ergibt sich eine Abweichung der experimentell bestimmten und mit den simulierten Modellparametern berechneten Konzentrationen im Fließgleichgewichtszustand von 7,6 %.

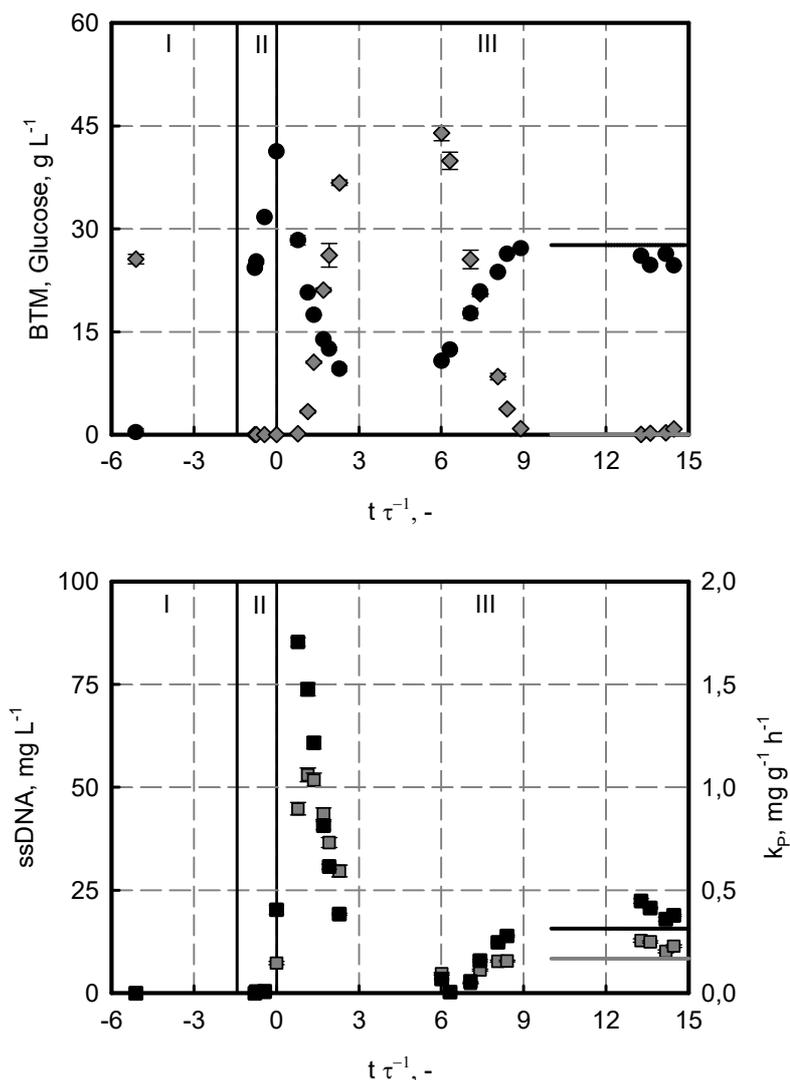


Abbildung 7.8 Kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab mit erhöhter Glucosekonzentration im Zulauf. Die kontinuierliche Kultivierung mit *E. coli* JM 109 im Rührkesselreaktor wurde in definiertem Medium nach Riesenberg et al. (1991) mit einer Glucosekonzentration von 70 g L^{-1} im Zulauf durchgeführt. Weiterhin sind die zum Erreichen eines Fließgleichgewichtszustandes nötige Satzphase (I), Zulaufphase mit vorgegebener spezifischer Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ (II) und die kontinuierliche Phase im Chemostaten bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ dargestellt. Der Start der kontinuierlichen Prozessführung wurde als $t \tau^{-1} = 0$ definiert. Auftragung des Konzentrationsverlaufes der Biotrockenmasse (\bullet , oben), der Glucose (\blacklozenge , oben), der ssDNA (\blacksquare , unten) und der biomassespezifischen ssDNA Bildungsrate k_P (\blacksquare , unten) über die auf die Verweilzeit normierte Prozesszeit ($t \tau^{-1}$). Die mit den Modellparametern in Tabelle 7.1 bestimmten Zustandsgrößen und Parameter im Fließgleichgewichtszustand sind als Linien ab einer hydraulischen Verweilzeit von 10 eingezeichnet.

Im Fließgleichgewicht wird eine ssDNA Konzentration von $19,1 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von 7,3 % bestimmt. Die aus den simulierten Modellparametern berechnete ssDNA Konzentration im Fließgleichgewichtszustand ist mit $15,6 \text{ mg L}^{-1}$ um 18,3 % niedriger. Dementsprechend ergibt sich bei der Betrachtung der experimentell bestimmten

und modellbasiert berechneten spezifischen ssDNA Bildungsraten eine Abweichung von 22,7 %.

Die erhaltenen Zustandsgrößen und berechneten Parameter im Fließgleichgewichtszustand für die unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Zulaufmedium sind in Tabelle 7.2 nochmals vergleichend aufgetragen. Ebenso werden zum Vergleich die Ergebnisse aus dem Millilitermaßstab bei einer Durchflussrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ aufgelistet.

Tabelle 7.2 Vergleich der Fließgleichgewichtszustände der kontinuierlichen Kultivierung im Milliliter- und Litermaßstab bei unterschiedlicher Glucosekonzentration im Zulaufmedium.

| Zustandsgröße/ Parameter | Millilitermaßstab | Litermaßstab | |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|
| $c_{SF}, \text{ g L}^{-1}$ | 20 | 20 | 70 |
| BTM, g L^{-1} | $8,4 \pm 0,5$ | $8,1 \pm 0,3$ | $25,5 \pm 0,9$ |
| ssDNA, mg L^{-1} | $5,7 \pm 0,8$ | $6,0 \pm 1,5$ | $19,4 \pm 1,4$ |
| $k_P, \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $0,17 \pm 0,007$ | $0,22 \pm 0,04$ | $0,22 \pm 0,02$ |
| $RZA, \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $1,6 \pm 0,1$ | $1,8 \pm 0,4$ | $5,7 \pm 0,4$ |

Die Erhöhung der Glucosekonzentration im Zulaufmedium bewirkte die Steigerung der Biotrockenmasse- und ssDNA Konzentration um den Faktor 3,2. Dementsprechend blieb die biomassespezifische ssDNA Bildungsrate innerhalb der Standardabweichung konstant. Die Raum-Zeit-Ausbeute konnte auf $5,7 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden.

Diskussion

Durch die kontinuierliche Kultivierung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren sind zum einen die parallele Untersuchung von bis zu 8 Zuständen möglich, sowie die rasche Identifikation formalkinetischer Modellparameter und die Bestimmung optimaler Betriebsbedingungen. Eine entscheidende Voraussetzung hierbei ist die Übertragbarkeit in den Litermaßstab. Dies konnte mittels der maximalen Sauerstofftransferrate als Übertragungskriterium anhand eines Fließgleichgewichtszustands gezeigt werden. Obwohl im Millilitermaßstab ein gasinduzierter Rührer und im Litermaßstab zwei 6-Blatt Scheibenrührer verwendet wurden, konnte der Bioprozess erfolgreich übertragen werden. Die Übertragbarkeit von Satz-, Zulauf- und kontinuierlichen Prozessen konnte bereits in verschiedenen Veröffentlichungen bestätigt werden (Hoefel et al. 2010; Hortsch et al. 2011;

Knorr et al. 2007; Schmideder et al. 2015). Aus diesem Grund lag der Fokus in der Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute, die nur durch die Erhöhung der Glucosekonzentration weiter gesteigert werden konnte. Dabei konnte ein Fließgleichgewichtszustand bei einer Glucosekonzentration von 70 g L^{-1} im Zulaufmedium erreicht werden. Die experimentell bestimmten Zustandsgrößen wichen dabei um die doppelte Standardabweichungen von der mit den Modellparametern berechneten Konzentration im Fließgleichgewicht ab. Diese Diskrepanz ist bei der Verwendung eines biologischen Systems akzeptabel und zeigt die Anwendbarkeit der Modellparameter, um die Zustandsgrößen Biotrockenmasse-, Glucose-, und ssDNA Konzentration im Fließgleichgewicht vorherzusagen. Durch die Erhöhung der Glucosekonzentration im Zulaufmedium konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $5,7 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden, dies entsprach einer Erhöhung um den Faktor 3,2.

Bei einer Zulaufkultivierung mit infizierten *E. coli* JM 109 konnten reproduzierbar $296,5 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA in einer Prozesszeit von 39,7 Stunden isoliert werden. Werden zusätzlich noch weitere 12 Stunden für die Vor- und Nachbereitung des Rührkesselreaktors berücksichtigt, ergibt sich ebenso eine Raum-Zeit-Ausbeute von $5,7 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Damit ist die kontinuierliche Prozessführung bezüglich der Produktivität identisch zum Zulaufprozess. Eine weitere Steigerung der Produktivität durch die Erhöhung der Glucosekonzentration bei gleichbleibenden Durchflussrate im kontinuierlichen Betrieb ist mit dem hier verwendeten Reaktionssystem technisch nicht realisierbar, da die Zuluft nicht durch reinen Sauerstoff angereichert werden kann, um eine Sauerstoffeintragslimitierung zu vermeiden. Neben der reinen Produktivität sollte für den Vergleich zwischen Zulauf- und kontinuierlichem Prozess zusätzlich die folgende Isolierung der ssDNA aus dem Reaktionsmedium berücksichtigt werden. Dabei ist zu beachten, dass die ssDNA Konzentration im Zulaufprozess um den Faktor 15 größer ist als im kontinuierlichen Prozess. Durch die deutlich höhere Produktkonzentration bei gleicher Produktivität werden die Kosten und das zu reinigende Reaktionsvolumen bei der Verwendung des Zulaufprozesses deutlich geringer sein.

8 Produktion von artifizierter Einzelstrang DNA für DNA Origami

Für die *scaffolded* DNA Origami Technologie wird häufig die genomische Einzelstrang DNA (ssDNA) des Bakteriophagen M13 verwendet. Dabei wurden durch Insertionen in die multiple Klonierungsstelle verschiedene Längenvarianten erstellt, um für das Strukturdesign mehr Freiheitsgrade zu generieren. Dennoch ist das Strukturdesign bisher auf den genomischen Gerüststrang des Bakteriophagen M13 angewiesen. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde am Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München die Kombination aus Phagemid und Helferphagen erarbeitet, dass die Produktion von artifizierter ssDNA ermöglicht. Die beiden Komponenten der *scaffolded* DNA Origami Technologie, der Gerüststrang und die kurzen Oligonukleotide, die als Klammern dienen, stellen dabei das Phagemid dar. Dabei enthält der später als Gerüststrang verwendete Bereich den Replikationsursprung der M13 Phagen, die Verpackungssequenz und als Selektionsmarker die resistenzvermittelnden Gene gegen Carbenicillin. Die Bereiche, die später als Klammern verwendet werden sollen, sind dabei durch zinkabhängige, selbstschneidende ssDNA Strukturen verbunden (Gu et al. 2013; Gu und Breaker 2013). In der Gesamtheit stellt dieses Phagemidsystem eine hohe Flexibilität in der Basensequenz dar, in der sowohl die Klammern als auch der Gerüststrang größtenteils individuell erstellt werden können. Weiterhin wird in einem Produktionsschritt artifizierbare ssDNA gebildet, die anschließend zu Gerüststrang und Klammern hydrolysiert wird. Die artifizierbare ssDNA soll mit dem im Schüttelkolben etablierten System der Infektion mit dem Helferphagen M13K07 produziert und in den Rührkesselreaktor übertragen werden. Dafür soll der modifizierte *E. coli* Stamm JM 109_pBSG, der das Phagemid trägt, im

Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren kultiviert und mit dem Helferphagen M13K07 infiziert werden. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

8.1 Einfluss der Multiplizität der Infektion bei der Zulaufkultivierung mit dem Helferphagen M13K07

Aufbauend auf Erfahrungswerten bei der Zulaufkultivierung mit dem Bakteriophage M13mp18 sollte die Infektion mittels Helferphagen M13K07 während der exponentiellen Zulaufphase mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von $0,05 \text{ pfu cfu}^{-1}$ erfolgen. Der durchgeführte Prozess wurde wiederum in eine Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose und der anschließenden Zulaufphase mit einem exponentiellen Zulaufprofil mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ in definiertem Medium durchgeführt. Das in Abbildung 6.1 dargestellte Zulaufprofil für den Stamm JM 109 wurde auf diesen Prozess übertragen. Die Infektion mit dem Helferphagen wurde 5 Stunden nach Start der Zulaufphase durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration an Helferphagen nach 28 Stunden $7,8 \pm 0,6 \cdot 10^9 \text{ pfu mL}^{-1}$ erreichte, bei einem Infektionstiter von $3,4 \pm 0,8 \cdot 10^9 \text{ pfu mL}^{-1}$. Der Phagentiter stieg dabei in 24 Stunden um den Faktor 2,2 an. Zu Prozessende wurde ein Verhältnis von Helferphagen zu Wirtszellen von $0,05 \text{ pfu cfu}^{-1}$ erreicht, womit mehr Zellen als Helferphagen vorlagen. Dabei wurde eine maximale Produktkonzentration an artifizierten Phagen von $3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{11} \text{ tu mL}^{-1}$ erreicht, dargestellt in Abbildung 8.1. Die Quantifizierung erfolgte dabei über die Übertragung der Resistenzgene für Carbenicillin auf einen Carbenicillin sensitiven *E. coli* Stamm und wurde als *transducing unit* (tu) angegeben (vgl. Kapitel 4.6.2). Durch Erhöhung der MOI an Helferphagen sollte der Anteil an infizierten Wirtszellen erhöht werden. Die Ergebnisse der Zulaufkultivierung mit *E. coli* JM109_pBSG74 bei unterschiedlichen MOI sind in Abbildung 8.1 dargestellt.

