

# Validierung von 3D-gedruckten Reaktorsystemen für biotechnologische Applikationen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Johanna Sophie Rehfeld, M. Sc.

2024

Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

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

Tag der Promotion: 26.01.2024

„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“

*Marie Curie*

# Kurzfassung

Im Bereich der Bioprozessentwicklung sind Miniaturisierung, Parallelisierung und Flexibilität entscheidend, um Zeit und Kosten zu sparen und Ressourcen zu schonen. Um genau diese Anforderungen zu erfüllen, ist die additive Fertigung (3D-Druck) eine ideale Technologie. Der 3D-Druck ermöglicht eine schnelle Herstellung von Prototypen und eine kostengünstige Produktion von maßgeschneiderten Komponenten mit komplexen Geometrien nach Bedarf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 3D-gedrucktes Kultivierungsgefäß entwickelt, welches mittels Inkjetverfahren aus einem transluzenten Polyacrylat gefertigt wurde und ein Gesamtvolumen von ca. 50 mL aufweist. Es wurde so konzipiert, dass es mit dem Shake Flask Reader vario (SFR vario), einem Multisensorsystem für Schüttelkolben, kompatibel ist. Dafür erfolgte die Integration von optischen Sensoren für die Online-Überwachung von pH und Gelöstsauerstoffkonzentration. Die stetige Weiterentwicklung und Optimierung des ersten Prototypens während der Charakterisierungsexperimente führten zu dem optisch modifizierten Well (OMW). Durch eine veränderte Lichtführung mittels 3D-gedruckter Prismen konnte die streulichtbasierte Biomassemessung mit Hilfe des SFR varios deutlich verbessert werden. Die Verwendung des OMWs für Upstream-Prozesse verschiedener Mikroorganismen und Zelllinien wurde in dieser Arbeit evaluiert. Es wurde gezeigt, dass das OMW für Kultivierungsvorhaben mit *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und Chinese hamster ovary (CHO) Zellen geeignet ist. Es liefert reproduzierbare Ergebnisse und ermöglicht die präzise Überwachung von Kultivierungsphasen mit geringen optischen Dichten unter 1,0 rel.AU. Bei gleichem Wachstumsverhalten der OMW-Kulturen im Vergleich mit Schüttelkolbenkulturen konnte das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant reduziert werden.

Zur Validierung des 3D gedruckten OMWs wurde die Übertragbarkeit von drei Bioprozessen zur Herstellung heterologer Produkte auf untersucht: die Produktion einer Carboxylsäurereductase in *E. coli*, die ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli* und die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in *E. coli*. Dabei wurden die Vorteile des 3D-Drucks genutzt und das Standard-OMW umdesignt, sodass ein weiterer kommerzieller Sensor zur Online-Überwachung der Fluoreszenz integriert werden konnte.

**Schlüsselwörter:** 3D-Druck, additive Fertigung, Online-Bioprozessüberwachung, SFR Vario, Bioprozessentwicklung

# Abstract

In the field of bioprocess development the concept of miniaturization, parallelization and flexibility are pivotal in the effort reducing time and costs and saving valuable resources. To meet precisely these requirements, additive manufacturing (3D printing) is an ideal technology. 3D printing facilitates the rapid prototyping and the cost-effective production of customized components with complex geometries on demand.

In this work, a 3D-printed cultivation vessel was developed, manufactured from a translucent polyacrylate material, using the multi jet modeling technology and holding a total volume of approx. 50 mL. It was designed to be compatible with the multi-sensor system Shake Flask Reader vario (SFR vario) for shake flasks. For this purpose, optical sensors were integrated for online monitoring of pH and DO. Continuous development and optimization of the first prototype during the characterization experiments led to the optically modified well (OMW). By modifying the light guidance using 3D-printed prisms, it was possible to significantly improve the scattered light-based biomass measurement using the SFR vario. In this work, the use of the OMW for upstream processes of various industrially relevant microorganisms and cell lines was evaluated. It was shown that the OMW is suitable for cultivation purposes with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and Chinese hamster ovary (CHO) cells. It provides highly reproducible results and allows precise monitoring of cultivation phases with low optical densities below 1.0 rel.AU. With the same growth behavior of OMW cultures compared to shake flask cultures, the signal-to-noise ratio could be reduced by up to 96 %. Furthermore, it was shown that the 3D-printed optics are transferable to different vessel geometries and sizes, enabling efficient biomass monitoring for individual requirements with customized 3D-printed cultivation vessels on a small scale.

In addition, the transferability of bioprocesses for the production of heterologous products to the 3D-printed OMW was investigated: the production of a carboxylic acid reductase in *E. coli*, the whole-cell catalytic production of the sesquiterpene germacrene A in *E. coli* and the production of green fluorescent protein (GFP). Here, the advantages of 3D printing were used and the standard OMW was redesigned in such a way that an additional commercial sensor could be integrated for online monitoring of the fluorescence.

**Key words:** 3D printing, additive manufacturing, online bioprocess monitoring, SFR Vario, bioprocess development

# Inhaltsverzeichnis

Zitat .....	II
Kurzfassung .....	III
Abstract .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Einleitung.....	1
Zielsetzung .....	2
<b>1 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
1.1 Bioprozessentwicklung.....	3
1.2 Miniaturisierte Kultivierungsgefäße.....	5
1.3 Prozessüberwachung in geschüttelten Kulturen.....	9
1.3.1 Sensoren für die Überwachung verschiedener Prozessparameter für kleinste Kultivierungssysteme .....	10
1.3.2 Sensoren für die Biomassebestimmung.....	13
1.3.3 Multisensorsystem – SFR vario.....	14
1.4 Additive Fertigung.....	16
1.4.1 Verfahren zur additiven Fertigung.....	16
1.4.2 Anforderungen an das Druckmaterial für den Einsatz in der Biotechnologie.....	18
1.4.3 Anwendungen der additiven Fertigung in der Bioprozesstechnik .....	19
<b>2 Experimentelle Arbeiten</b> .....	<b>22</b>
2.1 Entwicklung und Charakterisierung eines 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes.....	23
2.1.1 Abhängigkeit von Füllvolumen, Schüttelfrequenz und Gefäßhöhe.....	24
2.1.2 Einfluss der Geometrie auf den Sauerstoffübergangskoeffizienten.....	26
2.1.3 Untersuchung der Biokompatibilität des 3D-Druckmaterials AR-M2 .....	29
2.1.4 Zusammenfassung und Fazit .....	31
2.2 Optisch modifiziertes Well.....	33
2.2.1 Entwicklung und Konzept.....	33
2.2.2 Untersuchungen des Triggerwinkels zur streulichtbasierten Biomassemessung.....	36
2.2.3 Gegenüberstellung der Biomassemessung im SQ und OMW.....	40
2.2.4 Charakterisierung des Sensorsignals anhand verschiedener Modellorganismen .....	42
2.2.5 Zusammenfassung und Fazit .....	44
2.4 Proof of concept Kultivierungen im 3D-gedruckten OMW .....	45

2.4.1 Kultivierungen von Mikroorganismen im OMW .....	45
2.4.2 Kultivierung von CHO K1-Zellen im OMW .....	47
2.4.3 Gegenüberstellung von Kultivierungen im OMW und Schüttelkolben .....	49
2.4.4 Variation der Substratkonzentration .....	51
2.4.5 Variation der Gefäßgeometrie.....	53
2.4.6 Variation der Gefäßgröße .....	54
2.4.7 Zusammenfassung und Fazit .....	56
2.5 Anwendungen des 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes auf Bioprozesse .....	57
2.5.1 Rekombinante Produktion einer Carboxylsäurereduktase in <i>E. coli</i> .....	57
2.5.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben .....	59
2.5.1.2 Einfluss verschiedener Kultivierungsmedien .....	62
2.5.1.3 Kultivierung im 2L-Rührkesselreaktor .....	64
2.5.1.4 Kultivierung im 3D-gedruckten OMW .....	65
2.5.1.5 Ganzzellkatalytische Reduktion von 4-Hydroxybenzoesäure.....	67
2.5.1.6 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme.....	69
2.5.1.4 Zusammenfassung und Fazit .....	70
2.5.2 Ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in <i>E. coli</i> .....	71
2.5.2.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben .....	73
2.5.2.2 Kultivierung im 2 L-Rührkesselreaktor .....	75
2.5.2.3 Produktgewinnung von Germacren A im Schüttelkolben .....	76
2.5.2.4 Kultivierung im 3D-gedruckten OMW .....	79
2.5.2.5 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme.....	80
2.5.2.6 Zusammenfassung und Fazit .....	81
2.5.3 Rekombinante Produktion von GFP in <i>E. coli</i> .....	82
2.5.3.1 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme.....	84
2.5.3.2 Zusammenfassung und Fazit .....	85
<b>3 Fazit und Ausblick .....</b>	<b>86</b>
<b>4 Anhang.....</b>	<b>92</b>
4.1 Ergänzende Daten .....	92
4.1.1 Rekombinante Produktion von NoCAR in <i>E. coli</i> K12 .....	92
4.1.2 Ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in <i>E. coli</i> .....	94
4.1.3 Rekombinante Produktion von GFP in <i>E. coli</i> .....	96
4.2 Materialien und Chemikalien.....	96

4.2.1 Geräte .....	96
4.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	98
4.2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	99
4.2.4 Mikroorganismen und Zelllinien.....	102
4.2.5 Kultivierungsmedien, Puffer und Reagenzlösungen .....	102
4.2.6 SDS-PAGE.....	105
4.2.7 Lösungen für die ganzzellkatalytische Aktivitätsbestimmung von NoCAR .....	107
4.3 Methoden .....	108
4.3.1 Charakterisierung eines 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes .....	108
4.3.1.1 Konstruktion und 3D-Druck .....	108
4.3.1.2 Ermittlung der Abhängigkeit von Arbeitsvolumen, Wellhöhe und Schüttelfrequenz.....	108
4.3.1.3 $k_{La}$ -Wert Bestimmung.....	109
4.3.1.4 Kalibrierungsverfahren 3D gedruckter Kultivierungsgefäße .....	110
4.3.2 Allgemeine Kultivierungsarbeiten.....	110
4.3.2.1 Stammerhaltung .....	110
4.3.2.2 Vorkulturen .....	110
4.3.2.3 Mikrobielle (Proof of concept) Kultivierungen in 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßen .....	110
4.3.2.4 Kultivierungen von CHO-K1 Zellen .....	111
4.3.2.5 2 L-Rührkesselreaktor Kultivierungen.....	111
4.3.2.6 Analytik zu den Kultivierungsarbeiten.....	112
4.3.3 SDS-PAGE.....	112
4.3.3.1 Enzymatischer Zellaufschluss .....	112
4.3.3.2 SDS-Gele .....	113
4.3.3.3 Kolloidale Coomassie-Färbung.....	113
4.3.3.4 Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration .....	113
4.3.4 Arbeiten mit dem <i>E. coli</i> K12 NoCAR-Stamm .....	114
4.3.4.1 Aktivitätsbestimmung von NoCAR – ABAO-Assay.....	114
4.3.5 Arbeiten mit <i>E. coli</i> Tuner pET26bGAS + pMEV (Germacren A) .....	114
4.3.5.1 Extraktion von Germacren A aus wässriger Lösung.....	114
4.3.5.2 Festphasen Extraktion von Germacren A im Schüttelkolben.....	114
4.3.5.3 Gaschromatographie.....	115
4.3.6 Arbeiten mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-28c-His6-GFP.....	115

4.3.6.1 OMW-Kultivierung.....	115
Abbildungsverzeichnis .....	117
Tabellenverzeichnis.....	120
Literatur .....	122
Danksagung.....	134
Betreute Abschlussarbeiten .....	136
Lebenslauf .....	137
Publikationen .....	138

# Abkürzungsverzeichnis

<b>μ</b>	Wachstumsrate
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>BTM</b>	Biotrockenmasse
<b>CAD</b>	Computergestütztes Design (engl. Computer aided design)
<b>CAR</b>	Carbonsäurereduktase (engl. Carboxylic acid reductase)
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary
<b>CTR</b>	Kohlendioxidtransferrate (engl. Carbon dioxide transfer rate)
<b>DLR</b>	Dual lifetime Referencing
<b>DMAPP</b>	Dimethylallylpyrophosphat
<b>DO</b>	Gelöstsauerstoffkonzentration (engl. Dissolved oxygen)
<b>DoE</b>	Statistische Versuchsplanung (engl. Design of Experiments)
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FDM</b>	Schmelzschichtung (engl. Fused deposition Modeling)
<b>GAS</b>	Germacren A Synthase
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein
<b>IB</b>	Einschlusskörper (engl. Inclusion bodies)
<b>IPP</b>	Isopentylpyrophosphat
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<b>k<sub>La</sub></b>	Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient
<b>LIS</b>	Liquid Injection System
<b>MEP</b>	Methylerythritolphosphat
<b>MEV</b>	Mevalonat
<b>MTP</b>	Mikrotiterplatte
<b>NADPH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OFAT</b>	One factor at a time
<b>OMW</b>	Optisch modifiziertes Well
<b>OTR</b>	Sauerstofftransferrate (engl. Oxygen transfer rate)
<b>PPTase</b>	Phosphopantetheinyltransferase

<b>QbD</b>	Quality by Design
<b>rel.AU</b>	Relative amplitude units
<b>rpm</b>	Umdrehung pro Minute (engl. Revolutions per minute)
<b>RQ</b>	Respiratorischer Quotient
<b>S/R</b>	Signal-Rausch-Verhältnis
<b>SFR</b>	Shake flask reader
<b>SK</b>	Schüttelkolben
<b>SLA</b>	Stereolithographie
<b>SQ</b>	Status quo
<b>STR</b>	Rührkesselreaktor (engl. Stirred tank reactor)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VCC</b>	Lebendzellzahl (engl. Viable cell count)

# Einleitung

Bis 2050 werden 10 Milliarden Menschen auf unserem Planeten leben. Dies bringt einen erhöhten Nahrungsmittelbedarf, einen höheren Wasserverbrauch mit sich und verstärkt die Ausbreitungen von Krankheiten. Das sind neben der Klimakrise nur einige der Herausforderungen, mit denen wir in naher Zukunft zu tun haben werden. Ziel ist es eine nachhaltige Sicherung der Grundversorgung mit Nahrung, Wasser und Energie sowie den Medikamentenbedarf im Gleichgewicht von Ökologie und Ökonomie zu decken. Aufgrund schwindender fossiler Ressourcen ist eine Abkehr von der bisherigen Lebens- und Wirtschaftsweise unabdinglich. Vor allem in der industrialisierten Welt ist ein Paradigmenwechsel weg von der erdölbasierten Industrie, hin zu einer umweltfreundlicheren, nachhaltigeren und ressourcenschonenderen Produktion, dringend notwendig.

Die Biotechnologie stellt eine Schlüsseltechnologie für diesen Weg in die Zukunft dar. Durch die Nutzung der Stoffwechselkapazitäten von Organismen kann ein breites Spektrum an gesellschaftlich relevanten Produkten wie Spezialchemikalien, Pharmazeutika und Enzyme für den industriellen Einsatz sowie Prozesse umweltfreundlich und wirtschaftlich gestaltet werden. Die Schaffung neuer zellulärer Fabriken und deren Kultivierungsprozesse können einen möglichen Beitrag dazu leisten, die verschiedenen gesellschaftlichen Herausforderungen zu meistern. So verschieden die Produkte sind, so verschieden sind die Anforderungen der unterschiedlichen biologischen Systeme an die Kultivierungsbedingungen.

Der 3D-Druck hat in den letzten Jahren dazu beigetragen, dass sich die Art und Weise, wie wir Produkte gestalten und herstellen, verändert. Wo andere Verfahren an ihre Grenzen stoßen und damit die Komplexität des Bauteils einschränken, bietet die additive Fertigung fast vollkommene Designfreiheit, wodurch die gewünschte Funktion stärker in den Fokus rücken kann. Durch das additive Verfahren können Ressourcen eingespart und Abfälle vermieden werden. Die Herstellung direkt am Verwendungsort minimiert sowohl den Transport- als auch Logistikaufwand. Durch den hohen Individualisierungsgrad stellt der 3D-Druck ein ideales Werkzeug für maßgeschneiderte Kultivierungsgefäße im Kleinmaßstab dar. In Kombination mit einer Online-Prozessüberwachung wichtiger Parameter kann die frühe Prozessentwicklung bereits effizient gestaltet sowie ein höheres Maß an Prozessverständnis generiert werden, auf welches im Anschluss aufgebaut werden kann.

# Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit umfasst die Entwicklung und Charakterisierung 3D-gedruckter Kultivierungsgefäße für die Anwendung in Prozessen mit verschiedenen Organismen wie einfachen Prokaryoten, über Hefen bis hin zu Säugetierzellen. Die hohe Flexibilität, die die additive Fertigung bietet, soll genutzt werden, um die speziellen Anforderungen der unterschiedlichen biologischen Systeme zu erfüllen und Limitationen der bisherigen Standardsysteme aufzuheben. Durch die geometrische Anpassung soll beispielsweise die Sauerstoffversorgung gewährleistet und optimiert werden. Für den Einsatz von biologischen Systemen in Gegenwart des 3D-Druckmaterials muss die Biokompatibilität, also die Verträglichkeit, überprüft und sichergestellt werden. Für eine Prozessüberwachung im kleinen Maßstab, soll die Online-Überwachung von prozessrelevanten Parametern, wie pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration und Biomasse mit Hilfe des Multisensorsystems SFR vario realisiert werden. Dafür gilt es optische Sensoren in Form von Spots für pH- und DO-Messungen zu integrieren. Diese sowie die streulichtbasierte Biomassemessung erfordern somit die optische, nicht-invasive Zugänglichkeit zu dem Kultivierungsmedium, was die richtige Wahl des Druckverfahrens und -materials voraussetzt. Zur weiteren Evaluierung sollen sowohl bereits etablierte Bioprozesse als auch neu entwickelte Prozesse, die von industrieller Bedeutung sind, auf das aus dieser Arbeit hervorgegangene Kultivierungsgefäß übertragen werden. Als Modellprozesse sind die heterologe Produktion einer Carboxylsäurereductase, von GFP und die ganzzellkatalytische Herstellung des Sesquiterpens Germacren A in *Escherichia coli* vorgesehen. Zur Beurteilung werden Prozesskenngrößen wie Wachstumsraten, Produktkonzentrationen und Ausbeuten von Schüttelkolben- und 2 L-Rührkesselreaktorkultivierungen mit denen des 3D-gedruckten Gefäßes gegenübergestellt.

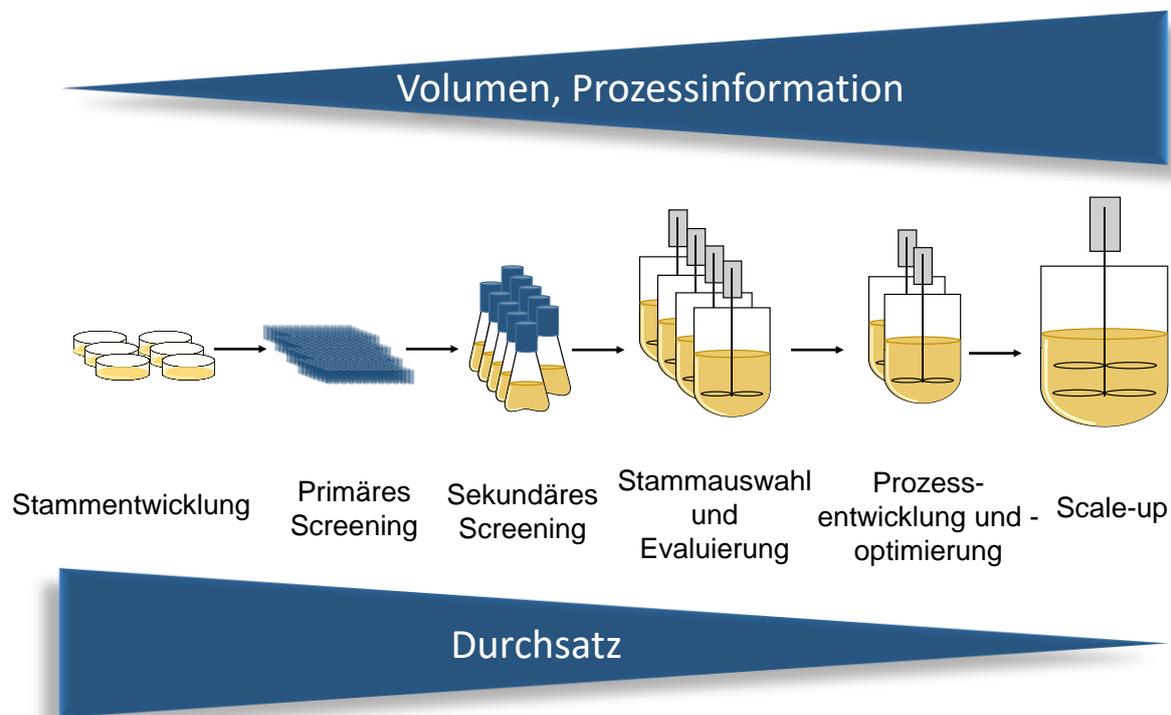
# 1 Theoretische Grundlagen

## 1.1 Bioprozessentwicklung

An einigen Herstellungsschritten wichtiger Produkte für die chemische, pharmazeutische Industrie oder Lebensmittelindustrie kommen konventionelle chemische Verfahren an ihre Grenzen. Biotechnologische Prozesse mit (Mikro-) Organismen können hier oftmals Abhilfe schaffen, denn unter optimalen Bedingungen schaffen sie die Herstellung des gewünschten Produktes mühelos. Voraussetzung hierfür ist die richtige Stammwahl und ein umfangreiches Prozessverständnis [1]. Die Nachfrage an industriellen biotechnologischen Prozessen steigt enorm. Jährliche Wachstumsraten von durchschnittlich 12 % werden im Bereich der weißen Biotechnologie bis 2028 erwartet [2]. Um jedoch weiter wettbewerbsfähig und damit profitabel zu sein, ist die Senkung der Entwicklungskosten von großem Interesse [3]. Die Produktentwicklung in der weißen Biotechnologie beansprucht in etwa ein bis zwei Jahre. Bei pharmazeutischen Produkten dauert die Markteinführung (time-to-market) aufgrund der nötigen klinischen Testungen sogar zwischen acht und 15 Jahre [4]. Da die Zeit bis zur Markteinführung eines Produktes vor allem durch die langen Prozessentwicklungszeiten verursacht wird, ist eine effiziente und kostengünstige Bioprozessentwicklung erstrebenswert [5]. Die Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses beinhaltet verschiedenste Fragestellungen. Diese befassen sich unter anderem mit der Wahl eines geeigneten Produktionsorganismus, der Medienzusammensetzung, der Betriebsweise (batch, fed-batch oder kontinuierlicher Betrieb), bis hin zum Scale-up des Prozesses in den Produktionsmaßstab.

Vereinfacht lässt sich die Entwicklung eines biotechnologischen Produktionsprozesses als Abfolge verschiedener Optimierungsschritte beschreiben (siehe **Abbildung 1**). Nach der Wahl eines geeigneten Produktionsorganismus findet zunächst die Stammentwicklung (Strain Engineering) statt. Der große Fortschritt im Bereich des Strain Engineerings führt zu einer enormen Anzahl an potenziellen Stämmen, welche anschließend unter gleichen Bedingungen charakterisiert werden müssen [6, 7]. Dieses geschieht im so genannten primären und sekundären Screening [8, 9]. Während des primären Screenings sollen die produktivsten Stämme identifiziert werden. Darauf folgt das sekundäre Screening, welches eine ressourcen- und zeitintensive Phase zur Identifikation optimaler Prozessbedingungen darstellt [9]. Dabei werden die Einflüsse kritischer Prozessparameter, wie pH-Wert,

Temperatur, Medienzusammensetzung und Induktionsbedingungen, auf die Produktivität der erfolgversprechendsten vorselektierten Stämme untersucht. Anschließend erfolgt die Evaluierung der Stammauswahl im Labormaßstab, bevor die Prozessentwicklung und -optimierung stattfindet. Abschließend wird der Transfer in den Pilotmaßstab realisiert.



**Abbildung 1:** Ablauf der Bioprozessentwicklung von der Stammentwicklung bis zum Scale-up.

Der hohe experimentelle Durchsatz, der benötigt wird, um die einzelnen Stämme der umfangreichen Stammbibliotheken phänotypisieren und charakterisieren zu können, hat zur Etablierung von Hochdurchsatz Screenings (HTS, engl. High throughput screening) geführt, die auf Miniaturisierung und Parallelisierung basieren [8, 10]. Durch die Kombination von Miniaturisierung, Parallelisierung und Prozessautomation kann der experimentelle Durchsatz erhöht und somit der zeitliche Aufwand der ersten Entwicklungsschritte massiv reduziert werden [10, 11]. Dank der Parallelisierung kommt die statistische Versuchsplanung (DoE, engl. Design of Experiments) immer mehr zum Einsatz, wodurch die Prozessentwicklung noch effizienter gestaltet und die Anzahl an notwendigen Experimenten so gering wie möglich gehalten werden kann.

Begünstigt durch neue Analysetechniken, Digitalisierung und Automatisierung werden im Laufe der Bioprozessentwicklung große Mengen an heterogenen experimentellen Daten

generiert, welche wertvolle Prozessinformationen enthalten [12]. Durch den Einsatz von HTS ist die generierte Datenmenge immens, wodurch die Datenanalyse oftmals zum Engpass wird und somit die Interpretation und die Planung neuer Versuche verzögert wird [13]. Durch intelligente Versuchsplanung, kombiniert mit Modellierungen und/oder dem Einsatz von z.B. Machine learning (ML) können jedoch zum einen der Informationsgehalt der Daten maximiert und zum anderen die Entwicklungszeiten minimiert werden [12]. ML wird nicht nur in den frühen Phasen des Strain Engineerings und Screenings eingesetzt, sondern wird über den gesamten Verlauf der Prozessentwicklung genutzt [13–18].

Die alleinige Konzentration auf Hochdurchsatztechnologien ist jedoch unzureichend, wenn das Screening unter ungeeigneten Bedingungen erfolgt. Insbesondere hat eine Erhöhung des Durchsatzes häufig eine Verringerung des Prozessverständnisses jeder einzelnen Kultur zur Folge, sodass sich Kultivierungsdurchsatz und Informationsgehalt konträr verhalten [10, 11, 19]. Daher sollten die Prozessparameter idealerweise bereits in frühen Screeningphasen gut definiert, überwacht und kontrolliert werden. So können die Grenzen zwischen Screening und Prozessentwicklung überwunden werden. Diese Anforderungen in der frühen Phase der Bioprozessentwicklung haben zu einem Bedarf an geeigneten Systemen für die Charakterisierung von Stämmen im Hochdurchsatz geführt und zur Entwicklung neuer miniaturisierter Kultivierungsgefäße beigetragen.

## 1.2 Miniaturisierte Kultivierungsgefäße

Da die Verwendung von Bioreaktoren im Labormaßstab zeit- und kostenintensiv ist, wird in der Prozessentwicklung und -optimierung auf die Verwendung von Mini- und Mikrobioreaktorsysteme gesetzt [20]. Minireaktoren verwenden Volumen zwischen 1 mL und 250 mL, wohingegen bei Volumen <1 mL von Mikroreaktoren gesprochen wird. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Begriffe Mini- und Mikroreaktor zusammenfassend als MBR bezeichnet. Sie sind ein vielseitiges Werkzeug in der Bioprozessentwicklung, da sie die Möglichkeit bieten viele parallele Ansätze auf möglichst kleinem Raum durchzuführen, was für eine wirtschaftliche, ökologische und effiziente Bioprozessentwicklung entscheidend ist.

MBRs lassen sich in zwei Kategorien unterteilen, die sich in der Art des Energieeintrages unterscheiden. Auf der einen Seite gibt es miniaturisierte Rührkesselbioreaktoren (STR, engl. Stirred tank reactor), welche eine sehr ähnliche Geometrie zu STRs im Labormaßstab

aufweisen. Die zweite Kategorie bilden geschüttelte Systeme, bei denen der Sauerstoffeintrag ausschließlich über den Kopfraum und der von der Flüssigkeit gebildeten Oberfläche erfolgt [21].

Geschüttelte Kultivierungsgefäße, wie Schüttelkolben (SK) und Mikrotiterplatten (MTP), sind die meistgenutzten Kultivierungssysteme in der Biotechnologie. Sie finden sowohl Anwendung im universitären Forschungsbereich als auch in der Industrie [22]. Dort kommen sie vor allem in den ersten Phasen der biotechnologischen Prozessentwicklung zum Einsatz [11]. Der Vorteil von geschüttelten Kultivierungsgefäßen ist die einfache Anwendung, gute Integration in die bestehende Laborumgebung, niedrige Kosten, ein geringer instrumenteller Aufwand und somit die Möglichkeit viele Experimente in kurzer Zeit durchführen zu können [23, 24].

Das wohl bekannteste und weitverbreitetste Kultivierungsgefäß in der Bioprozesstechnik ist der Schüttelkolben, auch bekannt als Erlenmeyerkolben [8]. Erhältlich sind diese in verschiedensten Ausführungen, in verschiedenen Größen (bis zu 5 L), mit oder ohne Schikanen und aus verschiedenen Materialien wie Glas oder Kunststoff. Typischerweise wird ein Arbeitsvolumen zwischen 10 % und 20 % des Kolbenvolumens verwendet. Dieses hängt unter anderem von den gewählten Schüttelbedingungen, wie Orbit und Frequenz ab. In den letzten zwei Jahrzehnten befassten sich Büchs *et al.* mit einer umfassenden verfahrenstechnischen Charakterisierung des schon seit Jahrzehnten genutzten Schüttelkolbens [22, 25].

MTPs stellen eine attraktive und kosteneffiziente Alternative zu Schüttelkolben dar. Die 96 Well-Mikrotiterplatte wurde in den 1950er Jahren für diagnostische Tests entwickelt [26]. Doch schnell kamen diese auch in anderen Forschungsbereichen zum Einsatz [27]. Anfang des 21. Jahrhunderts wurden MTPs auch immer mehr für small-scale Kultivierungen verwendet [28]. Für die Anwendung als geschüttelter Mikrobioreaktor wurden zahlreiche Untersuchungen unternommen, um die Flüssigkeitsbewegung, den Gastransfer, den Energieeintrag und die Durchmischung in MTPs zu charakterisieren [28–31]. Ein Hauptaugenmerk wurde dabei vor allem auf die Sauerstofftransferaten (OTR, engl. Oxygen transfer rate) gelegt [29, 32–34]. Um eine ausreichende Durchmischung und effizienten Sauerstoffeintrag zu gewährleisten, müssen hohe Schüttelfrequenzen (bis zu 900 rpm) und kleine Schütteldurchmesser (3 – 6 mm) gewählt werden [29]. Eine weitere Möglichkeit den

Sauerstoffeintrag zu verbessern ist eine Veränderung der Well-Geometrie. Für Kulturen mit hohem Sauerstoffbedarf wurde beispielweise die FlowerPlate (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) entwickelt, die aufgrund ihrer Geometrie für eine intensivere Durchmischung sorgt [28]. Neben dem hohen Grad an Parallelisierung, ermöglichen MTPs außerdem die einfache Implementierung von Liquid-Handling-Systemen, womit der Durchsatz erhöht und der Arbeitsaufwand minimiert werden kann [35, 36]. Insbesondere seit der Normierung der MTP-Geometrie durch die Society for Molecular Sciences im Jahr 1998 sind MTPs zu einem Standardwerkzeug in der Verwendung von automatisierten Systemen und dem HTS geworden [1, 37, 38]. Trotz der zahlreichen Vorteile für die Bioprozessentwicklung weisen SK und MTPs auch einige Nachteile auf. Aufgrund ihrer kleinen Größe können nur geringe Arbeitsvolumen verwendet werden. Somit liefern diese Kultivierungssysteme oft nur eine begrenzte Datendichte über den gesamten Kultivierungsverlauf, da sie sich häufig auf Endpunktmessungen beschränken, sodass eine detaillierte Analyse des Prozesses in Hinblick auf z.B. Produktbildung nicht möglich ist [9, 20, 39].

Es wurden kommerzielle Systeme etabliert, welche die MTPs als Kultivierungsgefäß integrieren und so eine kontrollierte Umgebung schaffen, und die eine gleichzeitige Prozessüberwachung ermöglichen. Das wohl bekannteste System ist der BioLector (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Neben den wichtigen Prozessparametern pH, Gelöstsauerstoffkonzentration (DO, engl. Dissolved oxygen) und Biomasse (BM), ermöglicht dieser auch Fluoreszenzmessungen. Durch die Integration eines mikrofluidischen Systems wird eine simultane pH-Regelung und Feeding unterstützt [40, 41]. Eine umfassende Beschreibung des Systems ist beispielweise bei Samorski *et al.*, sowie Kensy *et al.* zu finden [42, 43]. Weitere Systeme, die Kultivierungen in MTPs unterstützen sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Neben den bisher vorgestellten geschüttelten Kultivierungssystemen eröffnen miniaturisierte Rührkesselreaktoren neue Perspektiven für die Bioprozessentwicklung. Die Parallelisierung von Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab bietet ein effizientes Werkzeug für die Bioprozessentwicklung, da sie durch die miniaturisierte Bauweise vergleichbare verfahrenstechnische Charakteristiken zu STRs im Labor- und Pilotmaßstab aufweisen, wodurch das Scale-up in den Labor- und Pilotmaßstab erleichtert werden kann [44]. Im Gegensatz zu MTPs ermöglichen miniaturisierte STRs oftmals eine individuelle Reaktorregelung, was eine vollständige Prozesskontrolle erlaubt. Jedoch bedeutet dieses

auch, dass der technische Aufbau komplexer wird, was mit höheren Anschaffungskosten verbunden ist und einer einfachen Anwendung entgegenstehen kann [10, 45]. Die Implementierung einer nicht-invasiven optischen Biomassebestimmung mittels Trübung- oder Streulichtmessung ist in solchen MBR-Systemen jedoch schwierig, da der Einsatz von Rührwerken submerse Gasblasen hervorruft, welche die Messungen stören [10]. Einen Überblick über kommerziell erhältliche small-scale Multi-Minibioreaktoren gibt **Tabelle 1**.

**Tabelle 1:** Übersicht über kommerzielle, parallelisierbare MBR-Systeme.

<b>MBR-System</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reaktor Anzahl</b>	<b>Arbeitsvolumen [mL]</b>	<b>Reaktor-typ</b>	<b>Prozess-monitoring</b>	<b>Literatur</b>
BioLector	Beckman Coulter	48	0,8-2,4	MTP	BM, DO, pH, Fluoreszenz	[36, 42, 45-49]
ambr® 15	Sartorius	12 - 48	10-250	STR	DO, pH	[35, 50-53]
MicroMatrix	Getinge	24	1-5	MTP	DO, pH	[54, 55]
bioReactor	2mag	8 / 48	8-15	STR	DO, pH	[56-60]
Micro24	Pall corp	24	3-7	Blasen-säule	DO, pH	[61-64]
Bioscreen C	Oy Growth Curves Ab Ltd	200	0,4	MTP	BM	[65-67]

Darüber hinaus existieren neben den kommerziell erhältlichen MBRs eine Vielzahl an in universitären Forschungseinrichtungen entwickelten miniaturisierten Kultivierungssystemen [68-70].

Die stetige Nachfrage und Weiterentwicklung dieser Systeme spiegeln das Interesse an MBR-Systemen wider. Insgesamt wird deutlich, dass MBRs ein unverzichtbares Werkzeug in der Bioprozessentwicklung sind und auch in Zukunft eine zentrale Rolle spielen werden, um die Herausforderungen und Chancen der biotechnologischen Industrie erfolgreich zu bewältigen.

### 1.3 Prozessüberwachung in geschüttelten Kulturen

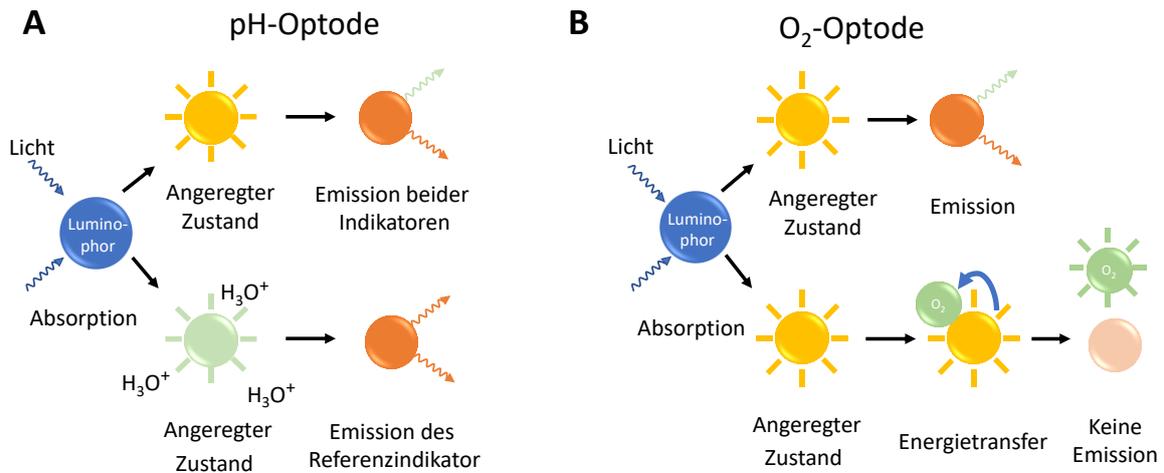
Eine effektive Prozessentwicklung und -optimierung benötigen real-time-Monitoring verschiedener Prozessparameter, wie DO und pH-Wert, damit Sauerstofflimitierungen und Veränderungen im pH-Wert bereits in frühen Entwicklungsstadien erkannt werden. Denn nur wenn aussagekräftige Parameter kontinuierlich überwacht werden, ist eine Prozesskontrolle und ein tiefes Prozessverständnis möglich, um optimale Bedingungen für das Zellwachstum und die Produktbildung mit gewünschter Qualität zu schaffen [71]. Vor allem in der pharmazeutischen Bioprozessentwicklung wird immer mehr dazu übergegangen, die Qualität eines Produktes nicht mehr nur nach Herstellung durch konventionelle Qualitätskonzepte zu kontrollieren, sondern die Qualität bereits zu Beginn der Prozessentwicklung in den Fokus zu stellen [72]. Dieses Konzept wird als Quality by Design (QbD) bezeichnet und soll die Entwicklungszeiten sowie Gesamtkosten reduzieren, in dem die Validierung von neuen Prozessen vereinfacht wird [73, 74]. Neben der Prozesskontrolle ist die sensorgestützte Überwachung von Kultivierungsprozessen ebenfalls von Bedeutung für Data Mining und die Erstellung von geeigneten Bioprozessmodellen [75]. Die kontinuierliche Überwachung von kritischen Prozessparametern erfordert den Einsatz von geeigneten Sensorsystemen. Vor allem, um die im vorherigen Kapitel erwähnten MTPs und MBRs sinnvoll in der Prozessentwicklung einsetzen zu können, bedarf es eines effizienten Online-Monitorings mittels praktikabler Sensoren. Während die Überwachung dieser kritischen Prozessparameter in Bioreaktoren im Labormaßstab meist mit Elektroden erfolgt, sind diese für die Anwendung in Schüttelkolben oder gar MTPs aufgrund ihrer Größe und des Einflusses auf die Flüssigkeitsbewegung und Kultivierungsumgebung äußerst ungeeignet [76, 77]. Diese Herausforderungen führen dazu, dass meistens optische Messverfahren in MBRs eingesetzt werden. Sie bieten nicht-invasive Messungen, miniaturisiertes Design und schnelle Ansprechzeiten, wodurch eine kontinuierliche Prozessüberwachung ohne Unterbrechung der Kultivierung ermöglicht wird [42]. Auf dem Markt befinden sich inzwischen einige Sensorsysteme, welche die Überwachung von Prozessparametern in geschüttelten Kultivierungssystemen ermöglichen.

### 1.3.1 Sensoren für die Überwachung verschiedener Prozessparameter für kleinste Kultivierungssysteme

In geschüttelten Systemen bzw. MBRs wird das Online-Monitoring meistens durch nicht-invasive optische Messsysteme realisiert [40]. Eine große Rolle spielen optische Sensorspots, auch Optoden genannt. Diese verwenden immobilisierte Fluoreszenzfarbstoffe, die für die Online-Messung von pH, DO und pCO<sub>2</sub> eingesetzt werden. Sie erfüllen die Anforderungen in Hinblick auf geringe Größe, hohe Präzision und geringe Kosten [78].

Die verwendeten Indikatoren können auf verschiedene Art und Weise in das Kultivierungsgefäß eingebracht werden. Entweder befindet sich der Indikator am Ende einer Glasfaser, welche in das Kultivierungsgefäß eingebracht wird, oder Sensorspots werden im Inneren des Gefäßes integriert und durch ein optisches Fenster ausgelesen. Die geringe Größe ermöglicht, dass sie flexibel in individuelle transparente Gefäße integriert werden können [31]. Sie sind ideal für die Anwendung in single-use Systemen, da sie zusammen mit dem Reaktorsystem gamma-sterilisiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sensorspots der PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) verwendet, welche für die Messung des pH-Wertes das Messprinzip des dual-lifetime referencing (DLR) verwenden (siehe **Abbildung 2 A**). Dabei sind in dem Sensorspot zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Luminophore) enthalten: einer, der pH-sensitiv gegenüber dem Analyten ist und ein zweiter Farbstoff, der nicht pH-sensitiv ist und somit als Referenzfarbstoff dient [79]. Entscheidend ist, dass sich die Lumineszenzlebensdauer beider verwendeten Farbstoffe deutlich unterscheiden. Der Protonierungsgrad der Messlösung verursacht eine messbare Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Emissionssignal, woraus der pH-Wert ermittelt wird. Das DLR-Verfahren wird vor allem verwendet, um die begrenzte Langzeitstabilität von Luminophoren zu umgehen, welche durch Photobleaching verursacht wird [80]. Zu berücksichtigen ist, dass Sensorspots für pH-Messungen nur in kleinen pH-Bereichen verfügbar sind und nicht den gesamten pH-Bereich abdecken können, was für die Anwendung in den meisten Bioprozessen jedoch zumeist auch nicht erforderlich ist [80].



**Abbildung 2:** Messprinzip optischer pH-Sensoren (A) und Sauerstoffsensoren (B). Eigene Darstellung nach [81].

Optische Sauerstoffsensoren werden mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Die Elektronen im Luminophor (Sauerstoff-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff) absorbieren die Energie des spezifischen Anregungslichts und werden auf ein höheres Energielevel angehoben. In diesem Zustand können Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, wie z.B. Sauerstoff auftreten. Wenn die Elektronen wieder in den Grundzustand zurückkehren, emittieren sie Licht in Form von Fluoreszenz. Ist jedoch zum Zeitpunkt der Anregung Sauerstoff vorhanden, welcher mit dem Luminophor kollidiert, wird die Energie vom Luminophor auf den Sauerstoff übertragen (siehe **Abbildung 2 B**). Dies beeinflusst die Fluoreszenzeigenschaften des Indikators. Zum einen ist die Fluoreszenzintensität reduziert und zum anderen wird die Fluoreszenzlebensdauer des Luminophors verkürzt. Dieses Phänomen wird auch als Fluoreszenzquenching bezeichnet [82].

Kommerziell erhältliche DO-Sensorspots beruhen auf der Detektion einer Verschiebung des Phasenwinkels, die zwischen der Anregung und der Emission des Fluoreszenzfarbstoffes beobachtet wird. Vorteil dieses Messprinzip gegenüber der intensitätsabhängigen Bestimmung ist, dass die Intensität der Lichtquelle oder das Ausbleichen des Farbstoffes die Messung nicht beeinträchtigt [71]. Außerdem zeichnen sich die optischen Sauerstoffsensoren durch den Vorteil aus, dass sie im Gegensatz zu elektrochemischen Sensoren keinen Sauerstoff verbrauchen und eine schnellere Reaktionszeit aufweisen, da sie nicht diffusionslimitiert sind [77].

Aufgrund der spezifischen Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe, sind photolumineszenz-basierte Sensoren selektiv für den jeweiligen Analyten und hochempfindlich. Somit sind Interferenzen mit dem Medium unwahrscheinlich [83]. Eingesetzt werden diese Monitoring-Systeme beispielsweise im ambr® 15 (Sartorius, Göttingen, Deutschland), BioLector und im Shake Flask Reader vario (SFR vario) (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland).

Zur Bestimmung der Atmungsaktivität von pro- und eukaryotischen Schüttelkolbenkulturen wurde das Respiration Activity Monitoring System (RAMOS®) (Adolf Kühner AG, Biersfelden, Schweiz oder HiTec Zang GmbH, Herzogenrath, Deutschland) entwickelt. Dieses ermöglicht die einfache Ermittlung von charakteristischen Kenngrößen, wie Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransferrate (CTR, engl. Carbon dioxide transfer rate), Respiratorischer Quotient (RQ) und Wachstumsrate ( $\mu$ ). Dafür sind ein elektrochemischer Sauerstoffsensor und ein Differenzdrucksensor im Kopfraum des Schüttelkolbens platziert [84, 85]. Die ursprünglich für den Schüttelkolben entwickelte Messtechnik konnte inzwischen erfolgreich in Form des  $\mu$ RAMOS auf MTPs übertragen werden [86, 87]. Ein vergleichbares Messprinzip verwendet das BCpreFerm System von BlueSens (Herten, Deutschland) zur Bestimmung von OTR, CTR und RQ.

Eine völlig ortsunabhängige, voll autarke und dazu minimal-invasive Prozessüberwachung bieten die Sens-o-Spheres (amensio GmbH, Dresden, Deutschland). Dabei handelt es sich um kirschkernegroße Kugeln, die sich passiv mit der Fluidströmung in dem Reaktorsystem bewegen. Diese können in kleinen Reaktoren mit geringen Arbeitsvolumen bis in den Hektoliter Maßstab verwendet werden. Die Übermittlung der Daten erfolgt kabellos über eine Funkverbindung an eine zentrale Empfängerstation [88, 89]. Bislang sind diese Sensorkugeln nur für das Monitoring der Temperatur ausgelegt. Es wird jedoch an der Erweiterung des Anwendungsspektrums auf die Prozessparameter DO und pH gearbeitet.

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie bietet ein weiteres Werkzeug für eine umfassende Prozesscharakterisierung, da es die Möglichkeit bietet z.B. Substrat- und (Neben-) Produktkonzentrationen zu bestimmen. Jedoch sind diese Systeme noch nicht kommerziell verfügbar. Derzeitige Studien zeigen aber bereits vielversprechende Ergebnisse für den Einsatz von 2D-Fluoreszenzspektroskopie in MTPs und damit in der Bioprozessentwicklung

[90, 91]. Außerdem geben sie einen Ausblick auf zukünftige Entwicklungen im Bereich des Online-Monitorings in MBRs.

### 1.3.2 Sensoren für die Biomassebestimmung

Neben den oben genannten Parametern spielt auch das Monitoring der Biomasse eine entscheidende Rolle. Die Biomasse ist als die Zellkonzentration eines Organismus in einer Kultur zu einem bestimmten Zeitpunkt definiert. Während eines Bioprozesses können Ereignisse, wie diauxisches Wachstum, Sauerstoff-, Substrat-, Produkt- oder Metabolitinhibierungen auftreten und das Wachstum beeinflussen. Für die Prozessentwicklung ist es von entscheidender Bedeutung diese Effekte zu erkennen, um den Bioprozess zu charakterisieren und entsprechend zu optimieren. Somit ist die Biomasse ebenfalls ein wichtiger Parameter, um die Reproduzierbarkeit eines Prozesses beurteilen zu können.

