

Batch-Fermentationsprozess am Beispiel einer extrazellulären Enzymproduktion mit dem Hefepilz *Pichia pastoris*.

BioVT, 2013

Allgemeine Vorbemerkungen

Diese Übung wird Sie mit den Grundoperationen eines Bioprozesses, also der Herstellung eines industriellen Produkts durch Kultivierung lebender Zellen, vertraut machen. Das produzierte Protein wird dann im darauffolgenden Übungsteil weiter aufgearbeitet und charakterisiert (siehe dazu Reinigung und Charakterisierung eines rekombinant produzierten Enzyms).

Ein Verständnis des Übungsinhalts wird nur dann möglich sein, wenn Sie sich mit den spezifischen Eigenschaften und Anforderungen von Bioprocessen zuvor vertraut machen. Zu diesem Zweck empfehlen wir den Inhalt des ersten, allgemeinen Teils der Vorlesung „Biotechnologie 1“ bzw. die diesbezüglichen Kapitel in R.D. Schmid's „Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik“, Wiley-VCH (Chemiebibliothek) durchzusehen.

Kultivierung von Mikroorganismen

Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgt auf festen Nährböden oder in Flüssigkulturen. Im Labormaßstab werden dafür Agarplatten (Petrischalen), Mikrotiterplatten mit flüssigen oder festen Medien oder Schüttelkolben verwendet. Im technischen oder industriellen Bereich kommen dafür meist Bioreaktoren zum Einsatz. Als Schüttelkolben werden häufig Erlenmeyerkolben (50 ml bis 2 L) verwendet, die eine Nährlösung (max. 25 % des Gesamtvolumens) enthalten. Diese Kolben werden in thermostatierten Schüttelinkubatoren gestellt und durch Kreisbewegungen wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet. Viele Optimierungsprozesse (z.B. Medien, Temperatur) werden wegen der einfacheren Handhabung und aus Kostengründen im Schüttelkolben durchgeführt bevor in der nächsten Stufe in den Reaktor gegangen wird. Bei Bioreaktoren oder Fermentern handelt es sich um geschlossene Reaktoren, deren Volumen im Normalfall von 1 L bis 500 m³ reicht. Ein häufiger Typ ist der Rührreaktor, bei dem der Massentransfer und Sauerstoffverteilung durch ein Rührwerk erfolgt. Diese Bioreaktoren können als Satzreaktor, als Satzreaktor mit Nährstoffzulauf oder als kontinuierlicher Reaktor betrieben werden. Häufig werden für diese beiden Verfahren die engl. Begriffe Batch und Fed-Batch verwendet. Ein wichtiger Grund für das Fed-Batch Verfahren ist, das viele Produkte erst am Ende der Wachstumsphase gebildet werden. Durch die Zugabe weiterer Nährstoffe am Ende der Wachstumsphase, wird diese produktive Phase verlängert und die Produktkonzentration erhöht. Eine kontrollierte Nährstoffzufuhr verhindert auch, dass eine Substrathemmung auftritt. Eine Substrathemmung tritt dann ein, wenn die Produktbildung z.B. durch die Anwesenheit von leicht abbaubaren Kohlenstoffquellen wie Glucose inhibiert wird.

Neben den diskontinuierlichen Chargenverfahren (*batch*) kommen in zunehmendem Maße Verfahren der kontinuierlichen Kultur zur Anwendung. Die Produktion von Einzellerproteinen (z. B. Futterhefe) wird auf diese Weise durchgeführt, ebenso wie die Abwasserreinigung. In der industriellen Praxis ist die sterile Durchführung einer langfristigen kontinuierlichen Kultur anspruchsvoll und mit hohem Aufwand verbunden. Auch findet bei der kontinuierlichen Kultur eine dauernde Selektion statt, die bei Verfahren mit Hochleistungsstämmen zu Leistungsminderungen führen kann. Um bei diskontinuierlichen Prozessen bestimmte Nährstoffe dauernd in einer optimalen Konzentration zu halten, werden sie zugefüttert.

Für die Ökonomie der Verfahren ist nicht nur die Produktivität und der Ertrag, sondern auch die Art der Substrate, die genutzt werden, von Bedeutung, wobei der Einsatz möglichst billiger Rohstoffe angestrebt wird. Das sind jedoch komplexe Substrate mit wechselnder Zusammensetzung. So ist z.B. die Zuckerrübenmelasse je nach Herkunft, Bodenstandort und Verarbeitungstechnologie unterschiedlich zusammengesetzt; das gleiche trifft auch für andere industrielle Substrate wie Sojamehl oder Maisquellwasser zu und bereitet bei der Standardisierung der Medien Schwierigkeiten.

Um unerwünschte Keime fernzuhalten, werden die Medien und die Geräte sterilisiert. Im Labormaßstab erfolgt die Sterilisation meist durch Autoklavieren, wobei hitzelabile Nährstoffe durch Filtration sterilisiert werden. Zuführte Luft wird durch Filter (Tiefenfilter) gereinigt. Auf Grund ihrer Größe werden Bioreaktoranlagen meist in-situ (vor Ort, in Position) dampfsterilisiert (1,4-3 bar).