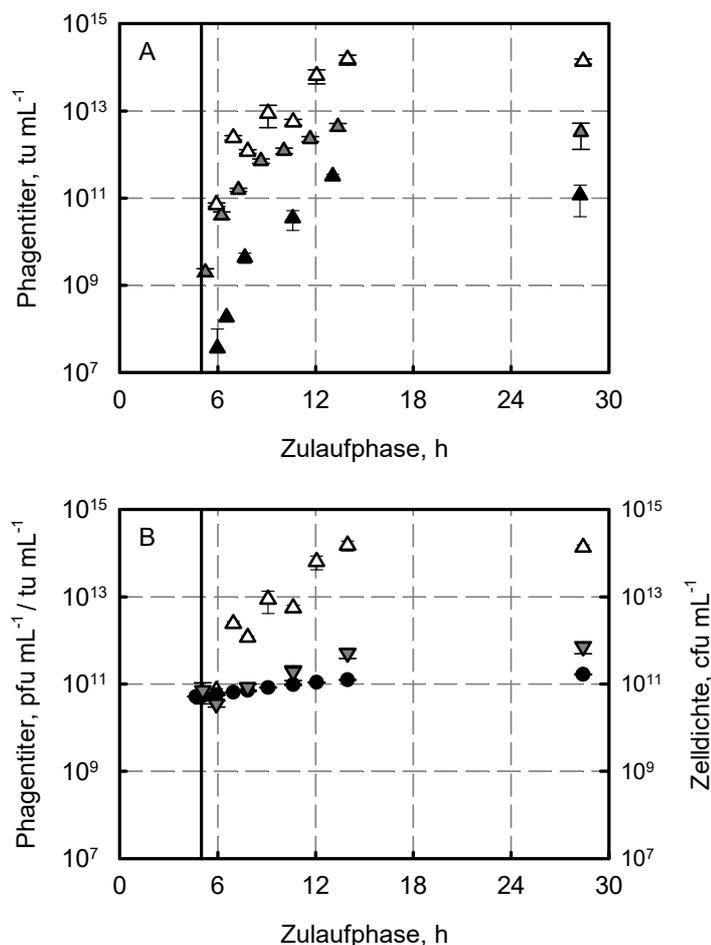


Abbildung 8.1 Einfluss der Infektionsdichte der Helferphagen M13K07 auf den Phagentiter mit artifizierlicher ssDNA. A: Dargestellt sind die Verläufe der Phagentiter mit artifizierlicher ssDNA für drei Hochzelldichtekultivierungen mit einer Infektionsdichte an Helferphagen M13K07 von MOI = 0,05 (▲), MOI = 0,8 (▲) und MOI = 1,3 (Δ). B: Aufgetragen sind der Phagentiter der Helferphagen (▼), die Produktkonzentration an artifiziiellen Phagen (Δ) und die Zelldichte der Wirtszellen (●) bei einer MOI von 1,3. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Prozessbedingungen (pH 6,7, T = 37 °C) in definiertem Medium nach Riesenberg im Rührkesselreaktor mit *E. coli* JM109_pBSG74 durchgeführt. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Mit steigender Infektionsdichte waren jeweils eine Stunde nach Zugabe der Helferphagen bereits höhere Produktkonzentrationen nachweisbar, dargestellt in Abbildung 8.1 A. Die Phagenproduktion zeigte einen vergleichbaren Verlauf für alle drei MOI, wohingegen bei der Endkonzentration des Produkts ein direkter Zusammenhang zur MOI hergestellt werden konnte. Bei einer MOI von 1,3 pfu cfu^{-1} wird ein Produkttiter von $1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{14}$ tu mL^{-1} erreicht, bei einer MOI von 0,05 pfu cfu^{-1} maximal $3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{11}$ tu mL^{-1} . Durch die Erhöhung der Infektionsdichte an Helferphagen konnte die Produktkonzentration somit um einen Faktor von 452 gesteigert werden.

Der Titer an Helferphagen mit $7,1 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$ pfu mL⁻¹ war zum Zeitpunkt der Infektion nach 5 Stunden Zulaufphase höher als die Zelldichte, wodurch eine Infektionsdichte von 1,3 pfu cfu⁻¹ berechnet wurde, dargestellt in Abbildung 8.1 B. Basierend auf einer Poissonverteilung wurden zum Zeitpunkt der Zugabe der Helferphagen 74 % der Zellen mit mindestens einem Bakteriophagen infiziert. Die Abnahme des Titers an Helferphagen nach einer Stunde spiegelt die Infektion der Zellen wider, nachdem mit dem Plaque Test nur infektiöse Phagenpartikel im Überstand bestimmt wurden. Nach 14 Stunden war die Konzentration an Helferphagen auf $5,1 \pm 1,2 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹, nach 28,5 Stunden auf $7,2 \pm 2,2 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ gestiegen. Der Helferphagentiter stieg dementsprechend über 23,5 Stunden nur um eine Größenordnung an. Im Gegensatz dazu konnte eine Produktkonzentration von $7,1 \pm 0,7 \cdot 10^{10}$ pfu mL⁻¹ eine Stunde nach Infektion und nach 14 Stunden Zulaufphase eine Konzentration von $1,5 \pm 0,3 \cdot 10^{14}$ pfu mL⁻¹ bestimmt werden. Dies entsprach einem Anstieg um 4 Größenordnungen innerhalb von 9 Stunden. Zu Prozessende wurde ein Verhältnis aus artifiziellen Bakteriophagen, die die gewünschte ssDNA verpackt haben, und den Helferphagen von 190 erzielt.

Die Produktion von artifizieller ssDNA mit *E. coli* JM 109_pBSG74 und die Infektion mit dem Helferphagen M13K07 sollte im Folgenden bei einer MOI von 1,3 pfu cfu⁻¹ reproduziert werden, dargestellt in Abbildung 8.2. Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration konnte für drei sequentiell durchgeführte Zulaufkultivierungen reproduziert werden, bei denen eine mittlere maximale Biotrockenmassekonzentration von $77,2 \pm 1,9$ g L⁻¹ erreicht wurde. Die Bestimmung des Titers der artifiziellen Bakteriophagen zeigte sowohl höhere analytische Abweichungen in der Bestimmung einzelner Proben als auch im Verlauf. Dennoch konnte ein mittlerer maximaler Phagentiter von $8,3 \pm 4,9 \cdot 10^{13}$ tu mL⁻¹ in den drei Zulaufkultivierungen identifiziert werden. Die Bildungsrate der artifiziellen Phagenpartikel konnte mit $0,45 \pm 0,04$ h⁻¹ bestimmt werden. Der Verlauf der Helferphagen zeigte einen Anstieg um eine Größenordnung nach 24 Stunden.

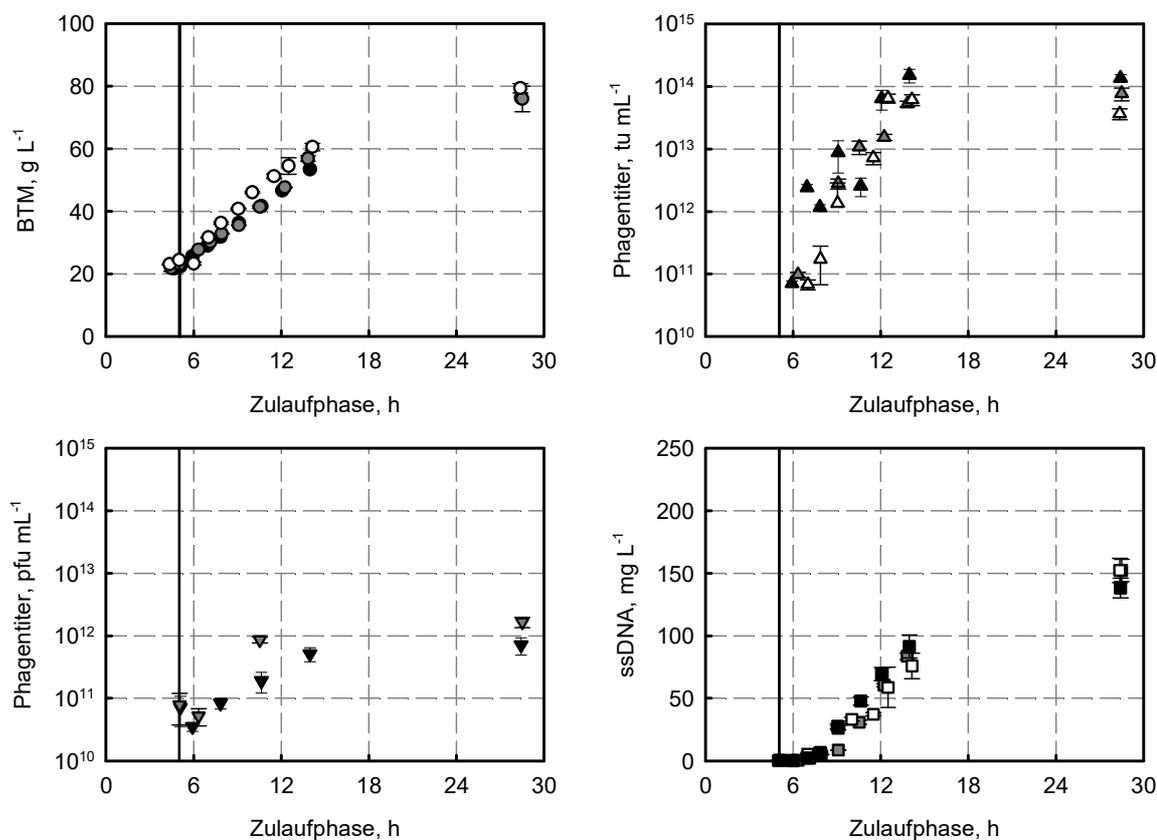


Abbildung 8.2 Reproduktion der Herstellung artifizierender ssDNA mit Helferphagen im Zulaufverfahren. Dargestellt sind die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration (A), des Titors der artifizierender Phagen (B), des Helferphagentiters (C) und der isolierten ssDNA (D) über die Zulaufphase für drei sequentiell durchgeführte Zulaufkultivierungen. Die Zugabe des Helferphagen M13K07 erfolgte nach 5 Stunden Zulaufphase mit einer MOI von $1,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$. Die Zulaufkultivierungen wurden unter identischen Prozessbedingungen ($\text{pH } 6,7$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$) in definiertem Medium nach Riesenberg im Rührkesselreaktor mit *E. coli* JM109_pBSG74 durchgeführt. Die vertikale Linie repräsentiert den Zeitpunkt der Infektion mit Helferphagen. Die Standardabweichungen stellen analytische Triplikate dar.

Zwei Stunden nach Zugabe der Helferphagen konnte bereits eine ssDNA Konzentration von $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ im Überstand nachgewiesen werden. Nach 9 Stunden wurde eine ssDNA Konzentration von $83,6 \pm 7,8 \text{ mg L}^{-1}$ isoliert, dargestellt in Abbildung 8.2 D. Am Ende der Zulaufkultivierung war die ssDNA Konzentration auf $147,6 \pm 8,2 \text{ mg L}^{-1}$ angestiegen.

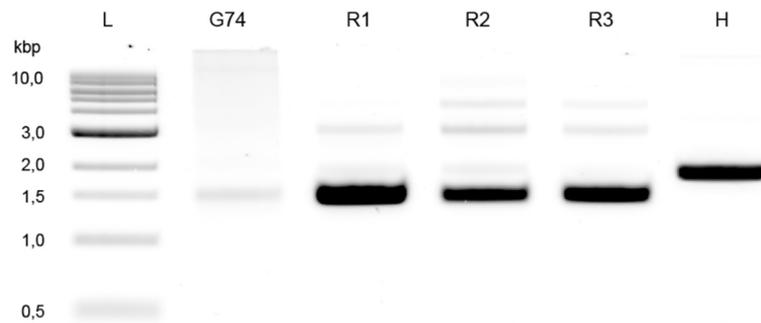


Abbildung 8.3 Migrationsverhalten der artifizierten ssDNA im Agarosegel. Aufgetragen sind die 1 kbp DNA Leiter (L), die ssDNA des Phagemids pBSG74 (G74) und die isolierte ssDNA (R1-3) der drei sequentiell durchgeführten Zulaufkultivierungen mit einem MOI von $1,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$. Zusätzlich ist in die ssDNA des Helferphagen M13K07 (H) aufgetragen. Bedingungen: 2 % Agarose, 11 mM MgCl_2 , 90 V, 500 mA.

Diskussion

Die Untersuchung des Einflusses der Infektionsdichte an Helferbakteriophagen zeigte, dass eine direkte Abhängigkeit zur Produktkonzentration besteht. Die Erhöhung der Infektionsdichte steigerte die maximale Produktkonzentration deutlich. Obgleich auch für Kultivierungen mit den Helferphagen im Schüttelkolben eine hohe Infektionsdichte verwendet wird (Sambrook et al. 2001), ist der Einfluss der Infektionsdichte auf die Produktkonzentration aufgrund der begrenzten Substratversorgung und niedrigen Sauerstoffeintragsraten im Schüttelkolben geringer. In Hochzelldichtekultivierungen mit dem Bakteriophagen M13mp18 konnte die Infektionsdichte als kritischer Parameter für die Phagenbildungsrate und die maximale Produktkonzentration identifiziert werden, wengleich der Einfluss auf die Produktkonzentration nur einen Faktor zwei entsprach und damit deutlich geringer war als in der Zulaufkultivierung mit dem Phagen M13K07.

Im Gegensatz zu Zulaufkultivierungen mit dem Bakteriophagen M13mp18 stieg die Konzentration an M13K07 innerhalb von 23,5 Stunden lediglich um eine Größenordnung an. In Zulaufkultivierungen mit dem Phagen M13mp18 bei vergleichbaren Infektionsdichten konnte ein Anstieg um 3 Größenordnungen erzielt werden. Die genetische Modifikation des Helferphagen M13K07 hat einen deutlichen negativen Einfluss auf die Phagenbildungsrate und die zu erreichende maximale Konzentration, bei gleichzeitiger Amplifikation der Phagemid DNA und Extrusion der artifizierten ssDNA über die Zellmembran. Die Bildung der artifizierten Phagenpartikel konnte durch die Variation der Infektionsdichte und damit einhergehenden die Anzahl an produzierenden Wirtszellen in Konzentrationsbereiche

vergleichbar der Zulaufkultivierung mit dem Bakteriophagen M13mp18 optimiert werden. Der in der Literatur beschriebene Anteil an Helferphagen von 5 % in Bezug auf die Produktkonzentration konnte durch die Variation der Infektionsdichte deutlich reduziert werden (Sambrook et al. 2001). Anhand der Quantifizierung mittels Plaquetest lässt sich ein Anteil an Helferphagen von 0,5 % berechnen. Dieses Ergebnis spiegelt sich in der Auftrennung der gereinigten ssDNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wider, dargestellt in Abbildung 8.3. Darin lässt sich keine ssDNA identifizieren, die dem Genom des Helferphagen zuzuordnen wäre. Dies ist bei einem Anteil von unter 1 % aufgrund der Auflösung der Gelelektrophorese auch nicht zu erwarten.