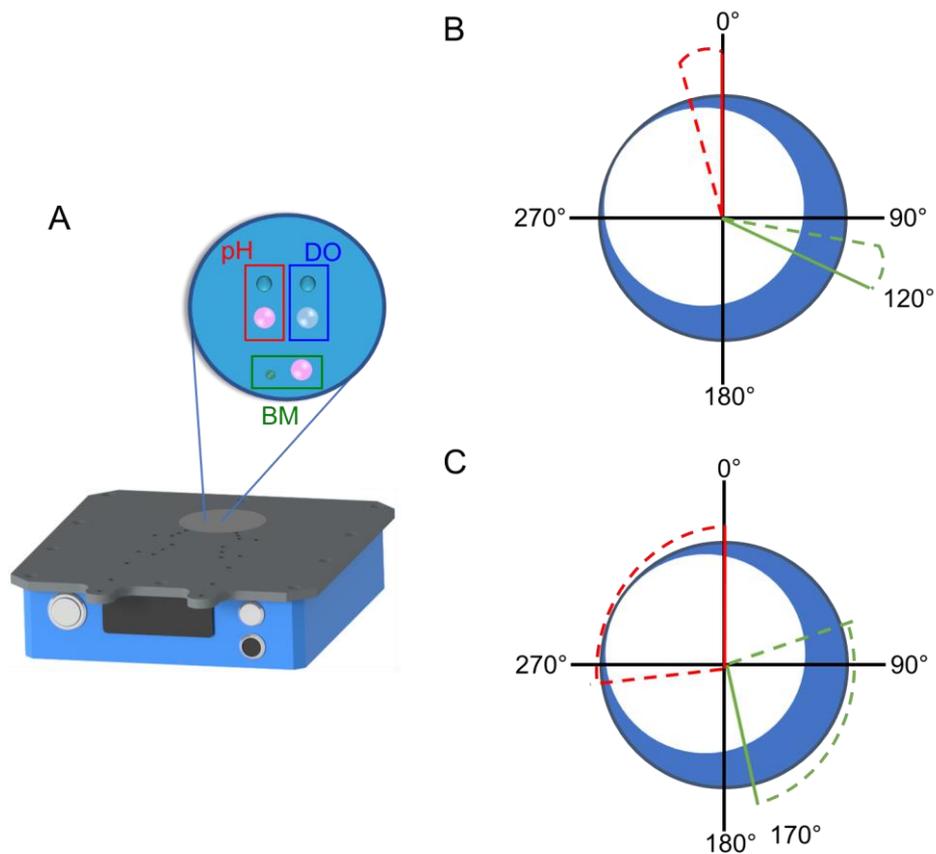
Die Biomassebestimmung wird oftmals durch manuelle Probennahme mit anschließender Offline-Analytik, wie Trübungsmessungen, Gravimetrie oder Zellzählung, durchgeführt, die komplex und zeitintensiv sind und keine kontinuierlichen Daten über den gesamten Prozessverlauf liefert [92, 93]. Außerdem ist bei der Verwendung von MBRs mit geringen Arbeitsvolumen eine häufige Probennahme unerwünscht bzw. nicht möglich ohne durch signifikante Volumenänderungen großen Einfluss auf den laufenden Prozess zu nehmen.

In den letzten Jahren kamen zu den bisherigen nicht-invasiven Sensoren für pH und DO auch einige nicht-invasive Möglichkeiten zur Biomassebestimmung in Schüttelkolben und MTPs hinzu [42, 43, 94, 95]. Die Biomassebestimmung erfolgt dabei in allen Fällen mittels optischer Messung der Trübung der Kulturbrühe. Die Sensoren messen die Lichtstreuung oder -absorption der Zellen in der Kultur und erlauben damit eine Abschätzung der Zellkonzentration. Dabei hat sich vor allem die 180°-Streulichtmessung etabliert. Diese kann nicht-invasiv eingesetzt werden, ist leicht zu miniaturisieren und flexibel in Bezug auf das zu verwendende Kultivierungsgefäß. Die größte Herausforderung aller Systeme ist die Flüssigkeitsbewegung innerhalb des Gefäßes aufgrund hoher Schüttelgeschwindigkeiten. Um dennoch eine robuste und reproduzierbare Biomassemessung im geschüttelten System zu erzielen, werden bei den Sensorsystemen verschiedene Maßnahmen (z.B. Beschleunigungskopplung, Synchronisation) ergriffen. Dadurch wird das dynamische System in ein statisches System umgewandelt, wodurch der Messvorgang vereinfacht wird

[6]. Jedoch geht diese Vereinfachung mit einer Einschränkung der Auflösung, Empfindlichkeit und Robustheit einher. Diese werden insbesondere bei geringen Arbeitsvolumen und gleichzeitig hoher Schüttelfrequenz beeinträchtigt [6]. Der Cell Growth Quantifier (CGQ) (scientific bioprocessing (sbi), Baseweiler, Deutschland) ist ein Biomassensensor, welcher einen dynamischen Ansatz zur streulichtbasierten Biomassemessung verfolgt. Dabei werden bei einer Messfrequenz von 500 kHz in einem Messzyklus von ein bis zwei Sekunden bis zu einer Million Messwerte erfasst, die ein periodisches Rohsignal abbilden und somit die dynamische Flüssigkeitsverteilung innerhalb mehrerer Zyklen abbildet. Dies führt zu einer hohen Datendichte und einer hohen Auflösung [96]. In Kombination mit einem Liquid Injection System (LIS), kann der CGQ für ein Biomasse-basiertes Feeding im Schüttelkolben eingesetzt werden [97]. Eine detaillierte Erläuterung des Sensors ist bei Bruder *et al.* zu finden [6]. Als weitere Sensoren zur Biomassebestimmung sind der OD-Monitor (TAITEC, Japan) und der OD-Scanner (BugLab LLC, USA) zu nennen. Der OD-Monitor verwendet eine Transmissionsmessung, wodurch die Nachweisgrenze auf  $OD_{600} < 10 \text{ rel.AU}$  limitiert ist und hohe Füllvolumen erforderlich sind. Der Nachteil des OD-Scanners ist, dass die Messung nur im statischen Zustand möglich ist, sodass das Schütteln unterbrochen werden muss und keine kontinuierliche Messung erfolgen kann.

### 1.3.3 Multisensorsystem – SFR vario

In dieser Arbeit wurde die Multisensorplattform SFR vario der Firma PreSens Precision Sensing GmbH verwendet (siehe **Abbildung 3 A**). Diese ermöglicht die simultane nicht-invasive Überwachung von DO, pH und Biomasse. Die Messungen von pH und DO erfolgen über chemisch-optische Sensorspots. Die Biomassemessung basiert auf einer Streulichtmessung und erfolgt mittels einer roten LED ( $\lambda=630 \text{ nm}$ ) und einer Photodiode, die im  $180^\circ$  Winkel installiert ist. Bei einem Winkel von  $180^\circ$  wird der größte Teil des emittierten Lichts an der Zellmembran gestreut [94]. Das Licht tritt durch den transparenten Boden des Kultivierungsgefäßes und wird dort an den Partikeln bzw. Zellen gestreut.



**Abbildung 3:** A: Multisensorplattform SFR vario zum Online-Monitoring von pH, Gelöst-sauerstoffkonzentration (DO) und Biomasse (BM). Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Triggerwinkel und Beleuchtungszeit (gestrichelte Linie) B: Kurze Beleuchtungszeit. C: Lange Beleuchtungszeit. Rot: Ungeeigneter Winkel. Grün: Geeigneter Winkel. Eigene Abbildung nach [98].

Ein wichtiger Parameter der Streulichtmessung des SFR varios ist die Beleuchtungszeit. Diese beschreibt die Dauer, in der die LED Licht sendet und die Photodiode das Streulicht detektiert. Durch kürzere Beleuchtungszeiten kann eine höhere Auflösung erzielt werden, wohingegen längere Beleuchtungszeiten zu robusteren Ergebnissen führen [98, 99]. Neben der Beleuchtungszeit ist auch der Triggerwinkel ein entscheidender Faktor für Messungen mit bestmöglicher Auflösung. Aufgrund der rotierenden Flüssigkeit und der sich bildenden Flüssigkeitssichel verändert sich die Eindringtiefe des Lichts innerhalb eines Rotationszyklus (360°). Durch die Optimierung des Triggerwinkels soll erreicht werden, dass sich während der Messung möglichst viel Flüssigkeit über der Optik befindet. Durch die Integration eines Beschleunigungssensors kann das Gerät seine Position innerhalb der Rotation erfassen. Standardmäßig findet die Messung an der 0° Position statt. Durch Anpassung des Winkels wird der Messzeitpunkt verschoben. Das Zusammenspiel von Triggerwinkel und Beleuchtungszeit ist in **Abbildung 3 B, C** dargestellt.

## 1.4 Additive Fertigung

Die additive Fertigung, auch bekannt als 3D-Druck, hat sich nach dem Auslauf der maßgeblichen Patente im letzten Jahrzehnt von einer Nischentechnologie zu einem nicht mehr wegzudenkenden Standardverfahren entwickelt. Der 3D-Druck hat viele Bereiche, darunter auch die Biotechnologie, revolutioniert. 3D-Druck basiert auf dem schichtweise Auftragen von Material (layer-by-layer), wodurch aus einem digitalen 3D-Modell ein physisches Objekt entsteht [100, 101]. Das Modell kann entweder mittels 3D-Scanner oder mit Hilfe einer CAD (engl. Computer aided design) Software erstellt werden. Die additive Fertigung ermöglicht die Herstellung von individuellen und komplexen Strukturen, die mit konventionellen Fertigungsverfahren nicht bzw. nur schwierig umzusetzen sind [102]. Die hohe Flexibilität der additiven Fertigung ist die ideale Voraussetzung für den Einsatz im Rapid Prototyping und der Herstellung kundenspezifischer Anpassungen. Neben dem hohen Grad an Designfreiheit, bietet die additive Fertigung weitere Vorteile gegenüber traditionellen Verfahren. Aufgrund der geringen Produktionszeiten und der direkten Verfügbarkeit durch die Herstellung direkt vor Ort (on demand), können Korrekturen und Weiterentwicklungen von Prototypen kurzfristig und unkompliziert umgesetzt werden. Mit den verkürzten Produktionszeiten gehen Reduzierungen der Entwicklungs- und Produktionskosten einher. Außerdem wird das Risiko von Fehlproduktionen stark minimiert. Dabei muss jedoch auch immer die Stückzahl berücksichtigt werden. Die additive Fertigung ist für die Herstellung von Kleinserien schnell und wirtschaftlich. Für Großaufträge hingegen ist der Einsatz von 3D-Druck nicht kosteneffizient, da es deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt im Vergleich zum Spritzgussverfahren.

### 1.4.1 Verfahren zur additiven Fertigung

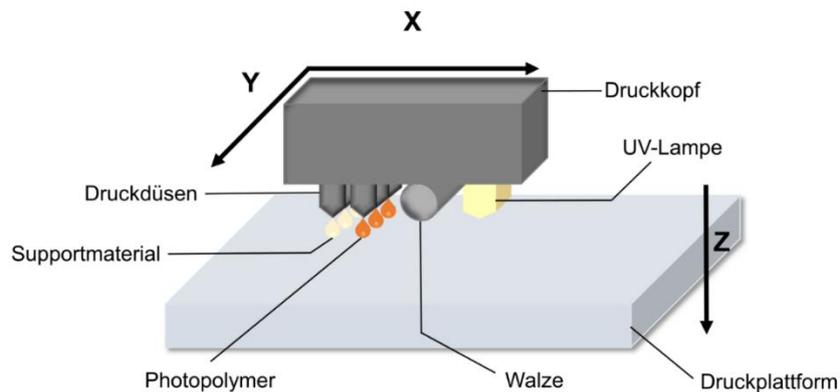
Die additive Fertigung bietet verschiedene Methoden mit spezifischen Vor- und Nachteilen. Im Folgenden wird auf die gängigsten Druckverfahren eingegangen.

Die Stereolithografie (SLA) beruht auf der Polymerisation lichtempfindlicher Harze. Das flüssige Photopolymergemisch liegt in einer Wanne vor. Die Schichten werden durch selektive Polymerisation des in der Wanne enthaltenen Harzes gebildet. Die Belichtung erfolgt mit einem Laser, dessen Strahl mit Hilfe von Spiegeln an den entsprechenden Ort gelenkt wird. Abhängig vom Laser und den Lichtabsorptionseigenschaften des Harzes kann eine hohe Druckauflösung erreicht werden [103]. Häufig ist eine Nachbearbeitung

erforderlich, um überschüssiges Harz zu entfernen. Optional kann das Objekt durch zusätzliche UV-Behandlung nachgehärtet werden [104]. Limitiert wird diese Fertigungstechnologie durch die geringe Auswahl an möglichen Materialien, sowie die Abmaße der Wanne, die die maximale Objektgröße bestimmt [105, 106].

Das bekannteste Verfahren ist die Schmelzschichtung (FDM, engl. Fused deposition modeling). Bei dem FDM-Verfahren dient ein festes, thermoplastisches Filament als Ausgangsmaterial. Dieses wird erhitzt und in einem semi-festen Zustand durch eine Druckdüse (Extruder) in die entsprechende Geometrie auf eine Plattform extrudiert. Anschließend wird die Plattform nach unten bewegt und das Objekt wird Schicht für Schicht aufgetragen [107]. Die Hauptvorteile dieses Druckverfahrens sind die kostengünstigen Anschaffungs- und Wartungskosten, wodurch FDM-Drucker oftmals auch in privaten Haushalten zu finden sind [105, 108]. Zu den Nachteilen gehören raue Oberflächen, schwache mechanische Eigenschaften und Limitierungen in der Objektgröße [109]. Die Verwendung von thermoplastischen Materialien verhindert außerdem die Sterilisation mittels Heißdampfs, welche in Laboren häufig verwendet wird.

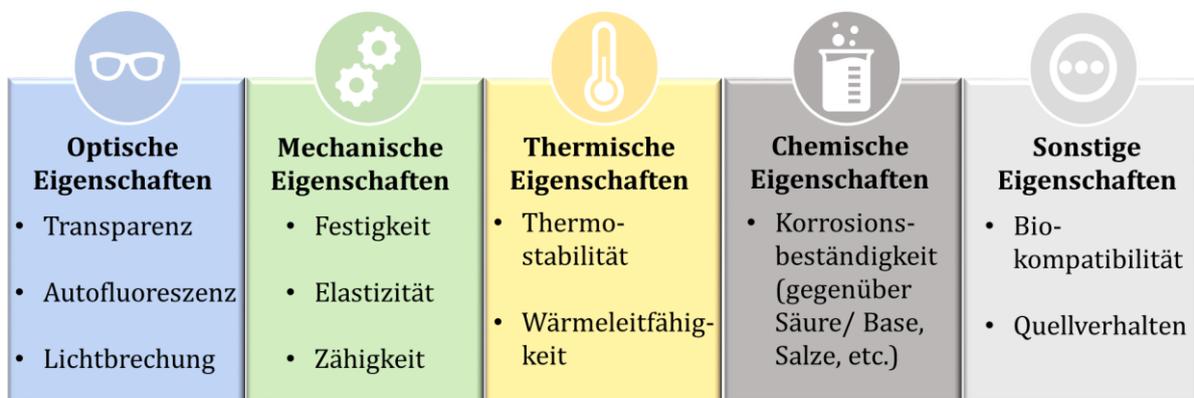
In der vorliegenden Arbeit wurde das Inkjetverfahren verwendet. Dabei wird ein lichtsensitives Photopolymerharz zeitgleich durch eine Vielzahl an Düsen auf die Plattform aufgetragen, mittels einer Walze geglättet und durch UV-Licht polymerisiert (siehe **Abbildung 4**). Dabei bewegt sich der Druckkopf in X- und Y-Richtung über die Druckplattform, welche in Z-Richtung abgesenkt wird. Vorteil gegenüber dem SLA-Verfahren ist die zusätzliche Verwendung von Stützmaterial, welches das Drucken von freien Strukturen, Hohlräumen und Überhängen ermöglicht [101]. Allerdings erfordert die Verwendung von Stützmaterial eine intensivere Nachbearbeitung, da dieses erst noch entfernt werden muss. Durch die Anordnung mehrerer Düsen bleibt die Druckgeschwindigkeit trotz hoher Druckauflösung hoch. Außerdem wird eine hohe Oberflächenqualität erreicht [101, 110].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Inkjet Druckverfahrens.

### 1.4.2 Anforderungen an das Druckmaterial für den Einsatz in der Biotechnologie

Das Druckmaterial muss je nach Anwendung verschiedenste Anforderungen erfüllen bzw. muss das Druckverfahren und damit das Material entsprechend der gewünschten Anwendung gewählt werden. Mögliche Anforderungen an das Material, die insbesondere für biotechnologische Applikationen von Interessen sind, sind in **Abbildung 5** aufgeführt.



**Abbildung 5:** Auswahl an Materialeigenschaften, die im Bereich der Biotechnologie von Interesse sind.

Die optischen Eigenschaften sind vor allem von Bedeutung, wenn optische Sensoren zum Einsatz kommen sollen, wie sie z.B. in der Bioprozessüberwachung genutzt werden. Dabei spielt nicht nur die Transluzenz und Lichtbrechung eine Rolle, sondern auch die Eigenfluoreszenz des Materials, da z.B. pH- und DO-Messungen auf Fluoreszenzmessung basieren. Außerdem sind thermische Eigenschaften des Materials zu berücksichtigen, wenn Kultivierungsgefäße additiv gefertigt werden, da diese gewisse Sterilitätsanforderungen erfüllen müssen, die häufig mit hohen Temperatureinwirkungen einhergehen [111].

Die Anwendung von 3D-gedruckten Systemen in der Zellkultur stellt besonders hohe Anforderungen. Neben den bereits erwähnten Ansprüchen an das 3D-Druckmaterial, ist die Biokompatibilität die grundlegendste Eigenschaft, die das Material erfüllen muss, um für Anwendungen in der Zellkultur eingesetzt werden zu können. Die Biokompatibilität beschreibt die Verträglichkeit eines Materials auf ein biologisches System [112]. Hauptverantwortlich für negative Effekte auf das biologische System werden so genannte leachables und extractables gemacht. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die nach dem Druckprozess aus dem Material entweichen. Bei polymerbasierten Materialien sind vor allem nicht auspolymerisierte Monomere, Photoinitiatoren oder andere Komponente des Harzes für negative Effekte verantwortlich [113]. Verschiedene Studien zeigten, dass durch Nachbearbeitungsschritte, das so genannte Post-Processing, die Menge an toxischen Bestandteilen reduziert werden kann [114, 115]. Bekannte Maßnahmen zur Nachbehandlung sind UV-Behandlung, Inkubation in Lösemittel und Hitze [116, 117]. Neben den grundlegenden Materialeigenschaften beeinflusst auch die Art und Dauer der Anwendung die Verträglichkeit [118]. So ist beispielweise die Biokompatibilität eines Materials von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Während Mikroorganismen sich toleranter gegenüber leachables und extractables zeigen, reagieren tierische Zellen häufig sehr empfindlich [119].

### 1.4.3 Anwendungen der additiven Fertigung in der Bioprozesstechnik

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über aktuelle Anwendungsbereiche der additiven Fertigung in der Biotechnologie, speziell in der Bioprozesstechnik, geben. Anfänglich wurde der 3D-Druck in der Biotechnologie vor allem für die Herstellung von Laborequipment, wie Pipettenhalterungen und Gelkämme verwendet. Doch schnell stellte sich heraus, dass die additive Fertigung ein geeignetes Werkzeug ist, welches die Herstellung von speziellem Equipment zur Realisierung individueller Versuchsaufbauten und anwendungsspezifischer Systeme ermöglicht. So wurde beispielsweise ein individuell gefertigter Deckel mit speziellen Anschlüssen für Schüttelkolben hergestellt, der eine Probennahme ohne Verschlussentfernung ermöglicht [102].

In der Biotechnologie ist die additive Fertigung besonders in der Mikrofluidik weit verbreitet [120–122]. Mikrofluidische Systeme bestehen aus Kanälen mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern und sind für Volumen in Mikro- bis Millilitermaßstab ausgelegt.

Dadurch sollen verschiedenste Prozessschritte auf kleinstem Raum zusammengebracht werden, wodurch die Menge an Reagenzien und Probenvolumen reduziert, Arbeitsfläche verringert und durch die Möglichkeit der Parallelisierung Hochdurchsatzsysteme geschaffen werden sollen [123, 124]. Daher werden solche Systeme auch als Lab-on-Chip (LoC) Systeme bezeichnet und können mittels 3D-Druck hergestellt werden, wodurch die Systeme in einem einzigen Schritt bei vollständiger Gestaltungsfreiheit produziert werden können. Ein Beispiel eines mikrofluidischen Systems in der Bioprozessentwicklung ist eine Zellseparationsspirale, die als Zellretentionssystem für einen Perfusionsprozess zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers in CHO (Chinese hamster ovary) Zellen eingesetzt wurde [125]. Einen ausführlichen Überblick über mikrofluidische Anwendung in der Biotechnologie ist bei Enders *et al.* und Heuer *et al.* zu finden [122, 126].

Der 3D-Druck stellt, wie bereits beschrieben, das ideale Verfahren zur Herstellung eines maßgeschneiderten Kultivierungsgefäßes dar. Je nach Organismus ergeben sich unterschiedlichste Anforderungen an den Bioprozess und an das verwendete Kultivierungsgefäß. Somit steigt die Nachfrage an anwendungsspezifischen und individualisierten Bioreaktorsystemen mit integrierten optischen Sensoren. Bisher gibt es jedoch nur wenige vollständig 3D-gedruckte Kultivierungsgefäße bzw. Bioreaktoren, die für die Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt werden. Lücking *et al.* realisierten eine individualisierte Mikrotiterplatte aus Polyamid mit vielen verschiedenen Well-Geometrien, die jeweils den experimentellen Anforderungen entsprechen. So wurden die MTPs sowohl für Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) eingesetzt, als auch in der adhären und Suspensionszellkultur von humanen Zellen [127, 128]. Ein Prozessmonitoring wurde dabei jedoch noch nicht berücksichtigt. Ein komplexeres Beispiel stellt das MicroLED da. Dabei handelt es sich um das erste vollständig mittels 3D-Druck erstellte Flat-Panel-Airlift-Photobioreaktorsystem zur Kultivierung von Mikroalgen mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 20 mL. Dabei wurden nicht-invasive Sensoren zur Überwachung der wichtigsten Prozessparameter (pH, DO, CO<sub>2</sub>) integriert, sowie Fluoreszenz- und Biomassemessungen ermöglicht [129]. Frey *et al.* entwickelten mit Hilfe des 3D-Drucks ein deutlich kleineres Reaktorsystem; ein Mikro-Blasensäulenreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 550 µL. Für eine effiziente Prozessanalytik wurde der Reaktor mit nicht-invasiven Sensoren zur Überwachung von Temperatur, Biomasse, pH und DO sowie pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> in der Gasphase, ausgestattet. Kultivierungen von *S. cerevisiae* erbrachten

vergleichbare Zelldichten, Wachstums- und Produktbildungsraten wie im 2,5 L Bioreaktor [130].

Achinas *et al.* nutzten das SLA-Verfahren zur Fertigung eines 40 mL-Reaktors, um die Auswirkungen des downscaling auf anaerobe Prozesse zu untersuchen. Es konnte eine ähnliche Umsetzungseffizienz wie in einem 400 mL STR erreicht werden. Die Biogasproduktionsrate sowie Methangehalt waren im 3D-gedruckten Reaktor jedoch geringer [131].

Die additive Fertigung ist somit schon lange nicht mehr nur Teil universitärer Forschungsvorhaben. Auch immer mehr Unternehmen aus dem Bereich der Bioprozesstechnik nutzen die additive Fertigung, um kundenspezifische Produkte anbieten zu können. Die Firma Getinge (Göteborg, Schweden) bietet beispielweise die Applikon AppliFlexST Einweg-Bioreaktoren (0,5 L, 3 L und 15 L) an, bei der die 3D-Drucktechnologie eingesetzt wird, um individuelle Deckel mit kunden- bzw. prozessspezifischen Anschlüssen zu erstellen [132]. Aquila biolabs (Baesweiler, Deutschland) nimmt sich den 3D-Druck zur Hilfe zur Herstellung von Adaptern, die die Verwendung ihres Liquid Injection Systems für eine Vielzahl an Gefäßtypen ermöglichen [133].

Die hier genannten Beispiele zeigen deutlich, dass die additive Fertigung ein großes Potenzial für die Herstellung von MBR-Systemen für den Einsatz in der Bioprozessentwicklung bietet.

## 2 Experimentelle Arbeiten

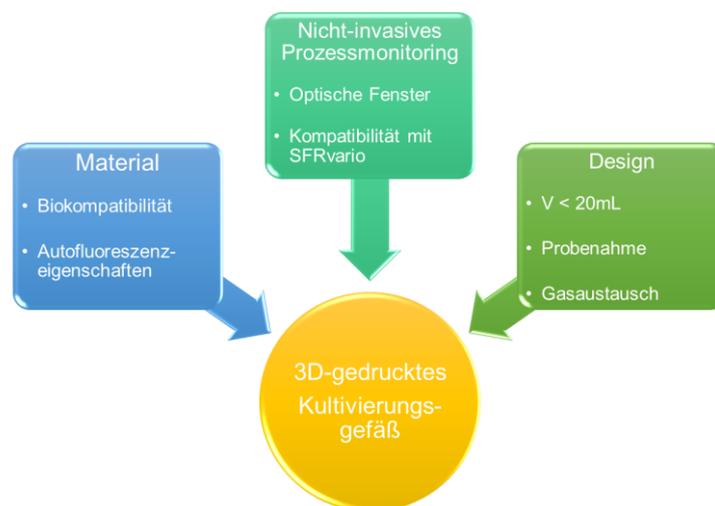
Im Folgenden werden die experimentellen Arbeiten und Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, vorgestellt.

- Im ersten Abschnitt wird der Entwicklungsprozess eines 3D-gedruckten Kultivierungssystems beschrieben und wichtige Eigenschaften wie Biokompatibilität und Sauerstoffeintrag charakterisiert. Darüber hinaus wird die Online-Biomassemessung mit dem SFR vario untersucht. Dafür werden Kalibrationsreihen von der optischen Dichte bei 600 nm und dem online Amplitudensignal verschiedener Organismen erstellt.
- Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse der proof of concept Kultivierungen mit verschiedenen für die Biotechnologie relevanten Organismen vorgestellt und mit Schüttelkolben Kultivierungen verglichen. Außerdem wird der Einfluss verschiedener Gefäßgeometrien und -größen auf das Wachstumsverhalten sowie auf die Online-Biomassemessungen untersucht.
- Im dritten Abschnitt wird das 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß hinsichtlich der Anwendbarkeit auf Bioprozesse untersucht. Dazu wird die Entwicklung von verschiedenen Bioprozessen dargestellt und die Übertragbarkeit auf das 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß überprüft. Dafür werden prozessrelevante Kennzahlen mit Kultivierungen in Schüttelkolben und STR verglichen.

## 2.1 Entwicklung und Charakterisierung eines 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Evaluierung eines miniaturisierten, 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes für biotechnologisch relevante Organismen. Dabei sollen die Vorteile der additiven Fertigung genutzt werden, um spezielle Anforderungen, wie z.B. die individuelle Anpassung der Geometrie, an ein Kultivierungsgefäß leicht umzusetzen. Das hier entwickelte Gefäß soll eine Position zwischen MTP und SK einnehmen, um sowohl einen hohen Parallelisierungsgrad von MTPs zu erhalten als auch ausreichend Volumen für optionale Offline-Analytik bereitzustellen.

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, ist für eine aussagekräftige Bioprozessentwicklung in diesem Maßstab ein umfangreiches nicht-invasives Prozessmonitoring erforderlich. In diesem Zusammenhang sollen die Integration optischer Chemosensoren für die Prozessparameter DO und pH realisiert werden sowie eine streulichtbasierte Online-Überwachung der Biomasse. Dafür wird der Multisensor SFR vario verwendet, was die Kompatibilität des gefertigten Gefäßes mit dem SFR vario voraussetzt. Dabei ist die optische Zugänglichkeit von entscheidender Bedeutung, die unter anderem die Anregung und Auslesung der Sensorspots ermöglicht. Die Wahl des geeigneten Druckverfahrens sowie Untersuchungen hinsichtlich Materialeigenschaften und den Einsatz für optische Messungen wurden in der parallel laufenden Promotionsarbeit von M.Sc. Louis Kuhnke durchgeführt. Die Konstruktion und der 3D-Druck wurden ebenfalls von M.Sc. Louis Kuhnke durchgeführt.

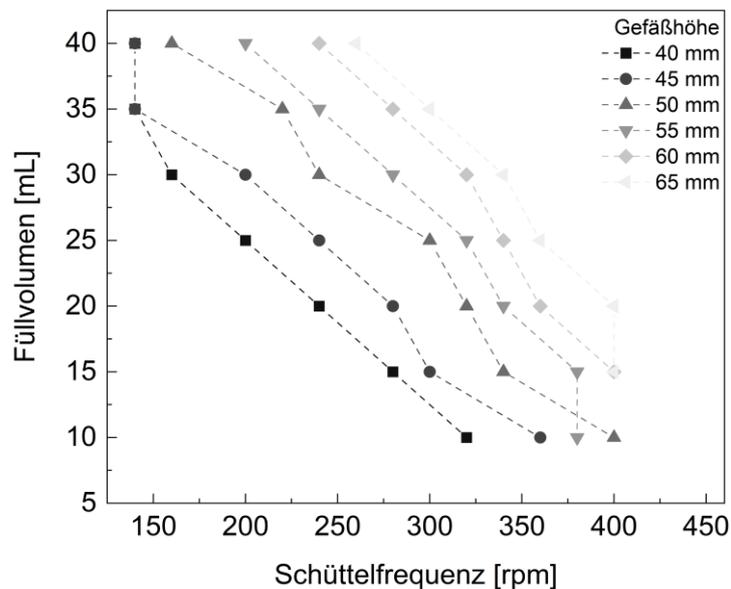


**Abbildung 6:** Anforderungskatalog an das zu entwickelnde 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß.

### 2.1.1 Abhängigkeit von Füllvolumen, Schüttelfrequenz und Gefäßhöhe

Zur geometrischen Auslegung des Gefäßes wurde im ersten Schritt der Entwicklung und Charakterisierung eines 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes zunächst der Zusammenhang zwischen Schüttelfrequenz, Füllvolumen und Gefäßhöhe untersucht. Dieses spielt vor allem bei stark sauerstoffzehrenden Kulturen eine Rolle, da hohe Schüttelfrequenzen verwendet werden, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu garantieren. Außerdem ist die Schüttelfrequenz entscheidend für eine ausreichende Durchmischung der Kulturbrühe. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die rotierende Flüssigkeit nicht über den Gefäßrand hinaus bzw. an den gasdurchlässigen Verschluss gelangt, da dies den Gasaustausch beeinträchtigen würde.

Der erste Prototyp basiert auf der Grundgeometrie einer 6-Well Zellkulturplatte. Es wurde ein Modellsystem mit sechs unterschiedlichen Gefäßhöhen (40 mm bis 65 mm, Innendurchmesser 32 mm) mittels FDM-Drucks erstellt (siehe **Kapitel 4.3.1.2, Abbildung 50**). Die Ermittlung des Zusammenhanges von Füllvolumen, Schüttelfrequenz und Gefäßhöhe erfolgte mit Hilfe einer Flüssigkeitsleitfähigkeitsmessung. Dafür wurden die Gefäße mit Natriumchlorid-Lösungen von 5 mL bis 40 mL gefüllt und die Schüttelfrequenz von 140 rpm bis 400 rpm schrittweise um 20 rpm erhöht. Der Orbitaldurchmesser des verwendeten Schüttlers beträgt 25 mm. Am unteren und oberen Gefäßrand wurde jeweils ein Goldkontakt integriert. Steigt die NaCl-Lösung bis an den oberen Gefäßrand wird der Stromkreis geschlossen. In **Abbildung 7** sind die Datenpunkte dargestellt, bei denen unter den Betriebsbedingungen der Stromkreis geschlossen wurde und es zum Überlaufen der Flüssigkeit kam.



**Abbildung 7:** Abhängigkeit Füllvolumen, Gefäßhöhe und Schüttelfrequenz. Die Datenpunkte repräsentieren die Betriebsbedingungen, bei denen es zum Überlaufen der Flüssigkeit gekommen ist. Schütteldurchmesser: 25 mm.

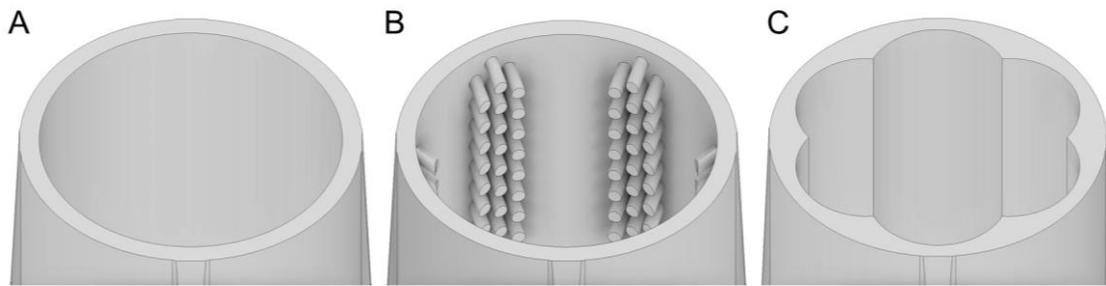
Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen Füllvolumen, Schüttelfrequenz und Gefäßhöhe. Die Ergebnisse belegen den erwarteten zunehmenden Trend der möglichen maximalen Schüttelfrequenz bei steigender Gefäßhöhe. Bei einem Füllvolumen von 5 mL kam es bei keinen der getesteten Schüttelfrequenzen und Gefäßhöhen zum Überlaufen der Flüssigkeit. 10 mL können bei Schüttelfrequenzen von 360 rpm und 400 rpm nur in den beiden höchsten getesteten Gefäßhöhen von 60 mm und 65 mm eingesetzt werden. Ab einem Füllvolumen von 15 mL führt die Zentrifugalkraft auch bei einer maximale Schüttelfrequenz von 400 rpm bei den höchsten Gefäßen dazu, dass die Flüssigkeit an den obersten Gefäßrand gelangt oder sogar übertritt.

Basierend auf den Ergebnissen wurde eine Gefäßhöhe von 65 mm für den ersten Prototypen gewählt. Bei einem Innendurchmesser von 32 mm ergibt sich somit ein Gesamtvolumen des Gefäßes von etwa 50 mL (49,1 mL). Geschüttelte Systeme werden häufig mit einem Füllvolumen von 20 % bzw. 25 % des Gesamtvolumens betrieben. Bei einem Gesamtvolumen von 50 mL entspricht dies einem Füllvolumen von 10 mL bzw. 12,5 mL. Somit bietet das 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß eine sehr gute Ergänzung zu den gängigen geschüttelten Systemen MTP und SK. Es können deutlich geringere Volumen eingesetzt werden als im SK, dennoch bietet das eingesetzte Volumen die Möglichkeit Proben zur Offline-Analytik zu entnehmen, ohne das Gesamtvolumen zu stark zu reduzieren.

## 2.1.2 Einfluss der Geometrie auf den Sauerstoffübergangskoeffizienten

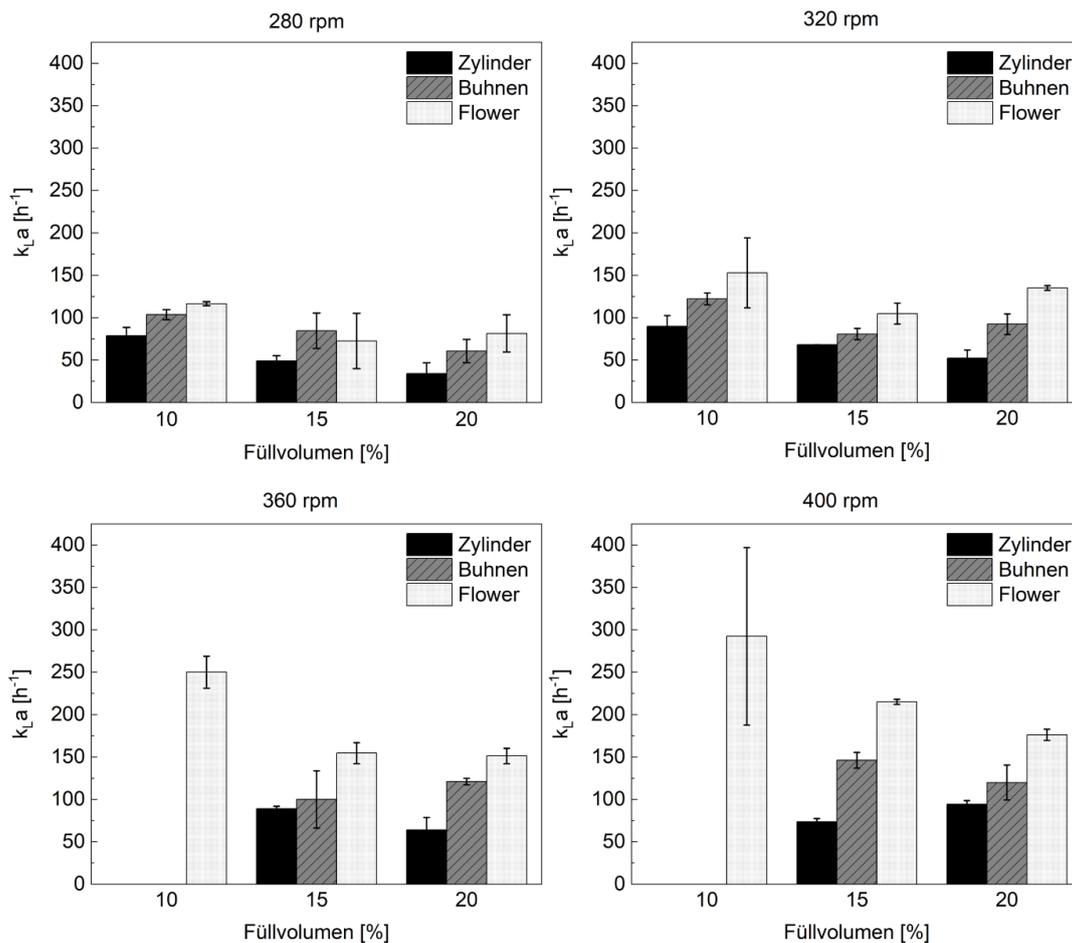
Bei aeroben mikrobiologischen Prozessen ist der Sauerstoffeintrag in die Kulturbrühe von großer Bedeutung, um die Sauerstoffverfügbarkeit für bestimmte Mikroorganismen zu gewährleisten und z.B. hohe Wachstumsraten zu erzielen. Insbesondere bei geschüttelten Systemen sollte der Sauerstoffeintrag hinreichend charakterisiert werden, da der Sauerstofftransport ausschließlich über Diffusion zwischen der Gasphase im Kopfraum und einer zusammenhängenden Flüssigkeitsoberfläche stattfindet [21]. Die Änderung der gelösten Sauerstoffkonzentration wird als OTR dargestellt, und gibt somit die Menge an Sauerstoff an, die pro Zeiteinheit von der Gas- in die Flüssigphase übergeht und ist abhängig von dem volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_{L,a}$ ). Abhängig ist der  $k_{L,a}$  im Wesentlichen von der geometrischen Auslegung und den Materialeigenschaften des Reaktionsgefäßes, den Betriebsbedingungen (Füllvolumen, Schüttelfrequenz) und den physikochemischen Eigenschaften des Mediums [23].

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung in blasenfreien Systemen zu ermöglichen, ist eine möglichst große Grenzfläche erforderlich. Häufig werden geringe Füllvolumen und hohe Schüttelfrequenzen eingesetzt, um hohe OTRs zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit ist die Integration von Schikanen bzw. eine Variation der Gefäßgeometrie. Dabei zerschlägt die zusammenhängende Flüssigkeit, sodass viele kleine Blasen mit einem großen Oberflächen-Volumenverhältnis entstehen. Jedoch führt die Integration von Schikanen dazu, dass Prozesse nicht genau reproduzierbar sind [22]. Der 3D-Druck ermöglicht eine einfache Realisierung des Kultivierungsgefäßes mit verschiedenen Geometrien (siehe **Abbildung 8**), welche hinsichtlich ihres Sauerstoffeintrages untersucht und miteinander verglichen werden sollen. Neben einem zylindrischen Gefäß (siehe **Abbildung 8 A**), wurde ebenso die von Funke *et al.* etablierte Flower-Form (siehe **Abbildung 8 C**) übernommen [28]. Bei der systematischen Untersuchung des Einflusses der Well-Geometrie einer MTP auf die maximale Sauerstofftransferkapazität wurde die sechsblättrige Blütenform als die optimale Geometrie bei maximaler OTR bei stabiler Flüssigkeitshöhe bei beliebigen Füllvolumen und Schüttelfrequenzen identifiziert. Eine dritte Variante wurde designt (siehe **Abbildung 8 B**), die mit herkömmlichen Spritzgussverfahren nicht hergestellt werden könnte. Bei dieser Variante ragen kleine Zylinder, welche um  $45^\circ$  nach unten geneigt sind, aus der Gefäßwand heraus und sollen somit als Schikanen fungieren. Diese Art an Schikanen wird im weiteren Verlauf als Bühnen bezeichnet.



**Abbildung 8:** CAD-Zeichnungen der verschiedenen Well-Geometrien. **A:** Zylinder, **B:** Buhnen, **C:** Flower-Form.

Ein gängiges Verfahren zum Vergleich des Sauerstoffeintrages in verschiedene Systeme ist die Bestimmung des  $k_{La}$  Werts. Dieser wurde in den jeweiligen Gefäßen mittels dynamischer Sulfit-Methode in Abhängigkeit der Schüttelfrequenz und des Füllvolumens bestimmt (Methode siehe **Kapitel 4.3.1.3**). Zur Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration wurden chemooptische Sauerstoffsensoren in Form von Spots in die jeweiligen Gefäße integriert, welche mit dem SFR vario ausgelesen werden. Die Verwendung der Spots bietet den Vorteil, dass sie im Vergleich zu Clark-Elektroden das Strömungsverhalten nicht beeinflussen und selbst keinen Sauerstoff verbrauchen. Dabei wurden jeweils Füllvolumen von 10 %, 15 % und 20 % des Gesamtvolumens bei Schüttelfrequenzen von 280 rpm, 320 rpm, 360 rpm und 400 rpm getestet. Der Einfluss des Füllvolumens und der Schüttelfrequenz auf den  $k_{La}$ -Wert sind in **Abbildung 9** dargestellt. Unabhängig von der Gefäßgeometrie werden höhere  $k_{La}$ -Werte bei höheren Schüttelfrequenzen und geringen Füllvolumen erreicht. Dies hängt mit der Vergrößerung der volumenspezifischen Phasengrenzfläche zusammen. Ein Füllvolumen von 10 % führte bei dem zylindrischen Gefäß und dem Gefäß mit den Buhnen zu keinen akzeptablen Messdaten, sodass die Ermittlung des  $k_{La}$ -Werts nicht möglich war. Grund dafür ist das Aufsteigen der Flüssigkeit an der Gefäßwand aufgrund der Zentrifugalkraft, wodurch keine durchgängige Sensorbedeckung gewährleistet ist. Dies hat zur Folge, dass die Gelöstsauerstoffkonzentration in der Mischphase bestimmt wurde.



**Abbildung 9:** Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient ( $k_{L,a}$ ) ermittelt durch die Sulfit-Methode bei steigender Schüttelfrequenz und unterschiedlichen Füllvolumen in drei verschiedenen 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßen. Schütteldurchmesser: 25 mm,  $n=3$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Gefäßgeometrie ausschlaggebend für die Maximierung des  $k_{L,a}$ -Wertes ist. Die Einführung von Schikanen führt im Vergleich zur runden Geometrie ohne Schikanen zu einem höheren volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten. Durch die Integration der Bühnen konnte der  $k_{L,a}$ -Wert um durchschnittlich 54 % gesteigert werden. Der höchste ermittelte  $k_{L,a}$ -Wert von  $146,25 \pm 9,22 \text{ h}^{-1}$  des Bühnengefäßes wurde mit einem Füllvolumen von 15 % bei einer Schüttelfrequenz von 400 rpm erreicht. Die Flower-Geometrie erreicht sogar einen maximalen  $k_{L,a}$ -Wert von  $292,43 \pm 104,64 \text{ h}^{-1}$  und zeigt somit den höchsten Sauerstoffeintrag. Aufgrund der turbulenteren Strömungsverhältnisse in dem Flower-Gefäß ist eine durchgängige Sensorbedeckung während der Messungen gewährleistet, allerdings sind diese mit hohen Standardabweichungen belastet. Im Vergleich zum Gefäß ohne Schikanen konnten die  $k_{L,a}$ -Werte für die Flower-Geometrie im Durchschnitt um 106 % gesteigert werden.

### 2.1.3 Untersuchung der Biokompatibilität des 3D-Druckmaterials AR-M2

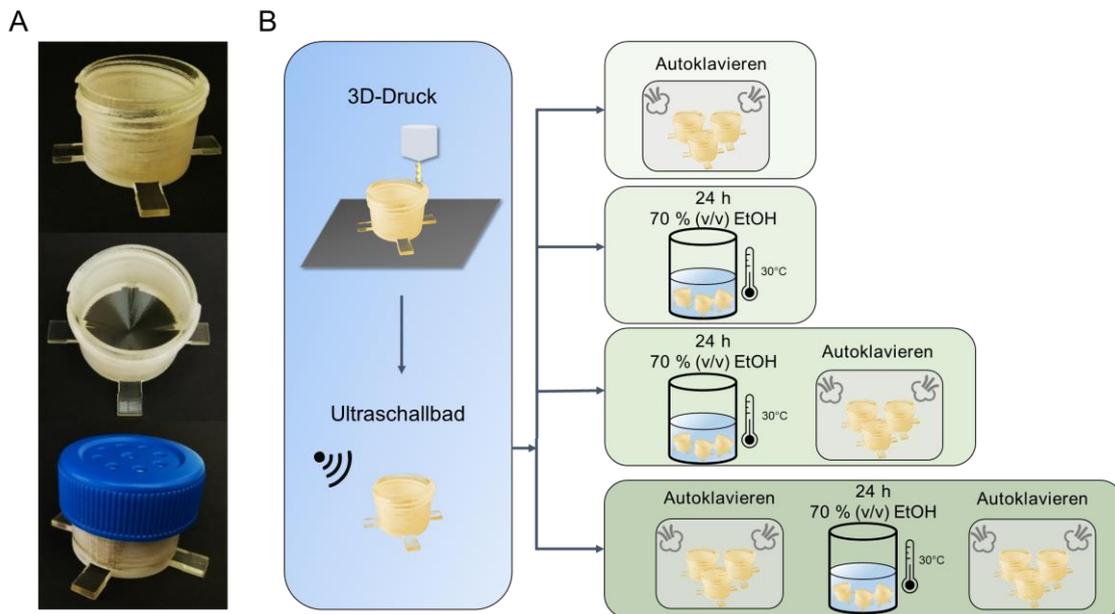
Für die Verwendung von 3D-gedruckten Systemen in der Zellkultur ist neben der Sterilisierbarkeit, die Biokompatibilität ein weiteres grundlegendes Kriterium. Sie ist eine der größten Herausforderung für den Einsatz in der Zellkultur. Die Verwendung des 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes zur Kultivierung von empfindlichen Zellen wie z.B. CHO-Zellen ist nur bei gegebener Biokompatibilität des Materials für die entsprechende Anwendung möglich.

Nur eine sehr geringe Anzahl an kommerziell erhältlichen 3D-Druckmaterialien wird als biokompatibel nach EN ISO 10993 deklariert [134]. Dazu kommt, dass die Hersteller die genauen Inhaltsstoffe oft nicht bekannt geben [135]. Darüber hinaus zeigte sich, dass selbst Materialien, welche als biokompatibel deklariert sind, in speziellen Anwendungen dennoch zelltoxisch waren [136, 137]. Daher sollten selbst biokompatible Materialien für jede individuelle Anwendung auf die Biokompatibilität hin untersucht werden. Nach EN ISO 10993 wird das zu untersuchende Material für eine definierte Zeit in dem entsprechenden Medium inkubiert, anschließend wird das Material entfernt und das so genannte Extraktionsmedium wird für die Kultivierung der jeweiligen Zellen verwendet. Die Zellen kommen bei diesem Test in keinen direkten Kontakt mit dem 3D-Druckmaterial.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Material handelt es sich um ein festes und transluzentes Polyacrylat namens AR-M2 (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Siller *et al.* überprüften die Biokompatibilität dieses Materials nach EN ISO 10993-12:2021 [138]. Außerdem wurde der Einfluss dieses Material in Hinsicht auf Zellproliferation, Viabilität, Zellmorphologie und Apoptose/Nekrose-Verteilungen von adipogenen, mesenchymalen Stammzellen charakterisiert [139]. Es konnte gezeigt werden, dass weder der indirekte Kontakt über das Extraktionsmedium noch der direkte Materialkontakt sich negativ auf das Zellwachstum auswirken.

