

Technische Universität München

TUM School of Engineering and Design

Automatisierte mikrobielle Expressionsoptimierung durch Kombination von Parallelbioreaktorsystemen im digitalisierten Bioprozesslabor

Nikolas von den Eichen

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr. Ing.) genehmigten Dissertation

Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling
Prüfer*innen: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Marco Oldiges

Die Dissertation wurde am 24.01.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 26.06.2023 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München unter der Betreuung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Daher danke ich Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für das in mich gesetzte Vertrauen das digitalisierte Bioprozesslabor an seinem Lehrstuhl mit aufbauen zu dürfen und für die eingeräumten Freiräume bei der Arbeit an den Projektzielen.

Außerdem danke ich Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Prof. Dr. Marco Oldiges für die Übernahme der Rolle des Zweitprüfers.

Mein Dank gilt auch den Partnern im Projekt „Digitalisierung in der industriellen Biotechnologie“ vom Forschungszentrum Jülich (Prof. Dr. Marco Oldiges) und der Leibniz Universität Hannover (Prof. Dr. Thomas Scheper) für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Michael Osthege vom Forschungszentrum Jülich für dessen zügige, unbürokratische und produktive Zusammenarbeit im Rahmen der Interaktionsstudie der digitalisierten Bioprozesslabore. Ich konnte viel von dir lernen!

Außerdem möchte ich mich bei den Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei den durch mich betreuten Studenten Matthias Schulz, Hannah Marienberg, Valeryia Sidarava, Paul Jacoby, Emmeran Bieringer, Max Huber, Michala Dölle und Nina Beyer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Meiner Partnerin Julia gilt am Schluss besonderer Dank: Sie war während den leichten, aber besonders während den schweren Teilen dieser Arbeit an meiner Seite.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretischer Hintergrund	9
3.1	Wachstum von Mikroorganismen	9
3.2	Bioreaktoren.....	11
3.2.1	Satzbetrieb.....	11
3.2.2	Zulaufprozesse.....	12
3.3	Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	13
3.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	14
3.3.2	Proteinexpression mit <i>E. coli</i>	15
3.4	Miniaturisierte Bioreaktoren.....	17
4	Material & Methoden	23
4.1	Allgemeines Material.....	23
4.2	Mikroorganismen.....	23
4.3	Verwendete Bioreaktoren.....	23
4.3.1	Rührkesselreaktoren im L-Maßstab.....	23
4.3.2	48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab.....	25
4.4	Ablaufsteuerungen zum Betrieb der Rührreaktoren im mL-Maßstab	28
4.4.1	Ablaufsteuerung ohne Berücksichtigung der Echtzeitpriorität	28
4.4.2	Prioritätsbasierte Ablaufsteuerung.....	30
4.5	Kultivierung von <i>E. coli</i> für die zweistufige Expressionsoptimierung	32
4.5.1	Kultivierung im L-Maßstab.....	32
4.5.2	Allgemeine Reaktionsbedingungen im mL-Maßstab.....	33
4.5.3	Kultivierungen von <i>E. coli</i> mCherry im mL-Maßstab	34
4.5.4	Kultivierungen von <i>E. coli</i> NoCAR im mL-Maßstab.....	34
4.5.5	Biotransformation von <i>E. coli</i> NoCAR.....	35
4.5.6	Auswertung der Biotransformationen	36
4.6	Allgemeine analytische Methoden	37

4.7	3D-Drucker für die additive Fertigung	38
4.8	Allgemeine Software	39
5	Ergebnisse	41
5.1	Automatisierter Transfer von Zellsuspensionen	41
5.1.1	Konstruktion der benötigten Bauteile	42
5.1.2	Software zur Steuerung des automatisierten Transfers von Zellsuspensionen	45
5.1.3	Einfluss des Zelltransfers auf Wachstum und Expressionsleistung von <i>E. coli</i>	48
5.2	Einbindung eines Pipettierroboters in die Software-Umgebung eines digitalisierten Bioprozesslabors	49
5.3	Digitaler Zwilling eines Pipettierroboters	62
5.3.1	Prüfung der Ablaufsteuerung	62
5.3.2	Simulation der Pipettierarbeit des Pipettierroboters	63
5.4	Zweistufige Expressionsoptimierung von mCherry produzierendem <i>E. coli</i>	70
5.4.1	Parallele Variation der Induktorkonzentration	70
5.4.2	Parallele Variation der Zulauftrate im L-Maßstab und der Induktorkonzentration im mL-Maßstab	76
5.5	Expressionsuntersuchung von NoCAR in <i>E. coli</i>	82
6	Zusammenfassung und Ausblick	95
7	Literaturverzeichnis	103
8	Abkürzungsverzeichnis	111
9	Symbolverzeichnis	113
10	Abbildungsverzeichnis	115
11	Anhang	121
11.1	Medien	121
11.1.1	Herstellung von Mineralmedium nach Riesenberg	121
11.2	Chemikalienliste	122
11.3	Geräteliste	124
11.4	Verwendete Druckmaterialien	125
11.5	Verwendete Software	125

1 Einleitung

Die Biotechnologie ist eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Mithilfe der Biotechnologie können viele Stoffumwandlungen und Produktionsprozesse im Vergleich zu vergleichbaren chemischen Verfahrensrouten energieeffizient und ressourcenschonend durchgeführt werden. Ihr Einsatz erstreckt sich dabei von den traditionellen Feldern, wie der Lebensmittelbiotechnologie oder der pharmazeutischen Biotechnologie, bis zu dem wachsenden Feld der industriellen Biotechnologie (Bareither and Pollard, 2011; Priebe et al., 2021; Storhas et al., 2013; Wild et al., 2019).

Zusätzlichen Schub erhielt die industrielle Biotechnologie durch die Gentechnik, welche die Gestaltung maßgeschneiderter Biokatalysatoren ermöglicht (Lee et al., 2012; Storhas et al., 2013; Wiechert et al., 2018). Dabei besteht jedoch die Herausforderung, den großen Spielraum in der Gestaltung der Biokatalysatoren und dem zugehörigen Bioprozess schnell und effizient in wirtschaftlich nutzbare Produktionsprozesse umzusetzen. Da die vollständige, prädiktive Simulation der mikrobiellen Stoffumwandlungen noch nicht gelingt, ist die Bioprozessentwicklung auf eine Vielzahl von Versuchen im Labormaßstab angewiesen (Neubauer et al., 2013; Storhas et al., 2013). Insbesondere in Konkurrenz zur chemischen Verfahrenstechnik sind die Entwicklungszyklen dadurch langwierig und teuer (Neubauer et al., 2013). Das Problem wird dadurch verschärft, dass die Laborversuche zur Identifikation geeigneter Biokatalysatoren im Labormaßstab oft unter Bedingungen erfolgen, die keine oder geringe Aussagen über die Leistungsfähigkeit der Biokatalysatoren im anschließenden Produktionsmaßstab zulassen, sodass im schlimmsten Fall ein Teil der Prozessentwicklung wiederholt werden muss (Neubauer et al., 2013; Weuster-Botz et al., 2006). Das umfasst etwa nicht vergleichbare Prozessführungen (Satzverfahren in der Prozessentwicklung versus Zulaufverfahren im Produktionsprozess) oder äußerst geringe Zelldichten im Vergleich zum Produktionsmaßstab. Daher muss ein zentrales Ziel moderner Bioprozessentwicklung sein, zum frühestmöglichen Zeitpunkt Untersuchungsbedingungen bereit zu stellen, die möglichst aussagekräftig für den anschließenden Prozess im Produktionsmaßstab sind.

Um diese Probleme zu lösen, wurden Mikrobioreaktoren entwickelt. Es handelt sich dabei um Reaktoren im μL bis mL -Maßstab auf Basis von geschüttelten (Huber et al., 2009; Tang et al., 2006) oder gerührten Bioreaktoren (Lamping et al., 2003; Puskeiler et al., 2005a; Ratcliffe et al., 2012). Allen gemein ist, dass sie spezifisch entwickelt wurden, um einfach skalierbare Reaktionsbedingungen zu schaffen. Dies umfasst beispielsweise einen vergleichbaren Leistungseintrag zu Rührkesselreaktoren im L -Maßstab (Hortsch and Weuster-Botz, 2010; Li et al., 2018) oder besonders hohe Sauerstoffeintragsraten (Funke et al., 2009; Puskeiler et al., 2005a). Um Mikrobioreaktoren effizient nutzbar zu machen, werden sie standardmäßig

vollautomatisch im Parallelansatz betrieben, beispielsweise mit Hilfe von Laborrobotern (Haby et al., 2019; Hemmerich et al., 2018; Janzen et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a; Rohe et al., 2012)

Wegen ihren vorteilhaften Eigenschaften wurden diese Mikrobioreaktoren in zahllosen Forschungsprojekten eingesetzt und es konnte vielfach gezeigt werden, dass der experimentelle Durchsatz stark gesteigert werden konnte (Hemmerich et al., 2014; Hemmerich et al., 2020; Moses et al., 2012; Sawatzki et al., 2018; Vester et al., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mikrobioreaktoren zum Labormaßstab vergleichbare Ergebnisse liefern können (Hemmerich et al., 2014; Puskeiler et al., 2005a; Rameez et al., 2014; Schmideder et al., 2016).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Proteine sind eine Klasse von Biomolekülen, die in allen Zellen als wichtige molekulare Werkzeuge dienen (Berg et al., 2018). Ihre Aufgaben sind sehr vielfältig und umfassen unter anderem die Zellbewegung, den Zellaufbau, den Stoffwechsel und die Immunantwort (Berg et al., 2018). Da sich diese vielfältigen Funktionen auch biotechnologisch nutzen lassen, werden ausgewählte Proteine künstlich hergestellt (Aggarwal, 2014). In der modernen Biotechnologie werden dafür Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Komagataella pastoris* oder *Corynebacterium glutamicum* genetisch umprogrammiert, sodass sie das gewünschte Zielprotein in unnatürlich großen Mengen herstellen können (Berdichevsky et al., 2011; Damasceno et al., 2012; Faust et al., 2014; Hemmerich et al., 2020; Neubauer and Winter, 2001).

Um geeignete Expressionsbedingungen zu finden, werden diese Mikroorganismen in Bioreaktoren kultiviert (Chmiel et al., 2018; Storhas et al., 2013). Die Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, Substratzugabe...), variieren allerdings stark in Abhängigkeit von Mikroorganismus und Zielprotein (Chmiel et al., 2018; Storhas et al., 2013).

Das führt dazu, dass im Labormaßstab in aufwändigen und langen Versuchsreihen die optimalen Prozessbedingungen für den Proteinproduktionsprozess ermittelt werden müssen.

Häufig werden hierzu Rührkesselreaktoren im L-Maßstab verwendet. Diese sind einfach skalierbar, erfordern durch eine in der Regel sequentielle Versuchsdurchführung allerdings sehr lange Versuchsreihen und binden große Ressourcen an Personen und Laborgeräten (Junker et al., 2009; Pérez et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation geeigneter Prozessbedingungen besteht in der Nutzung von Schüttelkolben, die in großer Zahl parallel betrieben werden (Büchs, 2001). Schüttelkolben sind Erlenmeyerkolben aus Glas oder Kunststoff, die mit Füllvolumina vom mL- bis zum L-Maßstab betrieben werden und bei denen Leistungseintrag und Gasaustausch durch Schütteln des Kolbens auf einer Kreisbahn erfolgt (Büchs, 2001; Chmiel et al., 2018). Schüttelkolben sind zwar einfach und kostengünstig, aber schwer zu automatisieren und binden daher viel manuelle Arbeitskraft (Puskeiler et al., 2005a). Durch das ungünstige Verhältnis von Arbeitsvolumen und Phasengrenzfläche ergeben sich deutlich geringere Gastransferraten als bei Rührkesselreaktoren und dadurch wird die Maßstabsübertragung auf den Produktionsmaßstab erschwert (Chmiel et al., 2018; Neubauer et al., 2013).

Alternativ können geschüttelte Mikrotiterplatten verwendet werden (Betts and Baganz, 2006). Eine Mikrotiterplatte ist eine Kunststoffplatte mit „Kavitäten“ (Vertiefungen) mit einem Füllvolumen von wenigen Mikrolitern bis zu einigen Millilitern (Funke et al., 2009; Hemmerich

et al., 2018). In den Kavitäten erfolgt die Kultivierung der Mikroorganismen. Wenn diese Kunststoffplatte geschüttelt wird, ergibt sich durch die Bewegung der Flüssigphase eine Durchmischung und bei Begasung der Flüssigkeitsoberfläche ein Gasaustausch (Funke et al., 2009; Micheletti and Lye, 2006). Durch die einfache und kompakte Bauweise der Mikrotiterplatte lassen sich viele Versuche parallel durchführen und die Versuche können einfach automatisiert werden (Huber et al., 2009; Rohe et al., 2012). Die Nachteile von geschüttelten Mikrotiterplatten bestehen darin, dass die Maßstabsübertragung auf den Produktionsmaßstab durch die unterschiedliche Art des Leistungseintrags schwierig ist und es durch die geringen Arbeitsvolumina schwierig ist, Nährstoffe oder pH-Stellmittel nachzudosieren (Funke et al., 2010; Funke et al., 2009).

Eine weitere Alternative ist die Verwendung von Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab (Hemmerich et al., 2018; Neubauer et al., 2013). Ein besonders fortgeschrittenes Beispiel davon ist der „bioREACTOR 48“ (Bioreaktorblock), bei dem 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab auf einer kompakten Fläche mit magnetisch-induktivem Antrieb betrieben werden können (Puskeiler et al., 2005a; Weuster-Botz et al., 2005). Der Bioreaktorblock zeichnet sich durch eine zum L-Maßstab vergleichbare Gastransferrate aus (Puskeiler et al., 2005a). Dadurch ergibt sich eine einfache Skalierbarkeit der Reaktionsbedingungen (Schmideder et al., 2016).

Bei der Proteinproduktion mithilfe von Mikroorganismen wird oft ein Zulaufverfahren eingesetzt (Neubauer et al., 2013; Neubauer and Winter, 2001). Dabei werden während der Kultivierung Nährstoffe nachdosiert, um beispielsweise eine geeignete Wachstumsrate einzustellen (Choi et al., 2006; Hellmuth et al., 1994; Kim et al., 2005; Neubauer and Winter, 2001; Schmideder et al., 2016). Außerdem wird die Zellproduktion zeitlich von der Proteinproduktion entkoppelt, da die Proteinproduktion eine große metabolische Last für die Zelle darstellt, welche das Zellwachstum negativ beeinflussen könnte (Bhattacharya and Dubey, 1995; Choi et al., 2000; Neubauer and Winter, 2001).

Die Zellbildungsphase ist typischerweise spezifisch für den Mikroorganismus, die Proteinproduktionsphase typischerweise spezifisch für das produzierte Protein und die Art, wie das Expressionssystem gestaltet wurde (Choi et al., 2006; Hellmuth et al., 1994; Kim et al., 2004; Korz et al., 1995; Riesenberg and Guthke, 1999; Riesenberg et al., 1991). Da die Proteinexpression im Prozess auf die Zellbildungsphase folgt, kann die biologische Streuung der Zellbildungsphase die anschließende Expressionsphase beeinflussen. Dadurch kann es unklar sein, ob beobachtete Veränderungen in den gebildeten Proteinmengen auf die Zellbildungsphase oder auf die Expressionsphase zurück zu führen sind.

Daher ist die Zielsetzung dieser Arbeit eine geeignete Kombination und Automatisierung von parallel betriebenen Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab, um eine sichere und

effiziente Identifikation von Reaktionsbedingungen für die optimale Proteinexpression zu ermöglichen. Die Zellbildungsphase erfolgt dabei idealerweise im L-Maßstab, um einen definierten, identischen Ausgangspunkt für die Expressionsphase zu erzeugen. Im parallelen Rührkesselreaktorsystem im mL-Maßstab erfolgen anschließend Untersuchungen zur Proteinproduktion, da durch die große Anzahl parallel nutzbarer Reaktoren eine große Anzahl Variablen variiert werden können. Um Kultivierungen, die im L-Maßstab begonnen wurden (Zellbildungsphase), im mL-Maßstab weiter führen zu können, muss eine geeignete technische Lösung erarbeitet werden, um den Inhalt der Reaktoren des L-Maßstabs automatisiert auf Reaktoren im mL-Maßstab übertragen zu können.

Um eine automatisierte Versuchsdurchführung zu ermöglichen, werden Parallelbioreaktoren im mL-Maßstab mit einem handelsüblichen Pipettierroboter betrieben (Haby et al., 2019; Janzen et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a). Pipettierroboter bestehen aus einem teilweise abgeschlossenen Arbeitsbereich, innerhalb dessen ein oder mehrere Roboterarme Komponenten für den Flüssigkeitstransport (Pipettierkanal) zum Einsatz bringen können. Darüber hinaus sind meist Greifarme installiert, die typische Labor-Verbrauchsmaterialien greifen und transportieren können. Dadurch kann der Roboter mit anderen Laborgeräten wie Zentrifugen oder Inkubationsschränken interagieren. Insgesamt können damit viele Laborprozesse vollständig automatisiert bearbeitet werden (Bogue, 2012; Kong et al., 2012). Die meisten Pipettierroboter verfügen über 8 Pipettierkanäle, die unabhängig voneinander genutzt werden können.

Diese 8 Pipettierkanäle werden beim Betrieb des Bioreaktorblocks im mL-Maßstab dazu genutzt, pH-Stellmittel und Nährstoffe nachzudosieren sowie Proben aus den Reaktoren zu nehmen und zu verarbeiten (Haby et al., 2019; Janzen et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a). Dies führt zu dem Problem, dass all diese Aufgaben potentiell für eine Vielzahl von Reaktoren parallel erfolgen müssen und daher zeitlich kollidieren (Weuster-Botz et al., 2005). Standardmäßig werden die Aufgaben daher nach vorher festgelegten Schleifen durchgeführt (Haby et al., 2019).

Hier ist die Nutzung einer Ablaufsteuerung für den Betrieb der Parallelbioreaktoren im mL-Maßstab sinnvoll, welche die anstehenden Aufgaben in Echtzeit für den Pipettierroboter priorisiert. In einem parallelen Forschungsvorhaben wurde eine solche Ablaufsteuerung realisiert (Bromig et al., 2022). Diese kalkuliert für jede konfigurierte Robotertätigkeit (Probenahme, pH-Regelung, Nährstoffdosierung...) die Priorität basierend auf dem Zeitpunkt im Prozess (wenn eine regelmäßige Nährstoffdosierung gewünscht ist) oder auf den Echtzeitdaten (bei der pH-Regelung). Wenn mehrere Aufgaben gleichzeitig ausführbar wären, wird die Aufgabe mit der höchsten Priorität zuerst ausgeführt.

Hierzu muss die Ablaufsteuerung die Aufgaben inklusive ihrer Variablen an den Pipettierroboter übergeben können. Da ein Pipettierroboter in den meisten Nutzungsfällen das komplexeste Gerät im Labor ist, welches die Arbeit aller gekoppelten Geräte steuert, ist die Software der Pipettierroboter stark darauf ausgelegt, andere Geräte zu steuern. Die Pipettierrobotersoftware bietet üblicherweise keine Möglichkeiten, den Pipettierroboter mit einer anderen Software zu steuern.

Daher wird eine Schnittstelle benötigt, die die Einbindung des zur Verfügung stehenden Pipettierroboters in die Ablaufsteuerung ermöglicht. Der Pipettierroboter sollte bei dieser Schnittstelle ein reiner Befehlsempfänger sein, welcher der Ablaufsteuerung ereignisgesteuert seine Verfügbarkeit anzeigt und Pipettieraufgaben entgegennimmt. Die Schnittstelle sollte außerdem so schnell wie möglich sein, um die Tätigkeit des Roboters nicht zu verlangsamen.

Für den sicheren Betrieb des Pipettierroboters mit der Ablaufsteuerung wäre es außerdem vorteilhaft, einen einfachen digitalen Zwilling des Pipettierroboters zu realisieren. Ein digitaler Zwilling ist eine digitale Repräsentation einer physikalischen Entität, welche sich bezüglich seiner Schnittstellen möglichst identisch zur physikalischen Entität verhält. Dadurch kann die Arbeit mit der physikalischen Entität untersucht werden, ohne diese tatsächlich nutzen zu müssen (Chen et al., 2020).

Da der Pipettierroboter als reiner Befehlsempfänger konzipiert ist, besteht die Tätigkeit des Pipettierroboters aus Sicht der Ablaufsteuerung lediglich aus der Entgegennahme von Befehlen und einer Durchführungszeit, bis der Roboter wieder zur Verfügung steht. Die Durchführungszeit ist dabei von der konkreten Aufgabe und deren Variablen abhängig. Damit bietet es sich an, Algorithmen zu entwickeln, die diese Arbeitszeit basierend auf zur Verfügung stehenden historischen Prozessdaten abschätzen, um dadurch einen für die Ablaufsteuerung plausiblen Roboter zu simulieren.

Wenn der Pipettierroboter eine bestimmte Anzahl an Reaktoren im mL-Maßstab betreiben soll, wird durch die geplanten Robotertätigkeiten bestimmt, ob dies zu einer zeitlichen Überlastung des Roboters führt. So könnte eine große Zahl zu betreibender Reaktoren kombiniert mit einer aufwändigen Probenahme, und einer hohen Frequenz, mit der Nährstoffe nachdosiert werden sollen, dazu führen, dass der Roboter noch vor Abschluss einer Tätigkeit eine Vielzahl neuer Aufgaben erhalten könnte und diese nie vollständig abarbeitet. Dies würde keine sinnvolle Prozessführung erlauben. Mit dem digitalen Zwilling des Pipettierroboters könnte allerdings die Auslastung des Roboters bei einer bestimmten Konfiguration zuvor *in silico* abgeschätzt und so ein sicherer realer Betrieb ermöglicht werden.

Die Kombination und Automatisierung von Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab zur Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen für die Proteinexpression erfolgte anhand von zwei Prozessbeispielen.

Als erstes Prozessbeispiel wurde die Expression des Proteins mCherry in *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein fluoreszierendes Protein, welches ursprünglich aus der Qualle *Discosoma* isoliert wurde und welches rot fluoresziert (Shaner et al., 2004). Die Anregungswellenlänge beträgt 587 nm, die Emissionswellenlänge 610 nm (Lambert, 2019). Dieses Prozessbeispiel wurde gewählt, da sich die Menge des gebildeten Proteins mCherry einfach photometrisch nachweisen lässt.

Als zweites Prozessbeispiel wurde die Expression einer Carboxylreduktase aus *Nocardia otitidiscaviarum* (NoCAR) in *E. coli* gewählt. Carboxylreduktasen sind eine Klasse von verhältnismäßig großen (~ 130 kDa) Enzymen, die für die selektive Reduktion von Carboxylsäuren aus Aldehyden genutzt werden können (Weber et al., 2021). NoCAR gilt als schwierig zu produzierendes Protein, da es zur Bildung von Einschlusskörperchen neigt (Weber et al., 2021). Einschlusskörperchen sind unlösliche Aggregate von Proteinen, die bei der mikrobiellen Proteinproduktion insbesondere bei großen oder schlecht wasserlöslichen Proteinen intrazellulär entstehen. Einschlusskörperchen sind meist nicht biologisch aktiv und daher nicht technisch nutzbar (Bhatwa et al., 2021). Daher ist es sinnvoll, die Proteinproduktionsbedingungen so zu wählen, dass das Protein in löslicher Form vorliegt.

Die Menge an aktiver NoCAR kann über eine Ganzzellbiotransformation nach Ende der Expression abgeschätzt werden. Bei einer Ganzzellbiotransformation werden die ganzen Zellen mit dem überexprimierten Zielprotein als Biokatalysator genutzt (Chmiel et al., 2018). Dafür muss ein geeignetes Edukt vorgelegt werden, welches vom Ganzzellbiokatalysator umgesetzt wird. Das entstehende Produkt sollte idealerweise einfach nachweisbar sein. Für den Mikroorganismus und NoCAR wurde bereits eine Ganzzellbiotransformation für die Untersuchung von Kultivierungen in Mikrotiterplatten veröffentlicht, die für den vorhandenen Versuchsaufbau automatisiert werden muss (Schwendenwein et al., 2019).

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Wachstum von Mikroorganismen

Mikroorganismen können als Biokatalysatoren für verschiedenste Anwendungen genutzt werden. Ihr zentraler Vorteil ist dabei, dass sich der Biokatalysator selbstständig vermehren kann. Damit diese Zellbildung erfolgen kann, müssen im Medium alle Substrate vorgelegt werden, die zum Wachstum nötig sind. Das umfasst die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, aber auch alle anderen Elemente, aus denen der Mikroorganismus aufgebaut ist (Chmiel et al., 2018).

Das Wachstum von Mikroorganismen kann mit einfachen formalkinetischen Ansätzen beschrieben werden. Das mikrobielle Wachstum kann bei Bakterien oft mit der Vermehrung der Zellzahl gleichgesetzt werden. Dies ist dann zutreffend, wenn sich die Zusammensetzung der Zellen in Abhängigkeit vom Wachstumszeitpunkt nicht ändert (Chmiel et al., 2018). Die spezifische Wachstumsrate ist wie folgt definiert:

$$\mu = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (1)$$

Dabei beschreibt c_x die Biomassekonzentration und t die Zeit. (Chmiel et al., 2018)

Die Integration der obigen Gleichung ermöglicht die Beschreibung der Veränderung der Biomassekonzentration bei einer konstanten Wachstumsrate in einem ideal durchmischten Volumenelement.

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (2)$$

Dabei beschreibt $c_{x,0}$ die Biomassekonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ (Chmiel et al., 2018).

Für das Biomassewachstum setzen die Zellen Substrate um, die Stöchiometrie dieses Vorgangs kann über den Ertragskoeffizienten beschrieben werden (Kato et al., 2015). Dieser lässt sich formulieren als:

$$Y_{xS,\mu} = \frac{dc_x}{dc_s} \quad (3)$$

Dabei beschreibt c_s die limitierende Substratkonzentration (Kato et al., 2015).

Der qualitative Verlauf der Biomassekonzentration bei einem Satzprozess in einem ideal durchmischten Reaktor ist in Abbildung 1 dargestellt.

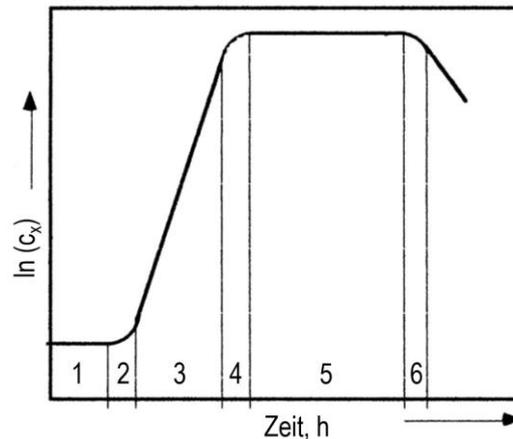


Abbildung 1: Qualitativer Verlauf der logarithmierten mikrobiellen Zellkonzentration bei einem Satzprozess. Es findet zuerst (1) die Verzögerungsphase statt, dann die (2) 1. Übergangsphase, danach die (3) exponentielle Phase, dann die (4) 2. Übergangsphase und die (5) stationäre Phase und die (6) Absterbephase (Abbildung abgewandelt aus (Storhas et al., 2013)).

Nachdem die Zellen im Reaktor vorgelegt wurden, erfolgt zuerst eine Verzögerungsphase (1), bei der noch kein Wachstum stattfindet und makroskopisch noch kein Wachstum sichtbar wird und die Zellen sich an die neuen Bedingungen anpassen. Nach erfolgter Adaption befinden sich die Zellen in der 1. Übergangsphase (2), bei der sich die Wachstumsrate langsam steigert aber noch nicht maximal ist. Dann wird die exponentielle Wachstumsphase (3) durchlaufen, während der die Zellen sich mit einer konstanten Wachstumsrate μ_{\max} vermehren. Es herrschen unlimitierte Bedingungen. In der 2. Übergangsphase (4) verlangsamt sich das Wachstum durch die sich verringernde Verfügbarkeit eines limitierenden Substrats und eventuell die Anwesenheit von toxischen Stoffwechselprodukten. Während der stationären Phase (5) befindet sich die Zellbildung und das Absterben der Zellen im Gleichgewicht, die Biomassekonzentration bleibt konstant. Am Schluss wird eine Absterbephase (6) erreicht, bei der das Absterben der Zellen die Zellbildung übersteigt und die messbare Biomassekonzentration sinkt (Chmiel et al., 2018; Storhas et al., 2013).

Von den hier beschriebenen Phasen kann die Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase und die 2. Übergangsphase durch ein stark vereinfachendes Sättigungsmodell beschrieben werden (Monod, 1949).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} \quad (3)$$

μ_{\max} beschreibt die maximale Wachstumsrate. Die Variable c_s beschreibt die Konzentration des limitierenden Substrats. K_s ist die Sättigungskonzentration des limitierenden Substrats. Bei einer Substratkonzentration von $c_s = K_s$, ist die Wachstumsrate genau die Hälfte der maximalen Wachstumsrate μ_{\max} (Chmiel et al., 2018; Storhas et al., 2013).

3.2 Bioreaktoren

Ein Bioreaktor ist ein „Apparat (...) in dem unter Mitwirkung von Biokatalysatoren Stoffumwandlungen mit Enzymen, Mikroorganismen oder Zellen stattfinden“ (Chmiel et al., 2018). Die wesentlichen Aufgaben eines Bioreaktors sind Homogenisieren, Suspendieren und Dispergieren der Reaktionslösung. Außerdem muss ein (kontrollierter) Energie- und Stoffaustausch mit der Umgebung und eine Sterilbarriere gewährleistet werden. Rührkesselreaktoren sind die meist verbreiteten Bioreaktoren (Weuster-Botz et al., 2006). Vereinfachend kann im Labor oft von einem idealen Rührkesselreaktor ausgegangen werden. Das bedeutet, dass die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften und deshalb auch die Reaktionsraten räumlich konstant sind (Chmiel et al., 2018).

Grundsätzlich kann die Stoffbilanz eines idealen Rührkesselreaktors vereinfachend beschrieben werden als:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + R_i \cdot V_R \quad (4)$$

V_R beschreibt das Reaktorvolumen und c_i , $c_{i,ein}$ sowie $c_{i,aus}$ die Konzentrationen der Komponente i im Reaktor sowie im Zulauf- und Ablaufvolumenstrom. F_{ein} und F_{aus} beschreiben den Zulauf- und Ablaufvolumenstrom. R_i beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i (Chmiel et al., 2018).

Diese allgemeine Stoffbilanz lässt sich für verschiedene Betriebsarten vereinfachen. Die Wichtigsten umfassen den Satzbetrieb, den Zulaufbetrieb und den kontinuierlichen Betrieb. Auf den Satzbetrieb und den Zulaufbetrieb soll im Folgenden näher eingegangen werden, da diese in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.2.1 Satzbetrieb

Beim Satzbetrieb wird der Reaktor als geschlossenes System in Bezug auf die Flüssigphase betrieben. Das heißt, es gibt keine flüssigen Zu- oder Ablaufströme und das Volumen bleibt konstant. Die Zugabe von pH-Stellmitteln und Antischaummittel wird typischerweise vernachlässigt. Die Stoffbilanz lässt sich dann deutlich vereinfachen zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = R_i \quad (5)$$

Da keine Zu- oder Ablaufströme existieren, ändert sich die Konzentration der Komponente i nur durch in dem Reaktor stattfindende Reaktionen.

Der Satzprozess ist eine einfache Möglichkeit, Bioprozesse durchzuführen und wird daher oft eingesetzt, wenn mit begrenztem technischen und finanziellen Aufwand eine große Anzahl von Versuchen durchgeführt werden muss (Chmiel et al., 2018; Weuster-Botz et al., 2006).

3.2.2 Zulaufprozesse

Bei Vorliegen einer Substratüberschussinhibition oder der Bildung von toxischen Nebenprodukten kann ein Zulaufprozess für das Erreichen hoher Zelldichten hilfreich sein. Der Zulaufprozess wird oft nach einer vorher im gleichen Reaktor abgelaufenen Satzphase initiiert. Beim Zulaufprozess fließt Flüssigkeit in den Reaktor, das Reaktionsvolumen verändert sich. Die Stoffbilanz stellt sich dann folgendermaßen dar:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + V_R \cdot R_i \quad (6)$$

Bei Anwendung der Produktregel ergibt sich:

$$c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} + \frac{dc_i}{dt} \cdot V_R = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + V_R \cdot R_i \quad (7)$$

Da die zeitliche Änderung des Reaktorvolumens durch den Zulaufvolumenstrom F_{ein} erfolgt, gilt:

$$c_i \cdot F_{ein} + \frac{dc_i}{dt} \cdot V_R = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + V_R \cdot R_i \quad (8)$$

Durch umstellen ergibt sich:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + R_i \quad (9)$$

Mit einem Zulaufverfahren wird oft das Ziel verfolgt, die Zellen nicht zu Prozessbeginn mit sehr hohen Substratkonzentrationen zu konfrontieren. Dabei ist es grundsätzlich möglich, die Substratkonzentration in einem Zulaufprozess zu regeln, dies erfordert jedoch aufwändige Messtechnik. Oft ist es einfacher, über ein vordefiniertes Zulaufprofil die Wachstumsrate zu begrenzen (Korz et al., 1995).

Bei einer konstanten Wachstumsrate ist die Änderung der Substratkonzentration im Reaktor 0, daher ergibt sich die Stoffbilanz zu:

$$F_{ein} = \frac{V_R \cdot R_s}{(c_{s,ein} - c_s)} \quad (10)$$

Die Substrataufnahmerate kann unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels formuliert werden als:

$$R_s = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} \cdot c_x \quad (11)$$

Wenn die Volumenänderung im Reaktor vernachlässigbar klein ist, lässt sich die Zelldichte in Abhängigkeit von der Zeit bei konstanter Wachstumsrate beschreiben als:

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (12)$$

Beides zusammen in Gleichung 10 eingesetzt ergibt:

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{x,0}}{(c_{s,ein} - c_s) \cdot Y_{XS,\mu}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (13)$$

Da $c_{s,ein}$ in der Regel sehr viel größer als c_s ist, kann die Gleichung weiter vereinfacht werden:

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{x,0}}{c_{s,ein} \cdot Y_{XS,\mu}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (14)$$

Die Variable $c_{x,0}$ beschreibt hier die Biomassekonzentration zum Zulaufstart, also typischerweise nach Abschluss des vorangegangenen Satzprozesses. Wenn diese Biomassedichte nicht während des Prozesses gemessen werden kann, kann es vorteilhaft sein, diese abzuschätzen. Dies ist möglich über den Ertragskoeffizienten (Gleichung 3).

Für den Prozesszeitraum des Satzprozesses gilt:

$$\Delta c_x = Y_{XS,\mu} \cdot \Delta c_s \quad (15)$$

Bei geringer Startzellkonzentration entspricht die gebildete Gesamtbiomasse Δc_x nach Ende der Satzphase näherungsweise der gebildeten Biomassekonzentration. Wenn sichergestellt wird, dass das gesamte Substrat im Satzprozess verbraucht wird, entspricht Δc_s dem vorgelegten Substrat aus der Satzphase. Dies lässt sich dann wieder in die Gleichung 14 einsetzen:

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{s,Satz} \cdot Y_{XS,\mu}}{c_{s,ein} \cdot Y_{XS,\mu}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (16)$$

Beziehungweise:

$$F_{ein} = \frac{V_{R,0} \cdot \mu_{set} \cdot c_{s,Satz}}{c_{s,ein}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \quad (17)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung lässt sich der Zulaufvolumenstrom bei einem Rührkesselreaktor nach einem Satzversuch ohne jegliche Messung einstellen.

3.3 Das Bakterium *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Enterobakterium, welches natürlicherweise als Symbiont in der Darmflora des Menschen vorkommt (Arumugam et al., 2011; Neubauer and Winter, 2001). *E. coli* ist ein weit verbreiteter Modellorganismus für viele mikrobielle Produktionsprozesse, hauptsächlich deshalb, weil die meisten gentechnischen Werkzeuge an *E. coli* entwickelt wurden und daher dort zuverlässig funktionieren (Choi et al., 2006; Neubauer and Winter, 2001; Terpe, 2006). So existiert eine Vielzahl von Promotern, Stämmen und Plasmiden, die für die Produktion von Proteinen mit *E. coli* in Frage kommen (Terpe, 2006).

Im Folgenden sollen daher zuerst die Herausforderungen und Strategien für die Kultivierung von *E. coli* beschrieben werden. Danach wird auf die Strategien für die Proteinproduktion mit *E. coli* eingegangen.

3.3.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli kann eine Vielzahl von Monosacchariden als Kohlenstoffquelle verwerten, in der Kultivierung im für Bioprozesse dominieren allerdings Glukose und Glycerin (Förster and Gescher, 2014; Neubauer and Winter, 2001). Für Bioprozesse werden bevorzugt definierte Medien eingesetzt, bei denen im Unterschied zu Komplexmedien alle Bestandteile chemisch definiert sind. Dies sorgt dafür, dass die vorhandenen Nährstoffe präziser eingestellt werden können und so die Reproduzierbarkeit der Kultivierungen steigt (Lee, 1996). Dabei ist ein Überschuss von Nährstoffen nicht zwangsläufig von Vorteil, da bestimmte Nährstoffe in hohen Konzentrationen das Wachstum von *E. coli* hemmen. Das umfasst Ammonium (ab 3 g L^{-1}), Eisen (ab $1,15 \text{ g L}^{-1}$), Magnesium (ab $8,7 \text{ g L}^{-1}$) Phosphor (10 g L^{-1}) und Zink ($0,038 \text{ g L}^{-1}$) (Riesenberg, 1991). Es wurden Medien für *E. coli* entwickelt, bei denen alle Komponenten mit Ausnahme des Zuckers und der Stickstoffquelle für Zelldichten bis ca. 110 g L^{-1} vorgelegt werden konnten (Riesenberg et al., 1991).

Grundsätzlich kann *E. coli* mit den meisten Prozessführungsstrategien kultiviert werden, in der industriellen Praxis dominiert jedoch der Zulaufprozess, da damit schnell hohe Zelldichten bei vertretbarem Aufwand realisiert werden können. Bei Zulaufprozessen mit *E. coli* wird normalerweise nach einer kurzen Satzphase für die initiale Zellbildung ein Zulauf gestartet, welcher die limitierende Kohlenstoffquelle enthält (Riesenberg and Guthke, 1999). Der Zulauf kann allerdings je nach Mediengestaltung auch noch Spurenelemente, eine Stickstoffquelle und einzelne Salze enthalten (Korz et al., 1995; Puskeiler et al., 2005a; Riesenberg, 1991). Die Stickstoffquelle im Zulauf kann entfallen, wenn Ammonium für die Titration bei der Regelung des pH genutzt wird (Lee, 1996).

Ein Kernziel beim Zulaufprozess bei *E. coli* ist die Vermeidung der Acetatbildung (Eiteman and Altman, 2006). *E. coli* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, welches bei Fehlen von Sauerstoff zur Säuregärung fähig ist (Förster and Gescher, 2014). Es bildet allerdings auch Acetat, wenn hinreichend Sauerstoff verfügbar ist, die zelluläre Sauerstoffaufnahme allerdings schon erschöpft ist (Eiteman and Altman, 2006; Varma and Palsson, 1994). Da die zelluläre Sauerstoffaufnahme bei aerobem Wachstum mit der Wachstumsrate korreliert, lässt sich die Bildung von Acetat qualitativ wie in Abbildung 2 darstellen.

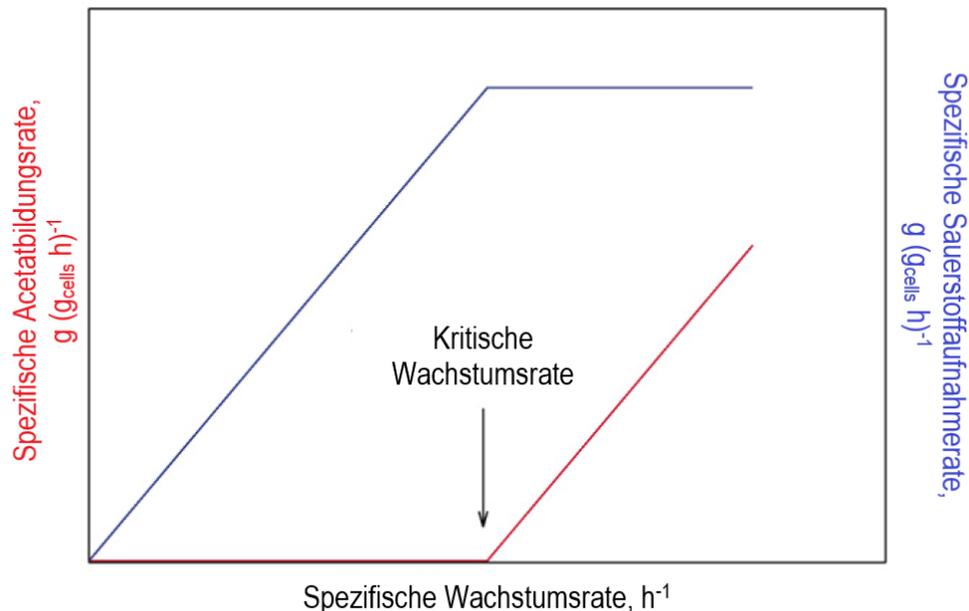


Abbildung 2: Qualitative Beschreibung, unter welchen Bedingungen *E. coli* bei aeroben Prozessen Acetat bildet. Beim Wachstum auf Glukose wird Acetat erst gebildet, wenn die kritische Wachstumsrate überschritten wurde. Die kritische Wachstumsrate korreliert mit der maximalen zellulären Sauerstoffaufnahme. Die kritische Wachstumsrate ist deutlich niedriger als die maximale Wachstumsrate (Abbildung abgewandelt aus (Eiteman and Altman, 2006)).

Grundsätzlich wird demnach Acetat gebildet, wenn eine gewisse kritische Wachstumsrate überschritten wird, wobei die kritische Wachstumsrate unterhalb der maximal erreichbaren Wachstumsrate liegt. Die kritische Wachstumsrate, ab der *E. coli* beginnt Acetat zu bilden, variiert je nach Stamm und liegt zwischen $0,14 - 0,17 h^{-1}$ bei Zulaufprozessen und $0,35 - 0,48 h^{-1}$ bei kontinuierlichen Prozessen (Eiteman and Altman, 2006; Lee, 1996).