Wachstum von Mikroorganismen

Einzeller wie Bakterien und Hefen vermehren sich oft durch Zweiteilung. Daher lässt sich die Erhöhung ihrer Zellzahl durch optische Methoden wie der Messung der Trübung des Mediums bestimmen. Die einzelnen Phasen des Wachstums wie sie in einem Schüttelkolben oder einer Batch Fermentation vorkommen lassen sich wie folgt beschreiben:

Nach der Beimpfung kommt es zuerst zu einer sogenannten Anlaufphase (lag Phase), in der die für das Wachstum wichtigen Stoffwechselforgänge aktiviert werden, nach einer Übergangsphase erfolgt dann eine Phase des exponentiellen Wachstums (log Phase). Auf diese log Phase folgt wieder eine Übergangsphase. Gründe für diese Übergangsphase können die Limitierung durch ein Substrat oder die Hemmung durch ein Produkt sein. Nach dieser Phase stellt sich eine stationäre Phase ein. Die stationäre Phase kann durch eine Substratbegrenzung, hohe Populationsdichte, niedriger O₂ Partialdruck oder die Ansammlung toxischer Stoffwechselprodukte hervorgerufen werden. An diese Phase schließt dann oft eine Absterbephase an, bei der die Zahl der Zellen abnimmt.

Ein wichtiger Parameter für das Wachstum ist die spezifische Wachstumsrate μ mit der Dimension [h⁻¹]. Die Wachstumsrate hängt zusammen mit der Generations oder Verdoppelungszeit. Diese gibt an wie schnell sich die Bakterien in der exponentiellen Phase verdoppeln

Wachstum in der exponentiellen Phase: $\mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt}$ $\mu = \mu_{\max} = \text{const.}$
 X – Biomasse [g/l]

Wachstum in der Übergangsphase:
 (für substratlimitierendes Wachstum) $\mu = \mu_{\max} * \frac{S}{K_s + S}$
 S – Konzentration des limitierenden Substrates [mol/l]; K_s – Sättigungskonstante [mol/l]

Verdopplungszeit: $t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$

Generationszeit: $t_G = \frac{\ln 2}{v}$

Teilungsrate: $v = \frac{1}{N} * \frac{dN}{dt}$ N – Zellzahl [-]

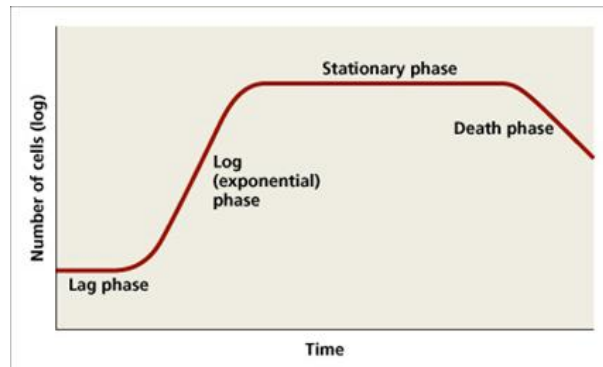


Abb. 1. Typischer Wachstumskurvenverlauf eines Mikroorganismus in einer Batchkultur.

Zum besseren Verständnis und Einschätzung welche spezifischen Wachstumsraten für verschiedene Mikroorganismen erreicht werden, sind μ_{\max} sowie die Verdopplungszeit t_D in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Spezifische Wachstumsraten und Verdopplungszeiten für einige biotechnologisch relevante Mikroorganismen.

	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_D [h]
<i>Escherichia coli</i> , 35°C	>2	>0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 35°C	0,6	1,2
<i>Aspergillus niger</i> , 30°C	0,2	3,5
<i>Penicillium chrysogenum</i> , 25°C	0,12	5,7

Produktivität und Ertrag

Das Ziel eines Fermentationsprozesses ist die optimal mögliche Herstellung eines Produkts. Um diese zu charakterisieren, benützt man den Begriff der **Produktivität**. Unter dieser versteht man Leistung pro Zeiteinheit. Die Produktivität, d. h. die pro Zeiteinheit gebildete Produktmenge kann auf das Reaktorvolumen oder die Zellkonzentration bezogen werden. In der Biotechnologie ist es vielfach üblich, das Bioreaktorvolumen als Bezugsgröße zu wählen.

Die sich daraus ergebende **volumetrische Produktbildungsrate** $P = dP/dt$ (wobei $P = \text{kg}/\text{h}\cdot\text{m}^3$) wird auch als Raum-Zeit-Ausbeute bezeichnet. Sie sagt, wie Abb. 1 veranschaulicht, noch nichts über die Leistung der produzierenden Zellen. Vollbringen wenige Zellen die gleiche Leistung wie viele, so ist die spezifische Leistung der wenigen größer. Für das Verständnis und die Ökonomie ist die auf die Biomasse bezogene **spezifische Produktbildungsrate** $q_p = P/[X]$ (X = Konzentration der Biomasse) mit der Dimension g Produkt/h.g Biomasse aussagefähiger. Eine weitere wichtige Größe für die Produktbildung ist die dafür verbrauchte Substratmenge. Der **Ertrag** (engl. *yield*) lässt sich aus der gebildeten Produktmenge pro verbrauchte Substratmenge S errechnen. Für die Biomasse ergibt sich der Ertragskoeffizient aus der Beziehung $Y_x = X/S$, für ein Produkt $Y_p = P/S$. Für Hefen (*Candida* sp.) liegt Y_x bei Hexosen um 0.5, für Kohlenwasserstoffe bei 1.0. Für eine Stickstoffquelle wie Ammonium erhält man ein Y_x um 6. Für das Antibiotikum Penicillin wird auf Glucose ein Y_p von 0.1 erreicht.