Da die Biokompatibilität für jede individuelle Anwendung neu bewertet werden sollte, wurde das Material und mögliche Post-Processing Strategien für die Anwendung mit Säugertierzellen untersucht [136]. Für Kultivierungen der CHO-Zellen wurden die in **Abbildung 10 A** dargestellten 3D-gedruckten Gefäße verwendet. Dadurch kommen die CHO-Zellen in direkten Kontakt mit dem Material. Diese können mit einem kommerziell erhältlichen Verschluss abgedichtet werden. Als mögliche Post-Processing Strategien

wurden verschiedene Kombinationen aus Autoklavieren und Inkubation in Lösemittel gewählt (siehe **Abbildung 10 B**).

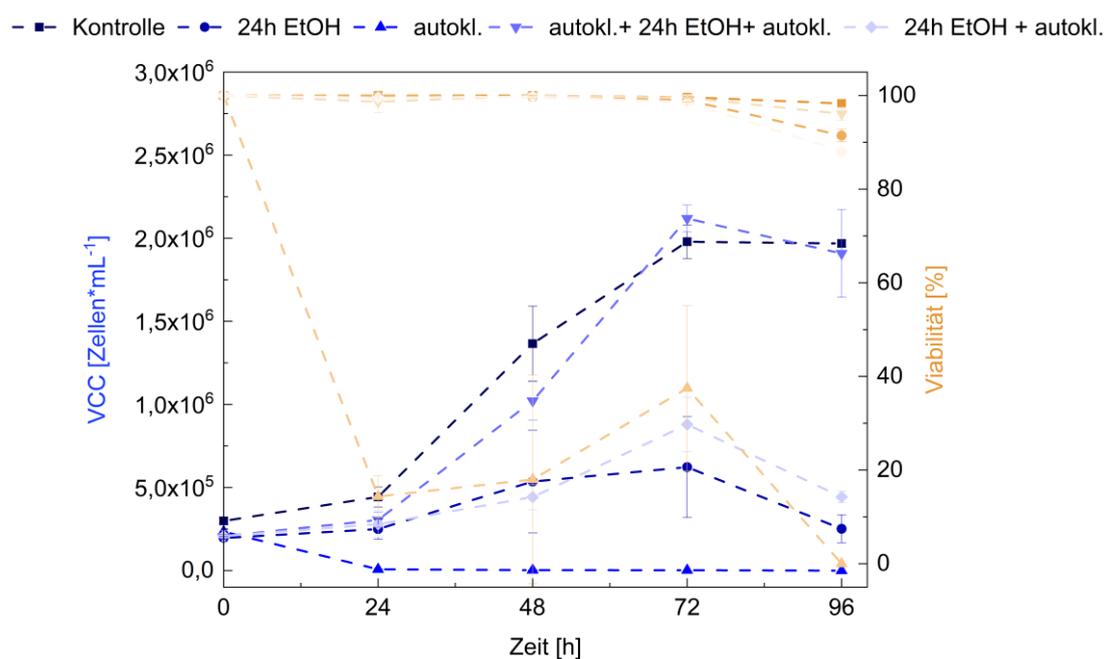


**Abbildung 10:** Verwendete 3D-gedruckte Gefäße für die Biokompatibilitätsuntersuchungen (A) und schematische Darstellung des Druck- und Post-Processing Ablaufs zur Biokompatibilitätstestung (B).

Um die Passagedauer vieler Zelllinien abzudecken, wurden die Kultivierungen über vier Tage durchgeführt, sodass auch später auftretende potenziell toxische Effekte festgestellt werden können.

Für die Biokompatibilitätstestungen wurden CHO-Zellen in den unterschiedlich behandelten 3D-gedruckten Kultivierungssystemen für vier Tage kultiviert. Als Kontrollgefäß wurde ein kommerziell erhältlicher 50 mL TubeSpin®-Bioreaktor verwendet. Täglich wurde eine Probe entnommen und die Zellzahl und Viabilität der Kulturen mit Hilfe des Cedex HiRes Analyzer (Roche, Basel, Schweiz) bestimmt (siehe **Abbildung 11**). Die initiale Zellkonzentration betrug  $3,0 \cdot 10^5$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$ . In den ersten 24 h zeigten alle Kulturen ein vergleichbares Wachstum bis auf die Kulturen aus den ausschließlich autoklavierten Gefäßen. Die Viabilität dieser Kulturen war innerhalb von 24 h auf 18 % gefallen. Die geringe Viabilität spiegelte sich ebenfalls in der Zellzahl wider. Nach 48 h zeigten nur noch die Kulturen in den Gefäßen, welche autoklaviert, 24 h in Ethanol (70 % v/v) (EtOH) inkubiert und nochmals autoklaviert wurden, eine vergleichbare Zellzahl zu den Kontrollkulturen. Die Gefäße, die für 24 h in EtOH inkubiert wurden, führten zu einem deutlich verlangsamten

Wachstum, zeigen jedoch weiterhin eine hohe Viabilität von 99,7 %. Gleiches Ergebnis zeigen die Kulturen, die erst 24 h in EtOH inkubiert und anschließend autoklaviert wurden. Nach 72 h haben diese Kulturen ihre maximale Zellzahl von  $8,80 \pm 1,63 \cdot 10^5$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$  erreicht. Nach 72 h erreichten die Kulturen in der 3-Schrittbehandlung sowie in den Kontrollkulturen die höchsten Zellzahlen. Nach 96 h nahmen die Zellzahl sowie die Viabilität in allen Kulturen aufgrund der Passagedauer und die damit einhergehenden Nährstofflimitierungen ab.



**Abbildung 11:** Biokompatibilitätsuntersuchung des Materials AR-M2. Wachstumskurven und Viabilität von CHO-Zellkulturen in unterschiedlich nachbearbeiteten Gefäßen, n=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein geeignetes Post-Processing von 3D-gedruckten Systemen für den Einsatz in der Suspensionszellkultur von Säugetierzellen unabdinglich ist. Eine einfache Sterilisation mit Hitze (121°C) führt dazu, dass die Zellen innerhalb kürzester Zeit sterben. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die hohe Temperatur dazu führt, dass toxische Bestandteile aus dem Material gelöst werden. Wird das Bauteil jedoch nach dem Autoklavieren zusätzlich in 70 % EtOH inkubiert, ist kein negativer Effekt mehr zu verzeichnen. In weiteren Studien sollten alternative Sterilisationsverfahren, wie z.B. Gammasterilisation untersucht werden.

#### 2.1.4 Zusammenfassung und Fazit

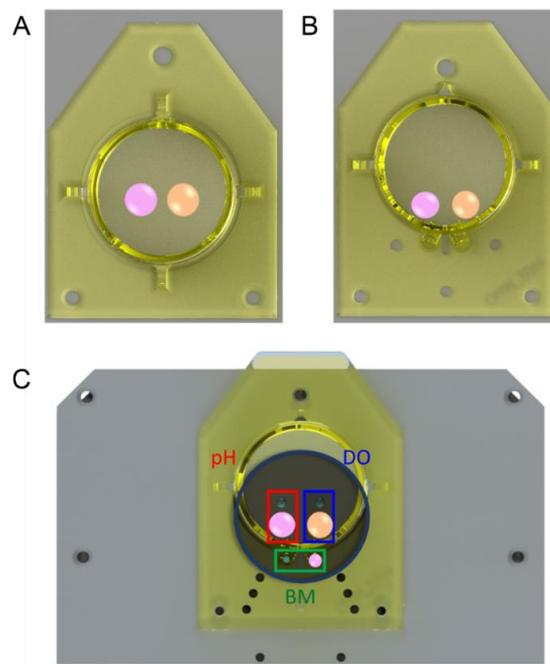
Die Ergebnisse und gewonnenen Erkenntnisse dieser Kapitel können genutzt werden, um ein 3D-gedrucktes Kultivierungsgefäß mit einem Gesamtvolumen von etwa 50 mL zu

entwickeln. Dieses kann bei einer Schüttelfrequenz von 400 rpm und einem Schütteldurchmesser von 25 mm mit einem Arbeitsvolumen bis 25 % betrieben werden, ohne dass es zum Übertreten der Flüssigkeit kommt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die additive Fertigung eine schnelle Anpassung der Gefäßgeometrie ermöglicht. Damit bietet sich die Möglichkeit den volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten zu erhöhen und damit eine bessere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Hier konnte durch die Verwendung der Flower-Geometrie der  $k_{La}$ -Wert um bis zu 106 % im Vergleich zum Referenzgefäß gesteigert werden. Im Rahmen der Charakterisierungsversuche wurde außerdem die Biokompatibilität des Materials AR-M2 für die Verwendung mit CHO K1-Zellen durch ein geeignetes Post-Processing bestehend aus einer Kombination aus Autoklavieren und Inkubation in 70 % EtOH (v/v) sichergestellt. Außerdem zeigen die Untersuchungen, dass das hier verwendete 3D-Druckmaterial AR-M2 gegenüber den Sterilisationsverfahren Heißdampfsterilisation und Inkubation in 70 % EtOH (v/v) beständig ist, wodurch ein weiterer wichtiger Parameter für die Anwendung des 3D-gedruckten Gefäßes in Kultivierungsvorhaben erfüllt ist.

## 2.2 Optisch modifiziertes Well

### 2.2.1 Entwicklung und Konzept

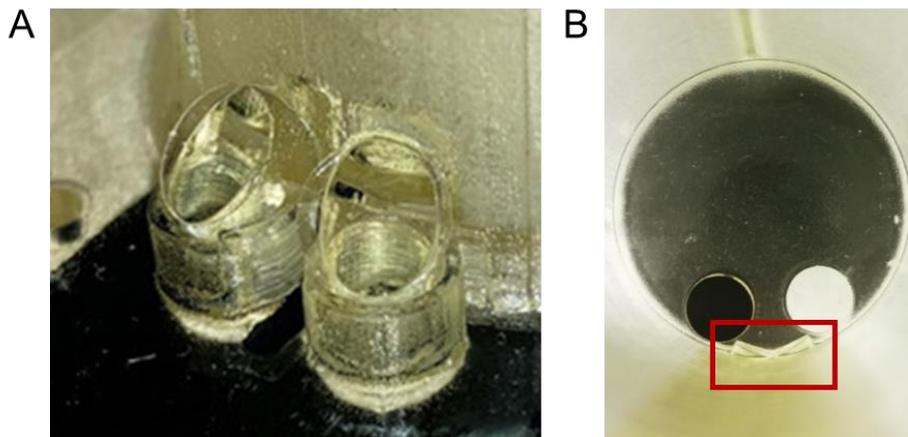
Während der Untersuchungen zum  $k_L a$ -Wert mussten einige konstruktive Herausforderungen überwunden werden. Geringe Volumina und/oder hohe Schüttelfrequenzen führten beim derzeitigen verwendeten Gefäß, im Folgenden Status quo (SQ) genannt, dazu, dass die Sauerstoffspots nicht vollständig und durchgängig mit der Flüssigkeit bedeckt waren, wodurch eine robuste Sauerstoffmessung nicht möglich war. Eine effiziente Lösung hierfür konnte gefunden werden indem die Sensorspots maximal nach außen des Gefäßbodens verlegt wurden, um eine durchgängige Bedeckung zu gewährleisten (vgl. **Abbildung 12 A, B**). Dies hatte allerdings zur Konsequenz, dass der Boden des Wells nicht mehr passend mit der Optik des Sensors (SFR vario) abgeschlossen hat und die Optik für die streulichtbasierte Biomassemessung nicht mehr unterhalb des Gefäßbodens lag (siehe **Abbildung 12 C**). Da bei der derzeitigen Messmethode das Licht senkrecht von unten durch den Boden des Kultivierungsgefäßes tritt, wäre somit eine Biomassemessung nicht mehr möglich [94].



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des Status Quos (SQ) (A) und des optisch modifiziertem Wells (OMW) (B) inklusiver Sensorpositionen für pH- und Sauerstoffmessungen. (C): Positionierung des OMWs auf dem SFR vario.

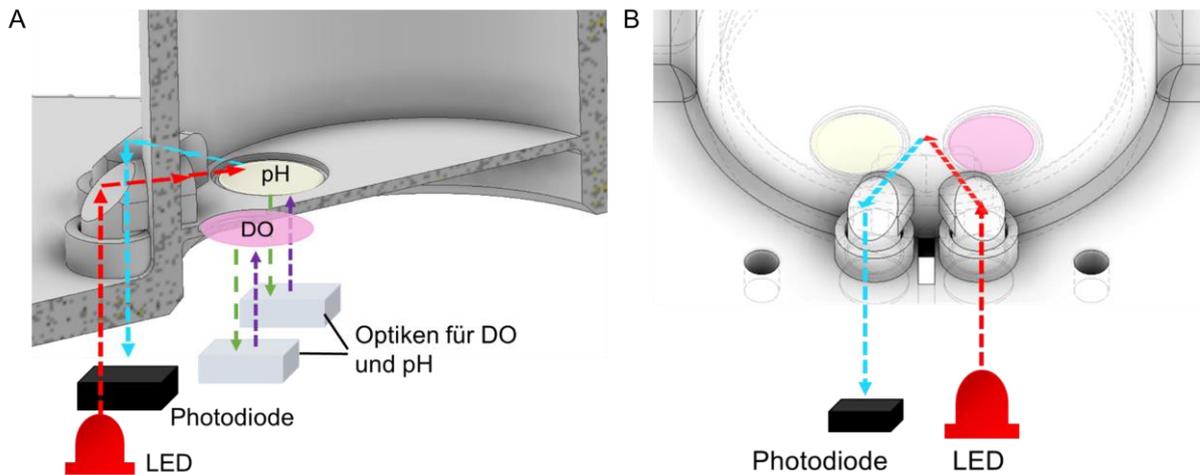
Um jedoch weiterhin sowohl pH, DO als auch Biomasse mit Hilfe des SFR varios aufzeichnen zu können, wurde das Gefäß optisch modifiziert. Dafür wurde das 3D-Druckmaterial funktionalisiert, in dem Prismen gedruckt wurden, die ein Umlenken des Lichts ermöglichen sollen. Eine ausführliche Untersuchung des Druckvorgangs sowie die Charakterisierung 3D-gedruckter Prismen erfolgte im Rahmen der Dissertation von M.Sc. Louis Kuhnke und wurde von Kuhnke *et al.* veröffentlicht [140].

Das optisch modifizierte Well (OMW) kennzeichnet sich durch 3D-gedruckte lichtleitende Prismen, welche von außen durch die Gefäßwand in das Innere führen (siehe **Abbildung 13**). Um die optischen Eigenschaften der Prismen zu verbessern, wurden runde Deckgläschen auf den Prismen verklebt.



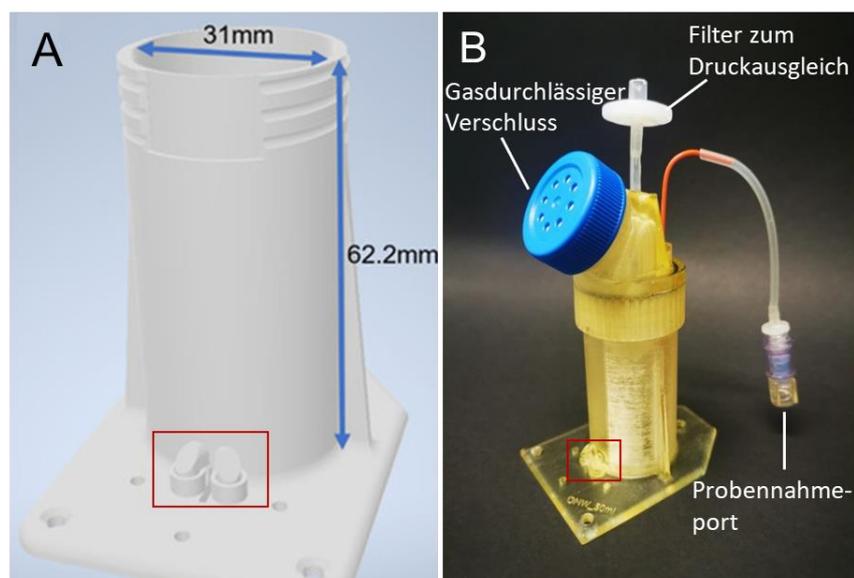
**Abbildung 13:** Foto der 3D-gedruckten Prismen des OMWs. **A:** Nahaufnahme der 3D-gedruckten Prismen an der Gefäßaußenwand mit aufgeklebten Deckgläschen. **B:** Nahaufnahme des Gefäßinneren mit Austrittsflächen der Prismen (roter Kasten) und eingeklebte Sensorspots für Online-Messungen von pH und DO.

**Abbildung 14** zeigt den somit erzeugten Strahlengang. Durch die Integration der Prismen wird das Licht um  $90^\circ$  umgelenkt. Somit findet die Streulichtmessung nicht mehr in der vertikalen, sondern in der horizontalen Ebene statt. Die Austrittsflächen der lichtleitenden Prismen (Anregung und Detektion) sind in einem  $130^\circ$  Winkel zueinander angeordnet.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Strahlengänge im 3D-gedruckten OMW. **A:** Querschnitt des OMWs mit eingezeichneten Strahlengängen der streulichtbasierten Biomassemessung (Exitationspfad in rot, Detektionspfad in blau) und DO und pH Messung (Exitationspfad in lila, Emissionspfad in grün). **B:** Außenansicht auf die 3D-gedruckten Prismen mit eingezeichnetem Strahlengang der Biomassemessung.

**Abbildung 15** zeigt ein CAD-Modell des OMWs (**A**) und ein Foto des vollständig gedruckten OMWs inklusive additiv gefertigten Verschluss (**B**). Mit Hilfe eines Gewindes kann ein kommerziell erhältlicher Deckel mit gaspermeabler Membran verschraubt werden, wodurch der Gasaustausch mit der Umgebung gewährleistet ist. Außerdem wurde ein Probenahmeport integriert, sodass keine Demontage des OMWs zur Probenahme nötig ist. Die drei Löcher in den Ecken des Sockels dienen zur Befestigung des OMWs auf dem SFR vario.



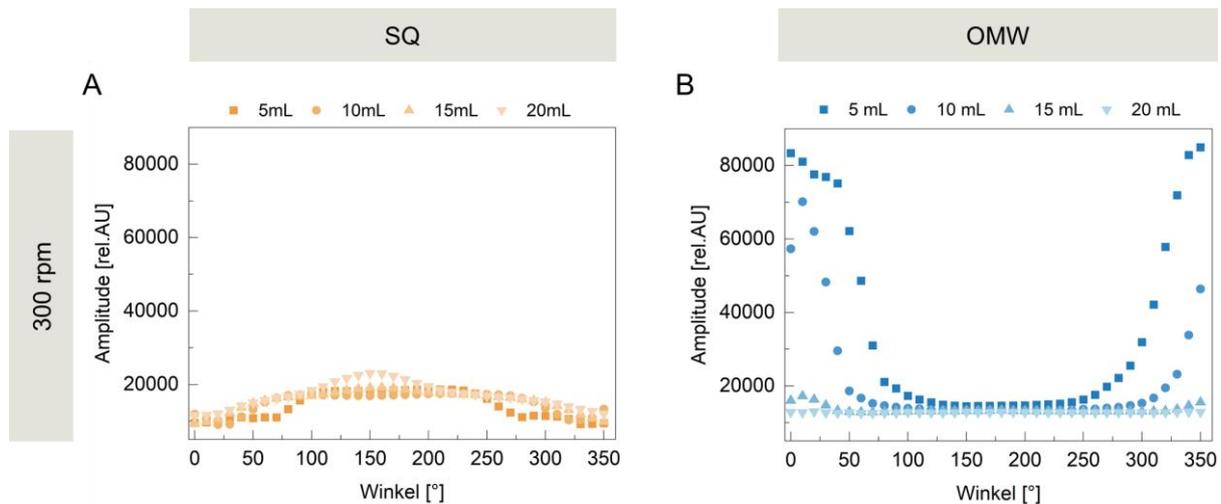
**Abbildung 15:** 3D-gedrucktes OMW. **A:** CAD-Modell. **B:** Foto des OMWs mit Deckel mit einem kommerziellen Verschluss und einem Probenahmeport. Rote Kästen kennzeichnen 3D-gedruckte Prismen.

## 2.2.2 Untersuchungen des Triggerwinkels zur streulichtbasierten Biomassemessung

Zuerst soll das neue Konzept des OMWs zur streulichtbasierten Biomassemessung in horizontaler Ebene mit dem SFR vario charakterisiert und mit der bisherigen Messung im SQ verglichen werden. Wie anfänglich bereits erwähnt, wird die Robustheit der Streulichtmessung vor allem durch die Flüssigkeitsmenge im Detektionsbereich bestimmt. Parameter wie Schüttelfrequenz, Schütteldurchmesser, Gefäßgeometrie und Füllvolumen beeinflussen hierbei die Füllhöhe. Insbesondere wenn zu wenig Flüssigkeit im Detektionsbereich vorliegt, kommt es zu Brechungsvorgängen an der Phasengrenze, wodurch nur noch ein Teil des eingestrahlt Lichtes für die Streulichtmessung zur Verfügung steht. Wie in **Kapitel 1.1.3** beschrieben, kann die Auslösung der Messereignisse durch die richtige Wahl des Winkels verschoben werden, so dass die Flüssigkeitsmenge im Detektionsbereich maximal ist. Zunächst wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Triggerwinkel bei verschiedenen Betriebsparametern auf das Sensorsignal bei der horizontalen Messebene des OMWs auswirken.

Zur Charakterisierung der Streulichtmessung über die 3D-gedruckten Prismen in horizontaler Ebene, wurden sogenannte Winkelscans durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Funktion der PreSens Flask Studio Software, einen geeigneten Triggerwinkel für die Biomassemessung zu finden. Dabei werden alle Winkel im 10° - Schritten getestet. Ein geeigneter Winkel zeichnet sich durch einen möglichst hohen Amplitudenwert aus bei geringer Abweichung des Signals zu den angrenzenden Winkeln. Die Winkelscans wurden mit Proben einer *S. cerevisiae* Zellsuspension mit konstanter Biomassekonzentration sowohl im OMW als auch im SQ durchgeführt. Dabei wurde sowohl das Füllvolumen bei konstanter Schüttelfrequenz variiert (siehe **Abbildung 16**) als auch die Schüttelfrequenz bei konstantem Füllvolumen verändert (siehe **Abbildung 17**).

Durch die Anwendung verschiedener Füllvolumen (5 - 20 mL) bei einer konstanten Schüttelfrequenz von 300 rpm sind bereits deutliche Unterschiede in den erhaltenen Winkelscans des SQs und OMWs erkennbar.



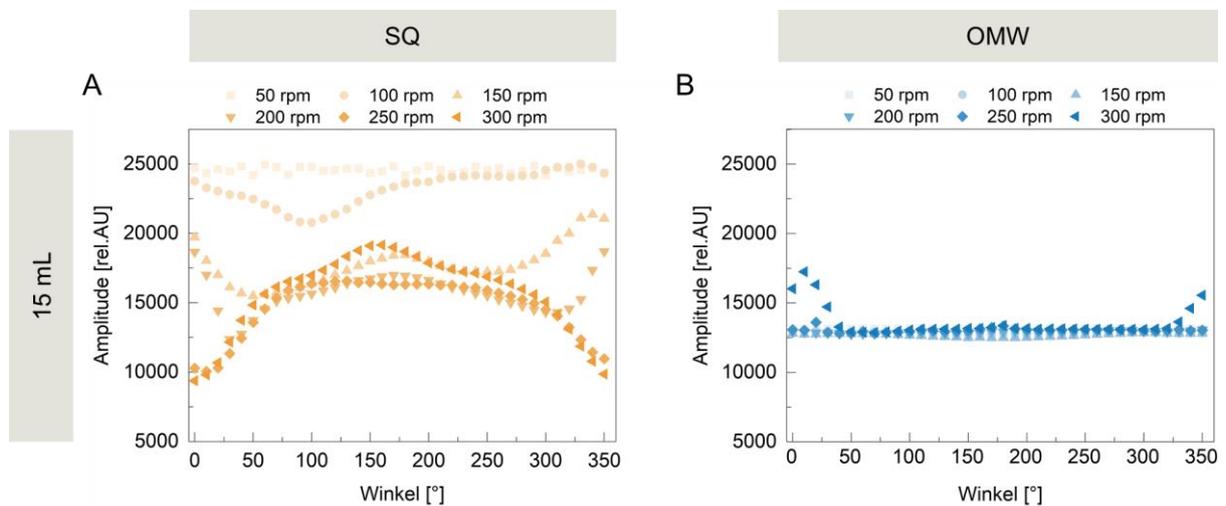
**Abbildung 16:** Gegenüberstellung der Winkelscans von SQ (**A**) und OMW (**B**) mit einer *S. cerevisiae* Zellsuspension bei konstanter Schüttelfrequenz von 300 rpm und unterschiedlichen Füllvolumen.

Die Winkelscans des SQs in **Abbildung 16 A** zeigen, dass die maximalen Amplitudenwerte bei gleichem Füllvolumen um bis zu 50 % voneinander abweichen. Bei einem Füllvolumen von beispielsweise 20 mL reichen die maximalen Amplitudenwerte je nach Winkel von 11.595 rel.AU bis 23.075 rel.AU. Die Winkelscans des OMWs in **Abbildung 16 B** zeigen bei allen Füllvolumen ein deutliches Plateau in einem Winkelbereich von 130 – 240°. Für Volumen ab 10 mL verbreitert sich dieses sogar auf 90 – 280°. Die maximal erreichten Amplitudenwerte nehmen hierbei mit steigendem Volumen ab und unterscheiden sich bei 15 mL und 20 mL je nach Winkel um maximal 3 %. Im Gegensatz dazu zeigen die geringen Füllvolumen von 5 mL und 10 mL einen starken Anstieg des Sensorsignals bei geringen (0 – 80°) und hohen Winkeln (280 – 350°). Eine Messung in der reinen Gasphase (Luft) kann jedoch ausgeschlossen werden, da Messungen ohne Kultur ein Grundsignal von ca. 43.000 rel.AU ergaben. Daher könnten die hohen Signalwerte durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm verursacht werden, der dazu führt, dass das Licht nicht an den in der Flüssigkeit befindlichen Zellen gestreut, sondern an der Phasengrenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft reflektiert wird.

**Abbildung 17 A** zeigt die Winkelscans der Messungen im SQ bei Schüttelfrequenzen zwischen 50 rpm und 300 rpm. Geringere Schüttelfrequenzen resultieren hierbei in durchgängig höheren Amplitudenwerten. Ab 150 rpm nehmen die Amplitudenwerte insgesamt ab. Außerdem führen kleine (0 – 80°) und große (270 – 350°) Winkel dazu, dass

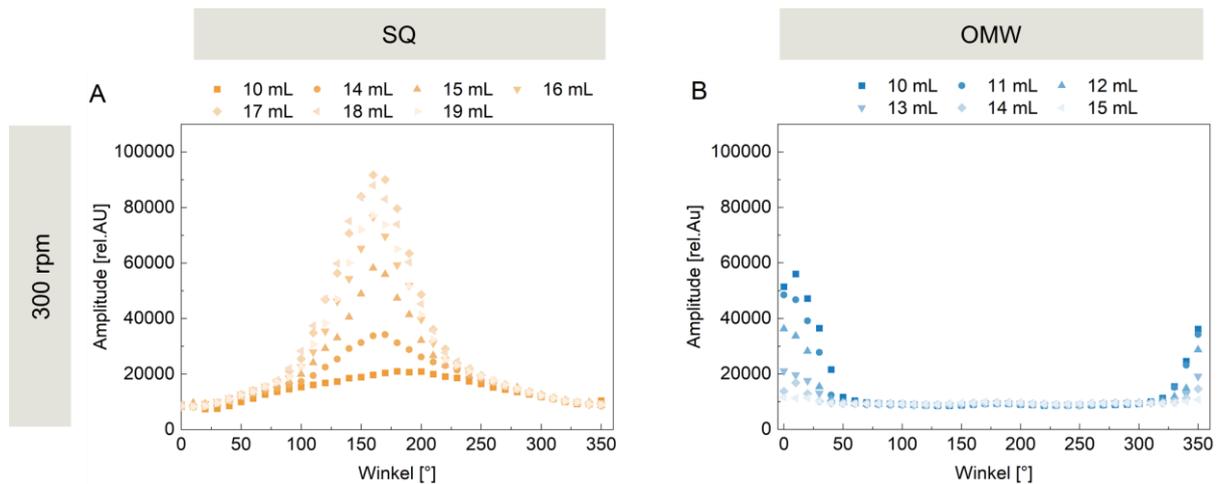
bei höheren Schüttelfrequenzen die Amplitude stark reduziert oder erhöht wird im Vergleich zu dem mittleren Winkelbereich.

Im Gegensatz dazu führt die Variation der Schüttelfrequenz im OMW lediglich zu geringen Veränderungen der maximalen Amplitudenwerte zwischen 12.490 rel.AU und 17.244 rel.AU. Die höchste getestete Schüttelfrequenz von 300 rpm hat zur Folge, dass es bei kleinen und hohen Winkeln zu einem Anstieg des Amplitudenwertes auf maximal 17.244 rel.AU kommt. Bei einem Winkel von 180° variiert die Amplitude lediglich zwischen 12.500 rel.AU und 13.383 rel.AU, was einer Abweichung von 6,6 % entspricht. Beim SQ hingegen liegt der Amplitudenwert bei gleichem Winkel zwischen 16.318 rel.AU und 24.194 rel.AU, was einer Differenz von 32,5 % entspricht.



**Abbildung 17:** Gegenüberstellung der Winkelscans von SQ (A) und OMW (B) mit einer *S. cerevisiae* Zellsuspension bei konstantem Füllvolumen von 15 mL und unterschiedlichen Schüttelfrequenzen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Füllvolumen einen Einfluss auf die Wahl des Triggerwinkels hat und es je nach Messmethode (SQ, OMW) einen kritischen Bereich gibt, bei dem sich der Winkelscan verändert. Daher sollte im nächsten Schritt jeweils der individuelle Störbereich ausfindig gemacht werden. Dafür wurde anstelle einer Zellsuspension deionisiertes Wasser verwendet, um jegliche Störungen, die durch Grenzflächenreflexionen entstehen, zu identifizieren. Dazu wurden Winkelscans bei den jeweiligen kritischen Füllvolumen durchgeführt. Im SQ wurde der Bereich zwischen 14 mL und 20 mL höher aufgelöst und beim OMW zwischen 10 mL und 15 mL. Die resultierenden Winkelscans zur Identifizierung des Störbereiches sind in **Abbildung 18** dargestellt.



**Abbildung 18:** Winkelscans zur Bestimmung des Störbereichs mit deionisiertem Wasser im SQ (A) und OMW (B) bei einer Schüttelfrequenz von 300 rpm.

Die Winkelscans des SQs in **Abbildung 18 A** zeigen, dass in einem Triggerbereich von 100 – 250° der Amplitudenwert stark volumenabhängig ist. Bei einem Füllvolumen von 14 – 17 mL und einem Triggerwinkel von 160° nimmt der maximale Amplitudenwert mit steigendem Füllvolumen kontinuierlich bis zu einem maximalen Wert von 91.672 rel.AU (17 mL) zu. Größere Volumina zeigen jedoch bei gleichem Triggerwinkel geringere Maxima, so dass der Zusammenhang zwischen Füllvolumen und Signalstärke im SQ als nicht-linear angenommen werden kann. Unabhängig des Füllstandes führen kleine (0 – 50°) und große (310 – 350°) Winkel hingegen bei allen getesteten Volumina zu sehr ähnlichen Amplitudenwerten zwischen 9.000 rel.AU und 13.000 rel.AU. Die Messungen mit dem OMW zeigen hingegen keine ausgeprägten Peaks (siehe **Abbildung 18 B**). Bei allen untersuchten Füllvolumina werden in einem Triggerbereich von 70 – 310° konstante Amplitudenwerte von  $9.136 \pm 323,8$  rel.AU erreicht; kleinere bzw. größere Triggerwinkel resultieren in deutlichen höheren Amplitudenwerten. Dabei ist die Zunahme proportional zur Volumenabnahme. Dennoch bietet die Messung in horizontaler Ebene durch die 3D-gedruckten Prismen des OMWs einen deutlich breiteren Triggerbereich im Vergleich zum SQ mit nahezu konstanten Amplitudenwerten bei unterschiedlichen Füllvolumina.

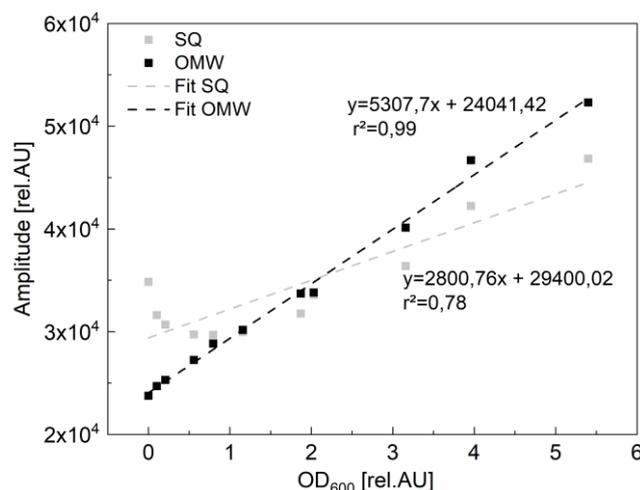
Die hier dargestellten Daten zeigen, dass die Wahl eines geeigneten Winkels beim OMW nahezu unabhängig von der Schüttelfrequenz und dem Füllvolumen ist. Im Falle des SQs muss die Einstellung des Triggerwinkels möglichst genau erfolgen. Insbesondere wenn es zu Volumenveränderungen kommt, ist die Wahl des Winkels entscheidend, da es ansonsten zu deutlichen Erhöhungen im Amplitudenwert kommt, obwohl die Trübung und damit die

Zelldichte unverändert ist. Das OMW bietet hingegen einen breiten Toleranzbereich, innerhalb dessen sich die Amplitudenwerte kaum verändern. Dadurch ergibt sich der Vorteil, dass eine Volumenreduzierung, z.B. durch Probennahme, aber auch Verdunstungseffekte, kaum einen Effekt auf das Amplitudensignal hat. Außerdem stellt dies einen großen Vorteil für den Anwender dar, da ohne große Vorkenntnisse bzw. Voruntersuchungen ein geeigneter Triggerwinkel für eine robuste streulichtbasierte Biomassemessung gewählt werden kann.

Durch die Messung in horizontaler Ebene im OMW konnten zufällige Lichtreflexionen an der Phasengrenzfläche (Gas-Flüssigkeit) deutlich minimiert werden, was vor allem entscheidend für Messungen niedriger optischen Dichten ( $OD_{600} < 1,0$  rel.AU) ist. Somit zeigen die Ergebnisse großes Potenzial für hochauflösende Messungen in der Lag-Phase von mikrobiellen Kulturen oder bei Säugetierzellsuspensionen, wie z.B. CHO-Suspensionskulturen [141].

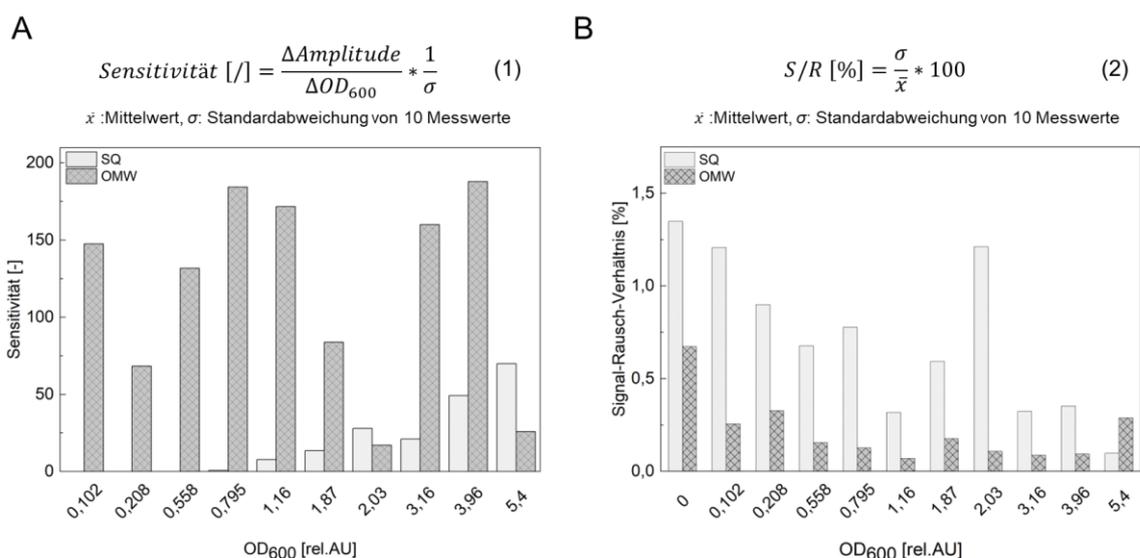
### 2.2.3 Gegenüberstellung der Biomassemessung im SQ und OMW

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Messungen mit dem OMW bereits einen Vorteil bei der Wahl des geeigneten Triggerwinkels gegenüber des SQs bieten, wurden im nächsten Schritt Kalibrationsreihen mit einer sequenziellen Verdünnungsreihe einer stationären *S. cerevisiae* Kultur in beiden Systemen aufgenommen (Methode siehe **Kapitel 4.3.1.4**). Um Einflüsse des verwendeten Mediums auszuschließen, wurden die Verdünnungen mit Saline erstellt. In **Abbildung 19** ist der Zusammenhang zwischen offline gemessener  $OD_{600}$  und Online-Sensoramplitude dargestellt.



**Abbildung 19:** Korrelationen von Amplitude (SFR vario) mit  $OD_{600}$  (Photometer) im optisch modifizierten Well (OMW) und dem Status Quo (SQ) mit einer sequenziellen Verdünnungsreihe einer stationären *S. cerevisiae* Kultur. Volumen: 12,5 mL, Schüttelfrequenz: 300 rpm. Abbildungen nach [140].

Die Kalibrationskurve des SQs zeigt bei niedrigen OD<sub>600</sub> Werten (0 – 1,2 rel.AU) keinen linearen Zusammenhang zwischen offline bestimmter OD<sub>600</sub> und online gemessener Amplitude. Obwohl die Verdünnungsreihe in aufsteigender Reihenfolge verläuft, nehmen die Amplitudenwerte des Biomassesensors im Bereich von 0 – 1,16 rel.AU ab. Das Messprinzip des SQs hat somit eine untere Detektionsgrenze von einer OD<sub>600</sub> = 1,2 rel.AU, was nahe an der unteren Grenze des vom Hersteller angegebenen Messbereichs (OD<sub>600</sub> 1 – 80 rel.AU) des SFR variuos liegt [99]. Mit dem OMW ergibt sich eine Kalibrationskurve, die über den gesamten Messbereich eine lineare Korrelation des Sensorsignals und der offline bestimmten OD<sub>600</sub> zeigt, was sich in dem Regressionskoeffizienten von 0,99 widerspiegelt. Zur weiteren Charakterisierung wurde in beiden Systemen die Sensitivität nach **Formel 1** sowie das Signal-Rausch-Verhältnis (S/R) nach **Formel 2** berechnet. Die Sensitivität ist ein dimensionsloser Wert, welcher angibt, wie stark sich der Wert der Ausgangsvariablen (Amplitude) im Verhältnis zu einer Änderung der Eingangsvariablen (OD<sub>600</sub>) verändert.



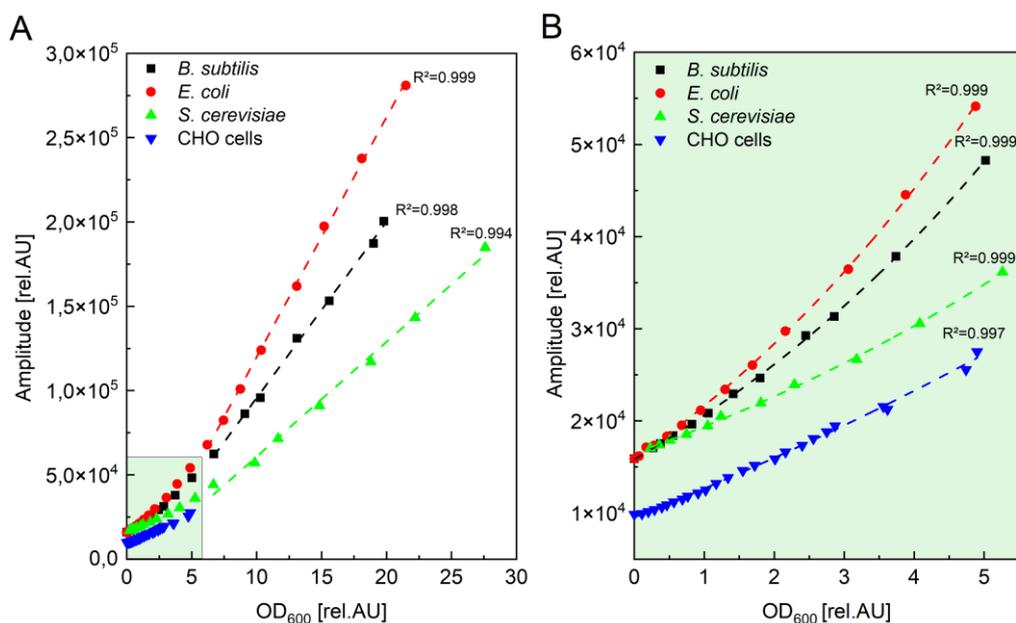
**Abbildung 20:** Vergleich von Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis der Biomassemessung im SQ und OMW **A:** Sensitivität berechnet nach Formel (1). **B:** Signal-Rausch-Verhältnis berechnet nach Formel (2) Abbildungen nach [140].

**Abbildung 20 A** zeigt, dass die Sensitivität des OMWs mindestens dreimal höher ist als im SQ. In **Abbildung 20 B** ist das S/R beider Systeme dargestellt. Sowohl beim OMW als auch beim SQ ist das S/R im unteren OD-Bereich höher und nimmt mit zunehmender OD ab. Jedoch zeigen die Messungen mit dem OMW ein deutlich geringeres S/R als die des SQs. Die Messungen mit dem OMW führten z.B. bei einer offline gemessenen OD<sub>600</sub> von 0,208 rel.AU

zu einer S/R Reduktion um 63,951 %. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Messung in horizontaler Ebene das S/R erheblich reduziert werden konnte, da durch die veränderte Lichtführung weniger zufällige Reflektionen an der Grenzfläche auftreten als bei Messungen mit dem SQ.

## 2.2.4 Charakterisierung des Sensorsignals anhand verschiedener Modellorganismen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das hier entwickelte 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß mit integrierter 3D-gedruckter Optik die Biomassebestimmung mit dem SFR vario bei dynamischen Messungen mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae* erheblich verbessern konnte, wurden zusätzliche Kalibrationsreihen aufgenommen. Dafür wurden weitere für die Biotechnologie relevanten Modellorganismen gewählt: das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) und die eukaryotischen Zellen *S. cerevisiae* und CHO-Zellen. Dafür wurden aus stationären Kulturen sequenzielle Verdünnungsreihen mit Saline bzw. PBS-Puffer hergestellt und anschließend mit dem SFR vario und einem Photometer vermessen (Methode siehe **Kapitel 4.3.1.4**). In **Abbildung 21** wurden die offline gemessenen OD<sub>600</sub>-Werte gegen die online bestimmten Amplitudenwerte aufgetragen.



**Abbildung 21:** Korrelation von Amplitude (SFR vario) mit OD<sub>600</sub> (Photometer) unterschiedlicher Organismen. Vergleich der Streulichtintensitäten mit OD<sub>600</sub>-Werten für *B. subtilis*, *E. coli*, *S. cerevisiae* und CHO-Zellen mit Daten, die aus Verdünnungsreihen von Zellsuspensionen in der stationären Phase gewonnen wurden. **A:** Vollständig untersuchter OD<sub>600</sub>-Bereich von 0 – 27 rel.AU. **B:** Vergrößerte Darstellung des OD<sub>600</sub>-Bereichs von 0 – 5,5 rel.AU.

Die Kalibrationskurven der Mikroorganismen werden in zwei Abschnitte unterteilt. Im unteren  $OD_{600}$ -Bereich (**Abbildung 21 B**) kann der Zusammenhang zwischen online gemessenem Streulichtsignal und offline bestimmter  $OD_{600}$  durch einen exponentiellen Fit beschrieben werden. Das Bestimmtheitsmaß weist in allen drei Fällen einen Wert von 0,99 auf und bestätigt somit einen exponentiellen Zusammenhang von  $OD_{600}$  und der Online-Amplitude. Die mit dem SFR vario gemessene Amplitude variiert für alle drei Organismen nur geringfügig zwischen  $OD_{600}$  - Werten von 0,2 rel.AU und 1 rel.AU. Mit zunehmender  $OD_{600}$  zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Amplitudenwerten zwischen den Organismen. Bei gleichen offline bestimmten  $OD_{600}$ -Werten zeigt *E. coli* die höchsten Amplitudenwerte, gefolgt von *B. subtilis* und *S. cerevisiae*. Dies kann auf den Unterschied in der Zellmorphologie der Organismen zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur runden Zellform von *S. cerevisiae* weisen die Bakterien *E. coli* und *B. subtilis* eine stäbchenförmige Morphologie auf, wodurch das Licht unterschiedlich gestreut wird [142]. Für  $OD_{600}$ -Werte über 5 rel.AU können die Korrelationen durch lineare Regressionen beschrieben werden (**Abbildung 21 A**). Mit einem Bestimmtheitsmaß von jeweils 0,99 bei allen drei Organismen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen  $OD_{600}$  und Online-Amplitude. Bei höheren  $OD_{600}$ -Werten (18,1 – 19,0 rel. AU) ist die Sensoramplitude von *E. coli* 1,2 – mal höher als die von *B. subtilis* und zweimal höher als die von *S. cerevisiae*, wodurch die unterschiedlichen Lichtstreuungseigenschaften noch einmal verdeutlicht werden. Aufgrund ihrer geringen Lichtstreuungseigenschaften und niedrigen Zellkonzentrationen war es bisher schwierig, robuste Wachstumskurven von CHO-Zellen mit dem SFR vario aufzuzeichnen, da keine sinnvolle Korrelation zwischen Sensorsignal und Zellkonzentration möglich war [28, 30]. **Abbildung 21** zeigt hier eine deutliche lineare Korrelation von offline ermittelter  $OD_{600}$  und Amplitude bei CHO-Zellen über den gesamten untersuchten Bereich von 0 – 5 rel.AU mit einem Regressionskoeffizienten von 0,997.

Die hier erstellten Kalibrationen dienen zur Charakterisierung und Beurteilung des neuen Messprinzips des OMWs. Die einzelnen Messpunkte der jeweiligen Kalibrationen wurden mit Kulturen aus der stationären Phase mit gleichbleibender Zellmorphologie aufgenommen. Da sich diese jedoch im Laufe einer Kultivierung verändern kann und somit das Streulichtverhalten variiert [143], wird für eine erhöhte Vorhersagegenauigkeit in zukünftigen Anwendungen das dynamische Kalibrationsverfahren empfohlen. Dabei wird die Kalibration anhand einer wachsenden Kultur aufgenommen.