Das Problem ist, dass Acetat schon ab geringen Konzentrationen ($> 0,5 g L^{-1}$) sowohl das Wachstum als auch die Proteinbildung von *E. coli* hemmt (Jensen and Carlsen, 1990; Koh et al., 1992; Nakano et al., 1997). Daher ist es bei der Gestaltung eines Zulaufprozesses wichtig, eine Wachstumsrate einzustellen, die sicher unterhalb der kritischen Wachstumsrate liegt. Dies erfolgt normalerweise durch ein vorgegebenes, exponentielles Dosierprofil, welches basierend auf kinetischen Daten des verwendeten Stammes konfiguriert wird (Korz et al., 1995). Das ermöglicht die Einstellung einer festen Wachstumsrate ohne komplexe Rückkopplungsschleifen über Abgasmessung oder die on-line Messung des limitierenden Substrats (Horn et al., 1996; Riesenberget al., 1991; Turner et al., 1994). In einer vorher abgelaufenen Satzphase gebildetes Acetat kann im folgenden Zulaufverfahren auch wieder von den Zellen verwertet werden (Riesenberget al., 1991; Varma and Palsson, 1994).

3.3.2 Proteinexpression mit *E. coli*

Da die Proteinproduktion eine große metabolische Last für die Zellen darstellen kann, ist die zeitliche Trennung von Zellbildung und Proteinbildungsphase häufig in der Produktion von

rekombinanten Proteinen mit *E. coli* (Neubauer and Winter, 2001). Dafür muss die Proteinproduktion durch steuerbare Promoter einstellbar sein. Bei *E. coli* steht dafür eine Vielzahl von genetischen Konstrukten zur Verfügung (Terpe, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das T7 Expressionssystem verwendet, welches daher hier kurz erklärt werden soll (Tabor and Richardson, 1985). Beim T7 Expressionssystem ist auf dem Chromosom des Bakteriums (normalerweise *E. coli* BL21 (DE3)) das Protein für die T7 RNA-Polymerase (aus dem T7-Phagen) unter Kontrolle eines lac Promoters kodiert. Zusätzlich ist auf einem Plasmid das zu exprimierende Protein unter Kontrolle eines T7-Promoters codiert. Daher wird bei Zugabe eines Induktors für den lac Promoter zuerst die T7 RNA-Polymerase synthetisiert, welche dann das zu exprimierende Protein vom Plasmid transkribiert (Studier and Moffatt, 1986). Dieses System erlaubt eine sehr große Expressionsstärke und wird daher viel bei Prozessen eingesetzt, bei denen maximale Konzentrationen des Zielproteins gewünscht sind (Terpe, 2006). Es kann sowohl mithilfe des natürlichen Induktors Lactose als auch mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Lactose ist vergleichsweise billig, wird allerdings durch die Zellen abgebaut. Dadurch verringert sich die Induktionsstärke mit der Zeit (Neubauer and Hofmann, 1994). Dies kann umgangen werden, wenn eine zusätzliche Kohlenstoffquelle eingesetzt wird, damit die Zellen die Lactose nicht spalten (Ukkonen et al., 2013).

IPTG ist ein strukturelles Analogon zu Lactose und aktiviert dieselben Promotoren wie Lactose, kann von *E. coli* dabei allerdings nicht abgebaut werden. Daher bleibt die Konzentration an IPTG während der Expression konstant (Terpe, 2006; Ukkonen et al., 2013). Die optimale IPTG-Konzentration während der Expression kann dabei nicht im Vorhinein bestimmt werden, da diese stark vom Protein, den Prozessbedingungen, dem Wirt und der Zellkonzentration abhängt (Choi et al., 2000; Durany et al., 2004; Olaofe et al., 2010). Bei hohen Induktorkonzentrationen und niedrigen Zelldichten kann sogar ein negativer Effekt auf das Zellwachstum beobachtet werden (Malakar and Venkatesh, 2012).

Um vor der Induktion genug Zellen zur Produktion des Zielproteins im Reaktionsgefäß zu haben, kann im einfachsten Fall auf ein Autoinduktionsmedium zurückgegriffen werden. Die Kernidee dabei ist, dass *E. coli* einen anderen Zucker wie Glucose vor dem Induktor Lactose aufnimmt und verwertet (Katabolitrepression). Dadurch erfolgt bis zum vollständigen Verbrauch der Glukose keine Expression (Faust et al., 2015).

Alternativ wird der Induktor nach einer vordefinierten Prozesszeit oder bei Erreichen einer gewissen Zelldichte zugegeben, um die Proteinbildung zu starten (Faust et al., 2014; Rohe et al., 2012). Bis dahin werden Standardverfahren für die schnelle Produktion von Zellen, typischerweise ein Satzprozess gefolgt von einem Zulauf mit limitierendem Substrat,

durchgeführt (Choi et al., 2000; Jeong Ki and Lee Sang, 1999; Pack et al., 1993; Wilms et al., 2001).

Die Zellbildungsphase bei *E. coli* ist verhältnismäßig gut verstanden und erfolgt daher meist nach Standardverfahren (Neubauer and Winter, 2001). Die optimalen Prozessbedingungen für die Proteinbildungsphase sind jedoch individuell unterschiedlich, daher sind dort zur Identifikation geeigneter Bedingungen oft eine Vielzahl von Experimenten nötig. Einige der häufiger untersuchten Einflussgrößen zur Verbesserung der Expression sind die Zulauftrate, die Induktorkonzentration, die Reaktionstemperatur und der pH. Optimale Bedingungen scheinen dabei sehr stark vom Zielprotein abzuhängen (Neubauer and Winter, 2001; Olaofe et al., 2010; Sevastyanovich et al., 2009; Wilms et al., 2001).

3.4 Miniaturisierte Bioreaktoren

Bei der Bioprozessentwicklung wird typischerweise zuerst ein geeigneter Biokatalysator für die gewünschte Umsetzung gestaltet und anschließend die Reaktionsbedingungen in einem skalierbaren Maßstab untersucht (Chmiel et al., 2018). Da diese Untersuchungen eine große Anzahl von Versuchen bedingen, müssen diese Versuche mit möglichst geringem Aufwand im kleinen Maßstab durchgeführt werden (Weuster-Botz, 2005). Damit eine möglichst große Aussagekraft der Versuche für den anschließenden Produktionsmaßstab gegeben ist, werden miniaturisierte Bioreaktoren verwendet (Neubauer et al., 2013).

Nach Hemmerich *et al.* (2018) sollen die Reaktionsbedingungen in den miniaturisierten Bioreaktoren hinsichtlich Temperatur, pH und Zulaufprofilen so präzise wie möglich kontrollierbar sein. Dies soll dann alle relevanten Prozessführungsstrategien ermöglichen (Satz, Zulauf und kontinuierlicher Betrieb) und dabei ebenso skalierbar sein wie standardmäßig verwendete Reaktoren im Labormaßstab (L-Maßstab). Um ein hohes Tempo bei der Durchmusterung zu ermöglichen, sollen die miniaturisierten Bioreaktoren ein hohes Maß an Parallelisierung innerhalb eines einzelnen Experiments ermöglichen. Außerdem sollen miniaturisierte Bioreaktoren mit Laborrobotern automatisierbar sein, um mit einem hohen Maß an Nutzerfreundlichkeit parallele Versuchsdurchführungen zu ermöglichen. Die Laborroboter und sonstigen integrierten Laborgeräte sollen auch eine möglichst universelle Analytik für eine Vielzahl von mikrobiellen Prozessen ermöglichen. Zu guter Letzt sollte die technische Vor- und Nachbereitungszeit der miniaturisierten Reaktoren mit Laborroboter so kurz wie möglich sein, um einen möglichst hohen Versuchsdurchsatz zu ermöglichen (Hemmerich et al., 2018).

Dafür wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von miniaturisierten Bioreaktoren entwickelt, von denen im Folgenden die Wichtigsten kurz mit ihren Eigenschaften vorgestellt werden sollen.

Eine sehr einfache Möglichkeit, miniaturisierte Bioreaktoren zu gestalten, ist die Nutzung von geschüttelten Mikrotiterplatten (MTPs). Jede Kavität der MTP entspricht dabei einem Bioreaktor. Ein sehr weit entwickeltes Bioreaktorsystem dieses Typs ist der Bio- oder Robolector der Firma Beckman Coulter. Dabei wird eine speziell für hohe Sauerstofftransferkoeffizienten optimierte MTP geschüttelt und inkubiert (Funke et al., 2009). Die besondere blumenartige Struktur der MTP-Kavität ermöglicht dabei einen für MTPs außergewöhnlich hohen Sauerstoffkoeffizient von $> 0.16 \text{ s}^{-1}$ wenn ein geringes Arbeitsvolumen gewählt wurde (Funke et al., 2009). Der verwendete Schüttelinkubator ermöglicht den Zugriff durch einen Standard-Laborroboter und wird typischerweise mit diesem zusammen verwendet (Huber et al., 2009). Der pH, die Zelldichte, die Gelöstsauerstoffkonzentration und bestimmte Fluoreszenzsignale können faseroptisch und nichtinvasiv für jede Kavität gemessen werden (Funke et al., 2010; Huber et al., 2009; Rohe et al., 2012). Das Arbeitsvolumen liegt bei ca. 1 mL und ermöglicht damit nur eine begrenzte Anzahl Probenahmen. Umgekehrt gestaltet sich auch die Zugabe von Stellmitteln für die pH-Regelung sowie die Realisierung von Zulaufprozessen schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine mikrofluidische Lösung für die Zugabe von Stellmitteln und Substrat entwickelt. Diese nutzt einzelne Kavitäten der MTP als Reservoirs für die intermittierende Dosierung mittels mikrofluidischer Ventile in andere Kavitäten der MTP (Funke et al., 2010). Nachteil dieser Technik ist, dass die nur einmal verwendbare MTP um Ventile und Mikrodosiertechnik erweitert wird und dadurch sehr teuer ist. Außerdem reduziert sich die Anzahl der verfügbaren Reaktorpositionen der MTP je nach Anzahl der Dosierströme, da für jeden Dosierstrom pro Reaktorkavität auch eine Reservoirkavität nötig ist. Die pH- und pO_2 -Messung erfolgt über die Fluoreszenzmessung von im Kavitätsboden immobilisierten Sensoren (Funke et al., 2010; Huber et al., 2000).

Dieses Bioreaktorsystem wurde für sehr viele verschiedene Untersuchungen eingesetzt, von denen hier nur beispielhaft einige beschrieben werden sollen. Diese umfassen etwa die automatisierte Identifikation von optimalen Medienzusammensetzungen (Rohe et al., 2012) oder Prozessstrategien (Morschett et al., 2020) für die Proteinproduktion mittels *Corynebacterium glutamicum*. Auch große Stammbibliotheken können mit diesem Bioreaktorsystem effizient durchmustert werden (Hemmerich et al., 2020). Bei der Produktion von Lipase in *Pichia pastoris* oder Green Fluorescent Protein (GFP) in *Hansenula polymorpha* und *E. coli* wurde eine Maßstabsvergrößerung in den Labormaßstab erfolgreich demonstriert (Hemmerich et al., 2014; Kensy et al., 2009).

Ein weiteres Bioreaktorsystem für die Kultivierung mit geschüttelten MTPs wurde unter dem Namen μ -24 entwickelt (Isett et al., 2007; Tang et al., 2006). Es handelt sich dabei um eine Mikrotiterplatte mit insgesamt 24 Reaktorpositionen, in denen mit einem Arbeitsvolumen von bis zu 10 mL kultiviert werden kann. Eine Besonderheit bei diesem Bioreaktorsystem ist, dass

der Leistungseintrag zusätzlich zum Schüttelvorgang noch durch submerse Begasung unterstützt wird. Diese Begasung erfolgt positionsspezifisch und soll dabei sowohl die pH-Regelung (Begasung mit NH_3 oder CO_2) als auch die pO_2 -Regelung (Begasung mit Stickstoff oder Sauerstoff) übernehmen. Die pH- und pO_2 -Messung erfolgt über die Fluoreszenzmessung von im Kavitätboden immobilisierten Sensoren. Die Reaktorpositionen können jeweils positionsspezifisch temperiert werden. Bei einer Begasungsrate von 4 vvm und maximaler Schüttelfrequenz wurden bei diesem Bioreaktorsystem maximale k_{La} -Werte von 0,016 - 0,036 s^{-1} gemessen (Betts et al., 2014; Isett et al., 2007). Diese Werte sind etwa eine Größenordnung niedriger als bei anderen miniaturisierten Bioreaktorsystemen und begrenzen den Einsatz dieses Bioreaktorsystems auf Anwendungen mit niedrigem Sauerstoffbedarf. Ein typisches Anwendungsgebiet dieses Bioreaktorsystems umfasst die Kultivierung tierischer Zelllinien (Betts et al., 2014), aber auch mikrobielle Kultivierungen von *E. coli*, *Shewanella oneidensis* oder *Saccharomyces cerevisiae* (Isett et al., 2007; Tang et al., 2006). Die Skalierbarkeit des μ -24 ist jedoch durch die niedrigen Sauerstofftransferkoeffizienten begrenzt. Es gibt jedoch einen begrenzt erfolgreichen Bericht über eine Maßstabsvergrößerung bei der Kultivierung von Gewebezellen (Chen et al., 2009). Eine Automatisierung mit einem Pipettierroboter wurde hier jedoch nicht beschrieben.

Eine grundsätzlich andere Alternative zu geschüttelten Bioreaktorsystemen sind miniaturisierte Rührkesselreaktoren. Dabei werden Rührkesselreaktoren typischerweise bis in den mL-Maßstab verkleinert, um ein befriedigendes Maß an Parallelisierung zu ermöglichen ohne die Probenahmemöglichkeiten zu stark einzuschränken. Miniaturisierte Rührkesselreaktoren, die nicht parallelisiert betrieben werden, wurden ebenfalls entwickelt, haben aber durch ihre geringen Vorteile gegenüber größeren Reaktoren nur geringe Verbreitung (Lamping et al., 2003; Neubauer et al., 2013).

Ein Beispiel für parallelisierte miniaturisierte Rührkesselreaktoren ist der „Ambr-Bioreaktor“ (Ambr-15, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Dieser besteht aus bis zu 48 miniaturisierten Rührkesselreaktoren, die jeweils in Zwölfergruppen angeordnet sind. Jeder Reaktor ist mit einem Schrägblattrührer oder einem Scheibenrührer ausgerüstet, der direkt angetrieben wird (Velez-Suberbie et al., 2018). Die Rührkesselreaktoren werden mit einem einfachen Pipettierroboter ausgeliefert und werden normalerweise innerhalb einer Sterilwerkbank betrieben (Ratcliffe et al., 2012). Der Pipettierroboter verfügt über einen einzelnen Kanal, mit dem die pH- und Substratzugabe sowie die Probenahme erfolgen kann. Zusätzlich besteht die Option, jeden Reaktor mit Pumpleitungen zu versehen, die ein minimales Dosiervolumen von 5 μL aufweisen (Velez-Suberbie et al., 2018). Jede Zwölfergruppe wird zusammen temperiert und gerührt (Moses et al., 2012). Jeder Bioreaktor kann individuell entweder submers oder in den Kopfraum begast werden (Hsu et al., 2012). Die pH- und pO_2 -Messung erfolgt ähnlich wie bei den vorher beschriebenen

Bioreaktorsystemen über die kontaktlose Messung von Fluoreszenzfarbstoffen, die im Behälterboden immobilisiert sind. Der k_{La} beträgt bei der Version mit Schrägblattrührer lediglich bis zu $0,002 \text{ s}^{-1}$ (Nienow et al., 2013), bei der Version mit Scheibenrührer bis zu $0,05 \text{ s}^{-1}$ (Velez-Suberbie et al., 2018). Dadurch ist auch dieses Bioreaktorsystem auf Anwendungen mit niedrigem Gasbedarf limitiert. Die meisten Anwendungen beschäftigen sich mit der Charakterisierung von CHO-Zelllinien (Alsayyari et al., 2018; Hsu et al., 2012; Rameez et al., 2014; Ratcliffe et al., 2012). Dabei wurde erfolgreich vom mL-Maßstab bis zum 200 L Reaktor skaliert (Rameez et al., 2014). Das Bioreaktorsystem wurde auch bei mikrobiellen Fermentationen mit *E. coli* bei niedrigen Zelldichten eingesetzt, auch dort wurde erfolgreich eine Maßstabsübertragung in den L-Maßstab durchgeführt (Velez-Suberbie et al., 2018).

Ein weiteres Beispiel der parallelen miniaturisierten Rührkesselreaktoren ist der „bioREACTOR 48“ (Bioreaktorblock, 2mag AG, München, Deutschland). Dieser besteht aus 48 Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 8-14 mL. Jede Reaktorposition ist mit einem gasinduzierenden Rührorgan versehen, welches bei hoher Drehzahl ($> 2000 \text{ rpm}$) Gas aus dem Reaktorkopfraum in die Flüssigphase saugt und gleichzeitig dispergiert (Puskeiler et al., 2005a). Der gasinduzierende Rührer koppelt dadurch die Begasungsrate mit der Rührerdrehzahl, da die Reaktoren nicht mit separaten Begasungsorganen ausgestattet sind. Die Rührorgane werden magnetisch-induktiv für den gesamten Reaktorblock angetrieben (Puskeiler et al., 2005a). Dadurch ist nur eine Rührerdrehzahl, eine Begasungsrate und damit ein k_{La} -Wert für alle 48 Reaktoren innerhalb eines Experiments wählbar. Es können Rührerdrehzahlen zwischen 100 und 4000 rpm eingestellt werden, wobei ab einer Drehzahl von 2800 rpm ein k_{La} von $> 0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht wird (Puskeiler et al., 2005a). Dieser Wert zählt zu den höchsten, die bei miniaturisierten Reaktorsystemen erreicht werden und ermöglicht Anwendungen mit hohem Sauerstoffbedarf. Zusätzlich zu den gasinduzierenden Rührern wurden auch Rührorgane für die Kultivierung von scherkraftempfindlichen Mikroorganismen (Hortsch et al., 2010) oder die Hydrolyse von pflanzlichen Reststoffen (Riedlberger et al., 2013) entwickelt, wobei der Gasaustausch jeweils über Kopfraumbegasung erfolgt. Das Bioreaktorsystem wird typischerweise innerhalb von normalen Pipettierrobotern betrieben (Haby et al., 2019; Janzen et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a; Von den Eichen et al., 2021). Es wurde zwar ein Labormuster mit mikrofluidischer Dosierung entwickelt (Gebhardt et al., 2011), dies ist allerdings nicht kommerziell verfügbar. Daher muss der Pipettierroboter beim Betrieb des Bioreaktorsystems sowohl den pH-Wert durch die Zugabe von Stellmitteln korrigieren und Substrate für Zulaufprozesse nachdosieren, als auch Proben aus den Reaktoren entnehmen und verarbeiten (Haby et al., 2019; Janzen et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a; Von den Eichen et al., 2021). Die dabei entstehende Notwendigkeit, bei schnellen mikrobiellen Prozessen eine Vielzahl von Robotertätigkeiten optimal zu steuern, hat zur Entwicklung von speziell dafür zugeschnittener Software geführt. So wurde etwa ein

Labormuster für eine prioritätsbasierte Ablaufsteuerung basierend auf einem „Marktplatzsystem“ von der DASGIP AG (Jülich, Deutschland) geschaffen (Kusterer et al., 2008; Weuster-Botz et al., 2005). Bei dem „Marktplatzsystem“ wird jeder Aufgabe des Pipettierroboters ein fiktiver Wert zugeordnet. Wenn der Pipettierroboter verfügbar ist, wird ihm die Aufgabe mit dem höchsten Wert zugeteilt. Dieses Labormuster ist jedoch nicht kommerziell verfügbar. Alternativ kann das Problem der begrenzten Roboterzeit gelöst werden, indem mehrere Roboter parallel für den Betrieb des Bioreaktorblocks genutzt werden (Haby et al., 2019). Dies erhöht die Kosten der Gesamtanlage allerdings beträchtlich und macht die zuverlässige Abstimmung der einzelnen Pipettierroboter nötig. Außerdem wurde ein Labormuster für den kontinuierlichen Betrieb des Bioreaktorblocks entwickelt (Schmideder et al., 2015).

Das Bioreaktorsystem wurde in der Vergangenheit für eine Vielzahl mikrobieller Prozesse eingesetzt (Faust et al., 2015; Kusterer et al., 2008; Strillinger et al., 2016). Diese umfassen beispielsweise die Durchmusterung von *Bacillus subtilis* Stämmen (Vester et al., 2009), die Untersuchung von Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* (Priebe et al., 2021) und die Identifikation geeigneter Reaktionsmedien für gentechnisch veränderte *Saccharomyces cerevisiae* (Wagner et al., 2021). Die Skalierbarkeit wurde an verschiedenen Beispielen untersucht. So wurde unter anderem die Maßstabsvergrößerung der Biomasseproduktion mit *E. coli* erfolgreich durchgeführt (Puskeiler et al., 2005a). Außerdem wurde eine Maßstabsvergrößerung der Lipase-Produktion mit *Komagataella pastoris* vom bioREACTOR48 bis in den Kubikmetermaßstab durchgeführt (Schmideder et al., 2016). Für die Produktion von Riboflavin mithilfe von *Bacillus subtilis* wurden ähnliche Produktausbeuten im mL- und im L-Maßstab gezeigt (Vester et al., 2009). Für *E. coli* wurde bei Zulaufprozessen ein Einfluss der intermittierenden Dosierung auf die Produktbildung bei bestimmten Proteinen gefunden (Faust et al., 2014).

Aus den besonderen Konstruktionen der verschiedenen Bioreaktorsysteme ergeben sich für die praktische Anwendung Besonderheiten. So ist die Realisierung von Zulaufprozessen anspruchsvoll, da für die oft gewünschte kontinuierliche Dosierung von Substrat extrem niedrige Flüssigkeitsmengen (in der Größenordnung von Nanolitern) in sehr hoher Frequenz dosiert werden müssen (Funke et al., 2010). Dafür kann entweder auf die Verwendung von (Einweg) Mikrofluidik-Dosiersystemen zurückgegriffen werden (Faust et al., 2014; Funke et al., 2010; Gebhardt et al., 2011) oder es wird Standard-Pipettiertechnologie von Laborrobotern verwendet (Haby et al., 2019; Puskeiler et al., 2005a). Diese ist allerdings nur für Dosiervolumina in der Größenordnung von Mikrolitern geeignet. Wenn mit möglichst hoher Frequenz (wenige Minuten bis Sekunden) Substrat dosiert werden soll, muss das Zulaufmedium im Vergleich zum L-Maßstab stark verdünnt werden. Dies sorgt dafür, dass entweder die Dauer der Zulaufphase durch den Volumenanstieg durch das verdünnte

Zulaufmedium begrenzt wird oder die Dosierfrequenz niedriger ausfallen muss. Eine Dosierfrequenz in der Größenordnung von Minuten setzt dann die Zellen ständig wechselnden Wachstumsbedingungen aus.

Die zweite wesentliche Einschränkung der meisten miniaturisierten Bioreaktorsysteme ist, dass die Ausstattung des Laborroboters (Laborroboter inklusive integrierter Geräte für die Analytik) zum Betrieb der Reaktorsysteme keine zum normalerweise verwendeten Labormaßstab vergleichbare Analytik erlaubt. Bei der manuellen Arbeit mit Reaktoren im L-Maßstab werden die Proben normalerweise „off-line“ durch den Nutzer an potentiell allen verfügbaren Analysegeräten des Labors ausgewertet. Diese Flexibilität liegt bei miniaturisierten Bioreaktorsystemen nicht vor. Das Problem wird dadurch verschärft, dass die miniaturisierten Bioreaktorsysteme durch den hohen Grad an Parallelisierung eine hohe Anzahl an zu analysierenden Proben generieren. Daher wird bei nicht-trivialer Analytik oftmals auf die manuelle Probenauswertung zurückgegriffen (Faust et al., 2014; Haby et al., 2019; Hortsch and Weuster-Botz, 2011; Velez-Suberbie et al., 2018). Dies ist gefährlich, da es das Risiko beinhaltet, den Aufwand für die Bioprozessentwicklung lediglich von der Kultivierung auf die Analytik der Kultivierung zu verschieben.

4 Material & Methoden

4.1 Allgemeines Material

Alle Materialien, die üblicherweise in bioverfahrenstechnischen Arbeiten verwendet werden, sind im Anhang angegeben. Das umfasst u.A. die verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen.

4.2 Mikroorganismen

Für die Etablierung der zweistufigen Reaktorkaskade wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit einem pET28a Plasmid verwendet. Auf dem Plasmid war eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin codiert. Außerdem war das Gen für das Protein mCherry aus *Discosoma* (Shaner et al., 2004) unter Kontrolle eines T7-RNA-Promotors auf dem Plasmid codiert. Für die Stammhaltung wurde eine exponentiell wachsende Schüttelkolbenkultur der Zellen mit der dreifachen Menge an 50 % (v/v) Glycerin versetzt und anschließend bei -80 °C tiefgefroren gelagert.

E. coli K12 MG1655 RARE (#61440 bei Addgene, Watertown, USA) mit einem pETDuet-Plasmid mit einem Carboxylase-Gen aus *Nocardia otitidiscaviarum* und einer Pyrophosphatase aus *E. coli* (EcPPase) unter der Kontrolle eines T7-RNA-Promotors (Weber et al., 2021), wurde freundlicherweise von Frau Prof. Rother (Synthetische Enzymkaskaden, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Zellen wurden bei -80 °C gelagert, nachdem die exponentiell wachsende Schüttelkolbenkultur abzentrifugiert, das Pellet in 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert und 1:1 mit einer 50%igen (v/v) Glycerinlösung gemischt worden war.

4.3 Verwendete Bioreaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab gearbeitet. Im Folgenden werden die verwendeten Rührkesselreaktoren vorgestellt.

4.3.1 Rührkesselreaktoren im L-Maßstab

Für alle Versuche im L-Maßstab wurden Parallelreaktoren der Firma Eppendorf (DASGIP Parallelreaktorsystem, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet (siehe Abb. 3).



Abbildung 3: Foto des Parallelreaktorsystems im L-Maßstab. Jeder Glasrührkesselreaktor befindet sich in einem einzeln temperierbaren Mantel. Der Motor, Dosierstrecken sowie die Sonden (pH, pO₂) werden im Reaktordeckel montiert.

Dies ist ein vierfach paralleles Rührkesselreaktorsystem mit einem Arbeitsvolumen von 0,3 bis 0,8 L pro Rührkessel. Es handelt sich um einwandige Reaktoren mit Flachboden, welche für die Temperierung in einen Heiz-/Kühlblock gestellt werden. Die Rührkesselreaktoren besitzen zwei Seitenarme mit Septum für die manuelle sterile Zugabe von Inokulum und weiteren Substanzen. Über einen auf dem Reaktordeckel montierten Elektromotor können Rührdrehzahlen von 100-1400 rpm realisiert werden. Als Rührorgane wurden in dieser Arbeit zwei 6 Blatt-Scheibenrührer verwendet. Im Reaktordeckel sind zusätzlich zur Lagerung der Rührwelle sieben PG-13,5 Gewindeanschlüsse für die Montage von pO₂- und pH-Sonde, Zuluft und Abgas, Stellmittel- und Substratzugabe vorgesehen. Für die Dosierung von Lösungen sind pro Reaktor vier Schlauchpumpen vorgesehen. Jeder Reaktor ist außerdem mit einer Leitfähigkeitssonde ausgerüstet: Diese besteht aus einem elektrisch isolierten Stahlstift im Reaktordeckel, durch den die Leitfähigkeit des Reaktionsmediums zum elektrisch geerdeten Reaktordeckel, gemessen werden kann. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl für die Detektion von Schaum (geringe Leitfähigkeit, > 100 µS) als auch der Flüssigkeitsoberfläche (hohe Leitfähigkeit, > 1000 µS) des Reaktionsmediums genutzt. Über

eine Gasmischstation konnte jeder Reaktor individuell mit einer Mischung von Druckluft und Stickstoff mit einer Flussrate von 0 - 250 L h⁻¹ begast werden. Für die Analyse der Stoffwechselaktivitäten der Zellen verfügt das Reaktorsystem über eine Abgasanalytik mit der der Kohlenstoffdioxidgehalt (CO₂-Gehalt), Sauerstoffgehalt (O₂-Gehalt) und der Druck gemessen werden können (BlueVary, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland).

Grundsätzlich wurde das Reaktorsystem mit der vom Hersteller gelieferten Software betrieben (DASware Control, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Da die Abgasanalytik nicht vom Hersteller des Parallelreaktorsystems stammte, wurde diese mithilfe eines am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TUM entwickelten SiLA2-Treibers betrieben. Außerdem verfügte die Herstellersoftware zum Betrieb des Bioreaktorsystems über eine OPC-UA („Open Platform Communications Unified Architecture“) Schnittstelle, mit der die Betriebsdaten der Reaktoren gelesen und gesteuert werden können. Für diese Schnittstelle wurde ebenfalls ein am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TUM entwickelter SiLA2-Treiber eingesetzt.

4.3.2 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab

Ein zentrales Arbeitsmittel in diesem Forschungsvorhaben war ein paralleles Rührreaktorsystem im mL-Maßstab (bioREACTOR48, 2mag AG, München, Deutschland). Dieses besteht aus 48 Einzelreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 8-15 mL, welche in einem Reaktionsblock zusammengefasst werden. Jeder Rührreaktor besteht aus einem durch Strahlung sterilisierten Reaktionsgefäß mit Strömungsbrechern aus Polystyrol. Am Boden jedes Reaktionsgefäßes sind Fluoreszenzfarbstoffe für die kontaktlose Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH immobilisiert (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland). Die kontaktlose Messung von pH und pO₂ erfolgt durch unterhalb der Reaktoren positionierte Messriegel, wobei jeder Messriegel pH und pO₂ für 8 Reaktoren messen kann. In jedes Reaktionsgefäß ragt eine Hohlachse hinein, an deren Ende ein gasinduzierendes Rührorgan gelagert ist. Dieses wird magnetisch-induktiv angetrieben und saugt Prozessgas aus dem Reaktorkopfraum durch die Hohlachse in die Flüssigphase und dispergiert gleichzeitig die entstehenden Gasblasen. Dadurch ist die Menge des in die Flüssigphase eingetragenen Gases eine Funktion der Rührerdrehzahl und es wird ein k_La von > 0,4 s⁻¹ unter Prozessbedingungen erreicht (Puskeiler et al., 2005a).

Auf die 48 Reaktionsgefäße im Antriebsblock wird im Betrieb ein autoklavierbarer Deckel aufgesetzt, in dem die Hohlachsen befestigt werden. Der Deckel hat einen zentralen Anschluss für die Sterilgasüberlagerung aller Reaktoren. Dadurch wird Druckluft mit 4,8 L min⁻¹ gleichzeitig in die Kopfräume aller Reaktoren gefördert, sodass ein Teil der Luft über die Hohlachse ins Reaktionsmedium eingesaugt wird und der andere Teil durch die Abluftbohrung des Reaktordeckels entweichen kann. Die aus den Abluftbohrungen des Deckels entweichende Luft ermöglicht einen sterilen Betrieb der Rührreaktoren, da durch die hohe

Gasleerrohrgeschwindigkeit von $13,3 \text{ cm s}^{-1}$ der Eintrag von Partikeln aus der Umgebung nicht möglich ist (Puskeiler et al., 2005a). Die Abluftbohrungen des Reaktorblocks dienen gleichzeitig auch als Pipettieröffnungen für die Dosierung von Substanzen während der Prozesszeit oder für die Probenahme.

Das 48-fach parallele Reaktorsystem wurde mithilfe eines Pipettierroboters (Microlab STARlet, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) automatisiert betrieben (siehe Abb. 4).



Abbildung 4: 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab automatisiert durch einen Pipettierroboter. Bei (A) Mikrotiterplattenlese- sowie -waschgerät (B) Nadelwaschstation mit drei Waschstationen und Nadelsätzen (C) Bioreaktorblock mit 48 parallel betriebenen Rührreaktoren (D) vom Roboter selbstständig zu öffnende Reaktionsgefäße („FlipTubes“) (E) für at-line Messungen verwendete Mikrotiterplatten

Der Pipettierroboter besteht aus einem Arbeitsbereich, in dem sich ein seitlich verschiebbarer Arm („X-Arm“) bewegen kann. An diesem Arm sind acht Pipettierkanäle und ein Plattengreifer befestigt. Diese sind jeweils unabhängig in Y- und Z-Richtung beweglich, teilen sich allerdings zwei Linearachsen in Y-Richtung. Die Pipettierkanäle besitzen keine fest montierten Pipettierspitzen, stattdessen können nach Bedarf verschiedene Spitzen gekoppelt werden. In dieser Arbeit wurden standardmäßig Stahlnadeln mit einem Arbeitsvolumen von $300 \mu\text{L}$ verwendet, da nur diese dünn genug sind, um durch die Pipettieröffnungen des Reaktorblocks in die Flüssigphase hinein zu reichen. Die Spitzen wurden nach jeder Benutzung durch Aufsaugen (Aspiration) und Dispensieren von $300 \mu\text{L}$ Ethanol bei einer Eintauchtiefe von 20 mm desinfiziert. Anschließend wurden die Nadeln mit sterilfiltriertem, deionisiertem Wasser in einer Nadelwaschstation (Needle Wash Station CR, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) gereinigt und bis zur erneuten Nutzung geparkt. Die Nadelwaschstation besitzt Aufnahmen für drei Nadelsätze von jeweils acht Pipettiernadeln. Dadurch konnte unmittelbar

nach dem Absetzen eines Nadelsatzes für die Waschung ein neuer, frisch gewaschener Nadelsatz für eine unterbrechungsfreie Pipettiertätigkeit aufgenommen werden. Die drei Nadelsätze wurden rotierend verwendet.

Im Unterschied zu den vorherigen Arbeiten am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik erfolgt die Pipettierung bei diesem Roboter nicht durch die Bewegung von Systemflüssigkeit (Faust et al., 2014; Puskeiler et al., 2005b; Vester et al., 2009). Stattdessen erzeugt ein Kolben innerhalb des Pipettierkanals Über- oder Unterdruck innerhalb einer Luftsäule, durch die je nach Pipettenposition Flüssigkeit angesaugt oder dispensiert werden kann. Jeder Pipettierkanal verfügt über verschiedene Techniken für eine individuelle Flüssigkeitsoberflächenerkennung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich die kapazitive Flüssigkeitsoberflächenerkennung genutzt. Grundsätzlich wurde bei allen Aspirationsschritten, soweit nicht anders vermerkt, die Flüssigkeitsoberfläche kapazitiv detektiert und anschließend für die Aspiration eine Eintauchtiefe relativ zur Flüssigkeitsoberfläche angefahren. Während des Aspirationsprozesses folgt der Roboter dann der Flüssigkeitsoberfläche basierend auf der konfigurierten Geometrie des Behälters. Dies ist möglich, da beim Roboter für jeden im Arbeitsbereich befindlichen Flüssigkeitscontainer die Innengeometrie definiert wurde.

Außerdem verfügt der Roboter in seinem Arbeitsbereich über Werkzeuge zum Öffnen spezieller Reaktionsgefäße (FlipTubes, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) und zum Greifen von Objekten mithilfe der Pipettierkanäle (CO-RE Gripper, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz). Da mit diesen Greifern Objekte nicht außerhalb des Arbeitsbereichs des Roboters bewegt werden können, ist der Roboter zusätzlich mit einem separaten Greifarm (iSWAP, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) ausgestattet, mit dem Geräte außerhalb des Arbeitsbereichs des Roboters bestückt werden können.

Darüber hinaus ist ein Waschgerät für Mikrotiterplatten (405 LS, Biotek, Winooski, USA) sowie ein Absorptions- und Fluoreszenzmessgerät für Mikrotiterplatten (Synergy HTX, Biotek, Winooski, USA) in den Roboter integriert. Diese werden während der Prozesse durch den Roboter gesteuert und durch den separaten Greifarm mit Mikrotiterplatten bestückt.

Außerdem ist der Pipettierroboter mit einem Schüttel-/Heizgerät für Mikrotiterplatten oder Deep-Well-Platten (Hamilton Heater Shaker, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) ausgestattet, mit dem die *at-line* Biotransformation für die Expressionsuntersuchung von *E. coli* NoCAR durchgeführt wurde.

4.4 Ablaufsteuerungen zum Betrieb der Rührreaktoren im mL-Maßstab

Der Pipettierroboter muss während der Prozesse im mL-Maßstab Substrat nachdosieren, den pH durch die Zugabe von Stellmitteln korrigieren, Induktorsubstanzen zu definierten Zeitpunkten in die Reaktoren dosieren sowie Proben nehmen, verdünnen und messen. Diese Tätigkeiten müssen parametrisiert und zu sinnvollen Zeiten im Prozess ausgeführt werden. Dafür wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ablaufsteuerungen genutzt.

Zum einen eine monolithische Ablaufsteuerung, welche die Aufgaben des Roboters sequentiell abarbeitet und die weitgehend durch den Hersteller des Pipettierroboters geliefert wurde. Diese wurde für die Etablierung der zweistufigen Expressionsoptimierung mit *E. coli* mCherry genutzt.

Zum anderen wurde eine Ablaufsteuerung genutzt, welche in der Lage ist, die anstehenden Aufgaben basierend auf ihrer Echtzeitpriorität abzuarbeiten. Diese wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens erarbeitet und wurde im Rahmen der Untersuchung der Expression von NoCAR in *E. coli* eingesetzt.

4.4.1 Ablaufsteuerung ohne Berücksichtigung der Echtzeitpriorität

Diese Software bündelt die gesamte Funktionalität, die für den Betrieb des Reaktorblocks nötig ist, innerhalb der Herstellersoftware des Pipettierroboters (Venus 4.5, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz). Grundsätzlich arbeiten drei Threads (ein Thread ist ein Vorgang innerhalb einer Software, der im gleichen Speicherbereich, aber zeitlich entkoppelt stattfindet) innerhalb der Anwendung parallel: a) die Hauptschleife, die den Start der Roboterarbeiten initiiert, b) ein Thread, der die Datenaufzeichnung der pH-Messriegel durchführt und c) ein Thread, der die Datenaufzeichnung und Überwachung des Parallelbioreaktorsystems im mL-Maßstab durchführt. Der anspruchsvollste Teil der Anwendung ist die Hauptschleife, da während der Kultivierungen im Parallelreaktorsystem im mL-Maßstab eine Vielzahl von Aufgaben parallel durchgeführt werden müssten, die durch die pipettierende Arbeitsweise des Roboters notwendigerweise sequentiell erfolgen müssen. Ein schematischer Überblick der Logik der Hauptschleife ist in Abbildung 5 dargestellt.

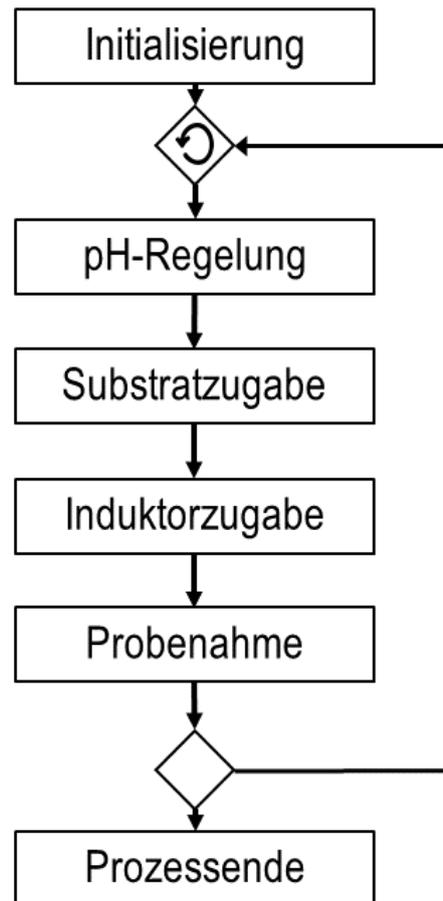


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der vom Hersteller des Pipettierroboters mitgelieferten Software zum Betrieb des Bioreaktorblocks. Nach der Initialisierung geht die Software die einzelnen ausführbaren Roboteraufgaben sequentiell durch. Falls eine der Aufgaben ausführbar ist, wird sie ausgeführt. Dabei findet keine Beurteilung statt, ob und welche weiteren Aufgaben zum gleichen Zeitpunkt ausführbar gewesen wären. Das Prozessende wird nur ausgeführt, wenn dies durch den Nutzer manuell ausgewählt wurde.

Grundsätzlich wurde nach einer Initialisierung der Software und der Geräte in einer Endlosschleife eine Liste von Aufgaben auf ihre Ausführbarkeit untersucht. Die Ausführbarkeit war dabei individuell für die einzelnen Aufgaben definiert. Jede Aufgabe bezog sich allerdings immer auf alle Parallelreaktoren gleichzeitig. Im ersten Schritt der Hauptschleife wurde die Ausführbarkeit der pH-Regelung geprüft. Beim pH wurde eine Mindestzeit zwischen zwei Ausführungen sowie ein mindestens zu dosierendes Volumen geprüft. Wenn der durch den Proportionalregler („P-Regler“) erzeugte Stellwert ein Volumen dosieren würde, welches niedriger als das Mindestdosiervolumen ist, ist die pH-Regelung nicht ausführbar. Für die Substratzugabe ist ebenfalls ein minimales Dosiervolumen hinterlegt. Wenn das hinterlegte Dosierprofil zum Zeitpunkt der Beurteilung für alle Reaktoren ein niedrigeres Dosiervolumen als das minimale Dosiervolumen nahelegt, wird die Roboteraufgabe als nicht ausführbar interpretiert. Die Zugabe des Induktors erfolgt zu festen Zeitpunkten, das bedeutet, die

Aufgabe Induktion ist ausführbar wenn der vorher festgelegte Zeitpunkt für die Induktorzugabe erreicht oder überschritten war.