Der Ertragskoeffizient ist dimensionslos. Er ist jedoch von der Entwicklungsphase der Kultur abhängig, d.h. die Kinetik von Wachstum und Produktbildung muss in die Betrachtung einbezogen werden. Es tritt sowohl eine Kopplung von Wachstum und Produktbildung als auch eine Trennung beider Prozesse auf. Dazwischen liegen viele Übergangsbedingungen

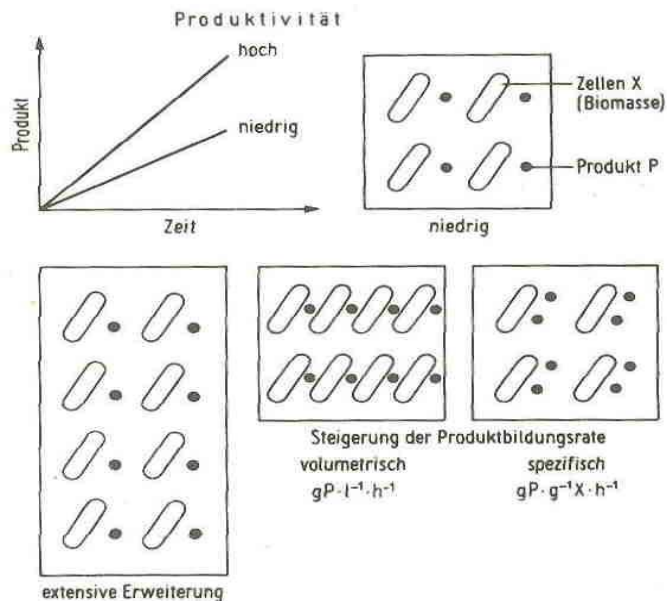


Abb. 1: Volumetrische und spezifische Produktbildung

Leistungen im technischen System: Bioprozeßtechnik

Die Nutzung mikrobieller Aktivitäten im industriellen Maßstab erfordert eine spezifische Fermentations- oder Bioprozesstechnik. Für die Produktion sekundärer Metaboliten wie Antibiotika werden Bioreaktoren von 200 m³, für die Produktion mikrobieller Biomasse wie z.B. Einzellerprotein solche von > 1000 m³ eingesetzt. Ein klassischer Fermentationsprozess wie z.B. Antibiotikaproduktion lässt sich in folgende Abschnitte gliedern:

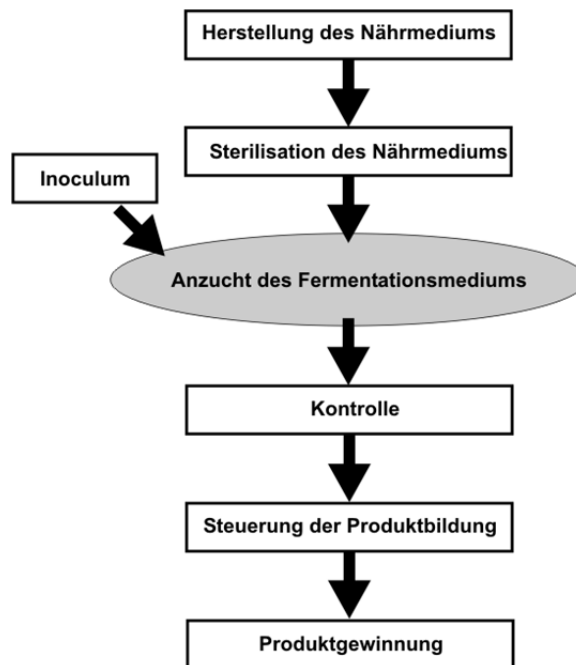


Abb. 2: Fließschema eines Bioprozesses

Der Bioprozessablauf lässt sich folgendermaßen beschreiben:

- der aus der Selektion und genetischen Bearbeitung hervorgegangene Hochleistungsstamm wird durch Lyophilisierung oder Lagerung unter flüssigem Stickstoff konserviert. Von dieser Stammkonserve werden Abimpfungen gemacht und die Leistung geprüft.
- die weitere Vermehrung des Impfmateri als erfolgt stufenweise über immer größere Bioreaktoren (als Beispiel siehe Abb. 3). Die herangewachsenen Kulturen werden zur Beimpfung in jeweils etwa zehnmal größere Fermentoren gepumpt (eine mikrobielle Produktionsanlage verfügt über mehrere Fermenter der einzelnen Größen). Die Zusammensetzung der Anzucht- und Produktionsmedien ist zumeist verschieden, da in den Vorstufen der Biomasse (=Inokulum)bildung gegenüber der Produktbildung der Vorrang gegeben wird.