### 2.2.5 Zusammenfassung und Fazit

Die Untersuchungen des optisch modifizierten Wells ergaben, dass durch die Integration von Prismen in die Gefäßwand und die damit veränderte Lichtführung zu einer verbesserten Streulichtmessung zum Biomassemonitoring in einer turbulenten, oszillierenden Strömung (geschütteltes System) führen. Im Vergleich zur bisherigen Messung in vertikaler Ebene (SQ) ergibt sich ein größerer Toleranzbereich in Hinblick auf die Wahl des Triggerwinkels. Außerdem konnte durch die optische Funktionalisierung die Sensitivität verbessert, die Empfindlichkeit gegenüber Störungen gemindert und eine Erhöhung des Freiheitsgrads in Bezug auf den Messort erzielt werden. Darüber hinaus konnte die Korrelation von online gemessener Amplitude mit der  $OD_{600}$  vor allem im niedrigen OD-Bereich deutlich verbessert werden, wodurch die erstmalige Anwendung des SFR varios für Säugertierzellen ermöglicht werden konnte.

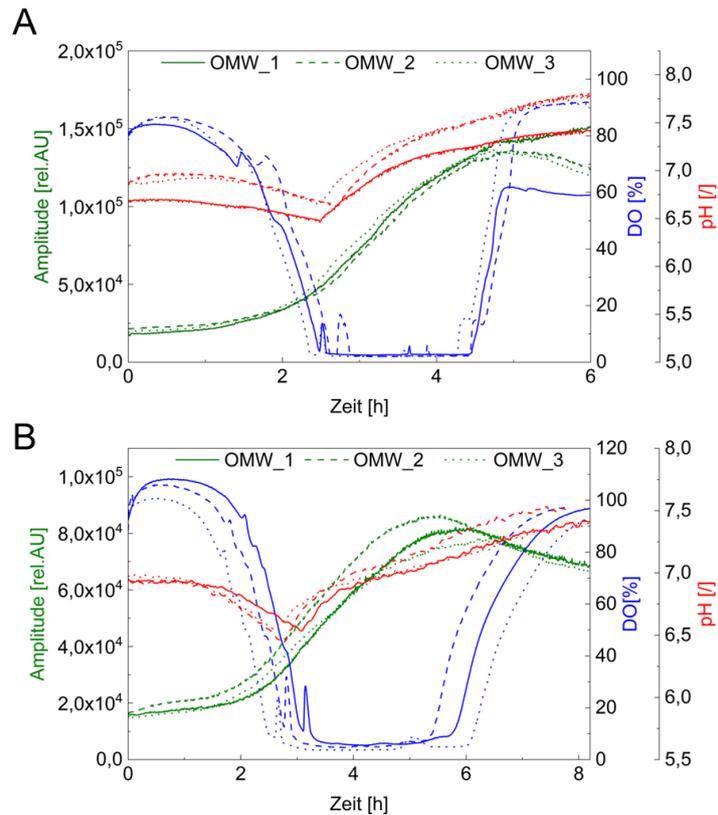
## 2.4 Proof of concept Kultivierungen im 3D-gedruckten OMW

Nachdem eine Korrelation des Sensorsignals und offline bestimmter  $OD_{600}$  nachgewiesen werden konnte, wurden proof of concept Kultivierungen der verschiedenen Organismen im OMW mit Online-Überwachung der kritischen Prozessparameter DO, pH und Biomasse durchgeführt, um die Eignung des OMWs für Kultivierungsvorhaben zu untersuchen. Außerdem wurde untersucht, inwiefern sich die 3D-gedruckten Optiken zur Biomasseüberwachung auf andere Gefäßgeometrien übertragen lassen.

### 2.4.1 Kultivierungen von Mikroorganismen im OMW

Für die proof of concept Kultivierungen wurden biotechnologisch relevante Organismen verwendet. Als gram-negativer Modellorganismus wurde *E. coli* BL21 gewählt. *E. coli* spielt eine wesentliche Rolle in industriellen Anwendungen, wie z.B. bei der Produktion von rekombinanten Protein und Biopharmazeutika [144]. *B. subtilis* wurde in dieser Arbeit als gram-positiver Modellorganismus verwendet. Es wächst ähnlich schnell wie *E. coli*, hat jedoch den Vorteil, dass es nur eine einfache Zellmembran besitzt, was die Sekretion erleichtert und somit den Downstream Prozess vereinfacht und kostengünstiger macht, wodurch es eine große Rolle als Produktionsorganismus von medizinischen Proteinen und industriellen Enzymen spielt [145]. Als dritten mikrobiellen, aber eukaryotischen Organismus wurde die Bäckerhefe *S. cerevisiae* gewählt. Sie zählt zu den am besten untersuchten Eukaryoten und ist einer der am meisten genutzten Produktionsorganismen in der Biotechnologie [146]. Außerdem weist *S. cerevisiae* einen ausgeprägten Glucosestoffwechsel auf. Selbst unter aeroben Bedingungen wird die Gärung der Atmung bevorzugt [147]. Ein weiterer Vorteil von Hefe im industriellen Umfeld ist die große Toleranz gegenüber hohen Glucosekonzentrationen.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Kultivierungsverläufe wurden mit jedem Organismus jeweils drei Kultivierungen in identischen 3D-gedruckten OMW durchgeführt (Methode siehe **Kapitel 4.3.2.3**). **Abbildung 22** zeigt die online aufgezeichneten Verläufe von Biomasse, DO und pH der drei Organismen.

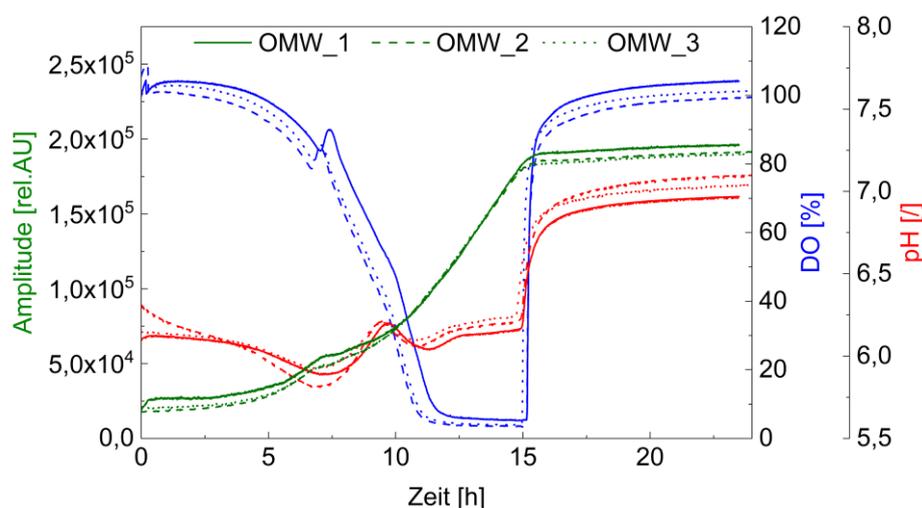


**Abbildung 22:** Online-Überwachung von pH, DO und Biomasse von mikrobiellen Kulturen im OMW mit Hilfe des SFR varios. **A:** *E. coli* BL21 Medium: LB, Temperatur: 37°C. **B:** *B. subtilis* Medium: LB, Temperatur: 37°C. Schütteldurchmesser: 25 mm, Schüttelfrequenz: 345 rpm, Triggerwinkel: 180°, n=3.

Die Online-Biomassesignale der *E. coli*- (siehe **Abbildung 22 A**) und *B. subtilis* – Kultivierung (**Abbildung 22 B**) zeigen erwartungsgemäß einen vergleichbaren Wachstumsverlauf. Dieser lässt sich sowohl für *E. coli* als auch für *B. subtilis* in die charakteristischen Wachstumsphasen, lag-, exponentielle-, stationäre- und Absterbe-Phase unterteilen. Die Reproduzierbarkeit spiegelt sich außerdem in den anhand des Biomassesignals berechneten maximalen Wachstumsraten ( $\mu_{\max}$ ) wider. Die *E. coli* Kulturen erreichen maximale Wachstumsraten zwischen  $0,79 \text{ h}^{-1}$  und  $0,81 \text{ h}^{-1}$ . Die berechneten Wachstumsraten von *B. subtilis* liegen bei  $0,58 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ . Neben dem Biomassesignal zeigt sich ebenfalls eine Reproduzierbarkeit bei den online gemessenen DO- und pH-Signalen.

**Abbildung 23** stellt die Online-Daten der drei durchgeführten *S. cerevisiae* Kultivierungen im OMW dar. Alle Kultivierungen zeigen in den drei gemessenen Parametern eine hohe Übereinstimmung und entsprechen dem typischen Wachstumsverhalten einer Hefekultur auf komplexem Medium mit Glucose. Die typische Diauxie, d.h. die Umstellung des

Metabolismus von Glucose auf das im Medium enthaltene Pepton ist durch einen Peak im Sauerstoffsignal, durch einen Anstieg im pH-Wert und einem Plateau im Biomassesignal gekennzeichnet.



**Abbildung 23:** Online-Überwachung von pH, DO und Biomasse von *S. cerevisiae* Kulturen im OMW mit Hilfe des SFR varios. Medium: YPD-Medium mit  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glucose, Temperatur:  $30^\circ\text{C}$ . Schütteldurchmesser: 25 mm, Schüttelfrequenz: 345 rpm, Triggerwinkel:  $180^\circ$ ,  $n=3$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass das 3D-gedruckte OMW für Kultivierungsvorhaben mit den für die Biotechnologie relevanten Mikroorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* geeignet ist. Außerdem ist ein Online-Monitoring kritischer Prozessparameter mit Hilfe des SFR varios möglich und entspricht den erwartenden Wachstumsverläufen der jeweiligen Organismen.

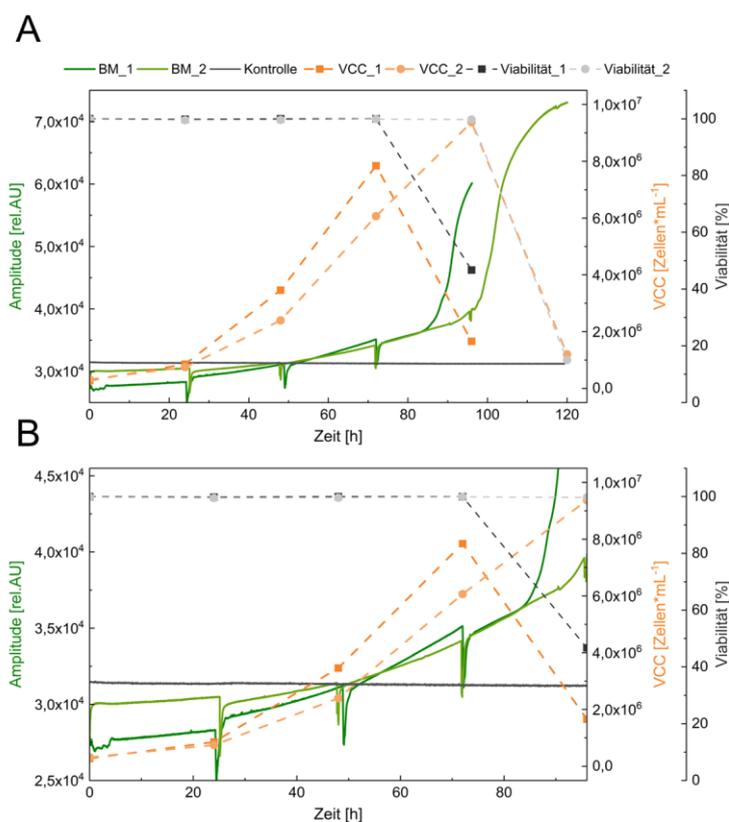
### 2.4.2 Kultivierung von CHO K1-Zellen im OMW

Aufgrund ihrer humanidentischen Glykosylierungsmuster spielen CHO-Zellen eine entscheidende Rolle in der biotechnologischen Produktion von therapeutischen Proteinen wie beispielsweise monoklonalen Antikörpern [148].

Bislang stellte die Online-Biomassemessung von Säugetierzellkulturen aufgrund ihrer geringen Streulichteigenschaften eine erhebliche Herausforderung dar [141, 149]. Die geringe optische Dichte solcher Kulturen führen zu einer großen Eindringtiefe des LED Lichts. Mit zunehmender Eindringtiefe nimmt die Lichtstärke ab und die Intensität des gestreuten Lichts wird reduziert. Die Ergebnisse aus **Kapitel 2.2.4** zeigten jedoch bereits, dass die horizontale Streulichtmessung des OMWs zu einem plausiblen Zusammenhang

zwischen der optischen Dichte und dem Sensorsignal bei CHO-Zellen führt und somit die Aufzeichnung schlüssiger Online-Wachstumskurven ermöglichen sollte.

Nachdem eine geeignete Post-Processing Strategie für das 3D-Druckmaterial gefunden wurde, die die Kultivierung von CHO-Zellen in direktem Kontakt mit dem Material ermöglicht (siehe **Kapitel 2.1.3**), wurden CHO K1-Zellen in dem OMW kultiviert und das Biomassesignal online mit dem SFR vario aufgezeichnet (Methode siehe **Kapitel 4.3.2.4**). Zusätzlich zur Online-Überwachung wurden alle 24 h Proben zur Offline-Analyse entnommen und die Lebendzellkonzentration (VCC, engl. Viable cell count) sowie die Viabilität bestimmt. **Abbildung 24 A** zeigt den gesamten Kultivierungsverlauf über 4 Tage bzw. 5 Tage.



**Abbildung 24:** Kultivierung von CHO K1-Zellen im OMW mit Online-Biomasseüberwachung, sowie offline bestimmter Lebendzellkonzentration (VCC) und Viabilität. **A:** Gesamter Kultivierungsverlauf über 96 h bzw. 120 h. **B:** Detaillierte Darstellung der Wachstumsphase in den ersten 96 h zur besseren Beurteilung der Korrelation des Online-Biomassesignals und der offline bestimmten VCC. Medium: TC-42 Medium + 8 mM L-Glutamin, Temperatur: 37°C, Begasung: 5 % CO<sub>2</sub>, Schütteldurchmesser: 19 mm, Schüttelfrequenz: 150 rpm, Triggerwinkel: 310°, n=2.

Das Online-Biomassesignal zeigt einen stetigen Anstieg des Amplitudenwerts und entspricht damit dem Verlauf der offline bestimmten Zellkonzentrationen (siehe **Abbildung 24 B**).

Während der Wachstumsphase nehmen die initialen Biomassesignale um ca. 10.000 rel.AU zu. In **Abbildung 24 A** ist zu erkennen, dass nach 84 h bzw. 96 h das Biomassesignal deutlich ansteigt, obwohl die offline ermittelte Konzentration an lebensfähigen Zellen bereits eine deutliche Abnahme verzeichnet. Dies spiegelt sich auch in der Viabilität der Kulturen mit 47 % bzw. 15 % wider. Nach Abnahme der Viabilität und der VCC sind Zunahmen im Sensorsignal von 25.000 – 33.000 rel.AU zu beobachten. Maschke *et al.* erzielten ähnliche Ergebnisse unter Verwendung eines herkömmlichen Schüttelkolbens, jedoch ohne eine Signalzunahme in der Wachstumsphase und korrelierten das Biomassesignal mit der Dichte an toten Zellen [149]. Dieser Effekt kann auf Veränderungen der Zellmorphologie und der Zelloberfläche während der Absterbephase zurückgeführt werden. Außerdem führt die Zellyse zu Akkumulation von Zellfragmenten in der Suspension und zur Freisetzung von Organellen, die sich ebenfalls auf das Streulicht auswirken [150].

Durch die Implementierung der horizontalen Streulichtmessung mittels 3D-gedruckter Prismen konnte erstmalig eine hochsensible Online-Überwachung von CHO-Zellkulturen unter Verwendung des SFR varios realisiert werden. Dies ist ein bedeutsamer Fortschritt im Bereich des Online-Monitorings von Suspensionszellkulturen mittels Streulichts.

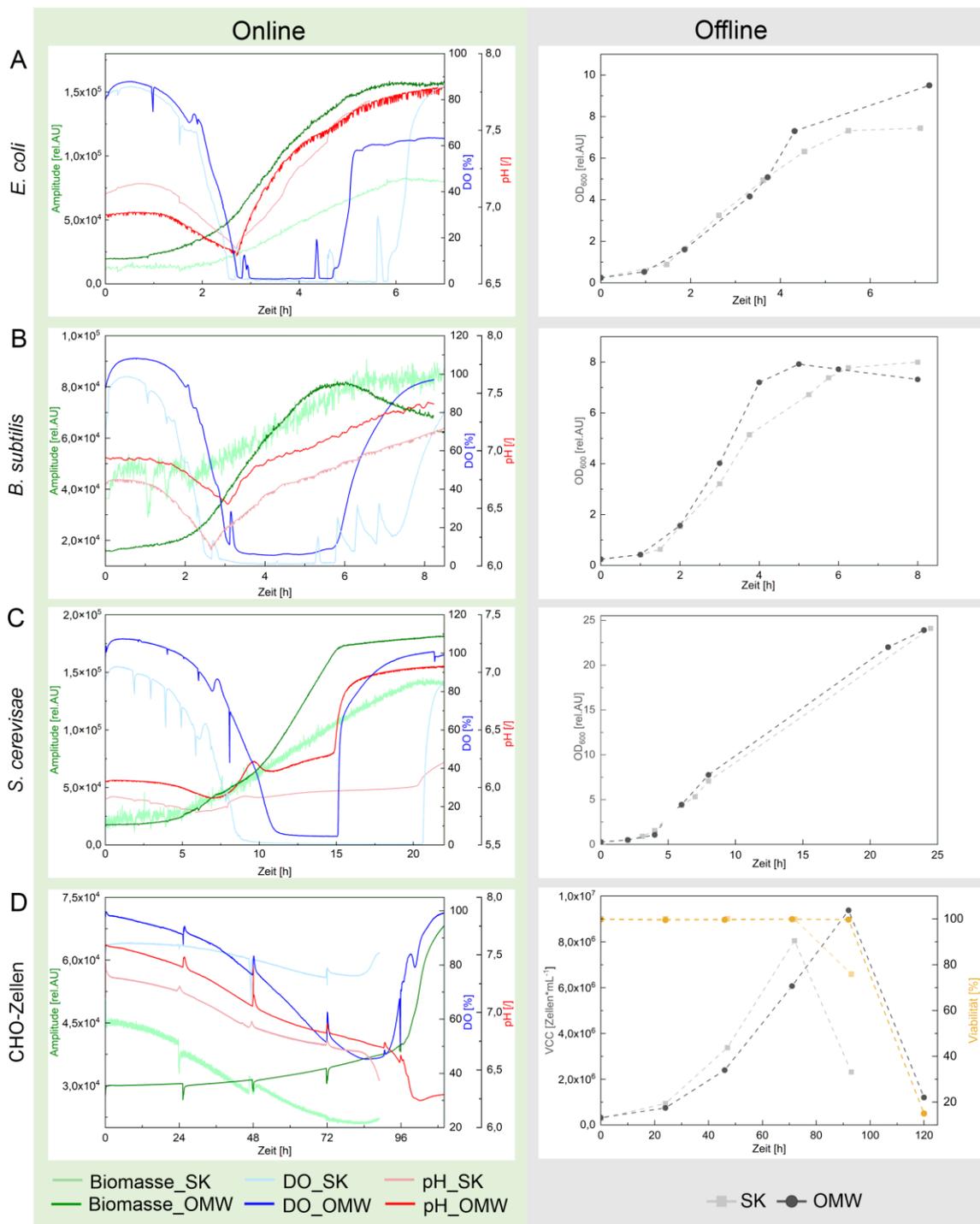
### 2.4.3 Gegenüberstellung von Kultivierungen im OMW und Schüttelkolben

Nachdem von den verschiedenen Modellorganismen im OMW organismusspezifische Wachstumskurven sowie pH-Wert und DO online aufgezeichnet werden konnten, wurde die Vergleichbarkeit des Wachstumsverhaltens als auch das Online-Monitoring mit einem herkömmlich verwendeten Schüttelkolben (SK) untersucht.

Dazu wurden die bereits verwendeten Modellorganismen parallel in beiden Kultivierungssystemen kultiviert. Neben der Online-Überwachung von pH-Wert, DO und Biomasse wurde die Zelldichte anhand der  $OD_{600}$  offline bestimmt. In **Abbildung 25** sind sowohl die Online- als auch die Offline-Daten der Kultivierungen für die vier untersuchten Organismen in beiden Systemen dargestellt. Die Offline-Daten zeigen, dass das Wachstum unabhängig vom Zelltyp in beiden Systemen vergleichbar ist.

Die Ergebnisse aus dem **Kapitel 2.2.3** haben gezeigt, dass die Streulichtmessungen in vertikaler Ebene zu einem höheren S/R aufgrund von unregelmäßigen Grenzflächenreflexionen führen. Dies tritt vor allem bei geringen optischen Dichten auf.

Dieses Ergebnis spiegelt sich in den Biomassesignalen der wachsenden Kulturen im Schüttelkolben, bei denen das vertikale Messprinzip durch den Kolbenboden verwendet wird, wider. Die Online-Biomassesignale weisen vor allem zu Beginn der Kultivierungen, wenn eine geringe OD vorliegt, ein höheres Signalrauschen auf.



**Abbildung 25:** Vergleich Online-Daten von Biomasse, DO und pH und offline bestimmter Wachstumskurven von OMW- und SK-Kultivierungen von verschiedenen Modellorganismen. **A:** *E. coli*, **B:** *B. subtilis*, **C:** *S. cerevisiae* und **D:** CHO-Zellen.

Um das S/R der Biomassesignale von OMW und SK zu vergleichen, wurden die Daten der ersten Kultivierungsstunde verwendet. Dafür wurde ein Medianfilter mit einer Fenstergröße von 20 angewendet und die durchschnittliche Abweichung vom Originalsignal bestimmt (siehe **Tabelle 2**).

**Tabelle 2:** Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnis der Biomassesignale von OMW- und Schüttelkolbenkultivierungen.

<b>Organismus</b>	<b>Relatives S/R OMW</b>	<b>Relatives S/R SK</b>	<b>Reduktion</b>
<i>E. coli</i>	0,62 %	7,55 %	91,78 %
<i>B. subtilis</i>	0,54 %	3,87 %	86,14 %
<i>S. cerevisiae</i>	0,58 %	13,82 %	95,78 %
CHO-Zellen	0,21 %	1,26 %	83,81 %

Bei Verwendung des OMWs liegt das relative S/R des Biomassesignals unter einem 1 %. Die Biomassesignale der Schüttelkolbenkultivierungen weisen hingegen ein relatives S/R von 1,3 – 14 % auf. Somit konnte eine Verringerung des Signalrauschens um mehr als 83 % bei geringen optischen Dichten durch die Verwendung des OMWs erzielt werden.

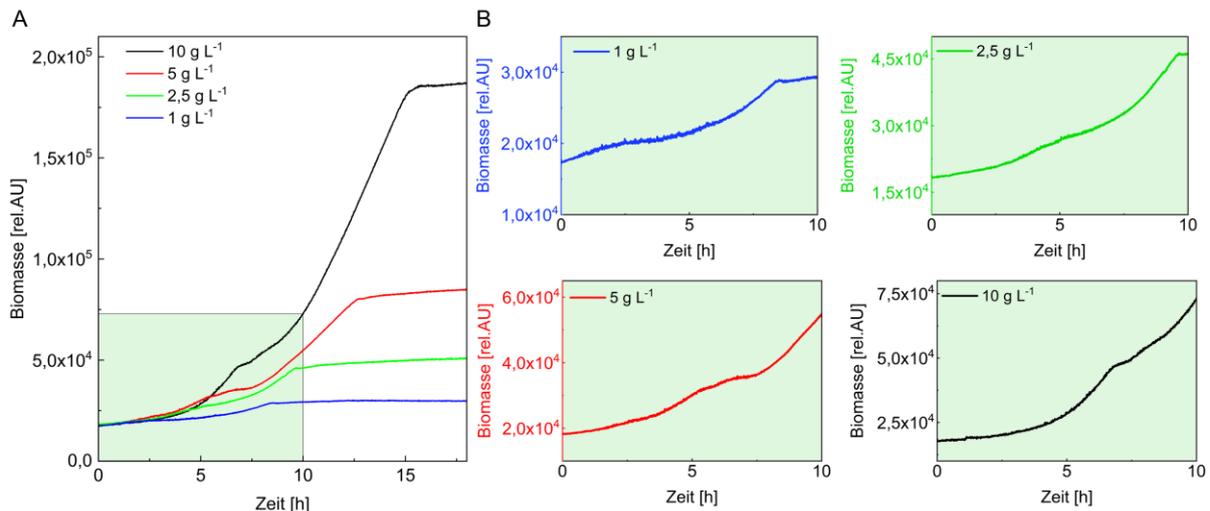
Werden die DO-Signale miteinander verglichen, so zeigt sich, dass die Sauerstofflimitierungen im SK früher eintraten und länger anhielten als im 3D-gedruckten OMW. Beide Systeme wurden mit ihren spezifischen Standardbedingungen betrieben (OMW: 345 rpm, 25 mm Orbit und SK: 150 rpm, 50 mm Orbit). Untersuchungen des  $k_{LA}$ -Wertes zeigten, dass unter diesen Standardbedingungen der  $k_{LA}$ -Wert des Schüttelkolbens um 13,9 % niedriger ist, was bedeutet, dass die Sauerstoffversorgung schlechter ist als im OMW. Für einen quantitativen Vergleich beider Systeme, sollten die Kultivierungsparameter so gewählt werden, dass in beiden Systemen der gleiche  $k_{LA}$ -Wert erreicht wird.

Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen die Vorteile des neuen Messprinzips zur Online-Biomassemessung mittels 3D-gedruckter Optiken in horizontaler Ebene im Vergleich zum vertikalen Messprinzips im Schüttelkolben.

#### 2.4.4 Variation der Substratkonzentration

Das Potenzial der neuen streulichtbasierten Online-Überwachung mittels 3D-gedruckter Prismen soll im folgenden Kapitel durch die Kultivierung von *S. cerevisiae* in komplexen YPD-Medien mit verschiedenen Glucosekonzentrationen demonstriert werden. Ziel war es, die Grenzen der Erkennung von Stoffwechselverschiebungen bei niedriger Konzentration der Kohlenstoffquelle zu untersuchen, was mit einer geringeren Biomassekonzentration

verbunden ist. **Abbildung 26 A** zeigt die mit dem SFR vario aufgezeichneten Wachstumskurven von *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen.



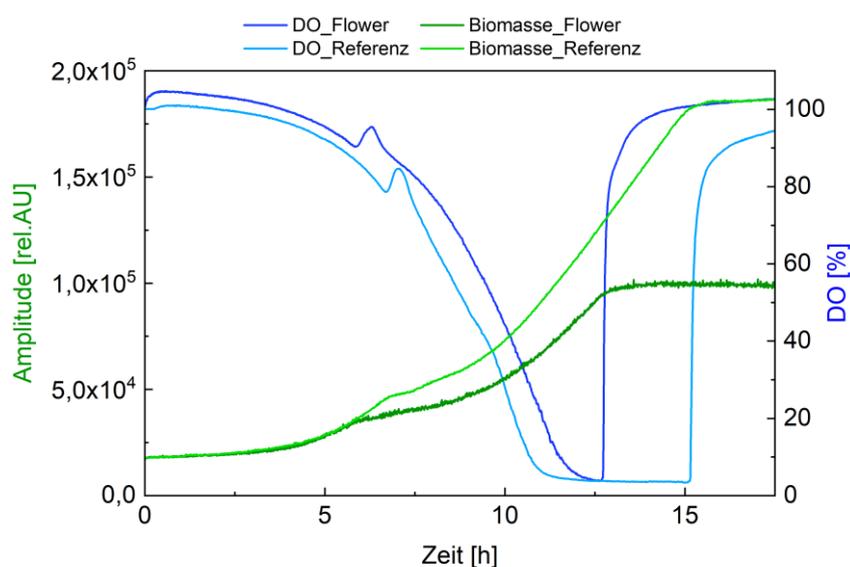
**Abbildung 26:** Online-Wachstumskurven und Detektion von diauxischen Wachstum von *S. cerevisiae* Kulturen im OMW. Kulturen wurden in komplexen YPD-Medium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen kultiviert. **A:** Vollständiger Kultivierungsverlauf. **B:** Detaillierte Ansichten des Zeitpunkts der Diauxie bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen.

Abhängig von der anfänglichen Glucosekonzentration erreichen die Kulturen die stationäre Phase zu unterschiedlichen Zeiten. Die Kultur mit einer initialen Glucosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup> trat bereits nach einer Kultivierungsdauer von ca. 8,5 h in die stationäre Phase ein, wohingegen die Kultur mit einer Glucosekonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> erst nach 16 h in die stationäre Phase übergang. Je mehr Glucose zur Verfügung steht, desto mehr Biomasse kann produziert werden, was sich deutlich in den Biomassesignalen der Streulichtüberwachung zeigt. Die finalen Amplitudenwerte variieren zwischen ca. 29.700 rel.AU und 186.600 rel.AU.

Wenn die primäre Kohlenstoffquelle Glucose limitierend wird, treten die Zellen in eine diauxische Verschiebung ein, die durch eine verringerte Wachstumsrate gekennzeichnet ist, was als Plateau im online überwachten Biomassesignal beobachtet werden kann [151]. Die online überwachten Wachstumskurven mit Hilfe von 3D-gedruckten Prismen ermöglichen die Erkennung des bioprozessrelevanten Phänomens, namens diauxisches Wachstum auch bei niedrigen Konzentrationen der Kohlenstoffquelle (**Abbildung 26 B**). Dies bietet die Möglichkeit das Online-Biomassesignal für die Prozesskontrolle zu nutzen, da selbst kleine metabolische Veränderungen detektierbar sind.

## 2.4.5 Variation der Gefäßgeometrie

Es gibt drei Parameter, die hauptsächlich eingestellt werden, um die Sauerstoffversorgung einer geschüttelten Kultur zu verbessern: Schütteldurchmesser, Schüttelfrequenz und Füllvolumen. Da eine Erhöhung des Schütteldurchmessers, der Schüttelfrequenz oder eine Verringerung des Füllvolumens zu einem kleineren Messvolumen und damit zu einem höheren Signalrauschen führen, besteht eine weitere Möglichkeit darin, die Gefäßgeometrie zu modifizieren und Schikanen zu integrieren wie schon in **Kapitel 2.1.2** dargestellt [22, 28]. Die Flower-Form zeigte sich als die Gefäßgeometrie mit dem maximalen  $k_L a$ -Wert. Die hohe Flexibilität des 3D-Drucks ermöglicht das schnelle Prototyping des OMWs in der Flower-Geometrie. Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens sowie der streulichtbasierten Online-Biomassemessung über 3D-gedruckte Prismen in einem OMW mit Schikanen wurden Kultivierungen mit *S. cerevisiae* im OMW ohne Schikanen (Referenz) und im OMW in Flower-Geometrie durchgeführt.



**Abbildung 27:** Online-Monitoring von Biomasse und DO von *S. cerevisiae* Kulturen in einem Standard-OMW (Referenz) und einem Flower-OMW. Medium: YPD-Medium mit 10 g\*L<sup>-1</sup> Glucose, Temperatur: 30°C, Schütteldurchmesser: 25mm, Schüttelfrequenz: 345 rpm.

**Abbildung 27** zeigt die Online-Daten der Biomasse und DO der *S. cerevisiae*-Kultivierungen. Beide Kulturen zeigen eine typische Wachstumskurve von *S. cerevisiae* auf komplexen Nährmedium mit Glucose. In den ersten 5 h der Kultivierung weisen die Biomassesignale nahezu identische Amplitudenwerte auf. Nach Umstellung des Metabolismus nimmt das Biomassesignal des Flower-OMWs deutlich langsamer zu und erreicht lediglich 65 % des

Maximalwertes der Referenzkultur, obwohl die finale  $OD_{600}$  der Flower-OMW-Kultur von 25,9 rel.AU sogar etwas höher ist als die der Referenzkultur mit 25,2 rel.AU. Außerdem ist zu erkennen, dass das Biomassesignal des Flower-OMWs ein höheres Rauschen aufweist, was durch die Veränderung des Strömungsverhaltens aufgrund der Schikanen jedoch zu erwarten war [22].

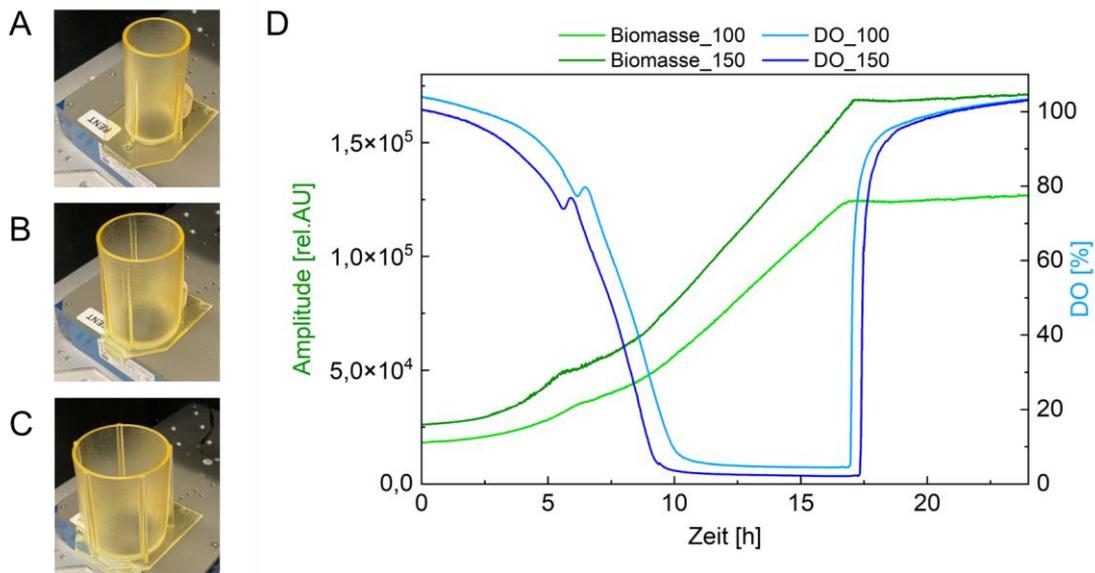
Mit Hilfe der numerischen Strömungsmechanik (CFD; engl. Computational fluid dynamics) könnten in weiteren Studien die Flüssigkeitsbewegungen genauer analysiert werden, um Aufschluss über die veränderte Flüssigkeitsverteilung im Flower-OMW und die damit einhergehende verringerte Sensitivität der Biomassemessung mit dem SFR vario zu erhalten.

Die online überwachten DO-Signale zeigen deutlich den Unterschied im  $k_{La}$ -Wert der beiden Gefäßgeometrien. Die Kultur im Referenz-OMW mit einem kleineren  $k_{La}$ -Wert trat früher in die Phase der Sauerstofflimitierung ein und erreichte die stationäre Phase ca. 2,5 h Stunden später als die Kultur in dem Flower-OMW. Der größere  $k_{La}$ -Wert des Flower-OMWs führt außerdem dazu, dass die Sauerstofflimitierung auf eine sehr kurze Dauer minimiert werden konnte, verglichen mit der Referenz-Kultur.

#### 2.4.6 Variation der Gefäßgröße

In einigen Fällen ist die Offline-Analytik für die Produktüberwachung oder die Untersuchung von potenziell anfallenden Nebenprodukten unerlässlich. Hierfür ist ein Mindestprobenvolumen erforderlich. Mit einem Gesamtgefäßvolumen von ca. 50 mL und einem Arbeitsvolumen von 25 % ist das verfügbare Probenvolumen begrenzt. Vor allem eine kontinuierliche Verkleinerung des Kultivierungsvolumens würde sich auf das Biomassesignal auswirken [94].

Um den Einfluss der Gefäßgröße auf die Streulichtmessung mittels 3D-gedruckter Prismen und das Wachstumsverhalten zu untersuchen, wurden zwei weitere OMWs mit einem Gesamtvolumen von 100 mL und 150 mL konstruiert. Die Höhe der Gefäße und die 3D-gedruckten Optiken waren identisch zu dem Referenz-OMW. Dies führte dazu, dass der Durchmesser mit zunehmendem Gefäßvolumen zunimmt (siehe **Abbildung 28 A – C**).



**Abbildung 28:** *S. cerevisiae* Kultivierungen in OMWs mit verschiedenen Gesamtvolumen. **A:** OMW mit einem Gesamtvolumen von 50 mL, **B:** OMW mit einem Gesamtvolumen von 100 mL, **C:** OMW mit einem Gesamtvolumen von 150 mL. **D:** Online-Monitoring von Biomasse und DO von *S. cerevisiae* Kulturen in OMWs mit einem Gesamtvolumen von 100 mL und 150 mL. Medium: YPD-Medium mit  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glucose, Temperatur:  $30^\circ\text{C}$ , Schütteldurchmesser: 25 mm, Schüttelfrequenz: 345 rpm.

**Abbildung 28 D** zeigt die online aufgenommenen Wachstumskurven und DO-Signale von *S. cerevisiae* Kultivierungen, die in OMWs mit einem Gesamtvolumen von 100 mL (OMW\_100) und 150 mL (OMW\_150) durchgeführt wurden. Beide Kultivierungsgefäße wurden mit der gleichen Kultur gefüllt, deren initiale  $\text{OD}_{600}$  0,265 rel.AU betrug. Trotz identischer initialer  $\text{OD}_{600}$  unterscheiden sich die anfänglichen Biomassesignale voneinander. Das OMW\_150 weist um 30 % höhere Amplitudenwerte auf als das OMW\_100.

Beide Kulturen erreichten die stationäre Phase nach einer Kultivierungszeit von 17 h. Die Kultur im OMW\_100 erreichte ein maximales Biomassesignal von 127.469 rel.AU, was einer offline bestimmten  $\text{OD}_{600}$  von 21,1 rel.AU entspricht. Obwohl die offline gemessene  $\text{OD}_{600}$  von OMW\_150 mit 20,3 rel.AU etwas niedriger ist, ergibt sich ein höheres Biomassesignal von 171.782 rel.AU, was in etwa der anfänglichen relativen Differenz von 30 % entspricht.

Durch den zunehmenden Gefäßradius verändert sich das Oberflächen-Volumen-Verhältnis und damit die Fluidynamik, welche sich wiederum auf die Bildung der Flüssigkeitssichel auswirkt. Durch den größeren Gefäßradius ist der Abstand zwischen Rotationsachse und Gefäßrand größer. Dies führt zu einer höheren Fliehkraft, da diese proportional zum Abstand vom Rotationszentrum ist. Dadurch wird die Flüssigkeit mehr nach außen gedrückt. Dies resultiert in einem kleineren Messbereich, der für die Streulichtmessung zur Verfügung steht.

Das könnte zur Folge haben, dass es zu mehr Reflexionen an der Phasengrenzfläche kommt, wodurch sich höhere Amplitudenwerte ergeben [152]. Trotz des größeren Durchmessers können detaillierte Wachstumskurven aufgezeichnet werden, die mit denen des Referenz-OMWs von 50 mL vergleichbar sind (vgl. **Abbildung 27**).

#### 2.4.7 Zusammenfassung und Fazit

Die Daten dieser Kapitel bestätigen, dass verschiedene für die Biotechnologie relevante Organismen im 3D-gedruckten Kultivierungsgefäß kultiviert werden können. Außerdem konnten Sensorspots für die Online-DO- und -pH-Messung in das Kultivierungsgefäß integriert werden und ermöglichten somit die Überwachung der kritischen Prozessparameter pH und DO, anhand derer Rückschlüsse auf z.B. metabolische Veränderungen im Laufe der verschiedenen Wachstumsphasen geschlossen werden können.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Verwendung von 3D-gedruckten Prismen in Kombination mit dem SFR vario zu hochpräzisen und reproduzierbaren online bestimmten Wachstumskurven führt und erstmalig plausible Daten bei der Kultivierung von CHO-Zellen liefert. Ein weiterer Vorteil des Online-Monitorings im OMW im Vergleich zum Schüttelkolben ist die erhebliche Reduzierung des S/R, die durch die geänderte Lichtführung erreicht werden konnte. Selbst bei geringen Biomassekonzentrationen konnten metabolische Veränderungen deutlich abgebildet und identifiziert werden.

Im Rahmen der proof of concept Kultiverungen wurde außerdem die Übertragbarkeit der 3D-gedruckten Optik und deren Anwendung auf die Flower-Geometrie sowie auf Gefäße mit größerem Gesamtvolumen untersucht. Die konstruktive Einbindung der Optik in weitere Gefäßtypen gelang problemlos. Mit allen Kultivierungsgefäßen konnten für *S. cerevisiae* typische Wachstumsverläufe aufgezeichnet werden. Jedoch führen unterschiedliche Geometrien aufgrund verschiedener Strömungsverhalten zu unterschiedlichen Amplitudenwerten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit für gefäßspezifische Kalibrationen, um das online ermittelte Biomassesignal mit Standard-Biomasseparametern wie OD<sub>600</sub> oder Trocken- bzw. Feuchtgewicht der Zellen zu korrelieren.

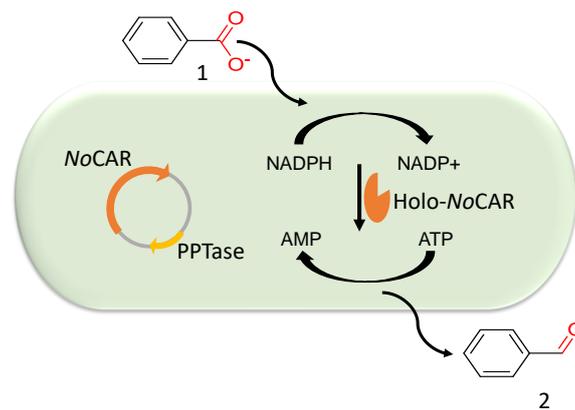
## 2.5 Anwendungen des 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes auf Bioprozesse

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Anwendung des 3D-gedruckten OMWs auf verschiedene industriell relevante Bioprozesse untersucht. Als Modellbioprozesse wurden die Produktion eines rekombinanten Proteins, eines small molecules und eines fluoreszierenden Proteins gewählt. Für die Expression eines rekombinanten Enzyms und die Produktion des small molecules fand zunächst eine Prozessentwicklung im Schüttelkolbenmaßstab statt und eine anschließende Prozessübertragung auf einen geregelten Rührkesselreaktor. Anschließend wurden die entwickelten Prozesse auf das 3D-gedruckte OMW übertragen und mit Kultivierungen in üblichen Reaktorsystemen verglichen. Für das dritte Anwendungsbeispiel wurde ein bereits etablierter Prozess zur rekombinanten Produktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in *E. coli* gewählt. Dabei stand die Integration weiterer Sensorik für die Prozessüberwachung im OMW im Vordergrund.

### 2.5.1 Rekombinante Produktion einer Carboxylsäurereduktase in *E. coli*

Als erster Modellprozess wurde die Enzymproduktion in *E. coli* am Beispiel der Carboxylsäurereduktase (CAR, engl. Carboxylic acid reductase) aus *Nocardia oitidiscaviarum* (NoCAR) gewählt.

Aldehyde spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese komplexer Moleküle für Feinchemikalien und pharmazeutische Wirkstoffe. Die klassische chemische Synthese von Aldehyden durch die Reduktion von Carbonsäuren ist herausfordernd. Die mangelnde Chemoselektivität und der hohe Bedarf an Reduktionsmitteln führen oftmals zu einer Überreduktion des Aldehyds zum entsprechenden Alkohol [153]. Ein alternativer Ansatz zur Gewinnung des gewünschten Aldehyds ist die biokatalytische Reduktion. Diese erfolgt in nur einem Schritt mit hoher Selektivität und unter mildereren Reaktionsbedingungen als bei chemischen Ansätzen und bietet somit eine umweltfreundlichere und chemoselektive Möglichkeit zur Herstellung von Aldehyden [154].



**Abbildung 29:** Biokatalytische Reduktion von Benzoesäure (1) zu Benzaldehyd (2) durch die heterologe Produktion einer Carboxylsäurereduktase aus *Nocardia otitidiscaviarum* (NoCAR) in *E. coli* K12.

Carboxylsäurereduktasen katalysieren unter Verbrauch von Adenosin-Triphosphat (ATP), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und katalytischen Mengen an  $Mg^{2+}$  die genannte Reduktionsreaktion. CARs sind Multidomänenenzyme, die eine zusätzliche Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) benötigen, um ihre enzymatische Aktivität vollständig zu entfalten [154, 155]. Die posttranslationale Modifizierung des Apoenzym in das Holoenzym erfolgt hier *in vivo* durch die Co-Expression einer PPTase. Die Co-Expression ist eine gängige Strategie und wurde bereits für eine Vielzahl von Proteinen angewandt [156].

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* K12 Stamm zur Produktion der Carboxylsäurereduktase aus *Nocardia otitidiscaviarum* wurde freundlicherweise vom Forschungszentrum Jülich (Prof. Dörte Rother) bereitgestellt. Die Gene zur Expression der NoCAR und der PPTase stehen unter der Kontrolle des T7-Promoters, welcher durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert wird.

Ziel war es optimale Kultivierungsbedingungen zu finden, die zu einer möglichst hohen Konzentration an aktiver NoCAR führen. Eine der größten Herausforderungen ist hierbei die geringe Toleranz von *E. coli* gegenüber großen (> 100 kDa) heterologen Enzymen, was die Aggregation und somit die Bildung von inclusion bodies (IB) fördert [157]. Mit einer Größe von 130 kDa und die zusätzliche physiologische Belastung durch die bereits erwähnte Co-Expression und posttranslationaler Modifikation wäre die Bildung von IBs in *E. coli* nicht unerwartet. Die Aggregation des Enzyms hätte zur Folge, dass gar keine bzw. nur eine stark reduzierte Aktivität erreicht wird [158]. Daher ist es von großer Bedeutung passende Kultivierungsbedingungen zu finden, die einen optimalen Einsatz der rekombinanten CAR ermöglichen.

### 2.5.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben

Das Ziel der folgenden Arbeiten war es, grundlegende Kultivierungsbedingungen für eine optimale Proteinexpression von NoCAR in *E. coli* K12 zu bestimmen. Dabei soll eine möglichst hohe Konzentration an löslichem Enzym erzielt werden.

Um einen ersten Anhaltspunkt für mögliche Kultivierungsbedingungen zu finden, wurden erste Untersuchungen nach dem OFAT (one factor at a time) Prinzip durchgeführt. Dabei wurden Kultivierungsparameter, wie Induktorkonzentration, OD<sub>600</sub> bei Induktion (Induktions-OD<sub>600</sub>) und Temperatur während der Expressionsphase untersucht. Die gewählten Versuchsreihen sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Für die Induktions-OD<sub>600</sub> wurden optische Dichten gewählt, die verschiedenen Phasen des exponentiellen Wachstums zugeordnet werden können. Eine OD<sub>600</sub> von 0,5 rel.AU entspricht der frühen exponentiellen Phase, eine OD<sub>600</sub> von 1,5 rel.AU der mittleren exponentiellen Phase und eine OD<sub>600</sub> von 3 rel.AU und 4 rel.AU lassen sich der späten exponentiellen Phase zu ordnen. Durch die Absenkung der Temperatur von 37°C auf 28°C, 20°C oder 15°C soll die Wachstums- von der Expressionsphase entkoppelt werden, damit möglichst wenig IB gebildet werden. Die Versuche erfolgten in 250 mL-Schüttelkolben mit Terrific Broth (TB) Medium.

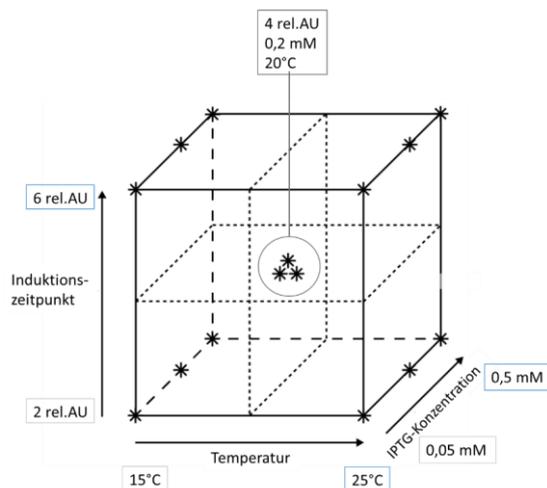
**Tabelle 3:** Versuchsreihen zur Bestimmung geeigneter Expressionsbedingungen nach dem OFAT-Prinzip. Grau hinterlegte Felder wurden in der jeweiligen Versuchsreihe variiert.