Die Probenahme wurde ebenfalls anhand von vorher festgelegten Zeitplänen durchgeführt. Aus einer Konfigurationsdatei wurde eine Liste von Zeitpunkten geladen, zu denen eine Probenahmeprozedur als ausführbar identifiziert wurde. Da jedoch eine vollständige Probenahmeprozedur für alle 48 Reaktoren bis zu eine halbe Stunde gedauert hätte, ist diese in insgesamt vier Sub-Schritte unterteilt. Im ersten Schritt wurde Puffer für die Verdünnung in einer Mikrotiterplatte vorgelegt, im zweiten Schritt wurden die Proben aus dem Reaktor entnommen, im dritten Schritt wurden die Probe sequentiell 1:10 und 1:100 verdünnt und im vierten Schritt wurde die Proben photometrisch gemessen. Jeder dieser Sub-Schritte wurde innerhalb der Programmlogik separat ausgeführt. Das bedeutet, dass zum Probenahmezeitpunkt zuerst die Verdünnung vorgelegt wurde, dann sprang die Hauptschleife wieder an ihren Ausgangspunkt und prüfte die Ausführbarkeit aller anderen Aufgaben und bearbeitete diese gegebenenfalls. Wenn die Hauptschleife wieder bei der Prüfung der Ausführbarkeit der Probenahme angelangt war, wurde der folgende Sub-Schritt der Probenahme ausgeführt. Wenn nach insgesamt vier Durchläufen der Hauptschleife das Ende der Probenahmeprozedur erreicht war, galt die Probenahme bis zum nächsten Probenahmezeitpunkt wieder als nicht ausführbar.

Die Konfiguration der Parallelprozesse mit *E. coli* erfolgte sowohl direkt innerhalb der Venus-Software des Herstellers als auch in Steuerdateien, die als Tabellen in verschiedenen Dateiformaten vorlagen (.csv, .xlsx).

Diese Software ist durch die mangelnde Priorisierung nur bedingt für pipettierintensive Parallelprozesse im mL-Maßstab geeignet. Außerdem sind bestimmte Versuchsbedingungen innerhalb der Software nicht umsetzbar (z.B. feste Dosierfrequenzen für den Zulauf). Darüber hinaus ist die Veränderung von Komponenten wie der Probenahmeprozedur durch die starke Integration innerhalb der Venus-Software schwierig und benötigt einige Erfahrung des Nutzers. Dies lag daran, dass die Programmbestandteile für die Ablaufsteuerung (wann ist welche Aufgabe ausführbar?) und der Pipettierlogik (was wird wo und wie aspiriert und dispensiert?) sich überlagern, sodass der Nutzer beide Bestandteile verstehen musste um eine von beiden verändern zu können.

4.4.2 Prioritätsbasierte Ablaufsteuerung

Daher wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens eine weitere Ablaufsteuerung etabliert, die diese Einschränkungen nicht haben sollte. Ein Kernelement des Entwurfs bestand darin, dass eine strenge Trennung zwischen der Ausführung von Aufgaben durch den Pipettierroboter und der Steuerung der Aufgaben durch die Ablaufsteuerung erreicht werden sollte.

Die prioritätsbasierte Ablaufsteuerung wurde in Python geschrieben, wobei die Aufgaben zum Betrieb des Bioreaktorblocks (Zulauf, pH-Regelung, Probenahme, Induktion) anhand ihrer Echtzeitpriorität regelmäßig gewichtet wurden. Wenn der Pipettierroboter zum Zeitpunkt der Prioritätsberechnung verfügbar war, wurde die jeweils wichtigste Aufgabe an den Pipettierroboter übergeben und ausgeführt.

Die Konfiguration der Ablaufsteuerung erfolgte über ein „user script“. Das ist eine in der Programmiersprache Python geschriebene Konfigurationsdatei, bei der unter anderem folgende Parameter für jede Pipettieraufgabe festgelegt wurden:

- Minimale / Maximale Priorität
- Minimales / Maximales Dosiervolumen
- Minimaler / Maximaler Abstand zwischen zwei Ausführungen der Pipettieraufgabe
- Welcher Methodename beim Roboter aufgerufen werden soll

Es wurden zwei verschiedene Modi der Prioritätsberechnung erstellt, nämlich die „zeitbasiert skalierende Priorität“ und die „volumenbasiert skalierende Priorität“.

Bei der „zeitbasiert skalierenden Priorität“ steigt die Priorität nach dem Zeitpunkt, ab dem eine Pipettieraufgabe ausführbar wurde linear bis zum festgelegten oberen Zeitlimit. Das heißt, die Aufgabe hat die Minimalpriorität wenn sie ausführbar wird und die Maximalpriorität wenn das festgelegte obere Zeitlimit erreicht wurde, dazwischen wird linear interpoliert. Diese Art der Prioritätsberechnung wurde für die Probenahme verwendet.

Bei der „volumenbasiert skalierenden Priorität“ erhält ab dem Punkt, an dem eine Pipettieraufgabe ausführbar wurde, diese ihre Minimalpriorität. Die maximale Priorität wird erreicht, wenn bei allen Bioreaktorpositionen das vorher konfigurierte, maximal in einem Schritt dosierbare Volumen erreicht wurde. Dazwischen wird linear interpoliert. Diese Art der Prioritätsberechnung wurde für den Substratzulauf, die pH-Regelung und die Induktion verwendet.

Beim Substratzulauf wird für jede aktive Position eine Python-Funktion definiert, die als Eingangsgröße die Prozesszeit in Stunden bekam und als Ergebnis die Zulauftrate in $\mu\text{L h}^{-1}$ ausgibt. Damit können alle Dosieraufgaben verhältnismäßig einfach abgebildet werden, etwa „Starte nach X Stunden Prozesszeit mit einer Zulauftrate, die mit einer exponentiellen Funktion ansteigt und nach Y Stunden Prozesszeit beendet wird“.

Darüber hinaus wurde auch bei dieser Ablaufsteuerung die Steuerung und Datenerfassung der pH- und pO_2 -Messriegel und des Bioreaktorblocks integriert. Die Kommunikation mit den Geräten erfolgte über zwei am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte SiLA2-Treiber. Bei den pH/ pO_2 -Messriegeln wurden der pH und der DO-Wert mit einer Abtastzeit von 30

Sekunden gemessen und die erhaltenen Daten in die verwendete InfluxDB-Zeitreibendatenbank (InfluxData, San Francisco, USA) gespeichert. Bei der Steuerung des Bioreaktorblocks wurde die gewünschte Drehzahl zu Prozessbeginn eingestellt und die Rührer gestartet. Während des Prozesses wurde alle 15 Sekunden der Rührerzustand (drehend / nicht drehend) anhand der im Bioreaktorblock montierten Hallsensoren ausgelesen und die Zustände ebenfalls in die InfluxDB-Zeitreibendatenbank geschrieben.

Außerdem war die Ablaufsteuerung in der Lage, einzelne Reaktoren basierend auf unplausibel abweichenden pH Messwerten (mehr als zwei pH-Einheiten vom Regelungsziel entfernt) oder stillstehendem Rührorgan nach drei erfolglosen Neustarts auszuschließen. Aufgrund dessen wurde der Reaktor dann von der pH-Regelung und der Probenahme ausgeschlossen.

Die Datenvisualisierung während des Prozesses erfolgt über das Chronograf-Plugin (InfluxData, San Francisco, USA) der Zeitreibendatenbank, bei dem basierend auf SQL-Abfragen die Daten aus der Zeitreibendatenbank visualisiert werden. SQL („Structured Query Language“) ist eine Datenbanksprache, mit der Daten aus der Datenbank gelesen werden können.

Für diese Ablaufsteuerung wurde im Rahmen dieser Arbeit die Schnittstelle des Pipettierroboters und die zugehörige Methodenbibliothek sowie ein einfacher digitaler Zwilling geschrieben.

4.5 Kultivierung von *E. coli* für die zweistufige Expressionsoptimierung

4.5.1 Kultivierung im L-Maßstab

Die Vorkultur von *E. coli* mCherry wurde in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen und einem Arbeitsvolumen von 100 mL angesetzt. Die Vorkultur von *E. coli* NoCAR wurde in 1000 mL Schüttelkolben mit Schikanen und einem Arbeitsvolumen von 100 mL angesetzt. Es wurde LB-Medium (5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L⁻¹ Pepton, 5 g L⁻¹ NaCl, 50 mg L⁻¹ Kanamycin für *E. coli* mCherry oder 50 mg L⁻¹ Ampicillin für *E. coli* NoCAR), dem 100 µL Zellen aus der aufgetauten Stammkultur zugesetzt wurden, verwendet. Jede Stammkultur wurde nur genau ein einziges Mal aufgetaut. Die Zellen wurden für mindestens 7,5 Stunden in einem Schüttler (Multitron, Infors, Bottmingen-Basel, Schweiz) bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Von der Vorkultur wurden die Rührkesselreaktoren im L-Maßstab inokuliert. Die Inokulationsdichte betrug bei allen Versuchen 0,15 g L⁻¹, außer bei den Versuchen zum Einfluss der Wachstumsrate im L-Maßstab auf die folgende Expression des Zielproteins. Dort lag die Startzellendichte jeweils bei 0,02 g L⁻¹ ($\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$) und 0,005 g L⁻¹ ($\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$). Die pH-Sonden wurden bei pH 7 und pH 4 kalibriert. Die Pumpen für die Zulaufdosierung wurden

gravimetrisch vor jedem Experiment kalibriert. Die zusammengesetzten Bioreaktoren wurden danach mit einer 9:1 Mischung von deionisiertem Wasser und Leitungswasser autoklaviert. Anschließend wurde das Wasser steril durch das verwendete Mineralmedium (Zusammensetzung im Anhang) ausgetauscht. Die pO_2 -Sonden wurden mit Druckluft (100 %) und Stickstoff kalibriert (0 %). Der pH wurde auf pH 7,0 durch die Zugabe von 12,5 % (v/v) Ammoniakwasser geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auf > 30 % Luftsättigung geregelt, indem die Rührerdrehzahl zwischen 600 - 1400 rpm variiert wurde. Die Reaktoren wurden mit Druckluft mit einer Begasungsrate von 4 vvm begast. Die Abgaskühler der Reaktoren wurden auf 10 °C temperiert um Verdunstung zu reduzieren.

Es wurde eine Satzglucose von 5 g L⁻¹ vorgelegt. Das Ende der Satzphase wurde anhand des Anstiegs des Gelöstsauerstoffsignals über 75 % Luftsättigung innerhalb eines Skripts in der Steuerungssoftware DASware Control detektiert und anschließend automatisch der Zulauf mit einer fest vorgegebenen Wachstumsrate gestartet. Die erreichte Zellkonzentration wurde unter Vernachlässigung der Startzellkonzentration und mit einem Ausbeutekoeffizienten von 0,5 g Zellen g⁻¹ Glukose abgeschätzt. Die Zulauftrate wurde abgeschätzt unter der Annahme eines idealen Zulaufreaktors unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Volumenveränderungen durch die Zugabe des Substrats und durch Verdunstung. Die Berechnung der Zulauftrate erfolgte nach Gleichung 18. Der Zulauf bestand aus 500 g L⁻¹ Glukose mit 12,5 g L⁻¹ MgSO₄.

Es wurden 10 % (v/v) Antischaumlösung (AF 204, Sigma-Aldrich / Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) automatisch basierend auf dem Messsignal der Leitfähigkeitssonde zugegeben. Die Leitfähigkeitssonde wurde bei allen Expressionsuntersuchungen bei Prozessbeginn wenige Zentimeter oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche platziert, so dass eventuell entstehender Schaum eine leitfähige Verbindung zwischen Sondenspitze und Reaktorerdung herstellen konnte. Wenn die Leitfähigkeitssonde eine Leitfähigkeit von > 100 µS zwischen Sondenspitze und Reaktordeckel gemessen hat, wurde Antischaumlösung dosiert, außer die gesamte zugegebene Menge an Antischaumlösung betrug bereits mehr als 20 mL.

Der exponentielle Zulauf wurde nach dem Ablauf der definierten Zeit für die Zellbildungsphase gestoppt und die Zellen wurden für die Untersuchung der Proteinexpression automatisiert auf die Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab verteilt.

4.5.2 Allgemeine Reaktionsbedingungen im mL-Maßstab

Alle hier vorgestellten Kultivierungen im mL-Maßstab fanden im Rahmen von zweistufigen Expressionsuntersuchungen statt, bei denen die Biomassebildungsphase vorher im L-Maßstab stattgefunden hatte. Daher lagen zu Prozessbeginn in allen betriebenen Reaktoren

im mL-Maßstab Zellen in definiertem Medium mit einer Zelldichte von $10\text{-}20\text{ g L}^{-1}$ vor. Bei allen Versuchen betrug die Begasungsrate für den gesamten Bioreaktorblock $4,8\text{ L min}^{-1}$, dies entsprach einer Sterilgasüberlagerung von $0,1\text{ L min}^{-1}$ pro Reaktor.

4.5.3 Kultivierungen von *E. coli* mCherry im mL-Maßstab

Bei *E. coli* mCherry wurde eine Reaktortemperatur von 37 °C eingestellt. Die Zuluft wurde nicht befeuchtet und der Kopfraum des Bioreaktorblocks auf 10 °C gekühlt. Das Arbeitsvolumen im Reaktor betrug jeweils 11 mL . Die Rührerdrehzahl wurde innerhalb der ersten fünf Minuten von 2500 rpm auf 3000 rpm gesteigert. Der pH wurde bei $\text{pH } 6,9$ durch die Zugabe von 1 M HCl oder $12,5\text{ \% (v/v)}$ Ammoniakwasser eingestellt. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde automatisch nach einer Stunde durch den Pipettierroboter aus vorher manuell geöffneten Reaktionsgefäßen zugegeben. Es wurde eine konstante Zulauftrate von $2,4\text{ g Glukose L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ durch intermittierende Dosierung des Pipettierroboters vorgegeben. Das Zulaufmedium bestand aus 300 g L^{-1} Glukose mit $7,5\text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 . Das minimale Dosierintervall betrug 9 min , dies konnte jedoch nicht exakt eingehalten werden, da dies die dort verwendete Steuerung des Pipettierroboters nicht ermöglichte. Die Prozesszeit betrug 18 Stunden , wobei etwa stündlich Proben durch den Pipettierroboter für die Messung der optischen Dichte und der Fluoreszenz für die Abschätzung der Biomassekonzentration und der Proteinkonzentration aus allen Parallelreaktoren entnommen wurden.

4.5.4 Kultivierungen von *E. coli* NoCAR im mL-Maßstab

Bei *E. coli* NoCAR wurde eine Reaktionstemperatur von 30 °C eingestellt. Die Zuluft wurde durch eine Gaswaschflasche befeuchtet und der Kopfraum des Bioreaktorblocks wurde auf 20 °C temperiert. Das Arbeitsvolumen im Reaktor betrug jeweils 10 mL . Es wurde eine fixe Rührerdrehzahl von 3000 rpm eingestellt. Der pH wurde durch Zugabe von $12,5\text{ \% (v/v)}$ Ammoniakwasser auf $\text{pH } 6,9$ eingestellt. Es wurden konstante Zulaufraten von $1\text{ - }4,8\text{ g Glukose L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ eingestellt. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von $100\text{ - }300\text{ g L}^{-1}$ Glukose als Zulaufmittel verwendet, damit bei einer Dosierfrequenz von 6 h^{-1} ein minimales Dosiervolumen von $14\text{ }\mu\text{L}$ nicht unterschritten wurde. In den jeweiligen Zulaufmedien befand sich außerdem MgSO_4 im Verhältnis von $1:40$ zur Glukose (beispielsweise befand sich bei 300 g L^{-1} Glukose $7,5\text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 im Zulauf). Nach einer Stunde Prozesszeit wurden $0,24\text{ - }32\text{ }\mu\text{M}$ IPTG als Induktor hinzugegeben. Es wurden in verschiedenen Experimenten die Stammlösungen des IPTG so gewählt, dass pro Reaktor zwischen $15\text{ und }200\text{ }\mu\text{L}$ dosiert wurde. Die Stammlösung wurde in speziellen $1,5\text{ mL}$ Reaktionsgefäßen (FlipTubes, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) auf der Arbeitsfläche gelagert, die vom Pipettierroboter autonom geöffnet und geschlossen werden konnten.

Für alle Versuchsbedingungen wurden die Versuche in mindestens vier biologischen Replikaten durchgeführt.

4.5.5 Biotransformation von *E. coli* NoCAR

Das verwendete Biotransformationsverfahren ist adaptiert von Schwendenwein et al. (Schwendenwein et al., 2019).

Die Biotransformationen wurden automatisch am Ende der Kultivierungen von *E. coli* NoCAR im mL-Maßstab in einer Deep-Well-Plate (DWP) mit einem Arbeitsvolumen von 1 mL durchgeführt. Die Biotransformation besteht in der Umwandlung von 3-Hydroxybenzoesäure in 3-Hydroxybenzaldehyd. Zum Nachweis wird 2-Aminobenzamidoxim (ABAO) zugegeben, das mit 3-Hydroxybenzaldehyd zu 4-Amino-2-(3-hydroxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-3-oxid reagiert. Dieser ABAO-Phenol-Komplex ist bei 360 nm photometrisch messbar. Ein schematischer Überblick über die Zusammensetzung ist in Abbildung 6 dargestellt.

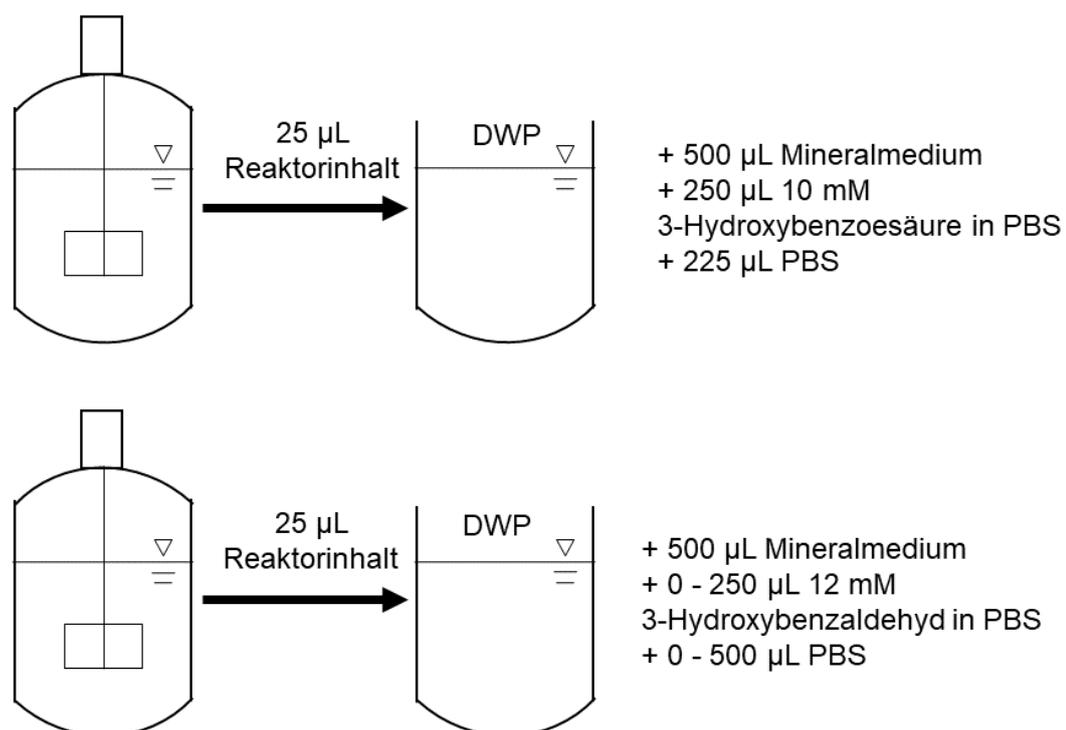


Abbildung 6: Schematischer Überblick über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze der Biotransformationen für Messpositionen (oben) und die Kalibriermessungen (unten). Nach Ende der Expressionsphase im mL-Maßstab wurden 25 µL aus jedem Reaktor entnommen und in eine Vertiefung der „Deep Well Plate“ (DWP) gegeben. Dazu wurden bei den Messpositionen 250 µL 10 mM 3-Hydroxybenzoesäure gelöst in PBS, 225 µL PBS und 500 µL Mineralmedium gegeben. Bei den Kalibrierpositionen wurden 0-250 µL 12 mM Hydroxybenzaldehyd gelöst in PBS gegeben und anschließend auf 1 mL Gesamtvolumen aufgefüllt.

Für alle 48 Probenpositionen wurden 25 μL Zellen aus den Rührkessel-Bioreaktoren im mL-Maßstab mit 250 μL 10 μM 3-Hydroxybenzoesäure, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 8 g L^{-1} NaCl, 0.2 g L^{-1} KCl, 1.44 g L^{-1} Na_2HPO_4 , 0.24 g L^{-1} KH_2PO_4), 500 μL Mineralmedium nach Riesenberg (Riesenberg, 1991) mit 10 g L^{-1} Glukose und 225 μL PBS gemischt.

Für jedes Parallelexperiment wurden drei Kalibrierkurven erstellt. Jede Kalibrierkurve enthält sechs verschiedene Produktkonzentrationen. Grundsätzlich wurde die Eduktlösung (3-Hydroxybenzoesäure) durch verschiedene Mengen der Produktlösung (12 mM 3-Hydroxybenzaldehyd, gelöst in PBS) ersetzt, um eine endgültige Produktkonzentration in der DWP von 0 bis 3 mM zu erreichen. Um in allen Kalibriervertiefungen identische Volumina zu erhalten, wurden die Positionen nach Zugabe der Zelllösung und des mineralischen Mediums auf 1 mL mit PBS aufgefüllt. Die Biomasse für alle Kalibrierkurven wurde von der ersten (A1) Bioreaktorposition des jeweiligen Versuchs aspiriert.

Alle für die Biotransformation erforderlichen Lösungen wurden für jedes Experiment frisch zubereitet.

Nach der Herstellung der Ausgangsreaktionsmischung für die Biotransformationen wurde die DWP bei 35 °C und 1000 rpm geschüttelt (Hamilton Heater Shaker, Hamilton Bonaduz AG, Schweiz). Alle 1,1 Stunden wurden 50 μL aller Positionen (48 Probenpositionen und 18 Kalibrierungspositionen) in eine Mikrotiterplatte übertragen und mit 50 μL ABAO-Lösung gemischt. Die ABAO-Lösung bestand aus 10 mM ABAO, gelöst in Natriumacetatpuffer (3,69 g L^{-1} Natriumacetat, 3,15 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid, pH auf 4,5 eingestellt). Anschließend wurde die Mikrotiterplatte 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch bei 360 nm und 600 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Synergy HTX, Biotek, Winooski, USA) gemessen. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem von dem Pipettierroboter betriebenen Mikrotiterplattenwaschgerät (405 LS, Biotek, Winooski, USA) gewaschen. Die Probenflüssigkeiten wurden zunächst abgesaugt und verworfen, gefolgt von drei Dispensier- und Absaugschritten mit 300 μL deionisiertem Wasser mit 0,1 % (v/v) Tween (Tween 20, Amresco, Solon, USA). Schließlich wurde die restliche Waschlösung abgesaugt und verworfen, und die Mikrotiterplatte wurde von dem Pipettierroboter in ihre Ausgangsposition gebracht.

Es wurden insgesamt fünf Messungen durchgeführt, darunter eine Messung direkt nach Beginn der Biotransformation.

4.5.6 Auswertung der Biotransformationen

Grundsätzlich wird bei der in dieser Arbeit verwendeten Biotransformation mit *E. coli* NoCAR die Enzymaktivität durch die Absorptionsmessung bei 360 nm gemessen. Bei dieser

Wellenlänge absorbiert das Reaktionsprodukt der Biotransformation (3-Hydroxybenzaldehyd). Da bei der automatisierten Versuchsdurchführung im Rahmen dieser Arbeit keine Zellabtrennung möglich war, ergaben sich daraus verschiedene Probleme für die Auswertung der Biotransformation:

- 1) Die Biomasse im Biotransformationsgefäß trägt zur Absorption bei 360 nm bei, sodass die Produktkonzentration nicht unabhängig von der Biomassekonzentration gemessen werden kann.
- 2) Während der Biotransformation wachsen die Zellen. Die Wachstumsgeschwindigkeit hängt allerdings von der zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden Produktkonzentration ab.
- 3) Die Ausgangsbiomasse in den Proben- und Kalibrierpositionen hängt von der vorher angewandten Zulauftrate ab, da die Zellen für die Biotransformation um einen festen Faktor verdünnt werden. Durch die verschiedenen Zulaufraten während der Expression ergab sich eine unterschiedliche finale Zelldichte in den Rührreaktoren im mL-Maßstab

Daher wurde beim Projektpartner (Michael Osthege, Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland) ein auf Bayes'scher Statistik basierendes, mechanistisches Modell entwickelt, um die Messungen auswerten zu können und anschließend die katalytische Aktivität der Zellen abzuschätzen. Eine genaue Beschreibung des Modells ist unter Github.com zu finden (<https://github.com/JuBiotech/diginbio-car-paper>).

4.6 Allgemeine analytische Methoden

Die Biomassekonzentration der Proben wurde durch die Messung der optischen Dichte abgeschätzt. Die Messung erfolgte mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Synergy HTX, Biotek Inc. Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Der lineare Messbereich lag zwischen $OD_{600} = 0,1 - 0,4$. Proben mit einer höheren optischen Dichte wurden mit PBS (8 g L^{-1} NaCl, 0,2 g L^{-1} KCl, 1,44 g L^{-1} Na_2HPO_4 , 0,24 g L^{-1} KH_2PO_4) verdünnt, sodass die Extinktion wieder im Messbereich des Photometers lag.

Für die Erstellung einer Korrelation zwischen optischer Dichte und Biomassekonzentration wurden jeweils 2 mL Proben bei 21130 (xg) für 5 min abzentrifugiert (5424 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), der Überstand verworfen und anschließend in vorher getrockneten und gewogenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 24 Stunden bei 80 °C getrocknet und erneut gewogen. Entsprechende Korrelationen von optischer Dichte und Biomassekonzentration wurden für alle verwendeten Mikroorganismen angefertigt.

Die Proteinexpression von mCherry wurde fluorimetrisch mittels der Messung in einem Mikrotiterplattenlesegerät abgeschätzt (Synergy HTX, Biotek Inc. Winooski, USA). Die

Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 560 nm. Die Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm.

4.7 3D-Drucker für die additive Fertigung

Insbesondere für die Kopplung der Rührkesselreaktoren im L-Maßstab mit dem mL-Maßstab wurden Komponenten mittels FFF-Druck („Fused Filament Fabrication“, Schmelzschichtdruck) hergestellt. Dafür wurde ein modifizierter Prusa i3 MK3 3D-Drucker verwendet (Prusa Research, Prag, Tschechien). Der Drucker wurde zur Vermeidung von Zugluft in einem Gehäuse aus Plexiglas platziert. Da dies die Temperatur um den Drucker erhöht, wurde das Netzteil des Druckers außerhalb des Gehäuses platziert. Da das Netzteil normalerweise zur Steifigkeit des Druckerrahmens beiträgt, wurde stattdessen eine Versteifung aus Glykol-modifiziertem Polyethylenterephthalat (Extrudr PETG, Lauterach, Österreich) gedruckt und anstelle des Netzteils am Druckerrahmen montiert. Darüber hinaus wurde die originale Messingdüse gegen eine Düse mit einem Durchmesser von 0,4 mm aus Werkzeugstahl mit Antihafbeschichtung getauscht (Nozzle X, E3D, Chalgrove, Vereinigtes Königreich). Außerdem wurde die originale Spulenhalterung durch vier jeweils zweifach kugelgelagerte Rollen ersetzt, auf denen die Filamentspulen aufgestellt und vom Drucker abgerollt werden. Zwei der Rollen sind für die Anpassung an verschiedene Spulendurchmesser seitlich verschiebbar. Die Auflösung der automatischen Gitterbettnivellierung („Mesh bed leveling“) vor jedem Druckvorgang wurde von den originalen neun Kalibrierpunkten auf 49 Kalibrierpunkte erhöht. Das Leitplastik für die Führung der Kühlluft des Bauteils wurde anhand der originalen CAD-Datei des Herstellers aus glasfaserverstärktem Polypropylen (XSTRAND PP GF30, BASF 3D Printing Solutions, Heidelberg, Deutschland) gedruckt und ersetzt, um hohen Drucktemperaturen dauerhaft widerstehen zu können.

Als Druckoberfläche wurden zwei Druckplatten aus Federstahl mit Kunststoffbeschichtung verwendet. Die Beschichtung der einen Druckplatte war eine glatte Polyetherimidbeschichtung („PEI Smooth Printing Sheet“, Prusa Research, Prag, Tschechien). Die Kunststoffbeschichtung wurde vor jeder Nutzung mit Isopropanol gereinigt (Rotipuran, >99,5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Außerdem wurde die Kunststoffbeschichtung im Abstand von wenigen Monaten mit Aceton (Rotipuran, >99,8 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) regeneriert. Diese Druckoberfläche wurde, wenn nicht anders erwähnt, für alle Druckvorgänge verwendet.

Für die zweite Druckoberfläche wurde eine Federstahlplatte mit aufgeklebter „Buildtak“-Druckoberfläche verwendet (BuildTak, Maplewood, USA). Die Kunststoffbeschichtung wurde vor der ersten Inbetriebnahme einmalig mit Isopropanol gereinigt. Danach durfte die Beschichtung nicht mehr in Kontakt in Lösungsmitteln kommen, da dies die Haftkraft

irreversibel reduziert. Die Beschichtung wurde danach nur noch mit vollentsalztem Wasser gereinigt und bei Beschädigungen der Oberfläche ausgetauscht.

4.8 Allgemeine Software

Wenn nicht anders angegeben, wurde sämtliche Software in der Programmiersprache Python, Version 3, geschrieben (Python Software Foundation, Delaware, USA). Für die Integration des Pipettierroboters ins Laborumfeld wurde Software in der Programmiersprache C# mithilfe von Visual Studio 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) geschrieben.

Die Datenauswertung erfolgte mit den Paketen „Scipy“, NumPy“, „pandas“ und „matplotlib“ in der Programmiersprache Python.

Mechanische Konstruktionen wurden alle mit der Software FreeCAD 0.19 erstellt. Von FreeCAD wurde für die Konstruktion von Bauteilen überwiegend die „Part Design“ Werkbank verwendet. Für die Erstellung von dreidimensionalen Gitterapproximationen der Bauteile für den 3D-Druck wurde die „Mesh Design“ Werkbank verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Automatisierter Transfer von Zellsuspensionen¹

In dieser Arbeit wurde mithilfe von standardisierten Zulaufverfahren im L-Maßstab Zellen hergestellt, die anschließend auf bis zu 48 Rührkesselreaktoren verteilt werden, um dort geeignete Expressionsbedingungen zu identifizieren. Automatisierte Rührkesselreaktoren im L-Maßstab und automatisierte Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab sind kommerziell verfügbar. Es existiert jedoch keine technische Lösung für den Transfer von Zellsuspensionen aus Rührkesselreaktoren im L-Maßstab auf Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab und eine Automatisierung dieses Vorgangs.

Grundsätzlich sollte der Transfer schnell erfolgen, um physiologische Veränderungen der Zellen beim Transfer zu vermeiden. Da vier Parallelreaktoren im L-Maßstab zur Verfügung standen, wäre es sinnvoll, die Zellsuspension beliebig auf bis zu 48 Reaktoren im mL-Maßstab verteilen zu können. Aus der Konstruktion des mL-Reaktorsystems ergab sich die weitere Herausforderung, dass dieses Reaktorsystem keine Dosierpumpen für die einzelnen Reaktoren vorsieht und nur eine 3,5 mm große Pipettieröffnung an jeder Reaktoroberseite besitzt. Zuletzt sollten die Apparate des Transfersystems auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters so wenig Platz wie möglich einnehmen.

Daher wurde das in Abbildung 7 dargestellte Fließbild für ein Transfersystem konzipiert.

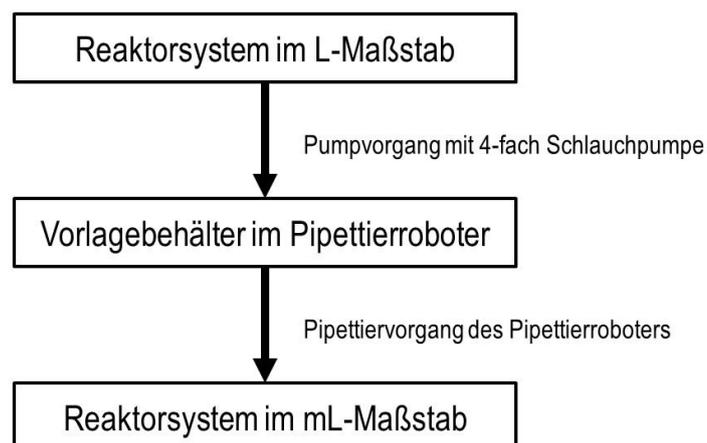


Abbildung 7: Konzept für den Transfer von Zellsuspension

¹ Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in: „Nikolas Von den Eichen, Lukas Bromig, Valeryia Sidarava, Hannah Marienberg, Dirk Weuster-Botz, Automated multi-scale cascade of parallel stirred-tank bioreactors for fast protein expression studies, Journal of Biotechnology, Volume 332, 2021, Pages 103-113, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.021>.“

5.1.1 Konstruktion der benötigten Bauteile

Die Absaugung des Reaktorinhalts erfolgte mit Steigrohren mit 4 mm Außendurchmesser und einer Wandstärke von 0,4 mm. Die Steigrohre wurden am reaktorseitigen Ende schräg abgeschnitten und geschliffen, sodass sie bis zum Boden des Reaktors geschoben werden konnten, ohne den Strömungsquerschnitt zu verringern. Der Reaktorinhalt aus den Rührkesselreaktoren im L-Maßstab wurde mithilfe einer 4-fach Schlauchpumpe (Reglo ICC, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) in Vorlagebehälter auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters gefördert. Es wurden die größten autoklavierbaren und verwendbaren Pumpenschläuche für den Pumpentyp mit 2,79 mm Innendurchmesser verwendet (PharMed BTP, Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). Aus den Vorlagebehältern sollte der Roboter anschließend durch seine Standard Pipettierkanäle die Zellsuspension auf eine beliebige Kombination von Reaktoren im mL-Maßstab übertragen.

Das Rührkesselreaktorsystem im mL-Maßstab hat ein maximales Arbeitsvolumen pro Reaktor von 14 mL, dies ergibt bei 48 Reaktoren insgesamt 672 mL. Vier so große Vorlagebehälter hätten viel Platz auf der Arbeitsfläche des Roboters in Anspruch genommen. Um kleinere Vorlagebehälter zu ermöglichen müssen beide Vorgänge (Befüllen des Vorlagebehälters und Verteilung der Zellsuspension auf mL-Reaktoren) gleichzeitig stattfinden. Das ermöglichte ein reduziertes Arbeitsvolumen der Vorlagebehälter von 90 mL. Dafür muss allerdings die Möglichkeit bestehen, dass der Pipettierroboter den Flüssigkeitsstand während der Pipettierung misst. Dies kann mithilfe einer kapazitiven Füllstandsmessung („capacitive liquid level detection“, CLLD) erfolgen. Bei der kapazitiven Messung wird die Änderung der elektrischen Kapazität zwischen Sonde (hier die Dosiernadeln des Pipettierroboters) und der Umgebung gemessen. Dafür mussten allerdings die Vorlagebehälter aus sterilisierbarem Kunststoff gefertigt werden.

Diese Anforderungen konnten mit der in Abbildung 8 dargestellten Gestaltung der Transferbehälter erfüllt werden.

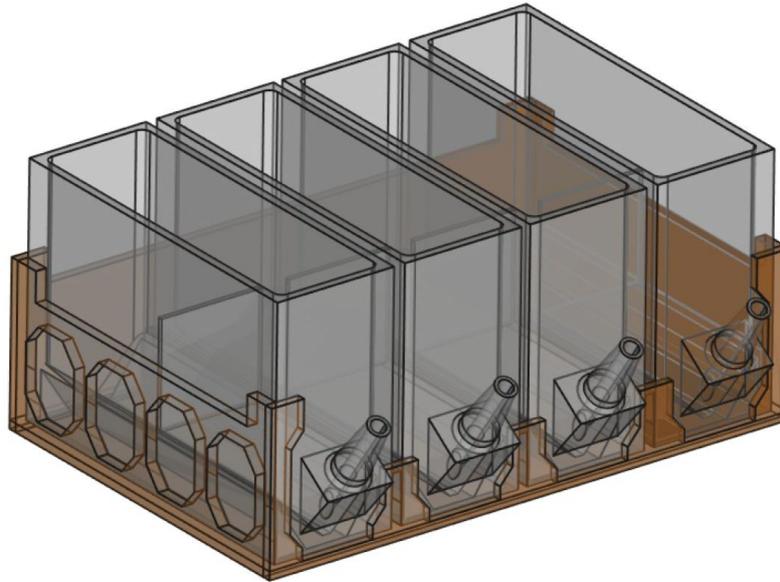


Abbildung 8: Neu gestaltete Vorlagebehälter zum Transfer von Zellsuspensionen. Der braune Rahmen hat als Grundfläche das SBS-Format. Dies ist ein ANSI/SLAS-Standard für die Grundfläche einer Mikrotiterplatte und beträgt 127.76 mm x 85.48 mm. Die grauen Vorlagebehälter sind jeweils einzeln verwendbar. Die Abbildung wurde mit FreeCAD erstellt.

Die Vorlagebehälter wurden aus einem Co-Polyester (nGen_flex, Colorfabb, Belfeld, Niederlande) im Schmelzschichtverfahren („Fused filament fabrication“, FFF) hergestellt. Dadurch konnte die komplexe Geometrie der Behälter in einem Schritt gefertigt werden. Das Material nGen_flex ist vom Hersteller für die Dampfsterilisation zugelassen. Die Vorlagebehälter haben jeweils eine schräg angesetzte Schlauchtülle, um einen Silikonschlauch als Verbindung zur Schlauchpumpe aufzusetzen. Jeder einzelne Vorlagebehälter ist lang genug, um bei dem typischen Minimalabstand der Pipettierkanäle eines Pipettierroboters von 9 mm den gleichzeitigen Zugriff von bis zu 8 Pipettierkanälen zu ermöglichen.

Zwischen den einzelnen Vorlagebehältern und der Fläche der SBS-Position stellt ein weiteres Kunststoffbauteil die Verbindung her. Dies ist in Abbildung 8 in braun dargestellt und wird im Weiteren als Behälterrahmen bezeichnet. Der Behälterrahmen hat im Wesentlichen zwei Zwecke: Einerseits ermöglicht er die Positionierung einzelner Vorlagebehälter auf der SBS-Position. Andererseits macht er die Konstruktion erst möglich, da das für die Vorlagebehälter verwendete Material eine starke Tendenz hat, sich während des Druckvorgangs aufgrund von thermischen Spannungen von der Druckplatte abzulösen. Die Tendenz, sich vom Druckbett abzulösen, ist proportional zur Bauteilgröße. Daher wurde der Behälterrahmen aus Glykol-modifiziertem Polyethylenterephthalat (PETG, Extrudr, Lauterach, Österreich) gefertigt, welches eine geringe Schwindung (0,5 % nach ISO 294-4 technisches Datenblatt des Herstellers) aufweist, dafür allerdings nicht autoklavierbar ist. Um trotz der ineinander gesetzten Bauteile eine möglichst spielfreie Positionierung zu ermöglichen, wurde die Passung

zwischen den Vorlagebehältern und dem Behälterrahmen innerhalb der ersten 5 mm ab dem Rahmenboden als Nullpassung ausgeführt. Dies ist möglich, da das für die Vorlagebehälter verwendete Material nGen_flex die Härte und Elastizität von Hartgummi aufweist (Shore-Härte 55D, Reißdehnung von 400 %, Elastizitätsmodul von 350 MPa nach dem technischen Datenblatt des Herstellers). Darüber weitet sich die Passung mit einem Winkel von 1,8 ° auf einer Länge von 7 mm. Dadurch entsteht eine einfach einsetzbare, aber trotzdem spielfreie Verbindung.

Wie eingangs bereits erwähnt, sollte der Pipettierroboter während des Pumpvorgangs in die Vorlagebehälter die Zellsuspensionen aus den Vorlagebehältern in die einzelnen Reaktoren im mL-Maßstab transferieren. Standardmäßig werden für den Betrieb der mL-Parallelreaktoren Stahlnadeln mit einer maximalen Kapazität von 300 µL verwendet, da nur diese dünn genug sind um für die Probenahme in die Pipettieröffnungen der Parallelbioreaktoren zu fahren. Da bei dieser Anwendung jedoch ein möglichst schneller Transfer der Zellsuspension notwendig war, wurden beim Roboter Einweg-Kunststoffpipettenspitzen mit einem Arbeitsvolumen von 1000 µL gewählt (1000 µL High Volume Tips, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz). Da die Spitzen mit etwa 9 mm Durchmesser zu groß sind, um in die Pipettieröffnungen des Bioreaktorblocks (Durchmesser 3,5 mm) einfahren zu können, wurde eine Dispensierposition von 102 mm oberhalb des Reaktorbodens gewählt, sodass die Spitzen gerade in die Pipettieröffnungen des Bioreaktorblocks eintauchen.

Ein Überblicksfoto des gesamten Transfersystems ist in Abbildung 9 dargestellt.