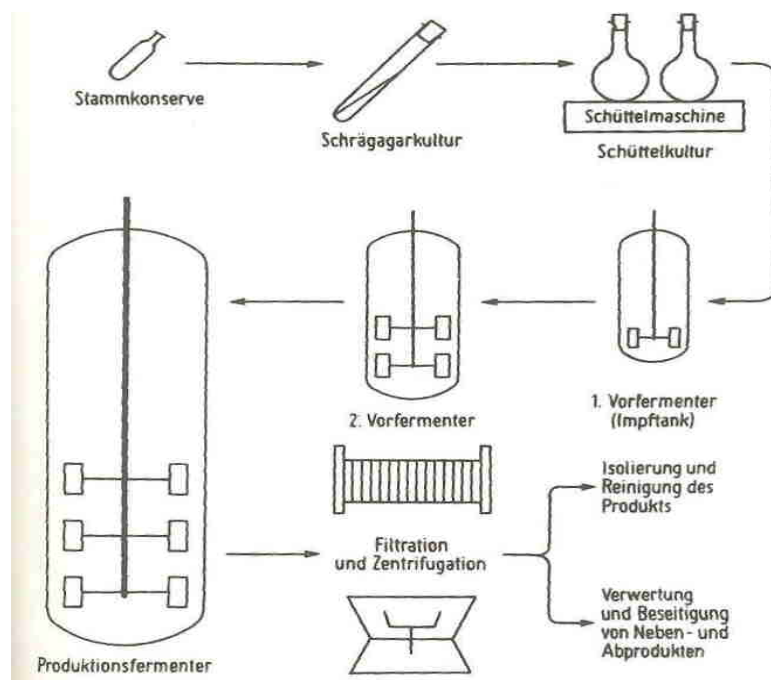
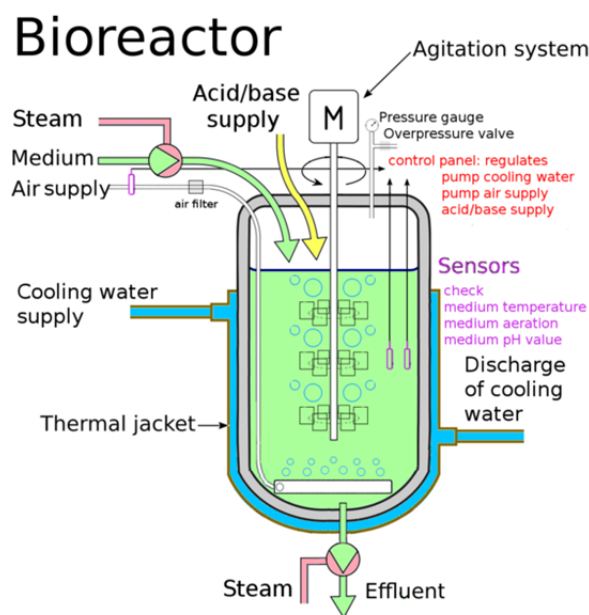


Abb. 3: Schema eines Bioprozesses

- Während der Fermentation erfolgt eine Kontrolle und Steuerung der Produktbildung (Zusätze von Nährstoffen, pH-Regulierung). Zum Zeitpunkt des Ertragsoptimums wird der Prozess abgebrochen und der Fermenterinhalt abgelassen. Zur Isolierung der ausgeschiedenen Produkte werden die Zellen abfiltriert oder separiert und die Kulturlösung aufgearbeitet. Liegen die Produkte in den Zellen vor, so werden diese nach Abtrennung extrahiert. Die Reinigung und Konfektionierung der Produkte und die Verarbeitung bzw. Beseitigung der Abfallprodukte sind sehr aufwendige weitere Arbeitsstufen.

Im Bioreaktor oder Fermenter finden das Wachstum und die Produktbildung unter Kulturbedingungen statt, die zu einer hohen Produktivität führen. Das erfordert eine entsprechende Fermenterausrüstung. Ein Beispiel für den klassischen Fermenter ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. Im Bioreaktor werden in der Regel auch das Ansetzen und die Sterilisation des Nährmediums vorgenommen. Durch Einleiten von überhitztem Dampf wird sterilisiert. Ein Kühlmantel oder eine Kühlschlange im Fermenter ermöglicht die Temperatursteuerung. Durch

Überdruck während der Fermentation wird das Eindringen von Fremdkeimen verhindert. Der Fermenter wird zu etwa zwei Drittel mit Nährmedium gefüllt. Die Belüftung mit steriler Luft und Rührung dient der Sauerstoffversorgung der Zellen und der homogenen Verteilung des Inhalts. Durch die Belüftung muss eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung gewährleistet werden. Bei atmosphärischem Druck und 30°C sind in belüfteten Nährmedien 4–5 ml O₂ enthalten. Die bei mikrobiellen Produktionsprozessen vorliegenden Zelldichten von 20-50 g Biomassetrockensubstanz pro Liter verbrauchen 1000 bis 10000 ml O₂ pro Stunde. In Bruchteilen einer Minute würde der Sauerstoff verbraucht sein, wenn nicht durch Luftzufuhr und Feinverteilung der Luftblasen eine dauernde Nachlieferung erfolgt.



1. Abb. 4: Ein typischer Submersfermenter (

Effektive Belüftungssysteme sind das Herzstück eines Bioreaktors. Es gibt eine Vielzahl von Bioreaktortypen. So werden statt Rührern für die Belüftung auch Strahldüsen eingesetzt, die mit einem inneren (z.B. Strahldüsen-schlaufenreaktor) oder äußeren Umlauf (z.B. Tauchstrahlfermenter) verbunden sind.

Für die Prozesskontrolle und -steuerung hat die Computerkopplung entscheidende Fortschritte gebracht. Die optimale Prozessführung so komplexer Prozesse, wie sie für biotechnologische Verfahren charakteristisch sind, ist nur mit Hilfe der Informations- und Rechentechnik möglich, wobei heute auch Information aus der Systembiologie genutzt wird. Die kontinuierliche Parametererfassung erfolgt durch geeignete Sensoren.

Ziel und Inhalt der Übung

Im Rahmen des Praktikums Biochemie und Biotechnologie sollen Sie einen *batch*-Fermentationsprozess im 2-L Maßstab am Beispiel einer Enzymproduktion mit *Pichia pastoris* durchführen. Dabei sollen Sie die Bildung der Biomasse und des Produkts verfolgen, um daraus die wichtigsten Parameter einer Fermentation (Produktbildungsraten, Abhängigkeit der Produktbildung vom Wachstum) selbst zu ermitteln.