8.2 Selbstassemblierungsreaktion im Millilitermaßstab

Die im Rührkesselreaktor mit den Helferphagen M13K07 hergestellte artifizierliche ssDNA wurde im Folgenden für die Faltung dreidimensionaler Strukturen verwendet. Dafür wurde durch Zugabe von 4 mM Zinkionen zur gereinigten ssDNA (50 nM) die selbstschneidende Aktivität der DNase katalysiert. Dadurch wurde die artifizierliche ssDNA in die zwei Komponenten, den Gerüststrang und die Klammern hydrolysiert. Nach einem erneuten Reinigungsschritt wurde die Faltung der ssDNA nach der DNA Origami Technologie, die über ein Temperaturprofil begünstigt wird, durchgeführt. Dabei konnte die Selbstassemblierungsreaktion in einem Volumen von fünf Millilitern mit 50 nM ssDNA durchgeführt werden. In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München konnte gezeigt werden, dass sowohl die Hydrolyse der artifizierlichen ssDNA, als auch die Faltungsreaktion erfolgreich waren.

9 Zusammenfassung

DNA Origami ist eine aktuelle Strategie aus dem Bereich der Nanotechnologie, bei der aus selbstassemblierenden DNA Molekülen mit hoher Präzision benutzerdefinierte, dreidimensionale Nanopartikel konstruiert werden. Die Bildung dieser komplexen Nanopartikel kann nach der *scaffolded* DNA Origami Methode erfolgen, bei der ein zirkuläres und einzelsträngiges DNA (ssDNA) Molekül als Grundgerüst mit Hilfe von kurzen, konstruierten ssDNA Strängen in einer selbstassemblierenden Reaktion Nanostrukturen ausbildet. Trotz der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und der rasanten Fortschritte in diesem jungen Forschungsbereich verhindert die unlimitierte Bereitstellung der zwei ssDNA Edukte bisher eine marktfähige Anwendung. Dabei besteht die Herausforderung in der Entwicklung einer Methode, die sowohl die hohen Anforderungen an Qualität und Quantität der ssDNA, aber auch die Möglichkeit zur Skalierung in einen industriellen Maßstab beinhaltet.

Zur Produktion von ssDNA können verschiedene biotechnologische Methoden eingesetzt werden, die sich in Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte, *rolling circle* Amplifikationen und eine phagenbasierte Methode unterteilen lassen. Um die Anforderungen in Bezug auf Quantität und vor allem auf eine einfache Maßstabsvergrößerung zu erfüllen, wurde die ssDNA Herstellung mit den Bakteriophagen M13 untersucht. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit die Herstellung des Bakteriophagen mit *Escherichia coli* (*E. coli*) im Satzverfahren im Rührkesselreaktor. Darauf aufbauend sollte ein Hochzelldichteprozess mit *E. coli* und anschließender Infektion mit Bakteriophagen erarbeitet und reaktionstechnisch untersucht werden, um die Produktkonzentration an Bakteriophagen und ssDNA steigern zu können. Durch die Untersuchung der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* mit dem Bakteriophagen M13

sollten die Kinetiken von Wachstum und Produktbildung identifiziert werden. Abschließend sollte die Kombination aus Phagemid und Helferphagen in den Rührkesselreaktor übertragen werden, um artifizielle ssDNA herzustellen. Diese artifizielle ssDNA enthält die beiden ssDNA Edukte, die für die DNA Origami Technologie benötigt werden, wodurch die Produktion im Grammmaßstab ermöglicht wird.

In einem ersten Schritt wurde die Satzkultivierung von zwei *E. coli* Stämmen (*E. coli* XL1-blue, *E. coli* JM 109) mit dem Bakteriophagen M13 in einem chemisch definierten Medium im Rührkesselreaktor etabliert. Dabei konnte der Anstieg des Phagentiters über 4 Größenordnungen von 10^8 pfu mL⁻¹ auf 10^{12} pfu mL⁻¹ in Übereinstimmung mit Literaturdaten beobachtet werden. Im Gegensatz zu bisherigen Literaturangaben konnte die Infektion mit dem Bakteriophagen M13 bei Biotrockenmassekonzentrationen von 3,2 g L⁻¹ und höher durchgeführt werden (Sambrook et al. 2001). Die maximale spezifische Wachstumsrate von *E. coli* XL1-blue wurde durch die Infektion um 29 % von 0,34 h⁻¹ auf 0,24 h⁻¹ reduziert. Die Infektion mit dem Bakteriophagen M13 führt hierbei nicht zur Lyse der Wirtszellen, sondern lediglich zur Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate (Sambrook et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung des Stammes *E. coli* JM 109 keine signifikante Reduktion der spezifischen Wachstumsrate in identisch durchgeführten Satzprozessen identifiziert werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Satzkultivierungen mit *E. coli* XL1-blue und JM 109 konnten durch Anpassungen des definierten Mediums nach Riesenberg et al. (1991) Zulaufverfahren mit maximalen Biotrockenmassekonzentrationen von 96 g L⁻¹ etabliert werden. Das Zulaufverfahren wurde in die drei Abschnitte Satzphase, exponentielle Zulaufphase und konstante Zulaufphase unterteilt. Die Infektion mit den Bakteriophagen erfolgte während der exponentiellen Zulaufphase, bei der die spezifische Wachstumsrate der Zellen durch das Zulaufprofil vorgegeben wurde. Durch die Verlängerung der Produktionsphase im Vergleich zum Satzverfahren konnte ein Anstieg des Phagentiters von 10^8 pfu mL⁻¹ auf 10^{14} pfu mL⁻¹ innerhalb von 8 Stunden erreicht werden. Es konnte eine maximale Phagenbildungsrate von 1,23 h⁻¹ mit beiden *E. coli* Stämmen unter identischen Reaktionsbedingungen ermittelt werden. Mit beiden Stämmen wurde eine maximale ssDNA Bildungsrate von 0,66 mg g⁻¹ h⁻¹ erreicht und nach 27 Stunden Zulaufphase wurden 300 mg L⁻¹ ssDNA isoliert. Dies zeigt die Robustheit des entwickelten Produktionsprozesses für ssDNA, unabhängig von der Wahl des *E. coli* Stammes. Im Vergleich zum Satzprozess konnten der maximale Phagentiter und die ssDNA Konzentration um zwei

Größenordnungen ohne Auftreten einer Limitierung durch Medienbestandteile gesteigert werden. Die isolierte ssDNA wurde erfolgreich in der DNA Origami Technologie für ausgewählte Nanostrukturen eingesetzt. Damit konnte eine Methode erarbeitet werden, die den hohen Herausforderungen bezüglich ssDNA Qualität und Quantität gerecht wird, aber auch prinzipiell eine Maßstabsvergrößerung in den industriellen Maßstab ermöglicht.

Die reaktionstechnische Charakterisierung des entwickelten Zulaufverfahrens zeigte, dass die Infektion mit Bakteriophagen die maximale Biotrockenmassekonzentration um bis zu 29 % auf $66,5 \text{ g L}^{-1}$ reduziert, dargestellt in Abbildung 9.1 A. Dennoch können die *E. coli* Zellen aufgrund des nicht lytischen Phagenzyklus nach Infektion mit dem Bakteriophagen M13 weiterhin wachsen. Die extrazelluläre Produktion der filamentösen Bakteriophagen führte zum Anstieg der dynamischen Viskosität auf $6,9 \text{ mPa s}$. Im Referenzprozess ohne Bakteriophagen wurde eine maximale dynamische Viskosität von $2,6 \text{ mPa s}$ bestimmt.

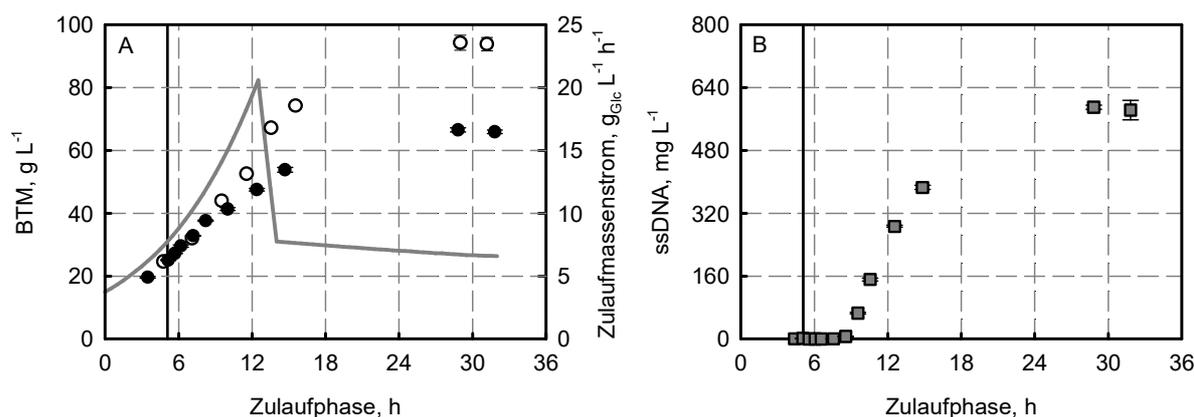


Abbildung 9.1 Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* XL1-blue mit Bakteriophagen M13 zur ssDNA Produktion im Rührkesselreaktor. A: Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse nicht infizierter (\circ) und infizierter (\bullet) Zellen über die Zulaufphase. Zusätzlich ist der Zulaufmassenstrom an Glucose (graue Linie) aufgetragen. B: Auftragung der isolierten ssDNA über die Zulaufphase. Die vertikale Linie symbolisiert den Zeitpunkt der Phageninfektion.

Der erste Schritt im Phagenzyklus stellt die Adsorption des Bakteriophagen M13 an den Fertilitätspilus von *E. coli* dar, die über die Adsorptionsrate beschrieben werden kann. Nach der Adsorption erfolgt die Infektion der *E. coli* Zellen, indem die genomische ssDNA des Bakteriophagen in das Cytosol injiziert wird. Die Adsorptionsrate des Bakteriophagen M13 ist im Vergleich zu veröffentlichten Daten aus Schüttelkolbenversuchen um über 2 Größenordnungen langsamer. Unter turbulenten Strömungsbedingungen wurde im Rührkesselreaktor erstmals eine Adsorptionsrate von $7,5 \cdot 10^{-13} \text{ mL min}^{-1}$ bestimmt, im

Schüttelkolben dagegen sind Adsorptionsraten von $3 \cdot 10^{-11} \text{ mL min}^{-1}$ beschrieben (Kasman et al. 2002). Dennoch ist die Infektion von *E. coli* mit dem Bakteriophagen M13 bei hohen Biotrockenmassekonzentrationen ($40,7 \text{ g L}^{-1}$) und turbulenten Strömungsverhältnissen möglich.

Durch die gezielte Variation der spezifischen Wachstumsrate während der exponentiellen Zulaufphase konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zur maximalen Phagenbildungsrate vorliegt. Durch Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ auf $0,25 \text{ h}^{-1}$ für den Stamm *E. coli* JM 109 konnte die maximale Phagenbildungsrate um den Faktor 2,5 auf $3,06 \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Im Vergleich dazu wurde bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ eine maximale Phagenbildungsrate von $1,21 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Eine Multiplizität der Infektion (MOI) von $2,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$ führte zu einer deutlichen Reduktion der maximalen Phagenbildungsrate und der isolierten ssDNA Konzentration. Im Gegensatz dazu konnte durch die Erhöhung der MOI von $0,002 \text{ pfu cfu}^{-1}$ auf $0,05 \text{ pfu cfu}^{-1}$ bei gleichbleibender Phagenbildungsrate die maximale ssDNA Konzentration auf 590 mg L^{-1} bei einer spezifischen ssDNA Bildungsrate von $1,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden, dargestellt in Abbildung 9.1 B. Dabei wurde ein maximaler Phagentiter von $3,6 \cdot 10^{14} \text{ pfu mL}^{-1}$ erreicht, was einer Trockenmassekonzentration an Bakteriophagen M13 von $7,3 \text{ g L}^{-1}$ entspricht.

Durch die kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* mit Bakteriophagen M13 konnten die Kinetiken von Wachstum und Produktbildung untersucht werden und mit dem nicht infizierten Zustand verglichen werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die kontinuierliche Prozessführung eine Alternative zum entwickelten Zulaufverfahren bezüglich der Raum-Zeit-Ausbeute an ssDNA darstellt. Die Verwendung von parallel betriebenen Rührkesselreaktoren ermöglichte die Einstellung von bis zu 8 Durchflussraten im Chemostaten, wodurch eine schnelle Identifikation der Zustandsgrößen Biotrockenmasse-, Glucose- und ssDNA Konzentration im Fließgleichgewichtszustand möglich war. Auf Grundlage dieser Daten wurden die Modellparameter für Wachstum und Produktbildung bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM 109 mit Bakteriophagen bestimmt. Dabei konnte eine signifikante Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate um 15 % von $0,74 \text{ h}^{-1}$ auf $0,63 \text{ h}^{-1}$ durch die Infektion mit dem Bakteriophagen M13 gezeigt werden. Weiterhin wurde eine konstante ssDNA Bildungsrate von $0,17 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ unabhängig von der eingestellten Durchflussrate im Chemostaten für den Fließgleichgewichtszustand identifiziert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorherigen Ergebnissen im Zulaufprozess, bei denen eine höhere Wachstumsrate eine höhere spezifische

Produktbildungsrate in Zulaufkultivierungen erzielte. Beim grundlegenden Vergleich der zwei Betriebsweisen ist festzuhalten, dass bei der kontinuierlichen Kultivierung im Chemostaten im Gegensatz zu Zulaufkultivierungen eine Selektion zu schnell wachsenden Zellen stattfinden könnte. Durch eine Selektion auf schnell wachsende Zellen im Chemostaten würden sich lediglich die Zellen durchsetzen, die sich an die Phagenproduktion adaptiert haben und ein Gleichgewicht aus Phagenproduktion und Zellwachstum erreichen. Diese Selektion findet in Zulaufkultivierungen nicht statt. Diese Hypothese muss in Zukunft noch experimentell überprüft werden.