Temperatur [C°]	Expressionsphase	Induktions-OD <sub>600</sub> [rel.AU]	IPTG-Konzentration [mM]
20		1,5	0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1
20		0,5; 1; 3; 4	0,2
15, 20, 28		4	0,2

Nach 24 Stunden wurden auf die Zelldichte normierte Proben entnommen, enzymatisch aufgeschlossen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert und die Konzentration an NoCAR densitometrisch quantifiziert (siehe **Kapitel 4.1.1, Abbildung 43 - 45**). Die höchste Konzentration an löslichem Protein wurde erreicht, wenn die Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 4 rel.AU mit 0,2 mM IPTG induziert wurde und die Temperatur auf mindestens 20°C abgesenkt wurde.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe eines DoEs die Kultivierungsbedingungen optimiert, um die Produktausbeute zu maximieren. Mittels DoE

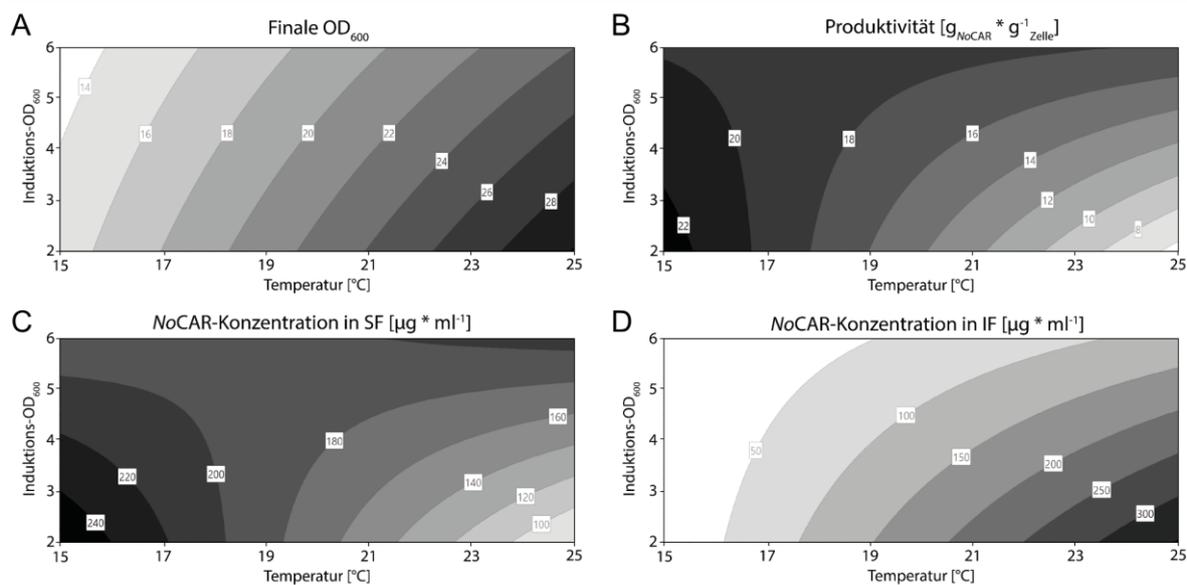
soll mit möglichst geringer Anzahl an Versuchen der Zusammenhang zwischen den obigen Prozessparametern auf die Produktausbeute ermittelt werden. Der verwendete zentrale Versuchsplan mit den minimalen und maximalen Faktorgrenzen sowie den drei zusätzlichen Zentralpunkten ist in **Abbildung 30** dargestellt. Daraus resultiert ein DoE-Ansatz mit 15 Versuchen.



**Abbildung 30:** Graphische Darstellung des verwendeten Versuchsdesigns für den DoE zur Ermittlung der optimalen Kultivierungsparameter zur Produktion von NoCAR.

Die Kultivierungen wurden in 250 mL-Schüttelkolben mit TB-Medium durchgeführt. Dafür wurden die Kulturen auf eine  $OD_{600}$  von  $\sim 0,2$  rel.AU inokuliert. 24 Stunden nach Induktion wurden Proben entnommen und hinsichtlich finaler  $OD_{600}$ , NoCAR-Konzentration in der löslichen (SF, engl. Soluble fraction) und unlöslichen Fraktion (IF, engl. Insoluble fraction) sowie Produktivität analysiert. Zum Vergleich der Proteinproduktion in den verschiedenen Ansätzen wurden normierte Proben basierend auf der optischen Dichte entnommen. Nach enzymatischem Zellaufschluss wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert und die Konzentration des Zielproteins densitometrisch bestimmt (Methode siehe **Kapitel 4.3.3**).

Die Auswertung erfolgte mit der Software MODDE 12 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Schweden). Die Daten ergaben, dass die Induktorkonzentration keinen signifikanten nachweisbaren Einfluss auf die Produktausbeute hat. Daher sind in der nachfolgenden **Abbildung 31** die response contour plots für die Faktoren Induktionszeitpunkt und Temperatur abgebildet.



**Abbildung 31:** Response contour plots des DoEs zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von NoCAR in *E. coli* K12. Antworten: Finale OD<sub>600</sub> (A), Produktivität (B), NoCAR-Konzentration in SF (C) und NoCAR-Konzentration in IF (D) in Abhängigkeit von Induktions-OD<sub>600</sub> und Temperatur.

Durch das Absenken der Temperatur nach der Induktion, soll die Wachstumsphase von der Expressionsphase getrennt werden und somit die Bildung von IB vermieden bzw. reduziert werden [159]. **Abbildung 31 A** zeigt, wie die final erreichte OD<sub>600</sub> nach 24 h von der Temperatur und der Induktions-OD<sub>600</sub> abhängt. Es ist ersichtlich, dass sowohl höhere Temperaturen als auch eine frühe Induktion zu höheren finalen OD<sub>600</sub> führen. Die Absenkung der Temperatur verlangsamt den Stoffwechsel der Zellen und führt zu einer Verringerung der Zellteilungsrate. In **Abbildung 31 C** und **D** sind die response contour plots zu den Antworten NoCAR-Konzentration in der SF und IF dargestellt. Die höchste Konzentration an löslichem NoCAR mit 240 µg \* ml<sup>-1</sup> wurde bei einer Temperatur während der Expressionsphase von 16°C erreicht, wenn die Induktion mit 0,2 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 2 rel.AU erfolgte. Mit steigender Temperatur nimmt die Konzentration an NoCAR in der löslichen Fraktion kontinuierlich ab. Zeitgleich wird durch höhere Temperaturen die Produktion an unlöslichem Protein begünstigt. Bei einer Temperatur von 25°C betrug die NoCAR-Konzentration 300 µg \* ml<sup>-1</sup> und liegt damit deutlich über der NoCAR-Konzentration in der löslichen Fraktion mit 100 µg \* ml<sup>-1</sup>. Um die Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurde außerdem noch die Produktausbeute pro Gramm Zelle ( $Y_{P/X}$ ) bestimmt (siehe **Abbildung 31 B**). Die höchste Produktausbeute mit 22 g<sub>NoCAR</sub> \* g<sup>-1</sup><sub>Zelle</sub> wurde durch eine Induktion bei einer OD<sub>600</sub> von 2 rel.AU erreicht und bei einer Temperatur von

16°C. Mit steigender Temperatur nimmt die Ausbeute pro Gramm Zelle stetig ab. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen eine erfolgreiche Entkopplung von Wachstums- und Expressionsphase zur Ausbeutesteigerung des Zielproteins in löslicher und aktiver Form und zeigen außerdem deutlich, welchen Effekt die Temperatur hat.

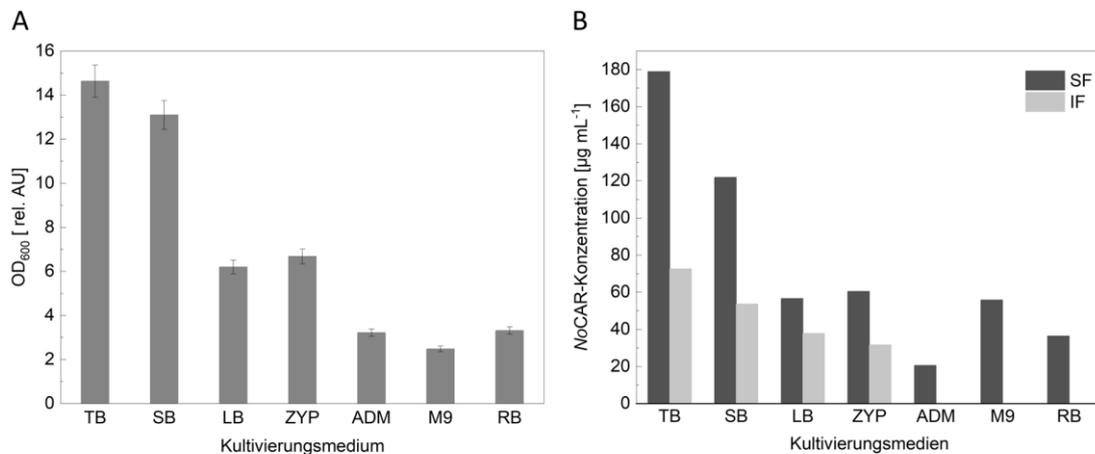
In einem weiteren DoE-Ansatz wurde untersucht, ob sich durch eine weitere Temperatursenkung während der Expressionsphase die NoCAR-Ausbeute in der löslichen Fraktion weiter steigern lässt. Außerdem wurde analysiert, wie sich die Produktausbeute verändert, wenn zu einem noch früheren Zeitpunkt induziert wird. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Temperaturen unter 15°C wieder zu einer deutlichen Produktabnahme führen. Lediglich der Anteil an unlöslicher NoCAR konnte durch eine weitere Temperatursenkung reduziert bzw. bei 8°C sogar komplett unterbunden werden (siehe **Kapitel 4.1.1, Abbildung 46**). Eine Induktion bei einer OD<sub>600</sub> von 1 rel.AU führte mit 250 µg \* ml<sup>-1</sup> zu einer ähnlichen Konzentration an löslichen NoCAR, wie eine Induktion bei 2 rel.AU.

Die Ergebnisse zeigen, dass die optimale Temperatur während der Expressionsphase bei 16°C liegt und die Induktion bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 1 – 2,5 rel.AU, was der mittleren exponentiellen Wachstumsphase entspricht, mit einer IPTG-Konzentration von 0,2 mM erfolgen sollte, um eine maximale Ausbeute an löslichem und funktionsfähigem Protein zu erzielen und die Bildung von inclusion bodies zu minimieren. Ähnliche Kultivierungsbedingungen wurden von Weber *et al.* bei der Produktion von NoCAR in *E. coli* Tuner bzw. *E. coli* Bl21 gefunden [160].

### 2.5.1.2 Einfluss verschiedener Kultivierungsmedien

Ein weiterer Parameter, der die Produktion beeinflusst, ist die Wahl des Kultivierungsmediums. Mit dem Ziel die NoCAR-Ausbeute weiter zu erhöhen, wurde der Einsatz verschiedener komplexer (TB, SB und LB) und definierter Medien (ZYP, ADM, M9 und RB) untersucht (Zusammensetzungen siehe **Kapitel 4.2.5**).

Dabei wurde einmal die final erreichte OD<sub>600</sub> nach 24 h verglichen, sowie die Konzentration an NoCAR in der löslichen und unlöslichen Fraktion nach 24 h (siehe **Abbildung 32**). Um die Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung vergleichen zu können, wurden die Proben auf eine OD<sub>600</sub> von 2,0 rel.AU normiert.



**Abbildung 32:** Expression von *NoCAR* in verschiedenen Kultivierungsmedien. **A:** Vergleich der finalen OD<sub>600</sub>. **B:** Vergleich der *NoCAR*-Konzentration in der löslichen (SF) und unlöslichen (IF) Fraktion nach enzymatischem Zellaufschluss nach 24 h in komplexen und definierten Kulturmedien. Wachstumsphase bei 37°C, Induktion mit 0,2 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 1 rel.AU, Expressionsphase bei 16°C. Komplexe Medien: Terrific broth (TB), Super broth (SB) und Lysogeny broth (LB). Definierte Medien: Zyp-5052 Autoinduzierend (ZYP), Aparicio defined media (ADM), Minimal M9 Medium (M9) und Riesenberg Medium (RB).

Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien hinsichtlich finaler erreichter OD<sub>600</sub> und der Konzentration an *NoCAR* festgestellt werden. Die höchsten Zelldichten wurden in den beiden komplexen Kultivierungsmedien TB- und SB-Medium mit 14,6 rel.AU bzw. 13,1 rel.AU erreicht. Das dritte getestete Komplexmedium (LB) weist eine finale OD<sub>600</sub> von 6,2 rel.AU auf. Das autoinduzierende Medium führt dahingegen zu einer etwas höheren Zelldichte von 6,68 rel.AU. Die definierten Medien (ADM, M9 und RB) zeigten erwartungsgemäß mit 2,46 rel.AU und 3,32 rel.AU deutlich geringere Zelldichten.

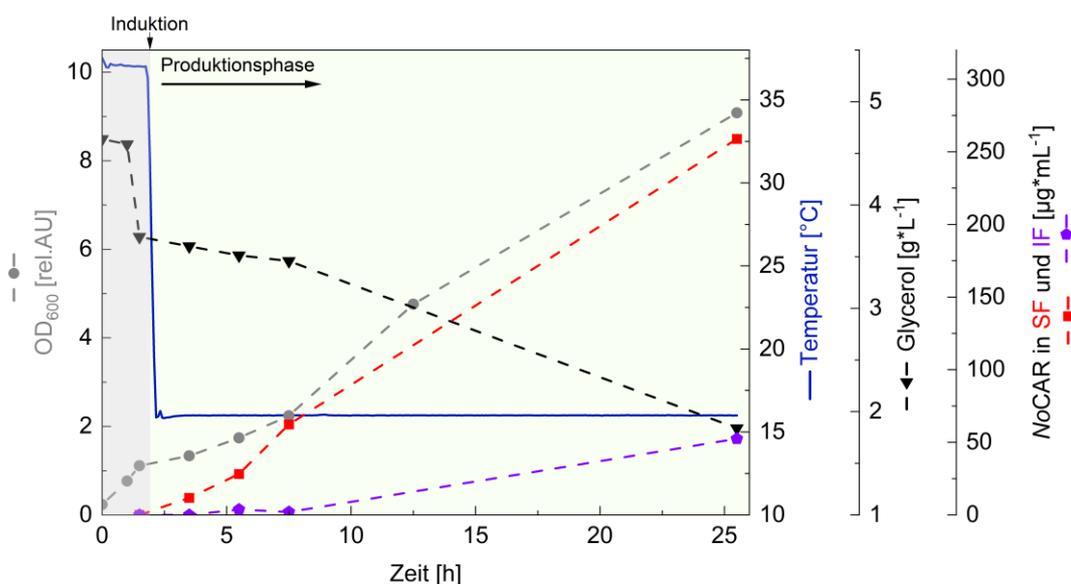
Die Tendenzen im Zellwachstum spiegeln sich auch in der *NoCAR*-Konzentration in der löslichen Fraktion wider. Somit wurde die höchste Konzentration an löslichem *NoCAR* im TB-Medium mit 178,9 µg\*mL<sup>-1</sup> bestimmt. Bei den definierten Medien korreliert die höchste Zelldichte nicht mit der höchsten Proteinkonzentration. Die höchste Konzentration an *NoCAR* in der löslichen Fraktion wurde im Minimalmedium M9 mit 55,87 µg\*mL<sup>-1</sup> erzielt, gefolgt von 36,39 µg\*mL<sup>-1</sup> im RB-Medium und 29,59 µg\*mL<sup>-1</sup> im ADM-Medium. Im Vergleich zu den verwendeten Komplexmedien wurde in den definierten Medien kein Zielprotein in der unlöslichen Fraktion detektiert. Dies könnte mit dem erhöhten Nährstoffgehalt der Komplexmedien zusammenhängen, die zu einer erhöhten Proteinexpression führen, die wiederum zur vermehrten Bildung von inclusion bodies führen kann. [161].

Obwohl die Verwendung von definierten Medien ausschließlich zur Produktion der gewünschten löslichen Form an *NoCAR* führt, ist die Ausbeute im Vergleich zum Komplexmedium um 68,77 % geringer. Daher wird trotz einem Anteil von 28 % an unlöslichem Protein an der Gesamtkonzentration das komplexe TB-Medium zur rekombinanten Produktion von *NoCAR* in *E. coli* K12 gewählt.

### 2.5.1.3 Kultivierung im 2L-Rührkesselreaktor

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Expression von *NoCAR* in *E. coli* K12 gefunden wurden, wurde der Prozess in einen 2 L-Rührkesselreaktor (BIOSTAT® A, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L übertragen. Der Rührkesselreaktor bietet im Vergleich zu dem Schüttelkolben eine kontrollierte Umgebung, da wichtige Prozessparameter, wie pH und DO geregelt werden können.

Der pH-Wert wurde durch automatische Zugabe von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf pH 7,0 geregelt. Die Regelung des DOs auf 30 % erfolgte über die Rührerdrehzahl. Der Reaktor wurden mit einer initialen OD<sub>600</sub> von 0,2 rel.AU inokuliert und zunächst bei 37°C betrieben. Während der Kultivierung wurden Proben zur Analyse der OD<sub>600</sub>, Biotrockenmasse (BTM), Glycerol-Konzentration sowie der *NoCAR*-Konzentration entnommen. Der zeitliche Verlauf der Kultivierung ist in **Abbildung 33** dargestellt.



**Abbildung 33:** Produktion von *NoCAR* in *E. coli* K12 im 2L-Rührkesselreaktor. Kultivierungsbedingungen: Volumen: 1,5 L, Medium: TB-Medium, Temperatur: 37°C Wachstumsphase, 16°C Produktionsphase, Induktion: bei OD<sub>600</sub>≈1 rel.AU mit 0,2 mM IPTG. *NoCAR*-Konzentration wurde nach enzymatischen Zellaufschluss densitometrisch bestimmt.

Es ist keine signifikante lag-Phase zu erkennen. Die Zellen wachsen bis zum Zeitpunkt der Induktion mit einer Wachstumsrate ( $\mu$ ) von  $0,75 \text{ h}^{-1}$  und verbrauchen in den ersten 1,5 h  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerol. Als eine  $\text{OD}_{600}$  von 1,11 rel.AU nach 1,5 h erreicht wurde, wurde begonnen die Reaktortemperatur auf  $16^\circ\text{C}$  zu senken. Daraufhin wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von  $0,2 \text{ mM}$  IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Durch das Absenken der Temperatur wird das Wachstum deutlich verlangsamt und es spiegelt sich ein lineares Wachstumsverhalten wider. 6 h nach Induktion betrug die  $\text{OD}_{600}$  2,24 rel.AU. Dieses korreliert auch mit der linearen Abnahme der Glycerol-Konzentration (C-Quelle) über die Zeit.

Bereits 2 h nach Induktion konnten bereits  $11,77 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  lösliches NoCAR detektiert werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf konnte eine kontinuierliche Zunahme an NoCAR verzeichnet werden. Nach 24 h betrug die NoCAR-Konzentration in der löslichen Fraktion  $258,85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Der Anteil an unlöslichem Enzym ist mit  $52,48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  vergleichsweise gering. Längere Kultivierungszeiten führten zu keiner weiteren Zunahme an löslichem Produkt, sondern steigerten nur den Anteil an aggregierten Proteinen in der unlöslichen Phase (Daten nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass der Bioprozess zur Produktion des rekombinanten Proteins NoCAR in *E.coli* K12 in den 2L-Rührkesselreaktor übertragen werden konnte.

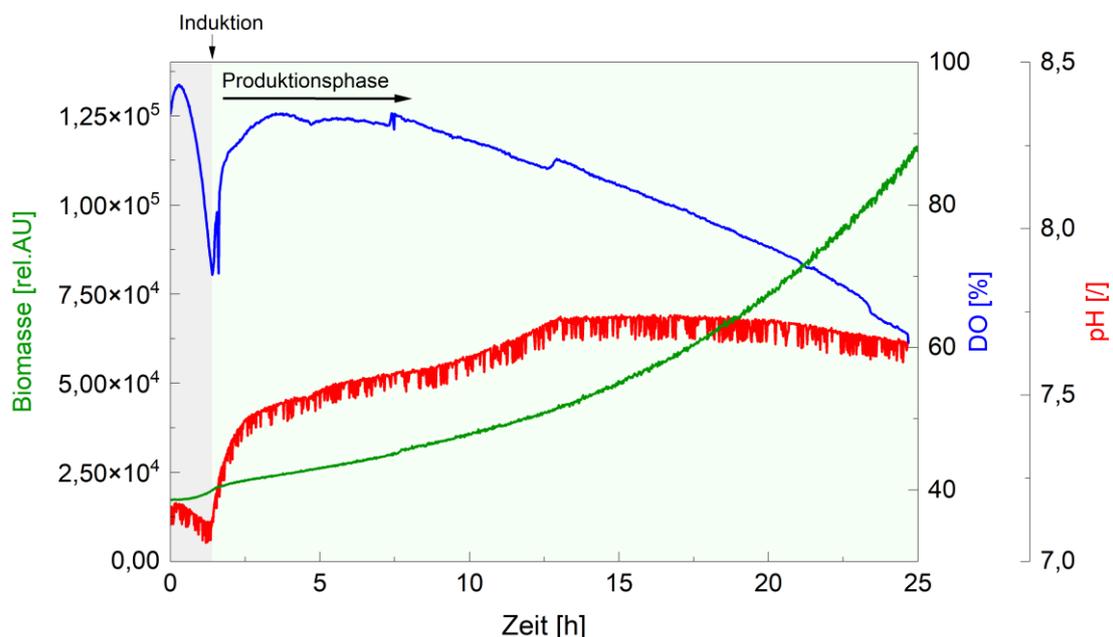
#### 2.5.1.4 Kultivierung im 3D-gedruckten OMW

Nachdem der Bioprozess zur rekombinanten Produktion von NoCAR in *E. coli* K12 entwickelt und auf den 2L-Rührkesselreaktor übertragen wurde, sollte nun untersucht werden, ob der entwickelte Bioprozess in dem 3D-gedruckten OMW durchgeführt werden kann.

Dafür wurden  $12,5 \text{ mL}$  TB-Medium und entsprechendes Antibiotikum in das zuvor autoklavierte OMW gegeben und auf eine initiale  $\text{OD}_{600}$  von  $0,2 \text{ rel.AU}$  inokuliert. Anschließend wurde das OMW auf den SFR vario auf einen Tischschüttler mit einem Schütteldurchmesser von  $25 \text{ mm}$  montiert. Für die Temperierung wurde eine Certomat Inkubationshaube verwendet.

Die Online-Überwachung von pH, DO und Biomasse erfolgte mit Hilfe des SFR variuos. Die Daten sind in **Abbildung 34** dargestellt. Die initiale optische Dichte von  $0,22 \text{ rel.AU}$  entspricht einem Biomassesignal von  $17.285,11 \text{ rel.AU}$ . Die Wachstumsphase, welche bei

37°C erfolgte, ist durch eine kurze lag-Phase gekennzeichnet. Nach ca. 0,5 h ist der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zu verzeichnen. Dies ist ebenfalls durch den Abfall des DO-Signals von anfänglich 96,7 % auf 70,65 % nach 1,4 h ersichtlich. Nach 1,4 h Kultivierungszeit ist das Biomassesignal auf 20.048,08 rel.AU angestiegen, was einer OD<sub>600</sub> von 1,41 rel.AU entspricht. Somit wurde die Temperatur auf 16°C gesenkt und die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Das Absenken der Temperatur hat einen Anstieg des DO-Signals sowie des pH-Wertes zufolge. Die Online-Daten zeigen deutlich, dass die geringere Temperatur das Wachstum zunächst stark verlangsamt. Dies ist zum einen an der nur langsamen Zunahme des Biomassesignals zu erkennen, zum anderen am Verlauf des DO-Signals. Erst 6 h nach Induktion ist eine erneute Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration ersichtlich. Dieses spiegelt sich auch in dem Biomassesignal und der Wachstumsrate wider. Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt 25,6 h wurde der Prozess mit einem finalen Biomassesignal von 117.742,0 rel.AU, was einer offline bestimmten OD<sub>600</sub> von 16,1 rel.AU entspricht, beendet. Die densitometrische Quantifizierung des Zielproteins ergab eine Konzentration von 201,93 µg\*mL<sup>-1</sup> in der SF und 146,24 µg\*mL<sup>-1</sup> in der IF. Eine detaillierte Gegenüberstellung der Kultivierungen in unterschiedlichen Kultivierungssystemen erfolgt in **Kapitel 2.5.1.6**.

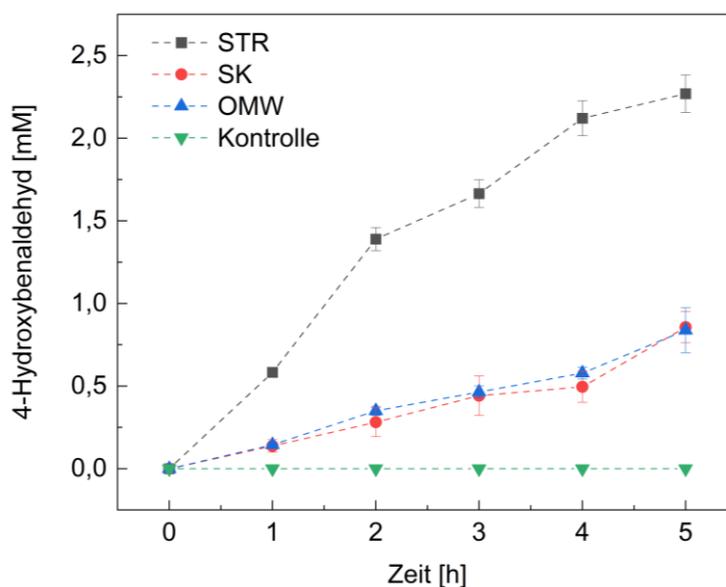


**Abbildung 34:** Online-Daten der *E. coli* K12 Kultivierung zur rekombinanten Produktion von NoCAR im 3D-gedruckten OMW. Kultivierungsbedingungen: Volumen: 12,5 mL, Medium: TB, Temperatur: 37°C Wachstumsphase, 16°C Produktionsphase, Schüttelfrequenz: 345 rpm, Induktion: bei OD<sub>600</sub>≈1,4 rel.AU mit 0,2 mM IPTG. Online-Überwachung mittels SFR vario.

### 2.5.1.5 Ganzzellkatalytische Reduktion von 4-Hydroxybenzoesäure

Um die Qualität der in verschiedenen Kultivierungssystemen hergestellten *NoCAR* zu untersuchen, sollte die Aktivität des Enzyms untersucht werden. Da CARs sowohl ATP- als auch NADPH-abhängig sind, ist ein Cofaktorregenerationssystem erforderlich, um den Einsatz von teuren Cofaktoren in stöchiometrischen Mengen zu vermeiden. Die einfachste Möglichkeit für solch ein System ist die Anwendung von CARs in der ganzen Zelle. Dabei kann das zelleigene Cofaktorregenerationssystem genutzt werden und es muss lediglich Glucose für die metabolischen Funktionen der Zellen bereitgestellt werden [162]. In dieser Arbeit wurde die Funktionalität des Enzyms mit Hilfe des 2-Aminobenzamidoxim (ABAO) Assays untersucht, welcher chemoselektiv ist und die Quantifizierung von Aldehyden in Gegenwart von Zellen, Alkoholen und Carbonsäuren ermöglicht (Methode siehe **Kapitel 4.3.4.1**) Der Assay basiert auf der Reaktion des entstehenden Aldehyds mit dem ABAO in saurem wässrigem Natriumacetatpuffer. Dabei bildet sich ein UV-aktives und fluoreszierendes Dihydrochinazolin, welches den Nachweis und die Quantifizierung des Aldehyds ermöglicht [163]. In dieser Arbeit wurde 4-Hydroxybenzoesäure als Substrat verwendet, welches von *NoCAR* zu 4-Hydroxybenzaldehyd reduziert wird.

Es wurden Zellen aus den drei verwendeten Kultivierungssystemen (OMW, SK, STR) verwendet. Als Kontrolle wurde das Medium ohne Zellen verwendet und mit dem Substrat versetzt. Die eingesetzten Proben wurden jeweils auf eine OD<sub>600</sub> von 10 rel.AU eingestellt. Die Biotransformation zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde in 24-Deep Well Platten durchgeführt.



**Abbildung 35:** Vergleich der ganzzellkatalytischen Reduktion von 4-Hydroxybenzoesäure zu 4-Hydroxybenzaldehyd durch *NoCAR* aus verschiedenen Kultivierungsgefäßen. *NoCAR* wurde durch Kultivierungen im STR, Schüttelkolben (SK) und dem 3D-gedruckten OMW gewonnen, als Kontrolle wurde Medium verwendet. Nachweis des Aldehyds erfolgte mittels ABAO-Assays. Initiale Substratkonzentration: 2,5 mM 4-Hydroxybenzoesäure, Temperatur: 25°C, Wellenlänge: 380 nm. Die Reaktionen wurden in dreifacher technischer Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die Ergebnisse des Assays sind in **Abbildung 35** dargestellt. Insgesamt ist zu erkennen, dass bei allen Reaktionsansätzen die Aldehydkonzentration über die Zeit zunimmt, und somit die 4-Hydroxybenzoesäure zu 4-Hydroxybenzaldehyd durch die CAR reduziert wurde. Nach einer Stunde konnte in der Probe aus dem STR bereits eine Aldehydkonzentration von  $0,58 \pm 0,03$  mM ermittelt werden. Nach zwei Stunden wurde bereits die Hälfte des eingesetzten Substrates umgesetzt und es wurde eine Aldehydkonzentration von  $1,38 \pm 0,07$  mM bestimmt. In den darauffolgenden drei Stunden, nimmt die Aldehydkonzentration langsamer zu. Nach einer Reaktionszeit von fünf Stunden fand eine nahezu vollständige Reduktion der 4-Hydroxybenzoesäure zu 4-Hydroxybenzaldehyd statt. Die finale Aldehydkonzentration beträgt  $2,27 \pm 0,11$  mM. Dies entspricht einem Umsatz von 90,8 %. Die Reaktionsansätze mit den Zellen aus den beiden geschüttelten Reaktionsgefäßen zeigen ebenfalls einen Anstieg in der Aldehydkonzentration über den Reaktionszeitraum von fünf Stunden. Jedoch ist hier sowohl in dem Ansatz aus dem SK als auch aus dem OMW, eine lineare Zunahme der Produktkonzentration zu erkennen. Außerdem wird in den Proben aus dem SK lediglich eine finale Aldehydkonzentration von  $0,86 \pm 0,09$  mM und in den Proben aus dem OMW von  $0,83 \pm 0,14$  mM erreicht. Somit wurden nur 34,4 % bzw. 33,2 % des eingesetzten Substrates umgesetzt. Obwohl in beiden Verläufen noch keine Abnahme der

Steigung und somit der Reaktionsgeschwindigkeit erkennbar ist, wäre eine längere Reaktionszeit nicht empfehlenswert. Zu lange Reaktionszeiten führen aufgrund der Flüchtigkeit des Aldehyds zu verringerten Produktkonzentrationen. Außerdem können Nebenreaktionen in der Zelle zu einer verfälschten Aldehydkonzentration führen [163].

### 2.5.1.6 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme

Zur Beurteilung der Übertragbarkeit des Bioprozesses zur rekombinanten Produktion von NoCAR in *E. coli* K12 auf das 3D-gedruckte OMW wurden relevante Parameter der Kultivierungen in den verschiedenen Kultivierungssystemen in **Tabelle 4** zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Gegenüberstellung von Prozessparameters zum Vergleich der Kultivierung von *E. coli* K12 zur Produktion von NoCAR in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen : OMW, Schüttelkolben (SK) und 2L-Rührkesselreaktor (STR).

Parameter		OMW	SK	STR
Zeit bis Induktion	[h]	1,4	1,37	1,5
Wachstumsrate $\mu_{\max}$	[h <sup>-1</sup> ]	0,074	0,08	0,12
BTM	[g * L <sup>-1</sup> ]	5,26	6,08	3,89
OD <sub>600_final</sub>	[rel.AU]	16,1	15,9	9,08
NoCAR SF	[ $\mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$ ]	201,93	250,18	258,85
NoCAR IF	[ $\mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$ ]	146,24	65,73	52,48
Y <sub>P/X</sub>		0,038	0,041	0,066
Enzymatischer Umsatz	[%]	34,4	33,2	90,8

Werden zunächst die beiden geschüttelten Systeme, OMW und SK, gegenübergestellt, ist zu erkennen, dass die Kultivierungsparameter vergleichbar sind. Nach der 24-stündigen Expressionsphase wurde im OMW eine OD<sub>600</sub> von 16,1 rel.AU und im SK von 15,9 rel.AU erreicht. Die Wachstumsraten, welche mit Hilfe des online aufgezeichneten Biomassesignals bestimmt wurden, zeigen mit 0,074 h<sup>-1</sup> und 0,08 h<sup>-1</sup> ebenfalls eine gute Übereinstimmung. Die densitometrisch ermittelten Konzentrationen des Zielproteins NoCAR in der löslichen und unlöslichen Fraktion unterscheiden sich jedoch voneinander. In dem 3D-gedruckten OMW ist die Konzentration an unlöslichen NoCAR mit 146,24  $\mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$  im Vergleich zum SK mit 65,73  $\mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$  um 122,5 % deutlich höher. Die Konzentration an löslichem NoCAR ist im OMW 19,29 % geringer als im SK. Somit wurde im 3D-gedruckten Kultivierungsgefäß trotz gleicher Wachstumsbedingungen ein schlechteres Verhältnis zwischen löslichem und

unlöslichem Protein erzielt. Eine mögliche Ursache könnte ein schlechterer Kühlvorgang bei der OMW-Kultivierung sein. Durch die Verwendung eines Tischschüttlers zusammen mit einer Inkubationshaube, bei der die Temperierung über einen einseitigen Luftstrom erfolgt, kann es zu einem Temperaturgradienten innerhalb der Inkubationshaube kommen. Wie die Ergebnisse zur Bestimmung der optimalen Kultivierungsbedingungen gezeigt haben, hat die Temperatur den größten Einfluss auf die Bildung von inclusion bodies. Somit könnte der größere Anteil an unlöslichem NoCAR im OMW durch eine nicht-optimale Temperierung auf 16°C verursacht worden sein.

Werden nun die Ergebnisse der beiden geschüttelten Systeme mit dem regulierten Bioreaktor verglichen, ist zu erkennen, dass bei gleicher initialer OD<sub>600</sub> und gleichen Induktionsbedingungen in den geschüttelten Systemen höhere BTM und OD<sub>600</sub>-Werte erzielt werden. Jedoch zeigen die berechneten Ausbeutekoeffizienten ( $Y_{P/X}$ ), dass im STR pro Gramm Zellen mehr lösliches Protein gebildet wird als in den geschüttelten Systemen. Dies spricht dafür, dass durch die kontrollierte Umgebung im Bioreaktor eine effizientere Entkopplung von Wachstums- und Produktionsphase erfolgte. Die untersuchte Aktivität des Enzyms im ganzzellkatalytischen System mit den Zellen aus dem Bioreaktor liegt mit einem Umsatz von 90,8 % über denen der geschüttelten Systeme. Die Enzymaktivität ist unter anderem vom pH-Wert abhängig. Im Gegensatz zum geregelten Bioreaktor findet in den geschüttelten Systemen keine pH-Regulierung statt, sodass sich der pH-Wert im Laufe der Kultivierung ändert und von dem pH-Optimum von pH 7 abweicht, wodurch die spätere Enzymaktivität beeinflusst wird.

#### 2.5.1.4 Zusammenfassung und Fazit

Es konnte ein Bioprozess zur heterologen Produktion einer Carboxylsäurereduktase in *E. coli* K12 etabliert werden. Dafür wurden mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung optimale Kultivierungsbedingungen bestimmt. Somit konnte durch eine Induktion mit 0,2 mM IPTG bei einer optischen Dichte zwischen 1 rel.AU und 2,5 rel.AU, welches der mittleren exponentiellen Wachstumsphase entspricht, bei einer Temperatur von 16°C eine maximale Produktausbeute an löslichem NoCAR von 250,18 µg mL<sup>-1</sup> im Schüttelkolben erzielt werden. Anschließend fand eine erfolgreiche Maßstabsübertragung in den 2 L-Rührkesselreaktor statt. Durch die Übertragung in den STR wurde der Produktausbeutekoeffizient um 37,88 % gesteigert. Außerdem wurde gezeigt, dass der

Bioprozess im 3D-gedruckten OMW durchgeführt werden kann und eine Online-Überwachung der kritischen Prozessparameter über den gesamten Prozessverlauf möglich war. Darüber hinaus verhielt sich das OMW fast genau gleich wie ein Schüttelkolben und zeigt damit ein großes Potential als alternatives Kultivierungsgefäß zum herkömmlichen Schüttelkolben. Die ganzzellkatalytische Reduktion der 4-Hydroxybenzoesäure zeigte, dass das Enzym aus allen drei Kultivierungssystemen aktiv ist. Die Verwendung des kontrollierten STR zur Herstellung von NoCAR führte jedoch unter gleichen Versuchsbedingungen zu einem höheren Umsatz im Vergleich zu den beiden geschüttelten Systemen.

### 2.5.2 Ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli*

Als zweiter Modellprozess zur Validierung des OMWs wurde die Produktion eines small molecules mit einem pathway-optimierten Mikroorganismus am Beispiel des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli* gewählt.

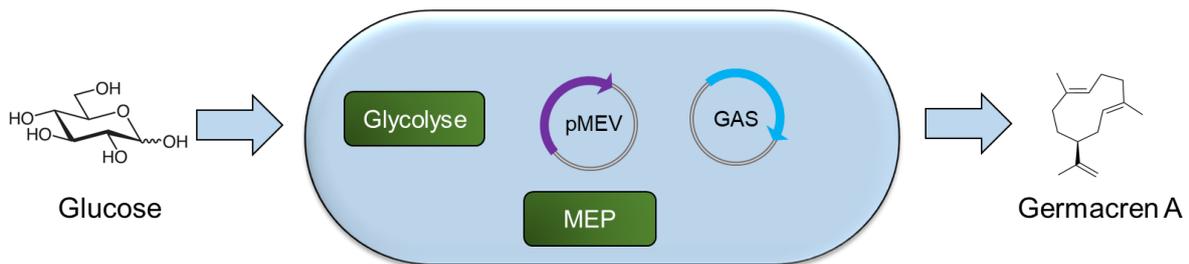
Natürliche Pflanzenstoffe sind heute wichtige Bestandteile von Parfüms, Kosmetika, Lebensmitteln, Körperpflegemitteln, Insektiziden und pharmazeutischen Produkten [164–166]. Diese Stoffe gehören zu der Naturstoffklasse der Terpene, die über 60.000 verschiedene Verbindungen umfasst [167]. Sie sind bedeutende Bestandteile aller Einzeller und multizellulären Organismen und kommen sowohl im Primär- als auch Sekundärstoffwechsel vor [166, 168]. In allen Organismen basieren Terpene auf der Kondensation der beiden Kohlenstoffeinheiten Isopentylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Die Synthese dieser beiden universellen Vorläufer erfolgt bei Pilzen, Tieren und Pflanzen über den Mevalonat-Weg (MVA), während Bakterien den 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat-Weg (MEP) nutzen [169, 170]. Aufgrund ihrer immensen strukturellen Vielfalt weisen diese Verbindungen ein breites Spektrum an biologischer Aktivität auf und sind in der Natur für eine Vielzahl von Funktionen verantwortlich [166]. Ursprünglich werden Terpene aus pflanzlichem Gewebe extrahiert. Die natürlichen Quellen liefern jedoch im Allgemeinen nur geringe Erträge, wodurch die Nachfrage des Weltmarktes nicht immer gedeckt werden kann [166]. Außerdem ist der Ernteertrag von den sich ändernden klimatischen Bedingungen oder von dem Krankheitsbefall der Pflanzen abhängig.

Fortschritte in der Molekularbiologie und dem Metabolic Engineering ermöglichten die heterologe Produktion von Terpenen in Bakterien und Hefen [166, 171–173]. Die Produktion komplexer Terpenmoleküle in Mikroorganismen bietet im Vergleich zu herkömmlichen Methoden mehrere Vorteile in Bezug auf Skalierbarkeit, Verbrauch natürlicher Ressourcen und Nachhaltigkeit der Prozesse. Darüber hinaus können diese Moleküle in großem Maßstab ganzzellkatalytisch aus kostengünstigen Kohlenstoffquellen bereitgestellt werden, wodurch wertvolle Wirkstoffe oder Wirkstoffvorstufen leichter zugänglich werden [174].

Germacren A ist ein wichtiges Intermediat für die Synthese verschiedener Wirkstoffe, insbesondere für das Sesquiterpen  $\beta$ -Elemen, welches eine proliferationshemmende Wirkung bei einigen Krebszelltypen zeigt [175, 176]. Derzeit erfolgt die Gewinnung von Elemen mittels Extraktion aus der Ingwerpflanze *Curcuma wenyujin* oder durch chemische Synthese. Aufgrund des geringen Gehalts, des komplizierten Extraktionsverfahrens und der hohen Kosten ist seine praktische Anwendung jedoch weitgehend eingeschränkt [177]. Allerdings kann es sehr einfach durch den Einfluss von Hitze oder Säure mittels einen einzigen molekularen Umlagerungsschritt, einer Cope-Umlagerung, aus Germacren A gewonnen werden [178].

In dieser Arbeit wird die biotechnologische Produktion des Sesquiterpens Germacren A aus der Schafgarbe *Achillea millefolium* durch einen metabolisch optimierten *E. coli* Stamm gezeigt (siehe **Abbildung 36**).

Die Klonierung verschiedener *E. coli* Stämme und deren ersten Charakterisierungen hinsichtlich Produktivität wurden in Vorarbeiten am Institut für Technische Chemie durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Stämme erstellt, die jeweils zwei Plasmide enthalten. Ein Plasmid kodiert für das Schlüsselenzym Germacren A Synthase (GAS), welche die 1,10-Cyclisierung des E,E-Farnesyl-Diphosphats katalysiert [179]. Das zweite Plasmid (pBbA5c-MevT-MBIS (pMev)) kodiert für die acht Enzyme des pflanzlichen MEV-Stoffwechselwegs. Produkt dieses Stoffwechselweges ist Farnesylpyrophosphat und ist das Vorläufermolekül für das Sesquiterpen Germacren A.



**Abbildung 36:** Schematische Darstellung des stoffwechseleoptimierten *E. coli* Stamms zur ganzzellkatalytischen Produktion von Germacren A mit endogenem Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) und dem heterolog eingebrachten Mevalonatweg (MEV-Weg).

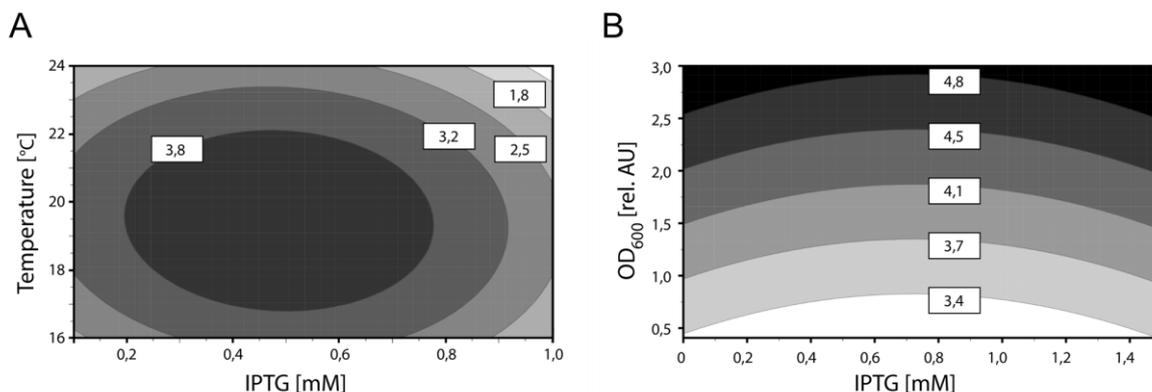
Obwohl nur ein geringer Anteil an small molecules in löslicher Form nachgewiesen werden konnte (siehe **Kapitel 4.1.2, Abbildung 47**), wurde das Produkt Germacren A bzw. dessen Umlagerungsprodukte  $\beta$ -Elemen,  $\alpha$ -Guaien und  $\alpha$ -Selenen mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometer (GC-MS) identifiziert (siehe **Kapitel 4.1.2, Abbildung 48**). Aus der Literatur ist bekannt, dass die hohe Injektionstemperatur bei der GC-Analyse von über 200°C zur Cope-Umlagerung führen [178, 180, 181]. Somit konnte Germacren A indirekt über das Umlagerungsprodukt  $\beta$ -Elemen nachgewiesen werden

In dieser Arbeit wurde mit dem vielversprechendsten Stamm (*E. coli* Tuner pET26bGAS + pMEV) weitergearbeitet und mögliche Kultivierungsbedingungen zur ganzzellkatalytischen Produktion von Germacren A identifiziert. Anschließend wurde der Prozess auf den 2 L-Rührkesselreaktor übertragen sowie die Übertragbarkeit in das 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß (OMW) untersucht und miteinander verglichen. Außerdem wurden verschiedene Produktgewinnungsstrategien untersucht und bewertet.

### 2.5.2.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben

Zur Steigerung der *in vivo* produzierten Germacren A-Konzentration wurden die Kultivierungsbedingungen hinsichtlich Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt und Temperatur während der Expressionsphase in 125 mL-Glasschüttelkolben optimiert. Dafür wurde ein Temperaturbereich für die Expressionsphase zwischen 16°C und 24°C untersucht. Die Induktion fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten des bakteriellen Wachstums statt, so dass bei OD<sub>600</sub>-Werten zwischen 0,5 rel.AU und 3,0 rel.AU mit einer Induktorkonzentration zwischen 0,1 mM und 1 mM IPTG induziert wurde. 24 h nach Induktion wurden Proben entnommen und eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Isooctan durchgeführt, um

anschließend die Produktkonzentration mittels GC/FID zu bestimmen (Methode siehe **Kapitel 4.3.5**).



**Abbildung 37:** Optimierung der Induktionsbedingungen für die ganzzellkatalytische Produktion von Germacren A in *E. coli* Tuner in 125 mL Glas-Schüttelkolben mit TB-Medium. **A:** Abhängigkeit von Temperatur und IPTG-Konzentration. **B:** Abhängigkeit von IPTG-Konzentration und OD<sub>600</sub> bei Induktion.