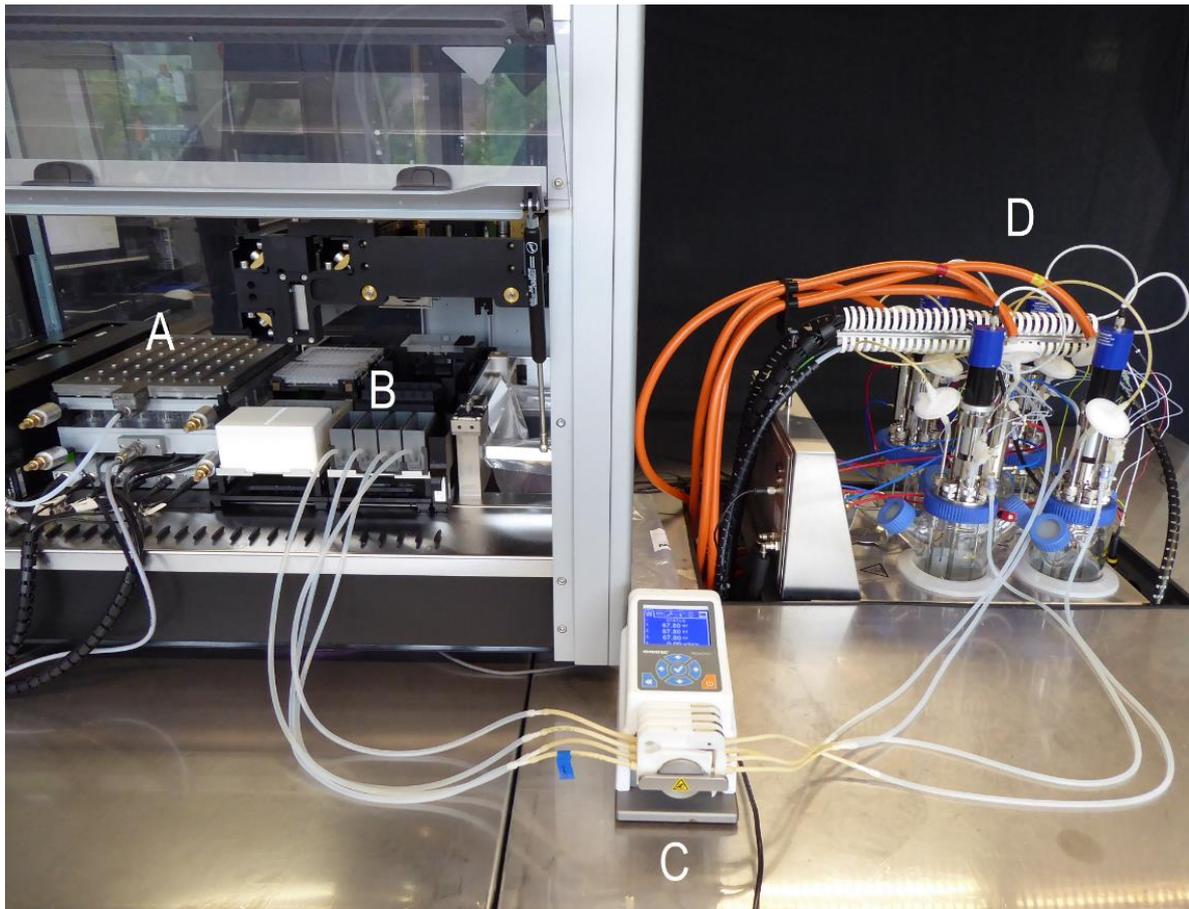


Abbildung 9: Foto des 48-fach Parallelbioreaktorsystems (A) mit den 4 Vorlagebehältern im Behälterrahmen (B) auf einer SBS-Position der Arbeitsfläche Pipettierroboters. Auf der rechten Seite sind die 4 Rührkesselreaktoren im L-Maßstab (D). Die Mehrkanalpumpe (C) verbindet jeden Rührkesselreaktor des L-Maßstabs mit jeweils einem Transfergefäß.

5.1.2 Software zur Steuerung des automatisierten Transfers von Zellsuspensionen

Die Steuerung wurde als Methode innerhalb der Venus-Software des Pipettierroboters (Venus 4.5, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) geschrieben. Die Kommunikation zwischen dem Pipettierroboter und der Pumpe erfolgte mithilfe des SiLA2-Standards, wobei der SiLA2-Server auf einem Einplatinencomputer (BeagleBone Green, BeagleBoard.org Foundation, Oakland, USA) mit serielltem Interface zur Pumpe lief. Parametrisierbare Python-Programme, welche von der Venus-Software gestartet werden, stellen den SiLA2-Client dar.

Im Betrieb wurden die gewünschte Anzahl Vorlagebehälter mit angeschlossener Schlauchleitung in Aluminiumfolie autoklaviert. Dann wurde eine Seite mit dem Steigrohr am Reaktor des L-Maßstabs verbunden und der auf der anderen Seite befindliche Vorlagebehälter auf dem Behälterrahmen auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters positioniert.

Zuerst startete der Roboter den Transfer von 90 mL Zellsuspension aus den Rührkesselreaktoren im L-Maßstab in die Vorlagegefäße mit der maximalen Pumprate.

Es wurden in dieser Arbeit zwei Methoden zur Pumpenregelung implementiert. Die erste, einfachere, wurde für die Untersuchungen der Proteinexpression mit *E. coli* mCherry verwendet. Zuerst begann der Roboter mit acht parallelen Dosierstrecken jeweils eine Spalte des Parallelreaktorsystems im mL-Maßstab durch wiederholtes Aspirieren und Dispensieren zu befüllen. Dabei schickte der Pipettierroboter nach jedem Aspirationsvorgang aus dem Transferbehälter ein Kommando, weitere acht mL durch die Pumpe mit der maximalen Pumprate nachzudosieren. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das Zielvolumen in den Reaktoren des mL-Maßstabs erreicht war. Danach gab es drei Optionen: Entweder wurde die Spalte des Bioreaktorblocks gewechselt und mit dem Befüllen von weiteren Reaktoren fortgefahren. Oder es wurde der Quellreaktor im L-Maßstab gewechselt, indem zusätzlich zum Spaltenwechsel die Pipettenspitzen, der Transferbehälter und der aktive Pumpkanal gewechselt wurde. Außerdem bestand die Option, dass alle mL-Reaktoren erfolgreich befüllt waren. In diesem Fall wurden die Pipettenspitzen abgeworfen und der Transfervorgang war beendet.

Um weniger Drift beim Füllstand des Transferbehälters durch nicht perfekte Pumpenkalibrationen zu erhalten, wurde für die Untersuchung von *E. coli* NoCAR eine weitere Steuerungslogik implementiert, die eine Füllstandsregelung durch den Pipettierroboter ermöglichte. Hier wurde nach dem initialen Transfer von 90 mL Zellsuspension aus den Reaktoren im L-Maßstab der aktive Pumpkanal mit 80 % der maximalen Pumprate weiter betrieben. Danach begann der Roboter, mit acht parallelen Dosierstrecken jeweils eine Spalte des Parallelreaktorsystems im mL-Maßstab durch wiederholtes Aspirieren und Dispensieren zu befüllen. Bei jedem Aspirationsschritt erfolgte eine kapazitive Messung der Flüssigkeitshöhe, womit das aktuelle Flüssigkeitsvolumen im Transferbehälter berechnet wurde und mit dem Sollwert verglichen wurde. Das Sollvolumen im Transferbehälter betrug 80 mL. Bei Über- oder Unterschreiten des Sollwerts wurde die Pumpe in Schritten von 20 % gedrosselt oder beschleunigt. Dies führte dazu, dass die in der Praxis unvermeidbare Ungenauigkeit der Schlauchpumpen (durch Autoklavieren und Einspannen des Schlauches) durch die angewandte Regelung irrelevant wird. Wenn das Zielvolumen in den Reaktoren des mL-Maßstabs erreicht war (typischerweise 10 oder 11 mL), erfolgte der Wechsel der Zielspalte im Bioreaktorblock. Wenn die gewünschte Anzahl Reaktoren des mL-Maßstabs gefüllt war, wurde die Pumpe gestoppt und der Transfer war beendet.

Die Dauer des Transfers ist limitiert durch die Pipettiergeschwindigkeit des Roboters und eine direkte Funktion der Anzahl der genutzten Reaktoren im mL-Maßstab. Bei 48 aktiven Reaktoren im mL-Maßstab dauerte der gesamte Transfer bis zu 25 min.

Diskussion

Mit dem hier vorgestellten Transfersystem konnte der gewünschte Transfer vom L- in den mL-Maßstab mit geringem apparativen Aufwand umgesetzt werden. Besonders hervorzuheben ist die Nutzung von Schmelzschicht-3D-Druck (FFF) bei Komponenten, die hohen Ansprüchen hinsichtlich thermischer Belastbarkeit (Transferbehälter) oder Fertigungsgenauigkeit (Behälterrahmen) unterliegen. In der Vergangenheit wurden dafür Komponenten mittels Selektivem Lasersintern (SLS-Verfahren) (Ude et al., 2015) oder mittels Stereolithografie (SLA-Verfahren) (Raddatz et al., 2017) gefertigt. Der Aufwand, die Komponenten zu fertigen, ist beim SLS- oder SLA-Verfahren jedoch deutlich höher, da bei beiden manuelle Nachbearbeitung des Produkts nötig ist (Sandstrahlen, Waschen, Aushärten...). Außerdem ist die Nutzung des SLA- oder SLS-Verfahrens deutlich teurer, da die verwendeten Maschinen typischerweise mehrere tausend bis zehntausend Euro teuer sind (Tully and Meloni, 2020), während der hier verwendete FFF-Drucker lediglich Investitionskosten von tausend Euro nötig machte. Auch die Material- und Betriebskosten sind beim FFF-Druck am niedrigsten (Tully and Meloni, 2020). Die niedrigen Kosten und die unkomplizierte Fertigung bedeuten konkret, dass ein Transferbehälter innerhalb von sechs Stunden für zwei Euro Materialkosten herstellbar war. Das dringt in Bereiche vor, bei dem mittels 3D-Druck hergestellte Einwegartikel attraktiv werden könnte.

In einer früheren Arbeit wurde ein Reaktortransfer von einem 5 L Rührkesselreaktor auf bis zu sechs 1 L Rührkesselreaktoren vorgestellt (Fricke et al., 2011). Bei dieser Arbeit wurden die Reaktoren über feste Verbindungen von Pumpen, Rohren und Ventilen verbunden. Dies ist deutlich aufwändiger und auf diese Kombination an Reaktoren limitiert. Wenn sowohl der große, als auch die kleinen Reaktoren in größerer Zahl verwendet werden, steigt die technische Komplexität sehr schnell.

Ein weiterer Ansatz wurde von Morschett et al. vorgestellt (Morschett et al., 2021). Hierbei wurden 4 Reaktoren im L-Maßstab mittels eines Probenahmesystems an einen Pipettierroboter gekoppelt. Diese Herangehensweise ist im Gegensatz zum hier Vorgestellten nicht auf maximalen Durchsatz, sondern auf minimales Totvolumen optimiert. Dies wurde erreicht, indem die Glasreaktoren mit einem zusätzlichen seitlichen Anschluss versehen wurden, um dort eine Kapillare anschließen zu können. Der Zweck davon war, den Pipettierroboter als Probenahme- und Verarbeitungssystem für 4 Rührkesselreaktoren nutzen zu können. Durch das Probenahmesystem konnte der Pipettierroboter Proben aus dem Rührkesselreaktor im L-Maßstab nehmen und diese dann verarbeiten.

Die Geschwindigkeit des Transfers war bei dem vorgestellten Verfahren durch die Pipettiergeschwindigkeit des Roboters limitiert. Dies ließe sich beschleunigen, indem mehr Pipettierkanäle oder Pipettierkanäle mit größerem Arbeitsvolumen verwendet werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass dies auch Anpassungen an den Transferbehältern nötig

machen würde, da sonst nicht alle Pipettierkanäle gleichzeitig Zugriff auf das Transfergefäß hätten. So hat ein Pipettierkanal mit einem Aspirationsvolumen von 5 mL der Firma Hamilton einen Kanal zu Kanal Mindestabstand in Y-Richtung von 18 mm. Das bedeutet, dass bei dem vorliegenden Design des Transferbehälters nur noch vier Kanäle parallel pipettieren könnten.

Bei den beiden Varianten der Steuerung des automatisierten Transfers ist die Variante mit Füllstandsregelung eindeutig vorteilhaft, da sie selbst bei sehr ungenauer Kalibration der Pumpe einen konstanten Füllstand im Transfergefäß garantiert. Die verwendete kapazitive Füllstandsdetektion des Pipettierroboters wird normalerweise dafür verwendet, innerhalb von Mikrotiterplatten oder mL-Reaktionsgefäßen Füllstände auf $< 0,2$ mm genau zu detektieren. Sie ist daher mehr als genau genug für die hier vorgestellte Anwendung.

5.1.3 Einfluss des Zelltransfers auf Wachstum und Expressionsleistung von *E. coli*

Während des Transfers sind die Mikroorganismen bis zu 25 Minuten ohne Kohlenstoffquelle, Sauerstoffversorgung, pH-Regelung und Temperaturkontrolle. Diese Bedingungen entsprechen nicht den im Bioreaktor eingestellten Kultivierungsbedingungen. Daher ist die Frage, ob der Zelltransfer einen Einfluss auf die folgenden Prozessergebnisse im Vergleich zu einer unterbrechungsfreien Prozessführung hat. Als Beispielprozess wurde die rekombinante Herstellung des rot fluoreszierenden Proteins mCherry mit *E. coli* gewählt. Diese erfolgt typischerweise in zwei Phasen, einer Zellbildungs- und einer Proteinproduktionsphase. Der Transfer sollte zwischen den beiden Phasen stattfinden.

Für die Simulation der Transferphase wurde ein Versuch im Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor im L-Maßstab durchgeführt, bei dem ein unterbrechungsfreier Zulaufprozess mit einem Prozess verglichen wurde, bei dem anstelle des Transfers in den mL-Maßstab eine Unterbrechung von 30 min vorgesehen wurde. Während dieser Unterbrechung wurde der Rührreaktor auf Raumtemperatur temperiert. Außerdem wurde die pH-Regelung, Begasung und der Rührer ausgeschaltet. Nach dem Ende der Unterbrechung wurde die Proteinexpression in beiden Versuchen identisch weitergeführt (Induktion mit $5 \mu\text{M}$ IPTG, Zulauftrate von $2,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose, pH 7). Jeder Versuch wurde als biologisches Duplikat mit drei technischen Replikaten ausgeführt.

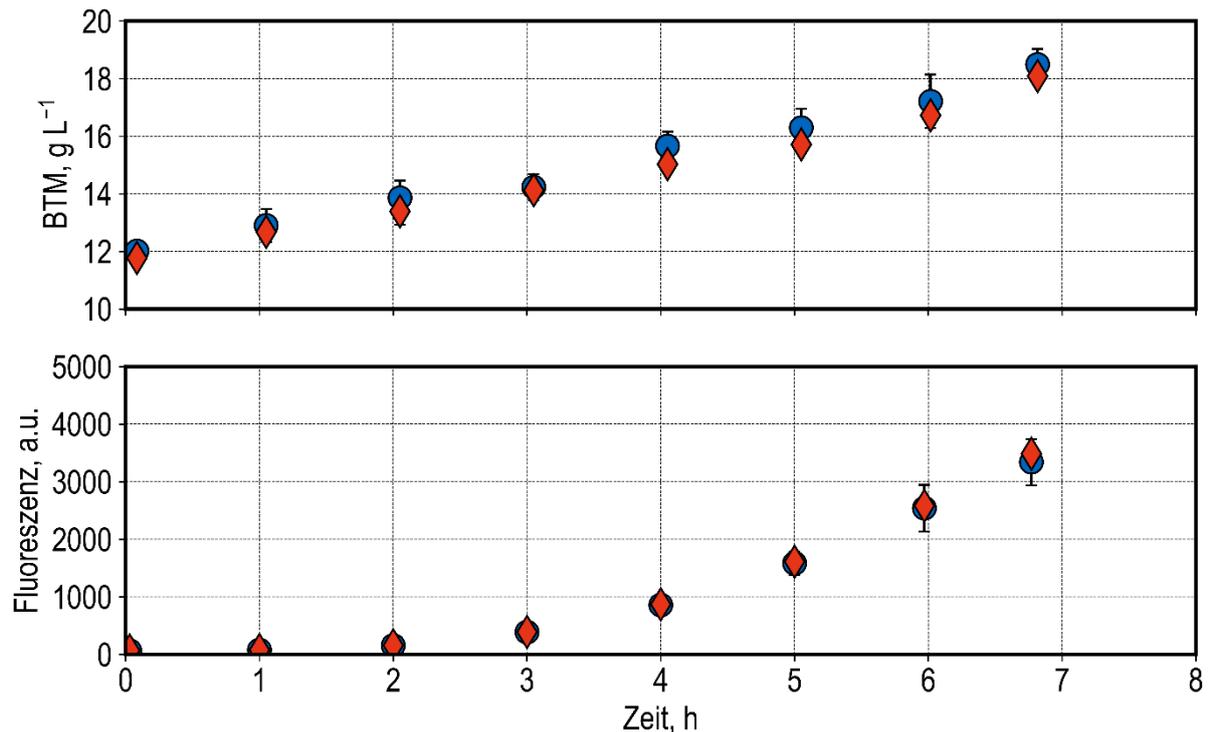


Abbildung 10: Vergleich von Biomassekonzentration und Fluoreszenz von *E. coli* mit (blaue Kreise) und ohne (rote Vierecke) vorhergehender Prozessunterbrechung von 30 Minuten. Während der Prozesszeit wurden pH-Regelung, Rührer und die Begasung ausgeschaltet. Außerdem wurden die Zellen auf Raumtemperatur (22 °C) temperiert. Die Prozesszeit von 0 bezeichnet den Zeitpunkt der Induktion mit 5 μM IPTG. Die Zellen wurden vor der Induktion mit einem Satzprozess (5 g L⁻¹ Glucose) und einem darauffolgenden Zulaufprozess ($\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$) kultiviert. Die Standardabweichungen basieren auf zwei biologischen Replikaten mit drei unabhängigen Messungen pro Datenpunkt ($V = 500 \text{ mL}$, $F_{\text{in}} = 2.4 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ °C}$, $\text{pH} = 7$, $\text{DO} > 30 \%$).

In Abbildung 10 sind die gemessenen Biomassekonzentrationen und Fluoreszenzen als Maß für die Proteinexpression nach der Induktion dargestellt. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 7 Stunden wurde sowohl für die Biomassekonzentration als auch für die Fluoreszenz kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen festgestellt.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die durch den Transfer erfolgende Auszehrphase jedenfalls für *E. coli* keine Auswirkungen auf die anschließende Proteinexpression oder Biomassebildung hinterlässt.

5.2 Einbindung eines Pipettierroboters in die Software-Umgebung eines digitalisierten Bioprozesslabors

Die Ablaufsteuerung des Pipettierroboters erlaubt keine Echtzeitpriorisierung der anstehenden Tätigkeiten des Roboters und es ist vergleichsweise aufwändig, die einzelnen Abläufe (Probenahme, pH-Regelung, Zulauf...) versuchsspezifisch zu variieren. Dies führt zu nicht-optimaler Prozessführung im mL-Maßstab und limitiert die Anwendungen der Parallelbioreaktoren im mL-Maßstab. Daher sollte eine Ablaufsteuerung verwendet werden,

die am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelt wurde und die a) die Aufgaben basierend auf ihrer Echtzeitpriorität auswählt und b) streng zwischen Pipettiertätigkeit und Aufgabenpriorisierung trennt. Allerdings verfügte der verwendete Pipettierroboter werksseitig über keine hinreichenden Möglichkeiten für eine softwarebasierte Fernsteuerung.

Pipettierroboter sind weit verbreitete Hilfsmittel in Laboren weltweit. Dabei hat sich ein weit verbreiteter Typ herausgebildet, der von mehreren Firmen ähnlich gebaut wird (z.B. PerkinElmer, Inc. Waltham, USA, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Diese Pipettierroboter haben einen oder mehrere Roboterarme, mit denen Komponenten zum Flüssigkeitstransport (Pipettierkanäle) zum Einsatz gebracht werden können. Darüber hinaus haben sie Greifarme, mit denen typische Labor-Verbrauchsmaterialien wie etwa Mikrotiterplatten transportiert werden können. Letzteres ermöglicht eine Interaktion mit Drittgeräten wie Mikrotiterplattenlesern, Inkubationsschränken, Zentrifugen und vielem mehr. Beides kann innerhalb eines teilweise abgeschlossenen Arbeitsbereichs zum Einsatz gebracht werden. Das heißt der Pipettierroboter kann innerhalb seines Arbeitsbereichs beliebig Flüssigkeiten pipettieren oder Labor-Verbrauchsmaterialien bewegen.

Die Software zum Betrieb des Pipettierroboters, hier Venus 4.5 (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz, im Folgenden Venus-Software genannt), hat ihr primäres Gestaltungsziel darin, technisch weniger versierte Labornutzer in die Lage zu versetzen, ihre Pipettierarbeiten zu automatisieren. Zu diesem Zweck werden die Tätigkeiten des Pipettierroboters (z.B. Aspirieren, Dispensieren, Platten bewegen...) in Blöcke zusammengefasst und in einer grafischen Oberfläche zusammengefügt, um eine Robotertätigkeit abzubilden. Ein Beispiel aus dieser Programmierumgebung ist in Abbildung 11 gegeben.

23		Grouping Pipetting Work
24		PickupNeedles of NeedleController blnReturnValue = NEEDLECONTROLLER::PickupNeedles(ML_STAR, "11111111")
25		Loop over following sequences: - seqBioreactorpositions (Controlling), Adjust for '1' times consumption 'loopCounter1' used as loop counter variable
26		Array: Get At 'strcurrDispenseChannelPattern' = element from array 'arrstrChannelPatterns' at the index [loopCounter1].
27		Trace02 of TrcLevel TrcLevel:Trace02(TrcLevel:DEBUG, strFunctionName, "The current dispense channel pattern: ", strcurrDispenseChannelPattern)
28		Sequence: Get Current Position 'intCurrentPosition' = current position of sequence 'seqBioreactorpositions'
29		Trace02 of TrcLevel TrcLevel:Trace02(TrcLevel:DEBUG, strFunctionName, "The sequence current position is: ", intCurrentPosition)
30		1000ul Channel Aspirate (Single Step) on ML_STAR Channel (1..8): strcurrDispenseChannelPattern, Optimized channel use: Channel pattern, Sequence: io_seqSource, Sequence counting: (0) Manually, Liquid class: "Bioreaktor_Glucose_150_gL_JetEmptyTip", Volume [u]: io_arrfitPipettingVolumes[*intCurrentPosition], Mix volume [u]: *, Cycles: 0, Position relative to liquid surface: * mm, LLD settings: On, Capacitive:5, Liquid following: On 3 return value(s) .
31		1000ul Channel Dispense (Single Step) on ML_STAR Channel (1..8): strcurrDispenseChannelPattern, Optimized channel use: Channel pattern, Sequence: seqBioreactorpositions, Sequence counting: (1) Automatic, Liquid class: As in first aspiration of cycle, Volume [u]: io_arrfitPipettingVolumes[*intCurrentPosition], Mix volume [u]: *, Cycles: 0, Position relative to liquid surface: * mm, LLD settings: Off, Liquid following: Off 3 return value(s) .
32		End Loop - Reset sequence after loop: seqBioreactorpositions
33		_PipetteEthanolToCleanTips of FedBatchCultivationSubmethods _PipetteEthanolToCleanTips(ML_STAR, io_seqEthanol)
34		EjectNeedles of NeedleController blnReturnValue = NEEDLECONTROLLER::EjectNeedles(ML_STAR, "11111111")
35		Grouping
36		

Abbildung 11: Ausschnitt aus der Venus-Software zur Programmierung des Hamilton STARlet Pipettierroboters. In dem dargestellten Abschnitt erfolgt eine repetitive Abfolge von Aspirations- und Dispensierungsschritten aus einer Ursprungssequenz („seqSource“) in eine Zielsequenz („seqBioreactorpositions“). Anschließend werden die Nadeln mit Ethanol desinfiziert.

In diesem Beispiel ist eine Schleife von Pipettierungen abgebildet. Die Software strukturiert die Pipettierung in Schritte, in der Abbildung sind die Schritte 23 bis 36 (links in der Abbildung zu sehen) abgebildet. Die Tätigkeit des Roboters lässt sich bei diesem Beispiel von oben nach unten nachvollziehen. In Schritt 23 nimmt der Roboter Pipettenspitzen auf, anschließend beginnt eine Schleife (Schritt 25) bei der wiederholt aspiriert (Schritt 30) und dispensiert (Schritt 31) wird. Nach Abschluss der Schleife erfolgt eine Desinfektion der Pipettenspitzen mit Ethanol (Schritt 33) und der Abwurf der Pipettenspitzen (Schritt 34).

Die auswählbaren Schritte innerhalb der Venus-Software sind darauf ausgerichtet, typische Laborarbeit abzubilden. Komplexe, nichtlineare und von externen Datenquellen abhängige Robotertätigkeiten lassen sich nur sehr schwer oder gar nicht programmieren. Externe Datenquellen können dabei Datenbanken oder komplexe Geräte sein. In dieser Arbeit wurde eine prioritätsbasierte Ablaufsteuerung verwendet, die komplexe Echtzeitpriorisierung von

Robotertätigkeiten (pH-Regelung, Substratzulauf und Probenahme und –verarbeitung) ermöglichen. Diese ist daher innerhalb dieser Software nur schwer umsetzbar.

Naturgemäß ist die Software des Pipettierroboters darauf ausgerichtet, andere Geräte zu steuern, aber nicht darauf, selber gesteuert zu werden. Dies ergibt sich daraus, dass der Pipettierroboter in den meisten Laboren das komplexeste Gerät ist, welches den Großteil der Automatisierung durchführt und dadurch andere Geräte aufeinander abstimmt. Beispielsweise ist es naheliegend, dass ein Mikrotiterplattenleser, der von dem Roboter mit Mikrotiterplatten beladen wird, auch von diesem gesteuert wird, da etwa die Messung der Mikrotiterplatte erst durchgeführt werden kann, wenn die zu messenden Flüssigkeiten in die Mikrotiterplatte pipettiert wurden.

Das bedeutet konkret, dass die Venus-Software viele Funktionalitäten aufweist, um andere Geräte zu steuern. Dies beinhaltet also eine reichhaltige Softwarebibliothek für Drittgeräte und verschiedene Möglichkeiten, auf serielle Schnittstellen zuzugreifen. Umgekehrt besteht keine Funktionalität innerhalb der Venus-Software, mit der der Roboter umfassend gesteuert werden kann.

Die Venus-Software des Hamilton Pipettierroboters ist in einer proprietären Programmiersprache namens „Hamilton Standard Language“ (HSL) geschrieben. Diese Sprache ist eine Eigenentwicklung von Hamilton, ist aber an C beziehungsweise C# angelehnt. Das führt dazu, dass HSL die Ausführung von Code unterstützt, der als „Component Object Model“ (COM) Interop registriert wurde. COM Interop ist eine Technologie von Microsoft aus der .NET Framework „Common Language Runtime“ (CLR). Diese Technologie ermöglicht die Ausführung von COM-registriertem Code in anderen Programmiersprachen als der, in der der Code geschrieben wurde. Die Einbindung von C# Software für die Steuerung komplexer Routinen ist auch die Standardvorgehensweise des Herstellers vom Pipettierroboter (persönliche Kommunikation Konrad Stadtmüller, Team Leader Software, Hamilton Germany GmbH). Das bedeutet konkret, dass C# Software geschrieben werden kann, die als COM Interop registriert wird und anschließend von der Venus-Software des Pipettierroboters als normale Softwarebibliothek ausgeführt werden kann.

Die Möglichkeit, C# Code in der Venus Software ausführen zu können, führt dazu, dass mit einer modernen Programmiersprache und deren Paketen gearbeitet werden konnte. Ab diesem Punkt bestanden zwei Möglichkeiten: Entweder kann die Ablaufsteuerung in C# geschrieben werden, welche direkt über COM Interop in den Roboter eingebunden wird. Oder die Einbindung von C# Code wird nur genutzt, um eine Schnittstelle zu generieren, über die die Aufgaben des Pipettierroboters von der Ablaufsteuerung in die Venus Software geschleust werden kann.

Die erste Option hätte weniger Kommunikationsschnittstellen beinhaltet, aber dafür verschiedene andere Nachteile erzeugt. So hätte die Ablaufsteuerung zwangsläufig in C# oder einer anderen, COM Interop unterstützenden Sprache geschrieben werden müssen (beispielsweise Visual Basic). C# ist im wissenschaftlichen Kontext nicht besonders verbreitet und auch nicht gut geeignet, um schnell Software zu entwickeln: So beinhaltet C# starke, explizite Variablentypisierungen und obligatorische Objektorientierung. Außerdem wäre die Ablaufsteuerung zwangsläufig spezifisch für das verwendete Fabrikat des Pipettierroboters geworden. Daher wurde entschieden, COM Interop nur für die Schnittstelle des Roboters zur Laborumgebung zu nutzen.

Für die konkrete Gestaltung der Schnittstelle muss zuerst auf die typischerweise anfallenden Aufgaben während paralleler Kultivierungen im Bioreaktorblock eingegangen werden. Die Reaktoren des BioREACTOR 48 sind miniaturisierte Rührkesselreaktoren. Das heißt, dass typischerweise alle Aufgaben durchgeführt werden müssen, die auch bei Rührkesselreaktoren im L-Maßstab durchgeführt werden. Das umfasst unter anderem die Zugabe von Substraten oder Induktoren (insbesondere in Zulaufprozessen), die Zugabe von pH-Stellmitteln und die Probenahme und Probeverarbeitung für Analysen. Die Substratzugabe, die pH-Stellmittelzugabe wird im L-Maßstab durch Pumpen durchgeführt, die Probenahme erfolgt typischerweise manuell durch Labormitarbeiter. Diese drei Aufgaben werden im BioREACTOR48 durch den Pipettierroboter durchgeführt. Im Unterschied zum L-Maßstab, bei der Pumpen eine quasi-kontinuierliche Flüssigkeitszufuhr ermöglichen, erfolgt die Dosierung von Flüssigkeiten beim Pipettierroboter durch wiederholtes Aspirieren und Dispensieren von Flüssigkeiten, also zu diskreten Zeitpunkten.

Ein Pipettierroboter hat nur eine begrenzte Anzahl Dosierstrecken (meistens 8), die drei Aufgaben (Substratzugabe, pH-Regelung und Probenahme) parallel ausführen sollen. Von diesen drei Aufgaben müssten jedoch mindestens die pH-Regelung und die Substratzugabe eigentlich kontinuierlich ausgeführt werden.

Dadurch müssen die Aufgaben zwangsläufig intermittierend ausgeführt werden. Das heißt, dass beispielsweise zuerst die Substratzugabe für alle (relevanten) Reaktoren erfolgt, dann die pH-Regelung und dann wieder die Substratzugabe.

Darauf basierend wurde die Information definiert, die der Pipettierroboter zur Ausführung dieser Aufgabe benötigt. Dies umfasst:

- a) Den Aufgabennamen, beispielsweise „pHControlBaseAmmonium“. Dies ist eine Zeichenkette, welche die auszuführende Methode innerhalb des Pipettierroboters eindeutig identifizieren muss.

- b) Die Zielpositionen. Das ist eine Liste von Zeichenketten, die innerhalb der Venus-Software zu einer Sequenz umgewandelt wird. Meistens handelt sich dabei um eine Teilmenge der Reaktoren des bioREACTOR48.
- c) Die Ursprungspositionen. Das ist ebenfalls eine Liste von Zeichenketten, die innerhalb der Venus-Software zu einer Sequenz umgewandelt wird. Das kann z.B. ein wechselnder Bereich eines großen, unterteilten Vorlagegefäßes sein, bei dem während der Laufzeit aus verschiedenen Positionen aspiriert werden soll.
- d) Die Volumina. Das ist eine Liste von Fließkommazahlen, die innerhalb der Venus-Software zu einem Array umgewandelt wird.

Diese Information ist bewusst nicht vollständig: Für eine vollständige Parametrisierung beispielsweise einer Stellmittelzugabe wären erheblich mehr Informationen nötig (Flüssigkeitsklassen des Pipettierroboters, Aspirier- und Dispensierhöhen, Fehlerbehandlung...). Da sich diese Konfigurationen einer Aufgabe jedoch normalerweise nicht innerhalb einer Kultivierung ändern, werden alle Informationen, die nicht in a-d enthalten sind, innerhalb der Venus-Software spezifisch für die Aufgabe hinterlegt.

Des Weiteren benötigen nicht alle Roboteraufgaben alle Informationen, die übermittelt werden. Zwingend erforderlich ist nur der Aufgabename. Ob und wie die Zielpositionen, die Ursprungspositionen oder die Volumina verwendet werden, hängt von der konkreten Roboteraufgabe ab.

Beispielsweise benötigt eine pH-Regelung mittels Ammoniakwasser als Stellmittel die Zielpositionen. Diese werden als Menge der Reaktoren des BioREACTOR48 interpretiert. Außerdem werden die Volumina genutzt, da diese die Menge des zu dosierenden Ammoniakwasser darstellen. Die Ursprungspositionen werden jedoch nicht verwendet, da das Ammoniakwasser von einem festen Vorlagebehälter aspiriert wird, der sich innerhalb eines Prozesses nicht ändert.

Mit diesem Wissen kann nun weiter auf die gestaltete Schnittstelle eingegangen werden. Die Kommunikation wurde mittels des Kommunikationsprotokolls gRPC („g Remote Procedure Call“, das „g“ steht je nach Version für etwas Anderes, bei der Version 1.44 für „great“) gestaltet. gRPC ist ein quelloffenes Protokoll für den Aufruf von Funktionen auf verteilten Computersystemen über http/2. http/2 ist ein modernes Netzwerkprotokoll, das überwiegend für das Laden von Informationen aus dem Internet in einen Webbrowser verwendet wird, allerdings nicht darauf limitiert ist. Eines der Kernelemente von gRPC ist die Nutzung der Schnittstellenbeschreibungssprache protobuf. Aus der Schnittstellenbeschreibung können dann die Coderümpfe für den Server und Client automatisch erzeugt werden, die dann durch den Entwickler nur noch mit der Information über die zu übermittelnde Information ausgestattet werden muss. Es existieren Kompilierer für eine Vielzahl von Programmiersprachen (unter

Anderem (C#, C++, Python, Java, Ruby, Go). Dadurch wird gRPC programmiersprachenagnostisch: Durch den Bezug auf die abstrakte Schnittstellendefinition und den automatisch erzeugten Coderumpf können alle Server/Client Paare miteinander kommunizieren, welche die gleiche Schnittstellendefinition teilen. Außerdem unterstützt gRPC Authentifizierung und Verschlüsselung, sowie die kontinuierliche Übertragung von Daten („streaming“) sowie die automatische Überprüfung der Verfügbarkeit eines Kommunikationskanals.

Daher wurde die in Abbildung 12 dargestellte Struktur der Kommunikation zwischen der Ablaufsteuerung und dem Pipettierroboter gestaltet.

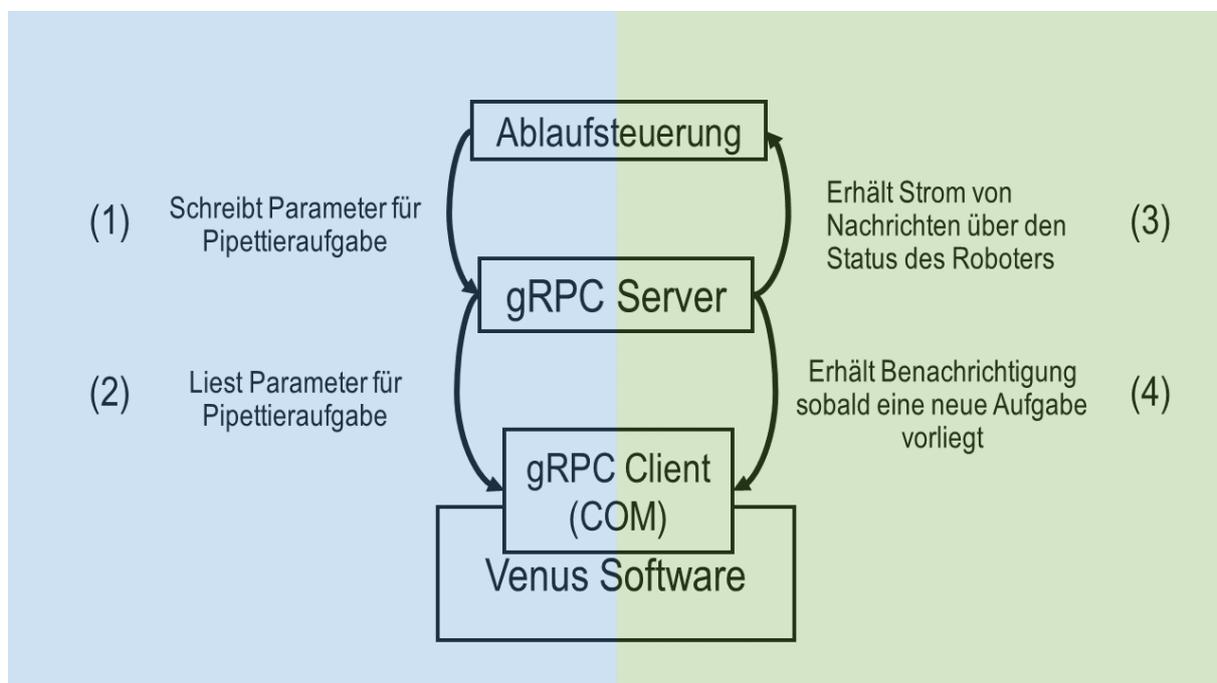


Abbildung 12: Überblick über die Gestaltung der Einbindung der Venus Software. Die Kommunikation lässt sich in insgesamt 4 Schritte unterteilen. In der linken Hälfte der Abbildung (hellblau dargestellt) sind die beiden Schritte für die Parametrisierung der Pipettieraufgaben. Im Schritt (1) werden die Parameter für die Pipettieraufgabe von der Ablaufsteuerung auf den gRPC Server geschrieben. Im Schritt (2) werden die Parameter der Pipettieraufgabe vom gRPC Client der Venus Software gelesen und so der Venus Software verfügbar gemacht. Damit die Ablaufsteuerung weiß, wann der Roboter bereit ist, neue Aufgaben auszuführen, wurden die Kommunikationsschritte (3) und (4) rechts in der Darstellung hinzugefügt. Während des gesamten Prozesses erhält die Ablaufsteuerung einen kontinuierlichen Strom an Nachrichten über die Verfügbarkeit des Pipettierroboters, dies ist im Bild mit (3) beschriftet. Wenn auf dem gRPC Server keine Pipettieraufgabe hinterlegt war, klinkt sich der gRPC Client der Venus Software beim gRPC Server ein und wartet auf eine Benachrichtigung, dass eine neue Pipettieraufgabe vorliegt, im Bild mit (4) dargestellt.

Innerhalb der Kommunikation gibt es insgesamt drei Akteure: Die Ablaufsteuerung, den gRPC Server und den in die Venus Software eingebetteten gRPC Client. Die Ablaufsteuerung agiert ebenfalls als gRPC Client. Der gRPC Server agiert als reine Plattform für die Informationsweitergabe. Das bedeutet, dass der Server zu jedem Zeitpunkt nur eine

Pipettieraufgabe mit ihren Parametern speichert. Der Server enthält allerdings den Großteil der Logik, um eine ereignisgesteuerte Abfertigung der Aufgaben zu ermöglichen.

Die ereignisgesteuerte Abfertigung der Aufgaben soll nun erklärt werden. Zu Prozessbeginn eröffnet die Ablaufsteuerung einen Kommunikationskanal zum gRPC-Server, um einen kontinuierlichen Strom an Informationen über die Verfügbarkeit des Roboters zu erhalten (3). Sobald der gRPC Server vom Roboter erfährt, dass dieser gerade keine Aufgabe zu bearbeiten hat, wird über diesen Kanal eine Nachricht geschickt, welche die Verfügbarkeit des Roboters weiterleitet.

Der gRPC Server selber erfährt von der Verfügbarkeit des Roboters auf folgende Weise. Wenn der Roboter gestartet wird, hat er genau zwei Funktionen mit denen er mit dem gRPC Server interagiert. Diese werden auch immer in der gleichen Reihenfolge ausgeführt. Zuerst erfolgt eine Abfrage über die aktuelle Aufgabe und deren Parameter (2). Wenn keine Pipettieraufgabe auf dem gRPC Server vorlag, wird der Roboter sich direkt anschließend mit dem gRPC Server verbinden, um eine Nachricht zu erhalten, wenn eine neue Aufgabe vorliegt (4). Dieser Kommunikationskanal bleibt so lange offen, bis der gRPC Server von der Ablaufsteuerung eine neue Aufgabe erhält oder der Roboter gestoppt wird.

Das heißt, innerhalb eines Bioprozesses wird der Roboter eine Aufgabe ausführen und nach Abschluss der Aufgabe beim gRPC Server die neue Pipettieraufgabe abrufen. Zu diesem Zeitpunkt liegt allerdings keine Pipettieraufgabe vor. Deshalb wird der Roboter sich dann beim gRPC Server einloggen, um Bescheid zu erhalten, wenn eine neue Pipettieraufgabe auf dem gRPC Server vorliegt. Gleichzeitig erhält die Ablaufsteuerung die Meldung, dass der Roboter verfügbar ist und schickt, falls nötig, eine neue Pipettieraufgabe an den gRPC Server. Dadurch wiederum erhält der Roboter die Meldung, dass eine neue Aufgabe auf dem gRPC Server vorliegt, welche dann vom Roboter abgerufen und bearbeitet wird.

Innerhalb der gesamten Informationskette existieren keine periodischen Abfragen, jede Information wird ereignisgesteuert verarbeitet. Dadurch ist die Kommunikation sehr schnell: Die gesamte Übertragung der Information von dem Zeitpunkt, ab dem der Roboter mit einer Pipettieraufgabe fertig wird, bis er mit einer neuen Aufgabe beginnt, dauert etwa 33 ms mit einer Standardabweichung von 13 ms. Damit wird die Geschwindigkeit der Informationsübertragung vernachlässigbar gegenüber der Arbeitsgeschwindigkeit des Pipettierroboters.

Methodenbibliothek

Wie oben bereits erwähnt, sind mehr Informationen als die parametrisierten Pipettieraufgaben nötig, um die Pipettieraufgaben durchführen zu können. Das umfasst z.B. im einfachsten Fall die Flüssigkeitsklasse des Pipettiervorgangs, aber auch die genauen Positionen beim

Aspirations- oder Dispensierschritt. Diese Informationen befinden sich innerhalb der Venus-Software in der Methodenbibliothek. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Grundausrüstung von Methoden innerhalb der Methodenbibliothek geschrieben. Diese Methoden unterscheiden sich zum Teil sehr stark von den Methoden, die standardmäßig für den Pipettierroboter geschrieben werden können, da diese Methoden anwendungsbedingt abstrakt sein müssen, das heißt sie müssen beliebige Kombinationen an Parametern, die sie erhalten können, verarbeiten. Außerdem sollten die Methoden gegen fehlerhafte Parametrisierung geschützt sein, da sonst die Gefahr bestünde, dass der Pipettierroboter sich selbst beschädigt.