Durch die Erhöhung der Substratkonzentration von 20 g L^{-1} auf 70 g L^{-1} Glucose im Zulaufmedium bei der kontinuierlichen Prozessführung mit *E. coli* JM 109 konnten die Biotrockenmasse- und die ssDNA Konzentration im Fließgleichgewicht um den Faktor 3,2 gesteigert werden. Dadurch wurde eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $5,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt, die ebenso in Zulaufprozessen mit *E. coli* JM 109 erreicht werden. Dahingehend stellt die kontinuierliche Prozessführung eine Alternative dar. Dennoch müssen ebenso die Kosten und das Aufarbeitungsvolumen der anschließenden Isolierung der ssDNA aus dem Reaktionsmedium beachtet werden. Diese sind im Zulaufprozess deutlich geringer, da eine um den Faktor 15 höhere ssDNA Konzentration am Ende des Zulaufprozesses im Vergleich zum Fließgleichgewichtszustand vorliegt.

Abschließend wurde untersucht, ob die Kombination aus Phagemid und Helferphagen M13K07 für die Produktion von artifizieller ssDNA im Rührkesselreaktor mit *E. coli* verwendet werden kann. Dabei konnte das für den Bakteriophagen M13mp18 entwickelte Zulaufverfahren auch auf den Helferphagen M13K07 übertragen werden. Durch die Steigerung der Multiplizität der Infektion von $0,05 \text{ pfu cfu}^{-1}$ auf $1,3 \text{ pfu cfu}^{-1}$ konnte die Konzentration an artifizieller ssDNA um den Faktor 452 gesteigert werden. Dabei wurde eine maximale ssDNA Konzentration von $147,6 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht. Die isolierte ssDNA konnte in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner vom Lehrstuhl für Biomolekulare Nanotechnologie der Technischen Universität München zunächst in die zwei ssDNA Edukte hydrolysiert und bereits im Millilitermaßstab in dreidimensionale Nanostrukturen gefaltet werden. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass katalytisch aktive ssDNA in diesen Mengen in einem Bioprozess hergestellt und für die Faltung von dreidimensionalen Nanostrukturen eingesetzt werden kann.

10 Ausblick

Bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) mit dem Bakteriophagen M13 kam es zu einer Adaption auf schnell wachsende, produzierende Zellen, die durch eine in kontinuierlichen Prozessen beschriebene wachstumsabhängige Selektion erklärt werden kann. Diese Adaption und damit einhergehend die Bildung von Populationen mit unterschiedlichen Eigenschaften, sollte weiter wissenschaftlich untersucht werden. Die Unterscheidung von Populationen mit unterschiedlichen Produktionsraten an Bakteriophagen ist theoretisch mittels Durchfluss-zytometrie möglich, insofern die Produktionsrate auf transkriptionischer oder translationaler Ebene mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird. Dabei muss das mit der Produktionsrate gekoppelte mRNA Konstrukt oder Phagenprotein identifiziert werden, wodurch eine weitere molekularbiologische Optimierung des Wildtyp Bakteriophagen M13 denkbar ist. Zusammenfassend können mit diesen molekularbiologischen Informationen mathematische Modelle erstellt werden, die eine Beschreibung der Phagenproduktion bei verschiedenen Betriebsweisen *in silico* ermöglichen.

Die Produktion artifizierender ssDNA konnte mit dem Helferphagensystem erfolgreich in den Grammaßstab im Rührkesselreaktor übertragen werden. Weiterhin hydrolysierte die produzierte ssDNA autokatalytisch durch Zugabe von Zinkionen, wodurch sowohl der Gerüststrang, als auch die Klammern in einem Ansatz gebildet wurden. Diese beiden Edukte konnten bereits im fünf Millilitermaßstab zu Nanostrukturen nach der DNA Origami Technologie gefaltet werden. Die weitere Übertragung der selbstassemblierenden Reaktion in den Litermaßstab ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Dabei müssen die bestimmenden Einflussfaktoren auf die Faltungsreaktion, wie Mischzeit, Energiedissipation oder Temperaturgradienten in Reaktionssystemen im Litermaßstab identifiziert werden, um

eine erfolgreiche Übertragung zu gewährleisten. Die Übertragung in den Litermaßstab mit den standardmäßig eingesetzten Konzentrationen an ssDNA Edukten würde die Produktionszeit von DNA Origami Strukturen von mehreren Monaten auf mehrere Tage reduzieren.

Die Verwendung des Helferphagen M13K07 birgt weiterhin ein Kontaminationsrisiko für andere Bioprozesse, die in derselben Produktionsanlage mit Fertilitätspilus tragenden *E. coli* Stämmen durchgeführt werden. Dies stellt ein bedeutendes Problem dar, welches eine Nutzung in Produktionsanlagen bei Lohnherstellern verhindert. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll *E. coli* mit einem zusätzlichen Helferplasmid auszustatten, das die Gene für den Phagenzyklus enthält. Damit können in Kombination mit dem bereits genutzten Phagemid filamentöse Bakteriophagen produziert werden, die lediglich artifizielle ssDNA tragen. Durch die Verwendung des Helferplasmids werden im Gegensatz zu den Helferphagen keine unerwünschten Phagenpartikel gebildet, die eine Kontaminationsgefahr für andere Bioprozesse darstellen.

11 Literaturverzeichnis

- Abröhl C, Kurth T, Langer T, Munk K, Nethe-Jaenchen R (2008) *Biochemie - Zellbiologie*: Thieme.
- Adams MH (1959) *Bacteriophage*. New York: Interscience Publishers, INC. 620 p.
- Agrawal P, Lim HC (1984) Analyses of various control schemes for continuous bioreactors. In: *Bioprocess Parameter Control*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 61–90.
- Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang D-K, Ankrum JA, Le XC, Zhao W (2014) Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society reviews* 43(10):3324–3341. DOI: 10.1039/c3cs60439j.
- Ali MM, Li Y (2009) Colorimetric Sensing by Using Allosteric-DNAzyme-Coupled Rolling Circle Amplification and a Peptide Nucleic Acid–Organic Dye Probe. *Angewandte Chemie International Edition* 48(19):3512–3515. DOI: 10.1002/anie.200805966.
- Anderson RA, Nakashima Y, Coleman JE (1975) Chemical modifications of functional residues of fd gene 5 DNA-binding protein. *Biochemistry* 14(5):907–917. DOI: 10.1021/bi00676a006.
- Aristidou AA, San K-Y, Bennett GN (1994) Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnol. Bioeng.* 44(8):944–951. DOI: 10.1002/bit.260440810.
- Asano S, Higashitani A, Horiuchi K (1999) Filamentous phage replication initiator protein gpII forms a covalent complex with the 5' end of the nick it introduced. *Nucleic Acids Research* 27(8):1882–1889.

- Avci-Adali M, Paul A, Wilhelm N, Ziemer G, Wendel HP (2010) Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules* (Basel, Switzerland) 15(1):1–11. DOI: 10.3390/molecules15010001.
- Baerns M2012 *Technische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH. 733 p.
- Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ (2001) *Phage display. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1 volume in various.
- Beck E, Zink B (1981) Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages fl and fd. *Gene* 16(1-3):35–58.
- Bellot G, McClintock MA, Chou JJ, Shih WM (2013) DNA nanotubes for NMR structure determination of membrane proteins. *Nat Protoc* 8(4):755–770. DOI: 10.1038/nprot.2013.037.
- Bennett NJ, Rakonjac J (2006) Unlocking of the Filamentous Bacteriophage Virion During Infection is Mediated by the C Domain of pIII. *Journal of Molecular Biology* 356(2):266–273. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.069.
- Berardi MJ, Shih WM, Harrison SC, Chou JJ (2011) Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature* 476(7358):109–113. DOI: 10.1038/nature10257.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ (2014) *Biochemie*. Berlin: Springer Spektrum. 1196 p.
- Bergter F (1983) *Wachstum von Mikroorganismen. Experimente und Modelle*. Weinheim, Deerfield Beach, Fla.: Verlag Chemie. 161 p.
- Berkowitz SA, Day LA (1976) Mass, length, composition and structure of the filamentous bacterial virus fd. *Journal of Molecular Biology* 102(3):531–547. DOI: 10.1016/0022-2836(76)90332-6.
- Branston S, Stanley E, Keshavarz-Moore E, Ward J (2012) Precipitation of filamentous bacteriophages for their selective recovery in primary purification. *Biotechnol Progress* 28(1):129–136. DOI: 10.1002/btpr.705.

- Branston S, Stanley E, Ward J, Keshavarz-Moore E (2011) Study of robustness of filamentous bacteriophages for industrial applications. *Biotechnol. Bioeng.* 108(6):1468–1472. DOI: 10.1002/bit.23066.
- Branston SD, Wright J, Keshavarz-Moore E (2015) A non-chromatographic method for the removal of endotoxins from bacteriophages. *Biotechnology and bioengineering.* DOI: 10.1002/bit.25571.
- Brissette JL, Russel M (1990) Secretion and membrane integration of a filamentous phage-encoded morphogenetic protein. *Journal of Molecular Biology* 211(3):565–580. DOI: 10.1016/0022-2836(90)90266-O.
- Brissette JL, Russel M, Weiner L, Model P (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(3):862–866. DOI: 10.1073/pnas.87.3.862.
- Burns JR, Seifert A, Fertig N, Howorka S (2016) A biomimetic DNA-based channel for the ligand-controlled transport of charged molecular cargo across a biological membrane. *Nat Nano* 11(2):152–156.
- Calendar R (2006) *The bacteriophages*. Oxford, New York: Oxford University Press. 1 online resource (xiii, 746).
- Campesi A, Cerri MO, Hokka CO, Badino AC (2009) Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32(2):241–248. DOI: 10.1007/s00449-008-0242-4.
- Carnes AE (2005) Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess Int* 3(9):36–44.
- Castan A, Enfors S-O (2000) Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering* 22(6):509–515. DOI: 10.1007/s004499900094.
- Castro CE, Kilchherr F, Kim D-N, Shiao EL, Wauer T, Wortmann P, Bathe M, Dietz H (2011) A primer to scaffolded DNA origami. *Nat Meth* 8(3):221–229. DOI: 10.1038/nmeth.1570.
- Chandrasekaran AR (2016) DNA origami and biotechnology applications: a perspective. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91(4):843–846. DOI: 10.1002/jctb.4826.

- Chang HN, Lee WG, Kim BS (1993) Cell retention culture with an internal filter module: Continuous ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 41(6):677–681. DOI: 10.1002/bit.260410612.
- Chen JH, Seeman NC (1991) Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 350(6319):631–633. DOI: 10.1038/350631a0.
- Chen SH, Plank JL, Willcox S, Griffith JD, Hsieh T-s (2013) Improved methods for creating migratable Holliday junction substrates. *Nucleic Acids Research* 41(5):e60. DOI: 10.1093/nar/gks1343.
- Chen Y-J, Groves B, Muscat RA, Seelig G (2015) DNA nanotechnology from the test tube to the cell. *Nat Nano* 10(9):748–760.
- Chmiel H (2011) *Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XIII, 540 S.
- Choi HJ, Jeong JK, Kim CS, Lee YS (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):640–645. DOI: 10.1007/s002530000334.
- Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Biomolecular Engineering* 61(3):876–885. DOI: 10.1016/j.ces.2005.03.031.
- Choi JH, Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(5):625–635. DOI: 10.1007/s00253-004-1559-9.
- Citartan M, Tang T-H, Tan S-C, Gopinath, Subash C. B. (2011) Conditions optimized for the preparation of single-stranded DNA (ssDNA) employing lambda exonuclease digestion in generating DNA aptamer. *World J Microbiol Biotechnol* 27(5):1167–1173. DOI: 10.1007/s11274-010-0563-8.
- Citartan M, Tang T-H, Tan S-C, Hoe C-H, Saini R, Tominaga J, Gopinath, Subash C. B. (2012a) Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34(2):125–131.

- Citartan M, Tang T-H, Tominaga J, Tan S-C, Gopinath, Subash C. B. (2012b) Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst* 137(6):1307–1315. DOI: 10.1039/C2AN15905H.
- Clackson T, Lowman HB (2004) Phage display. A practical approach. 1 online resource (xxiv, 332 pages).
- Clarke M, Maddera L, Harris RL, Silverman PM (2008) F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(46):17978–17981. DOI: 10.1073/pnas.0806786105.
- Click EM, Webster RE (1998) The TolQRA Proteins Are Required for Membrane Insertion of the Major Capsid Protein of the Filamentous Phage ϕ 1 during Infection. *Journal of Bacteriology* 180(7):1723–1728.
- Clokier MRJ, Kropinski AM (2009) Bacteriophages. Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Totowa, NY: Humana [u.a.]. XXII, 307 S.
- Curless C, Pope J, Tsai L (1990) Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress* 6(2):149–152. DOI: 10.1021/bp00002a009.
- Dahl F, Banér J, Gullberg M, Mendel-Hartvig M, Landegren U, Nilsson M (2004) Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(13):4548–4553. DOI: 10.1073/pnas.0400834101.
- Darwin AJ (2005) The phage-shock-protein response. *Molecular Microbiology* 57(3):621–628. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04694.x.
- Day LA, Marzee CJ, Reisberg SA, Casadevall A (1988) DNA Packing in Filamentous Bacteriophages. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17(1):509–539. DOI: 10.1146/annurev.bb.17.060188.002453.
- Delbrück M (1940) Adsorption of Bacteriophage under Various Physiological Conditions of the Host. *The Journal of General Physiology* 23(5):631–642.
- Dente L, Cesareni G, Cortese R (1983) pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Research* 11(6):1645–1655.

- Derda R, Tang SKY, Whitesides GM (2010) Uniform Amplification of Phage with Different Growth Characteristics in Individual Compartments Consisting of Monodisperse Droplets. *Angewandte Chemie International Edition* 49(31):5301–5304. DOI: 10.1002/anie.201001143.
- Derr ND, Goodman BS, Jungmann R, Leschziner AE, Shih WM, Reck-Peterson SL (2012) Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science* 338(6107):662–665. DOI: 10.1126/science.1226734.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(4):939–1031. DOI: 10.1128/MMBR.00024-06.
- Di Lee S, Qian H, Tay CY, Leong DT (2016) Cellular processing and destinies of artificial DNA nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/C5CS00700C.
- Dittrich CR, Bennett GN, San K-Y (2005) Characterization of the Acetate-Producing Pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Progress* 21(4):1062–1067. DOI: 10.1021/bp050073s.
- Dogic Z, Fraden S (2006) Ordered phases of filamentous viruses. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11(1):47–55. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.10.004.
- Dong D, Sutaria S, Hwangbo J, Chen P (2013a) A simple and rapid method to isolate purer M13 phage by isoelectric precipitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(18):8023–8029. DOI: 10.1007/s00253-013-5049-9.
- Dong H, Wang C, Xiong Y, Lu H, Ju H, Zhang X (2013b) Highly sensitive and selective chemiluminescent imaging for DNA detection by ligation-mediated rolling circle amplified synthesis of DNAzyme. *Biosensors & bioelectronics* 41:348–353. DOI: 10.1016/j.bios.2012.08.050.
- Dotto GP, Enea V, Zinder ND (1981a) Gene II of phage f1: its functions and its products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(9):5421–5424.
- Dotto GP, Enea V, Zinder ND (1981b) Functional analysis of bacteriophage f1 intergenic region. *Virology* 114(2):463–473. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90226-9.