Verwendeter Mikroorganismus – *Pichia pastoris*

In der Übung wird der eukaryontische Mikroorganismus *Pichia pastoris* zum Einsatz kommen. Es handelt sich um einen methylotrophen Hefepilz, der neben gängigen Substraten wie Glucose oder Glycerin auch einen Stoffwechselweg zur Aufnahme und Umwandlung von Methanol besitzt. Die Information, des in dieser Übung zu produzierenden Fremdproteins Galaktose-6-oxidase ist mit dem Promotersystem für den Methanolstoffwechsel gekoppelt. Nähere und weiterführende Informationen finden sie im Teil des Skriptes „Reinigung und Charakterisierung eines rekombinant produzierten Enzyms“. Für die Enzymherstellung werden verschiedene Stämme verwendet. Der genaue Genotyp dieses Stammes und seine Eigenschaften werden am Beginn der Übung für jede Gruppe bekanntgegeben. Die Haltung der *Pichia pastoris* Stämme erfolgt auf einem festen Agar-Medium in Petrischalen.

Durchführung der Übung

Die Übung wird an einem BIOSTAT A plus MO 2-L-Tischfermenter (Abb. 4) durchgeführt, welcher über eine Computer-gesteuerte Regeleinheit gekoppelt ist. Der Fermenter darf nur unter Anleitung und in Gegenwart des betreuenden Assistenten bedient werden. Eine Einführung in seine Operationsweise wird am Beginn der Übung durchgeführt.



Abb. 4: Der BIOSTAT A plus Bioreaktor. (www.sartorius-stedim.com).

Herstellung der Nährmedien

Stocklösungen:

1M Kaliumphosphat Puffer, pH 6

- Mischen von 132ml 1M K_2HPO_4 und 868ml 1 M KH_2PO_4
- pH Wert mittels KOH oder Phosphorsäure auf pH 6 einstellen.
- autoklavieren.

10X YNB (Yeast nitrogen base)

- Einwaage von 34g YNB ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren
- Einwaage von 100g Ammoniumsulfat
- Lösen in 1L Wasser
- Sterilfiltration in sterile Glasflasche
- Lagerung bei 4°C

500X B (0,02% Biotin)

- Lösen von 20mg Biotin in 10ml Wasser
- Sterilfiltration
- Lagerung bei 4°C

20X GY (20% Glycerin)

- Mischen von 200ml Glycerin und 800ml Wasser
- Sterilfiltrieren oder autoklavieren
- Lagerung auf Raumtemperatur

PTM 4 Spurenelemente für 1 Liter

2	g	Kupfersulfat x 5 H ₂ O
0.08	g	Natriumjodid
3	g	Mangansulfat x H ₂ O
0.2	g	Natriummolybdat x 2 H ₂ O
0.02	g	Borsäure
0.5	g	Kobaltchlorid x 6 H ₂ O
7	g	Zinkchlorid
22	g	Eisensulfat x 7 H ₂ O
0.2	g	Biotin
1	ml	Schwefelsäure

Zusammensetzung der Vorkultur und des Fermentationsmedium

Die Vorkultur wird in 2x100 ml Vorkulturmedium in 1 L Erlenmeyerkolben durchgeführt. In der Praxis beträgt das Volumen der Vorkultur ca. 10 % des Arbeitsvolumens bei der Fermentation. Die Vorkultur wird für ca. 20-24 h bei 28°C und 230 rpm im Schüttelschrank inkubiert.

Vorkultur:

YNB Medium (Yeast Nitrogen Base) für 100 ml

10ml	1M Kaliumphosphatpuffer
10ml	10X YNB
0.2ml	500X Biotin
10ml	20X Glycerin
69.8ml	Wasser

Fermenterkultur: FM22 Medium für 1 Liter

42.9	g	KH ₂ PO ₄
5	g	(NH ₄) ₂ SO ₄
1	g	CaSO ₄ ·2H ₂ O
14.3	g	K ₂ SO ₄
11.7	g	MgSO ₄ ·7H ₂ O.
4.35	ml	PTM4 Lösung (nach erfolgter Sterilisation)

Ablauf der Fermentation:

Tag 1 - Montag:

Vorbereiten der Vorkultur

Alle notwendigen Stocklösungen die zur Herstellung der Medien benötigt werden bekommen Sie vom Assistenten zur Verfügung gestellt!

Alle Gruppen bereiten das YNB Medium gemeinsam vor. Jede Gruppe bereitet zwei Erlenmeyerkolben mit der entsprechenden Menge Wasser vor um diese dann gemeinsam zu autoklavieren. Während des Sterilisationsvorganges wird eine kurze Einführung zum apparativen Aufbau und zur Instrumentierung der Bioreaktoren stattfinden und das FM22 Medium für die Bioreaktorkultur von jeder Gruppe hergestellt. Anschließend werden die Vorkulturen durch sterile Zugabe der übrigen Medienbestandteile und der Startkultur (eingefroren bei -80°C) gestartet um eine möglichst lange Kulturzeit bis zur Reaktorinokulation zu ermöglichen.

Apparativer Aufbau und Instrumentierung

Der genaue apparative Aufbau wird während Einführung genauer erklärt.

Vorbereiten des Reaktors

Der Zusammenbau des Reaktors erfolgt **AUSSCHLIESSLICH** mit den betreuenden Assistenten der die Prozedur an einem Reaktor beispielhaft erklärt, falls Sie Fragen zu einzelnen Schritten haben, bitte kontaktieren Sie den Assistenten. Folgende Punkte sind dabei zu beachten:

- Alle Teile des Reaktors wurden von der vorherigen Gruppe gereinigt und müssen daher nach der Fermentation wiederum ausgiebig mit **Leitungswasser** gewaschen werden.
- Alle ringförmigen Dichtungselemente, kurz O-Ringe genannt, werden, falls notwendig, mit Silikonfett versehen.
- Die einzelnen Elemente (Kühlfinger, Abluftkühlung, Basenzugabe, Temperaturfühler, Probennahme, Inokulationsport, Luftzufuhr) werden angeschlossen. Zwei Portöffnungen bleiben für die pH und pO₂ Elektrode offen.
- Alle Schlauch Ein- und Ausgänge werden mit Schlauchklemmen verschlossen. Die Abluftstrecke (Schlauch nach dem Abluftkühler) **MUSS** offen bleiben um einen Druckaufbau im Glasgefäß auszuschließen und eine erfolgreiche Sterilisation während des Autoklaviervorganges zu gewährleisten.