Für den Substratzulauf wurden Methoden für die Zugabe von 100, 150 oder 300 g L⁻¹ Glukose geschrieben. Für die pH-Regelung wurden Methoden für die Zugabe von 1 M HCl-Lösung (Säurezugabe) oder 12,5 % Ammoniakwasser (Basenzugabe) geschrieben. Außerdem wurde eine Methode für die Induktion mit IPTG geschrieben. Die Probenahme mit 10 und 100-fach Verdünnung und anschließender Messung der optischen Dichte (bei 600 nm) und wahlweise einer Fluoreszenzmessung wurde ebenfalls hinzugefügt. All diese Methoden sind durch die Methodenbibliothek parametrisierbar und mit beliebigen Kombinationen von 1 bis 48 Reaktoren durchführbar. Es gibt zwei wahrscheinliche Fehlerquellen, die bei der Parametrisierung der Aufgaben erfolgen können. So kann beispielsweise ein zu hohes Volumen durch die Ablaufsteuerung vorgegeben werden. Da die verwendeten Kanäle bis zu 1000 µL aspirieren können, im Standardfall die Spitzen allerdings nur 300 µL aufnehmen können, bestünde bei Volumina > 300 µL pro Kanal die Gefahr, dass die Flüssigkeit ins Kanalinnere gelangt und diese beschädigt. Außerdem sind insbesondere bestimmte Methoden bei der Probenahme darauf ausgelegt, dass die Reihenfolge der Methoden beachtet wird, da sonst beispielsweise eine Mikrotiterplatte gefüllt werden soll, die aktuell gar nicht an dem erwarteten Platz steht. Daher prüfen alle Methoden a) ob die durch die Pipettiernadel vorgegebenen Volumengrenzwerte eingehalten werden und b) ob gegebenenfalls die Reihenfolge der Submethoden korrekt berücksichtigt werden. Im Falle einer Zuwiderhandlung durch die Ablaufsteuerung erfolgt ein sofortiger Abbruch der Robotertätigkeit. Dieses harte Abbruchkriterium wurde gewählt, da dieser Zustand dringend die Verbesserung der Ablaufsteuerung nahelegte.

Im Folgenden wird die automatisierte Durchführung der einzelnen Methoden kurz beschrieben.

Zuerst wurde bei allen dosierenden Methoden geprüft, ob der durch die verwendeten Pipettenspitzen gegebene Volumengrenzwert von 300 µL für alle aktiven Positionen eingehalten wurde. Außerdem wurde geprüft, ob die aktiven Positionen in der Objektdefinition des Bioreaktorblocks existieren. Falls diese Bedingungen bei irgendeiner Methodenausführung nicht gegeben waren, wurde der Roboter sofort gestoppt.

Bei der Dosierung von Substrat ($100 - 300 \text{ g L}^{-1}$ Glukose) wurden danach gewaschene und desinfizierte Pipettieradeln aus der Nadelwaschstation auf alle acht Pipettierkanäle aufgenommen. Dann erfolgte die Aspiration von Substratlösung für jeweils eine Reaktorposition pro Pipettierkanal aus dem Vorlagebehälter auf dem Roboterdeck. Danach erfolgt die Dispensierung der Substratlösung in die gewünschten Reaktorpositionen. Die Dispensierhöhe war fest auf einer Höhe von 52 mm oberhalb des Reaktorbodens eingestellt. Diese Höhe stellte sicher, dass die Pipettieradel unterhalb des Dosierkanals des Bioreaktorblocks steht, um ein Anhaften des Dosiertropfens innerhalb des Dosierkanals zu vermeiden. Trotzdem steht die Pipettieradel so hoch, dass auch bei hohen Füllständen im Reaktor die Berührung der Flüssigkeitsoberfläche ausgeschlossen ist. Dies vermeidet Kreuzkontaminationen bei der Verwendung des gleichen Nadelsets in verschiedenen Reaktoren. Diese Dispensierhöhe wird im Folgenden als Standarddosierhöhe des Bioreaktorblocks bezeichnet. Die Prozedur aus Aspiration und Dispensierung der Substratlösung wird solange wiederholt, bis alle aktiven Positionen mit dem eingestellten Volumen versorgt waren. Danach werden die Nadeln mit einer Eintauchtiefe von 20 mm in 70 % (v/v) Ethanol von innen und außen durch langsame Aspiration von 300 μL desinfiziert. Anschließend werden die Nadeln in die Nadelwaschstation abgesetzt und die Waschprozedur mit sterilfiltriertem, vollentsalztem Wasser gestartet.

Bei der pH-Regelung mittels Ammoniakwasser wird auch das maximale Volumen der verwendete Pipettieradeln geprüft. Da hier allerdings im Aliquot dispensiert wurde, betrug das maximale Dispensiervolumen pro Reaktorposition 45 μL . Auch hier wird zuerst ein Satz von acht Pipettieradeln aus der Nadelwaschstation aufgenommen. Bei der Aspiration des Ammoniakwassers wird nun allerdings in einem einzigen Schritt das gesamte benötigte Volumen aspiriert. Da der Bioreaktorblock aus insgesamt 48 (sechs Spalten und acht Zeilen) Reaktorpositionen besteht, werden bis zu sechs Reaktoren mit einer Pipettieradel versorgt. Zusätzlich zu der für die Bioreaktorpositionen erforderlichen Ammoniaklösung werden noch pro Pipettenspitze jeweils 10 μL für einen Dosierstoß vor und nach den Reaktorpositionen aufgenommen. Nach der Aspiration werden die ersten 10 μL direkt im Flüssigkeitsstrahl in das Vorlagegefäß zurückgegeben. Dies erhöht die Genauigkeit der folgenden Dosierstöße. Danach werden die aktiven Volumina durch wiederholte Dosierstöße auf der Standarddosierhöhe des Bioreaktorblocks verteilt. Am Schluss wird das verbliebene Volumen von 10 μL pro Kanal wieder zurück in das Vorlagegefäß dosiert. Danach werden die Nadeln wie oben beschrieben mit Ethanol desinfiziert und in der Nadelwaschstation gereinigt.

Die pH-Regelung durch Zugabe von 1 M HCl erfolgte grundsätzlich genauso wie die Zugabe von Ammoniakwasser. Die Pipettierung erfolgte ebenfalls im Aliquot mit einem Dispensierstoß von 10 μL vor der ersten Dispensierung und 10 μL Restvolumen in den Pipettieradeln. Die Dämpfe der verwendeten Salzsäure bergen das Risiko, die Metallteile des Pipettierroboters

bei dauerhafter Exposition durch Korrosion zu schädigen. Daher wurde die Salzsäure in speziellen Reaktionsgefäßen („FlipTubes“, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), welche durch den Pipettierroboter automatisch geöffnet und geschlossen werden, gelagert. Dafür wurden vor der Aufnahme der Pipettiernadeln durch den Pipettierroboter spezielle Werkzeuge zur Öffnung der Reaktionsgefäße aufgenommen („FlipTube Tools“), mit denen die Deckel von bis zu vier Reaktionsgefäßen über einen Hebelmechanismus aufgedrückt werden. Danach nimmt der Pipettierroboter die Pipettiernadeln aus der Nadelwaschstation auf und schiebt die teilweise geöffneten Deckel der Reaktionsgefäße durch eine Seitwärtsbewegung mit den Pipettenspitzen vollständig auf. Anschließend erfolgte die Pipettierung genau wie bei der Zugabe von Ammoniakwasser. Nach erfolgter Pipettierung nahm der Pipettierroboter die Werkzeuge für die Reaktionsgefäße wieder auf, um diese wieder zu schließen.

Die Zugabe von IPTG erfolgte grundsätzlich fast identisch zur Dosierung des Zulaufs durch wiederholte Aspiration aus einem Vorlagebehälter und Dispensierung in die Positionen des Bioreaktorblocks. Da es sich bei der Induktionslösung oft um Flüssigkeit handelte, die nur in geringen Mengen zugegeben werden sollten, erfolgte die Aspiration auch hier aus speziellen, durch den Pipettierroboter zu öffnenden, 1,5 mL Reaktionsgefäßen („FlipTubes“, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), wie bei der pH-Regelung mit Säure. Danach erfolgte die Aspiration und Dispensierung analog zur Dosierung des Zulaufs. Nach Abschluss der Pipettierungen wurden die Reaktionsgefäße vom Pipettierroboter wieder geschlossen.

Die Probenahme erfolgte in zwei Varianten. Entweder wurde nur eine Absorptionsmessung bei 600 nm durchgeführt, oder es wurde eine Absorptionsmessung und eine Fluoreszenzmessung (Anregung 560 nm, Emission 620 nm) durchgeführt. Da die Probenahme viele verschiedene Schritte umfasste, wurde diese in vier (Probenahme ohne Fluoreszenzmessung) oder fünf (Probenahme mit Fluoreszenzmessung) Sub-Schritte unterteilt, welche nicht zwangsläufig unterbrechungsfrei aufeinander folgen müssen. Das bedeutet, dass die Ablaufsteuerung nach jedem Abschnitt der Probenahme beliebige andere Pipettieraufgaben ausführen kann, die aktuell höher priorisiert sind als die Probenahme. Auch bei dieser Methode wird geprüft, ob die von der Ablaufsteuerung erhaltene Konfiguration für den Roboter schadensfrei ausführbar ist. Die Ablaufsteuerung verwendet für die Probenahme zwei Kommandos, eines für den Probenahmestart und eines für die Fortsetzung der Probenahme. Das bedeutet, dass eine vollständige Probenahme aus einem Kommando für den Probenahmestart und drei (bzw. vier bei der Fluoreszenzmessung) Kommandos für die Fortsetzung der Probenahme bestehen. Der Roboter prüft beim Erhalten eines Kommandos zum Probenahmestart, ob aktuell keine Probenahme läuft. Bei der Fortsetzung der Probenahme wird umgekehrt geprüft, ob aktuell eine Probenahme läuft und nur bei Zutreffen fortgefahren.

Beim Bioreaktorblock sind die einzelnen Reaktoren in Spalten und Zeilen positioniert. Es sind jeweils 8 Reaktoren in einer Spalte, und insgesamt 6 Reaktoren in jeder Zeile. Standardmäßig werden die Reaktoren spaltenweise gezählt, das bedeutet beispielsweise, dass die ersten 8 Reaktoren genau die erste Spalte umfassen würde.

Grundsätzlich erfolgen die Pipettierungen bei der Probenahme nach einer anderen Logik als bei allen anderen Pipettierungen: Standardmäßig erfolgen die Pipettierungen unter Einbezug aller Pipettierkanäle aber ggfs. über mehrere Reaktorspalten, das heißt, wenn alle Reaktoren bis auf den Reaktor an Position sechs bearbeitet werden sollen, würde der Roboter erst mit den ersten sieben Pipettierkanälen die ersten sieben Reaktoren in der ersten Spalte bearbeiten und anschließend zur Seite fahren (alle Kanäle teilen sich eine X-Achse), um mit dem achten Pipettierkanal die Reaktorposition neun, welche sich in der nächsten Spalte befindet, zu bearbeiten. Dieses Muster, dass der X-Arm jeweils für die folgende Reaktorspalte erneut seitlich bewegt wird, wiederholt sich dann für den gesamten Bioreaktorblock. Diese Seitwärtsbewegung in Kombination mit erneuter Aspiration oder Dispensierung führt etwa zu einer Verdopplung der Zeit, die der Roboter für die Tätigkeit benötigt. Das bedeutet, dass diese Art der Arbeitsweise sehr ineffizient ist, wenn einzelne Reaktorpositionen nicht bearbeitet werden sollen. Umgekehrt ist die Arbeitsweise allerdings effizient, wenn nur wenige Reaktorpositionen innerhalb einer Spalte bearbeitet werden sollen. Da allerdings bei der Probenahme regelmäßig damit gerechnet werden muss, dass einzelne Reaktoren nicht bearbeitet werden sollen (beispielsweise aufgrund von einem stillstehenden Rührorgan oder defektem pH-Messfarbstoff), würde diese Arbeitsweise den Roboter stark verlangsamen. Daher erfolgt hier die Pipettierung in vollständigen Spalten und gegebenenfalls unter Auslassung von einzelnen Pipettierkanälen. Bei dem obigen Beispiel würde also die erste Spalte des Bioreaktorblocks unter Auslassung von Kanal sechs bearbeitet und danach würde mit einem vollständigen Nadelsatz die zweite Spalte des Reaktorblocks bearbeitet, bis sich am Ende statt elf Seitwärts- und Aspirations-/Dispensierungsbewegungen nur sechs ergeben. Diese Pipettierung wurde für alle aufeinander folgenden Schritte der Probenahme durchgeführt, die im Folgenden erklärt werden.

Im ersten Schritt der Probenahme werden Pipettiernadeln aufgenommen und für alle aktiven Reaktorpositionen phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, $8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $1,44 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) innerhalb einer Mikrotiterplatte vorgelegt, sodass eine sequentielle 1:10 und 1:100 Verdünnung der Proben angefertigt werden kann. Die Salzlösung wird im Flüssigkeitsstrahl dispensiert. Dann werden die Pipettiernadeln desinfiziert und in die Nadelwaschstation für die Waschung zurückgegeben.

Im zweiten Schritt werden Proben aus dem Bioreaktorblock entnommen. Dafür wird zuerst ein Nadelsatz aus der Nadelwaschstation entnommen und auf einer Höhe von 27 mm oberhalb

des Reaktorbodens aus der ersten Reaktorspalte eine Probe entnommen. Diese Höhe markiert den niedrigsten Punkt, in den der Roboter einfahren kann ohne mit dem Nadeloberteil auf dem Reaktordeckel aufzusetzen. Auf dieser Höhe ist es möglich, Flüssigkeit aus den Reaktoren bis zu einem Minimalvolumen von etwa 7 mL zu entnehmen (bei gasinduzierenden Rührern). Da die Probe durch den Betrieb des Rührers als eine Mischung von Flüssigkeit und Gasblasen aspiriert wird, die nicht präzise zu dosieren ist, wird diese zuerst auf einer zweiten Mikrotiterplatte zum Ausgasen abgelegt. Danach werden die Pipettiernadeln mit Ethanol wie oben beschrieben desinfiziert und die Nadeln zum Waschen in der Nadelwaschstation abgelegt. Danach wird ein weiterer Nadelsatz aufgenommen und es werden in identischer Weise die folgenden Spalten des Bioreaktorblocks bearbeitet.

Im dritten Schritt werden die Proben sequentiell verdünnt. Dafür wird ein Nadelsatz aus der Nadelwaschstation entnommen und es wird die erste Spalte der Proben aus der Mikrotiterplatte zum Ausgasen entnommen und in die erste Spalte der Mikrotiterplatte für die Verdünnung gegeben. Die Dispensierung erfolgt dabei in Kontakt mit der Flüssigkeitsoberfläche. Nach der Dispensierung wird die Verdünnung durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gemischt. Um das Dispensieren von Gasblasen oder die unverhältnismäßige Benetzung der Pipettiernadeln zu vermeiden, folgen die Pipettierkanäle beim Mischen der gemessenen Flüssigkeitsoberfläche mit einer Eintauchtiefe von 0,5 mm. Danach erfolgt der zweite Schritt der sequentiellen Verdünnung, bei dem der Pipettierroboter aus der eben gemischten Spalte der Mikrotiterplatte wiederum Flüssigkeit entnimmt und in die folgende Spalte für die 1:100 Verdünnung dispensiert. Auch hier erfolgt die Dispensierung in Kontakt mit der Flüssigkeitsoberfläche und es wird wie bei der ersten Verdünnungsstufe durch die Pipettierkanäle gemischt. Danach wird der benutzte Nadelsatz wie oben mit Ethanol desinfiziert und für die Waschung in die Nadelwaschstation gegeben.

Im vierten Schritt erfolgt die Waschung und photometrische Messung der Mikrotiterplatten. Dafür wird zuerst mithilfe des externen robotischen Greifers (iSWAP, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) die Mikrotiterplatte, die für das Ausgasen der Proben verwendet wurde, zum Mikrotiterplattenwaschgerät gebracht. Dort wird der Waschprozess gestartet. Dieser besteht aus einer initialen Aspiration der Probenlösung gefolgt von drei Dispensier- und Aspirationsschritten von 300 μ L vollentsalztem Wasser mit 0,1 % Tween (Tween 20, Amersco, Solon, USA). Während dieses Prozesses baut der Pipettierroboter die Kommunikation mit dem Mikrotiterplattenlesegerät auf. Danach wartet der Pipettierroboter auf den Abschluss der Waschprozedur und bringt die Mikrotiterplatte vom Mikrotiterplattenwaschgerät zu ihrer Ursprungsposition zurück. Nun wird die Mikrotiterplatte mit den Proben mit demselben Greifer zum Mikrotiterplattenlesegerät gebracht und dort die photometrische Messung bei 600 nm gestartet. Nach Abschluss der Messung startet der Roboter den Datenexport, bei dem a) die Daten im Tabellenformat auf die Festplatte des steuernden Computers gespeichert werden

und b) die Daten durch ein im Rahmen dieser Arbeit geschriebenes Python-Plugin für den Roboter in die Zeitreihendatenbank für die Prozessdaten gespeist werden. Falls eine Probenahme ohne Fluoreszenzmessung gewählt wurde, wird an dieser Stelle die Platte durch den robotischen Greifer zum Mikrotiterplattenwaschgerät transportiert und danach ebenso verfahren wie mit der anderen Mikrotiterplatte. Wenn die Probenahme mit Fluoreszenzmessung gewählt wurde, wird an dieser Stelle die Fluoreszenzmessung im Mikrotiterplattenlesegerät gestartet und der Abschnitt der Probenahme ist beendet.

Der fünfte und letzte Schritt der Probenahme existiert nur, wenn eine Fluoreszenzmessung durchgeführt wurde. Dann beginnt der Pipettierroboter damit, auf den Abschluss der Messung durch das Mikrotiterplattenlesegerät zu warten. Anschließend erfolgt in jedem Fall der Export der Daten ins Tabellenformat und in die Zeitreihendatenbank. Die Daten umfassen die eigentlichen Messwerte mit den zugehörigen Positionen in der Mikrotiterplatte, das verwendete Protokoll, der Protokolltyp, der Probenahmezeitpunkt sowie der Messzeitpunkt. Der Export der Daten in die Zeitreihendatenbank erfolgt durch ein Python-Plugin, welches von der Venus Software des Pipettierroboters ausgeführt wird. Danach wird die Mikrotiterplatte vom robotischen Greifer zum Mikrotiterplattenwaschgerät gebracht und dort ebenso gewaschen wie die andere Mikrotiterplatte.

5.3 Digitaler Zwilling eines Pipettierroboters

Wie bereits beschrieben, ist der Pipettierroboter für die Ablaufsteuerung ein reiner Befehlsempfänger, welcher die erhaltenen Aufgaben innerhalb einer gewissen Zeit bearbeitet. Gleichzeitig ist die Schnittstelle, über die der Pipettierroboter die Aufgaben erhält innerhalb einer Schnittstellendefinition definiert und damit programmiersprachenagnostisch.

Daher lag es nahe, eine Simulationsumgebung für den Pipettierroboter zu schaffen, welche die Pipettieraufgaben exakt identisch zum Pipettierroboter entgegennimmt. Diese Simulationsumgebung wird im Weiteren als digitaler Zwilling bezeichnet. Statt nun allerdings die Pipettieraufgabe in der Realität durchzuführen, prüft der digitale Zwilling des Pipettierroboters einerseits die erhaltene Pipettieraufgabe anhand des Konfigurationsskripts des Prozesses. Außerdem simuliert der digitale Zwilling die Arbeitszeit des Pipettierroboters anhand historischer Prozessdaten. Auf beide Aspekte soll im Folgenden separat eingegangen werden.

5.3.1 Prüfung der Ablaufsteuerung

Innerhalb des Konfigurationsskripts der Ablaufsteuerung ist die wesentliche Konfigurationsinformation vorhanden, nach denen ein Prozess durchgeführt werden soll. Das umfasst die Liste der sich wiederholenden Pipettieraufgaben, aber auch deren genaue Konfiguration. Standardmäßig umfasst die Liste die pH-Regelung (mit Säure oder Base), den

Substratzulauf, die Probenahme und die Zugabe des Induktors. Für jeden Typ Pipettieraufgabe werden andere Prüfungen ausgeführt. Grundsätzlich wird jede Prüfung zum Zeitpunkt der Entgegennahme der Pipettieraufgabe durchgeführt.

Für den Substratzulauf wird für jede der maximal 48 Reaktorpositionen die Einhaltung der Volumengrenzwerte für einmalige Dosierung überprüft. Außerdem wird die Einhaltung der Dosierfunktion für jede der maximal 48 Reaktorpositionen geprüft. Darüber hinaus wird geprüft, ob das maximale kumulative Substratvolumen pro Reaktor eingehalten wurde. Daneben wird die Einhaltung der eingestellten Dosierfrequenz geprüft.

Bei der pH-Regelung wird ebenfalls für jede der maximal 48 Reaktorpositionen die Einhaltung der Volumengrenzwerte für einmalige Dosierung überprüft. Auch hier wird die Einhaltung der Dosierfrequenz für pH-Stellmittel geprüft. Darüber hinaus wird allerdings auch die Plausibilität der pH-Korrektur geprüft: Das heißt, es wird reaktorspezifisch die simulierte pH-Messung mit der Richtung der Korrektur und dem Sollwert verglichen, um zu klären, ob die Korrektur in die richtige Richtung wirkt. Dies ist möglich, da in der Ablaufsteuerung ein einfacher Proportionalregler hinterlegt ist. Auch wird hier geprüft, ob das maximale kumulative Substratvolumen pro Reaktor eingehalten wurde.

In den durchgeführten Prozessen wurden die Probenahmezeitpunkte zu festen Zeitpunkten definiert (beispielsweise nach 2, 3 und 5 Stunden Prozesszeit). Die Einhaltung der Probenahmezeitpunkte wird als unterer Grenzwert geprüft. Das heißt eine Probenahme, die nach 3 Stunden fällig war, durfte jedenfalls nicht davor und nur wenig danach gestartet werden. Durch die Abhängigkeit von der dynamischen Priorisierung und der Auslastung des Roboters ist dieses Kriterium allerdings nicht in allen Fällen valide. Außerdem wird die korrekte Reihenfolge der einzelnen Subschritte (Vorlage des Puffers, Probenahme, Verdünnung, Messung) geprüft.

Bei der Pipettieraufgabe der Induktorzugabe wird der korrekte Zeitpunkt der Ausführung geprüft. Außerdem wird reaktorspezifisch geprüft, ob das richtige Volumen des Induktors zugegeben wurde.

Darüber hinaus werden die Leerlaufzeiten des digitalen Zwillings protokolliert und am Ende des simulierten Prozesses exportiert.

5.3.2 Simulation der Pipettierarbeit des Pipettierroboters

Der Pipettierroboter parametrisiert die innerhalb der Venus-Software vorliegende Methodenbibliothek, um anstehende Pipettieraufgaben innerhalb eines Prozesses ausführen zu lassen. Die Dauer, die für die Bearbeitung der Pipettieraufgabe benötigt wird, hängt von der Sequenz der Bewegungen ab, die der Pipettierroboter ausführen muss. Da eine vollständige

Simulation der Bewegungen des Roboters den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, wurde eine vereinfachte Abhängigkeit gesucht.

Dabei wurden zwei Merkmale genauer betrachtet: Zuerst die adressierte Methode aus der Methodenbibliothek der Venus-Software. Es liegt nahe, dass beispielsweise die Dosierung von Substrat in die Reaktorpositionen eine andere Zeit benötigt als die Probenahme und Messung im Photometer. Außerdem könnte die Anzahl der Positionen, auf die die Methode angewandt wird, bestimmen, wie lang die Arbeitsdauer des Roboters ist.

Daher wurde folgende Architektur gewählt: Der entgegen genommene Name der Pipettieraufgabe ist mit einer Funktion verknüpft, die eine Arbeitsdauer basierend auf der Anzahl der aktiven Positionen berechnet. Innerhalb des digitalen Zwillings können beliebig viele Pipettieraufgabennamen mit Funktionen verknüpft werden. Wenn für die Pipettieraufgabe allerdings keine Funktion hinterlegt ist, greift der digitale Zwilling für die Berechnung dieser Arbeitsdauer einfach auf eine Standardfunktion zurück.

Die Funktion der Arbeitsdauer ist völlig flexibel: Alles, was sich innerhalb von Python ausdrücken lässt, kann als Funktion genutzt werden. Im Folgenden soll die Erzeugung dieser Funktionen anhand von zwei Beispielen erklärt werden.

Eine der Pipettieraufgaben, welche am meisten Zeit innerhalb einer Kultivierung erfordert, ist der Substratzulauf. Eine Möglichkeit dazu, die in dieser Arbeit viel verwendet wurde, ist die Zugabe von 300 g L^{-1} Glucose mit $7,5 \text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 . In Abbildung 13 ist die Abhängigkeit der Ausführungsdauer der Methode „Feed300gLGlucoese“ von der Anzahl der aktiven Bioreaktorpositionen dargestellt.

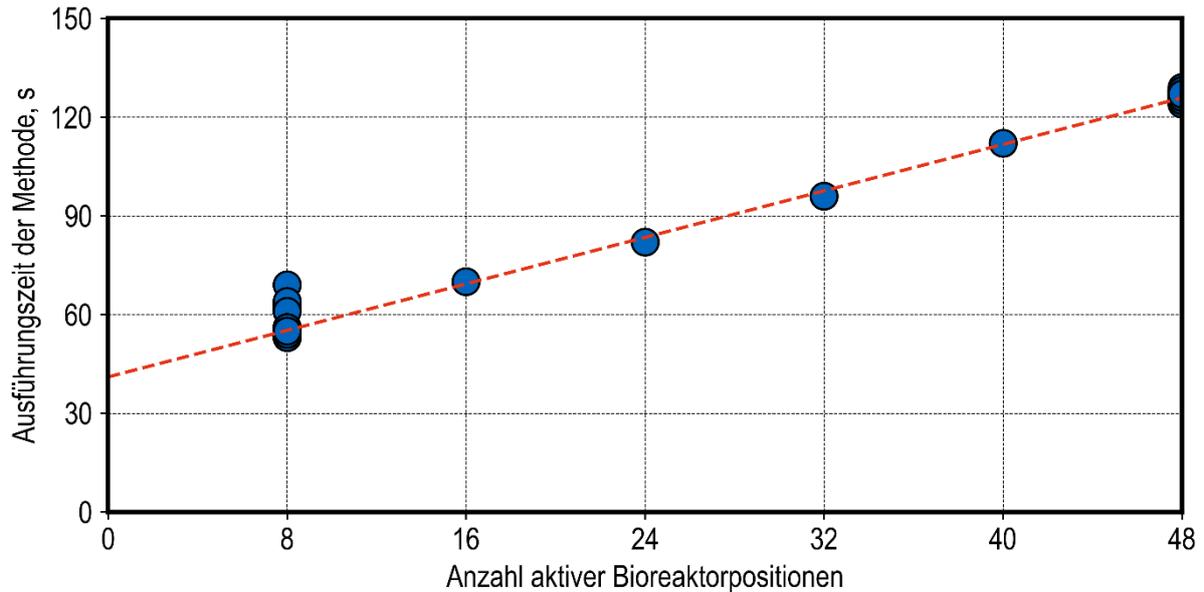


Abbildung 13: Arbeitsdauer des Pipettierroboters bei der Methode „Feed300gLGlucose“ in Abhängigkeit von den aktiven Bioreaktorpositionen. Es wurden nur jeweils benachbarte Positionen betrachtet. Die gestrichelte Linie ist eine lineare Interpolation der Messdaten. Die blauen Punkte sind Arbeitsdauern basierend auf historischen Prozessdaten.

Die Methode „Feed300gLGlucose“ dient dazu, Substratlösung mit 300 g L^{-1} Glucose und $7,5 \text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 in die Reaktoren zu dosieren. Mithilfe der Dosierfrequenz und den zu dosierten Volumen können verschiedene Zulaufraten eingestellt werden. Es können zwar beliebige Positionen innerhalb des Bioreaktorblocks adressiert werden, dies ist jedoch nicht sinnvoll und bildet nicht die erfolgte Arbeitsweise ab. Durch die räumliche Gruppierung von verschiedenen eingestellten Zulaufraten kann Roboterarbeitszeit gespart werden. Daher sind in der Abbildung nur Daten gezeigt, bei denen die jeweilige Anzahl der Reaktoren benachbart lag.

Es ist ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen Arbeitszeit des Pipettierroboters und der Anzahl der Reaktoren sichtbar. Daher wurde die Interpolation für die Funktion (rot gestrichelt dargestellt) gewählt als:

$$t = 1,78 \cdot n + 41,02 \quad (1)$$

Die Variable n bezeichnet die Anzahl aktive Positionen, t ist die Roboterarbeitszeit in Sekunden.

Der lineare Zusammenhang scheint die Messdaten sinnvoll abzubilden. Wenn man den Inhalt der betrachteten Methode näher betrachtet, ist das durchaus nachvollziehbar. Die Methode beginnt mit dem Aufnehmen der Pipettierspitzen und endet mit dem desinfizieren der Pipettierspitzen und dem Abwurf der Spitzen in die Nadelwaschstation. Dazwischen wird wiederholt vom Vorlagebehälter aspiriert und dann in jeweils 8 aktive Positionen innerhalb des Bioreaktorblocks dispensiert. Dieser Schritt wird bis zu sechs Mal wiederholt, je nachdem wie viele Positionen aktiv sind. Die Streuung bei 8 beziehungsweise 48 Reaktoren liegt

wahrscheinlich daran, dass a) nicht alle Daten mit der gleichen Konfiguration auf der Arbeitsfläche des Roboters erhoben wurden und b) der Vorgang der Flüssigkeitsoberflächensuche durch den Roboter unterschiedlich lang dauert, je nachdem wie viel Flüssigkeit im Vorlagebehälter vorhanden ist.

Dieser lineare Zusammenhang ist jedoch nicht automatisch richtig. Dies soll am Beispiel der pH-Regelung mittels 12.5 % Ammoniakwasser erläutert werden. In Abbildung 14 ist die Roboterarbeitszeit in Abhängigkeit von den aktiven Positionen bei der Methode „pHControlBaseAmmonium“ dargestellt.

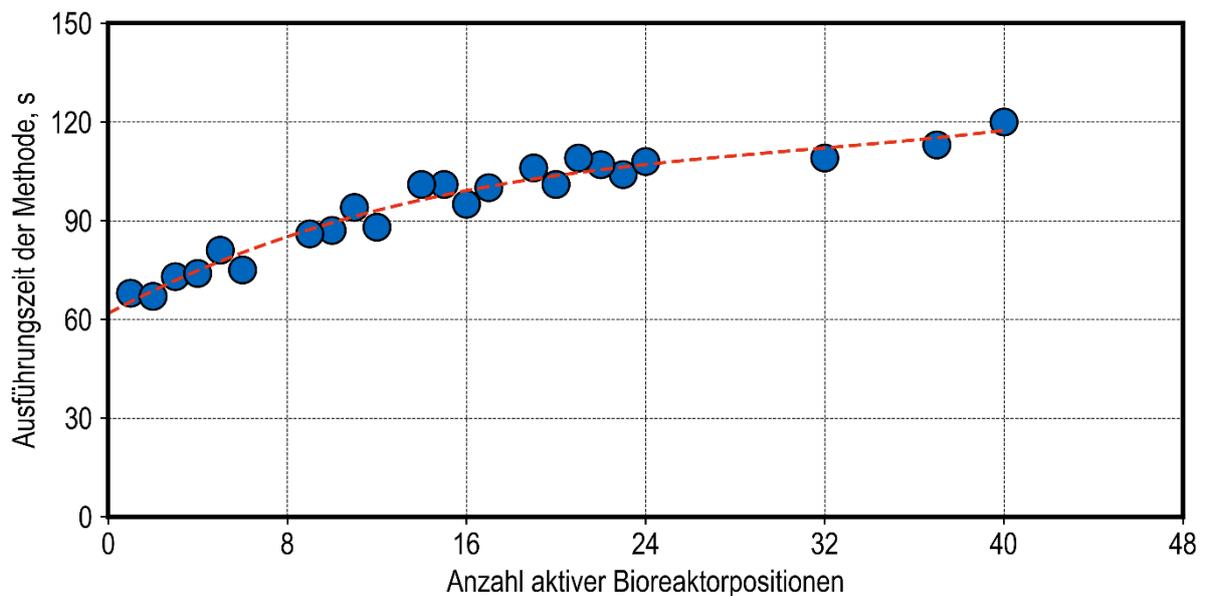


Abbildung 14: Arbeitsdauer des Pipettierroboters bei der Methode „pHControlBaseAmmonium“ in Abhängigkeit von den aktiven Bioreaktorpositionen. Die Methode wurde für die Zugabe von 12.5 % Ammoniakwasser für die pH-Regelung genutzt. Es wurden beliebige Positionskombinationen betrachtet. Die blauen Punkte sind Arbeitsdauern basierend auf historischen Prozessdaten. Die gestrichelte Linie ist eine polynomische Interpolation der Messdaten.

Mithilfe der Methode „pHControlBaseAmmonium“ kann zu bis zu 48 Reaktoren Ammoniakwasser für die pH-Regelung zugegeben werden. Da die Notwendigkeit der pH-Regelung kaum geplant werden kann, sind in der Abbildung alle Positionskombinationen abgebildet. Die Interpolation wurde mithilfe einer polynomischen Funktion durchgeführt.

$$t = 1,04 \cdot 10^{-3} \cdot n^3 - 9,76 \cdot 10^{-2} \cdot n^2 + 3,63 \cdot n + 61,77 \quad (2)$$

Die Variable n bezeichnet die Anzahl der aktiven Positionen, t ist die Arbeitszeit des Roboters.

Auch hier ist für das genauere Verständnis der Arbeitsdauer die Kenntnis der zugrundeliegenden Methode nützlich. Bei der Methode „pHControlBaseAmmonium“ wird aus einem Aliquot dispensiert. Das bedeutet, dass nach der Spitzenaufnahme zuerst das gesamte Volumen für alle aktiven Reaktorpositionen aspiriert wird. Außerdem wird Volumen für einen Dosierstoß für und nach den eigentlichen Dosiervorgängen (Pre- und Post-Aliquot) von jeweils

10 μL aufgenommen. Nach dem Aspirationsschritt wird zuerst das Pre-Aliquot zurück in den Vorlagebehälter abgegeben. Danach werden die aktiven Reaktorpositionen durch sequentielle Dosierstöße mit den angestrebten Volumina versorgt. Danach wird das Post-Aliquot zurück in den Vorlagebehälter gegeben, die Spitzen mit Ethanol desinfiziert und anschließend in der Nadelwaschstation abgelegt.

Bei dieser Art der Pipettierung findet ein großer Teil der Bewegungen unabhängig von der Anzahl der aktiven Positionen statt. Dies ist an dem größeren Y-Achsenabschnitt erkennbar. Außerdem wird die Pipettierung effizienter, wenn mehr Positionen bedient werden: Dies liegt daran, dass bei dem wiederholten Dispensierschritt aus dem Aliquot weniger Spreizbewegungen und seitliche Bewegungen durchgeführt werden müssen, wenn mehr Positionen aktiv sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich auch diese Methode gut durch eine Abhängigkeit von den aktiven Positionen beschreiben lässt.

Mithilfe der Funktionen für die Arbeitsdauer des Pipettierroboters – hier nur in Auszügen dargestellt – lassen sich im einfachsten Fall Arbeitsauslastungen des Roboters vor der konkreten Versuchsdurchführung abschätzen. Wenn beispielsweise hohe Dosierfrequenzen oder enge Probenahmeintervalle gewünscht sind, lässt sich dies vorher simulieren und es können Aussagen darüber getroffen werden, ob und wann mit einer Überlastung des Roboters zu rechnen ist. Ein Beispiel für eine solche Abschätzung der Roboterbelastung bei einem typischen Zulaufprozess mit *E. coli* ist in Abbildung 15 gegeben.

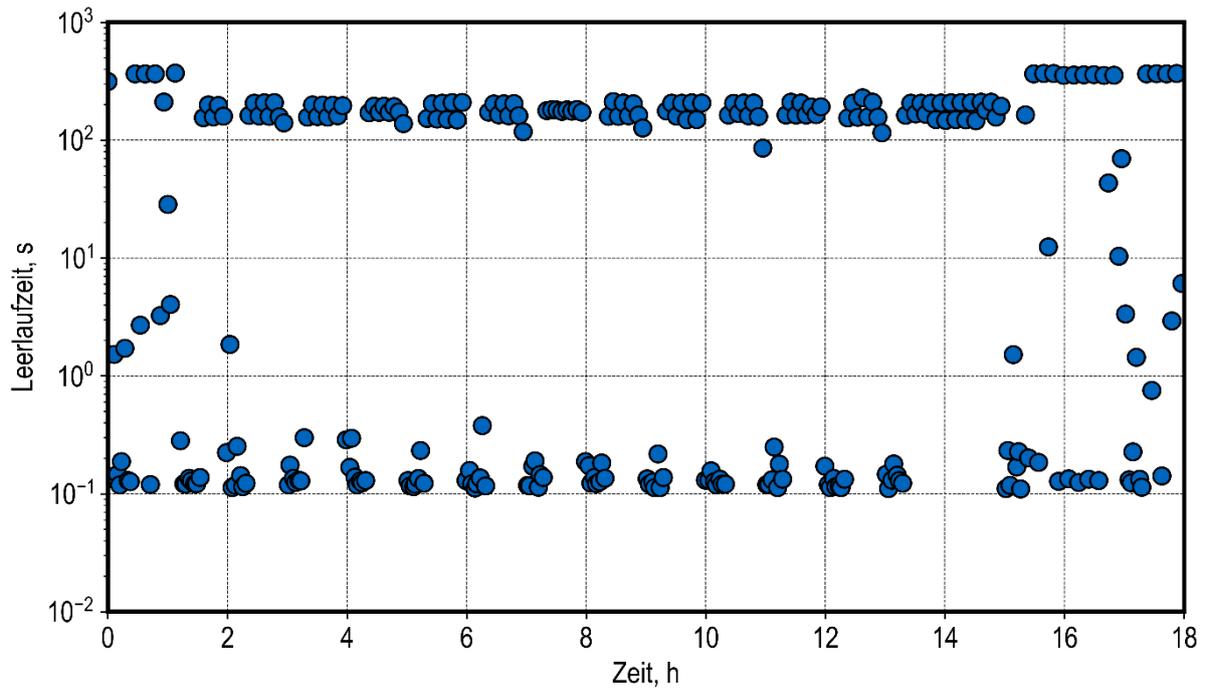


Abbildung 15: Leerlaufzeit des digitalen Zwillings des Pipettierroboters während der simulierten Durchführung von Bioprozessen in 48 Parallelreaktoren. Es wurden pH-Regelung (Säure und Base), Probenahme, Zulauf und Induktion simuliert durchgeführt. Die Leerlaufzeit ist die Zeit die der digitale Zwilling zwischen zwei Methodenausführungen zur Verfügung gestanden hätte. Es wurde der Betrieb von 48 Reaktoren simuliert. Die pH-Regelung und der Zulauf wurden mit einer Frequenz von 6 h^{-1} durchgeführt. Die Probenahme erfolgte etwa stündlich, die Induktion erfolgte nach einer Stunde Prozesszeit. Die Konfiguration der Ablaufsteuerung stellte bei diesem Versuch eine typische Zulaufkultivierung mit *E. coli* dar.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die Leerlaufzeit des Roboters während des simulierten Prozesses zwischen 0,1 - 200 Sekunden schwankt. Dies ergibt insoweit Sinn, als dass der Roboter während der Probenahme für etwa 20 min maximal ausgelastet ist und nur die Geschwindigkeit der Ablaufsteuerung die Leerlaufzeit erzeugt. Wenn allerdings gerade keine Probenahme erfolgt, hat der Roboter deutlich mehr Leerlaufzeit. Es ist erkennbar, dass der Roboter in der Lage ist, die zugeteilten Aufgaben abzuarbeiten ohne dass sich weitere Aufgaben stauen. Der so konfigurierte Versuch wäre also vermutlich in der Realität ebenfalls durchführbar.

Der digitale Zwilling unterstützt auch die beschleunigte Simulation des Prozesses. Das bedeutet, dass der digitale Zwilling in der Lage ist, alle Zeitabläufe mit einem vorgegebenen Faktor zu beschleunigen. Dies sollte allerdings nur bis zu etwa 10-facher Beschleunigung genutzt werden, da sonst die Dauer der Kommunikation und Prioritätsberechnung nicht mehr vernachlässigbar gegenüber der beschleunigten Arbeitsdauer des Roboters ist. Die Dauer der Kommunikation (ca. 30 Millisekunden für die komplette Aufgabenübermittlung) kann nicht weiter beschleunigt werden. Daher würde der digitale Zwilling unzutreffende Ergebnisse erzeugen, wenn diese 30 Millisekunden nicht vernachlässigbar wenig sind.

Außerdem kann die Kombination von Simulation der Roboterarbeitszeit und Prüfung der Konfiguration der Ablaufsteuerung als Test im Sinne der Softwareentwicklung genutzt werden. Damit können keinesfalls gründliche Unittests ersetzt werden, aber es ist geeignet, als einfacher Integrationstest in der Softwareprüfung zu dienen. Unittests sind (automatisierte) Tests von Software, bei der die einfachsten Strukturelemente der Software (Klassen, Funktionen...) auf korrekte Funktionsweise getestet werden. Ein Integrationstest dient dem gegenüber als eine Prüfung des korrekten Zusammenspiels der Komponenten einer Software.

Gemeinsam mit der prioritätsbasierten Ablaufsteuerung lassen sich durch die Roboterintegration flexibel Bioprozesse im mL-Maßstab durchführen, bei der die exakte Reihenfolge der Arbeitsschritte vor Versuchsstart nicht bekannt sein muss. Das Rührkesselreaktorsystem im mL-Maßstab ist mit der prioritätsbasierten Ablaufsteuerung in der Lage, während der Prozesszeit basierend auf einfachen Prioritäten sinnvolle Entscheidungen zu treffen.