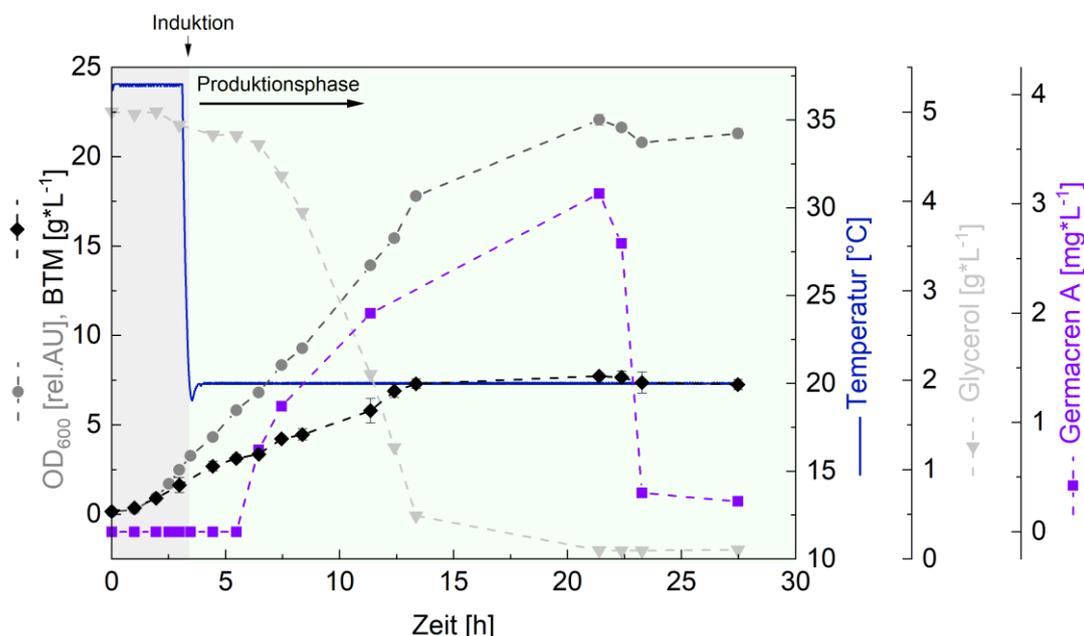
Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen der Temperatur während der Expressionsphase und der IPTG-Konzentration untersucht. Dafür wurden die Kulturen anfänglich bei 37°C kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 rel.AU und 1 rel.AU erreicht wurde. Dann erfolgte die Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM). Außerdem wurde die Temperatur auf 24°C, 20°C oder 16°C gesenkt, um einen möglichst hohen Anteil an löslichem Protein zu erhalten und damit eine hohe Konzentration an Germacren A. In **Abbildung 37 A** sind die mittels GC-FID ermittelten Produktkonzentrationen in Abhängigkeit der Induktorkonzentration und Temperatur während der Expressionsphase dargestellt. Die höchste Produktkonzentration von 4,36 mg·L<sup>-1</sup> wurde bei der Kultur erreicht, die mit 0,5 mM IPTG induziert wurde und anschließend bei 20°C weiter kultiviert wurde. Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen Induktionszeitpunkt und IPTG-Konzentration untersucht. Dafür wurden die Kulturen bei unterschiedlichen optischen Dichten induziert (0,4 rel.AU, 0,6 rel.AU, 1 rel.AU, 2,5 rel.AU und 3 rel.AU). Die Ergebnisse in **Abbildung 37 B** zeigen, je später die Expression induziert wurde, desto mehr Produkt wurde im Kulturmedium quantifiziert. Die IPTG-Konzentration hat dabei keinen signifikanten Einfluss. Die höchste Produktkonzentration von 5,49 mg·L<sup>-1</sup> wurde durch die Induktion mit 0,5 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 3 rel.AU erzielt. Eine noch spätere Induktion erhöhte die Konzentration nicht weiter (Daten nicht

gezeigt). Daher werden für weitere Kultivierungen folgende Kultivierungsbedingungen festgelegt: Induktion bei 3 rel.AU mit 0,5 mM IPTG und eine Temperatur von 20°C.

### 2.5.2.2 Kultivierung im 2 L-Rührkesselreaktor

Nachdem die optimalen Bedingungen für die ganzzellkatalytische Produktion von Germacren A in *E. coli* Tuner (DE3) gefunden wurden, wurde der Prozess in einen 2 L-Rührkesselreaktor (BIOSTAT® A, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) übertragen.

Inokuliert wurde der Reaktor auf eine optische Dichte von 0,2 rel.AU mit einer VK in LB-Medium. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von 3 rel.AU erreicht wurde. Die Reaktortemperatur wurde auf 20°C gesenkt und anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Während der Kultivierung wurden Proben zur analytischen Untersuchung der OD<sub>600</sub>, BTM und Glycerol-Konzentration entnommen. Außerdem wurde zur Beurteilung der Germacren A Produktion zu jedem Probenzeitpunkt eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Isooctan durchgeführt und anschließend mittels GC/FID quantifiziert. Die Daten sind in **Abbildung 38** dargestellt.



**Abbildung 38:** Heterologen Produktion von Germacren A in *E. coli* Tuner im 2 L-Rührkesselreaktor. Versuchsbedingungen: Volumen: 1,5 L, Temperatur Wachstumsphase: 37°C, Temperatur Expressionsphase: 20°C, IPTG-Konzentration: 0,5 mM; Induktionszeitpunkt: 3 rel.AU, pH: 7,0.

Es ist zu erkennen, dass die Kultur nach einer sehr kurzen lag-Phase in die exponentielle Wachstumsphase mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,86 \text{ h}^{-1}$  übergeht. Nachdem die Kultur nach 3,5 Stunden eine  $OD_{600}$  von 3,2 rel.AU erreichte, wurde die Temperatur auf 20°C gesenkt und die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die geringe Temperatur von 20°C führt dazu, dass die Zellen in ein lineares Wachstumsverhalten übergehen mit einem  $\mu_{\max}$  von  $0,12 \text{ h}^{-1}$ . Drei Stunden nach der Induktion wurde das erste Mal Germacren A mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  im Kulturüberstand detektiert. Anschließend nahm die Konzentration an Germacren A kontinuierlich zu, während die Glycerolkonzentration stetig abnahm. Nach einer Prozesszeit von 21,4 h wurde die maximale Germacren A Konzentration von  $3,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  bestimmt bei der maximalen  $OD_{600}$  von 22,07 rel.AU und einer BTM von  $7,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung war die Kohlenstoffquelle (Glycerol) verbraucht. Anschließend ist keine weitere Zunahme in der Biomasse zu erkennen. Die Produktkonzentration fällt rapide ab und 24 h nach Induktion betrug die Produktkonzentration im Medium lediglich  $0,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Da die plötzliche Abnahme des Produktes mit dem Verbrauch von Glycerol einherging, ist davon auszugehen, dass das Sesquiterpen von *E. coli* aufgrund des Nährstoffmangels verstoffwechselt wurde. Gleiche Beobachtungen wurden auch bei der *in vivo* Produktion des Sesquiterpens  $\alpha$ -Humulen gemacht und bestätigt [182].

### 2.5.2.3 Produktgewinnung von Germacren A im Schüttelkolben

Ein technischer Ansatz zur Verhinderung des Abbaus von Germacren A und zur Verbesserung der Produktivität ist die *in situ* Produktgewinnung (ISPR) zur direkten Abtrennung des Produktes vom produzierenden Biokatalysator [183]. Die ISPR ist in biotechnologischen Prozessen eine häufig gewählte Methode. Insbesondere dann, wenn Produkte oder Nebenprodukte mit einer inhibierenden oder toxischen Wirkung entstehen oder es zum Produktabbau kommt [184]. Dadurch bieten sich ökonomische Vorteile für den Gesamtprozess, da die Produktausbeute erhöht werden kann [185]. Es können unterschiedliche ISPR-Methoden zur Gewinnung des Terpens angewendet werden. Entweder werden flüssige oder feste Extraktionsmittel verwendet. Dabei wird das Terpen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen oder Adsorption gebunden und damit der Abbau bzw. die Verflüchtigung verhindert. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wird ein organisches Lösungsmittel direkt zu der wässrigen Phase (Zellsuspension in Medium) in das

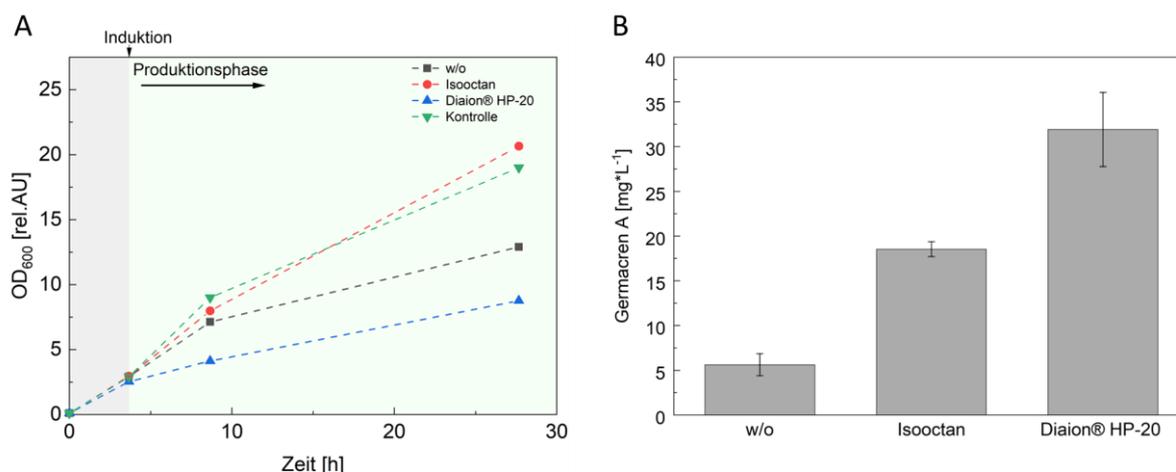
Kultivierungsgefäß gegeben. Anstatt des flüssigen Extraktionsmittels kann auch ein festes gewählt werden. Bei der Fest-Flüssig-Extraktion werden z.B. Zeolithe, Aktivkohle oder polymere Adsorber verwendet, um das Terpen aus der Kulturbrühe zu adsorbieren. Anschließend wird das adsorbierte Produkt mit Hilfe einem geeigneten organischen Lösemittel vom festen Träger desorbiert [186].

Im Folgenden wurden zwei verschiedene ISPR-Strategien zur Erhöhung der Germacren A Ausbeute im Schüttelkolben untersucht. Dabei wurden je Methode drei Kultivierungen durchgeführt. Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde unmittelbar nach Induktion durch IPTG 10 % (v/v) Isooctan zugegeben. Nach der Kultivierung wurde das Zwei-Phasensystem durch Zentrifugation getrennt und eine Probe zu Quantifizierung der Germacren A Konzentration aus der organischen Phase entnommen. Verglichen wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einer Fest-Flüssig-Extraktion. Als festes Extraktionsmittel wurde ein polymerer Adsorber (Diaion® HP20) verwendet (Methode siehe **Kapitel 4.3.5.2**). Nach der Kultivierung wurde eine definierte Menge Adsorber entnommen und das Produkt mit Hilfe von Isooctan desorbiert und anschließend mittels GC/FID quantifiziert. Die Kontrollkulturen enthielten kein Extraktionsmittel. Nach Beenden der Kultivierung wurde eine Probe entnommen und das Produkt mit Isooctan extrahiert.

Die Kulturen wurden unter den Standardbedingungen mit oder ohne (w/o) Extraktionsmittel kultiviert. Zur Beurteilung des Wachstums in Gegenwart der verschiedenen Extraktionsmittel wurden 5 h und 24 h nach Induktion die Zelldichte anhand der optischen Dichte ermittelt (**Abbildung 39 A**). Bis zum Zeitpunkt der Induktion unterscheidet sich das Wachstum aller Kulturen nicht voneinander. 5 h nach der Induktion ist bereits zu erkennen, dass sich zum einen die Proteinexpression negativ auf das Wachstum auswirkt. Außerdem ist erkennbar, dass durch die Anwesenheit der Adsorberpartikel in der Kulturbrühe das Wachstum negativ beeinflusst wird. Während die anderen Kulturen eine  $OD_{600}$  zwischen 7,12 rel.AU und 9 rel.AU aufweisen, konnte in den Kulturen mit den Adsorbentien lediglich eine  $OD_{600}$  von 4,12 rel.AU ermittelt werden. 24 h nach Induktion ist ein deutlicher Unterschied in den erreichten optischen Dichten zu verzeichnen. Die nicht induzierten Kulturen und die Kulturen mit Flüssig-Flüssig ISPR zeigen eine finale  $OD_{600}$  von 19 rel.AU bzw. 20,65 rel.AU. Die Kulturen ohne ISPR erreichten eine  $OD_{600}$  von 12,9 rel.AU und die Kulturen mit den Adsorbentien von 8,76 rel.AU. Eine mögliche Ursache für das eingeschränkte Wachstum der Zellen in Gegenwart der Adsorberpartikel, könnte die

schlechtere Sauerstoffversorgung sein. Da sich die Partikel auf der Oberfläche des Kulturmediums befinden und somit die Sauerstoffversorgung beeinträchtigen könnten. Eine stetige Produktabtrennung könnte außerdem dazu führen, dass sich der Metabolismus der Zellen mehr auf die ganzzellkatalytische Produktion von Germacren A als auf das Zellwachstum fokussiert.

Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt 27 h mit einer 24-stündig anhaltenden Produktionsphase wurde in allen Ansätzen die Germacren A Konzentration bestimmt (siehe **Abbildung 39 B**). Durch die Anwendung beider ISPR-Methoden konnte die Konzentration an Germacren A signifikant gesteigert werden. Die höchste Konzentration an Germacren A konnte über die Adsorption von Germacren A mit dem Diaion® HP-20 erreicht werden. Der Produkttiter war im Vergleich zu den Kulturen ohne ISPR um das 5,6-fache höher. Durch das Flüssig-Flüssig-ISPR-Verfahren konnte die Germacren A Konzentration um das 3,3-fache gesteigert werden.



**Abbildung 39:** Vergleich verschiedener Produktgewinnungsstrategien des Sesquiterpenes Germacren A. **A:** Wachstumsverläufe von *E. coli* Tuner pET26bGAS\_MEV + pMEV in Gegenwart von 10 % (v/v) Isooctan zur Flüssig-Flüssig-Extrakt, dem Adsorber Diaion® HP-20 und ohne ISPR-Zusatz (w/o). Kontrolle stellt eine nicht induzierte Kultur dar. **B:** Germacren A Konzentration nach 24 h Produktionsphase quantifiziert mittels GC-FID. n=3

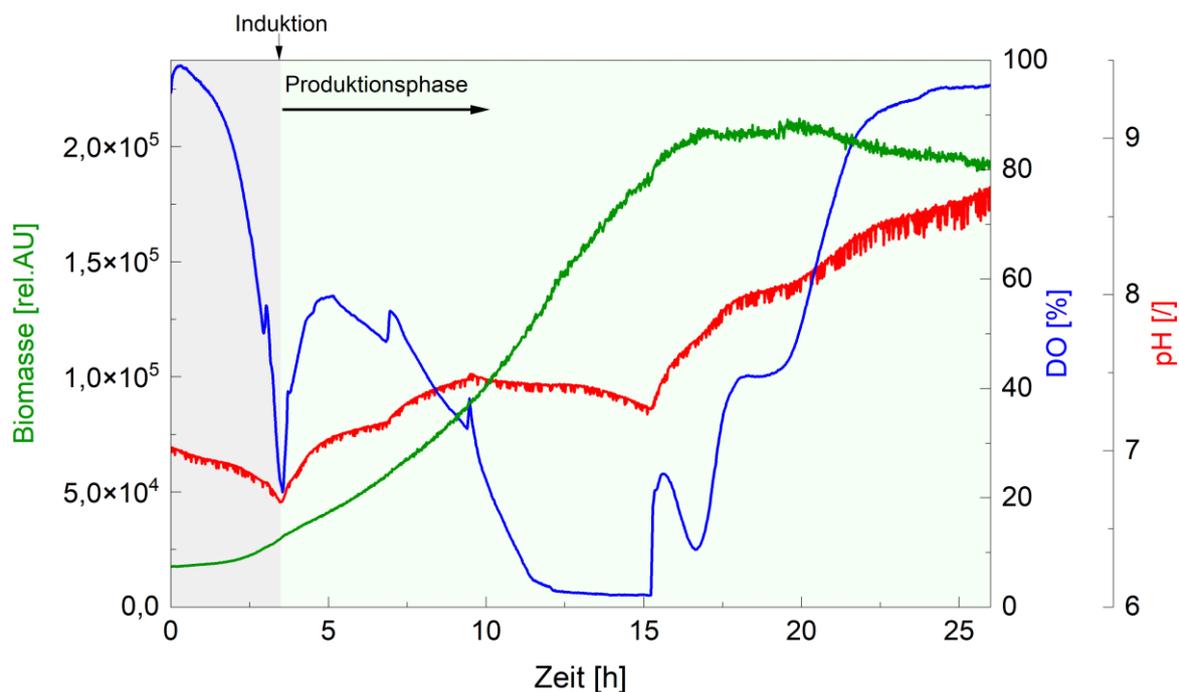
Die Verwendung des Adsorbers Diaion® HP-20 führt zwar zu einem geringeren Zellwachstum, dennoch können deutlich größere Mengen Germacren A nach 24 h nachgewiesen werden. Durch die Optimierung der Anwendung des Adsorbers in Hinblick auf Adsorbermenge und Desorptionsbedingungen könnte die Produktmenge weiter gesteigert werden.

#### 2.5.2.4 Kultivierung im 3D-gedruckten OMW

Der entwickelte Bioprozess zur *in vivo* Produktion von Germacren A sollte ebenfalls als Anwendungsbeispiel zur Validierung des 3D-gedruckten OMWs genutzt werden. Dafür wurde der *E. coli* Tuner Stamm unter den gleichen Bedingungen wie im SK und 2 L-Reaktor kultiviert. Voruntersuchungen mit den zwei ISPR-Strategien (Lösemittel und Adsorber Partikeln) ergaben, dass beide Ansätze nicht mit der Streulichtmessung des SFR varios kompatibel sind. Daher wurde der Prozess im OMW ebenfalls ohne ISPR-Strategie durchgeführt.

Dafür wurden 12,5 mL TB-Medium und entsprechende Antibiotika in das zuvor autoklavierte OMW gegeben und auf eine initiale OD<sub>600</sub> von 0,2 rel.AU inokuliert. Anschließend wurde das OMW auf den SFR vario auf einen Tischschüttler mit einem Schütteldurchmesser von 25 mm montiert. Für die Temperierung wurde eine Certomat Inkubationshaube verwendet.

Die mit Hilfe des SFR varios aufgezeichneten Online-Daten von pH, DO und Biomasse sind in **Abbildung 40** dargestellt. Die Wachstumsphase, welche bei 37°C erfolgte, ist durch eine lag-Phase gekennzeichnet. In diesen 2,5 h steigt das Biomassesignal von 17.626 rel.AU auf 22.443 rel.AU an. Nach 3,5 h erreichte die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 3,12 rel.AU. Zur Induktion wurde die Temperatur auf 20°C abgesenkt und 0,5 mM IPTG hinzugegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist die Gelöstsauerstoffkonzentration bereits auf 21 % abgefallen. Außerdem ist eine Abnahme des pH-Wertes in den ersten 3,5 h zu verzeichnen. Die Temperatursenkung spiegelt sich in einem Anstieg im DO-Signal wider sowie in einem verlangsamten Anstieg des Biomassesignals. 1,5 h nach Induktion ist eine erneute Abnahme im DO-Signal erkennbar, was mit einem stärkeren Anstieg des Biomassesignals einhergeht. Nach einer Prozesszeit von ca. 12 h zeigt das DO-Signal eine Sauerstofflimitierung auf, die für 3 h andauert. 13,5 h nach Induktion ist keine signifikante Zunahme im Biomassesignal mehr zu verzeichnen und somit die stationäre Wachstumsphase kennzeichnet. Der Prozess wurde nach einer Gesamtzeit von 25,8 h bei einer finalen OD<sub>600</sub> von 24 rel.AU beendet.



**Abbildung 40:** Online-Daten der *E. coli* Tuner Kultivierung zur heterologen ganzzellkatalytischen Produktion des Sesquiterpens Germacren A im 3D-gedruckten OMW. Kultivierungsbedingungen: Volumen: 12,5 mL, Medium: TB, Temperatur: 37°C Wachstumsphase, 20°C Produktionsphase, Schüttelfrequenz: 345 rpm, Induktion: bei  $OD_{600} \approx 3$  rel.AU mit 0,5 mM IPTG. Online-Überwachung mittels SFR vario.

### 2.5.2.5 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme

Zur Beurteilung der Übertragbarkeit des Bioprozesses zur ganzzellkatalytischen Produktion des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli* Tuner auf das 3D-gedruckte OMW wurden wichtige Kennparameter des Prozesses in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bestimmt und in **Tabelle 5** zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Gegenüberstellung von Prozessparameters zum Vergleich der Germacren A-Produktion in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen : OMW, Schüttelkolben (SK) und 2 L-Rührkesselreaktor (STR).

Parameter		OMW	SK	STR
BTM	[g*L <sup>-1</sup> ]	7,85	8,15	7,3
OD <sub>600_final</sub>	[rel.AU]	24	23,6	21,3
Wachstumsrate $\mu_{max}$	[h <sup>-1</sup> ]	0,17	0,17	0,17
Germacren A <sub>final</sub>	[mg*L <sup>-1</sup> ]	8,25	7,5	0,28
Y <sub>P/X</sub>		0,001	0,0009	0,000038

Die wachstumsbezogenen Parameter  $OD_{600}$ , BTM und die maximale Wachstumsrate zeigen in allen drei verwendeten Systemen eine hohe Übereinstimmung. Die final erreichten optischen Dichten liegen zwischen 21,3 rel.AU im STR und 24 rel.AU im OMW. Die maximalen Wachstumsraten von  $0,17 \text{ h}^{-1}$  in allen Systemen belegen die gute Übertragbarkeit des Prozesses auf das OMW. Einen deutlichen Unterschied ergeben sich in den finalen Produktkonzentrationen. Im STR lag die finale Germacren A Konzentration lediglich bei  $0,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Als eine Ursache wurde bereits der Produktabbau nach Erschöpfung der Kohlenstoffquelle erläutert (siehe **Kapitel 2.5.2.2**). Da die Produktkonzentrationen in den geschüttelten Systemen mit  $7,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  im SK und  $8,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  im OMW jedoch auch deutlich höher liegen als die maximale Konzentration im STR, könnte die Begasung des STRs einen weiteren Einfluss haben. Die aktive Begasung über ein Begasungsrohr in dem STR könnte dazu geführt haben, dass das flüchtige Produkt deutlich stärker aus dem Reaktor ausgetragen wurde als in den nicht-begasten geschüttelten Kulturen.

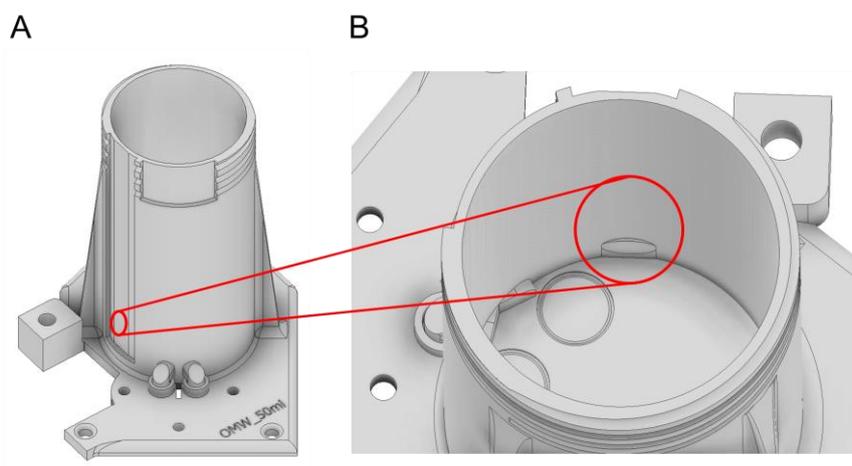
#### 2.5.2.6 Zusammenfassung und Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass das Sesquiterpen Germacren A *in vivo* in einem metabolisch optimierten *E. coli* Stamm produziert werden konnte. Die maximale Produktkonzentration wurde bei einer Induktion mit  $0,5 \text{ mM}$  IPTG bei einer  $OD_{600}$  von 3 rel.AU und einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  erreicht. Außerdem konnte der Prozess in einem 2 L-STR durchgeführt werden, jedoch zeigte sich dabei, dass die Limitierung der Kohlenstoffquelle zum Produktabbau führt. Außerdem begünstigt die aktive Begasung des Reaktors das Entweichen des flüchtigen Produktes aus dem System. Daher wurde eine *in situ* Produktgewinnung unter Verwendung eines Adsorbers getestet. Die Produktausbeute konnte dadurch um das 5,6-fache im Schüttelkolbenmaßstab gesteigert werden. Die Übertragbarkeit des Prozesses auf das 3D-gedruckte OMW war ebenfalls erfolgreich, was sich durch nahezu identische Prozessparameter im Vergleich zum Schüttelkolben zeigt. Allerdings lässt sich eine entsprechende ISPR-Strategie nicht im OMW abbilden, da der partikuläre Adsorber den Strahlengang für die Biomasseüberwachung stören würde. Insgesamt ist die Produktausbeute des Prozesses sehr gering. Dies könnte zum einen an dessen Instabilität liegen, aber auch an dem großen unlöslichen Anteil des Schlüsselenzyms Germacren A-Synthase (GAS). Wenn ein größerer Anteil an löslicher GAS exprimiert werden kann in der Kombination mit einer *in situ* Produktgewinnung, sollte die Ausbeute deutlich gesteigert

werden können. Dennoch zeigt dieses Anwendungsbeispiel das Potenzial der Biotechnologie hinsichtlich nachhaltigerer Gewinnung von Naturstoffen und die mögliche Anwendung von 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßen zur ganzzellkatalytischen Produktion eines small molecules für den Einsatz im mL-Maßstab inklusive Prozessüberwachung.

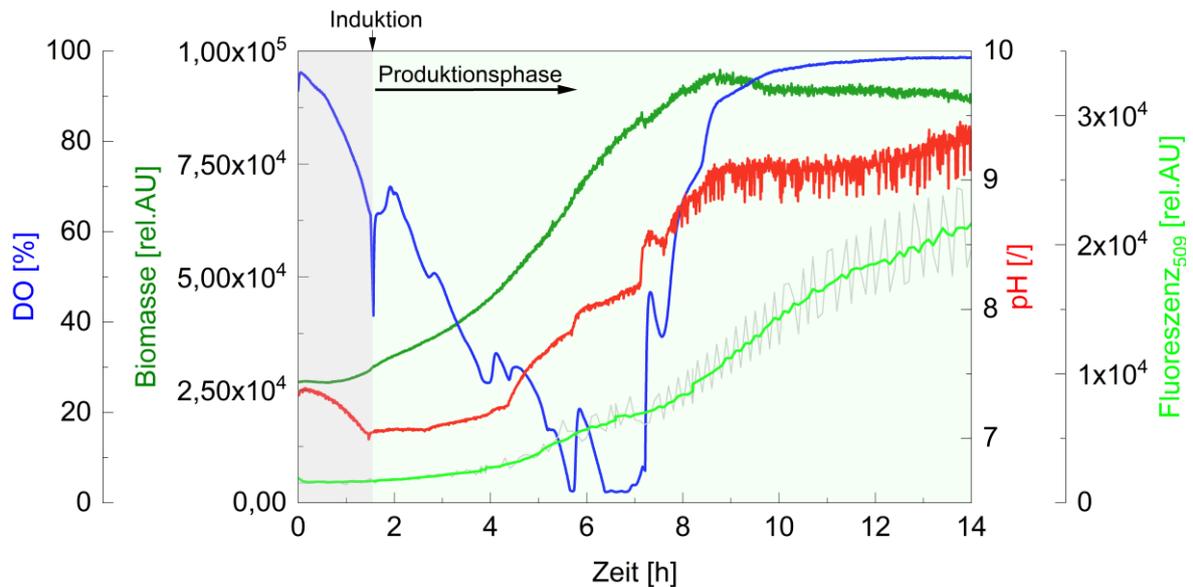
### 2.5.3 Rekombinante Produktion von GFP in *E. coli*

Als drittes Anwendungsbeispiel wurde ein bereits etablierter Prozess zur Produktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in *E. coli* gewählt. Der Stamm sowie die Kultivierungsbedingungen wurden von Zhaopeng Li übernommen [79]. Hier stand die Integration eines zusätzlichen kommerziellen Sensors im Vordergrund. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des GFPs ist ein Online-Produktmonitoring mit Hilfe eines Spektrometers (Flame Spectrometer, Ocean Insight Inc., Neuseeland) leicht zu realisieren. Für eine nicht-invasive Messung im 3D-gedruckten OMW wurde ein zusätzliches optisches Fenster seitlich zur Biomasseoptik in die Gefäßwand integriert (siehe **Abbildung 41**).



**Abbildung 41:** CAD-Modell des OMWs zur nicht-invasiven Online-Fluoreszenzmessung. **A:** Außenansicht, **B:** Innenansicht mit zusätzlichem optischem Fenster.

In **Abbildung 42** sind die Online-Daten der Kultivierung des *E. coli* BL21 Stammes zur rekombinanten Produktion von GFP im 3D-gedruckten Kultivierungsgefäß dargestellt.



**Abbildung 42:** Online-Daten der *E. coli* BL21 (DE3) Kultivierung zur rekombinanten Produktion von GFP im OMW. Kultivierungsbedingungen: Volumen: 12,5 mL, Medium: LB, Temperatur: 37°C Wachstumsphase, 23°C Produktionsphase, Schüttelfrequenz: 300 rpm, Induktion: bei  $OD_{600} \approx 1,0$  rel.AU mit 0,25 mM IPTG. Fluoreszenzmessung wurde alle 6 min aufgezeichnet. Hellgrüner Graph ist der gleitende Mittelwert mit einer Fensterbreite von 10.

Die Hauptkultur wurde mit einer  $OD_{600}$  von 0,2 rel.AU inokuliert und zunächst bei 37°C kultiviert. Beim Erreichen einer  $OD_{600}$  von 1,0 rel.AU nach 1,5 h wurde die Produktion des rekombinanten Proteins mit 0,25 mM IPTG induziert. Zur Abgrenzung der Produktionsphase von der Wachstumsphase wurde außerdem eine Temperatursenkung auf 23°C vorgenommen. Die Absenkung der Temperatur führt dazu, dass sich das Wachstum kurzzeitig verlangsamt, wodurch es zu einem Anstieg im DO-Signal kommt. Außerdem ist zu beobachten, dass die Zellen für ca. 2 h ein lineares Wachstumsverhalten aufzeigen, bevor sie anschließend in ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von  $0,22 \text{ h}^{-1}$  übergehen. Nach einer Gesamtkultivierungszeit von 8 h wurde das maximale Biomassesignal erreicht und die Zellen gehen in die stationäre Wachstumsphase über, welche ebenfalls durch den Anstieg des DO-Signals auf 98 % zu erkennen ist.

Die Online-Fluoreszenzmessung erfolgte alle 6 min mit einer Anregungswellenlänge von 395 nm. Das Fluoreszenzsignal weist über den gesamten Kultivierungsverlauf ein oszillierendes Verhalten aufgrund der sich rotierenden Flüssigkeit auf. Das Rohsignal (grau) wurde mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes mit einer Fensterbreite von 10 geglättet. Bis zum Zeitpunkt der Induktion ist das Fluoreszenzsignal konstant. Nach Zugabe des Induktors ist zunächst eine langsame Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Zwischen 4 h und 6 h

steigt das Fluoreszenzsignal schneller an. Die Phase der Sauerstofflimitierung führt zu einem Plateau im Fluoreszenzsignal. Sauerstoff ist erforderlich, damit das Chromophor-Molekül Fluoreszenz erzeugen kann [187]. Nachdem die Kultur die stationäre Phase erreicht hat und die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium nicht mehr limitiert war, ist ein stetiger Anstieg des Fluoreszenzsignals zu verzeichnen. Nach einer Produktionsphase von 12,5h wurde die Kultivierung beendet mit einer finalen OD<sub>600</sub> von 6,84 rel.AU. Zur Quantifizierung des GFPs wurde eine normierte Probe für die SDS-Gelelektrophorese entnommen. Die densitometrische Auswertung ergab eine finale GFP-Konzentration von 654,01 mg\*L<sup>-1</sup>.

### 2.5.3.1 Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungssysteme

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens und der Produktivität wurde der oben erwähnte Prozess ebenfalls im Schüttelkolben sowie im 2 L-Rührkesselreaktor durchgeführt. Es wurden prozessbezogene Kennparameter berechnet und gegenübergestellt (siehe **Tabelle 6**).

**Tabelle 6:** Gegenüberstellung von Prozessparametern zum Vergleich der GFP-Produktion in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen : OMW, Schüttelkolben (SK) und 2 L-Rührkesselreaktor (STR).

Parameter		OMW	SK	STR
BTM	[g*L <sup>-1</sup> ]	2,06	2,16	2,2
OD <sub>600_final</sub>	[rel.AU]	6,84	7,1	6,84
Wachstumsrate $\mu_{max}$	[h <sup>-1</sup> ]	0,22	0,41	0,42
GFP	[mg*L <sup>-1</sup> ]	654,01	648,52	569,68
Y <sub>P/X</sub>		0,317	0,300	0,248

Die Zelldichte-bezogenen Parameter OD<sub>600</sub> und BTM zeigen in allen drei verwendeten Systemen nahezu identische Werte. Auffällig ist jedoch die abweichende maximale Wachstumsrate der OMW-Kultur. Während im SK und STR ein  $\mu_{max}$  von 0,41 h<sup>-1</sup> bzw. 0,42 h<sup>-1</sup> erreicht wurde, lag die maximale Wachstumsrate im OMW lediglich bei 0,22 h<sup>-1</sup>. Um ein weitgehend stabiles Signal für die Fluoreszenzmessung zu erhalten, wurde die Kultivierung im OMW lediglich mit einer Schüttelfrequenz von 300 rpm durchgeführt. Die dadurch resultierende schlechtere Sauerstoffversorgung könnte unter anderem für die geringere Wachstumsrate verantwortlich sein. Die geringere Wachstumsrate hat jedoch keinen Einfluss auf die finale Produktkonzentration. In den beiden geschüttelten Systemen wurden nahezu identische GFP-Konzentrationen mit 654 mg\*L<sup>-1</sup> und 649 mg\*L<sup>-1</sup> erreicht. Im STR

konnte hingegen eine finale GFP-Konzentration von  $570 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ermittelt werden, was sich auch in dem geringeren Produktausbeutekoeffizient widerspiegelt.

### 2.5.3.2 Zusammenfassung und Fazit

Dieses Kapitel zeigt die Flexibilität der additiven Fertigung und das Potenzial des 3D-gedruckten OMWs als Kultivierungsgefäß für die Prozessentwicklung. Die additive Fertigung ermöglichte eine schnelle Anpassung des OMWs für die Integration eines Fluoreszenzspektrometers, wodurch eine nicht-invasive Messung der GFP-Fluoreszenz während der Kultivierung ermöglicht wurde. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass im OMW vergleichbare Produktausbeuten wie im herkömmlichen Schüttelkolben erzielt wurden und somit der Einsatz des OMWs für die Anwendung von rekombinant produzierenden Organismen geeignet ist.

### 3 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial der additiven Fertigung genutzt, um 3D-gedruckte Kultivierungsgefäße für biotechnologische Upstream Prozesse im mL-Maßstab zu entwickeln. Mit einem Gesamtvolumen von ca. 50 mL lässt sich das hier entwickelte System zwischen Mikrotiterplatte und Schüttelkolben einordnen. Dabei konnte die Integration optischer Sensoren sichergestellt werden. Der transparente Gefäßboden, ermöglichte die Verwendung von nicht-invasiven chemooptischen Sensorspots für die Online-Überwachung von pH-Wert und DO in Kombination mit der streulichtbasierten Biomassemessung mit dem SFR vario, ohne dabei die Fluidodynamik zu beeinflussen. Die Spots können bereits sterilisiert erworben werden und flexibel innerhalb des Kultivierungsgefäßes angebracht werden. Somit kann eine effiziente Gewinnung von Prozessinformationen bereits im kleinen Maßstab sichergestellt werden.

Die Sauerstoffversorgung spielt vor allem bei schnellwachsenden mikrobiellen Kulturen mit hohem Sauerstoffbedarf eine entscheidende Rolle bei der Auslegung eines Bioprozesses. In dieser Arbeit wurde der 3D-Druck verwendet, um das ursprüngliche Kultivierungsgefäß in seiner Geometrie schnell anzupassen und durch die Einführung von Schikanen einen höheren  $k_{La}$ -Wert zu generieren. Dabei wurden unter anderem die Vorteile des 3D-Drucks genutzt, um Geometrien und Einbauten zu erzeugen, die mit herkömmlichen Fertigungsmethoden nicht umzusetzen sind.

Der 3D-Druck ermöglichte außerdem die rasche und einfache Anpassung des Kultivierungsgefäßes an neue Gegebenheiten. Durch die Neupositionierung der Sensorspots an den Gefäßrand, musste eine Möglichkeit geschaffen werden, um die Streulichtmessung weiterhin für die Biomassemessung nutzen zu können. Zur Überwindung dieser Herausforderung wurde der 3D-Druck genutzt, indem das Druckmaterial selbst eine aktive Funktion für die Streulichtmessung übernimmt. Es wurden 3D-gedruckte Lichtleitelemente integriert, die als Optik dienen und das Licht mit Hilfe von Prismen im 90°-Winkel umlenken und somit die Biomassemessung ermöglichen. Durch das Umlenken des Lichts findet die Streulichtmessung in dem optisch modifizierten Well (OMW) nicht mehr in vertikaler, sondern in horizontaler Ebene statt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich dies auf die Streulichtmessung mit dem SFR vario auswirkt.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Amplitudenwerte über einen großen Winkelbereich kaum voneinander abweichen. Beim SQ führen allerdings Abweichungen von nur wenigen Grad zu deutlichen Unterschieden im Amplitudenwert. Dadurch wird dem Anwender die Wahl eines geeigneten Triggerwinkels für eine robuste Biomassemessung deutlich vereinfacht. Außerdem zeigte sich, dass sich eine Volumenveränderung ebenfalls nur geringfügig auf das maximale Amplitudensignal auswirkt, was entscheidende Vorteile in Hinblick auf unterschiedliche Füllstände und Probenahmen während der Kultivierung mit sich bringt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Korrelationen des Online-Biomassesignals mit der offline bestimmten  $OD_{600}$  von verschiedenen Organismen (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* und CHO-Zellen) bestimmt. Die Daten zeigen, dass die Änderung der Lichtführung die streulichtbasierte Online-Biomassemessung erheblich verbessert. Die horizontale Lichtführung ergab eine höhere Linearität und Sensitivität im Vergleich zur vertikalen Messung, insbesondere im niedrigen OD-Bereich. Dadurch konnte der SFR vario erstmalig für die Anwendung von Säugertierzellen (CHO-Zellen) mit geringen Zelldichten genutzt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Nutzung von 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßen ist die Biokompatibilität sowie ein geeignetes Sterilisationsverfahren. In dieser Arbeit wurden Wachstumskurven von CHO-Zellen in Kultivierungsgefäßen bestehend aus dem AR-M2 Material aufgezeichnet. Über eine Kultivierungsdauer von vier Tagen zeigte sich, dass die Sterilisation durch Autoklavieren zu einer Abnahme der Zellzahl sowie der Viabilität innerhalb der ersten 24 h führt. Durch die Kombination aus Autoklavieren, Inkubation in 70 % (v/v) EtOH und nochmaligen Autoklavieren, wurden vergleichbare Zellkonzentrationen bei hoher Viabilität wie in kommerziellen Reaktionsgefäßen erreicht. Dennoch ist für zukünftige Anwendungen zu beachten, dass die hier gefundene Post-Processing Strategie nicht allgemein gültig ist und für alle Zelltypen und deren spezifische Verwendung erneut überprüft werden muss.

Nachdem grundlegende Charakterisierungen durchgeführt wurden, konnte die Anwendung des 3D-gedruckten Kultivierungsgefäß für Upstream Prozesse von biotechnologisch relevanten Organismen untersucht werden. Mit Hilfe des SFR varios wurden organismusspezifische Wachstumskurven und entsprechende pH- und DO-Verläufe von

*E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* aufgezeichnet. Es konnte eine hohe Reproduzierbarkeit festgestellt werden. Dies unterstreicht die Eignung für den Einsatz in der Prozessentwicklung. Die Gegenüberstellung der offline bestimmten Wachstumsparameter mit Kultivierungen aus herkömmlich verwendeten Schüttelkolben ergab, dass nahezu identische Wachstumsverläufe der getesteten Organismen im OMW erzielt wurden. Die Proof of Concept Kultivierungen heben die Vorteile des neuen horizontalen Messprinzips gegenüber dem vertikalen des Schüttelkolbens hervor. Die Umlenkung des Lichts mittels der 3D-gedruckten Prismen führen zu einer Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses von bis zu 96 %. Bisher war eine Online-Überwachung der Biomasse von CHO-Kulturen mit dem SFR vario nicht realisierbar. Mit dem hier entwickelten OMW konnten erstmalig stringente Online-Biomassekurven von CHO-Kulturen aufgezeichnet werden.

Im Rahmen der Proof of Concept Kultivierungen wurden außerdem die Übertragbarkeit der 3D-gedruckten Prismen auf weitere Gefäßgeometrien und -größen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Anwendung möglich ist, jedoch für jede neue Gefäßgeometrie neue Kalibrationskurven erstellt werden müssen, wenn eine Korrelation von online gemessenem Biomassesignal und offline bestimmten Parametern wie OD<sub>600</sub> oder BTM erfolgen soll.

Durch das Online-Monitoring der Prozessparameter pH-Wert, DO und Biomasse mit Hilfe des SFR varios konnten bereits Rückschlüsse auf prozessrelevante Phänomene wie diauxisches Wachstum geschlossen werden. Dennoch könnte mit Hilfe weiterer Parameter das Prozessverständnis vertieft werden. Eine der standardisierten Methoden zur Prozessüberwachung und Prozessbilanzierung ist die Abgasanalytik. Diese ermöglicht nicht nur eine Aussage über die Biomasseentwicklung, sondern auch über die Substratverwertung und Produktinhibierung. Auf diese Weise könnten die gleichen Schlüsselparameter wie im Bioreaktor im Labormaßstab erfasst werden, womit das Potenzial des 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes für den Einsatz in der Bioprozessentwicklung steigt. Daher wäre die Integration einer (Ab)gasanalytik denkbar. Dafür müsste der bisherige Deckel modifiziert werden, indem beispielsweise Sensorspots für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in einem Pufferreservoir eingebettet werden und so Aufschluss über metabolische Zustände der Kultur geben können.

Nach der eingehenden Charakterisierung des OMWs sollte dieses durch die Anwendung in verschiedenen Bioprocessen validiert werden. Dazu wurden drei verschiedene

Modellbioprosesse gewählt: Die Produktion einer Carboxylsäurereduktase in *E. coli*, die Produktion eines small molecules (Germacren A) in einem pathway-optimierten *E. coli* sowie die Produktion von GFP in *E. coli* zur Testung von der Integration weiterer Sensoren.

Für den ersten Modellprozess wurde zunächst ein Bioprozess zur Produktion einer Carboxylsäurereduktase aus *Nocardia otitidiscaviarum* in *E. coli* etabliert und deren Aktivität im ganzzellkatalytischen System durch die Umsetzung von Benzoesäure zum Benzaldehyd bestimmt. Nachdem geeignete Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolbenmaßstab festgelegt wurden, fand eine Maßstabsübertragung auf einen 2 L-Rührkesselreaktor statt. Zur Evaluierung des entwickelten Kultivierungsgefäßes wurde der Prozess ebenfalls im OMW durchgeführt. Dabei wurden vergleichbare Prozessparameter wie im Schüttelkolben erzielt. Außerdem zeigte die Carboxylsäurereduktase aus einer OMW-Kultur bei der ganzzellkatalytischen Aktivitätsbestimmung einen vergleichbaren Umsatz wie die einer Schüttelkolben-Kultur.

Als weiteres Anwendungsbeispiel diente die ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli*. Dieser Prozess wurde ebenfalls zunächst im Schüttelkolbenmaßstab optimiert und anschließend auf einen 2 L-Rührkesselreaktor übertragen. Die Prozessdurchführung im OMW erzielte gleiche wachstumsspezifische Parameter wie im Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor. Da gezeigt werden konnte, dass durch die *in situ* Produktgewinnung mit dem Adsorber Diaion® HP20 die Ausbeute im Schüttelkolben um das 5,6-fache erhöht werden konnte, gilt es das OMW konstruktionell für die Verwendung von Adsorbentien weiterzuentwickeln, sodass weiterhin eine Online-Biomassemessung möglich ist.

Als drittes Anwendungsbeispiel wurde die rekombinante Produktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gewählt. Anhand dieses Beispiels wurde gezeigt, wie mit Hilfe des 3D-Druck das bestehende Kultivierungsgefäß schnell an gewünschte Anforderungen angepasst werden kann, um weitere kommerzielle Sensoren zu integrieren. Durch die Integration eines Fluoreszenzspektrometers wurde eine Online-Überwachung der Produktbildung ermöglicht, wodurch ein besseres Prozessverständnis und eine bessere Prozesskontrolle erreicht werden können.

Alle drei Modellprozesse konnten nicht nur auf das 3D-gedruckte OMW übertragen werden, sondern zeigten vergleichbare Ergebnisse zu den Kultivierungen im Schüttelkolben. Dies unterstreicht die Eignung des OMWs für den Einsatz in Bioprozessen.

In dieser Arbeit wurde das 3D-gedruckte OMW bereits für einige wichtige Organismen der industriellen Biotechnologie erfolgreich angewandt. Dennoch sollten weitere Organismen, wie Mikroalgen oder filamentöse Pilze berücksichtigt werden. Die damit einhergehenden neuen Anforderungen an das Kultivierungsgefäß (z.B. Lichtdurchlässigkeit bei Algenkulturen) könnten mit Hilfe der additiven Fertigung kostengünstig und einfach realisiert werden.

Für eine potenzielle Anwendung in der Bioprozessentwicklung müsste in weiteren Schritten die Parallelisierung mehrerer OMWs erfolgen. Dies setzt außerdem eine geringe batch-to-batch Varianz der einzelnen Gefäße voraus und sollte auf den Grundlagen von Kuhnke *et al.* genauer untersucht werden [140].

Die hohe Auflösung des Biomassesignals bei Verwendung des OMWs sowie die Echtzeitdaten des Prozessmonitorings relevanter Prozessparameter kann zur Prozesssteuerung verwendet werden. Beispielsweise könnte durch die Einbindung von Pumpsystemen oder Pipettiersystemen eine automatische Induktion anhand des Biomassesignals erfolgen.

Durch die Kombination aus 3D-gedruckten Prismen und dem kommerziellen Multisensorsystem SFR vario konnte die Präzision der Online-Biomassemessung deutlich verbessert werden. In der Literatur werden bereits vollständig 3D-gedruckte Sensoren bzw. das Einbetten von Sensoren in 3D-gedruckte Strukturen beschrieben [188]. Dies erfordert entscheidende Materialeigenschaften wie beispielsweise Biokompatibilität oder Lichtdurchlässigkeit. Die Entwicklung und Optimierung entsprechender Materialien ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben, wodurch sich zahlreiche Zukunftsperspektiven für den 3D-Druck in der Bioprozesstechnik und der Überwachung von Bioprozessen eröffnen.

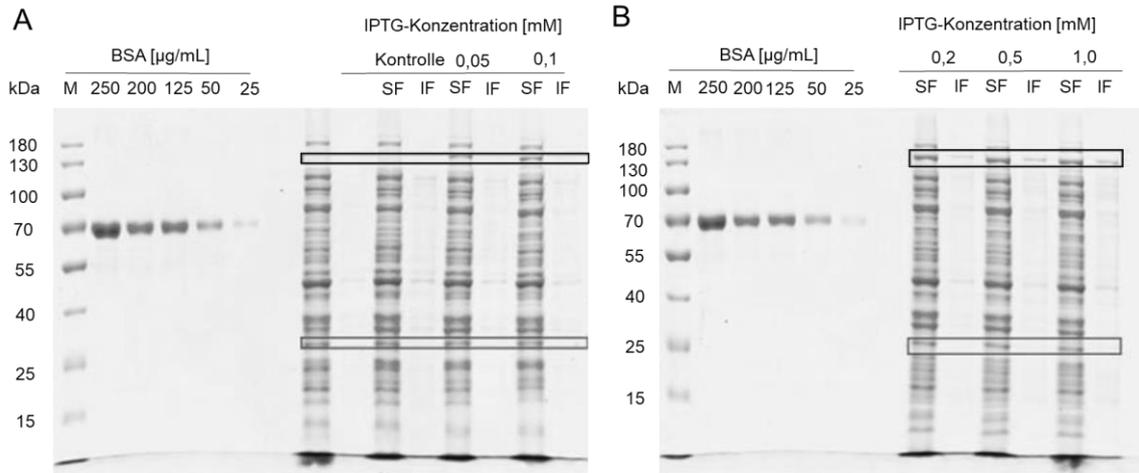
Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen wird das Potenzial des 3D-Drucks in der Forschung und Entwicklung von biotechnologischen Prozessen verdeutlicht. Die Flexibilität der 3D-Drucktechnologie in Verbindung mit einem intelligenten Bioprozessdesign kann spannende Geräte/Bauteile für den Einsatz in der Bioprozesstechnik hervorbringen. Es

bietet nicht nur eine enorme Gestaltungsfreiheit, sondern verschafft eine Unabhängigkeit von Lieferketten, da die Herstellung on demand am Einsatzort erfolgen kann. Dadurch werden lange Transportwege eingespart und Ressourcen geschont, wodurch ein wichtiger Beitrag zur Bewältigung aktueller und zukünftiger globalen Herausforderungen geleistet wird.