- Alle Schlauchöffnungen und die Filter werden mit Alufolie umschlossen.
- Einfüllen des hergestellten FM22 Mediums (Bitte beachten Sie das Maximalvolumen von 2 L abzüglich der Vorkultur). Es werden 5-6 Tropfen Antifoam dazugeben, das die unkontrollierte Schaumbildung bei der Fermentation unterdrückt.
- Die pH Elektrode wird mit Hilfe von Pufferlösungen und der Software kalibriert. Nach dem Anschluß der Elektrode an die Reaktoreinheit wird die Schutzhülle von der Membran entfernt (Handschuhe tragen, da diese mit 3M KCL gefüllt ist) und mit destilliertem Wasser gespült. Die Kalibrierung erfolgt mit den pH Puffern 7 und 4 nach Start der automatischen Kalibrierung über die Software. Folgen sie dazu den Anweisungen des Kalibrierungsprogramms und spülen sie die Elektrode zwischen den verschiedenen Puffern immer gut mit destilliertem Wasser.
- Nach der Kalibrierung wird die pH Elektrode **vorsichtig** (Glas-Elektrode Wert 400 €) in den Reaktor eingebaut. Das Software Programm sollte nicht gestoppt werden, da sonst auch die Kalibrierdaten verloren gehen.
- Gemeinsam mit dem betreuenden Assistenten werden die pO₂ Elektroden vorbereitet. Dazu wird vorsichtig der Membrankopf abgeschraubt und, falls nötig, neues Elektrolyt in den Membrankörper gegeben. Danach wird die Elektrode wieder (handfest) zugeschraubt und in den letzten verbleibenden Port des Reaktors eingeschraubt.
- Der Reaktordeckel sollte mit Hilfe der Deckelschrauben nur ein wenig (nur auf Anschlag) angezogen werden, da es sonst zum Bruch des Glasgefäßes während der Sterilisation kommen kann.
- Der Reaktor wird im Autoklaven (alle Gruppen zusammen) sterilisiert. Der Temperaturfühler des Autoklaven wird in eine Temperatursonde eines Reaktors eingeführt um die Temperatur des Mediums während der Sterilisation als Referenz zu nehmen. Die Glasflaschen für die Base (leer) sowie Inokulationsflaschen werden mitautoklaviert.

Bevor sie den Autoklaven einschalten, überprüfen sie noch ob die Deckelschrauben nur locker angeschraubt sind und der Schlauch der Abluft nicht durch eine Schlauchklemme verschlossen ist. Weiters werden die Inokulierungsflaschen autoklaviert.

- Nach dem Autoklavieren (Dauer ca 1.30 h) werden die Deckelschrauben angezogen (Handfest) und der Reaktor auf seinen Platz gestellt.
- Nacheinander werden die Peripherie-Geräte (Wasserkühlung, Abluftkühlung, Luftzufuhr, Temperatursonde, Heizmanschette) angeschlossen und mit Hilfe der Software werden die Temperatur (30°C) und die Rührerdrehzahl (50 rpm) eingestellt. Zusätzlich wird ein geringer Luftstrom von ca. 0,5 liter/min dem Reaktor zugeführt.
- Nun wird noch die pO₂ Elektrode angeschlossen um sie über Nacht ausreichend polarisieren zu lassen. Die Kalibrierung erfolgt kurz vor Inokulation am nächsten Tag.

- Nach erfolgter Temperatur Absenkung auf 30°C wird die Basenflasche mit Base befüllt (1-2M NH₄OH) und der pH des Mediums auf Start pH 5 eingestellt. Dies kann mit der Software automatisch geschehen, bitte ziehen sie dazu den Assistenten hinzu.

Tag 2 - Dienstag:

- Die Rührgeschwindigkeit wird mit Hilfe der Software auf 1000 rpm eingestellt und die Begasung auf 2 liter/min erhöht.
- Die Kaliabrierung der pO₂ Elektrode erfolgt mit Hilfe der Software. Zuerst wird der Reaktor bis zu einem konstanten Signal mit Stickstoff begast– Einstellung 0% Gelöst-Sauerstoff, danach wiederum mit Luft begast – Einstellung 100% Gelöst-Sauerstoff. Bitte führen Sie die Kalibrierung nur unter Aufsicht des Assistenten durch.
- Eine Komponente des Mediums (PTM4) wurde getrennt sterilfiltriert. Die vorgeschriebene Menge PTM4 wird nun über eine Spritze in den Reaktor über den passenden Verbinder zugeben (**steriles arbeiten notwendig**, Handschuhe und Ethanol zur Desinfektion nötig).
- Die zuvor autoklavierten Inokulationsflaschen werden in die Steril Werkbank gestellt um diese zur Inokulation der Vorkultur zu verwenden (steriles arbeiten notwendig). Die Vorkultur wird in die Inokulationsflasche überführt und die Flasche dann an den Reaktor geschlossen (Handschuhe, Ethanol, usw.). Am Reaktor wird die Begasung abgedreht um die Vorkultur mittels Schwerkraft in den Reaktor zu überführen. Nach der Zugabe wird die Inokulationsflasche abgenommen, die Anschlüsse mit Ethanol desinfiziert und die Belüftung wieder eingestellt (2 l/min).
- Im Reaktor befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch kein Methanol, welches als Substrat und zur Induktion der Proteinexpression eingesetzt wird. Die Zugabe (**1. Puls**) erfolgt mittels einer sterilen Spritze die mit der notwendigen Menge an 98% Methanol (1% v/v) unter der Sterilwerkbank aufgezogen wird. Die Spritze wird dann an den passenden Verbinder am Inokulationsport angesteckt und das Methanol in den Reaktor überführt (auf Sterilität achten).
- Damit beginnt die Fermentation (Zeitpunkt 0) und am PC wird die Datenaufzeichnung eingeschaltet und es wird die erste Probe gezogen.
- Alle Parameter (pH, Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Luftzufuhr) werden noch einmal überprüft. Die Standardeinstellungen sind: Temperatur 30°C, Rührgeschwindigkeit 1000 rpm, pH 5,0, Luftzufuhr 2,0 l/min. Die Fermentationsbedingungen können aber variieren (wenn vom Assistenten gefordert) und sind daher im Protokoll anzugeben.

Fermentationsbedingungen

Grundeinstellung: Temperatur 30°C, Rührgeschwindigkeit 1000 U/min, pH 5.0, Luftzufuhr 2.0 l/min, Arbeitsvolumen 2 Liter.

Fermentationsablauf

Die Proteinexpression wird mit Hilfe des induzierenden Substrates Methanol durchgeführt. Dafür ist eine mehrfache Zugabe von Methanol mit Hilfe von **Pulsen** notwendig. Es kann nicht von Beginn an eine hohe Konzentration an Methanol im Reaktor vorgelegt werden, da das Substrat sonst toxisch auf die Zellen wirkt.

Der Ablauf des Fermentationsbeispiels mit den planmäßigen Pulszeiten sowie Probennahmen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Fermentation mit geplanten Aktivitäten und Probennahmen

Tag der Fermentation		Aktion	Methanol Puls 0,5%	Methanol Puls 1,0%	Probennahme
Montag	9 Uhr	Start Vorkultur	-	-	-
	13 Uhr	Reaktor Vorbereitung	-	-	-
	17 Uhr	-	-	-	-
Dienstag	11 Uhr	Reaktor Vorbereitung	-	-	-
	13 Uhr	Inokulation	-	X	X
	17 Uhr	Probe	-	-	X
Mittwoch	9 Uhr	Puls, Probe	X	-	X
	13 Uhr	Probe	-	-	X
	17 Uhr	Puls, Probe	-	X	X
Donnerstag	9 Uhr	Puls, Probe	X	-	X
	13 Uhr	Probe	-	-	X
	17 Uhr	Puls, Probe	-	X	X
Freitag	9 Uhr	Probe Abbau Reinigung	-	-	X

Durchführung der Probenahme

Zu den jeweils in Tabelle 1 aufgeführten Zeiten müssen am Reaktor Proben genommen werden. Jede Probenahme ist wie folgt durchzuführen:

- Handschuhe tragen, Handdesinfektion mit Ethanol, Desinfektion des Schlauchendes der Probenahme
- Abfallgefäß (verschießbar) sowie Probenahmegefäß bereitstellen
- Schlauchklemme an Probenahmenschlauch öffnen – ca. 10 ml Probe in Abfallgefäß werfen
- Ungefähr 20ml Probenahme in Probenahmegefäß
- Verschließen der Schlauchklemme
- Sofortiges aufarbeiten der Probe

Analysen bei Probenahme

OD600 Bestimmung:

- Einschalten des Photometers mindestens 10 min vor der Messung
- Einstellen der Wellenlänge auf 600nm
- Mit einer Küvette gefüllt mit Wasser den „blank“ festlegen
- Notwendige Verdünnung der Probe als Doppelbestimmung herstellen (1:10; 1:100; 1:200)
– Probe muss vor Verdünnung gut durchmischt werden
- Messung der verdünnten Probe in Doppelbestimmung – Ergebnis notieren, wenn Wert zwischen 0,1 und 0,7 liegt, falls nicht, dementsprechende Verdünnung herstellen

Biomasse Trockengewicht:

- Einschalten der Zentrifuge
- Einstellungen kontrollieren (3500rpm, 4°C, 15 min)
- Leere getrocknete Reagenzgläser (Glas 10cm hoch) mit Probennummer A und B (Doppelbestimmung) beschriften, danach auf Präzisionswaage abwiegen, Leergewicht notieren (W1)
- Mit Hilfe einer Pipette, genau 5ml homogene Probe (gut durchmischen) in die zwei Reagenzgläser pipettieren
- Zentrifugieren (3500rpm, 4°C, 15 min)
- Überstand vorsichtig mit Pipette in beschriftete (Probennummer) Eppendorf Tubes überführen, restlichen Überstand in Flüssigabfall (verschließbares Glasgefäß) werfen
- Abgefüllte Eppendorftubes auf -20°C lagern bis zur weiteren Analyse (Produktmenge und Aktivität)
- 5ml destilliertes Wasser auf Biomasse-Pellet pipettieren, auf Vortexer homogenisieren
- Zentrifugieren (3500rpm, 4°C, 15 min)
- Überstand in Flüssigabfall werfen
- Glasröhrchen in Trockenschrank (105°C, Schutzhandschuhe tragen) stellen
- Nach mindestens 72h werden die Röhrchen aus dem Trockenschrank entnommen (Handschuhe) und im Exsikkator abgekühlt, danach auf der Präzisionswaage gewogen (W2)
- Die Trockenbiomasse kann mit folgender Formel berechnet werden

$$\text{Trockenbiomasse [g/l]} = (W2 - W1) * \frac{1}{\text{Volumen der abzentrifugierten Probe in l}}$$

Gesamtproteingehalt und Enzymaktivität:

Die Produktanalyse wird erst nach erfolgreicher Fermentation mit allen Proben zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Nähere Informationen finden Sie im Teil „Reinigung und Charakterisierung eines rekombinant produzierten Enzyms“.