Diskussion

Dies ist hilfreich, da dadurch das feste Planen der Roboterarbeiten vermieden werden kann, wie es in anderen Arbeiten durchgeführt wurde (Haby et al., 2019). Diese feste Planung setzt eine sehr genaue Kenntnis des untersuchten Bioprozesses voraus, die normalerweise erst innerhalb der Prozessentwicklung erzeugt wird.

Eine andere Gruppe hat zeitgleich mit ähnlichen Mitteln (OEM Interface der Venus Software, ein „Original Equipment Manufacturer“ Interface ist eine Schnittstelle, die ein Hersteller für Entwickler anderer Firmen bereit stellt, damit diese Geräte des Herstellers in ihre Produkte integrieren können) eine vollständige Abbildung der Funktionen der Venus-Software innerhalb von Python umgesetzt (Chory et al., 2020). Diese Software wird „PyHamilton“ genannt. Während diese Lösung ein Maximum an Flexibilität erzeugt, hat es für die Automatisierung des Bioreaktorblocks doch Nachteile. So entzieht man der Venus-Software auch die Bereiche, für die diese gedacht und gut geeignet ist, nämlich die Konfiguration von Pipettierschritten und sonstige Roboteraktivitäten. Dadurch muss der Nutzer sehr genau wissen, was sich hinter den Python-/Venusfunktionen verbirgt und was an diese übergeben werden muss. In dem hier vorgestellten Integrationskonzept muss der Nutzer nur wenig über die Art, wie der Roboter ins Labor integriert ist, wissen, um eigene Methoden zu schreiben oder um bestehende Methoden zu verändern.

Das gRPC-Framework (ein Software-Framework ist ein Gerüst mithilfe dessen ein Programmierer eine Anwendung erstellen kann) ist für die Kommunikation eine naheliegende Wahl, da es innerhalb vieler moderner IT-Projekte genutzt wird. So findet die Kommunikation der Referenzimplementierungen bei dem entstehenden SiLA2-Standard („Standardization in

Laboratory Automation“) ebenfalls mithilfe von gRPC statt (Porr et al., 2021). Es wurde jedoch bewusst davon Abstand genommen, die Roboterintegration SiLA2-konform zu gestalten, da dies eine erhebliche Verkomplizierung bedeutet hätte und einige Lösungen für die ereignisbasierte Informationsverarbeitung unmöglich gemacht hätte.

Die Simulation der Arbeitsdauer des digitalen Zwillings ist im Rahmen dieser Arbeit auf der Basis historischer Prozessdaten erfolgt. Dabei wurden kleine Programme geschrieben, bei denen die Arbeitszeit des Roboters in Abhängigkeit von der ausgeführten Methode und deren Parametern aus den automatisiert angelegten Logdateien des Pipettierroboters gelesen wurde. Es wäre jedoch eine naheliegende und hilfreiche Verbesserung, wenn a) die Zeitdauer der Methoden in Abhängigkeit von den Parametern automatisch abgelegt wurde und b) daraus automatisch die entsprechenden Funktionen für den digitalen Zwilling erzeugt werden. Dies ließe sich zum Beispiel durch eine Erweiterung der Kommunikationsbibliothek des Roboters erreichen.

5.4 Zweistufige Expressionsoptimierung von mCherry produzierendem *E. coli*²

Mithilfe der in Abschnitt 5.1 bis 5.3 entwickelten Werkzeuge kann nun die zweistufige Expressionsoptimierung durchgeführt werden. In den Abschnitten 5.4 und 5.5 werden beispielhaft zwei Proteinproduktionsprozesse mit *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben. Im Anwendungsbeispiel in Kapitel 5.4 wurde die prioritätsbasierte Ablaufsteuerung nicht angewandt.

5.4.1 Parallele Variation der Induktorkonzentration

E. coli mCherry wurde in einem Satz- und anschließendem Zulaufverfahren in einem Rührkesselreaktor im L-Maßstab mit einer Wachstumsrate μ_{set} von $0,1 \text{ h}^{-1}$ produziert. Es wurde Mineralmedium mit 5 g L^{-1} Glukose als limitierendem Substrat verwendet. Das Ende der Satzphase wurde automatisch anhand des plötzlichen Anstiegs des Sauerstoffsignals detektiert. Der nachfolgende exponentielle Zulauf wurde nach 23 Stunden Zulaufphase gestoppt und der automatisierte Transfer der Suspension der *E. coli* mCherry-Zellen in 48 Rührkessel-Bioreaktoren wurde eingeleitet, bis jeder der parallelen Rührkessel-Bioreaktoren innerhalb von ~ 30 Minuten mit 11 mL Zellsuspension gefüllt war. Eine halbe Stunde vor dem Transfer lag die Biomassekonzentration bei $9,9 \text{ g L}^{-1}$. Der Zulaufbetrieb der 48 parallelen Rührkessel-Bioreaktoren wurde gestartet, nachdem der Zelltransfer abgeschlossen war. Die

² Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in: Von den Eichen, N., Bromig, L., Sidarava, V., Marienberg, H., & Weuster-Botz, D. (2021). Automated multi-scale cascade of parallel stirred-tank bioreactors for fast protein expression studies. *Journal of Biotechnology*, 332, 103-113

Auswirkungen von zehn verschiedenen Induktorkonzentrationen zwischen 1,36 und 18,18 μM IPTG wurden parallel mit 4-5 Wiederholungen untersucht.

In Abbildung 16 ist die Biomassekonzentrationen der parallelen Prozesse im mL-Maßstab dargestellt.

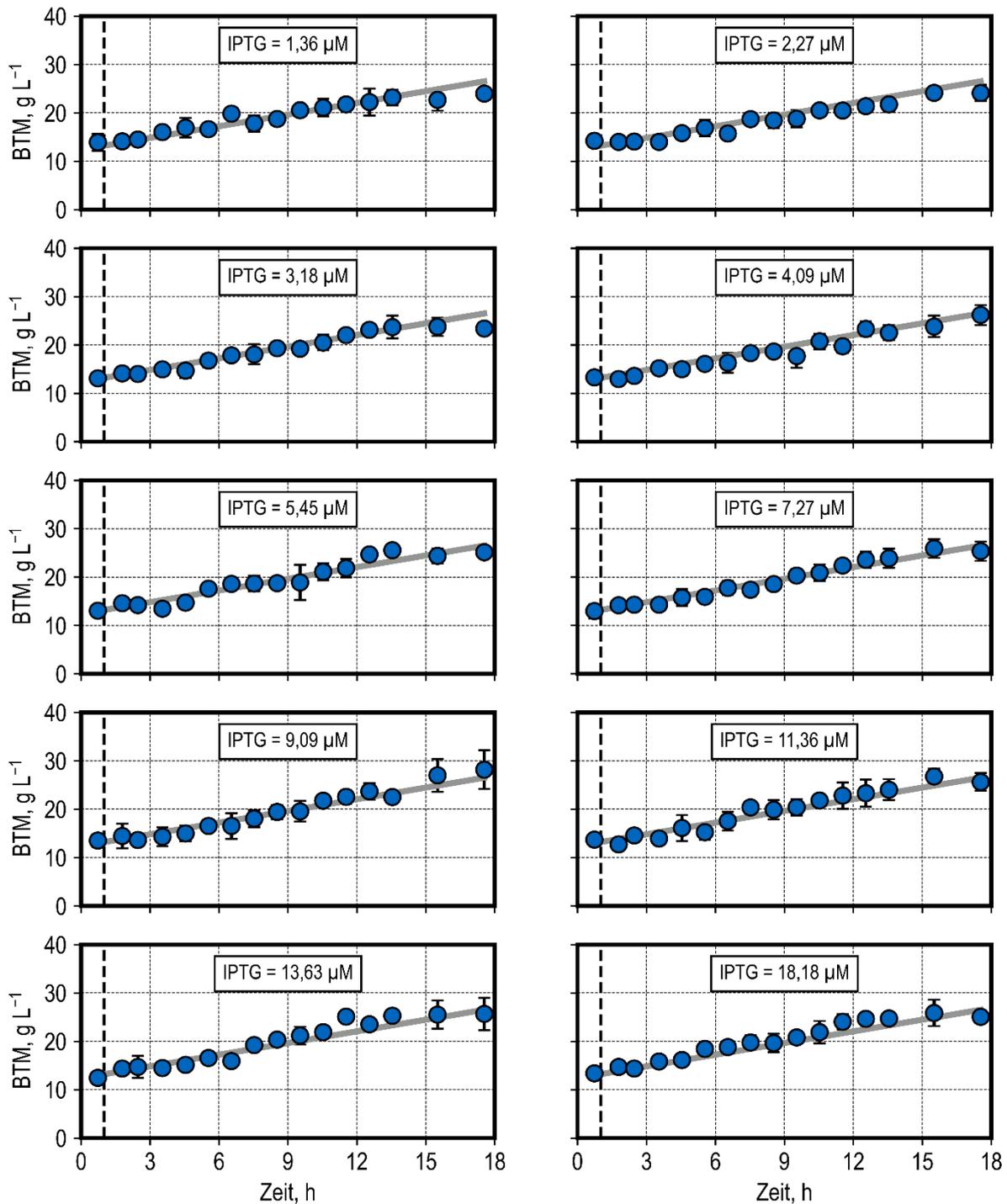


Abbildung 16: Biomassekonzentrationen von *E. coli* BL21(DE3) mCherry in Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben nach 1 Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Die Biomassekonzentrationen wurden anhand der automatisiert *at-line* gemessenen OD_{600} geschätzt. Jedes Diagramm zeigt den Mittelwert der Biomassekonzentrationen von 4-5 parallelen Bioreaktoren, die mit der angegebenen IPTG-Konzentration induziert wurden. Die graue Linie stellt eine lineare Regression der Biomassekonzentrationen aller 48 parallelen Bioreaktoren als Funktion der Prozesszeit unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration dar ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{\text{in}} = 2,4 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Die ersten OD_{600} -Messungen mit dem Pipettierroboter, die 15 Minuten nach Abschluss des Zelltransfers durchgeführt wurden, ergaben eine durchschnittliche Konzentration der

Trockenmasse der Zellen von $13,4 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $0,49 \text{ g L}^{-1}$. Da die letzte Biomassekonzentration im L-Maßstab nicht direkt vor dem Transfer gemessen wurde und die Zellen im mL-Maßstab bereits mit Substrat versorgt wurden, konnten die Zellen in der Zwischenzeit weiterwachsen. Das Wachstum von *E. coli* mCherry war innerhalb der Standardabweichung konstant ($0,8 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) unabhängig von der Menge des zugegebenen IPTG. Nach 18 Stunden Zulauf mit $2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde eine finale Biomassekonzentration von $25,2 \pm 1,3 \text{ g L}^{-1}$ (geschätzt auf Basis der *at-line* gemessenen OD_{600}) erreicht.

Diskussion

Ein systematischer Trend der initialen Biomassedichte entlang der Achsen des Bioreaktorblocks wurde nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass das Absetzen von Zellen im Transferreservoir kein Problem darstellte. Dies war auch zu erwarten, da der Inhalt der Transfergefäße durch das kontinuierliche Nachdosieren aus dem L-Maßstab durchmischt wurde.

Die Ergebnisse stimmen dahingehend mit der Literatur überein, dass eine Zugabe von unter $100 \mu\text{M}$ IPTG das Wachstum von *E. coli* nicht reduziert (Faust et al., 2015; Lecina et al., 2013; Olaofe et al., 2010).

Der mittels Messung der optischen Dichte abgeschätzte mittlere Biomasseertrag von $Y_{x,s} = 0,35 \text{ g g}^{-1}$ ist niedriger als in der Literatur für mit Glukose wachsenden *E. coli* veröffentlicht ist (Schmideder et al., 2015). Dies könnte auf die 10-12 Minuten andauernden Auszehrphasen zwischen den intermittierenden Glukosezugaben zurückzuführen sein, die den Glukoseverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel erhöhen könnten. Es ist bekannt, dass eine intermittierende Substratzugabe zu geringeren Biomasseerträgen führt, ohne dass es zu einer Akkumulation von Acetat kommt (Faust et al., 2014; Neubauer et al., 1995).

Im Unterschied zum Biomassewachstum war die Expression von mCherry eindeutig eine Funktion der Induktorzugabe. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

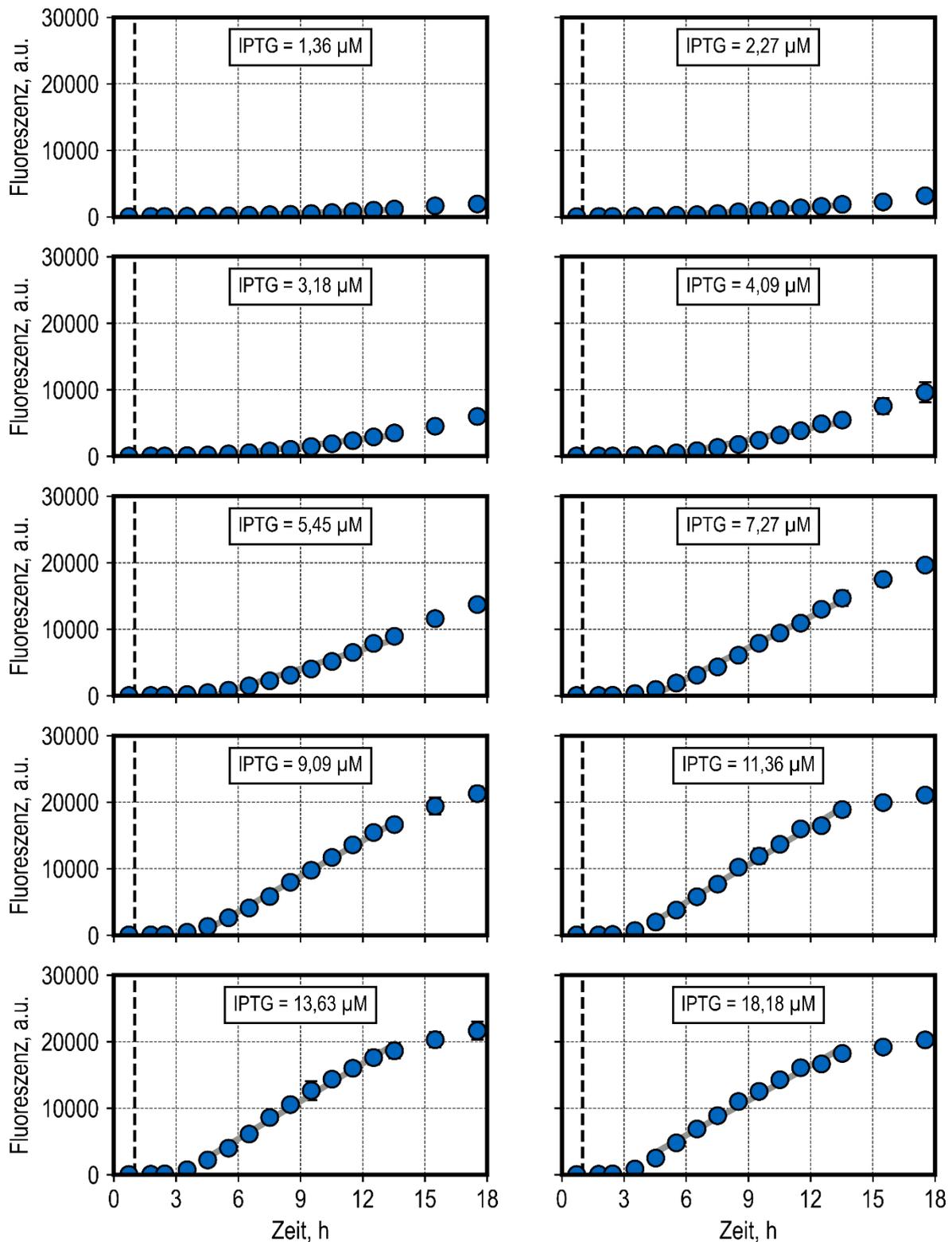


Abbildung 17: Automatisiert *at-line* gemessene mittlere Fluoreszenz als Abschätzung der mCherry-Konzentration in Rührkesselreaktoren mit *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugabe nach einer Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Jede Grafik zeigt den Mittelwert der Fluoreszenz von 4-5 parallelen Bioreaktoren, die mit der angegebenen IPTG-Konzentration induziert wurden. Die graue Linie zeigt die individuelle lineare Regression des Fluoreszenzanstiegs zwischen einer Prozessdauer von 3 - 11 h bei der angegebenen IPTG-Ausgangskonzentration ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Die *at-line* gemessene mittlere Fluoreszenz, die eine Schätzung der mCherry-Konzentration darstellt, begann einige Stunden nach der IPTG-Zugabe zu steigen. Die finale mittlere Fluoreszenz nach einer Prozessdauer von 18 Stunden steigt mit zunehmender IPTG-Konzentration bis zu 7,27 μM IPTG, aber eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration führte nicht zu einer höheren endgültigen Fluoreszenz außerhalb der Standardabweichung.

Der Anstieg der online gemessenen Fluoreszenz war abhängig von der anfänglichen Induktorkonzentration über eine Prozessdauer von 3 bis 11 Stunden konstant. Nach einer Prozessdauer von 11 Stunden reduzierte sich die mCherry-Expressionsrate, wenn die Startkonzentration von IPTG 7,27 μM überstieg.

Die ermittelten Fluoreszenzanstiege zwischen einer Prozessdauer von 3 - 11 Stunden sind als Funktion der anfänglichen IPTG-Konzentrationen in Abbildung 18 dargestellt.

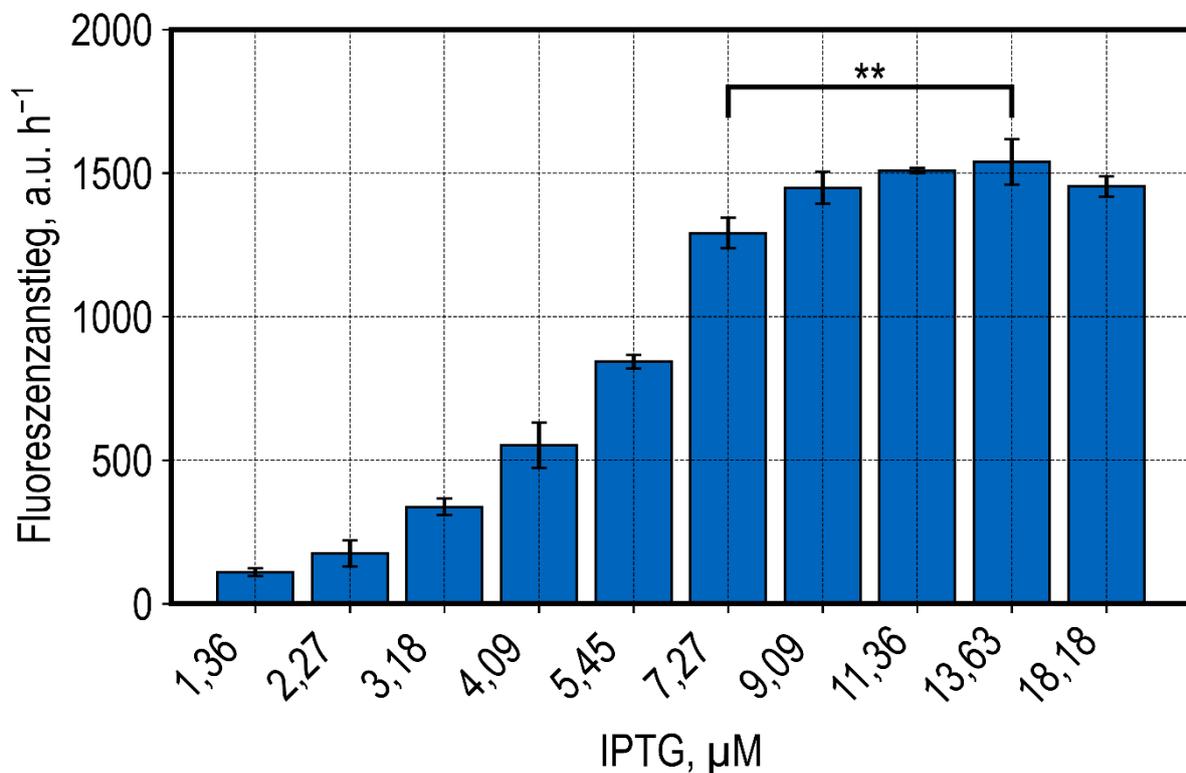


Abbildung 18: Steigungen der *at-line* gemessenen Fluoreszenz von *E. coli* BL21(DE3) mCherry im Zulaufbetrieb im mL-Maßstab bei einer Prozessdauer von 3 - 11 h als Funktion der zugesetzten IPTG-Konzentrationen. ** bedeuten $p < 0.01$ bei Welchs T-test (Virtanen et al., 2020) ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Der Anstieg der Fluoreszenz bei einer Prozessdauer von 3 bis 11 Stunden variierte nicht signifikant bei Induktorkonzentrationen über 9,09 μM IPTG. Bei niedrigeren Induktorkonzentrationen verringert sich der Fluoreszenzanstieg kontinuierlich.

Diskussion

Dies deutet darauf hin, dass ab dieser Induktorkonzentration die maximale Proteinproduktivität für die mCherry-Produktion mit *E. coli* erreicht wurde. Das T7-Expressionssystem ist sehr effektiv, und einige frühere Berichte haben auch gezeigt, dass eine IPTG-Konzentration von 8-10 μM ausreichen kann, um rekombinante Proteine wie alkalische Phosphatase oder Cytochrom mit *E. coli* effizient in Fed-Batch-Prozessen zu produzieren (Choi et al., 2000; Faust et al., 2015; Sevastyanovich et al., 2009). Es existieren allerdings auch Untersuchungen, bei denen deutlich höhere optimale IPTG-Konzentrationen gefunden wurden (Durany et al., 2004; Olaofe et al., 2010; Pinsach et al., 2008). Es scheint, dass die optimale Induktorkonzentration für die rekombinante Proteinexpression mit *E. coli* je nach Art des produzierten Proteins und der Prozessbedingungen variieren kann.

Bei diesem Versuch konnte mittels der Kopplung von Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab in einer Woche 48 parallele Expressionsbedingungen untersucht werden, bei denen durch die standardisierte Zellproduktion der alleinige Einfluss der Induktorkonzentration untersucht wurde. Bei der Verwendung von Reaktoren im L-Maßstab könnten von einer Person je nach Laborausstattung nur 1-4 Expressionsbedingungen in einer Woche mit sehr viel größerem manuellen Arbeitsaufwand untersucht werden.

5.4.2 Parallele Variation der Zulauftrate im L-Maßstab und der Induktorkonzentration im mL-Maßstab

Die Wachstumsrate μ_{set} während der Zulaufphase von *E. coli* mCherry wurde parallel im L-Maßstab variiert. Es wurden drei verschiedene Wachstumsraten gewählt (0,1 h^{-1} , 0,15 h^{-1} und 0,2 h^{-1}). Die Länge der Zulaufphase und die Startzelldichte wurden so eingestellt, dass am Ende der Zulaufprozesse im L-Maßstab gleichzeitig vergleichbare Biomassekonzentrationen erzeugt wurden, um einen gleichzeitigen Transfer der einzelnen Zellsuspensionen in die 48 Rührkessel-Bioreaktoren im mL-Maßstab zu ermöglichen. Fünf verschiedene Induktorkonzentrationen von 1,82 bis 13,63 μM IPTG wurden mit den bei unterschiedlichen Wachstumsraten produzierten *E. coli*-Zellen untersucht, so dass sich insgesamt $3 \times 5 = 15$ individuelle Kombinationen von Wachstumsrate und IPTG-Konzentrationen für die Expression von mCherry mit mindestens drei biologischen Replikaten ergaben.

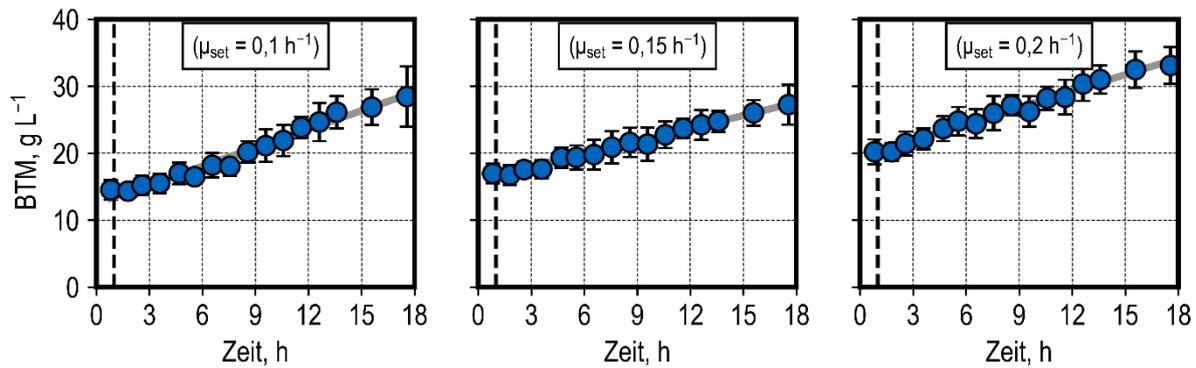


Abbildung 19: Mittlere Biomassekonzentrationen von *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben von 1,82 bis 13,63 μM nach 1 Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Die Biomassekonzentrationen wurden anhand der *at-line* gemessenen OD_{600} geschätzt. Jedes Diagramm zeigt den Mittelwert der Biomassekonzentrationen, die bei Zellen beobachtet wurden, die mit der gleichen Wachstumsrate im Zulaufverfahren im L-Maßstab produziert wurden, bevor sie automatisch in die Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab übertragen wurden. Die grauen Linien stellen die lineare Regression dieser mittleren BTM-Konzentrationen ($n = 16$) als Funktion der Prozesszeit unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration dar ($V = 11$ mL, $F_{in} = 2,4$ g Glukose $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$, $T = 37$ °C, pH 6,9, $n = 3000$ rpm).

Abbildung 19 zeigt den Mittelwert der Biomassekonzentrationen, die im mL-Maßstab unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration gemessen wurden. Die erste gemessene Zellkonzentration im mL-Maßstab mit Zellen des Reaktors, der mit $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ betrieben wurde, betrug $14,5 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}$. Mit Zellen des Reaktors, die mit $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ betrieben wurden, betrug die erste gemessene Zellkonzentration im mL-Maßstab $17,0 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$, und die erste gemessene Zellkonzentration im mL-Maßstab betrug $20,2 \pm 1,8 \text{ g L}^{-1}$ mit Zellen des Reaktors, die mit $\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ betrieben wurden.

In allen Fällen wurde ein konstanter Anstieg der Biomassekonzentration als Funktion der Prozesszeit beobachtet. Der Anstieg der Biomassekonzentration schwankte zwischen $0,92 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$), $0,65 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$) bzw. $0,82 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$).

Diskussion

Genau wie beim vorherigen Versuch wurde kein systematischer Trend beobachtet, der den Positionen des Bioreaktors in der Befüllungsreihenfolge folgt, was darauf hindeutet, dass sich die Zellen im Transferreservoir nicht absetzen. Die Durchmischung des Transfergefäßes durch das kontinuierliche Nachfördern aus dem L-Maßstab scheint hinreichend gewesen zu sein.

Die Abweichungen beim Biomassewachstum scheinen innerhalb des Schätzfehlers zu liegen, wenn man sie mit den Ergebnissen vergleicht, die zuvor beim konstanten Anstieg der Biomassendichte von $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1} \pm 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ mit bei $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ produzierten Zellen beobachtet wurden. Die Streuung der anfänglichen Zellkonzentrationen war unerwartet hoch und lag zwischen $14 - 20 \text{ g L}^{-1}$. Diese Variation wurde trotz der Variationen der Prozesszeit

und der Inokulumgröße mit dem Ziel, vergleichbare Zelldichten vor dem automatischen Transfer der Zellsuspensionen zu erreichen, beobachtet.

Die Schwankungen der anfänglichen Zelldichten im mL-Maßstab sind auf ein nicht optimales experimentelles Design der zuvor im L-Maßstab durchgeführten Zulaufprozesse zurückzuführen. Eine robustere Alternative wäre die Online-Messung der optischen Dichten in den parallelen Bioreaktoren im L-Maßstab und ein automatischer Start des Zelltransfers bei einer vordefinierten Biomassekonzentration, was zu einem gestaffelten Start der automatisierten Expressionsstudien im mL-Maßstab führen würde. Dabei wären allerdings 6 parallele 8-fache Bioreaktorblöcke anstelle der verwendeten 48-fach Einheit nötig, um einen spaltenweisen Start der Rührer zu ermöglichen.

Aufgrund der unterschiedlichen Startzelldichten im mL-Maßstab ist in Abbildung 20 die mittlere biomassespezifische Fluoreszenz als Maß für die Proteinexpression bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben dargestellt.

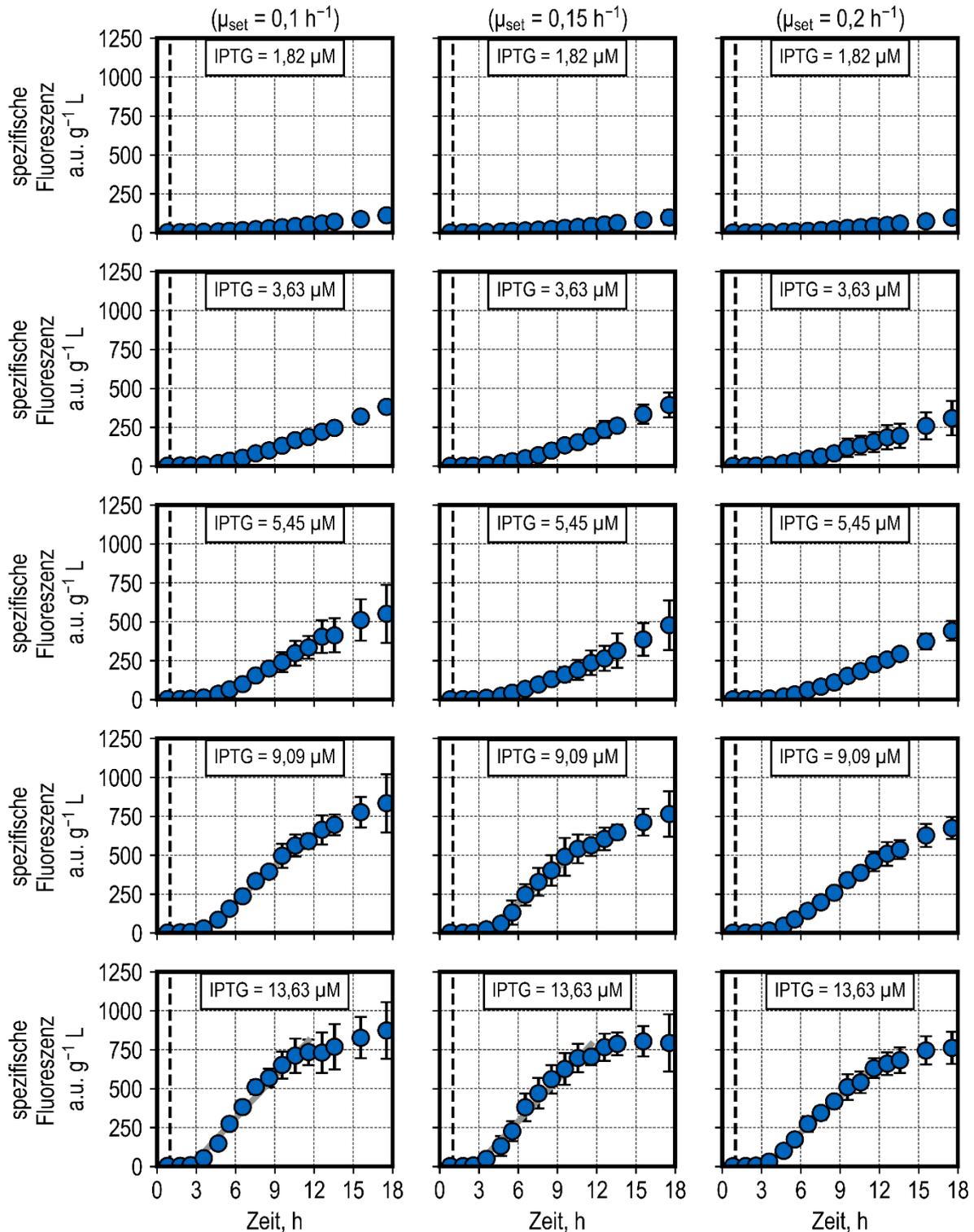


Abbildung 20: Biomassespezifische Fluoreszenz als Schätzung der spezifischen mCherry-Konzentration bei *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben nach 1 Stunde (senkrechte gestrichelte Linie). Außerdem wurde im gleichen Parallelansatz die Zulauftrate μ_{set} von 0,1 bis 0,2 h⁻¹ bei der Zellerstellung im L-Maßstab variiert (Spalten). Die graue Linie zeigt die individuelle lineare Regression des Anstiegs der spezifischen Fluoreszenz zwischen einer Prozessdauer von 3 und 11 Stunden bei der angegebenen IPTG-Ausgangskonzentration. Jede Grafik zeigt den Mittelwert der biomassespezifischen Fluoreszenz von mindestens 3 parallelen Bioreaktoren ($V = 11$ mL, $F_{\text{in}} = 2,4$ g L⁻¹ h⁻¹, $T = 37$ °C, $\text{pH} = 6,9$, $n = 3000$ rpm).

Wie erwartet, steigt die biomassespezifische Fluoreszenz als Maß für die spezifische mCherry-Konzentration mit zunehmender Induktorkonzentration bis zu 9,09 μM IPTG an und führt zu einer jeweils höheren maximalen biomassespezifischen Fluoreszenz. Ein konstanter Anstieg der biomassespezifischen Fluoreszenz wurde zwischen einer Prozessdauer von 3 und 11 Stunden bei allen Versuchsbedingungen beobachtet.

Abbildung 21 zeigt die biomassespezifischen Fluoreszenz als Funktion der anfänglichen IPTG-Konzentrationen für die Zellen, die mit unterschiedlichen Wachstumsraten produziert wurden, dargestellt, um optimale IPTG-Konzentrationen für die mCherry-Expression zu ermitteln. Der biomassespezifische Fluoreszenzanstieg zwischen 3 - 11 Stunden aus der Untersuchung zum alleinigen Einfluss der Induktorkonzentration ist als Referenz aufgetragen, um die sequentielle Reproduzierbarkeit des Versuchs bei einer Wachstumsrate in der exponentiellen Zulaufphase von $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ zu zeigen (hellblaue und blaue Balken in Abbildung 21).

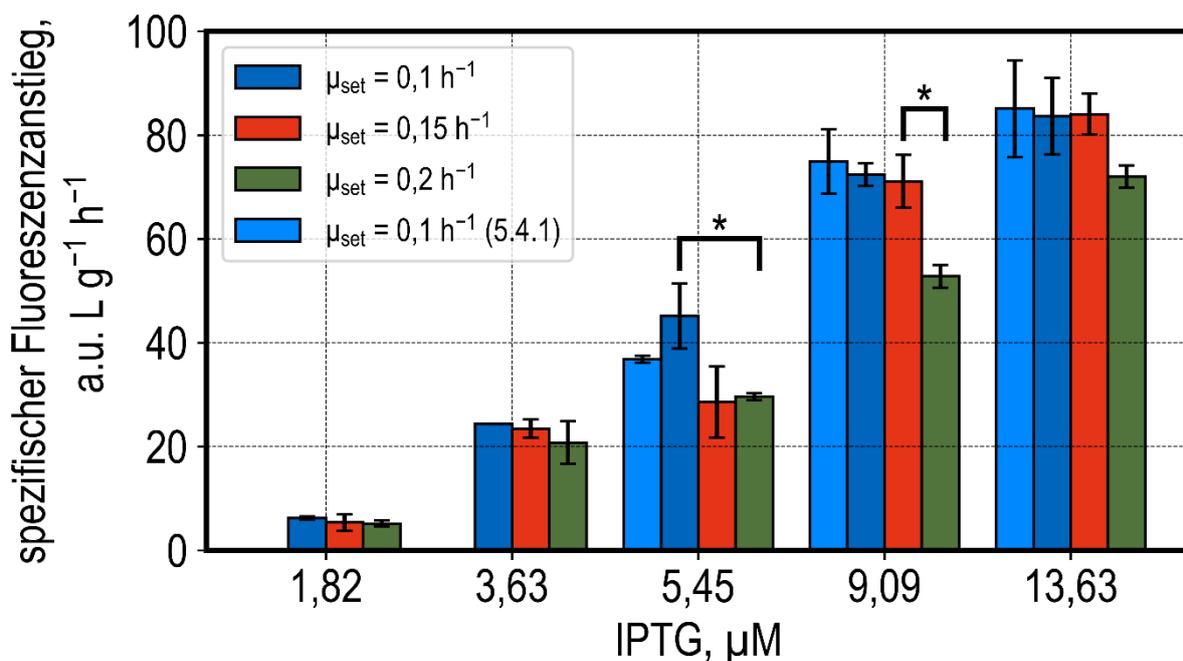


Abbildung 21: Anstieg der biomassespezifischen Fluoreszenz mit *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei einer Prozesszeit von 3 - 11 h als Funktion der zugesetzten IPTG-Konzentrationen und Zulaufzeiten in der Zellbildungsphase (blau: $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 14,5 \text{ g L}^{-1}$; rot: $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 17,0 \text{ g L}^{-1}$; grün: $\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 20,2 \text{ g L}^{-1}$). Zum Vergleich ist der biomassespezifische Anstieg der Fluoreszenz aus der Untersuchung zu Einfluss der Induktorkonzentration hinzugefügt (hellblau: $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 13,4 \text{ g L}^{-1}$). * bedeuten $p < 0,1$ nach Welch's t-test (Virtanen et al., 2020). Jeder Balken zeigt den Mittelwert des konstanten Anstiegs der biomassespezifischen Fluoreszenz von mindestens 3 parallelen Bioreaktoren ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{\text{in}} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Bei niedrigen IPTG-Konzentrationen gibt es keine Unterschiede in den spezifischen Produktbildungsraten zwischen den untersuchten *E. coli* mCherry-Zellen. *E. coli*-Zellen, die bei $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ($c_{X0} = 14,5 \text{ g L}^{-1}$) produziert wurden, erreichten den höchsten

biomassenspezifischen Fluoreszenzanstieg bei einer Induktorkonzentration von 5,45 μM im Vergleich zu den anderen eingestellten μ_{set} . Mit Ausnahme der *E. coli* mCherry-Zellen, die bei $\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ($c_{X0} = 20,2 \text{ g L}^{-1}$) kultiviert wurden, zeigten alle *E. coli*-Zellen innerhalb der Standardabweichung die gleiche spezifische Produktbildungsrate bei 9,09 μM IPTG. Diese lag deutlich über der Rate der bei $\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ produzierten Zellen. Bei 13,63 μM IPTG wurde kein signifikanter Unterschied im biomassenspezifischen Fluoreszenzanstieg festgestellt.

Diskussion

Es bleibt unklar, ob die deutlich verringerte spezifische mCherry-Bildungsrate bei niedrigeren IPTG-Konzentrationen als 3.63 μM durch die erhöhte Wachstumsrate ($\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1} > 0,15 \text{ h}^{-1} > 0,1 \text{ h}^{-1}$) während der Biomasseproduktion oder durch die höheren Biomassekonzentrationen während der Proteinexpression ($c_{X0} = 20,2 \text{ g L}^{-1} > 17 \text{ g L}^{-1} > 14,5 \text{ g L}^{-1}$) verursacht wurde.

Eine negative Auswirkung höherer Biomassekonzentrationen auf die Proteinexpression bei unveränderten IPTG-Konzentrationen könnte durch die Ergebnisse von Olaofe *et al.* 2010 gestützt werden, die berichteten, dass ein minimales Verhältnis von IPTG pro *E. coli*-Trockenzellmasse erforderlich ist, um eine vollständige Proteinexpression zu ermöglichen. Dies würde die Beobachtungen bei 5,45 und 9,09 μM IPTG erklären.

Wenn die rekombinante Genexpression durch niedrige IPTG-Konzentrationen begrenzt wird, haben die Vorgeschichte der Zellen oder die anfänglichen Zelldichten anscheinend keinen Einfluss auf die spezifische Proteinbildungsrate.

Der Vergleich der spezifischen Proteinproduktionsraten, die mit unabhängig voneinander bei $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ produzierten *E. coli* mCherry-Zellen gemessen wurden (hellblaue und blaue Balken in Abbildung 21), zeigt die hohe sequentielle Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus.

Bei diesem Versuch konnte mittels der Kopplung von Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab in einer Woche 48 parallele Expressionsbedingungen untersucht werden, bei denen durch die variierte Zellproduktion der kombinierte Einfluss von Zulauftrate während der Zellproduktion und Induktorkonzentration während der Expressionsphase untersucht wurde. Bei der Verwendung von Reaktoren im L-Maßstab könnten von einer Person je nach Laboraustattung 1 - 4 Expressionsbedingungen innerhalb einer Woche untersucht werden.

5.5 Expressionsuntersuchung von NoCAR in *E. coli*³

Für die Expressionsoptimierung von *E. coli* NoCAR wurde das Vorgehen für die Expressionsuntersuchung von *E. coli* mCherry leicht abgewandelt. Im ersten Schritt wurden wie zuvor in einem Satz- mit anschließendem Zulaufverfahren Zellen im Rührkesselreaktor im L-Maßstab hergestellt. Es wurden 5 g L^{-1} Glukose in Mineralmedium im Satzprozess vorgelegt, der Zulauf erfolgte mit einer Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ mit Glukose als limitierendem Substrat. Nach 23 Stunden Prozesszeit erfolgte der automatische Transfer auf 48 Reaktoren im mL-Maßstab. Im mL-Maßstab wurde nach einer weiteren Stunde Prozesszeit mit IPTG induziert. Dort erfolgte dann die parallele Variation der Induktorkonzentration und der Zulauftrate während der Proteinexpression. In Abbildung 22 sind die untersuchten Expressionsbedingungen im mL-Maßstab dargestellt.