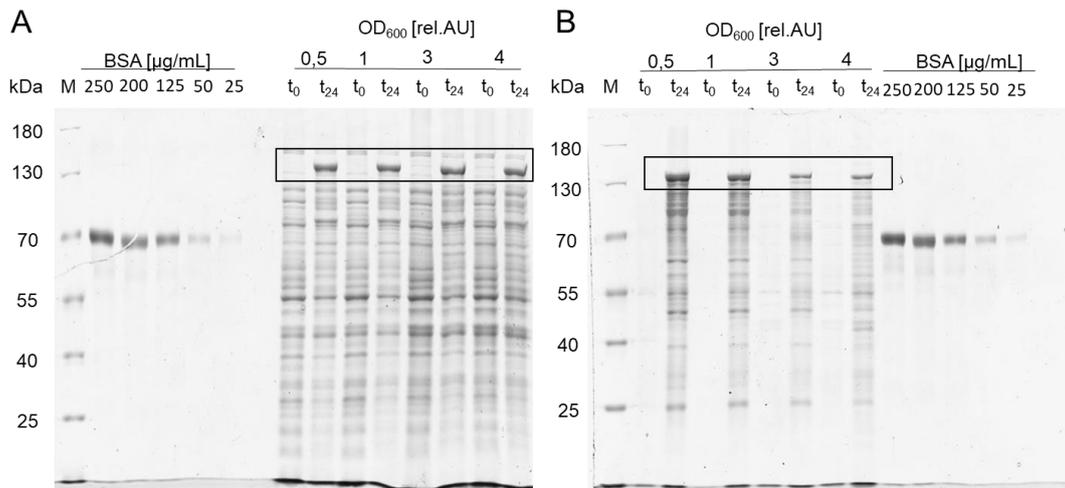
# 4 Anhang

## 4.1 Ergänzende Daten

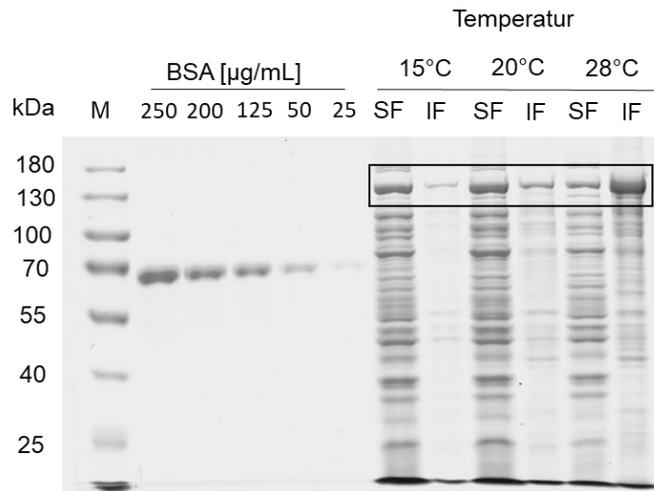
### 4.1.1 Rekombinante Produktion von NoCAR in *E. coli* K12



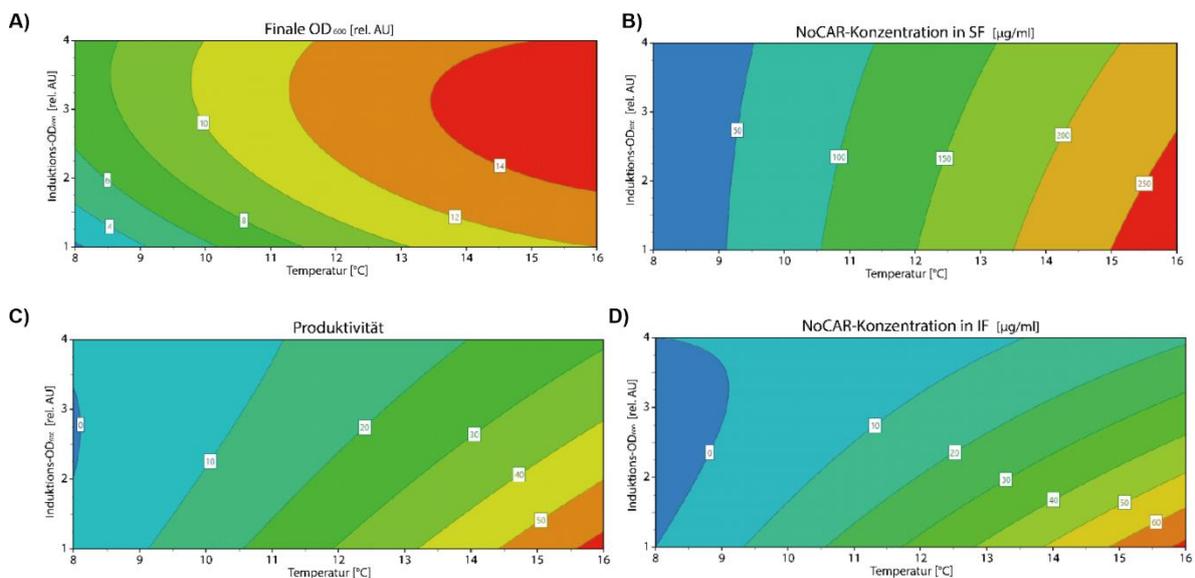
**Abbildung 43:** SDS-PAGE Analyse von NoCAR in *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Induktorkonzentration IPTG nach 24 h. A: Kontrolle, 0,05 mM und 0,1 mM. B: 0,2 mM, 0,5 mM und 1,0 mM IPTG. Sammelgel: 5 %, Trenngel: 10 %. M: Proteinmarker. Kultivierungsbedingungen: Induktions- $OD_{600}$ : 1,5 rel.AU, Temperatur Wachstumsphase: 37°C, Temperatur Expressionsphase: 20°C, Medium: TB. Box kennzeichnet NoCAR mit einem Molekulargewicht von 130 kDa.



**Abbildung 44:** SDS-PAGE Analyse von NoCAR in *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Induktions- $OD_{600}$ . A: lösliche Fraktion. B: unlösliche Fraktion. Sammelgel: 5 %, Trenngel: 10 %. M: Proteinmarker. Kultivierungsbedingungen: 0,2 mM IPTG, Temperatur Wachstumsphase: 37°C, Temperatur Expressionsphase: 20°C, Medium: TB. Box kennzeichnet NoCAR mit einem Molekulargewicht von 130 kDa.

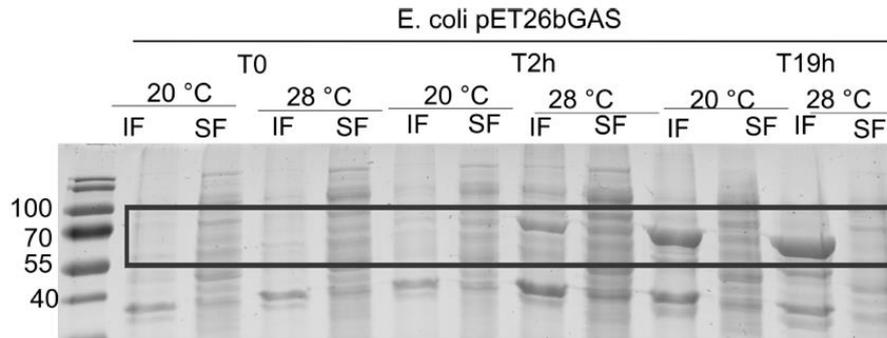


**Abbildung 45:** SDS-PAGE Analyse von NoCAR in *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Temperatur. Sammelgel: 5 %, Trenngel: 10 %. M: Proteinmarker. SF: lösliche Fraktion, IF: unlösliche Fraktion. Kultivierungsbedingungen: 0,2 mM IPTG, Temperatur Wachstumsphase: 37°C, Induktions-OD<sub>600</sub>: 4 rel.AU Medium: TB. Box kennzeichnet NoCAR mit einem Molekulargewicht von 130 kDa.

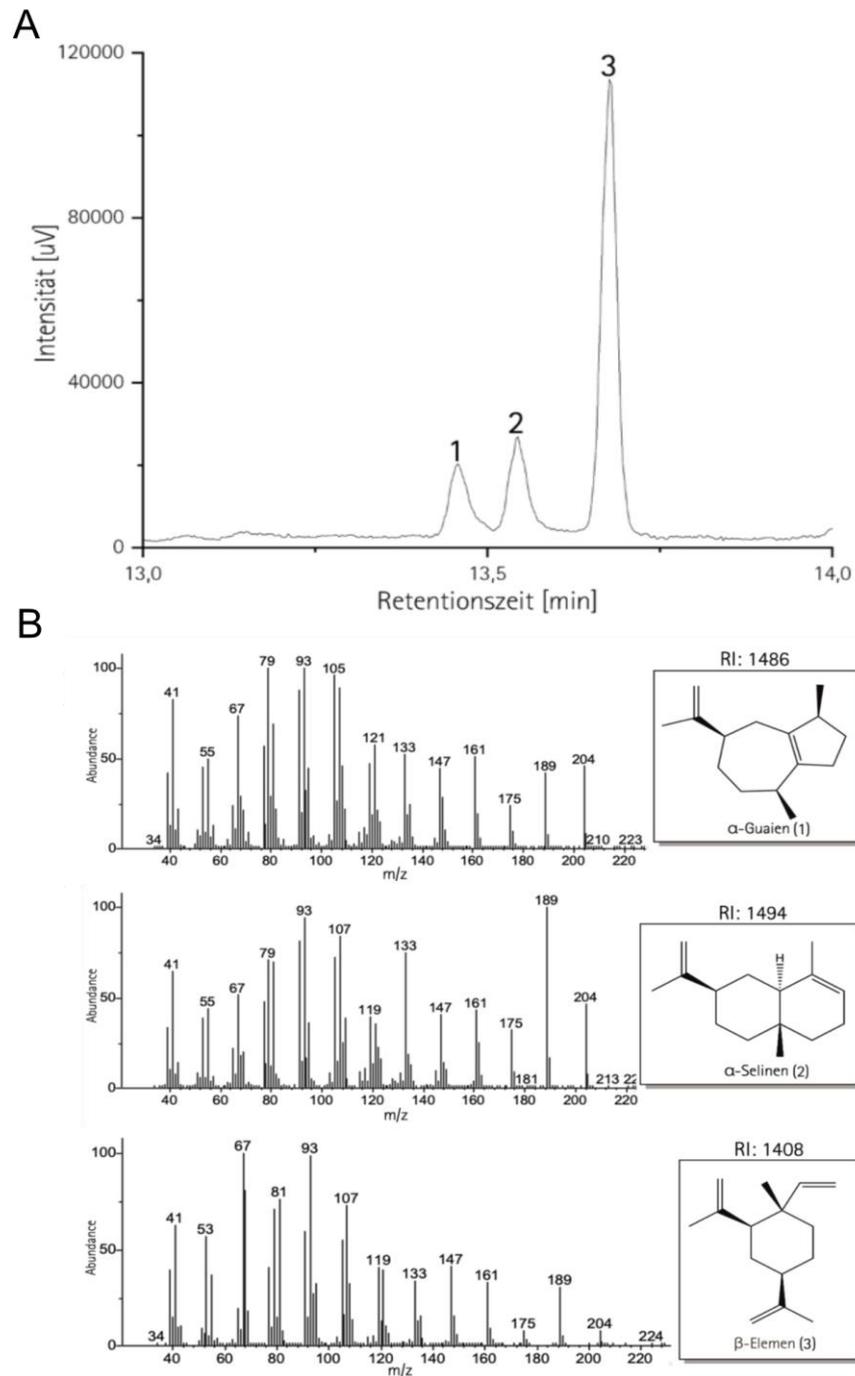


**Abbildung 46:** Response contour plots eines zweiten DoEs zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von NoCAR in *E. coli* K12. Antworten: finale OD<sub>600</sub> (A), NoCAR-Konzentration in SF (B), Produktivität (C) und NoCAR-Konzentration in SF (D) in Abhängigkeit von Induktions-OD<sub>600</sub> und Temperatur.

#### 4.1.2 Ganzzellkatalytische Produktion des Sesquiterpens Germacren A in *E. coli*

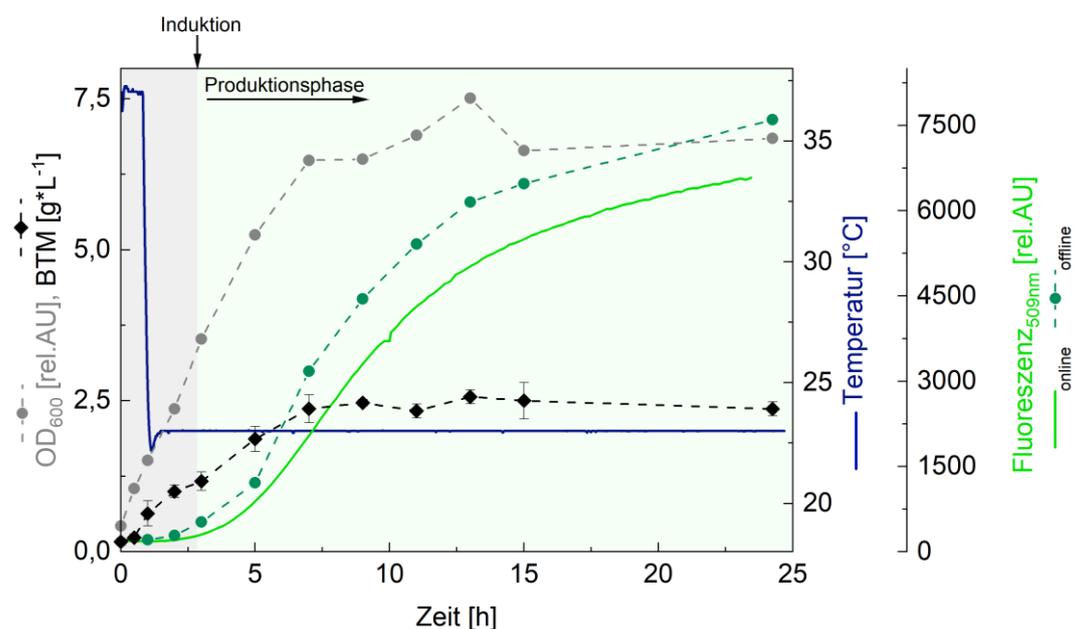


**Abbildung 47:** SDS-PAGE Analyse der Kultivierung mit dem *E. coli* Tuner (DE3) pET26bGAS + pMEV-Stammes zur ganzzellkatalytischen Produktion von Germacren A nach 0 h, 2 h und 19 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Sammelgel: 5 %, Trenngel: 10 %. SF: Lösliche Fraktion, IF: unlöslichen Fraktion. Box kennzeichnet das Schlüsselenzym Germacren A-Synthase mit einem Molekulargewicht von 65,5 kDa.



**Abbildung 48:** Gaschromatogramm des mittels Isooctan extrahierten Germacren A (A) und MS-Analyse der drei Hauptpeaks (B).

### 4.1.3 Rekombinante Produktion von GFP in *E. coli*



**Abbildung 49:** Daten zur rekombinanten Produktion von GFP in *E. coli* BL21 (DE3) in einer 2 L *batch*-Rührkesselreaktorkultivierung. Versuchsbedingungen: 1,5 L, Temperatur Wachstumsphase: 37°C, Temperatur Expressionsphase: 23°C, IPTG-Konzentration: 0,25 mM, Induktionszeitpunkt: 1 rel.AU, pH 7,0. Fluoreszenz wurde alle 12 min in einem By-Pass mit einer Durchflussküvette im Fluoreszenzspektrometer gemessen.

## 4.2 Materialien und Chemikalien

### 4.2.1 Geräte

**Tabelle 7:**Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
3D-Drucker	Agilista-3200W	Keyence Deutschland GmbH, Deutschland
Analysewaage	Cubis	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor	Biostat® A plus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
DO-Messonde	OxyFerm FDA	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
DO-Sensor-Messsystem	Oxy1-	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland

DO-Sensorspots	SP-PSt3-YAU	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland
Durchflussküvette	2,5 mm/ Quarzglas	5 mm Hellma Analytics, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	Hitachi F-7000	Hitachi, Japan
GC	Nexis GC-2030	Shimadzu, Japan
GC-Autosampler, Injector	AOC-20i Plus	Shimadzu, Japan
GC-Trennsäule	ZB-WAX plus	Phenomenex, USA
Glucoseanalysator	YSI 2900	Kreienbaum Neoscience, Deutschland
HPLC	Chromaster	Merck-Hitachi, Japan
HPLC Trennsäule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Inkubator	Multitron Standard	Infors HT, Schweiz
Inkubator mit CO <sub>2</sub>	Heracell™ 240	Thermo Fisher Scientific, USA
Inkubatorhaube	Certomat HK	B.Braun Biotech International, Deutschland
Orbitalschüttler	Solaris™ 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
pH-Elektrode	EasyFerm Plus	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
pH-Meter	HI 221	HANNA instruments, USA
Photometer	Libra S80	Biochrom GmbH; Deutschland
Photometer	MULTISKAN Sky	Thermo Fisher Scientific, USA
pH-Sensorspots	LG1 HP5	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland
Reinstwassersystem	Arium® pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Scanner	Perfection V750	Epson, Japan
SDS-PAGE Gelsystem	Mini-PRO-TEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Shake flask reader	SFR vario LG1 SFR vario	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland
SK mit Sensorspots	Sensor Flask SFS divers	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland
Spektrometer	Flame Spectrometer	Ocean Insight Inc, Neuseeland
Sterilbank	Herasafe™	Thermo Fisher Scientific, USA

Thermocycler	ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG; Deutschland
Trockenschrank	SU SL	Memmert GmbH & Co.KG, Deutschland
Ultraschallbad	Sonores Super RK510H	Bandelin GmbH, Deutschland
Vortex-Mischer	ZX4	Velp Scientifica, Italien
Zellanalysegerät	Cedex® HiRes	Roche Innovatis AG, Schweiz
Zentrifuge	Heraeus® Multifuge X3FR	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge	Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge	Heraeus® Megafuge® 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge	Microstar 17R	VWR International, USA

**Tabelle 8:** Verwendete 3D-Drucker.

<b>Druckerbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agilista 3200W	Keyence Corporation, USA
Replicator Z18	MakerBot Industries LLC, USA

**Tabelle 9:** Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Entwickler</b>
GelAnalyzer	Istvan Lazar Jr., PhD ( <a href="http://www.gelalyzer.com">http://www.gelalyzer.com</a> )
MFCS	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
OriginPro®	OriginLab, USA
PreSens Flask Studio	PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland
Realview 3.0	ABACOM GmbH, Deutschland
MODDE 12	Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Deutschland

## 4.2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 10:** Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
24er DeepWellplatten	Sigma-Aldrich, USA
96 Mikrotitterplatte	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Einwegspritzen (1 mL – 50 mL)	B.Braun Melsungen AG, Deutschland

Epoxidharz	FormLabs GmbH, Deutschland
GC-Probengefäß	VWR International, USA
Kanülen	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Kryoröhrchen	Corning, Inc., USA
Küvetten	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Luftfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Luxaprint® shellac	DETAX GmbH, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Pipettenspitzen divers	Brand GmbH, Deutschland
Schüttelkolben	Corning, Inc, USA; Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Serologische Pipette	Costar® Stripette®, Corning USA
Silikonschläuche divers	VWR International, USA
Spritzenvorsatzfilter	Merck KGaA, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Corning, Inc., USA

**Tabelle 11:** Verwendete 3D-Druckmaterialien.

<b>Druckerbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
AR-M2	Keyence Corporation, USA
AR-S1 Supportmaterial	Keyence Corporation, USA
PLA Filament	DAS FILAMENT Inh. Roman Stieben, Deutschland

### 4.2.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 12:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Aminobenzamidoxime (ABAO)	Alfa Aesar, USA
4-Hydroxybenzoesäure	Sigma-Aldrich, USA
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Adenosintriphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniak 25 % (w/w)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Benzonase® Nuclease	Sigma-Aldrich, USA
Borsäure	Merck Millipore, USA
Bovine serum albumin	Thermo Fisher Scientific
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
BugBuster Proteinextraktionsreagenz	Merck Millipore, USA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Citronensäure-Hydrat	Merck Millipore, USA
Cobalt (II) chlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Coomassie Brillint Blau G250	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
Diaion® HP-20	Sigma-Aldrich, USA
di-Ammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
di-Ammoniumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
di-Kaliumsulfat	Merck Millipore, USA
di-Methylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
di-Thiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Eisen (III) citrat	Sigma-Aldrich, USA
Eisensulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Imidazol	Merck Millipore, USA

Isooctan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	AppliChem GmbH, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kalium-di-hydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kupfer (II) Chlorid-dihydrat	Sigma-Aldrich, USA
Kupfersulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck Millipore, USA
Mangan (II) Chlorid-Tetrahydrat	Merck Millipore, USA
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumchlorid	VWR International, USA
Natriumdodecylsulfat SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriummolybdat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumsulfat	AppliChem GmbH, Deutschland
Nicotinamadenindinukleotidphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein MW Marker 26616	Thermo Fisher Scientific, USA
Pentan	Sigma-Aldrich, USA
Pepton aus Casein	Sigma-Aldrich, USA
Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5: 1), 40 %ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, USA
Tetra-Methylethylendiamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific, USA
Thiamin HCl	Merck Millipore, USA
Tris(hydrxymethyl)aminomethan Hydrochlorid Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Trypton	Sigma-Aldrich, USA
Zinkacetat-dihydrat	Sigma-Aldrich, USA

$\alpha$ -Cedren	Sigma-Aldrich, USA
$\alpha$ -Lactose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka AG (Sigma-Aldrich), USA

#### 4.2.4 Mikroorganismen und Zelllinien

**Tabelle 13:** Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

Organismus	Stammbezeichnung	Antibiotikaresistenz
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC 1024	
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 168	
CHO	K1	
<i>E. coli</i>	Tuner pET26bGAS + pMEV	Chloramphenicol, Kanamycin
<i>E. coli</i>	K12 pETDuet_1_ECPPTase_NHis- NoCAR	Ampicillin
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3) pET-28c-His6-GFP	Kanamycin

#### 4.2.5 Kultivierungsmedien, Puffer und Reagenzlösungen

Der pH-Wert des jeweiligen Mediums/Puffers wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt. Die hergestellten Medien wurden durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) oder Sterilfiltration (Porengröße 0,22  $\mu$ m) sterilisiert.

**Tabelle 14:** Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Lösemittel
Ampicillin	50	ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin	50	ddH <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34	96 % Ethanol

**Tabelle 15:** Zusammensetzung des LB-Mediums.

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
NaCl	10
Hefeextrakt	5

Pepton	10
--------	----

**Tabelle 16:** Zusammensetzung des TB-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Hefeextrakt	24 g L <sup>-1</sup>
Pepton	12 g L <sup>-1</sup>
Glycerol	5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,72 mM

**Tabelle 17:** Zusammensetzung des YPD-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g L<sup>-1</sup>]</b>
Hefeextrakt	24
Pepton	12
Glucose	10
pH 6,0	

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des SB-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
Pepton	20 g L <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	10 mM
Kaliumchlorid	2 mM
Magnesiumsulfat	20 mM

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des ZYP-5052-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>ZY</b>	
Pepton	10 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
<b>20x NPS</b>	
Ammoniumsulfat	6,6 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g L <sup>-1</sup>

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,2 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,2 g L <sup>-1</sup>
<b>50x 5052</b>	
Glycerol	25 % (v/w)
Glucose	2,5 % (v/w)
α-Lactose	10 % (v/w)

**Tabelle 20:** Zusammensetzung ADM-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g L<sup>-1</sup>]</b>
Glucose	10
Phosphate	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,03
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,3
Ammoniumsulfat	10
Natriumchlorid	1,2
Kaliumsulfat	1,1
Calciumchlorid	0,013
Spurenelemente	
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	1
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	1

**Tabelle 21:** Zusammensetzung M9-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g L<sup>-1</sup>]</b>
Glucose	10
Phosphate	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	6
Ammoniumchlorid	2
Natriumchlorid	0,5
Calciumchlorid	0,003
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,13

Thiamin HCl 0,0005

**Tabelle 22:** Zusammensetzung RB-Mediums.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g L<sup>-1</sup>]</b>
Glucose	10
<b>Salze</b>	
Citronensäure-Hydrat	17
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40
NaOH	24
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	133
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	1,2
<b>Spurenelemente</b>	
Ethylendiamintetraessigsäure	0,42
CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0,42
CuCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,075
Borsäure	0,15
MnCl <sub>2</sub> 3 H <sub>2</sub> O	0,75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,125
Zinkacetat	0,65
Eisen (III) Citrat	5

#### 4.2.6 SDS-PAGE

**Tabelle 23:** Zusammensetzung der SDS-Gele für jeweils 6 Stück.

<b>Komponente</b>	<b>Trenngel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
Polyacrylamid/Bisacrylamid Mischung (37,5:1), 40 %	7,5 mL	1,3 mL
4x <i>Lower buffer</i>	7,6 mL	
4x <i>Upper buffer</i>		2,5 mL
SDS (10 % aq. (w/v))	300 µL	
ddH <sub>2</sub> O	14,6 mL	6,2 mL
TEMED	60 µL	20 µL
APS (25 %)	60 µL	20 µL

**Tabelle 24:** Zusammensetzung des 4x Upper buffers (500 mL).

<b>Komponente</b>	
0,5 M Tris-HCl	30,5 g
SDS (10 % aq. (w/v))	20 mL
ddH <sub>2</sub> O	480 mL
pH 6,8	

**Tabelle 25:** Zusammensetzung des 4x Lower buffers (500 mL).

<b>Komponente</b>	
1,5 M Tris-HCl	91 g
ddH <sub>2</sub> O	500 mL
pH 8,8	

**Tabelle 26:** Zusammensetzung des 2x Laemmli Probenpuffers (50 mL).

<b>Komponente</b>	
Tris Base	0,747 g
SDS	2 g
Glycerol	10 mL
β-Mercaptoethanol	5 mL
Bromphenolblau	100 mg

**Tabelle 27:** Zusammensetzung des 10x TGS-Laufpuffers (1 L).

<b>Komponente</b>	
Tris-HCl	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	1000 mL
pH 8,3	

**Tabelle 28:** Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.

<b>Komponente</b>	
Coomassie Brilliant Blue G250	490 mg
ddH <sub>2</sub> O	367 mL
Ammoniumsulfat	40,8 mg

Phosphorsäure	48 mL
Methanol	82 mL

**Tabelle 29:** Zusammensetzung des BugBuster Arbeitspuffers für den enzymatischen Zellaufschluss.

<b>Komponente</b>	
BugBuster Proteinextraktionsreagenz	1 mL
Benzonase® Nuclease (250 U/μL)	1,2 μL
rLysozyme™ Solution (200 U/μL)	4 μL

#### 4.2.7 Lösungen für die ganzzellkatalytische Aktivitätsbestimmung von NoCAR

**Tabelle 30:** Zusammensetzung des N-free Resting Cell Mediums (500 mL).

<b>Komponente</b>	
10x M9 Salze (N-free)	50 mL
MgSO <sub>4</sub> 1 M	1,5 mL
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	0,5 mL
Glucose 20 % (w/v)	25 mL
ddH <sub>2</sub> O	423 mL

**Tabelle 31:** Zusammensetzung der 10x M9 Salze (500 mL)

<b>Komponente</b>	
NaCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2x H <sub>2</sub> O	37,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,0 g

**Tabelle 32:** Zusammensetzung der ABAO-Lösung.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Natriumacetat	100 mM
ABAO	10 mM
DMSO	5 % (v/v)
	pH 4,5 (mit Essigsäure einstellen)

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Charakterisierung eines 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßes

#### 4.3.1.1 Konstruktion und 3D-Druck

Die Konstruktion aller 3D-gedruckten Systeme wurden von Projektmitarbeitenden mit Hilfe des CAD (*computer aided design*)-Programms Autodesk Inventor Professional erstellt. Zum Entfernen des Stützmaterials, welches bei der Benutzung des Agilista 3200W Druckers verwendet wird, werden die Bauteile in ein temperiertes ( $\sim 50^{\circ}\text{C}$ ) Ultraschallbad gelegt. Das Wasser wird nach Bedarf gewechselt. Je nach Anwendung erfolgt ein Nachpolieren der Bauteile.

#### 4.3.1.2 Ermittlung der Abhängigkeit von Arbeitsvolumen, Wellhöhe und Schüttelfrequenz

Die Untersuchungen wurden mit einem aus Polylactid (PLA) bestehenden Modellsystem durchgeführt. Das Modell besteht aus einer Trägerplatte, auf dieser sich sechs zylinderförmige Wells mit einem Innendurchmesser von 32 mm befinden, die unterschiedliche Höhen aufweisen (siehe **Abbildung 50**). Damit eine Dichtigkeit gegeben ist, wurde das Model von innen mit Epoxidharz beschichtet. Mit Hilfe von zwei Goldkontakten, die mit einem Mikrokontroller verbunden sind, wird die elektrische Spannung gemessen. Ein Goldkontakt befindet sich kurz oberhalb der Grundfläche und der zweite kurz unterhalb der Wellöffnung. Die Wells werden mit einer 0,05 M NaCl-Lösung gefüllt und verschiedene Betriebsbedingungen getestet. Wird der Stromkreis geschlossen, können die resultierenden Spannungsimpulse detektiert werden. Die Software Realview 3.0 (ABACOM) zeichnet diese in Abhängig der Zeit auf.



**Abbildung 50:** Modellsystem aus PLA zur Bestimmung einer geeigneten Gefäßhöhe.

### 4.3.1.3 $k_{La}$ -Wert Bestimmung

Für die Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ ) wird die dynamische Sulfit-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird Sulfit in Gegenwart katalytischer Mengen an Kobalt-Chlorid zu Sulfat oxidiert (siehe Gleichung 3).



Als Messsystem wird der SFR vario verwendet. Die zu untersuchenden Systeme sind mit entsprechenden Sauerstoffsensordots ausgestattet. Das zu untersuchende System wird mit dem entsprechenden Volumen an 1 %iger Natriumsulfitlösung gefüllt. Anschließend erfolgt die Zugabe von einem Hundertstel des Volumens an 0,01 M  $CoCl_2$ -Lösung. Der zeitliche Verlauf der Sauerstoffkonzentration wird aufgezeichnet. Der Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration ist gegeben durch:

$$\frac{d(DO^*)}{dt} = k_{La} * (DO^* - DO(t)) \quad (4)$$

Nach Integration ergibt sich:

$$\ln(DO^* - DO(t)) = k_{La} * t \quad (5)$$

$DO^*$  [%]    maximaler Gelöstsauerstoffkonzentration

$DO_{min}$  [%]    minimaler Gelöstsauerstoffkonzentration

$DO(t)$  [%]    aktueller Gelöstsauerstoffkonzentration

Anschließend wird Gleichung 5 gegen die Zeit aufgetragen. Für die Bestimmung des  $k_{La}$ -Wertes werden die Daten des linearen Verlaufs verwendet. Die Steigung des Graphen ist gleich  $-k_{La}$ .

#### 4.3.1.4 Kalibrierungsverfahren 3D gedruckter Kultivierungsgefäße

Für die Kalibrierung des Streulichtsignals des SFR variuos mit der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) wurden Zellsuspensionen verschiedener Organismen verwendet.

Zur Herstellung der Zellsuspensionen werden die verwendeten Organismen in dem jeweiligen Medium im Schüttelkolben kultiviert. Die Zellen werden in der frühen stationären Phase durch Zentrifugation bei  $4000 \times g$  für 15 min und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. PBS-Puffer resuspendiert und daraus sequenzielle Verdünnungen für das Kalibrierungsverfahren hergestellt.

#### 4.3.2 Allgemeine Kultivierungsarbeiten

##### 4.3.2.1 Stammerhaltung

Für die Lagerung der verwendeten Stämme wurden Glycerol Stocks hergestellt. Hierzu wird für den Organismus spezifisches Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Daraufhin wird die Kultur mit sterilem Glycerin in Kryokulturgefäßen vermischt, so dass eine finale Glycerinkonzentration von 20 % vorliegt. Die Kryokulturen werden bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

##### 4.3.2.2 Vorkulturen

Für die Vorkulturen werden 250 mL Schüttelkolben verwendet und mit 50 mL des entsprechenden Mediums gefüllt. Vorkulturen werden mit Kryokulturen angeimpft und über Nacht inkubiert.

##### 4.3.2.3 Mikrobielle (Proof of concept) Kultivierungen in 3D-gedruckten Kultivierungsgefäßen

Die Sensorspots wurden je nach Spezifikationen vor oder nach dem Autoklavieren in das Gefäß eingebracht. Die Heißdampfsterilisation fand für 20 min bei  $121^\circ\text{C}$  statt. Nachdem das Kultivierungsgefäß abgekühlt war, wurde steriles Medium eingefüllt und mögliche Zusätze

hinzugegeben. Anschließend erfolgte das Inokulieren und das Gefäß wurde verschraubt und auf dem SFR vario installiert.

**Tabelle 33:** Verwendete Organismen und entsprechende Medien für Proof of concept Kultivierungen.

<b>Organismus</b>	<b>Medium</b>
<i>E. coli</i> BL21 (D3)	LB-Medium
<i>B. subtilis</i>	LB-Medium
<i>S. cerevisiae</i>	YPD-Medium
CHO K1-Zellen	TC-42

#### 4.3.2.4 Kultivierungen von CHO-K1 Zellen

CHO-K1 Zellen wurden in 125 mL-Schüttelkolben ohne Schikanen in chemisch definiertem TC-42 w/o L-Glutamin mit 8 mM L-Glutamin in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub> befeuchteten Atmosphäre bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 120 rpm mit einem Schütteldurchmesser von 19 mm kultiviert. OMW-Kulturen wurden mit einer initialen Zelldichte von ca.  $0,3 \cdot 10^6$  Zellen\*mL<sup>-1</sup> inokuliert und bei einer Schüttelfrequenz von 150 rpm betrieben.

#### 4.3.2.5 2 L-Rührkesselreaktor Kultivierungen

Die Kultivierungen im 1,5 L-Maßstab werden in einem Glasrührkesselreaktor Biostat® Aplus mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 L durchgeführt. Gesteuert wird der Reaktor über die entsprechende Steuereinheit. Temperiert wird der Reaktor über eine Heizmanschette und einen Kühlfinger, der in den Reaktorinnenraum ragt. Das Reaktorsystem verfügt am Deckel verschieden Ports. Über diese werden ein Temperaturfühler, eine pH-Elektrode und die Gelöstsauerstoffelektrode installiert. Der Reaktor wird mit allen hitzestabilen Medienbestandteilen befüllt, alle Elektroden installiert und anschließend bei 121°C für 30 min sterilisiert. Nach dem Abkühlen werden die restlichen Medienbestandteile hinzugegeben und die Sauerstoffelektrode kalibriert. Als Stellmittel für die pH-Wert Regulierung werden 1 M NaOH und 1 M HCl verwendet. Die Begasung erfolgt mit 1 vvm Druckluft. Die Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend (200 – 800 rpm), sodass die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 30 % geregelt wird. Die Aufzeichnung der Prozessdaten erfolgt über die MFCS-Software.

### 4.3.2.6 Analytik zu den Kultivierungsarbeiten

#### **Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>)**

Die optische Dichte wird bei 600 nm mit dem Photometer bestimmt. Der Lineare Bereich des Photometers liegt zwischen 0,1 rel.AU. und 0,3 rel.AU. Proben die einen Wert von OD<sub>600</sub> = 0,3 überschreiten, werden entsprechend mit Saline verdünnt.

#### **Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)**

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse werden 1 mL Kulturbrühe in ein zuvor getrocknetes und gewogenes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet für mindestens 24 h bei 70°C getrocknet. Abschließend wird durch Bestimmung der Gewichts Differenz die BTM ermittelt.

#### **Bestimmung der Glycerolkonzentration**

Die Glycerol-Konzentration der Kultivierungsproben wird chromatographisch mittels *High performance liquid chromatography* (HPLC) bestimmt. Zur Quantifizierung wird eine Glycerol-Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0 g L<sup>-1</sup> bis 5 g L<sup>-1</sup> aufgenommen. Die Proben werden zur Abtrennung der Zellen bei 13000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand filtriert (Ø 0,2 µm). Als Trennsäule wird die Aminex® HPX-87H verwendet. Die Detektion erfolgt mit einem Brechungsindex (RI)-Detektor.

**Tabelle 34:** Konfiguration der HPLC zur Bestimmung der Glycerolkonzentration.

<b>Betriebsparameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Eluent	0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussgeschwindigkeit	0,6 mL L <sup>-1</sup>
Säulentemperatur	55 °C
Injektionsvolumen	20 µL

### 4.3.3 SDS-PAGE

#### 4.3.3.1 Enzymatischer Zellaufschluss

Zur Analyse der Proteinproduktion hinsichtlich der Löslichkeit werden während der Kultivierung normierte Proben genommen. Zur Bestimmung des Probenvolumens wird **Formel 6** verwendet.

$$\text{Probenvolumen } [\mu\text{L}] = \frac{2}{\text{OD}_{600}} * 1000 \quad \text{Formel (6)}$$

Die entnommene Probe wird bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das entstandene Pellet wird in 133 µL BugBuster Arbeitslösung (siehe **Tabelle 29**) resuspendiert und für 20 min bei 27°C und 500 rpm inkubiert. Das Zelllysat wird für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand bildet die lösliche Fraktion (SF, engl. Soluble fraction). Das Pellet bildet die unlösliche Fraktion (IF, engl. Insoluble fraction) und wird in 133 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.3.3.2 SDS-Gele

Die zu analysierenden Proben werden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer (siehe **Tabelle 26**) versetzt und für 5 min bei 95 °C und 500 rpm inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren werden 6 µL Probe und 1,5 µL Größenstandard (PageRuler Prestained No.26616) auf das Gel aufgetragen. Das Gel wird in die mit 1x TGS-Puffer (siehe **Tabelle 27**) gefüllte Kammer eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt für die ersten 20 min bei 90 V und anschließend bei 120 V für ca. 1,5 h.

#### 4.3.3.3 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach Beenden der Gelelektrophorese werden die Gele zunächst mit ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend wird die Coomassie-Färbelösung hinzugegeben. Das Färben des Gels erfolgt über Nacht auf einem Schüttler. Die anschließende Entfärbung erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O bis der Hintergrund des Gels vollständig entfärbt ist.

#### 4.3.3.4 Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration werden die zu untersuchenden Proben und eine BSA-Standardreihe für die SDS-PAGE mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung, Coomasie-Färbung und anschließender Entfärbung wird das Gel gescannt. Die densitometrische Analyse erfolgt mit der Software GelAnalyzer. Mithilfe der BSA-Standardreihe wird eine Kalibrationsgerade aufgezeichnet, anhand dieser die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden kann.

#### 4.3.4 Arbeiten mit dem *E. coli* K12 NoCAR-Stamm

##### 4.3.4.1 Aktivitätsbestimmung von NoCAR – ABAO-Assay

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms fand ganz Zell katalytisch mit Resting cells statt. Dafür werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C für 15 min von der Kulturbrühe getrennt. Das entstandene Zellpellet wird entweder direkt für die Aktivitätsbestimmung verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für den ABAO-Assay wird das Pellet in M9 N-free Resting Cell Medium (**Tabelle 30**) resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> = 10 rel.AU. eingestellt. Durchgeführt wird der Assay in 24-deep-well-Platten mit einem Probenvolumen von insgesamt 4 mL. Diese setzen sich aus 3,5 mL Zellsuspension und 0,5 mL Substrat- bzw. Produktlösung zusammen. Als Substrat wird 20 mM Hydroxybenzoesäure, welche aus einer 200 mM Stammlösung (in Acetonitril) mit PBS verdünnt wird. Als Standardreihe (Produkt) wird 4-Hydroxybenzaldehyd verwendet.

Die Proben werden bei 25°C und 390 rpm inkubiert. Stündlich werden jeweils 100 µL Probe in eine 96-MTP überführt und 100 µL ABAO-Lösung (**Tabelle 32**) hinzugegeben. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 30 min bei 3000 x g zentrifugiert. 100 µL Überstand werden entnommen und bei 380 nm im Plattenphotometer vermessen. Die Reaktionsdauer beträgt insgesamt 5 h.

#### 4.3.5 Arbeiten mit *E. coli* Tuner pET26bGAS + pMEV (Germacren A)

##### 4.3.5.1 Extraktion von Germacren A aus wässriger Lösung

Für die Extraktion von Germacren A aus dem Kulturmedium werden 2 mL zellfreier Überstand verwendet. Die Extraktion erfolgt mit gekühltem Isooctan. Der Überstand wird mit 500 µL Isooctan versetzt und 1 min durch vortexen bei maximaler Geschwindigkeit vermischt. Die Phasen werden durch Zentrifugation bei 6000 x g für 10 min getrennt. Die organische Phase wird abgenommen. Dieser Schritt wird insgesamt dreimal durchgeführt, sodass am Ende eine 3x verdünnte Probe für die GC-Analyse vorliegt.

##### 4.3.5.2 Festphasen Extraktion von Germacren A im Schüttelkolben

Für die Festphasen-Extraktion werden Diaion® HP-20 Adsorber verwendet. Diese werden zunächst in einem Sieb mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend werden diese für 10 min

rührend in einem Becherglas mit 99 % Isopropanol inkubiert. Daraufhin werden die Adsorber zwei Mal mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Es folgt eine Inkubation mit dem später eingesetzten Lösemittel für 10 min rührend in einem Becherglas. Abschließend werden die Adsorber gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gespült und im Trockenschrank getrocknet. In einen 125 mL Glaskolben werden 3,5 g Adsorber gegeben und 1 mL ddH<sub>2</sub>O und anschließend autoklaviert. Nach der Kultivierung werden mindestens 300 mg Adsorber in ein 5 mL Glasfläschchen überführt und mit ddH<sub>2</sub>O gespült: Das Wasser wird so oft gewechselt bis es klar bleibt. Anschließend wird das Wasser entfernt und es erfolgt die Extraktion. Dafür wird Isooctan 1:1 (100 µL Isooctan auf 100 mg Adsorber) zu den Adsorbieren gegeben und für 15 h bei 10°C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wird die organische Phase mit der GC analysiert.

#### 4.3.5.3 Gaschromatographie

Für die gaschromatographische Analysen wurde der Nexis GC-2030 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet.

Die Trennung erfolgte mit einer Zebron ZB-Waxplus Kapillarsäule mit folgenden Abmessungen: 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser und eine Filmdicke von 0,25 µm. Es werden 1 µL der zu analysierenden Probe mithilfe eines Autosamplers direkt auf die Säule injiziert (*splitless*, Splitttemperatur 240°C). Als Trägergas wird Wasserstoff verwendet. Die initiale Temperatur der Säule beträgt 40°C mit einer Haltezeit von 20 sec. Die Säule wird auf 200°C mit einer Heizrate von 10°C min<sup>-1</sup> aufgeheizt und die Temperatur für 30 sec gehalten. Anschließend erfolgt eine weitere Aufheizung auf 230°C mit einer Heizrate von 30°C min<sup>-1</sup>. Die Endtemperatur wird für 2 min gehalten. Die Temperatur des Detektors beträgt 300°C.

#### 4.3.6 Arbeiten mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-28c-His6-GFP

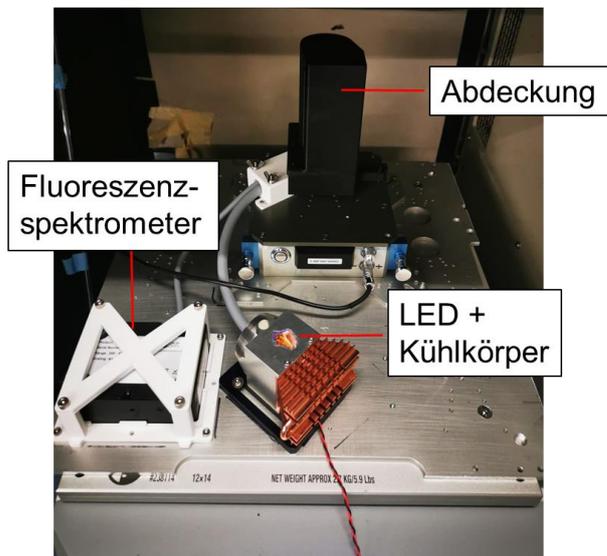
In dieser Arbeit wurde der *E. coli* BL21 (DE3) Stamm mit dem Plasmid pET-28c-His6-GFP von Li *et al.* [189] zur Produktion von GFP verwendet.

##### 4.3.6.1 OMW-Kultivierung

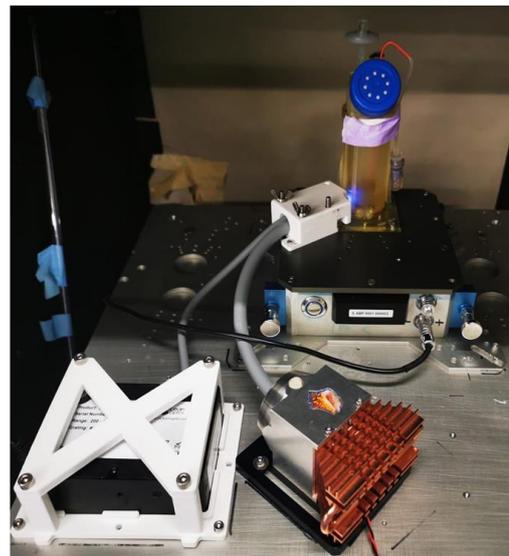
Für die Kultivierung des *E. coli* BL21 (DE3) Stamms mit dem Plasmid pET-28c-His6-GFP wurde der in **Abbildung 51** gezeigte Versuchsaufbau verwendet. Für die Online-Fluoreszenzmessung wurde ein Fluoreszenzspektrometer (Ocean optics) auf der Schüttlerplattform befestigt. Zur Abschirmung von Hintergrundlicht, sowie Vermeidung von

Streulicht wird das OMW mit einer schwarzen Abdeckung verdunkelt (siehe **Abbildung 51 B**). Die Fluoreszenzmessung erfolgt alle 6 min bei einer Anregung von 395 nm.

A



B



**Abbildung 51:** Versuchsaufbau zur Kultivierung von *E. coli* BL21 zur rekombinanten Produktion von GFP mit Online-Fluoreszenzmessung im 3D-gedruckten OMW mit (A) und ohne (B) Abdeckung zur Lichtabschirmung.