- Douglas SM, Bachelet I, Church GM (2012) A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science* 335(6070):831–834. DOI: 10.1126/science.1214081.
- Douglas SM, Chou JJ, Shih WM (2007) DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(16):6644–6648. DOI: 10.1073/pnas.0700930104.
- Douglas SM, Dietz H, Liedl T, Högberg B, Graf F, Shih WM (2009) Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* 459(7245):414–418. DOI: 10.1038/nature08016.
- Drexler KE, Peterson C, Pergamit G (1991) Unbounding the future. The nanotechnology revolution. New York: Morrow. 304 p.
- Ducani C, Bernardinelli G, Högberg B (2014) Rolling circle replication requires single-stranded DNA binding protein to avoid termination and production of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* 42(16):10596–10604. DOI: 10.1093/nar/gku737.
- Ducani C, Kaul C, Moche M, Shih WM, Högberg B (2013) Enzymatic production of 'monoclonal stoichiometric' single-stranded DNA oligonucleotides. *Nature methods* 10(7):647–652. DOI: 10.1038/nmeth.2503.
- Ducla JM, Desplanches H, Chevalier JL (1983) Effective Viscosity of Non-Newtonian Fluids in a Mechanically Stirred Tank. *Chemical Engineering Communications* 21(1-3):29–36. DOI: 10.1080/00986448308940273.
- Dykhuizen DE, Hartl DL (1983) Selection in chemostats. *Microbiological Reviews* 47(2):150–168.
- Eiteman MA, Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology* 24(11):530–536. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.09.001.
- Ellis EL, Delbrück M (1938) The Growth of Bacteriophage. *The Journal of General Physiology* 22(3):365–384.
- Endemann H, Model P (1995) Location of Filamentous Phage Minor Coat Proteins in Phage and in Infected Cells. *Journal of Molecular Biology* 250(4):496–506. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0393.

- Engels JW, Lottspeich F (2012) *Bioanalytik*. Berlin [u.a.]: Springer. XXIV, 1201, XVI S.
- Feng J-n, Model P, Russel M (1999) A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Molecular Microbiology* 34(4):745–755. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01636.x.
- Feng J-n, Russel M, Model P (1997) A permeabilized cell system that assembles filamentous bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8):4068–4073.
- Forsheit AB, Ray DS, Lica L (1971) Replication of bacteriophage M13: V. Single-strand synthesis during M13 infection. *Journal of Molecular Biology* 57(1):117–127. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90122-7.
- Fu TJ, Seeman NC (1993) DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* 32(13):3211–3220. DOI: 10.1021/bi00064a003.
- Fuchs G, Schlegel H-G, Eitinger T (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme. 750 p.
- Ganani E, Powell RL (1985) Suspensions of Rodlike Particles. Literature Review and Data Correlations. *Journal of Composite Materials* 19(3):194–215. DOI: 10.1177/002199838501900301.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* 27(2):153–176. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- Gavit P, Better M (2000) Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 79(2):127–136. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00213-3.
- Gostomski P, Mühlemann M, Lin Y-H, Mormino R, Bungay H (1994) Auxostats for continuous culture research. *Journal of Biotechnology* 37(2):167–177. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90008-6.
- Grieco S-H, Lee S, Dunbar WS, MacGillivray RA, Curtis S (2009) Maximizing filamentous phage yield during computer-controlled fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 32(6):773–779. DOI: 10.1007/s00449-009-0303-3.

- Grieco S-H, Wong AK, Dunbar WS, MacGillivray RA, Curtis S (2012) Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(10):1515–1522. DOI: 10.1007/s10295-012-1148-3.
- Gu H, Breaker RR (2013) Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products. *BioTechniques* 54(6):337–343. DOI: 10.2144/000114009.
- Gu H, Furukawa K, Weinberg Z, Berenson DF, Breaker RR (2013) Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA. *Journal of the American Chemical Society* 135(24):9121–9129. DOI: 10.1021/ja403585e.
- Gyllensten UB, Erlich HA (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(20):7652–7656.
- Hahm DH, Pan J, Rhee JS (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):100–107. DOI: 10.1007/BF00170231.
- Hartbrich A, Weuster-Botz DD, Wandrey CP (1996) Verfahren und Anordnung zur Durchführung biotechnologischer Prozesse unter Kultivierung aerober Organismen in hoher Zelldichte: Google Patents.
- Harwood AJ (1996) Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Harwood AJ, editor. *Basic DNA and RNA Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. p 93–96.
- Henzler H-J (2007) Auslegung von Rührfermentern – Berücksichtigung der nicht-Newton'schen Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chemie Ingenieur Technik* 79(7):951–965. DOI: 10.1002/cite.200600112.
- Hewitt CJ, Nebe-Von Caron G, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW (2000) Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol. Bioeng.* 70(4):381–390. DOI: 10.1002/1097-0290(20001120)70:4<381:AID-BIT3>3.0.CO;2-0.
- Higashitani A, Higashitani N, Horiuchi K (1997) Minus-strand origin of filamentous phage versus transcriptional promoters in recognition of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(7):2909–2914.

- Hoefel T, Wittmann E, Reinecke L, 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):477–484. DOI: 10.1007/s00253-010-2739-4.
- Hofschneider PH (1963) Untersuchungen über "kleine" *E. coli* K 12 Bakteriophagen. *Zeitschrift für Naturforschung B* 18 b:203–210.
- Hofschneider PH, Preuss A (1963) M 13 bacteriophage liberation from intact bacteria as revealed by electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* 7(4):450-IN5. DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80038-8.
- Hohn B, Lechner H, Marvin DA (1971) Filamentous bacterial viruses. *Journal of Molecular Biology* 56(1):143–154. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90090-8.
- Holst O, Manelius Å, Krahe M, Märkl H, Raven N, Sharp R (1997) Thermophiles and fermentation technology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 118(3):415–422. DOI: 10.1016/S0300-9629(97)00002-9.
- Horabin JI, Webster RE (1988) An amino acid sequence which directs membrane insertion causes loss of membrane potential. *Journal of Biological Chemistry* 263(23):11575–11583.
- Horn U, Strittmatter W, Krebber A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, Müller K, Matzku S, Plückthun A, Riesenberg 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. *Appl Microbiol Biotechnol* 46(5-6):524–532. DOI: 10.1007/s002530050855.
- Hortsch R (2011) Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Dissertation. München.
- Hortsch R, Krispin H, Weuster-Botz D (2011) Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34(3):297–304. DOI: 10.1007/s00449-010-0471-1.
- Hoskisson PA, Hobbs G (2005) Continuous culture--making a comeback? *Microbiology (Reading, England)* 151(Pt 10):3153–3159. DOI: 10.1099/mic.0.27924-0.

- Hu S-Y, Wu J-L, 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. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.09.014.
- Hunter IS, Kornberg HL (1979) Glucose transport of *Escherichia coli* growing in glucose-limited continuous culture. *Biochemical Journal* 178(1):97–101.
- Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(10):2420–2425.
- Janzen NH, Schmidt M, Krause C, Weuster-Botz D (2015) Evaluation of fluorimetric pH sensors for bioprocess monitoring at low pH. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38(9):1685–1692. DOI: 10.1007/s00449-015-1409-4.
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006) Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *Journal of Biotechnology* 127(1):84–94. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.06.004.
- Jung S-C, Smith CL, Lee K-S, Hong M-E, Kweon D-H, Stephanopoulos G, Jin Y-S (2010) Restoration of Growth Phenotypes of *Escherichia coli* DH5 α in Minimal Media through Reversal of a Point Mutation in *purB*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(18):6307–6309. DOI: 10.1128/AEM.01210-10.
- Karlsson F, Malmberg-Hager A-C, Albrekt A-S, Borrebaeck, Carl A K (2005) Genome-wide comparison of phage M13-infected vs. uninfected *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* 51(1):29–35. DOI: 10.1139/w04-113.
- Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS (2002) Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy. *Journal of Virology* 76(11):5557–5564. DOI: 10.1128/JVI.76.11.5557-5564.2002.
- Katoh S, Yoshida F (2009) *Biochemical engineering. A textbook for engineers, chemists and biologists.* Weinheim: Wiley-VCH. 266 p.
- Kelly W, Gigas B (2003) Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial-flow impellers operating in the transitional flow regime. *Chemical Engineering Science* 58(10):2141–2152. DOI: 10.1016/S0009-2509(03)00060-5.

- Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martinez C, Fulcher C, Huerta AM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muniz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Schroder I, Shearer AG, Subhraveti P, Travers M, Weerasinghe D, Weiss V, Collado-Vides J, Gunsalus RP, Paulsen I, Karp PD (2013) EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research* 41(Database issue):D605-12. DOI: 10.1093/nar/gks1027.
- Kick B, Praetorius F, Dietz H, Weuster-Botz D (2015) Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami. *Nano letters* 15(7):4672–4676. DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b01461.
- Kim D-N, Kilchherr F, Dietz H, Bathe M (2012) Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic Acids Research* 40(7):2862–2868. DOI: 10.1093/nar/gkr1173.
- Kleman GL, Strohl WR (1994) Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology* 5(2):180–186. DOI: 10.1016/S0958-1669(05)80033-3.
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann H-P, Weuster-Botz D (2007) Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal* 33(3):263–274. DOI: 10.1016/j.bej.2006.10.023.
- Konstantinov K, Kishimoto M, Seki T, Yoshida T (1990) A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 36(7):750–758. DOI: 10.1002/bit.260360714.
- Kopperger E, Pirzer T, Simmel FC (2015) Diffusive transport of molecular cargo tethered to a DNA origami platform. *Nano letters* 15(4):2693–2699. DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00351.
- Korz D, Rinas U, Hellmuth K, Sanders E, Deckwer W-D (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 39(1):59–65. DOI: 10.1016/0168-1656(94)00143-Z.
- Kosuri S, Church GM (2014) Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nat Meth* 11(5):499–507.
- Kraume M (2005) Mischen und Rühren. Grundlagen und moderne Verfahren. Weinheim: Wiley-VCH.

- Kremling A (2014) *Systems biology. Mathematical modeling and model analysis*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 363 p.
- Krueger AP (1931) The Sorption of Bacteriophage by Living and Dead Susceptible Bacteria. *J Gen Physiol* 14(4):493. DOI: 10.1085/jgp.14.4.493.
- Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, Weuster-Botz D (2008) Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(3):207–215. DOI: 10.1007/s00449-007-0195-z.
- Kuzyk A, Schreiber R, Fan Z, Pardatscher G, Roller E-M, Högele A, Simmel FC, Govorov AO, Liedl T (2012) DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature* 483(7389):311–314. DOI: 10.1038/nature10889.
- Langecker M, Arnaut V, Martin TG, List J, Renner S, Mayer M, Dietz H, Simmel FC (2012) Synthetic Lipid Membrane Channels Formed by Designed DNA Nanostructures. *Science* 338(6109):932–936. DOI: 10.1126/science.1225624.
- Lee S, Chang H (1994) Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. *J Environ Polym Degr* 2(3):169–176. DOI: 10.1007/BF02067442.
- Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 14(3):98–105. DOI: 10.1016/0167-7799(96)80930-9.
- Lee YL, Chang HN (1990) High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 36(4):330–337. DOI: 10.1002/bit.260360403.
- Levene PA (1919) The Structure of Yeast Nucleic Acid: IV. Ammonia Hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 40(2):415–424.
- Levinson A, Silver D, Seed B (1984) Minimal size plasmids containing an M13 origin for production of single-strand transducing particles. *Journal of molecular and applied genetics* 2(6):507–517.
- Lin C, Rinker S, Wang X, Liu Y, Seeman NC, Yan H (2008) In vivo cloning of artificial DNA nanostructures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(46):17626–17631. DOI: 10.1073/pnas.0805416105.

- Linko V, Dietz H (2013) The enabled state of DNA nanotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 24(4):555–561. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.02.001.
- Luli GW, Strohl WR (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.
- Mai-Prochnow A, Hui, Janice Gee Kay, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA (2015) 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host'. *FEMS microbiology reviews*. DOI: 10.1093/femsre/fuu007.
- Manderson D, Dempster R, Chisti Y (2006) A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(3):173–182. DOI: 10.1007/s10295-005-0046-3.
- Maré L de, Velut S, Ledung E, Cimander C, Norrman B, Karlsson EN, Holst O, Hagander P (2005) A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. *Biotechnology Letters* 27(14):983–990. DOI: 10.1007/s10529-005-7844-6.
- Marisch K, Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Luchner M, Striedner G (2013) Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories* 12:58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.
- Marvin DA (1998) Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current Opinion in Structural Biology* 8(2):150–158. DOI: 10.1016/S0959-440X(98)80032-8.
- Marvin DA, Symmons MF, Straus SK (2014) Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 114(2):80–122. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.003.
- Marvin DA, Welsh LC, Symmons MF, Scott, W R P, Straus SK (2006) Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to X-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane. *Journal of Molecular Biology* 355(2):294–309. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.10.048.
- Marvin DA, Wiseman RL, Wachtel EJ (1974) Filamentous bacterial viruses. *Journal of Molecular Biology* 82(2):121-IN6. DOI: 10.1016/0022-2836(74)90336-2.