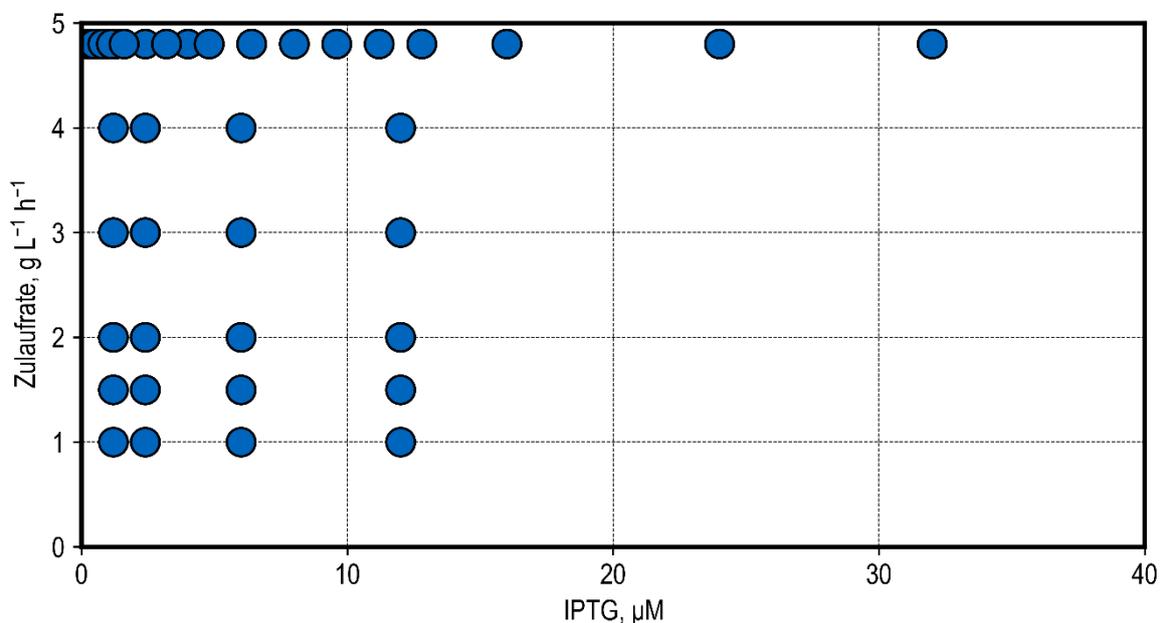


Abbildung 22: Versuchsplan der durchgeführten Experimente mit *E. coli* NoCAR, um optimale Produktionsbedingungen für die Expression zu finden. Jeder Punkt beschreibt eine einzigartige Kombination von Zulaufrate und Induktorkonzentration, die während der Proteinexpression angewandt wurde. Jede Kombination wurde mit 4 bis 8 biologischen Replikaten untersucht. Insgesamt wurden 192 Experimente in vier aufeinanderfolgenden Parallelexperimenten im mit jeweils 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen wurden anhand der vorher durchgeführten Versuche mit mCherry *E. coli* ausgewählt, da zum Zeitpunkt des Versuchsdesigns das Modell zur Auswertung der Daten noch nicht vorlag. Daher wurde der interessante Induktorbereich zwischen 1 und $12 \mu\text{M}$ IPTG ausgewählt. Zusätzlich wurde in einem Versuchsansatz auch der Einfluss höherer (bis

³ Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in: „von den Eichen, N., Osthege, M., Dölle, M., Bromig, L., Wiechert, W., Oldiges, M., & Weuster-Botz, D. (2022). Control of parallelized bioreactors II: probabilistic quantification of carboxylic acid reductase activity for bioprocess optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-16.“

32 μM) Induktorkonzentrationen untersucht, da in der Literatur in Schüttelkolbenversuchen eine optimale IPTG-Konzentration von 200 μM IPTG beschrieben wurde (Weber et al., 2021). Bei der Expression von *E. coli* mCherry wurde eine Zulauftrate von 2,4 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ gewählt. Daher wurde die Zulauftrate ausgehend von diesem Wert sowohl nach oben als auch nach unten variiert.

Es wurden insgesamt vier Zulaufverfahren mit identischen Reaktionsbedingungen im L-Maßstab durchgeführt. Nach jeweils 22,75 Stunden Prozesszeit wurde eine manuelle Probe für die Messung der optischen Dichte genommen. Dabei wurde eine Biomassedichte von 13,35 g L^{-1} +/- 1,4 g L^{-1} basierend auf der gemessenen optischen Dichte abgeschätzt.

Der automatisierte Transfer der Zellen vom L-Maßstab auf die 48 Reaktoren im mL-Maßstab wurde bei einer Prozesszeit von 23 Stunden gestartet und dauerte etwa 25 Minuten. Im mL-Maßstab wurden in insgesamt 192 Versuchen (4 x 48 Parallelversuche) 40 Kombinationen von Induktorkonzentrationen und Zulauftraten untersucht. Jede Versuchsbedingung wurde in 4 bis 8 Replikaten untersucht. Von den 192 durchgeführten automatisierten Experimenten wurden 191 ausgewertet. Ein Reaktor wurde aufgrund von starken Abweichungen bei der Sauerstoffsättigung von der Auswertung ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Damit ergibt sich eine Zuverlässigkeit Versuchsdurchführung der Reaktoren im mL-Maßstab von 99,5 % bei einer Prozesszeit von jeweils 18 Stunden. Bei einem Experiment mit dem gleichen Reaktorsystem wurde in der Literatur bei einer Prozesszeit von ca. 10 Stunden eine Ausfallquote der Reaktoren von ca. 12 % beobachtet (Hans et al., 2020). Dies legt nahe, dass bei korrekter Handhabung die Reaktoren im mL-Maßstab eine hohe Zuverlässigkeit erreichen können.

Für jede der 40 Versuchsbedingungen wurden automatisiert Zeitverläufe der Biomassekonzentration (abgeschätzt über die optische Dichte), des pH und des pO_2 aufgenommen. Da die Darstellung all dieser Messdaten stark repetitiv wäre, werden in den folgenden Abbildungen drei repräsentative Versuchsbedingungen (hohe / niedrige / mittlere Zulauftrate und Induktorkonzentration) dargestellt und diskutiert.

In Abbildung 23 ist der Verlauf der Biomassekonzentration von drei repräsentativen Expressionsbedingungen im mL-Maßstab beispielhaft dargestellt.

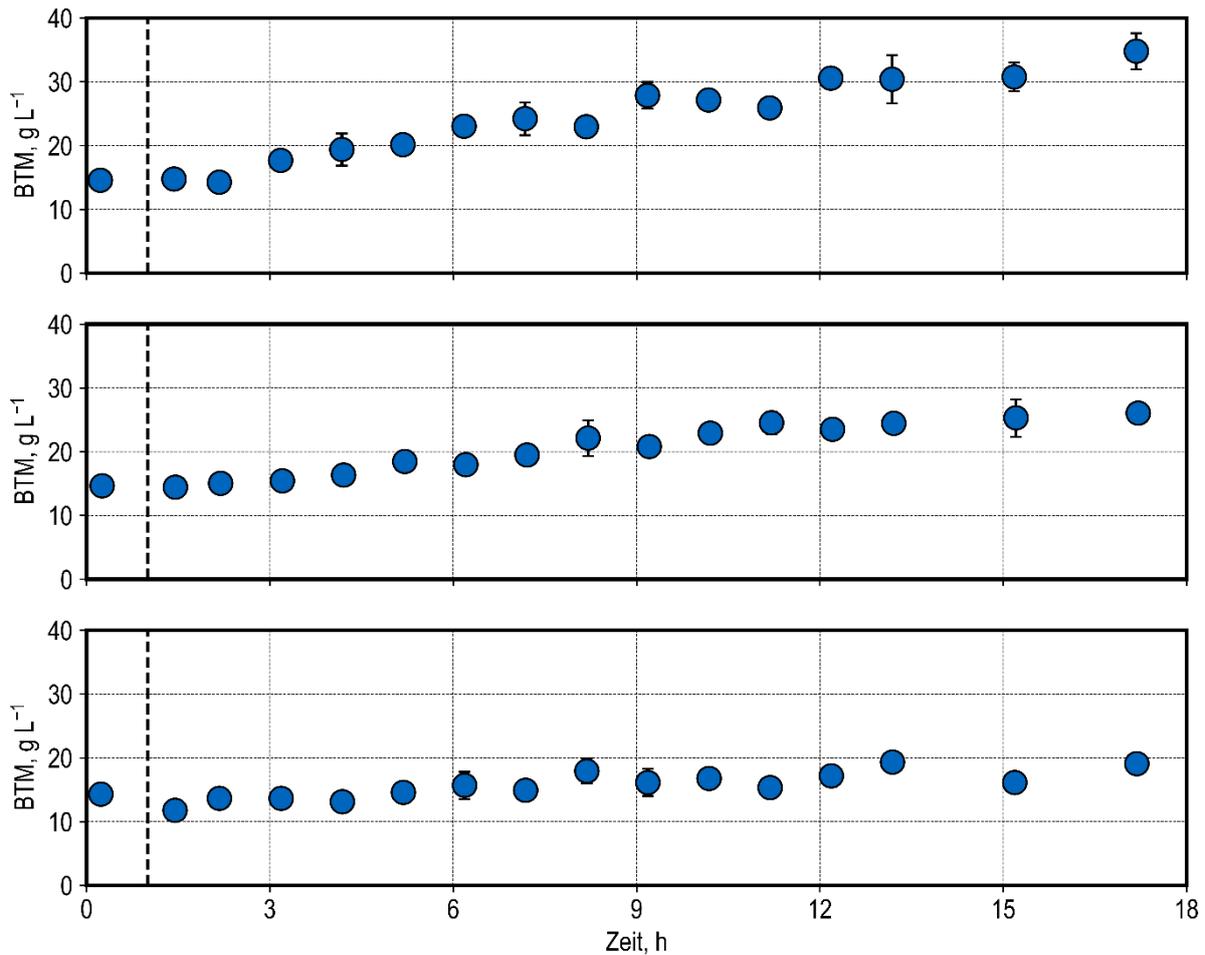


Abbildung 23: Biomassekonzentration (abgeschätzt über die at-line Messung der optischen Dichte) bei drei Expressionsbedingungen von *E. coli* NoCAR im Rührkesselreaktor im mL-Maßstab. Alle Reaktoren wurden nach einer Stunde Prozesszeit im mL-Maßstab mit IPTG induziert (vertikale gestrichelte Linie). In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. Jede Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von 4 parallelen Reaktoren ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Es besteht wie erwartet eine positive Korrelation zwischen der Zulauftrate und dem Zellwachstum, das heißt die Zellen wachsen schneller bei einer höheren Zulauftrate. Die Biomasseausbeute legt jedoch nahe, dass die Proteinbildung oder die intermittierende Substratdosierung die Biomasseausbeute der Zellen reduzieren ($0,25 \text{ g g}^{-1}$, $0,22 \text{ g g}^{-1}$ und $0,28 \text{ g g}^{-1}$ für Zulauftraten von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Bei Wachstum mit Glukose bei maximaler Wachstumsrate würde man bei *E. coli* eine Biomasseausbeute von ca. $0,5 \text{ g g}^{-1}$ erwarten (Schmideder et al., 2015).

In Abbildung 24 ist der Verlauf des pO_2 -Signals bei den gleichen Expressionsbedingungen dargestellt.

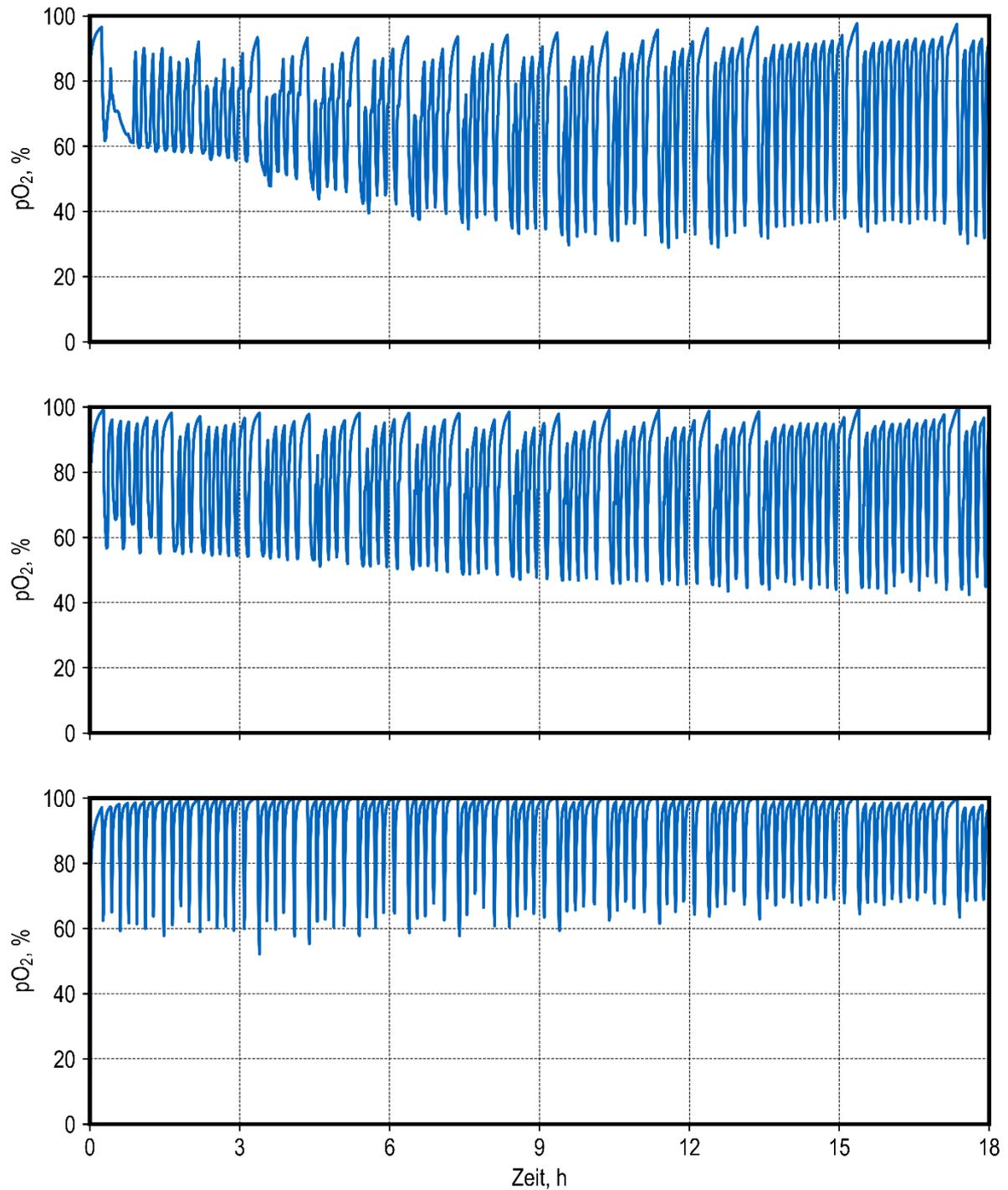


Abbildung 24: pO_2 -Signal von drei exemplarischen Expressionsbedingungen im mL-Maßstab. Nach einer Stunde Prozesszeit erfolgte die Induktion mit IPTG. In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG. Die Substratdosierung erfolgte mit einer Frequenz von 6 h^{-1} . Der Übersichtlichkeit halber ist jeweils nur ein Reaktor dargestellt. Das pO_2 -Signal wurde mit einer Abtastzeit von 30 Sekunden aufgezeichnet ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Nach dem Prozessstart steigen die pO_2 -Messwerte auf etwa 90 % Luftsättigung. Danach sinkt das pO_2 -Signal bei jeder Substratzugabe (Frequenz 6 h^{-1} , Schrittzeit 10 min) auf 40-60 %, um danach wieder auf den Ursprungswert zu steigen. Dies zeigt, dass bei allen

Versuchsbedingungen limitierende Zulaufraten eingestellt wurden. Der Abfall des pO_2 -Signals nach der Substratzugabe scheint nach einigen Stunden Prozesszeit proportional zur Zulaufrate zu werden. Dies ist nachvollziehbar, da bei hohen Zulaufraten mehr Zellen gebildet werden, die auf die intermittierende Substratzugabe reagieren können. Bei einer Zulaufrate von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konnte während der ersten Stunde kein Anstieg des gelösten Sauerstoffsignals nach der Zugabe des Substrats beobachtet werden. Dies legt nahe, dass während dieser Zeit noch keine Limitierung aufgetreten war. Vermutlich waren die Zellen noch nicht vollständig auf die neue Kultivierungstemperatur eingestellt (37 °C im L-Maßstab, 30 °C im mL-Maßstab).

In Abbildung 25 ist der pH-Verlauf der drei ausgewählten Parallelexperimente dargestellt.

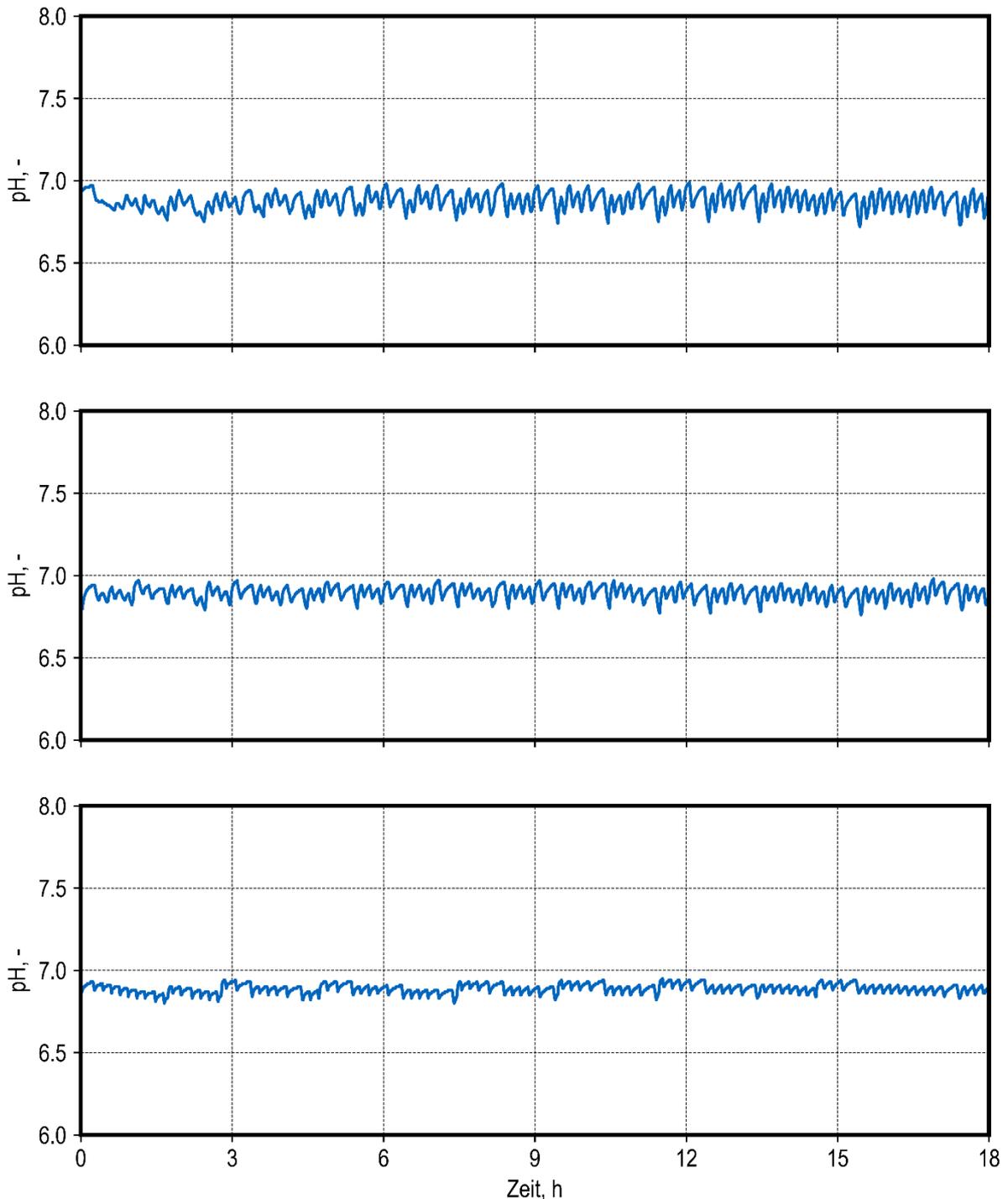


Abbildung 25: pH-Messwerte bei drei exemplarischen Expressionsbedingungen im mL-Maßstab. Nach einer Stunde Prozesszeit erfolgte die Induktion mit IPTG. In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. Die Substratdosierung und die pH-Regelung erfolgte mit einer Frequenz von 6 h^{-1} . Der Übersichtlichkeit halber ist jeweils nur ein Reaktor dargestellt. Das pH-Signal wurde mit einer Abtastzeit von 30 Sekunden aufgezeichnet ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).

Der Sollwert des pH-Reglers betrug $\text{pH } 7,0$. Da es sich um einen einfachen Proportionalregler handelte, ergibt sich eine konstante Abweichung von $0,1$ vom Sollwert. Darüber hinaus

oszilliert der pH durch die intermittierende Zugabe von pH-Stellmittel und der intermittierenden metabolischen Aktivität durch die intermittierende Substratdosierung. Insgesamt oszilliert der pH mit einer Abweichung von etwa 0,15 um pH 6,9. Um die pH-Oszillationen zu verringern, müsste die Frequenz der pH-Regelung erhöht werden. Dies wäre nur möglich, wenn entweder andere Roboteraufgaben reduziert oder die Anzahl der parallel betriebenen Reaktoren reduziert werden.

Nach insgesamt 18 Stunden Prozesszeit im mL-Maßstab (17 Stunden Proteinexpression) erfolgte jeweils eine Ganzzellbiotransformation in einer „Deep Well Plate“ (DWP) für jeden Bioreaktor automatisiert. Zusätzlich wurde für jeden Parallelansatz eine Kalibrierkurve mit 18 Positionen basierend auf der ersten Position des Bioreaktorblocks angesetzt. Bei den Ganzzellbiotransformationen wurden alle 1,1 Stunden Proben genommen, um die Produktkonzentration (360 nm) und die Biomassekonzentration (600 nm) photometrisch zu bestimmen.

Wie in Kapitel 4.5.6 beschrieben erfolgte die Auswertung der Biotransformationen durch den Kooperationspartner am Forschungszentrum Jülich mithilfe Bayes'scher Statistik. Damit konnten die spezifischen und absoluten Enzymaktivitäten inklusive ihrer Konfidenzintervalle abgeschätzt werden.

Durch die unterschiedlichen Zulaufzeiten während der Proteinexpression ergeben sich unterschiedliche Zelldichten zu Beginn der Biotransformation, die nicht normalisiert wurden. In Abbildung 26 ist die zellmassenspezifische Aktivität dargestellt.

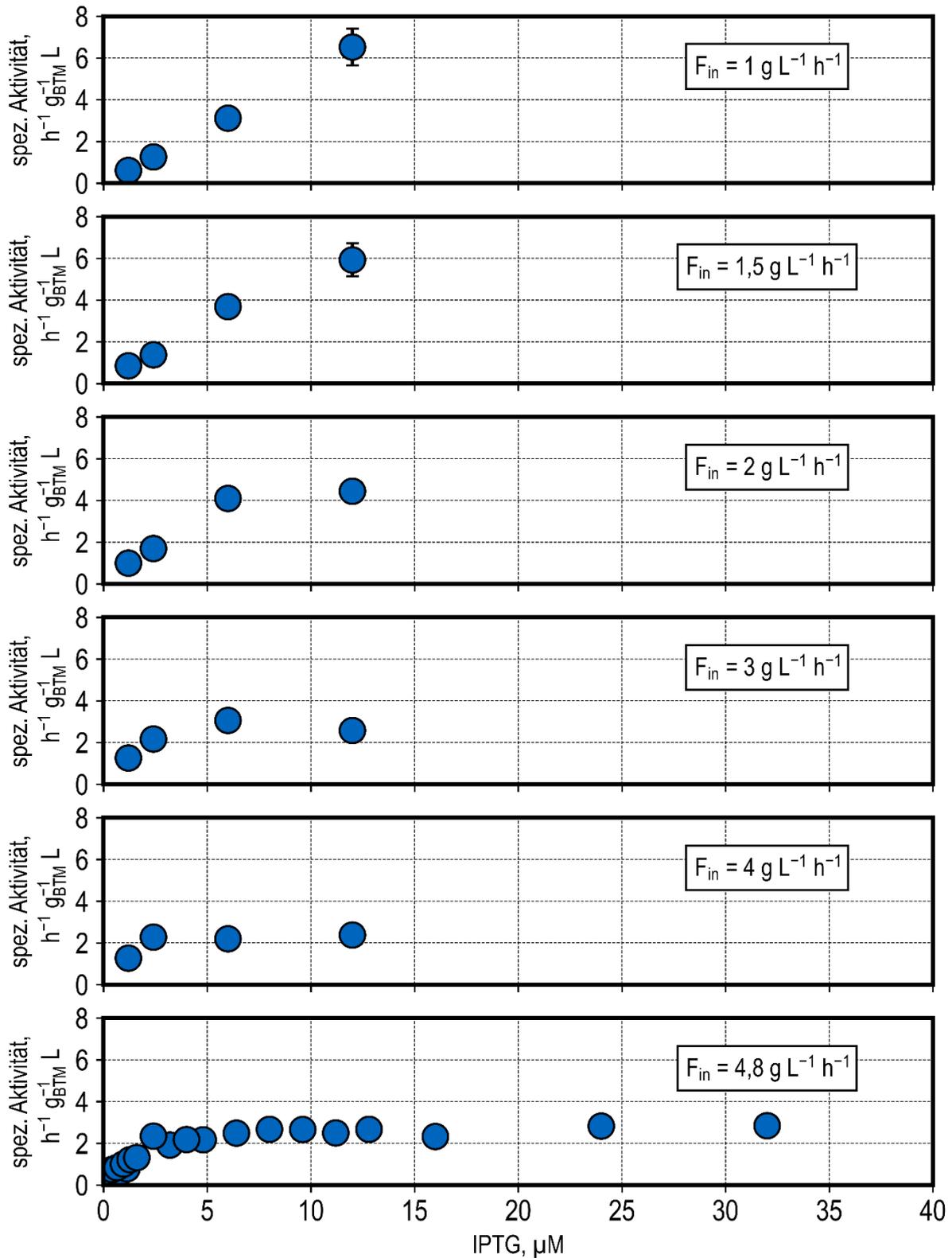


Abbildung 26: Spezifische NoCAR-Enzymaktivität bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* NoCAR. Jeder Punkt entspricht der biomassespezifischen Anfangsaktivität bei einer bestimmten Induktorkonzentration und Zulauftrate. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus 4 bis 8 unabhängigen Bioreaktoren. Bei den Fehlergrenzen handelt es sich um 90%ige Glaubwürdigkeitsintervalle.

Hohe Zulaufraten in der Expressionsphase führen grundsätzlich zu niedrigeren spezifischen NoCAR-Enzymaktivitäten. Gleichzeitig führt eine höhere IPTG-Konzentration zu höheren

spezifischen NoCAR-Aktivitäten, solange die Zulauftrate nicht zu hoch gewählt wurde. So wurde bei einer Zulauftrate von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ein Plateau von etwa $3 \text{ L h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ erreicht. Bei Zulauftraten von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde ein solches Plateau nicht beobachtet.

Eine spekulative Ursache dafür könnte sein, dass das Protein NoCAR, welches eine starke Neigung zur Bildung von Einschlusskörperchen hat (Weber et al., 2021), bei einer niedrigen Zulauftrate in korrekt gefalteter, aktiver Form vorliegt. Bei hohen Zulauftraten hingegen kann möglicherweise mehr Protein gebildet werden, dies liegt aber in unlöslicher, inaktiver Form vor. Dies könnte nach dem Ende der Proteinexpression durch die Beobachtung der Zellen im Lichtmikroskop nachgewiesen. Im vorliegenden Versuchsaufbau war dies jedoch nicht möglich, da die Zellen unmittelbar nach der Expression vom Roboter für die Ganzzellbiotransformation weiterverwendet wurden.

Die spezifischen Aktivitäten erlauben jedoch nur bedingt einen Rückschluss auf die absolut erreichten Aktivitäten, da am Ende der Proteinexpression durch die unterschiedlichen Zulauftraten Zelldichten von $20 - 40 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurden.

In Abbildung 27 sind die nach der Expressionsphase erzielten Gesamtaktivitäten von NoCAR zusammengestellt.

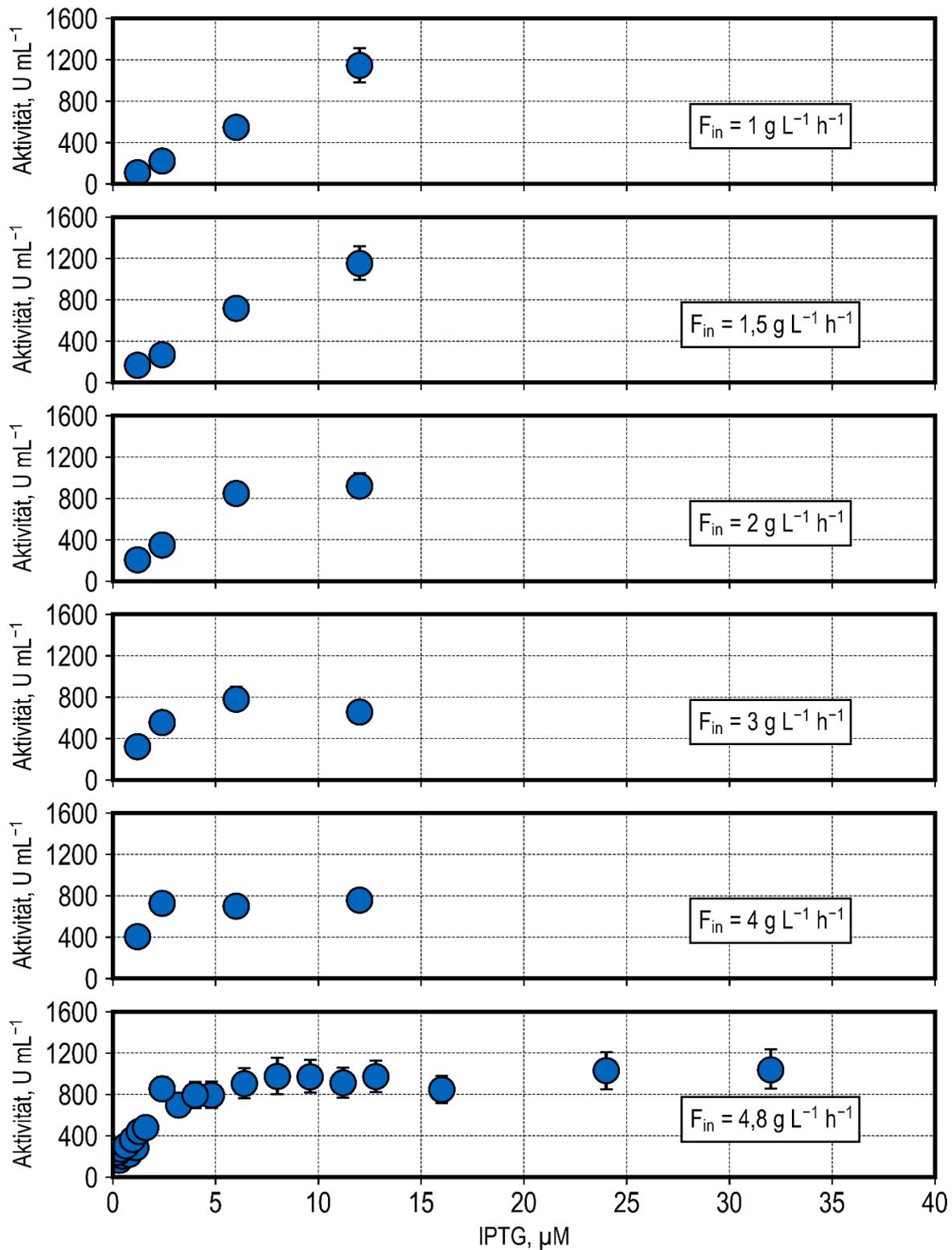


Abbildung 27: Gesamt NoCAR-Enzymaktivität bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* NoCAR. Jeder Messpunkt entspricht der volumetrischen Anfangsaktivität bei einer bestimmten Induktorkonzentration und Zulauftrate. Das Volumen wurde auf die Bioreaktoren bezogen, aus denen die Proben entnommen wurden. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus 4 bis 8 unabhängigen Bioreaktoren. Bei den Fehlergrenzen handelt es sich um 90%ige Glaubwürdigkeitsintervalle. Die Anfangsaktivität wurde berechnet mit einer Substratkonzentration von 2,5 mM.

Es lässt sich beobachten, dass eine gewisse Menge an IPTG zugegeben werden muss, um unter den vorliegenden Bedingungen vollständige Proteinexpression hervor zu rufen. So unterscheidet sich die beobachtete Aktivität bei einer Zulauftrate von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab einer Induktorkonzentration von ca. $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ nicht mehr bei steigender Induktorzugabe. Ein ähnliches Verhalten wurde bei niedrigeren Zulaufraten beobachtet, wobei der Punkt, ab dem die Aktivität durch die Zugabe von mehr Induktor nicht mehr gesteigert werden kann, sich zu höheren Induktorkonzentrationen verschiebt. So lässt sich bei einer Zulauftrate von $2 - 3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine hinreichende Induktorkonzentration von etwa $7 \text{ }\mu\text{M}$ beobachten. Interessanterweise ist ein solches Plateau bei der Aktivität bei den beiden niedrigsten Zulaufraten ($1,5$ und $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nicht zu beobachten, im Gegenteil wurde dort bei einer Zulauftrate von $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und der maximal untersuchten Induktorkonzentration von $12 \text{ }\mu\text{M}$ die mit 1152 U mL^{-1} höchste Anfangsaktivität beobachtet. Dies ist insoweit bemerkenswert, als dass die erreichte Zelldichte bei der Zulauftrate nur etwa die Hälfte der Zelldichte bei der höchsten Zulauftrate entsprach.

Diskussion

Das bedeutet, dass die spezifische Aktivität bei der niedrigsten Zulauftrate am größten gewesen sein muss. In einer prozesstechnisch vergleichsweise einfachen Expression mit Komplexmedium in stark gekühlten ($18 \text{ }^\circ\text{C}$) Schüttelkolben wurde eine maximale volumetrische Aktivität von etwa 26 U mL^{-1} gemessen (Weber et al., 2021). Dabei wurde jedoch auch festgestellt, dass die korrekte Faltung des vergleichsweise großen (130 kDa) Proteins für *E. coli* eine Herausforderung darstellt. Das könnte erklären, weshalb bei der geringsten Zulauftrate die höchste Aktivität beobachtet wurde. Möglicherweise lag das Protein bei höheren Zulaufraten in Einschlusskörperchen vor, die typischerweise keine enzymatische Aktivität aufweisen (Bhatwa et al., 2021). Oft kann man die Bildung von Protein in nicht löslicher Form mikroskopisch beobachten, dies war in dem vorliegenden Versuchsaufbau durch den hohen Automationsgrad nicht möglich.

Es ist festzustellen, dass mit etwa 1152 U mL^{-1} eine deutlich größere Aktivität als bei der Expression im Schüttelkolben mit 26 U mL^{-1} beobachtet wurde (Weber et al., 2021). Diese Steigerung um mehr als den Faktor 40 könnte verschiedene Ursachen haben. So gibt es Hinweise darauf, dass eine stringente pH-Regelung während der Proteinexpression, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, die Bildung von Protein in nicht löslicher Form reduziert (Strandberg and Enfors, 1991). Außerdem könnte die Verwendung eines limitierenden Substratzulaufs in definiertem Medium ebenfalls zu einer erfolgreichen Proteinfaltung beigetragen haben (Neubauer and Winter, 2001). Außerdem wurden in dem vorliegenden Prozess wahrscheinlich sehr viel höhere Zelldichten erreicht als im Schüttelkolben.

Da bei den Zulaufdaten von 1 und 1,5 g L⁻¹ h⁻¹ kein Plateau hinsichtlich der Induktorkonzentration erreicht wurde, bleibt die Frage, ob eine höhere Induktorkonzentration unter diesen Expressionsbedingungen zu noch besserer Enzymaktivität führen würde.

Bei dem vorliegenden Versuch konnten innerhalb von vier Wochen 192 Proteinexpressionen mit insgesamt 264 Ganzzellbiotransformationen durchgeführt werden. Bei einer Arbeitsweise, bei der pro Reaktor im L-Maßstab eine Woche Arbeitszeit nötig wäre, hätte dies mehrere Jahre Arbeit bedeutet. Die standardisierte Produktion von Biomasse in Rührkesselreaktoren im L-Maßstab ermöglichte es, die Expressionsleistungen eindeutig auf die unterschiedlichen Bedingungen während der Expressionsphase zurück zu führen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Proteine sind die wichtigste Klasse von Biomolekülen, die in allen Zellen als molekulare Werkzeuge dienen. Sie werden daher biotechnologisch genutzt und mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellt.

Um geeignete Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, Substratzugabe...) für die mikrobielle Produktion von Proteinen zu finden, findet Bioprozessentwicklung im Labor statt. Dafür können Rührkesselreaktoren im L-Maßstab, Schüttelkolben, Mikrotiterplatten oder miniaturisierte Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab verwendet werden.

Bei einer typischen Proteinproduktion werden in einem Bioreaktor zunächst die Mikroorganismen hergestellt, bevor die Produktion des Zielproteins in den Zellen durch Zugabe eines Induktors gestartet wird. Die Zellbildungsphase ist dabei typischerweise spezifisch für den jeweiligen Mikroorganismus. Die Proteinbildungsphase ist typischerweise spezifisch für das zu produzierende Protein und die Art, wie das Expressionssystem molekular gestaltet wurde. Da die Proteinexpression im Prozess auf die Zellbildungsphase folgt, kann die biologische Streuung der Zellbildungsphase die anschließende Expressionsphase beeinflussen. Dadurch kann es unklar sein, ob beobachtete Veränderungen in den gebildeten Proteinmengen auf die Zellbildungsphase oder auf die Expressionsphase zurück zu führen sind.

Daher ist die Zielsetzung dieser Arbeit eine geeignete Kombination und Automatisierung von parallel betriebenen Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab, um eine sichere und effiziente Identifikation von Reaktionsbedingungen für die optimale Proteinexpression zu ermöglichen. Die Zellbildungsphase erfolgt dabei idealerweise im L-Maßstab, um einen definierten, identischen Ausgangspunkt für die Expressionsphase zu erzeugen. Im parallelen Rührkesselreaktorsystem im mL-Maßstab erfolgen anschließend Untersuchungen zur Proteinproduktion, da durch die große Anzahl parallel nutzbarer Reaktoren eine große Anzahl Variablen variiert werden können.

Zur technischen Realisierung und Automatisierung waren hierzu erforderlich:

- Eine geeignete technische Lösung, um Zellsuspensionen aus Rührkesselreaktoren im L-Maßstab automatisiert in Parallelbioreaktoren im mL-Maßstab transferieren zu können
- Eine geeignete Schnittstelle zur Nutzbarmachung einer Ablaufsteuerung für den zur Automatisierung des Parallelbioreaktorsystems im mL-Maßstab eingesetzten Pipettierroboter

- Ein digitaler Zwilling des Pipettierroboters, um die Funktionsfähigkeit der Experimente zur Proteinexpression schon bei der Versuchsgestaltung sicherstellen zu können

Die Kombination von Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab zur Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen für die Proteinexpression erfolgte anhand von zwei Prozessbeispielen. Als erstes Prozessbeispiel wurde die Produktion des Proteins mCherry mithilfe von *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgewählt, da mCherry sich einfach durch Fluoreszenzmessung quantifizieren lässt. Als zweites Prozessbeispiel wurde die Produktion einer Carboxyl Reduktase aus *Nocardia otitidiscaviarium* (NoCAR) in *E. coli* gewählt, da die von NoCAR katalysierten Reaktionen vielfältige Anwendungen in der Industrie finden.

Für den automatisierten Transfer von Zellen aus bis zu vier Parallel-Rührkesselreaktoren im L-Maßstab in bis zu 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab wurden spezielle Transferbehälter aus autoklavierbarem Kunststoff konstruiert und im 3D-Druckverfahren hergestellt, die auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters positioniert wurden. In diese wurde durch eine Mehrkanalpumpe der Reaktorinhalt aus dem L-Maßstab gefördert, welcher anschließend durch Pipettiervorgänge des Roboters auf die Parallelreaktoren im mL-Maßstabs verteilt werden konnte. Durch die Synchronisation des Pumpvorgangs aus den Rührkesselreaktoren im L-Maßstab mit der Pipettieraktivität des Pipettierroboters konnte das Volumen der Transferbehälter soweit reduziert werden, dass vier Transferbehälter auf der Fläche einer SBS-Position (einer Standardgrundfläche bei Laborrobotern, 127,76 mm x 85,48 mm) Platz fanden. Durch die füllstandssensorgesteuerte Regelung des Transfervorgangs durch den Pipettierroboter war der Zelltransfer robust gegenüber ungenauer oder driftender Pumpenförderung. Der gesamte Transferprozess dauerte für alle 48 Reaktoren im mL-Maßstab etwa 25 Minuten. Durch den geringen Preis (etwa 2 Euro Materialkosten) und einfache Zugänglichkeit (etwa sechs Stunden Druckzeit pro Behälter) der Transferbehälter besteht auch die Möglichkeit, diese als Einwegware zu verwenden. Es wurde gezeigt, dass eine Transferdauer von 30 Minuten unter beispielhaft eingestellten Expressionsbedingungen ($5 \mu\text{M}$ IPTG, $F_{\text{in}} = 2,4 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\text{DO} > 30 \%$) keinen Einfluss auf die Proteinexpression oder Biomassebildung bei *E. coli* mCherry hat.