Durchführung eines Pulses

Zu den in Tabelle 1 aufgeführten Zeiten sind dementsprechende Pulse des Reaktors durchzuführen. Jeder Puls ist wie folgt durchzuführen:

- Handschuhe tragen, Handdesinfektion mit Ethanol, Desinfektion des Septums am Reaktor
- Unter der Sterilwerkbank wird in eine sterile Spritze die notwendige Menge Methanol (0,5 oder 1,0% v/v) aufgenommen
- Am Reaktor wird die Spritze an den Inokulationsport gesteckt (Sterilität), die Schlauchklemme geöffnet und das Methanol überführt, danach die Schlauchklemme wieder verschließen
- Die Spritze wird abgezogen und entsorgt

Auswertung der Messdaten

Wenn sie alle Messungen durchgeführt haben, wird nun das kinetische Profil der Fermentation ermittelt:

1. tragen Sie die erhaltenen Messwerte für die Konzentration der Biomasse und des Produkts (Enzymaktivität oder extrazelluläres Protein) pro Liter Fermentationsbrühe gegen die Inkubationszeit auf. Dies ist die Abb. 1 Ihres Protokolls.
2. Berechnen Sie nun die volumetrische Produktbildungsrate aus den Differenzen zwischen zwei Messpunkten. Volumetrische Produktbildung: tragen Sie r_p gegen die Inkubationszeit im Fermenter auf. Gehen Sie dann analog für die Bildung der Biomasse vor. Tragen Sie die erhaltenen Werte ebenfalls gg. die Zeit auf (beziehen Sie die Werte auf den zeitlichen Mittelwert der beiden für die Berechnung benützten Zeitpunkte). Dies ist Abb. 2 des Protokolls.

$$\text{Formeln: } r_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} [\text{g}/(\text{l} \cdot \text{h}) \text{ oder } \text{U}/(\text{l} \cdot \text{h})]; \quad r_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} [\text{g}/(\text{l} \cdot \text{h})]$$

3. Berechnen Sie nun aus den Werten der Abb. 2 die spezifische Produktbildungs-, und Biomassebildungsrate, indem Sie die volumetrischen Raten auf die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen Biomassekonzentrationen beziehen (Mittelwert der Biomassekonzentrationen der verwendeten Zeitpunkte verwenden). Dies ist Abb. 3 Ihres Protokolls.

$$\text{Formeln: } q_p = \frac{r_p}{X} [\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h}) \text{ oder } \text{U}/(\text{g} \cdot \text{h})]; \quad \mu = \frac{r_x}{X} [\text{l}/\text{h}]$$

Protokoll

Auf der ersten Seite sollen sich die Namen, Matr. No. und Studienkennzahl befinden.

1. Im Protokoll soll die Arbeitsvorschrift nicht wiederholt werden. Das Abschreiben der Arbeitsvorschrift führt zu Abzügen! Geben sie eine maximal einseitige Zusammenfassung: sie soll den verwendeten Stamm, das produzierte Enzym sowie eine kurze Zusammenfassung der

Fermentationsstrategie beinhalten. Zusätzlich sollten die Zusammensetzung des Mediums und die verwendeten Parameter der Fermentation zusammenfassend und übersichtlich dargestellt werden.

2. Führen sie alle Informationen, welche nicht in dieser Arbeitsvorschrift enthalten sind, und zur Nachvollziehung der erhaltenen Ergebnisse wichtig sind; insbesondere auch alle Abweichungen von der Arbeitsvorschrift an.

3. Geben sie die drei Abbildungen zur Fermentationskinetik an und beschreiben und diskutieren Sie die erhaltenen Ergebnisse. Des Weiteren können sie andere Abbildungen erstellen die die Diskussion der Ergebnisse unterstützen!

Im Anhang an das Protokoll geben sie folgendes an.

(1) Alle Daten in einer geeigneten Graphik die mittels der PC Steuerung gesammelt wurden. (Temperaturverlauf, pH, Basenzugabe, Rührergeschwindigkeitsverlauf, pO_2 Verlauf).

(2) Geben sie die Originalmesswerte in Tabellenform an, mit den dazu verwendeten Probenvolumina, Inkubationszeiten (ggf. auch die verwendete Verdünnung). Die daraus berechneten Konzentrationen an Biomasse und Enzymaktivität müssen nachvollziehbar sein. Geben sie daher auch die Formeln an, mit denen sie berechnet wurden.

APPENDIX:

Kurze Anleitung zum Import des Datenfiles in Excel:

Excel öffnen, neue Arbeitsmappe aufmachen:

Gehe zu Daten

Klick auf: Aus Text

Das CSV-file auswählen

Ursprünglicher Datentyp: *getrennt* auswählen

Weiter>

Trennzeichen: *Komma* und *Tabstopp* auswählen

Weiter>

Auf *Weitere* klicken:

Dezimaltrennzeichen:

.

1000er Trennzeichen:

keines auswählen

OK

Fertig stellen