- McNeil B, Harvey LM (1993) Viscous Fermentation Products. *Critical Reviews in Biotechnology* 13(4):275–304. DOI: 10.3109/07388559309075699.
- Messenger L, Burns JR, Kim J, Cecchin D, Hindley J, Pyne ALB, Gaitzsch J, Battaglia G, Howorka S (2016) Biomimetic Hybrid Nanocontainers with Selective Permeability. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55(37):11106–11109. DOI: 10.1002/anie.201604677.
- Metzner AB, Otto RE (1957) Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J.* 3(1):3–10. DOI: 10.1002/aic.690030103.
- Model P, Jovanovic G, Dworkin J (1997) The Escherichia coli phage-shock-protein (psp) operon. *Molecular Microbiology* 24(2):255–261. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3481712.x.
- Monod J (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3(1):371–394. DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
- Nakano K, Rischke M, Sato S, Märkl H (1997) Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48(5):597–601. DOI: 10.1007/s002530051101.
- Newton JM, Schofield D, Zhou Y, Vlahopoulou J (2016) Detecting cell lysis using viscosity monitoring in E. coli fermentation to prevent product loss. *Biotechnol Progress*:n/a-n/a. DOI: 10.1002/btpr.2292.
- Nobel Media AB (2016) The Nobel Prize in Chemistry 2016 (accessed 12 Oktober 2016).
- Notley L, Ferenci T (1995) Differential expression of mal genes under cAMP and endogenous inducer control in nutrient-stressed Escherichia coli. *Molecular Microbiology* 16(1):121–129. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02397.x.
- Opalka N, Beckmann R, Boisset N, Simon MN, Russel M, Darst SA (2003) Structure of the Filamentous Phage pIV Multimer by Cryo-electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology* 325(3):461–470. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)01246-9.
- Paalme T, Tiisma K, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R (1990) Glucose-Limited fed-batch cultivation of Escherichia coli with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 35(3):312–319. DOI: 10.1002/bit.260350313.

- Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters* 9(2):89–94. DOI: 10.1007/BF01032744.
- Papavoine CH, Christiaans BE, Folmer RH, Konings RN, Hilbers CW (1998) Solution structure of the M13 major coat protein in detergent micelles: a basis for a model of phage assembly involving specific residues^{1†}. *Journal of Molecular Biology* 282(2):401–419. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1860.
- Paul A, Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP (2009) Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides* 19(3):243–254. DOI: 10.1089/oli.2009.0194.
- Pei X, Wang Q, Qiu X, Ying L, Tao J, 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. DOI: 10.1007/s12010-010-8924-1.
- Peter CP (2006) Auslegung geschüttelter Bioreaktoren für hochviskose und hydromechanisch empfindliche Fermentationssysteme. Dissertation. Aachen.
- Peter CP, Lotter S, Maier U, Büchs J (2004) Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. *Applied Shaking Technology* 17(3):205–215. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00179-7.
- Pfitzner E, Wachauf C, Kilchherr F, Pelz B, Shih WM, Rief M, Dietz H (2013) Rigid DNA beams for high-resolution single-molecule mechanics. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52(30):7766–7771. DOI: 10.1002/anie.201302727.
- Pirt SJ (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*. New York: Wiley., 274.
- Pollard E, Reaume M (1951) Thermal inactivation of bacterial viruses. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 32(2):278–287. DOI: 10.1016/0003-9861(51)90273-1.
- Pratt D, Erdahl WS (1968) Genetic control of bacteriophage M13 DNA synthesis. *Journal of Molecular Biology* 37(1):181–200. DOI: 10.1016/0022-2836(68)90082-X.
- Puskeiler R, Weuster-Botz D (2004) Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab: Kultivierung von *Escherichia coli*. *Chemie Ingenieur Technik* 76(12):1865–1869. DOI: 10.1002/cite.200407026.

- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M (2011) Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 13(2):51–76.
- Rakonjac J, Feng J-n, Model P (1999) Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII1. *Journal of Molecular Biology* 289(5):1253–1265. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2851.
- Rakonjac J, Model P (1998) Roles of pIII in filamentous phage assembly1. *Journal of Molecular Biology* 282(1):25–41. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2006.
- Rasched I, Oberer E (1986) Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiological Reviews* 50(4):401–427.
- Reddy P, McKenney K (1996) Improved method for the production of M13 phage and single-stranded DNA for DNA sequencing. *Biotechniques* 20(5):854-6, 858, 860.
- Richey B, Cayley DS, Mossing MC, Kolka C, Anderson CF, Farrar TC, Record MT (1987) Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 262(15):7157–7164.
- Riechmann L, Holliger P (1997) The C-Terminal Domain of TolA Is the Coreceptor for Filamentous Phage Infection of *E. coli*. *Cell* 90(2):351–360. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80342-6.
- Riesenberg D (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 2(3):380–384. DOI: 10.1016/S0958-1669(05)80142-9.
- Riesenberg D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(4):422–430. DOI: 10.1007/s002530051412.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Roß A, Deckwer WD (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology* 20(1):17–27. DOI: 10.1016/0168-1656(91)90032-Q.
- Rinker S, Ke Y, Liu Y, Chhabra R, Yan H (2008) Self-assembled DNA nanostructures for distance-dependent multivalent ligand-protein binding. *Nat Nano* 3(7):418–422. DOI: 10.1038/nnano.2008.164.

- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- Rothmund PWK (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440(7082):297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
- Roy A, Mitra S (1970a) Increased Fragility of *Escherichia coli* After Infection with Bacteriophage M13. *Journal of Virology* 6(3):333–339.
- Roy A, Mitra S (1970b) Susceptibility of *E. coli* K-12 to Actinomycin D after Infection with Phage M13. *Nature* 228(5269):365–366. DOI: 10.1038/228365a0.
- Russel M, Model P (1989) Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *Journal of Virology* 63(8):3284–3295.
- Rutgers M, Balk PA, van Dam K (1989) Effect of concentration of substrates and products on the growth of *Klebsiella pneumoniae* in chemostat cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 977(2):142–149. DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80064-7.
- Rutherford K, Lee KC, Mahmoudi SMS, Yianneskis M (1996) Hydrodynamic characteristics of dual Rushton impeller stirred vessels. *AIChE J.* 42(2):332–346. DOI: 10.1002/aic.690420204.
- Said H, Schuller VJ, Eber FJ, Wege C, Liedl T, Richert C (2013) M1.3 - a small scaffold for DNA origami. *Nanoscale* 5(1):284–290. DOI: 10.1039/C2NR32393A.
- Salivar WO, Tzagoloff H, Pratt D (1964) Some physical-chemical and biological properties of the rod-shaped coliphage M13. *Virology* 24(3):359–371. DOI: 10.1016/0042-6822(64)90173-4.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Getr. Zählung.
- Sanchez F, Sobolev K (2010) Nanotechnology in concrete – A review. *Construction and Building Materials* 24(11):2060–2071. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014.
- Sánchez Pérez JA, Rodríguez Porcel EM, Casas López JL, Fernández Sevilla JM, Chisti Y (2006) Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 124(1–3):1–5. DOI: 10.1016/j.cej.2006.07.002.

- Schmid RD (2016) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Weinheim: Wiley-VCH. 402 p.
- Schmideder A, Severin TS, Cremer JH, Weuster-Botz D (2015) A novel milliliter-scale chemostat system for parallel cultivation of microorganisms in stirred-tank bioreactors. *Journal of Biotechnology* 210:19–24. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.402.
- Schmidt TL, Beliveau BJ, Uca YO, Theilmann M, Da Cruz F, Wu C-T, Shih WM (2015) Scalable amplification of strand subsets from chip-synthesized oligonucleotide libraries. *Nat Commun* 6.
- Schügerl K, Bellgardt K-H (2000) *Bioreaction Engineering. Modeling and Control*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 604225 p.
- Scott M, Gunderson CW, Mateescu EM, Zhang Z, Hwa T (2010) Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science* 330(6007):1099–1102. DOI: 10.1126/science.1192588.
- Seeman NC (1982) Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology* 99(2):237–247. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
- Senn H, Lendenmann U, Snozzi M, Hamer G, Egli T (1994) The growth of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostat cultures: a re-examination of the kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1201(3):424–436. DOI: 10.1016/0304-4165(94)90072-8.
- Sharma P, Ward A, Gibaud T, Hagan MF, Dogic Z (2014) Hierarchical organization of chiral rafts in colloidal membranes. *Nature* 513(7516):77–80.
- Shaw A, Lundin V, Petrova E, Fördös F, Benson E, Al-Amin A, Herland A, Blokzijl A, Högberg B, Teixeira AI (2014) Spatial control of membrane receptor function using ligand nanocalipers. *Nature methods* 11(8):841–846. DOI: 10.1038/nmeth.3025.
- Shiloach J, Fass R (2005) Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 23(5):345–357. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Research* 16(15):7583–7600.

- Slonczewski JL, Foster JW (2012) *Mikrobiologie. Eine Wissenschaft mit Zukunft*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. 1425 p.
- Sobczak J-PJ, Martin TG, Gerling T, Dietz H (2012) Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature. *Science* 338(6113):1458–1461. DOI: 10.1126/science.1229919.
- Specthrie L, Bullitt E, Horiuchi K, Model P, Russel M, Makowski L (1992) Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology* 228(3):720–724. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90858-H.
- Stahl E, Martin TG, Praetorius F, Dietz H (2014) Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(47):12735–12740. DOI: 10.1002/anie.201405991.
- Stassen APM, Folmer RHA, Hilbers CW, Konings RNH (1995) Single-stranded DNA binding protein encoded by the filamentous bacteriophage M13: structural and functional characteristics. *Mol Biol Rep* 20(3):109–127. DOI: 10.1007/BF00990543.
- Staudenbauer WL, Hofschneider PH (1972) Replication of Bacteriophage M13. *European Journal of Biochemistry* 30(3):403–412. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb02111.x.
- Steinsiek S, Bettenbrock K (2012) Glucose Transport in Escherichia coli Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems. *Journal of Bacteriology* 194(21):5897–5908. DOI: 10.1128/JB.01502-12.
- Storhas W (2013) *Bioverfahrensentwicklung*. Hoboken: Wiley. 1236 p.
- Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF (2012) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin: Springer. 932 p.
- Sulakvelidze A, Kutter E (2005) *Bacteriophages. Biology and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press. 510 p.
- Suzuki T (1996) A Dense Cell-Culture System for Microorganisms Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor Incorporating Asymmetric Porous Ceramic Filters. *J. Ferment. Bioeng.* 82(3):264–271. DOI: 10.1016/0922-338X(96)88818-0.
- Suzuki T, Yamane T, Shimizu S (1987) Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat modal feeding of multi-substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25(6):526–531. DOI: 10.1007/BF00252011.

- Thompson BG, Kole M, Gerson DF (1985) Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27(6):818–824. DOI: 10.1002/bit.260270610.
- Tipler PA, Gerlich D (2004) *Physik*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. 1522 p.
- Tripathi NK (2009) High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal*; Vol 59, No 2.
- Tzagoloff H, Pratt D (1964) The initial steps in infection with coliphage M13. *Virology* 24(3):372–380. DOI: 10.1016/0042-6822(64)90174-6.
- Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. In: *Methods in Enzymology: Recombinant DNA Part D*: Academic Press. p 3–11.
- Walder RY, Hayes JR, Walder JA (1993) Use of PCR primers containing a 3' terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences. *Nucleic Acids Research* 21(18):4339–4343. DOI: 10.1093/nar/21.18.4339.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356):737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
- Wei R, Martin TG, Rant U, Dietz H (2012) DNA origami gatekeepers for solid-state nanopores. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51(20):4864–4867. DOI: 10.1002/anie.201200688.
- Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA, Weuster-Botz D (2014) Fed-batch production of l-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 83:62–69. DOI: 10.1016/j.bej.2013.12.001.
- Weuster-Botz D (1999) Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. *Techn. Hochsch., Habil.-Schr.--Aachen*, 1999. Jülich: Forschungszentrum Jülich Zentralbibliothek. 321 p.
- Weuster-Botz D (2006) Mikro-Bioverfahrenstechnik. *Chemie Ingenieur Technik* 78(3):256–260. DOI: 10.1002/cite.200500180.
- Weuster-Botz D, Hekmat D, Puskeiler R, Franco-Lara E (2007) Enabling technologies: fermentation and downstream processing. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 105:205–247. DOI: 10.1007/10_2006_034.
- Williams KP, Bartel DP (1995) PCR product with strands of unequal length. *Nucleic Acids Res* 23(20):4220–4221.

- Wunderlich M, Taymaz-Nikerel H, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR (2014) Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117(3):336–342. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.007.
- Yee L, Blanch HW (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 10(12):1550–1556.
- Zanette D, Dundon W, Soffientini A, Sottani C, Marinelli F, Akesson A, Sarubbi E (1998) Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: Large-scale microbial growth and protein purification. *Journal of Biotechnology* 64(2–3):187–196. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00111-4.
- Zenkin N, Naryshkina T, Kuznedelov K, Severinov K (2006) The mechanism of DNA replication primer synthesis by RNA polymerase. *Nature* 439(7076):617–620. DOI: 10.1038/nature04337.
- Zhang H, Chao J, Pan D, Liu H, Huang Q, Fan C (2012) Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR. *Chem. Commun.* 48(51):6405–6407. DOI: 10.1039/C2CC32204H.
- Zhao W, Cui CH, Bose S, Guo D, Shen C, Wong WP, Halvorsen K, Farokhzad OC, Teo GSL, Phillips JA, Dorfman DM, Karnik R, Karp JM (2012) Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(48):19626–19631. DOI: 10.1073/pnas.1211234109.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1875–1881.