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Ablauf der Bioprozessentwicklung .....	4
<b>Abbildung 2:</b> Messprinzip optischer pH-Sensoren (A) und Sauerstoffsensoren (B) .....	11
<b>Abbildung 3:</b> A: Multisensorplattform SFR vario zum Online-Monitoring.....	15
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Inkjet Druckverfahrens.....	18
<b>Abbildung 5:</b> Auswahl an Materialeigenschaften, die im Bereich der Biotechnologie von Interesse sind .....	18
<b>Abbildung 6:</b> Anforderungskatalog an das zu entwickelnde 3D-gedruckte Kultivierungsgefäß.....	23
<b>Abbildung 7:</b> Abhängigkeit Füllvolumen, Gefäßhöhe und Schüttelfrequenz.....	25
<b>Abbildung 8:</b> CAD-Zeichnungen der verschiedenen Well-Geometrien.....	27
<b>Abbildung 9:</b> Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient ( $k_{La}$ ) ermittelt durch die Sulfit-Methode .....	28
<b>Abbildung 10:</b> Verwendete 3D-gedruckte Gefäße für die Biokompatibilitätsuntersuchungen (A) und schematische Darstellung des Druck- und Post-Processing Ablaufs zur Biokompatibilitätstestung (B).....	30
<b>Abbildung 11:</b> Biokompatibilitätsuntersuchung des Materials AR-M2.....	31
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung des Status Quos (SQ) (A) und des optisch modifiziertem Wells (OMW) .....	33
<b>Abbildung 13:</b> Foto der 3D-gedruckten Prismen des OMWs.....	34
<b>Abbildung 14:</b> Schematische Darstellung der Strahlengänge im 3D-gedruckten OMW.....	35
<b>Abbildung 15:</b> 3D-gedrucktes OMW.....	35
<b>Abbildung 16:</b> Gegenüberstellung der Winkelscans von SQ (A) und OMW (B) mit einer <i>S. cerevisiae</i> Zellsuspension bei konstanter Schüttelfrequenz .....	37
<b>Abbildung 17:</b> Gegenüberstellung der Winkelscans von SQ (A) und OMW (B) mit einer <i>S. cerevisiae</i> Zellsuspension bei konstantem Füllvolumen .....	38
<b>Abbildung 18:</b> Winkelscans zur Bestimmung des Störbereichs mit deionisiertem Wasser im SQ (A) und OMW (B) .....	39
<b>Abbildung 19:</b> Korrelationen von Amplitude (SFR vario) mit $OD_{600}$ (Photometer) im optisch modifizierten Well (OMW) und dem Status Quo (SQ) .....	40
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich von Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis der Biomassemessung im SQ und OMW.....	41
<b>Abbildung 21:</b> Korrelation von Amplitude (SFR vario) mit $OD_{600}$ (Photometer) unterschiedlicher Organismen.....	42

<b>Abbildung 22:</b> Online-Überwachung von pH, DO und Biomasse von mikrobiellen Kulturen im OMW mit Hilfe des SFR varios. ....	46
<b>Abbildung 23:</b> Online-Überwachung von pH, DO und Biomasse von <i>S. cerevisiae</i> Kulturen im OMW mit Hilfe des SFR varios.....	47
<b>Abbildung 24:</b> Kultivierung von CHO K1-Zellen im OMW.....	48
<b>Abbildung 25:</b> Vergleich Online-Daten von Biomasse, DO und pH und offline bestimmter Wachstumskurven von OMW- und SK-Kultivierungen.....	50
<b>Abbildung 26:</b> Online-Wachstumskurven und Detektion von diauxischen Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> Kulturen im OMW.....	52
<b>Abbildung 27:</b> Online-Monitoring von Biomasse und DO von <i>S. cerevisiae</i> Kulturen in einem Standard-OMW (Referenz) und einem Flower-OMW.....	53
<b>Abbildung 28:</b> <i>S. cerevisiae</i> Kultivierungen in OMWs mit verschiedenen Gesamtvolumen. ....	55
<b>Abbildung 29:</b> Biokatalytische Reduktion von Benzoesäure (1) zu Benzaldehyd (2).....	58
<b>Abbildung 30:</b> Graphische Darstellung des verwendeten Versuchsdesigns für den DoE zur Ermittlung der optimalen Kultivierungsparameter zur Produktion von NoCAR.....	60
<b>Abbildung 31:</b> Response contour plots des DoEs zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von NoCAR in <i>E. coli</i> K12.....	61
<b>Abbildung 32:</b> Expression von NoCAR in verschiedenen Kultivierungsmedien.....	63
<b>Abbildung 33:</b> Produktion von NoCAR in <i>E. coli</i> K12 im 2L-Rührkesselreaktor.....	64
<b>Abbildung 34:</b> Online-Daten der <i>E. coli</i> K12 Kultivierung zur rekombinanten Produktion von NoCAR im 3D-gedruckten OMW.....	66
<b>Abbildung 35:</b> Vergleich der ganzzellkatalytischen Reduktion von 4-Hydroxybenzoesäure zu 4-Hydroxybenzaldehyd durch NoCAR aus verschiedenen Kultivierungsgefäßen.....	68
<b>Abbildung 36:</b> Schematische Darstellung des stoffwechseloptimierten <i>E. coli</i> Stamms zur ganzzellkatalytischen Produktion von Germacren A.....	73
<b>Abbildung 37:</b> Optimierung der Induktionsbedingungen für die ganzzellkatalytische Produktion von Germacren A in <i>E. coli</i> Tuner.....	74
<b>Abbildung 38:</b> Heterologen Produktion von Germacren A in <i>E. Coli</i> Tuner im 2 L-Rührkesselreaktor.....	75
<b>Abbildung 39:</b> Vergleich verschiedener Produktgewinnungsstrategien des Sesquiterpens Germacren A. ....	78
<b>Abbildung 40:</b> Online-Daten der <i>E. coli</i> Tuner Kultivierung zur heterologen ganzzellkatalytischen Produktion des Sesquiterpens Germacren A im 3D-gedruckten OMW. ....	80
<b>Abbildung 41:</b> CAD-Modell des OMWs zur nicht-invasiven Online-Fluoreszenzmessung...82	
<b>Abbildung 42:</b> Online-Daten der <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Kultivierung zur rekombinanten Produktion von GFP im OMW.....	83

<b>Abbildung 43:</b> SDS-PAGE Analyse von <i>NoCAR</i> in <i>E. coli</i> K12 in Abhängigkeit der Induktorkonzentration IPTG nach 24 h.....	92
<b>Abbildung 44:</b> SDS-PAGE Analyse von <i>NoCAR</i> in <i>E. coli</i> K12 in Abhängigkeit der Induktions-OD <sub>600</sub> .....	92
<b>Abbildung 45:</b> SDS-PAGE Analyse von <i>NoCAR</i> in <i>E. coli</i> K12 in Abhängigkeit der Temperatur.....	93
<b>Abbildung 46:</b> <i>Response contour plots</i> eines zweiten DoEs zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von <i>NoCAR</i> in <i>E. coli</i> K12.....	93
<b>Abbildung 47:</b> SDS-PAGE Analyse der Kultivierung mit dem <i>E. coli</i> Tuner (DE3) pET26bGAS + pMEV-Stammes zur ganzzellkatalytischen Produktion von Germacren A .....	94
<b>Abbildung 48:</b> Gaschromatogramm des mittels Isooctan extrahierten Germacren A (A) und MS-Analyse der drei Hauptpeaks (B).....	95
<b>Abbildung 49:</b> Daten zur rekombinanten Produktion von GFP in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) in einer 2 L <i>batch</i> -Rührkesselreaktorkultivierung.....	96
<b>Abbildung 50:</b> Modellsystem aus PLA zur Bestimmung einer geeigneten Gefäßhöhe.....	109
<b>Abbildung 51:</b> Versuchsaufbau zur Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 zur rekombinanten Produktion von GFP mit Online-Fluoreszenzmessung im 3D-gedruckten OMW .....	116

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über kommerzielle, parallelisierbare MBR-Systeme.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnis der Biomassesignale von OMW- und Schüttelkolben-kultivierungen. ....	51
<b>Tabelle 3:</b> Versuchsreihen zur Bestimmung geeigneter Expressionsbedingungen nach dem OFAT-Prinzip.....	59
<b>Tabelle 4:</b> Gegenüberstellung von Prozessparameters zum Vergleich der Kultivierung von <i>E. coli</i> K12 zur Produktion von NoCAR in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen .....	69
<b>Tabelle 5:</b> Gegenüberstellung von Prozessparameters zum Vergleich der Germacren A-Produktion in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen .....	80
<b>Tabelle 6:</b> Gegenüberstellung von Prozessparametern zum Vergleich der GFP-Produktion in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen.....	84
<b>Tabelle 7:</b> Geräte.....	96
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete 3D-Drucker.....	98
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Software.....	98
<b>Tabelle 10:</b> Verbrauchsmaterialien.....	98
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete 3D-Druckmaterialien.....	99
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	99
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien .....	102
<b>Tabelle 14:</b> Antibiotika-Stammlösungen.....	102
<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung des LB-Mediums.....	102
<b>Tabelle 16:</b> Zusammensetzung des TB-Mediums. ....	103
<b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung des YPD-Mediums. ....	103
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung des SB-Mediums.....	103
<b>Tabelle 19:</b> Zusammensetzung des ZYP-5052-Mediums.....	103
<b>Tabelle 20:</b> Zusammensetzung ADM-Mediums .....	104
<b>Tabelle 21:</b> Zusammensetzung M9-Mediums.....	104
<b>Tabelle 22:</b> Zusammensetzung RB-Mediums. ....	105
<b>Tabelle 23:</b> Zusammensetzung der SDS-Gele für jeweils 6 Stück.....	105
<b>Tabelle 24:</b> Zusammensetzung des 4x Upper buffers (500 mL).....	106
<b>Tabelle 25:</b> Zusammensetzung des 4x Lower buffers (500 mL). ....	106
<b>Tabelle 26:</b> Zusammensetzung des 2x Laemmli Probenpuffers (50 mL).....	106

<b>Tabelle 27:</b> Zusammensetzung des 10x TGS-Laufpuffers (1 L).....	106
<b>Tabelle 28:</b> Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.....	106
<b>Tabelle 29:</b> Zusammensetzung des BugBuster Arbeitspuffers für den enzymatischen Zellaufschluss.....	107
<b>Tabelle 30:</b> Zusammensetzung des N-free Resting Cell Mediums (500 mL).....	107
<b>Tabelle 31:</b> Zusammensetzung der 10x M9 Salze (500 mL).....	107
<b>Tabelle 32:</b> Zusammensetzung der ABAO-Lösung.....	107
<b>Tabelle 33:</b> Verwendete Organismen und entsprechende Medien für Proof of concept Kultivierungen.....	111
<b>Tabelle 34:</b> Konfiguration der HPLC zur Bestimmung der Glycerolkonzentration.....	112

## Literatur

- [1] Lye, G. J., Dalby, P. A., Woodley, J. M., Better Biocatalytic Processes Faster: New Tools for the Implementation of Biocatalysis in Organic Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 434–440.
- [2] International Market Analysis Research and Consulting Group, White Biotechnology Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2023-2028, International Market Analysis Research and Consulting Group (IMARC) [zuletzt abgerufen am 10.06.23]. Abgerufen von: <https://www.imarcgroup.com/white-biotechnology-market>.
- [3] DiMasi, J. A., The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *PharmacoEconomics* 2002, 20 Suppl 3, 1–10.
- [4] Jungbauer, A., Göbel, U., Biopharmaceutical process development - shortcut to market: an interview with Rolf Werner from Boehringer Ingelheim. *Biotechnology journal* 2012, 7, 14–16.
- [5] Rzakhanov, Z., Innovation, product development and market value: evidence from the biotechnology industryinnovation in biotechnology industry. *Economics of Innovation and New Technology* 2004, 13, 747–760.
- [6] Bruder, S., Reifenrath, M., Thomik, T., Boles, E. et al., Parallelised online biomass monitoring in shake flasks enables efficient strain and carbon source dependent growth characterisation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories* 2016, 15, 127.
- [7] Nielsen, J., Tillegreen, C. B., Petranovic, D., Innovation trends in industrial biotechnology. *Trends in biotechnology* 2022, 40, 1160–1172.
- [8] Bareither, R., Pollard, D., A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnology progress* 2011, 27, 2–14.
- [9] Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Kensy, F., Hochparallele Bioprozessentwicklung in geschüttelten Mikrobioreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik* 2012, 84, 704–714.
- [10] Hemmerich, J., Noack, S., Wiechert, W., Oldiges, M., Microbioreactor Systems for Accelerated Bioprocess Development. *Biotechnology journal* 2018, 13, e1700141.
- [11] Long, Q., Liu, X., Yang, Y., Li, L. et al., The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. *Journal of biotechnology* 2014, 192 Pt B, 323–338.
- [12] Helleckes, L. M., Hemmerich, J., Wiechert, W., Lieres, E. von et al., Machine learning in bioprocess development: from promise to practice. *Trends in biotechnology* 2023, 41, 817–835.
- [13] Freier, L., Hemmerich, J., Schöler, K., Wiechert, W. et al., Framework for Kriging-based iterative experimental analysis and design: Optimization of secretory protein production in *Corynebacterium glutamicum*. *Eng. Life Sci.* 2016, 16, 538–549.
- [14] Li, G., Rabe, K. S., Nielsen, J., Engqvist, M. K. M., Machine Learning Applied to Predicting Microorganism Growth Temperatures and Enzyme Catalytic Optima. *ACS synthetic biology* 2019, 8, 1411–1420.

- [15] Mowbray, M., Kay, H., Kay, S., Caetano, P. C. et al., Probabilistic machine learning based soft-sensors for product quality prediction in batch processes. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2022, 228, 104616.
- [16] Le Yao, Ge, Z., Deep Learning of Semisupervised Process Data With Hierarchical Extreme Learning Machine and Soft Sensor Application. *IEEE Trans. Ind. Electron.* 2018, 65, 1490–1498.
- [17] King, Z. A., O'Brien, E. J., Feist, A. M., Palsson, B. O., Literature mining supports a next-generation modeling approach to predict cellular byproduct secretion. *Metabolic engineering* 2017, 39, 220–227.
- [18] Zhang, J., Petersen, S. D., Radivojevic, T., Ramirez, A. et al., Combining mechanistic and machine learning models for predictive engineering and optimization of tryptophan metabolism. *Nature communications* 2020, 11, 4880.
- [19] Doig, S. D., Baganz, F., Lye, G. J., High-throughput screening and process optimisation, in: *Ratledge, Kristiansen (Hg.) 2006 – Basic biotechnology*, pp. 289–306.
- [20] Betts, J. I., Baganz, F., Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial cell factories* 2006, 5, 21.
- [21] Maier, U., Büchs, J., Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 7, 99–106.
- [22] Büchs, J., Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 7, 91–98.
- [23] Klöckner, W., Büchs, J., Advances in shaking technologies. *Trends in biotechnology* 2012, 30, 307–314.
- [24] Akgün, A., Müller, C., Engmann, R., Büchs, J., Application of an improved continuous parallel shaken bioreactor system for three microbial model systems. *Bioprocess and biosystems engineering* 2008, 31, 193–205.
- [25] Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C., Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 7, 135–141.
- [26] Takátsy, G., The use of spiral loops in serological and virological micro-methods. 1955. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 2003, 50, 369-82; discussion 382-3.
- [27] Voller, A., Bidwell, D., Huldt, G., Engvall, E., A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bulletin of the World Health Organization* 1974, 51, 209–211.
- [28] Funke, M., Diederichs, S., Kensity, F., Müller, C. et al., The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnology and bioengineering* 2009, 103, 1118–1128.
- [29] Hermann, R., Lehmann, M., Büchs, J., Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnology and bioengineering* 2003, 81, 178–186.
- [30] Duetz, W. A., Rüedi, L., Hermann, R., O'Connor, K. et al., Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66, 2641–2646.
- [31] Kensity, F., John, G. T., Hofmann, B., Büchs, J., Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bioprocess and biosystems engineering* 2005, 28, 75–81.

- [32] Hermann, R., Walther, N., Maier, U., Büchs, J., Optical method for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. *Biotechnology and bioengineering* 2001, *74*, 355–363.
- [33] John, G. T., Klimant, I., Wittmann, C., Heinzle, E., Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and bioengineering* 2003, *81*, 829–836.
- [34] Weiss, S., John, G. T., Klimant, I., Heinzle, E., Modeling of Mixing in 96-Well Microplates Observed with Fluorescence Indicators. *Biotechnology progress* 2002, *18*, 821–830.
- [35] Velez-Suberbie, M. L., Betts, J. P. J., Walker, K. L., Robinson, C. et al., High throughput automated microbial bioreactor system used for clone selection and rapid scale-down process optimization. *Biotechnology progress* 2018, *34*, 58–68.
- [36] Rohe, P., Venkanna, D., Kleine, B., Freudl, R. et al., An automated workflow for enhancing microbial bioprocess optimization on a novel microbioreactor platform. *Microbial cell factories* 2012, *11*, 144.
- [37] Astle, T. W., Recollections of Early Microplate Automation. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* 2000, *5*, 30–31.
- [38] Lye, G. J., Ayazi-Shamlou, P., Baganz, F., Dalby, P. A. et al., Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques. *Trends in biotechnology* 2003, *21*, 29–37.
- [39] Doig, S. D., Baganz, F., Lye, G. J., High-throughput screening and process optimisation, in: *Basic Biotechnology*, 3rd Ed., Cambridge University Press, 2006, pp. 289–306.
- [40] Funke, M., Buchenauer, A., Schnakenberg, U., Mokwa, W. et al., Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates. *Biotechnology and bioengineering* 2010, *107*, 497–505.
- [41] Blesken, C., Olfers, T., Grimm, A., Frische, N., The microfluidic bioreactor for a new era of bioprocess development. *Eng. Life Sci.* 2016, *16*, 190–193.
- [42] Samorski, M., Müller-Newen, G., Büchs, J., Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: a novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnology and bioengineering* 2005, *92*, 61–68.
- [43] Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R.-K. et al., Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial cell factories* 2009, *8*, 31.
- [44] Hortsch, R., Weuster-Botz, D., Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms. *Advances in applied microbiology* 2010, *73*, 61–82.
- [45] Fink, M., Cserjan-Puschmann, M., Reinisch, D., Striedner, G., High-throughput microbioreactor provides a capable tool for early stage bioprocess development. *Scientific reports* 2021, *11*, 2056.
- [46] Back, A., Rossignol, T., Krier, F., Nicaud, J.-M. et al., High-throughput fermentation screening for the yeast *Yarrowia lipolytica* with real-time monitoring of biomass and lipid production. *Microbial cell factories* 2016, *15*, 147.
- [47] Hector, R. E., Dien, B. S., Cotta, M. A., Mertens, J. A., Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnology for biofuels* 2013, *6*, 84.

- [48] Koepff, J., Keller, M., Tsohis, K. C., Busche, T. et al., Fast and reliable strain characterization of *Streptomyces lividans* through micro-scale cultivation. *Biotechnology and bioengineering* 2017, 114, 2011–2022.
- [49] Morschett, H., Schiprowski, D., Müller, C., Mertens, K. et al., Design and validation of a parallelized micro-photobioreactor enabling phototrophic bioprocess development at elevated throughput. *Biotechnology and bioengineering* 2017, 114, 122–131.
- [50] Hsu, W.-T., Aulakh, R. P. S., Traul, D. L., Yuk, I. H., Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology* 2012, 64, 667–678.
- [51] Warr, S. R. C., ambr® 15 Microbioreactors for CHO Cell Cultivation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2020, 2095, 43–67.
- [52] Rameez, S., Mostafa, S. S., Miller, C., Shukla, A. A., High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: reproducibility, scalability, and control. *Biotechnology progress* 2014, 30, 718–727.
- [53] Jin, L., Wang, Z.-S., Cao, Y., Sun, R.-Q. et al., Establishment and optimization of a high-throughput mimic perfusion model in ambr® 15. *Biotechnology letters* 2021, 43, 423–433.
- [54] D'ambrosio, S., Ventrone, M., Alfano, A., Schiraldi, C. et al., Microbioreactor (micro-Matrix) potential in aerobic and anaerobic conditions with different industrially relevant microbial strains. *Biotechnology progress* 2021, 37, e3184.
- [55] Pepeliaev, S., Ehebauer, M. T., Cultivation of microbial cultures at high cell density in microbioreactor fermentations to increase protein yield. *Biotechnology and applied biochemistry* 2022.
- [56] Sawatzki, A., Hans, S., Narayanan, H., Haby, B. et al., Accelerated Bioprocess Development of Endopolygalacturonase-Production with *Saccharomyces cerevisiae* Using Multivariate Prediction in a 48 Mini-Bioreactor Automated Platform. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2018, 5.
- [57] Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D., Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and bioengineering* 2005, 89, 512–523.
- [58] Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M. et al., Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and biosystems engineering* 2008, 31, 207–215.
- [59] Schmideder, A., Weuster-Botz, D., High-performance recombinant protein production with *Escherichia coli* in continuously operated cascades of stirred-tank reactors. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2017, 44, 1021–1029.
- [60] Wellenbeck, W., Mampel, J., Naumer, C., Knepper, A. et al., Fast-track development of a lactase production process with *Kluyveromyces lactis* by a progressive parameter-control workflow. *Engineering in life sciences* 2017, 17, 1185–1194.
- [61] Xie, D., Using an advanced microfermentor system for strain screening and fermentation optimization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2012, 834, 217–231.

- [62] Warr, S. R. C., Microbioreactors and scale-down models: growth of CHO cells using the Pall Micro24 MicroReactor system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2014, *1104*, 149–165.
- [63] Isett, K., George, H., Herber, W., Amanullah, A., Twenty-four-well plate miniature bioreactor high-throughput system: assessment for microbial cultivations. *Biotechnology and bioengineering* 2007, *98*, 1017–1028.
- [64] Betts, J., Warr, S., Finka, G. B., Uden, M. et al., Impact of aeration strategies on fed-batch cell culture kinetics in a single-use 24-well miniature bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 2014, *82*, 105–116.
- [65] Rossi-Rodrigues, B. C., Brochetto-Braga, M. R., Tauk-Tornisielo, S. M., Carmona, E. C. et al., Comparative growth of trichoderma strains in different nutritional sources, using bioscreen c automated system. *Braz. J. Microbiol.* 2009, *40*, 404–410.
- [66] Medina, A., Lambert, R. J. W., Magan, N., Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal biology* 2012, *116*, 161–169.
- [67] Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C. et al., Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 1996, *25*, 225–232.
- [68] Harms, P., Kostov, Y., Rao, G., Bioprocess monitoring. *Current opinion in biotechnology* 2002, *13*, 124–127.
- [69] Szita, N., Boccazzi, P., Zhang, Z., Boyle, P. et al., Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing. *Lab on a Chip* 2005, *5*, 819–826.
- [70] Jin, Z., Ng, A., Maurice, C. F., Juncker, D., The Mini Colon Model: a benchtop multi-bioreactor system to investigate the gut microbiome. *Gut microbes* 2022, *14*, 2096993.
- [71] Demuth, C., Varonier, J., Jossen, V., Eibl, R. et al., Novel probes for pH and dissolved oxygen measurements in cultivations from millilitre to benchtop scale. *Applied microbiology and biotechnology* 2016, *100*, 3853–3863.
- [72] Snee, R. D., Quality by Design: Building Quality into Products and Processes, in: Zhang, L. (Ed.), *Nonclinical Statistics for Pharmaceutical and Biotechnology Industries. Statistics for Biology and Health*, Springer International Publishing, Cham 2016, pp. 461–499.
- [73] Rathore, A. S., Winkle, H., Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology* 2009, *27*, 26–34.
- [74] Vogt, F. G., Kord, A. S., Development of quality-by-design analytical methods. *Journal of pharmaceutical sciences* 2011, *100*, 797–812.
- [75] Yang, C.-T., Kristiani, E., Leong, Y. K., Chang, J.-S., Big data and machine learning driven bioprocessing - Recent trends and critical analysis. *Bioresource technology* 2023, *372*, 128625.
- [76] Hansen, S., Kensy, F., Käser, A., Büchs, J., Potential errors in conventional DOT measurement techniques in shake flasks and verification using a rotating flexitube optical sensor. *BMC biotechnology* 2011, *11*, 49.
- [77] Gruber, P., Marques, M. P. C., Szita, N., Mayr, T., Integration and application of optical chemical sensors in microbioreactors. *Lab on a Chip* 2017, *17*, 2693–2712.

- [78] Kumar, S., Wittmann, C., Heinzle, E., Minibioreactors. *Biotechnology letters* 2004, 26, 1–10.
- [79] Liebsch, G., Klimant, I., Krause, C., Wolfbeis, O. S., Fluorescent imaging of pH with optical sensors using time domain dual lifetime referencing. *Analytical chemistry* 2001, 73, 4354–4363.
- [80] Wencel, D., Abel, T., McDonagh, C., Optical chemical pH sensors. *Analytical chemistry* 2014, 86, 15–29.
- [81] Measurement principle of chemical optical sensors, 2023 [zuletzt abgerufen am 06.06.23].  
Abgerufen von:  
<https://www.presens.de/knowledge/basics/detail/measurement-principle-of-chemical-optical-sensors-901>.
- [82] McDonagh, C., Burke, C. S., MacCraith, B. D., Optical chemical sensors. *Chemical reviews* 2008, 108, 400–422.
- [83] Valeur, B., Berberan-Santos, M. N., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd Ed., Wiley-VCH, Weinheim 2013.
- [84] Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J., Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 2004, 17, 187–194.
- [85] Anderlei, T., Büchs, J., Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 7, 157–162.
- [86] Flitsch, D., Krabbe, S., Ladner, T., Beckers, M. et al., Respiration activity monitoring system for any individual well of a 48-well microtiter plate. *Journal of biological engineering* 2016, 10, 14.
- [87] Dinger, R., Lattermann, C., Flitsch, D., Büchs, J., The  $\mu$ RAMOS: A tool for high - throughput online monitoring of respiration activities in 96 - deepwell microtiter plates. *Chemie Ingenieur Technik* 2020, 92, 1208.
- [88] Lauterbach, T., Ziebart, N., Bley, T., Walther, T. et al., Mobile Sensoren für die Biotechnologie – Ortsunabhängige, miniaturisierte Prozessmessung. *Chemie Ingenieur Technik* 2019, 91, 1827–1832.
- [89] Lauterbach, T., Lüke, T., Büker, M.-J., Hedayat, C. et al., Measurements on the fly-Introducing mobile micro-sensors for biotechnological applications. *Sensors and Actuators A: Physical* 2019, 287, 29–38.
- [90] Berg, C., Herbst, L., Gremm, L., Ihling, N. et al., Assessing the capabilities of 2D fluorescence monitoring in microtiter plates with data-driven modeling for secondary substrate limitation experiments of *Hansenula polymorpha*. *Journal of biological engineering* 2023, 17, 12.
- [91] Ladner, T., Beckers, M., Hitzmann, B., Büchs, J., Parallel online multi-wavelength (2D) fluorescence spectroscopy in each well of a continuously shaken microtiter plate. *Biotechnology journal* 2016, 11, 1605–1616.
- [92] Claßen, J., Aupert, F., Reardon, K. F., Solle, D. et al., Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2017, 409, 651–666.
- [93] Sonnleitner, B., Locher, G., Fiechter, A., Biomass determination. *Journal of biotechnology* 1992, 25, 5–22.

- [94] Schmidt-Hager, J., Ude, C., Findeis, M., John, G. T. et al., Noninvasive online biomass detector system for cultivation in shake flasks. *Eng. Life Sci.* 2014, 14, 467–476.
- [95] Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously.
- [96] Bauer, I., Abt, B., Yap, A., Leuchtle, B. et al., Online Biomass Monitoring Enables Characterization of the Growth Pattern of *Aspergillus fumigatus* in Liquid Shake Conditions. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 2022, 8.
- [97] Biomass-based Feeding [zuletzt abgerufen am 12.06.23]. Abgerufen von: <https://www.scientificbio.com/biomass-based-feeding-in-shake-flasks>.
- [98] Ebert, F. V., Reitz, C., Cruz-Bournazou, M. N., Neubauer, P., Characterization of a noninvasive on-line turbidity sensor in shake flasks for biomass measurements. *Biochemical Engineering Journal* 2018, 132, 20–28.
- [99] PreSens GmbH, Instruction Manual SFR vario, Regensburg.
- [100] B.A, P., N, L., Buradi, A., N, S. et al., A comprehensive review of emerging additive manufacturing (3D printing technology): Methods, materials, applications, challenges, trends and future potential. *Materials Today: Proceedings* 2022, 52, 1309–1313.
- [101] Gibson, I., Rosen, D. W., Stucker, B., Khorasani, M., *Additive manufacturing technologies*, Springer, Cham, Switzerland 2021.
- [102] Raddatz, L., Austerjost, J., Beutel, S., 3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken. *Chem. Unserer Zeit* 2018, 52, 42–50.
- [103] Au, A. K., Huynh, W., Horowitz, L. F., Folch, A., 3D-Printed Microfluidics. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2016, 55, 3862–3881.
- [104] Robles Martinez, P., Basit, A. W., Gaisford, S., The History, Developments and Opportunities of Stereolithography, in: Basit, A. W., Gaisford, S. (Eds.), *3D printing of pharmaceuticals. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, volume 31*, Springer, Cham, Switzerland 2018, pp. 55–79.
- [105] Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. et al., Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering* 2018, 143, 172–196.
- [106] Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C. et al., Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Analytical chemistry* 2014, 86, 3240–3253.
- [107] Penumakala, P. K., Santo, J., Thomas, A., A critical review on the fused deposition modeling of thermoplastic polymer composites. *Composites Part B: Engineering* 2020, 201, 108336.
- [108] Rahim, T. N. A. T., Abdullah, A. M., Md Akil, H., Recent Developments in Fused Deposition Modeling-Based 3D Printing of Polymers and Their Composites. *Polymer Reviews* 2019, 59, 589–624.
- [109] Durgun, I., Ertan, R., Experimental investigation of FDM process for improvement of mechanical properties and production cost. *Rapid Prototyping Journal* 2014, 20, 228–235.
- [110] Bhushan, B., Caspers, M., An overview of additive manufacturing (3D printing) for microfabrication. *Microsyst Technol* 2017, 23, 1117–1124.

- [111] Krujatz, F., Lode, A., Seidel, J., Bley, T. et al., Additive Biotech-Chances, challenges, and recent applications of additive manufacturing technologies in biotechnology. *New biotechnology* 2017, 39, 222–231.
- [112] Williams, D. F., On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008, 29, 2941–2953.
- [113] Bernard, M., Jubeli, E., Pungente, M. D., Yagoubi, N., Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices - regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomaterials science* 2018, 6, 2025–2053.
- [114] Karakurt, I., Lin, L., 3D printing technologies: techniques, materials, and post-processing. *Current Opinion in Chemical Engineering* 2020, 28, 134–143.
- [115] Siller, I. G., Enders, A., Steinwedel, T., Epping, N.-M. et al., Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials. *Materials* 2019, 12, 2125.
- [116] González, G., Baruffaldi, D., Martinengo, C., Angelini, A. et al., Materials Testing for the Development of Biocompatible Devices through Vat-Polymerization 3D Printing. *Nanomaterials* 2020, 10, 1788.
- [117] Grigaleviciute, G., Baltriukiene, D., Bukelskiene, V., Malinauskas, M., Biocompatibility Evaluation and Enhancement of Elastomeric Coatings Made Using Table-Top Optical 3D Printer. *Coatings* 2020, 10, 254.
- [118] Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L., In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current chemical genomics* 2009, 3, 33–41.
- [119] Winkler, S., Meyer, K. V., Heuer, C., Kortmann, C. et al., Invitro biocompatibility evaluation of a heat-resistant 3D printing material for use in customized cell culture devices. *Eng. Life Sci.* 2022, 22, 699–708.
- [120] Amin, R., Knowlton, S., Hart, A., Yenilmez, B. et al., 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication* 2016, 8, 22001.
- [121] Nielsen, A. V., Beauchamp, M. J., Nordin, G. P., Woolley, A. T., 3D Printed Microfluidics. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 2020, 13, 45–65.
- [122] Heuer, C., Preuß, J.-A., Habib, T., Enders, A. et al., 3D printing in biotechnology-An insight into miniaturized and microfluidic systems for applications from cell culture to bioanalytics. *Eng. Life Sci.* 2022, 22, 744–759.
- [123] Winkler, S., Grünberger, A., Bahnemann, J., Microfluidics in Biotechnology: Quo Vadis. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2022, 179, 355–380.
- [124] Ho, C. M. B., Ng, S. H., Li, K. H. H., Yoon, Y.-J., 3D printed microfluidics for biological applications. *Lab on a Chip* 2015, 15, 3627–3637.
- [125] Schellenberg, J., Dehne, M., Lange, F., Scheper, T. et al., Establishment of a Perfusion Process with Antibody-Producing CHO Cells Using a 3D-Printed Microfluidic Spiral Separator with Web-Based Flow Control. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2023, 10, 656.
- [126] Enders, A., Grünberger, A., Bahnemann, J., Towards Small Scale: Overview and Applications of Microfluidics in Biotechnology. *Molecular biotechnology* 2022.
- [127] Lücking, T. H., Sambale, F., Beutel, S., Scheper, T., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle. *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 51–56.

- [128] Lücking, T. H., Sambale, F., Schnaars, B., Bulnes-Abundis, D. et al., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 57–64.
- [129] Krujatz, F., Fehse, K., Jahnel, M., Gommel, C. et al., MicroLED-photobioreactor: Design and characterization of a milliliter-scale Flat-Panel-Airlift-photobioreactor with optical process monitoring. *Algal Research* 2016, 18, 225–234.
- [130] Frey, L. J., Vorländer, D., Ostsieler, H., Rasch, D. et al., 3D-printed micro bubble column reactor with integrated microsensors for biotechnological applications: From design to evaluation. *Scientific reports* 2021, 11, 7276.
- [131] Achinas, S., Jan Willem Euverink, G., Development of an Anaerobic Digestion Screening System Using 3D-Printed Mini-Bioreactors, in: María Martínez-Espinosa, R. (Ed.), *New Advances on Fermentation Processes*, IntechOpen, 2020.
- [132] Applikon AppliFlex ST, 2023 [zuletzt abgerufen am 06.06.23]. Abgerufen von: <https://www.getinge.com/de/produkte/applikon-appliflex-st/>.
- [133] 3D printing specialized tools for the biotechnology sector with the Lisa PRO, 2023 [zuletzt abgerufen am 09.06.23]. Abgerufen von: <https://sinterit.com/wp-content/uploads/2022/06/aquila-biolabs-case-study.pdf>.
- [134] Kreß, S., Schaller-Ammann, R., Feiel, J., Priedl, J. et al., 3D Printing of Cell Culture Devices: Assessment and Prevention of the Cytotoxicity of Photopolymers for Stereolithography. *Materials (Basel, Switzerland)* 2020, 13.
- [135] Carve, M., Wlodkowic, D., 3D-Printed Chips: Compatibility of Additive Manufacturing Photopolymeric Substrata with Biological Applications. *Micromachines* 2018, 9.
- [136] Williams, D. F., Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2015, 26, 89.
- [137] Zhu, F., Friedrich, T., Nuggeoda, D., Kaslin, J. et al., Assessment of the biocompatibility of three-dimensional-printed polymers using multispecies toxicity tests. *Biomicrofluidics* 2015, 9, 61103.
- [138] Biological evaluation of medical devices: Sample preparation and reference materials, 10993-12:2021.
- [139] Siller, I. G., Enders, A., Gellermann, P., Winkler, S. et al., Characterization of a customized 3D-printed cell culture system using clear, translucent acrylate that enables optical online monitoring. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2020, 15, 55007.
- [140] Kuhnke, L. M., Rehfeld, J. S., Ude, C., Beutel, S., Study on the development and integration of 3D-printed optics in small-scale productions of single-use cultivation vessels. *Eng. Life Sci.* 2022, 22, 440–452.
- [141] Ude, C., Schmidt-Hager, J., Findeis, M., John, G. T. et al., Application of an online-biomass sensor in an optical multisensory platform prototype for growth monitoring of biotechnical relevant microorganism and cell lines in single-use shake flasks. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2014, 14, 17390–17405.
- [142] Latimer, P., Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters. *Annual review of biophysics and bioengineering* 1982, 11, 129–150.
- [143] Guadalupe-Daqui, M., Chen, M., Thompson-Witrick, K. A., MacIntosh, A. J., Yeast Morphology Assessment through Automated Image Analysis during Fermentation. *Fermentation* 2021, 7, 44.

- [144] McElwain, L., Phair, K., Kealey, C., Brady, D., Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* 2022, *44*, 917–931.
- [145] Su, Y., Liu, C., Fang, H., Zhang, D., *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial cell factories* 2020, *19*, 173.
- [146] Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., Hatziloukas, E., *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology* 2020, *6*, 1–31.
- [147] Pronk, J. T., Yde Steems, a, H., van Dijken, J. P., Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996, *12*, 1607–1633.
- [148] Tihanyi, B., Nyitray, L., Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug discovery today. Technologies* 2020, *38*, 25–34.
- [149] Maschke, R. W., Pretzner, B., John, G. T., Herwig, C. et al., Improved Time Resolved KPI and Strain Characterization of Multiple Hosts in Shake Flasks Using Advanced Online Analytics and Data Science. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2022, *9*.
- [150] Farhat, G., Mariampillai, A., Yang, V. X. D., Czarnota, G. J. et al., Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics* 2011, *16*, 70505.
- [151] Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., Vancura, A., Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omic : a journal of integrative biology* 2010, *14*, 629–638.
- [152] Luders, K., *GRUNDLAGEN DER PHYSIK: Kurz und knapp*, SPRINGER SPEKTRUM, [S.l.] 2023.
- [153] Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B. et al., Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2004, *43*, 788–824.
- [154] Finnigan, W., Thomas, A., Cromar, H., Gough, B. et al., Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry. *ChemCatChem* 2017, *9*, 1005–1017.
- [155] Venkitasubramanian, P., Daniels, L., Rosazza, J. P. N., Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *The Journal of biological chemistry* 2007, *282*, 478–485.
- [156] Alexandrov, A., Vignali, M., LaCount, D. J., Quartley, E. et al., A facile method for high-throughput co-expression of protein pairs. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2004, *3*, 934–938.
- [157] Kaur, J., Kumar, A., Kaur, J., Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International journal of biological macromolecules* 2018, *106*, 803–822.
- [158] Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M. et al., Protein production and purification. *Nature methods* 2008, *5*, 135–146.
- [159] Neubauer, P., Winter, J., Expression and Fermentation Strategies for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*, in: Merten, O.-W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G. et al. (Eds.), *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*, Springer Netherlands, Dordrecht 2001, pp. 195–258.

- [160] Weber, D., Patsch, D., Neumann, A., Winkler, M. et al., Production of the Carboxylate Reductase from *Nocardia otitidiscaviarum* in a Soluble, Active Form for in vitro Applications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2021, 22, 1823–1832.
- [161] Merten, O.-W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G. et al. (Eds.), *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*, Springer Netherlands, Dordrecht 2001.
- [162] Derrington, S. R., Turner, N. J., France, S. P., Carboxylic acid reductases (CARs): An industrial perspective. *Journal of biotechnology* 2019, 304, 78–88.
- [163] Ressmann, A. K., Schwendenwein, D., Leonhartsberger, S., Mihovilovic, M. D. et al., Substrate - Independent High - Throughput Assay for the Quantification of Aldehydes. *Adv. Synth. Catal.* 2019.
- [164] Huang, M., Sanchez-Moreiras, A. M., Abel, C., Sohrabi, R. et al., The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- $\beta$ -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *The New phytologist* 2012, 193, 997–1008.
- [165] Vickers, C. E., Bongers, M., Liu, Q., Delatte, T. et al., Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant, cell & environment* 2014, 37, 1753–1775.
- [166] Tetali, S. D., Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta* 2019, 249, 1–8.
- [167] Fan, M., Yuan, S., Li, L., Zheng, J. et al., Application of Terpenoid Compounds in Food and Pharmaceutical Products. *Fermentation* 2023, 9, 119.
- [168] Rodríguez-Concepción, M., Plant isoprenoids: a general overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2014, 1153, 1–5.
- [169] Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S. et al., Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 2564–2566.
- [170] Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R., Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 13172–13177.
- [171] Aguilar, F., Ekramzadeh, K., Scheper, T., Beutel, S., Whole-Cell Production of Patchouli Oil Sesquiterpenes in *Escherichia coli*: Metabolic Engineering and Fermentation Optimization in Solid-Liquid Phase Partitioning Cultivation. *ACS Omega* 2020, 5, 32436–32446.
- [172] Tippmann, S., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J., From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology journal* 2013, 8, 1435–1444.
- [173] Phulara, S. C., Chaturvedi, P., Gupta, P., Isoprenoid-Based Biofuels: Homologous Expression and Heterologous Expression in Prokaryotes. *Applied and environmental microbiology* 2016, 82, 5730–5740.
- [174] Daviet, L., Schalk, M., Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. *Flavour & Fragrance J* 2010, 25, 123–127.

- [175] Yao, Y.-Q., Ding, X., Jia, Y.-C., Huang, C.-X. et al., Anti-tumor effect of beta-elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer letters* 2008, 264, 127–134.
- [176] Zhu, T., Xu, Y., Dong, B., Zhang, J. et al.,  $\beta$ -elemene inhibits proliferation of human glioblastoma cells through the activation of glia maturation factor  $\beta$  and induces sensitization to cisplatin. *Oncology reports* 2011, 26, 405–413.
- [177] Chen, X., Huang, C., Li, K., Liu, J. et al., Recent advances in biosynthesis and pharmacology of  $\beta$ -elemene. *Phytochem Rev* 2023, 22, 169–186.
- [178] Kraker, J. W. de, Franssen, M. C., Groot, A. de, Konig, W. A. et al., (+)-Germacrene A biosynthesis . The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant physiology* 1998, 117, 1381–1392.
- [179] Xu, H., Dickschat, J. S., Germacrene A-A Central Intermediate in Sesquiterpene Biosynthesis. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2020, 26, 17318–17341.
- [180] Kraker, J.-W. de, Franssen, M. C. R., Joerink, M., Groot, A. de et al., Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome p450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant physiology* 2002, 129, 257–268.
- [181] Andersen, T., Cozzi, F., Simonsen, H., Optimization of Biochemical Screening Methods for Volatile and Unstable Sesquiterpenoids Using HS-SPME-GC-MS. *Chromatography* 2015, 2, 277–292.
- [182] Alemdar, S., Entwicklung einer biotechnologischen Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon, 2018.
- [183] Freeman, A., Woodley, J. M., Lilly, M. D., In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 1993, 11, 1007–1012.
- [184] Schewe, H., Mirata, M. A., Schrader, J., Bioprocess engineering for microbial synthesis and conversion of isoprenoids. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2015, 148, 251–286.
- [185] Stark, D., Stockar, U. von, In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2003, 80, 149–175.
- [186] Dafoe, J. T., Daugulis, A. J., In situ product removal in fermentation systems: improved process performance and rational extractant selection. *Biotechnology letters* 2014, 36, 443–460.
- [187] Tsien, R. Y., The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 1998, 67, 509–544.
- [188] Xu, Y., Wu, X., Guo, X., Kong, B. et al., The Boom in 3D-Printed Sensor Technology. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2017, 17.
- [189] Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., Rinas, U., Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, 91, 1203–1213.

# Danksagung

Das Anfertigen dieser Dissertation markiert den Höhepunkt einer anspruchsvollen Reise, die ohne die großzügige Unterstützung und den ermutigenden Beistand zahlreicher Personen nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn. Prof. Dr. Sascha Beutel für die herausragende Betreuung und Bereitstellung des interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die große Unterstützung in schwierigen Zeiten bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper. Zum einen für die Übernahme des Koreferats, aber vor allem für das TCI. Du hast das Institut zu dem gemacht, was es heute ist. Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Übernahme des Vorsitzenden der Prüfungskommission.

Den Projektmitarbeitenden der PreSens Precision Sensing GmbH und Louis Kuhnke danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes 3D-FSV.

Ein großes Danke geht an Friedbert Gellermann, Thorsten Stempel, Martina Weiß, Martin Pähler, Thorleif Hentrop, Dr. Ivo Havlik, Ulrike Dreschel und Christiane Hellwig. Ohne euch würde das Institut nicht so funktionieren und wir würden alle im Chaos versinken.

Danke an Jana, Louis, Steffen, Nicolas, Anton, Elena und Lars sowie Daniel und Tammy für die angenehme, lustige Atmosphäre im Büro – ihr habt das Chaos mal kurzzeitig vergessen lassen.

Carlotta, Katharina, Henrike, Ole, Taieb, Lisa, Marline, Tessa, Michaela sowie dem gesamten Institut danke ich für die gemeinsame Zeit und den Zusammenhalt. Bei Jan und Riekje möchte ich mich für die vielen gemeinsamen Stunden im Technikum bedanken. Auf euch war Verlass, wenn der Reaktor oder die Zellen mal wieder nicht so richtig wollten.

Auch wenn sich unsere gemeinsame Zeit am TCI nur kurz überschritten hat, möchte ich mich bei Pia, Ina, Katharina und Jens bedanken. Ihr hattet immer die richtigen Worte parat – Danke!

Ein großes Dankeschön geht an Svenja und Senta. Ihr habt immer ein offenes Ohr für mich, habt es geschafft, auch mal den nötigen Abstand zu finden und habt für einen wertvollen Austausch über die Fachgrenzen hinaus gesorgt.

Und dann möchte ich mich noch bei den ganzen Menschen bedanken, die mein Leben außerhalb der Uni bereichern. Ganz besonderem Dank gilt der Weltklasse Truppe, Lena, Norman, Nora und Ise und meiner Familie.

# Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

Bachelorarbeit

**Julian Mick**

*Grundlegende Untersuchungen zur Charakterisierung 3D-gedruckter Bioreaktoren*

März 2020 – Januar 2021

Masterarbeit

**Irem Cölükoglu**

*Optimierung der rekombinanten Produktion einer Carboxylreduktase in E. coli*

Februar 2021 – Dezember 2021

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Johanna Sophie Rehfeld  
Geburtsdatum: 19.01.1995  
Geburtsort: Northeim

## Ausbildung

Seit 12/2019 **Promotionsstudium** Chemie  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

10/2017 - 11/2019 **Masterstudium** Life Science  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

10/2013 - 07/2017 **Bachelorstudium** Biosystemtechnik  
Institut für System- und Verfahrenstechnik  
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

08/2005 – 06/2013 **Allgemeine Hochschulreife**  
Gymnasium Corvinianum Northeim

# Publikationen

## Fachartikel

**Rehfeld, J.S.**, Kuhnke, L.M., Ude, C., John, G.T., Beutel, S., (2023). Investigation and evaluation of a 3D-printed optical modified cultivation vessel for improved scattered light measurement of biotechnologically relevant organisms. *Eng Life Sci.* 2023; 23:e2300204. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300204>

Kuhnke, L.M., **Rehfeld, J.S.**, Ude, C., Beutel, S., (2022). Study on the development and integration of 3D-printed optics in small-scale productions of single-use cultivation vessels. *Eng Life Sci.* 2022; 22: 440–452. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100131>

Witt, M., Heuer, C., Miethke, L., Preuß, J.-A., **Rehfeld, J.S.**, Schüling, T., Blume, C., Thoms, S., Stahl, F. (2020). Nachweismethoden von SARS-CoV-2. *Chem. Unserer Zeit*, 54: 368-376. <https://doi.org/10.1002/ciuz.202000058>

Bartling, B., **Rehfeld, J.S.**, Boßmann, D., de Vries, I., Fohrer, J., Lammers, F., Scheper, T., Beutel, S., (2020). Determination of the Structural Integrity and Stability of Polysialic Acid during Alkaline and Thermal Treatment. *Molecules* 2020, 25, 165. <https://doi.org/10.3390/molecules25010165>

Bartling, B., Bröchle, N.C., **Rehfeld, J.S.**, Boßmann, D., Fiebig, T., Litschko, C., Fohrer, J., Gerardy-Schahn, R., Scheper, T., Beutel, S. (2020). Accelerated production of  $\alpha$ 2,8- and  $\alpha$ 2,9-linked polysialic acid in recombinant *Escherichia coli* using high cell density cultivation. *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands), 28, e00562. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00562>

## Konferenzbeiträge

**Rehfeld, JS.**, Bugrov, A., Aguilar, F., Beutel, S.: Whole-Cell Production of the Sesquiterpene Germacrene A in *Escherichia Coli*, 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied Biotechnology, 2022, Aachen (Poster).

**Rehfeld, JS.**, Kuhnke, L., Ude, C., Beutel, S.: Whole-Cell Production of the Sesquiterpene Germacrene A in *Escherichia Coli*, LUCS, 2022, Hannover (Poster).

**Rehfeld, JS.**, Kuhnke, L., Ude, C., Beutel, S.: Basic Investigation of 3D-printed Mini Bioreactors, 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology, 2021, Virtual Event (Poster).