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------|---|
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| AckA | Acetatkinase |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BTM | Biotrockenmasse |
| bp | Basenpaar |
| C | Celsius |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| cm | Zentimeter |
| CoA | Coenzym A |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DSMZ | Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>endA1</i> | Endonuclease I |
| FADH ₂ | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| Ff-Phage | F-spezifische, filamentöse Phagen |
| F-Pilus | Fertilitätspilus |
| F-Plasmid | Fertilitätsplasmid |
| g | Gramm |
| Gram ⁻ | Gram-negativ |
| h | Stunde |

| | |
|------------------|-------------------------------|
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Salzsäure |
| IMP | Inosin-5'-monophosphat |
| kDa | Kilodalton |
| KLF | Kleinlaborfermenter |
| L | Liter |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| m | Meter |
| M | Molar |
| min | Minute |
| mL | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MOI | Multiplizität der Infektion |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| μL | Mikroliter |
| μmol | Mikromol |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADH | Nicotinamadenindinukleotid |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| Pa | Pascal |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pfu | <i>Plaque forming unit</i> |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| PoxB | Pyruvatoxidase |
| Pta | Phosphotransacetylase |

| | |
|-----------------|--|
| PTS | Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System |
| RCA | <i>rolling circle</i> Amplifikation |
| <i>recA1</i> | Rekombinase |
| RF | doppelsträngige, replikative Form |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| R _{PX} | Verhältnis Bakteriophagen zu Zellen |
| RZA | Raum-Zeit-Ausbeute |
| s | Sekunde |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| TE-Puffer | Tris EDTA Puffer |
| <i>thi-1</i> | Deletion in der Thiaminsynthese |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tu | <i>transducing unit</i> |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumenanteil |
| w/v | Gewichtsanteil bezogen auf Volumen |
| VE-Wasser | vollentsalztes Wasser |

Symbolverzeichnis

| Symbol | Bedeutung, Einheit |
|--------------------|--|
| A | rührerspezifische Konstante, - |
| a | Parameter der Ausgleichsfunktion, - |
| b | Parameter der Ausgleichsfunktion, - |
| c | Parameter der Ausgleichsfunktion, - |
| C | Zellkonzentration, cfu mL ⁻¹ |
| c _i | Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L ⁻¹ |
| c _{i,aus} | Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L ⁻¹ |
| c _{i,ein} | Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L ⁻¹ |
| c _P | Produktkonzentration, g L ⁻¹ |
| c _S | Substratkonzentration, g L ⁻¹ |
| c _X | Biomassekonzentration, g L ⁻¹ |
| c _{X,0} | initiale Biomassekonzentration, g L ⁻¹ |
| D | Durchflussrate, h ⁻¹ |
| d | Durchmesser Rührer, m |
| D _{max} | maximale Durchflussrate, h ⁻¹ |
| D _{opt} | optimale Durchflussrate, h ⁻¹ |
| F | Volumenstrom, L h ⁻¹ |
| F(t) | Verweilzeitsummenkurve, - |
| F _{aus} | Ablaufvolumenstrom, L h ⁻¹ |
| F _{ein} | Zulaufvolumenstrom, L h ⁻¹ |
| K | Konsistenzindex, Pa s ^m |
| k | Adsorptionsrate, mL min ⁻¹ |

| | |
|-------------|---|
| k_{MO} | Metzner/Otto Konstante, - |
| k_P | konstante Produktbildungsrate, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| K_S | Affinitätskonstante des Substrats, $g\ L^{-1}$ |
| m | Fließindex, - |
| m_i | Masse der Komponente i , g |
| MOI | Multiplizität der Infektion, pfu cfu ⁻¹ |
| m_S | Substrataufnahmerate des Erhaltungstoffwechsels, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| n | Rührerdrehzahl, min ⁻¹ |
| Ne | Newtonzahl, - |
| n_P | Anzahl der Phagenpartikel, - |
| P | Konzentration an freien Bakteriophagen, pfu mL ⁻¹ |
| $P(n_P)$ | Wahrscheinlichkeit, dass n_P Phagenpartikel eine Zelle infizieren, - |
| P_0 | Konzentration an Bakteriophagen zum Zeitpunkt $t = 0$, pfu mL ⁻¹ |
| q_P | spezifische Produktbildungsrate, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| q_S | spezifische Substrataufnahmerate, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| $q_{S,\mu}$ | spezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| $q_{S,P}$ | Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ |
| r_i | Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ |
| r_P | volumetrische Produktbildungsrate, $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ |
| r_S | volumetrische Substrataufnahmerate, $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ |
| r_X | Wachstumsgeschwindigkeit, $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ |
| RZA | Raum-Zeit-Ausbeute, $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ |
| t | Zeit, h |
| V_R | Reaktionsvolumen, L |
| $V_{R,0}$ | initiales Reaktionsvolumen, L |
| $y(t)$ | dekadischer Logarithmus des Phagentiter in Abhängigkeit von t , - |
| y_0 | dekadischer Logarithmus des Phagentiters zum Zeitpunkt der Phageninfektion, - |

| | |
|-----------------------|---|
| Y_{PS} | Produktselektivität, g g^{-1} |
| Y_{PX} | Produktausbeutekoeffizient, g g^{-1} |
| Y_{XS} | Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1} |
| γ | Scherrate, s^{-1} |
| γ_{eff} | effektive Scherrate, s^{-1} |
| ε | mittlere Energiedissipation, $\text{m}^2 \text{s}^{-3}$ |
| η | dynamische Viskosität, Pa s |
| η_0 | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow 0$, Pa s |
| η_∞ | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow \infty$, Pa s |
| ρ | Dichte des Fluids, kg m^{-3} |
| τ | hydraulische Verweilzeit, h |
| $\tau(\gamma)$ | Schubspannung, Pa |
| μ | spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |
| μ_{max} | maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |
| μ_{set} | vorgegebene spezifische Wachstumsrate, h^{-1} |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.1 DNA Nanostrukturen gebildet nach der <i>scaffolded</i> DNA Origami Technologie. | 13 |
| Abbildung 3.2 Schematische Abbildung der filamentösen Struktur und des Genoms des M13 Bakteriophagen (modifiziert nach Slonczewski und Foster (2012)). | 23 |
| Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus des Bakteriophagen M13 in <i>E. coli</i> | 26 |
| Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Sättigungskinetik nach Monod. | 31 |
| Abbildung 3.5 Wachstumsphase von Mikroorganismen im Satzprozess. | 35 |
| Abbildung 3.6 Schematische Darstellung des xD -Diagramms für die kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels. | 41 |
| Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der wachstumsassoziierten und konstanten Produktbildung bei der kontinuierlichen Kultivierung von Mikroorganismen. | 43 |
| Abbildung 3.8 Verweilzeitsummenkurve für den idealen Rührkesselreaktor. | 44 |
| Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der Scherbeanspruchung einer Flüssigkeit zwischen zwei planparallelen Platten. | 46 |
| Abbildung 3.10 Schematische Darstellung des Fließverhaltens verschiedener Fluide. . | 47 |
| Abbildung 4.1 Schematische Abbildung des Rührkesselreaktors und Positionierung der Scheibenblattrührer. | 60 |
| Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der parallelen miniaturisierten Rührkesselreaktoren. | 64 |
| Abbildung 4.3 Schematische Darstellung des Reinigungsprozesses zur Isolierung von ssDNA. | 71 |
| Abbildung 5.1 Satzkultivierung von <i>E. coli</i> XL1-blue MRF' mit dem Bakteriophagen M13mp18. | 84 |
| Abbildung 5.2 Satzkultivierung von <i>E. coli</i> JM 109 mit dem Bakteriophagen M13mp18. | 86 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 5.3 Maximale Phagentiter in Satzprozessen mit <i>E. coli</i> | 89 |
| Abbildung 6.1 Etablierung einer Hochzelldichtekultivierung mit <i>E. coli</i> JM 109..... | 92 |
| Abbildung 6.2 Übertragung des Hochzelldichteprozesses auf den <i>E. coli</i> Stamm XL1-blue..... | 94 |
| Abbildung 6.3 Hochzelldichtekultivierung von <i>E. coli</i> XL1-blue mit Bakteriophageninfektion..... | 98 |
| Abbildung 6.4 Zeitliche Auflösung der Phageninfektion während einer Hochzelldichtekultivierung..... | 99 |
| Abbildung 6.5 Charakterisierung ausgewählter Medienbestandteile während einer Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen..... | 101 |
| Abbildung 6.6 Untersuchung zum Fließverhalten und zur effektiven Viskosität während der Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen..... | 103 |
| Abbildung 6.7 Hochzelldichtekultivierung mit zwei Wirtsstämmen zur Phagenproduktion..... | 111 |
| Abbildung 6.8 Produktion verschiedener Bakteriophagen M13 Varianten..... | 114 |
| Abbildung 6.9 Bestimmung der Qualität und Anwendung der ssDNA in der <i>scaffolded</i> DNA Origami Technologie..... | 117 |
| Abbildung 6.10 Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Hochzelldichtekultivierung mit Bakteriophagen..... | 120 |
| Abbildung 6.11 Untersuchung des Migrationsverhaltens der isolierten ssDNA in einem Agarosegel..... | 121 |
| Abbildung 6.12 Variation des Infektionszeitpunktes während der Hochzelldichtekultivierung..... | 123 |
| Abbildung 6.13 Variation der Zulaufprofile und Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration..... | 125 |
| Abbildung 6.14 Einfluss der spezifischen Wachstumsrate auf die Bakteriophagenproduktion mit <i>E. coli</i> XL1-blue..... | 127 |
| Abbildung 6.15 Phagenbildungsrate in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate..... | 128 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 6.16 Einfluss der Multiplizität der Infektion von <i>E. coli</i> XL1-blue auf die ssDNA Produktion..... | 132 |
| Abbildung 7.1 Kontinuierliche Kultivierung von <i>E. coli</i> JM 109 im miniaturisierten Rührkesselreaktor. | 136 |
| Abbildung 7.2 Kontinuierliche Kultivierung von <i>E. coli</i> JM 109 mit und ohne Bakteriophagen M13. | 138 |
| Abbildung 7.3 Kontinuierliche Kultivierung von <i>E. coli</i> JM 109 mit dem Bakteriophagen M13 bei zwei unterschiedlichen Durchflussraten. | 140 |
| Abbildung 7.4 ssDNA Konzentration und spezifische ssDNA Bildungsrate im Fließgleichgewichtszustand..... | 141 |
| Abbildung 7.5 Fließgleichgewichtsuntersuchungen und Simulationen im Chemostaten. | 142 |
| Abbildung 7.6 Vergleich der Modellparameter des Wachstums für infizierten und nicht infizierten <i>E. coli</i> JM 109. | 144 |
| Abbildung 7.7 Kontinuierliche Kultivierung von <i>E. coli</i> JM 109 mit dem Bakteriophagen M13 im Litermaßstab. | 149 |
| Abbildung 7.8 Kontinuierliche Kultivierung im Litermaßstab mit erhöhter Glucosekonzentration im Zulauf. | 151 |
| Abbildung 8.1 Einfluss der Infektionsdichte der Helferphagen M13K07 auf den Phagentiter mit artifizieller ssDNA. | 157 |
| Abbildung 8.2 Reproduktion der Herstellung artifizieller ssDNA mit Helferphagen im Zulaufverfahren. | 159 |
| Abbildung 8.3 Migrationsverhalten der artifiziellen ssDNA im Agarosegel..... | 160 |
| Abbildung 9.1 Hochzelldichtekultivierung von <i>E. coli</i> XL1-blue mit Bakteriophagen M13 zur ssDNA Produktion im Rührkesselreaktor..... | 165 |

Anhang

A1. Puffer und Lösungen

Tabelle A.1 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

| | |
|---|---|
| <p>370 g L⁻¹ Ammoniumsulfat: 185 g Ammoniumsulfat 500 mL VE-Wasser 20 min, 121 °C autoklaviert Lagerung bei 4 °C</p> | <p>500 g L⁻¹ Glucose: 550,4 g D-Glucose-Monohydrat 1 L VE-Wasser 20 min, 121 °C autoklaviert Lagerung bei 4 °C</p> |
| <p>Neutralisationspuffer, 3 M Kaliumacetat: 588,9 g Kaliumacetat 2 L VE-Wasser pH = 5,5 mit konz. HCl Lagerung bei 25 °C</p> | <p>Lysepuffer, 1% (w/v) Natriumdodecyl-sulfat, 0,2 M Natriumhydroxid: 20 g Natriumdodecylsulfat 16 g Natriumhydroxid 2 L VE-Wasser Lagerung bei 25 °C</p> |
| <p>190 g L⁻¹ Kaliumdihydrogenphosphat: 95 g Kaliumdihydrogenphosphat 500 mL VE-Wasser pH = 6,7 mit 10 M KOH 20 min, 121 °C autoklaviert Lagerung bei 25 °C</p> | <p>10 M Kaliumhydroxid: 280,55 g Kaliumhydroxid 500 mL VE-Wasser Lagerung bei 25 °C</p> |

50 g L⁻¹ Kanamycinsulfat:

1 g Kanamycinsulfat
20 mL VE-Wasser
sterilfiltriert (0,2 µm)
Lagerung in 2 mL Aliquots bei -20 °C

50 g L⁻¹ Carbenicillin:

1 g Carbenicillin
20 mL Ethanol (50 %, v/v)
sterilfiltriert (0,2 µm)
Lagerung in 2 mL Aliquots bei -20 °C

10x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

80 g Natriumchlorid
2 g Kaliumchlorid
26,81 g Dinatriumhydrogenphosphat-
Heptahydrat
2,7 g Kaliumdihydrogenphosphat
1 L VE-Wasser
pH = 7,4 mit 10 M NaOH
Lagerung bei 25 °C

360 g L⁻¹ Diammoniumhydrogenphosphat:

90 g Diammoniumhydrogenphosphat
250 mL VE-Wasser
pH = 6,7 mit 10 M NaOH
20 min, 121 °C autoklaviert
Lagerung bei 25 °C

**240 g L⁻¹ Polyethylenglykol 8000,
180 g L⁻¹ Natriumchlorid:**

60 g Polyethylenglykol 8000
45 g Natriumchlorid
250 mL VE-Wasser
Lagerung bei 25 °C

0,1 g L⁻¹ Standard Magnesium-Assay:

0,1014 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat
100 mL VE-Wasser
Lagerung bei 25 °C

100 mM Standard Phosphat-Assay:

0,2722 g Kaliumdihydrogenphosphat
20 mL VE-Wasser
Lagerung bei 25 °C

1 M Thiamin-Hydrochlorid:

6,7446 g Thiamin
20 mL VE-Wasser
sterilfiltriert (0,2 µm)
Lagerung bei 4 °C

10 M Natronlauge:

200 g Natriumhydroxid
500 mL VE-Wasser
Lagerung bei 25 °C

0,5x TBE-Puffer

44,5 mM Tris Base
44,5 mM Borsäure
1 mM EDTA
pH 8,4

| | |
|---|---|
| 1x Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer): | 250 g L⁻¹ Magnesiumsulfat 7*H₂O: |
| 10 mM Tris-HCl | 125 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat |
| 1 mM EDTA | 500 mL VE-Wasser |
| 1 L VE-Wasser, pH = 8,5 | 20 min, 121 °C autoklaviert |
| sterilfiltriert (0,2 µm) | Lagerung bei 4 °C |
| Lagerung bei 25 °C | |

0,1 M Calciumchlorid:

| |
|--|
| 1,47 g CaCl ₂ 2H ₂ O |
| 100 mL VE-Wasser |
| 20 min, 121 °C autoklaviert |
| Lagerung bei 25 °C |

A2. Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien**Tabelle A.2** Geräte

| Gerät | Hersteller |
|----------------------------------|--|
| Analysewaage CPA2202S | Sartorius AG, Göttingen |
| Analysewaage Explorer | Ohaus, Gießen, Deutschland |
| Analysewaage Signum 2 | Sartorius AG, Göttingen |
| Autoklav 5075 ELV | Systemec GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Autoklav Laboklav | SHP, Detzel Schloß, Deutschland |
| Autoklav Varioklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland |
| Autoklav Varioklav Zyklondampf | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland |
| Begasung | Bioengineering AG, Wald, Schweiz |
| Bioreaktionssystem bioREACTOR 48 | 2mag, München, Deutschland |
| Bunsenbrenner Fuego SCS | WLD-TEC, Göttingen, Deutschland |
| Eismaschine AF80 | Scotsman, Mailand, Italien |
| Elektrophorese-Kammer P8DS | Pwl, Portsmouth, VA, USA |

| | |
|---|---|
| Elektrophorese-Stromquelle E 802 | Consort, Fournhout, Belgien |
| Gasmischstation Brooks 0254 | Brooks, Dresden, Deutschland |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr, Biberach, Deutschland |
| Gefriertruhe -80 °C, Sanyo ultra | Ewald Innovationstechnik GmbH, Wiesloch, Deutschland |
| Inkubation WiseCube WIS-20 | Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Inkubator innova 44 | New Brunswick, Edison, USA |
| Inkubator Memmert | Bachofer Laboratoriumsgeräte, Degerschlacht, Deutschland |
| Inkubator Multitron Standard | Infors, Bottmingen-Basel, Schweiz |
| Kolonienzähler Colony Counter | N. USUI & CO., LTD., Endomachi Chuo-ku Kobe, Japan |
| Laborroboter mit Pipettier- und Roboterarm Genesis RSP 150 | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| Laserscanner Typhoon 9500 FLA | GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien |
| Magnetrührgerät IKA-Combimag Ret | Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland |
| Magnetrührgerät Monotherm Variomag | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland |
| Mehrkanalschlauchpumpe ISM 597 | Ismatec, Wertheim, Deutschland |
| Mehrkanalschlauchpumpe MP8 | DASGIP, Jülich, Deutschland |
| Mehrkanalschlauchpumpe MP8 | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| MTP-Photometer Fluostar Galaxy | BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland |
| MTP-Photometer infinite M200 | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| MTP-Waschstation Columbus Pro | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| Petrischalen-Drehtisch petriturn-M | Schuett-biotech GmbH, Göttingen, Deutschland |
| pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/325 | Mettler-Toledo AG, Columbus, USA |
| pH-Messgerät F20-Five Easy | Mettler-Toledo AG, Columbus, USA |
| pH-Messgerät Lab 870 | Schott Instruments GmbH, Mainz |

| | |
|---|--|
| pH-Messgerät SevenMulti | Mettler-Toledo AG, Columbus, USA |
| Photospektrometer Genesys 10S UV-Vis | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| pO ₂ -Elektrode InPro 6800 | Mettler-Toledo AG, Columbus, USA |
| Präzisionswaage Explorer | Ohaus, Gießen, Deutschland |
| Reagenzglasnischer | neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland |
| Rührkesselreaktor KLF W30522 | Bioengineering AG, Wald, Schweiz |
| Sensorriegel für pH- und pO ₂ -Messung | PreSens, Regensburg, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank MSC Advantage | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Sicherheitswerkbank SWB | Waldner, Wangen, Deutschland |
| Software Bioscada | Bioengineering AG, Wald, Schweiz |
| Software Laborroboter Gemini V4.2.17.304 | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| Software MTP-Photometer Fluostar 4.31 | BMG, Ortenberg, Deutschland |
| Software Prozesssteuerung Fedbatch-XP 1.0.248 | DASGIP, Jülich, Deutschland |
| Steuergerät | 2mag, München, Deutschland |
| Transferpipetten 10 mL, 1 mL, 200 µL, 20 µL | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Wasserbaar Haake W15 | PSL, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland |
| Wasserbad Kopfraumkühlung | Fry ka-Kältetechnik, Esslingen, Deutschland |
| Zentrifuge Biofuge stratos | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge Espresso | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Zentrifuge Rotixa 50 RS | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |

Tabelle A.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|--|
| Kulturstopfen Rotilabo Größe 32, | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Mikrotiterplattenfolie Adhensice Film | VWR International LLC, Radnor, USA |
| O ₂ -Elektrolyt 34 1002 016 | Mettler-Toledo AG, Columbus, USA |
| Pumpschläuche Marprene 0,25-4,8 mm Innendurchmesser | Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland |
| Pumpschläuche PharMed BPT 2,21/0,51 mm | Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland |
| Pumpschläuche SIK8363 Silikon 0,5/0,25 mm | IDEX, Wertheim, Deutschland |
| Schlauchverbinder 0,63/0,30 x 15 mm | IDEX, Wertheim, Deutschland |
| Schlauchverbinder 0,90/0,50 x 15 mm | IDEX, Wertheim, Deutschland |
| Septen Diaphragms Silicone 50001 | Bioengineering AG, Wald, Schweiz |
| Sterilfilter Minisart Single use 0,2 µm | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| UV-Küvetten 1,5 mL Halbmikro | Brand GmbH & CO KG, Wertheim |
| Vakutainer Blood Collection Tubes, 5 mL | BD, Plymouth, UK |
| Winkelrohre 0,50/0,25 x 101,9 mm, Werkstoff AISI316 L | Unimed, Lausanne, Schweiz |
| Winkelrohre 0,50/0,25 x 111,9 mm, Werkstoff AISI316 L | Unimed, Lausanne, Schweiz |
| Zentrifugenbecher Nalgene, 1 L, PPCO 3120-9500 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

Tabelle A.4 Kolorimetrische und enzymatische Enzymtests

| Analysetest | Hersteller |
|---|---|
| Ammoniak 11 112 732 035 | R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland |
| D-Glucose 10 716 251 035 | R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland |
| Essigsäure 10 148 261 035 | R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland |
| Magnesium Fluid MF01000100-2 | Centronic GmbH, Wartenberg, Deutschland |
| Phosphate Colorimetric Kit MAK030-1KT | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| SYBR [®] Gold Nucleic Acid Gel Stain S-11494 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

A3. Chemikalien

Tabelle A.5 Verwendete Chemikalien

| Chemikalien | Artikelnummer | Hersteller |
|-------------------------------|---------------|---|
| Agar für die Bakteriologie | A0949,1000 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Agarose UltraPure | 16500500 | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Ammoniaklösung 25 % (v/v) | 10314210 | Honeywell Burdick & Jackson Specialty Chemicals GmbH, Seelze, Deutschland |
| Ammoniumsulfat | A3598,5000 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Antischaum 204 | A6426-500G | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Borsäure zur Analyse | 1.00165.0500 | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Citronensäure | 20282,293 | VWR International bvba, Leuven, Belgien |
| Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat | 1.02539.0250 | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

| | | |
|--|--------------|--|
| D(+)-Glukose-Monohydrat | 49.575.000 | neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| di-Ammoniumhydrogenphosphat | 268,3 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | 54.945.000 | neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat | A3814,1000 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Eisen(III)-citrat | F6129-250G | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ethanol 99 % | | CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat | X986.2 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Hefeextrakt | 253-3 | Deutsche Hefewerke GmbH, Deutschland |
| Kaliumacetat | T874.3 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid | A3582,1000 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat | A1364,5000 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumhydroxid | 385 | Avantor Performance Materials B.V. Deventer, Schweden |
| Kanamycinsulfat | T832.1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat | 1.02733.0250 | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | T888.3 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat | 25222,233 | VWR International BVBA, Leuven, Belgien |
| Natriumchlorid | 31434-5KG-R | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | | |
|------------------------------|--------------|---|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | 2326,1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid | 402 | Avantor Performance Materials B.V. Deventer, Schweden |
| Natriummolybdat-Dihydrat | 1.06521.0250 | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Pepton aus Casein | 8986,4 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Polyethylenglykol 8000 | 263,2 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Pufferlösung pH 7,00 ± 0,002 | P713.2 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Pufferlösung pH 4,00 ± 0,002 | A517.1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Pursept® FD 5% | 35009 | Merz & Co., Frankfurt, Deutschland |
| Thiamin-Hydrochlorid | A0955,0100 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Tris | 54.761.000 | neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Zinkacetat-Dihydrat | 1.08802.0250 | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

A4. Arbeiten mit dem Bakteriophagen M13

Im Folgenden soll auf einige für die Laborsicherheit und das Arbeiten mit Bakteriophagen wichtige Aspekte eingegangen werden.

Desinfektion und Inaktivierung

Die Dampfsterilisation ist eine geeignete Methode zur Desinfektion bzw. Inaktivierung der Phagen im Rührkesselreaktor, da bei Temperaturen über 80 °C Phagen in Flüssigkultur schnell inaktiviert werden (Calendar 2006; Pollard und Reaume 1951). Die

Dampfsterilisation im *in-situ* sterilisierbaren Rührkesselreaktor wird bei 121 °C durchgeführt. Dabei ist die Dauer individuell programmierbar (30 Minuten, 121 °C) und gewährleistet die Inaktivierung der Bakteriophagen. Hierbei ist auf die Vermeidung von Toträumen zu achten, beispielsweise muss das mechanische Sicherheitsventil, wie vom Hersteller Bioengineering empfohlen, bei 121 °C kurzzeitig, vorsichtig angehoben werden. Weiterhin muss das Ernteventil, das zum Ablassen der Zellsuspension am Ende der Prozesse verwendet wird, mit Dampf sterilisiert werden.

Neben dem Reaktor stellt die Desinfektion von Laborgeräten einen wichtigen Aspekt dar. Ultraviolettes Licht (UV) ist effektiv für die Desinfektion von Oberflächen. Der Arbeitsbereich unter der Sterilbank kann durch regelmäßige UV-Behandlung zusätzlich zur Behandlung mit Oberflächendesinfektionsmitteln gereinigt werden.

Für Flächendesinfektion im Labor werden an die verwendeten Produkte folgende Anforderungen gestellt: günstig, hochgradig aktiv gegenüber Phagen und möglichst harmlos gegenüber Menschen. Aus diesem Anforderungsprofil bieten sich für Laborgeräte (z.B. Zentrifugenbecher) Natriumhypochlorit oder Formaldehyd an. Beide Chemikalien sind offensichtlich hochgradig effektiv gegen alle Arten von Bakteriophagen (Calendar 2006). Das am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik verwendete Flächendesinfektionsmittel Pursept-FD beinhaltet eine Konzentration an Formaldehyd in der Arbeitslösung von 0,25 %. Eine Formaldehydlösung von 0,02 % führt zu einer Reduktion des Phagentiters um 10^{-1} in 10 Sekunden (Calendar 2006) und wird deshalb zur Desinfektion von Oberflächen verwendet.

Mögliche Kontaminationsquellen

Die für den Produktionsprozess nötigen Arbeiten mit Bakteriophagen, wie beispielsweise die Herstellung von Phagenstammlösungen, das Ausplattieren auf Agarplatten, das Inokulieren der Zellen im Schüttelkolben, die Vorbereitungen zum Infizieren der Zellen im Rührkesselreaktor, usw. sind ausschließlich unter der Sicherheitswerkbank durchzuführen. Durch regelmäßige Desinfektion mit chemischen Desinfektionsmitteln (Pursept® FD), als auch durch UV-Bestrahlung lässt sich in diesem eingeschränkten Arbeitsbereich eine Kontamination vermeiden.

Bei der Kultivierung des Bakteriophagen M13 im Schüttelkolben stellt die Bildung von Aerosolen mit Phagenpartikeln eine mögliche Kontaminationsquelle dar. Aus diesem Grund werden Kulturstopfen (Carl Roth, Karlsruhe) anstelle der am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik routinemäßig verwendeten Metallkappen auf den Schüttelkolben eingesetzt.

Bei der Kultivierung im Rührkesselreaktor hingegen stellt die Probenahme während des Prozesses eine Kontaminationsquelle dar. Um diese Kontaminationsquelle zu minimieren, soll ein Probenahmesystem (Schnellprobenahmesystem ohne Totvolumen, Prototyp, Patent DE 102005049226, 2 mag AG) verwendet werden, das eine tropfenfreie Probenahme ermöglicht. Eine weitere Kontaminationsquelle stellt die Abluft dar. Aus diesem Grund soll nach dem dampfsterilisierbaren Abluftfilter eine Waschflasche installiert werden, die 0,02 % (v/v) Formaldehyd enthält. Dies stellt eine zweite Sicherheitsmaßnahme nach dem dampfsterilisierbaren Sterilfilter dar. Nach der Waschflasche wird die Abluft direkt in die Sonderabluft des Labors geleitet, um die zulässige Arbeitsplatzbelastung an Formaldehyd nicht zu übersteigen.

Im Produktionsprozess ist es nötig für die Zentrifugationsschritte (Abtrennung der Wirtszellen, Phagen Präzipitation mit Polyethylenglykol) das DNA Labor zu verlassen. Dabei werden die Zentrifugenbecher aerosolarm befüllt, noch im Labor austariert und vor dem Verlassen des Raumes wird die Oberfläche mit Pursept® behandelt. Dafür wird die Oberfläche der Laborgefäße vollständig mit der Pursept® Arbeitslösung (enthält 0,25 % Formaldehyd) benetzt. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute werden die Gefäße mit Ethanol gereinigt, um die Sicherheit der Mitarbeiter zu gewährleisten.

Trotz des *in-situ* sterilisierbaren Rührkesselreaktors müssen mit Phagensuspension kontaminierte Reaktionsgefäße (Schüttelkolben, Zentrifugenbecher) außerhalb des DNA Labors autoklaviert werden. Dafür soll ebenfalls die Oberfläche der Reaktionsgefäße nach oben genannter Vorschrift mit Pursept® behandelt werden. Die kurzfristige Lagerung (1-2 Tage) von kontaminierten Reaktionsgefäßen erfolgt im DNA Labor.

Eine weitere Kontaminationsquelle stellen die Transferpipetten dar. Aus diesem Grund ist auf eine regelmäßige Sterilisation und Reinigung zu achten. Des Weiteren sollen für Arbeiten mit Bakteriophagen (zum Beispiel Plaque Test und weitere analytische Methoden) und ohne Bakteriophagen getrennte Sätze an Transferpipetten verwendet werden. Um die Kontamination von sterilen Stammlösungen für das Kultivierungsmedium zu vermeiden,

wurden diese nur außerhalb des DNA Labors (Sicherheitswerkbank des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik) hergestellt und verwendet.

Die größte Kontaminationsgefahr stellt jedoch das Laborpersonal dar, weshalb folgende Vorschriften eingeführt wurden: Zugangsbeschränkung in das DNA Labor, zusätzliche Unterweisung der arbeitenden Personen, Aufbewahrung der Arbeitsschutzkleidung im DNA Labor.