Um die in einem parallelen Forschungsvorhaben erarbeitete prioritätsbasierte Ablaufsteuerung (Bromig et al., 2022) beim Betrieb der Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab zu nutzen, wurde eine Schnittstelle des Pipettierroboters für die Ablaufsteuerung erstellt. Dafür wurde ein Plugin für die proprietäre Steuerungssoftware des Pipettierroboters geschrieben, welches den Roboter als Client innerhalb des modernen Kommunikationsframeworks gRPC agieren lässt. Dieses Plugin basiert auf der programmiersprachenagnostischen Schnittstellenbeschreibungssprache protobuf, wodurch der Roboter mit nahezu allen modernen Programmiersprachen vernetzt werden kann. Für die Nutzung der Ablaufsteuerung

wurde außerdem ein Kommunikationsserver geschrieben, welcher die von der Ablaufsteuerung erhaltenen Aufgaben an den Pipettierroboter weiterreichte. Der Kommunikationsserver agierte vollständig ereignisgesteuert. Durch die ereignisgesteuerte Implementierung ergab sich eine Verzögerung von nur 30 Millisekunden zwischen der Verfügbarkeit des Roboters und dem weiteren Arbeiten des Roboters nach Erhalt eines neuen Auftrags. Diese ist vernachlässigbar gegenüber der Arbeitsgeschwindigkeit des Roboters.

Für die Ablaufsteuerung wurde eine Methodenbibliothek innerhalb der Software des Pipettierroboters geschrieben, welche alle Tätigkeiten bei typischen Kultivierungen im Bioreaktorsystem im mL-Maßstab ermöglicht. Eine Methode beschreibt dabei abstrakt eine Robotertätigkeit (Substratdosierung, pH-Regelung, Probenahme oder Induktion) mit allen für den Roboter nötigen Einstellungen und der Möglichkeit, die Zielreaktoren und –volumina durch die Ablaufsteuerung zu parametrisieren. Die Methodenbibliothek umfasste mehrere verschiedene Formen der Probenahme, pH-Regelung mit Säure und Base sowie die Zugabe von Induktor oder Substrat. Alle Methoden waren mit beliebigen Reaktorkombinationen von 1 bis 48 Reaktorpositionen ausführbar und waren gegen falsche Parametrisierung durch die Ablaufsteuerung gesichert.

Um als Integrationstest im Sinne der Softwaretestung zu dienen sowie für die *in silico* Versuchsplanung wurde ein einfacher digitaler Zwilling des Pipettierroboters geschrieben. Dieser benötigte grundsätzlich zwei Dinge: Eine identische Schnittstelle zur Ablaufsteuerung und ein einfaches Modell des Roboters, welches sein Verhalten beschreibt. Die Schnittstelle ergab sich aus der oben erwähnten abstrakten Schnittstellenbeschreibung. Als einfaches Modell der Robotertätigkeit aus Sicht der Ablaufsteuerung wurden Algorithmen erarbeitet, die die Tätigkeitsdauer des Pipettierroboters in Abhängigkeit von der Parametrisierung durch die Ablaufsteuerung beschreiben. Als wesentliche Einflussgröße wurden der Methodename und die Anzahl der zu bearbeitenden Reaktoren identifiziert. Mit diesen konnte der digitale Zwilling die Tätigkeit des Pipettierroboters sowohl in Echtzeit als auch bis zu einer 10-fachen Beschleunigung simulieren. Dies konnte als erste Abschätzung darüber dienen, ob eine gewählte Konfiguration des Bioreaktorblocks ohne Überlastung des Pipettierroboters ausführbar ist.

Für die Softwaretestung wurde ein Zugriff auf die Konfigurationsdateien der Ablaufsteuerung realisiert, bei denen basierend auf der aktuell vorliegenden Konfiguration die Befehle der Ablaufsteuerung auf Plausibilität geprüft wurden. Dadurch war es möglich, bei neueren Versionen der Ablaufsteuerung vollautomatisch die meisten Abläufe zu prüfen, die ein Nutzer sonst bei der praktischen Erprobung der Software im Labor erfahren hätte.

Diese automatisierte Kombination von parallel betriebenen Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab mit automatisiertem Zelltransfer wurde zur Untersuchung der Proteinexpression des

fluoreszierenden Proteins mCherry in *E. coli* angewandt. Dabei wurde zuerst im L-Maßstab die Biomasse in einem Zulaufprozess produziert. Anschließend erfolgte der automatische Transfer des Reaktorinhalts auf den mL-Maßstab, bei dem dann im Parallelansatz die Reaktionsbedingungen variiert wurden. Hierbei wurde der Einfluss der Wachstumsrate während der Zellbildungsphase auf die anschließende Proteinexpression und der Einfluss der Induktorkonzentration auf die Proteinbildung untersucht. Hierzu wurden lediglich zwei automatisierte Parallelexperimente durchgeführt.

So wurden in einem ersten Parallelexperiment zehn verschiedene Induktorkonzentrationen von 1,36 μM - 18,18 μM im mL-Maßstab untersucht, wobei die *E. coli* Zellen zuerst im L-Maßstab mit einer Wachstumsrate von 0,1 h^{-1} erzeugt wurden. Dabei wurde beobachtet, dass bereits ab einer Zugabe von 9 μM IPTG keine weitere Steigerung der maximalen Proteinproduktivität erreicht wurde. Bei einer geringeren Induktorkonzentration verringerte sich die Proteinproduktivität kontinuierlich. Zum Zeitpunkt der Induktion lag eine Biomassekonzentration von etwa 13 g L^{-1} vor, nach Ende der Expression stieg diese auf etwa 30 g L^{-1} .

In einem zweiten Parallelexperiment mit *E. coli* mCherry wurde der Einfluss der Wachstumsrate von 0,1 - 0,2 h^{-1} im 4-fach parallelen L-Maßstab auf die folgende Proteinexpression im mL-Maßstab bei verschiedenen Induktorkonzentrationen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass bei geringen (< 4 μM) oder hohen (> 10 μM) Induktorkonzentrationen kein Unterschied bei der zellspezifischen Proteinproduktivität vorlag. Im Konzentrationsbereich dazwischen wurde bei der höchsten gewählten Zulauftrate von 0,2 h^{-1} eine signifikant niedrigere zellspezifische Proteinproduktivität beobachtet. Dies könnte in dem vorliegenden Versuch jedoch auch daran gelegen haben, dass eine unerwartet hohe Zellkonzentration bei der höchsten untersuchten Zulauftrate erreicht wurde.

Mit der Kombination von Rührkesselreaktoren im L- und mL-Maßstab konnten die Untersuchungen zu *E. coli* mCherry in lediglich zwei Parallelexperimenten von jeweils einer Woche Arbeitszeit durchgeführt werden. Bei einer typischen Vorgehensweise im Labor unter Nutzung von einzelnen L-Reaktoren wäre für die gleiche Datenmenge etwa zwei Jahre Arbeit nötig.

Weiterhin wurde die automatisierte Kombination von parallel betriebenen Rührkesseln im L- und mL-Maßstab mit automatisiertem Zelltransfer für die Expression einer Carboxylreduktase (NoCAR) in *E. coli* eingesetzt. Nachdem die *E. coli* Zellen zuerst im L-Maßstab mit einer Wachstumsrate von 0,1 h^{-1} im Zulaufverfahren hergestellt und dann automatisiert auf die Parallelreaktoren transferiert wurden, wurde der Einfluss der Induktorkonzentration und der Zulauftrate während der Proteinexpression untersucht. Die Expression wurde durch eine automatisierte Aktivitätsbestimmung von NoCAR in Ganzzellbiotransformationen von Zellen,

die am Ende der Expressionsphase aus den Reaktoren im mL-Maßstab entnommen wurden, untersucht. Die Aktivität der NoCAR wurde in einer Ganzzellbiotransformation in einer „Deep-Well-Plate“ (DWP) mit 3-Hydroxybenzoesäure als Referenzsubstrat durchgeführt. Das entstehende Produkt 3-Hydroxybenzaldehyd wurde photometrisch gemessen.

In insgesamt vier Parallelexperimenten wurden 40 Expressionsbedingungen in 192 unabhängigen Rührkesselreaktoren mit unterschiedlichen Induktorkonzentrationen und Zulaufraten im mL-Maßstab untersucht. Die Ergebnisse der anschließenden 264 Biotransformationen wurden durch den Kooperationspartner am Forschungszentrum Jülich ausgewertet, sodass die zellspezifischen und Gesamtzymaktivitäten abgeschätzt werden konnten. Es wurden Zulaufraten von 1,0 - 4,8 g Glucose L⁻¹ h⁻¹ und Induktorkonzentrationen von 0,24 - 32 µM untersucht.

Hohe Glucosezulaufraten in der Expressionsphase von *E. coli* führten bei einer Startbiomassekonzentration von etwa 13 g L⁻¹ grundsätzlich zu niedrigeren spezifischen NoCAR-Enzymaktivitäten. Gleichzeitig führten höhere Induktorkonzentrationen zu höheren spezifischen NoCAR-Aktivitäten, solange die Zulauftrate nicht zu hoch gewählt wurde.

Die höchste Gesamtzymaktivität von etwa 1152 U mL⁻¹ wurde bereits bei einer niedrigen Zulauftrate von 1,5 g Glucose L⁻¹ h⁻¹ und einer Induktorkonzentration von 12 µM IPTG erreicht. Diese Enzymaktivität ist etwa um den Faktor 40 höher als bisher in der Literatur beschrieben (Weber et al., 2021). Ähnlich wie bei der Expression von mCherry wurde bei der Gesamtaktivität beobachtet, dass eine gewisse Mindestkonzentration an Induktor erforderlich ist, um eine Proteinexpression, die sich auch bei höheren IPTG-Zugaben nicht weiter steigern lässt, zu ermöglichen. Bei der Expression von NoCAR schien diese Mindestkonzentration jedoch von der Zulauftrate abzuhängen: Bei niedrigen Zulaufraten (1 – 1,5 g Glucose L⁻¹ h⁻¹) führte eine Erhöhung der Induktorkonzentration im untersuchten Bereich immer zu einer Steigerung der Gesamtzymaktivität, wohingegen bei allen anderen Zulaufraten ein Plateau erreicht wurde, bei dem eine Steigerung der Induktorkonzentration keine Veränderung der Gesamtzymaktivität mehr ergab. Ähnlich wie bei mCherry sank die Gesamtzymaktivität kontinuierlich, wenn die Induktorkonzentration zu niedrig war.

Anhand der Ergebnisse der Expression des Enzyms NoCAR lässt sich die Laborzeiterparnis der automatisierten Rührkesselkaskade mit dem typischen manuellen Vorgehen mit Rührkesselreaktoren im L-Maßstab vergleichen. Die in dieser Arbeit durchgeführten vier Parallelexperimente haben insgesamt 4 Wochen gedauert und es wurden 192 Rührkesselreaktoren betrieben. Bei einer typischen Arbeitsgeschwindigkeit bei manueller Arbeit im L-Maßstab würde man pro Kultivierung etwa eine Woche benötigen. Das bedeutet, dass für ähnliche Daten 192 Wochen oder vier Jahre ununterbrochene Kultivierungsarbeit

investiert werden müssten. Dies zeigt den Geschwindigkeitsvorteil, den die automatisierte Rührkesselkaskade für die Untersuchung der mikrobiellen Proteinexpression birgt.

Ausblick

Die Softwareintegration des Pipettierroboters für die Nutzung der prioritätsbasierten Ablaufsteuerung bietet insbesondere im Bereich des erstellten digitalen Zwillings noch Entwicklungspotential. Die Funktionen, mit denen der Pipettierroboter die Arbeitszeit basierend auf historischen Daten abschätzt, sind für diese Arbeit halbautomatisch erzeugt worden. Ein hilfreicher Schritt wäre es, wenn diese Funktionen während eines Prozesses oder am Ende eines Prozesses automatisch erzeugt werden könnten. Dafür müsste eine beteiligte Softwarekomponente (Ablaufsteuerung, Austauschserver oder Pipettierroboter) in die Lage versetzt werden, automatisch abzuschätzen, mit welchen Funktionen eine bestimmte Methode approximiert werden kann. Möglicherweise könnte das eine Anwendung von Bayes'scher Statistik sein, da damit basierend auf einer plausiblen Eingangsannahme („Arbeitszeit ist proportional zu Anzahl der verwendeten Positionen“) eine iterative Verbesserung bei Vorliegen von weiteren Datenpunkten erzielt werden kann.

Für den digitalen Zwilling mussten die Treiber aller beteiligten Geräte über Simulationsmodi verfügen, mit denen interagiert werden kann. Die Simulationsmodi der Treiber schicken plausible Antworten, ohne tatsächlich das reale Gerät zu betreiben. Die Antworten basierten dabei auf historischen Prozessdaten oder Zufallsberechnungen. Es wäre allerdings sinnvoll, für die Simulation der Bioprozesse im mL-Maßstab die Treiber der beteiligten Geräte (pH/pO₂-Messriegel sowie Steuergerät der Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab) soweit zu verbessern, dass sie tatsächlich auf die Aktionen des digitalen Zwillings des Pipettierroboters reagieren. So simulierte das Steuergerät der Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab zufällig den Ausfall einzelner Rührerpositionen, konnte aber nicht darauf reagieren, wenn ein Rührerneustart erfolgte. In der Realität lässt sich der Ausfall einzelner Rührerpositionen oft durch den Neustart des Rührvorgangs korrigieren. Genauso ist der pH-Verlauf typischerweise eine Funktion der Stellmittelzugabe und des Biomassewachstums und sollte sich daher durch die Aktivität des Pipettierroboters beeinflussen lassen. Das bedeutet, dass eine simulierte Stellmittelzugabe durch den digitalen Zwilling auch zu einer entsprechenden pH-Veränderung führen sollte. Dafür müsste man innerhalb der Treiber einfache Modelle für die zugrundeliegenden physikalischen und mikrobiellen Prozesse hinterlegen, um eine verbesserte *in silico* Versuchsplanung zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Software wo immer möglich in der Programmiersprache Python geschrieben, da diese im wissenschaftlichen Bereich sehr verbreitet ist, alle modernen Programmierdogmen unterstützt und eine reichhaltige Bibliothek an frei nutzbaren Softwarepaketen beinhaltet. Allerdings unterstützt Python Typkontrollen nur sehr rudimentär

und erzeugt als interpretierte Programmiersprache nahezu nur Fehler zur Ausführungszeit. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, bei allen nicht-trivialen Softwareprojekten zum frühestmöglichen Zeitpunkt automatisierte Softwaretests einzuplanen, um die unvermeidbar entstehenden Softwarefehler nicht in der praktischen Laborarbeit beobachten zu müssen. Sonst besteht die Gefahr, dass die Geschwindigkeit der Softwareentwicklung mit steigender Projektdauer und Softwarekomplexität stark abnimmt. Die Alternative, auf stärker typisierte und kontrollierte Sprachen auszuweichen, würde die Entwicklungshürde zur ersten funktionsfähigen Software deutlich erhöhen und erscheint daher nicht sinnvoll.

Für die Analytik von Bioprozessen kommen mitunter sehr komplexe Verfahren wie z.B. die Analyse des mikrobiellen Proteoms durch massenspektrometrische Methoden oder des mikrobiellen Transkriptoms durch Sequenzierung der transkribierten RNA zum Einsatz. Diese Verfahren beinhalten normalerweise eine Vielzahl von Verarbeitungsschritten (Zugabe von Reagenzien, Verdünnungen...) der Proben. Diese Verarbeitung kann grundsätzlich durch Pipettierroboter durchgeführt werden, ein Pipettierroboter kann jedoch keine Proben aus Reaktoren im L-Maßstab entnehmen.

Daher könnte das Transfersystem mit wenig Aufwand dafür genutzt werden, anspruchsvolle analytische Verfahren für Reaktoren im L-Maßstab verfügbar zu machen. Dafür würde das Transfersystem statt für den vollständigen Transfer des Reaktorinhalts lediglich als für den Roboter zugängliche Probenahme-position agieren. Eine ähnliche Kopplung wurde für einen einfachen kolorimetrischen Assay bereits veröffentlicht (Morschett et al., 2021), das dortige Verfahren benötigt allerdings Veränderungen an den teuren Glaskörpern der Reaktoren, was den Aufwand zur Anwendung erhöht.

Für die Integration insbesondere von Transkriptomsequenzierungen in vollautomatische Arbeitsabläufe im L- oder mL-Maßstab spricht besonders, dass die dort verwendeten Geräte in den letzten Jahren extrem kompakt geworden sind. Ein Sequenziergerät der Firma Oxford Nanopore Technologies (Oxford, England) benötigt etwa eine Standfläche eines modernen Mobiltelefons (MinION, 105 x 23 x 33 mm) und lässt sich dadurch sehr einfach im Arbeitsbereich eines Pipettierroboters platzieren. Die Arbeitsabläufe, um von dem Reaktorinhalt zum Transkriptom zu kommen (Zellaufschluss, RNA-Extraktion, RNA-Präparation), sind teilweise bereits vollautomatisch im Einsatz oder bieten großes Potential automatisiert zu werden (Jansen et al., 2020; Sellin Jeffries et al., 2014).

7 Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., (2014) What's fueling the biotech engine—2012 to 2013. *Nature Biotechnology* 32, 32-39.

Alsayyari, A.A., Pan, X., Dalm, C., van der Veen, J.W., Vriezen, N., Hageman, J.A., Wijffels, R.H., Martens, D.E., (2018) Transcriptome analysis for the scale-down of a CHO cell fed-batch process. *Journal of Biotechnology* 279, 61-72.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *nature* 473, 174-180.

Bareither, R., Pollard, D., (2011) A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: Current state and future need. *Biotechnology Progress* 27, 2-14.

Berdichevsky, M., d'Anjou, M., Mallem, M.R., Shaikh, S.S., Potgieter, T.I., (2011) Improved production of monoclonal antibodies through oxygen-limited cultivation of glycoengineered yeast. *Journal of Biotechnology* 155, 217-224.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr, G.J., Stryer, L., (2018) Zusammensetzung und Struktur der Proteine. In: Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr, G.J., Stryer, L. (Eds.), *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 31-77.

Betts, J., Warr, S., Finka, G., Uden, M., Town, M., Janda, J., Baganz, F., Lye, G., (2014) Impact of aeration strategies on fed-batch cell culture kinetics in a single-use 24-well miniature bioreactor. *Biochemical engineering journal* 82, 105-116.

Betts, J.I., Baganz, F., (2006) Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial cell factories* 5, 1-14.

Bhattacharya, S.K., Dubey, A.K., (1995) Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. *Biotechnology Letters* 17, 1155-1160.

Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y.I., Abraham, N., Li, X.-Z., Zhou, T., (2021) Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 65.

Bogue, R., (2012) Robots in the laboratory: A review of applications. *Industrial Robot: An International Journal*.

Bromig, L., von den Eichen, N., Weuster-Botz, D., (2022) Control of parallelized bioreactors I: dynamic scheduling software for efficient bioprocess management in high-throughput systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-11.

Büchs, J., (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7, 91-98.

Chen, A., Chitta, R., Chang, D., Amanullah, A., (2009) Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering* 102, 148-160.

Chen, Y., Yang, O., Sampat, C., Bhalode, P., Ramachandran, R., Ierapetritou, M., (2020) Digital Twins in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Manufacturing: A Literature Review. *Processes* 8.

Chmiel, H., Takors, R., Weuster-Botz, D., (2018) *Bioprozesstechnik*. Springer.

- Choi, J.H., Jeong, K.J., Kim, S.C., Lee, S.Y., (2000) Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 640-645.
- Choi, J.H., Keum, K.C., Lee, S.Y., (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61, 876-885.
- Chory, E.J., Gretton, D.W., DeBenedictis, E.A., Esvelt, K.M., (2020) Flexible open-source automation for robotic bioengineering. *bioRxiv*, 2020.2004.2014.041368.
- Damasceno, L.M., Huang, C.-J., Batt, C.A., (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 31-39.
- Durany, O., Caminal, G., de Mas, C., López-Santín, J., (2004) Studies on the expression of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry* 39, 1677-1684.
- Eiteman, M.A., Altman, E., (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology* 24, 530-536.
- Faust, G., Janzen, N.H., Bendig, C., Römer, L., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D., (2014) Feeding strategies enhance high cell density cultivation and protein expression in milliliter scale bioreactors. *Biotechnology Journal* 9, 1293-1303.
- Faust, G., Stand, A., Weuster-Botz, D., (2015) IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences* 15, 824-829.
- Förster, A.H., Gescher, J., (2014) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2, 16.
- Fricke, J., Pohlmann, K., Tatge, F., Lang, R., Faber, B., Luttmann, R., (2011) A multi-bioreactor system for optimal production of malaria vaccines with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal* 6, 437-451.
- Funke, M., Buchenauer, A., Schnakenberg, U., Mokwa, W., Diederichs, S., Mertens, A., Müller, C., Kensy, F., Büchs, J., (2010) Microfluidic biolector—microfluidic bioprocess control in microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering* 107, 497-505.
- Funke, M., Diederichs, S., Kensy, F., Müller, C., Büchs, J., (2009) The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 1118-1128.
- Gebhardt, G., Hortsch, R., Kaufmann, K., Arnold, M., Weuster-Botz, D., (2011) A new microfluidic concept for parallel operated milliliter-scale stirred tank bioreactors. *Biotechnology Progress* 27, 684-690.
- Haby, B., Hans, S., Anane, E., Sawatzki, A., Krausch, N., Neubauer, P., Cruz Bournazou, M.N., (2019) Integrated Robotic Mini Bioreactor Platform for Automated, Parallel Microbial Cultivation With Online Data Handling and Process Control. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 24, 569-582.
- Hans, S., Ulmer, C., Narayanan, H., Brautaset, T., Krausch, N., Neubauer, P., Schäffl, I., Sokolov, M., Cruz Bournazou, M.N., (2020) Monitoring parallel robotic cultivations with online multivariate analysis. *Processes* 8, 582.
- Hellmuth, K., Korz, D., Sanders, E.A., Deckwer, W.D., (1994) Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *Journal of Biotechnology* 32, 289-298.
- Hemmerich, J., Adelantado, N., Barrigón, J.M., Ponte, X., Hörmann, A., Ferrer, P., Kensy, F., Valero, F., (2014) Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microbioreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase. *Microbial Cell Factories* 13, 36.

- Hemmerich, J., Labib, M., Steffens, C., Reich, S.J., Weiske, M., Baumgart, M., Rückert, C., Ruwe, M., Siebert, D., Wendisch, V.F., (2020) Screening of a genome-reduced *Corynebacterium glutamicum* strain library for improved heterologous cutinase secretion. *Microbial biotechnology* 13, 2020-2031.
- Hemmerich, J., Noack, S., Wiechert, W., Oldiges, M., (2018) Microbioreactor systems for accelerated bioprocess development. *Biotechnology Journal* 13, 1700141.
- Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfer, U., Kujau, M., Wenderoth, R., Müller, K., Matzku, S., Plückthun, A., Riesenberger, D., (1996) High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 524-532.
- Hortsch, R., Stratmann, A., Weuster-Botz, D., (2010) New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnology and bioengineering* 106, 443-451.
- Hortsch, R., Weuster-Botz, D., (2011) Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied microbiology and biotechnology* 90, 69-76.
- Hortsch, R., Weuster-Botz, D., (2010) Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnology progress* 26, 595-599.
- Hsu, W.-T., Aulakh, R.P., Traul, D.L., Yuk, I.H., (2012) Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology* 64, 667-678.
- Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Werner, T., Mayr, T., Wolfbeis, O.S., (2000) Optical sensor for seawater salinity. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 368, 196-202.
- Huber, R., Ritter, D., Hering, T., Hillmer, A.-K., Kensy, F., Müller, C., Wang, L., Büchs, J., (2009) Robo-Lector—a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microbial cell factories* 8, 1-15.
- Isett, K., George, H., Herber, W., Amanullah, A., (2007) Twenty-four-well plate miniature bioreactor high-throughput system: assessment for microbial cultivations. *Biotechnology and bioengineering* 98, 1017-1028.
- Jansen, R.P., Müller, M.F., Schröter, S.E., Kappelmann, J., Klein, B., Oldiges, M., Noack, S., (2020) Parallelized disruption of prokaryotic and eukaryotic cells via miniaturized and automated bead mill. *Engineering in Life Sciences* 20, 350-356.
- Janzen, N.H., Striedner, G., Jarmer, J., Voigtmann, M., Abad, S., Reinisch, D., (2019) Implementation of a fully automated microbial cultivation platform for strain and process screening. *Biotechnology Journal* 14, 1800625.
- Jensen, E.B., Carlsen, S., (1990) Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering* 36, 1-11.
- Jeong Ki, J., Lee Sang, Y., (1999) High-Level Production of Human Leptin by Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* and Its Purification. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3027-3032.
- Junker, B., Walker, A., Hesse, M., Lester, M., Vesey, D., Christensen, J., Burgess, B., Connors, N., (2009) Pilot-scale process development and scale up for antifungal production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32, 443-458.
- Katoh, S., Horiuchi, J.-i., Yoshida, F., (2015) *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists*. John Wiley & Sons.

- Kensy, F., Engelbrecht, C., Büchs, J., (2009) Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microbial Cell Factories* 8, 68.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, Y.K., Chang, H.N., (2004) High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26, 147-150.
- Kim, T.W., Chung, B.H., Chang, Y.K., (2005) Production of soluble human interleukin-6 in cytoplasm by fed-batch culture of recombinant *E. coli*. *Biotechnology Progress* 21, 524-531.
- Koh, B.T., Nakashimada, U., Pfeiffer, M., Yap, M.G., (1992) Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechnology Letters* 14, 1115-1118.
- Kong, F., Yuan, L., Zheng, Y.F., Chen, W., (2012) Automatic liquid handling for life science: a critical review of the current state of the art. *Journal of laboratory automation* 17, 169-185.
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A., Deckwer, W.D., (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 39, 59-65.
- Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M., Weuster-Botz, D., (2008) Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and biosystems engineering* 31, 207-215.
- Lambert, T.J., (2019) FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods* 16, 277-278.
- Lamping, S.R., Zhang, H., Allen, B., Ayazi Shamlou, P., (2003) Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chemical Engineering Science* 58, 747-758.
- Lecina, M., Sarró, E., Casablancas, A., Gòdia, F., Cairó, J.J., (2013) IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. *Biochemical Engineering Journal* 70, 78-83.
- Lee, S., Mattanovich, D., Villaverde, A., (2012) Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Microbial Cell Factories* 11, 156.
- Lee, S.Y., (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 14, 98-105.
- Li, X., Scott, K., Kelly, W.J., Huang, Z., (2018) Development of a Computational Fluid Dynamics Model for Scaling-up Ambr Bioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 23, 710-725.
- Malakar, P., Venkatesh, K., (2012) Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 93, 2543-2549.
- Micheletti, M., Lye, G.J., (2006) Microscale bioprocess optimisation. *Current opinion in biotechnology* 17, 611-618.
- Monod, J., (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology* 3, 371-394.
- Morschett, H., Jansen, R., Neuendorf, C., Moch, M., Wiechert, W., Oldiges, M., (2020) Parallelized microscale fed-batch cultivation in online-monitored microtiter plates: implications of media composition and feed strategies for process design and performance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 47, 35-47.
- Morschett, H., Tenhaef, N., Hemmerich, J., Herbst, L., Spiertz, M., Dogan, D., Wiechert, W., Noack, S., Oldiges, M., (2021) Robotic integration enables autonomous operation of laboratory scale stirred tank bioreactors with model-driven process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 118, 2759-2769.

- Moses, S., Manahan, M., Ambrogelly, A., Ling, W.L.W., (2012) Assessment of AMBRTM as a model for high-throughput cell culture process development strategy.
- Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., Märkl, H., (1997) Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied microbiology and biotechnology* 48, 597-601.
- Neubauer, P., Cruz, N., Glauche, F., Junne, S., Knepper, A., Raven, M., (2013) Consistent development of bioprocesses from microliter cultures to the industrial scale. *Engineering in Life Sciences* 13, 224-238.
- Neubauer, P., Häggström, L., Enfors, S.-O., (1995) Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 47, 139-146.
- Neubauer, P., Hofmann, K., (1994) Efficient use of lactose for the lac promotercontrolled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouth disease virus in *Escherichia coli* under fed-batch fermentation conditions. *FEMS Microbiology Reviews* 14, 99-102.
- Neubauer, P., Winter, J., (2001) Expression and Fermentation Strategies for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*. In: Merten, O.W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Neubauer, P., Porro, D., Postma, P., de Mattos, J.T., Cole, J.A. (Eds.), *Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology: selected articles from the meeting of the EFB section on microbial physiology, Semmering, Austria, 5th–8th October 2000*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 195-258.
- Nienow, A.W., Rielly, C.D., Brosnan, K., Bargh, N., Lee, K., Coopman, K., Hewitt, C.J., (2013) The physical characterisation of a microscale parallel bioreactor platform with an industrial CHO cell line expressing an IgG4. *Biochemical Engineering Journal* 76, 25-36.
- Olaofe, O.A., Burton, S.G., Cowan, D.A., Harrison, S.T.L., (2010) Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 52, 19-24.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D., Plückthun, A., (1993) Improved Bivalent Mini-antibodies, with Identical Avidity as Whole Antibodies, Produced by High Cell Density Fermentation of *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 11, 1271-1277.
- Pérez, R.E., Lasa, A.M., Rodríguez, R.S., Menéndez, E.C., Suárez, J.G., Balaguer, H.D., (2006) Scale-up of recombinant Opc protein production in *Escherichia coli* for a meningococcal vaccine. *Journal of Biotechnology* 127, 109-114.
- Pinsach, J., de Mas, C., López-Santín, J., (2008) Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: Application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochemical Engineering Journal* 41, 181-187.
- Porr, M., Lange, F., Marquard, D., Niemeyer, L., Lindner, P., Scheper, T., Beutel, S., (2021) Implementing a digital infrastructure for the lab using a central laboratory server and the SiLA2 communication standard. *Engineering in Life Sciences* 21, 208-219.
- Priebe, X., Hoang, M.D., Rüdiger, J., Turgel, M., Tröndle, J., Schwab, W., Weuster-Botz, D., (2021) Byproduct-free geraniol glycosylation by whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 43, 247-259.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D., (2005a) Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and Bioengineering* 89, 512-523.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G.T., Weuster-Botz, D., (2005b) Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42, 227-235.

- Raddatz, L., de Vries, I., Austerjost, J., Lavrentieva, A., Geier, D., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T., (2017) Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Engineering in Life Sciences* 17, 931-939.
- Rameez, S., Mostafa, S.S., Miller, C., Shukla, A.A., (2014) High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: Reproducibility, scalability, and control. *Biotechnology Progress* 30, 718-727.
- Ratcliffe, E., Glen, K., Workman, V.L., Stacey, A.J., Thomas, R., (2012) A novel automated bioreactor for scalable process optimisation of haematopoietic stem cell culture. *Journal of biotechnology* 161, 387-390.
- Riedlberger, P., Brüning, S., Weuster-Botz, D., (2013) Characterization of stirrers for screening studies of enzymatic biomass hydrolyses on a milliliter scale. *Bioprocess and biosystems engineering* 36, 927-935.
- Riesenberg, D., (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 2, 380-384.
- Riesenberg, D., Guthke, R., (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 422-430.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W.A., Pohl, H.D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A., Deckwer, W.D., (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology* 20, 17-27.
- Rohe, P., Venkanna, D., Kleine, B., Freudl, R., Oldiges, M., (2012) An automated workflow for enhancing microbial bioprocess optimization on a novel microbioreactor platform. *Microbial Cell Factories* 11, 144.
- Sawatzki, A., Hans, S., Narayanan, H., Haby, B., Krausch, N., Sokolov, M., Glauche, F., Riedel, S.L., Neubauer, P., Cruz Bournazou, M.N., (2018) Accelerated bioprocess development of endopolygalacturonase-production with *Saccharomyces cerevisiae* using multivariate prediction in a 48 mini-bioreactor automated platform. *Bioengineering* 5, 101.
- Schmideder, A., Hensler, S., Lang, M., Stratmann, A., Giesecke, U., Weuster-Botz, D., (2016) High-cell-density cultivation and recombinant protein production with *Komagataella pastoris* in stirred-tank bioreactors from milliliter to cubic meter scale. *Process Biochemistry* 51, 177-184.
- Schmideder, A., Severin, T.S., Cremer, J.H., Weuster-Botz, D., (2015) A novel milliliter-scale chemostat system for parallel cultivation of microorganisms in stirred-tank bioreactors. *Journal of Biotechnology* 210, 19-24.
- Schwendenwein, D., Rössmann, A.K., Doerr, M., Höhne, M., Bornscheuer, U.T., Mihovilovic, M.D., Rudroff, F., Winkler, M., (2019) Random Mutagenesis-Driven Improvement of Carboxylate Reductase Activity using an Amino Benzamidoxime-Mediated High-Throughput Assay. *Advanced Synthesis & Catalysis* 361, 2544-2549.
- Sellin Jeffries, M.K., Kiss, A.J., Smith, A.W., Oris, J.T., (2014) A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC biotechnology* 14, 1-13.
- Sevastyanovich, Y., Alfasi, S., Overton, T., Hall, R., Jones, J., Hewitt, C., Cole, J., (2009) Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. *FEMS Microbiology Letters* 299, 86-94.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 22, 1567-1572.
- Storhas, W., Behrendt, U., Wiedemann, P., Rubbeling, H., Claus, G., Mack, M., Trasch, H., Kopf, M., Liedy, W., (2013) *Bioverfahrensentwicklung*. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Strandberg, L., Enfors, S.-O., (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 57, 1669-1674.
- Strillinger, E., Grötzinger, S.W., Allers, T., Eppinger, J., Weuster-Botz, D., (2016) Production of halophilic proteins using *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred-tank bioreactor. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 1183-1195.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189, 113-130.
- Tabor, S., Richardson, C.C., (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 1074-1078.
- Tang, Y.J., Laidlaw, D., Gani, K., Keasling, J.D., (2006) Evaluation of the effects of various culture conditions on Cr (VI) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a novel high-throughput mini-bioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 95, 176-184.
- Terpe, K., (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 211.
- Tully, J.J., Meloni, G.N., (2020) A Scientist's Guide to Buying a 3D Printer: How to Choose the Right Printer for Your Laboratory. *Analytical Chemistry* 92, 14853-14860.
- Turner, C., Gregory, M.E., Thornhill, N.F., (1994) Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 819-829.
- Ude, C., Hentrop, T., Lindner, P., Lücking, T.H., Scheper, T., Beutel, S., (2015) New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical* 221, 1035-1043.
- Ukkonen, K., Mayer, S., Vasala, A., Neubauer, P., (2013) Use of slow glucose feeding as supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. *Protein Expression and Purification* 91, 147-154.
- Varma, A., Palsson, B.O., (1994) Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and environmental microbiology* 60, 3724-3731.
- Velez-Suberbie, M.L., Betts, J.P.J., Walker, K.L., Robinson, C., Zoro, B., Keshavarz-Moore, E., (2018) High throughput automated microbial bioreactor system used for clone selection and rapid scale-down process optimization. *Biotechnology Progress* 34, 58-68.
- Vester, A., Hans, M., Hohmann, H.-P., Weuster-Botz, D., (2009) Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 71-76.
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S.J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K.J., Mayorov, N., Nelson, A.R.J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C.J., Polat, İ., Feng, Y., Moore, E.W., VanderPlas, J., Laxalde, D., Perktold, J., Cimrman, R., Henriksen, I., Quintero, E.A., Harris, C.R., Archibald, A.M., Ribeiro, A.H., Pedregosa, F., van Mulbregt, P., Vijaykumar, A., Bardelli, A.P., Rothberg, A., Hilboll, A., Kloeckner, A., Scopatz, A., Lee, A., Rokem, A., Woods, C.N., Fulton, C., Masson, C., Häggström, C., Fitzgerald, C., Nicholson, D.A., Hagen, D.R., Pasechnik, D.V., Olivetti, E., Martin, E., Wieser, E., Silva, F., Lenders, F., Wilhelm, F., Young, G., Price, G.A., Ingold, G.-L., Allen, G.E., Lee, G.R., Audren, H., Probst, I., Dietrich, J.P., Silterra, J., Webber, J.T., Slavič, J., Nothman, J., Buchner, J., Kulick, J., Schönberger, J.L., de Miranda Cardoso, J.V., Reimer, J., Harrington, J., Rodríguez, J.L.C., Nunez-Iglesias, J., Kuczynski, J., Tritz, K., Thoma, M., Newville, M., Kümmerer, M., Bolingbroke, M., Tarte, M., Pak, M., Smith, N.J., Nowaczyk, N., Shebanov, N., Pavlyk, O.,

- Brodtkorb, P.A., Lee, P., McGibbon, R.T., Feldbauer, R., Lewis, S., Tygier, S., Sievert, S., Vigna, S., Peterson, S., More, S., Pudlik, T., Oshima, T., Pingel, T.J., Robitaille, T.P., Spura, T., Jones, T.R., Cera, T., Leslie, T., Zito, T., Krauss, T., Upadhyay, U., Halchenko, Y.O., Vázquez-Baeza, Y., SciPy, C., (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods* 17, 261-272.
- Von den Eichen, N., Bromig, L., Sidarava, V., Marienberg, H., Weuster-Botz, D., (2021) Automated multi-scale cascade of parallel stirred-tank bioreactors for fast protein expression studies. *Journal of Biotechnology* 332, 103-113.
- Wagner, J., Schäfer, D., von den Eichen, N., Haimerl, C., Harth, S., Oreb, M., Benz, J.P., Weuster-Botz, D., (2021) D-Galacturonic acid reduction by *S. cerevisiae* for L-galactonate production from extracted sugar beet press pulp hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 5795-5807.
- Weber, D., Patsch, D., Neumann, A., Winkler, M., Rother, D., (2021) Production of the Carboxylate Reductase from *Nocardia otitidiscaviarum* in a Soluble, Active Form for in vitro Applications. *ChemBioChem* 22, 1823-1832.
- Weuster-Botz, D., (2005) Parallel reactor systems for bioprocess development. In: Kragl, U. (Ed.), *Technology Transfer in Biotechnology: From lab to Industry to Production*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 125-143.
- Weuster-Botz, D., Hekmat, D., Puskeiler, R., Franco-Lara, E., (2006) Enabling technologies: fermentation and downstream processing. *White Biotechnology*, 205-247.
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G.T., Arnold, M., (2005) Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28, 109-119.
- Wiechert, W., Scheper, T., Weuster-Botz, D., (2018) *Neue Schubkraft für die Biotechnologie*. DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Frankfurt am Main.
- Wild, K.J., Trautmann, A., Katzenmeyer, M., Steingaß, H., Posten, C., Rodehutschord, M., (2019) Chemical composition and nutritional characteristics for ruminants of the microalgae *Chlorella vulgaris* obtained using different cultivation conditions. *Algal Research* 38, 101385.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylđatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J., (2001) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering* 73, 95-103.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ANSI	American National Standards Institute
BTM	Biotrockenmasse
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLR	Common Language Runtime
COM	Component Object Model
CO-RE	Compressed O-Ring Expansion
DO	Dissolved Oxygen
DWP	Deep Well Plate
FFF-Druck	Fused Filament Fabrication
GF-PP	Glasfaserverstärktes Polypropylen
gRPC	g Remote Procedure Call
http/2	Hypertext Transfer Protocol 2
HSL	Hamilton Standard Language
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MTP	Mikrotiterplatte
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NoCAR	Carboxylreduktase aus <i>Nocardia Otitidiscaviarum</i>
OD	Optische Dichte
OEM	Original Equipment Manufacturer
OPC UA	Open Platform Communications – Unified Architecture
PEI	Polyetherimid
PETG	Glykolmodifiziertes Polyethylenterephthalat
PG	Panzergewinde
P-Regler	Proportionalregler
RARE	Reduced Aromatic Aldehyde Reduction
RNA	Ribonucleid Acid
SBS	Society for Biomolecular Screening
SiLA	Standardization in Laboratory Automation
SLA	Stereolithography
SLAS	Society for Laboratory Automation and Screening

SLS

Selektives Lasersintern

VE-Wasser

Vollentsalztes Wasser

VVM

Volume per Volume and Minute

9 Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
c	Konzentration
F	Volumenstrom
μ	Zellspezifische Wachstumsrate
R	Konzentrationsänderung durch Reaktion
t	Zeit
V	Volumen
$Y_{XS,\mu}$	Ausbeutekoeffizient unter Vernachlässigung des Erhaltungstoffwechsels

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Qualitativer Verlauf der logarithmierten mikrobiellen Zellkonzentration bei einem Satzprozess. Es findet zuerst (1) die Verzögerungsphase statt, dann die (2) 1. Übergangsphase, danach die (3) exponentielle Phase, dann die (4) 2. Übergangsphase und die (5) stationäre Phase und die (6) Absterbephase (Abbildung abgewandelt aus (Storhas et al., 2013)).....	10
Abbildung 2: Qualitative Beschreibung, unter welchen Bedingungen <i>E. coli</i> bei aeroben Prozessen Acetat bildet. Beim Wachstum auf Glukose wird Acetat erst gebildet, wenn die kritische Wachstumsrate überschritten wurde. Die kritische Wachstumsrate korreliert mit der maximalen zellulären Sauerstoffaufnahme. Die kritische Wachstumsrate ist deutlich niedriger als die maximale Wachstumsrate (Abbildung abgewandelt aus (Eiteman and Altman, 2006)).....	15
Abbildung 3: Foto des Parallelreaktorsystems im L-Maßstab. Jeder Glasrührkesselreaktor befindet sich in einem einzeln temperierbaren Mantel. Der Motor, Dosierstrecken sowie die Sonden (pH, pO ₂) werden im Reaktordeckel montiert.	24
Abbildung 4: 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab automatisiert durch einen Pipettierroboter. Bei (A) Mikrotiterplattenlese- sowie -waschgerät (B) Nadelwaschstation mit drei Waschstationen und Nadelsätzen (C) Bioreaktorblock mit 48 parallel betriebenen Rührreaktoren (D) vom Roboter selbstständig zu öffnende Reaktionsgefäße („FlipTubes“) (E) für at-line Messungen verwendete Mikrotiterplatten.....	26
Abbildung 5: Schematischer Ablauf der vom Hersteller des Pipettierroboters mitgelieferten Software zum Betrieb des Bioreaktorblocks. Nach der Initialisierung geht die Software die einzelnen ausführbaren Roboteraufgaben sequentiell durch. Falls eine der Aufgaben ausführbar ist, wird sie ausgeführt. Dabei findet keine Beurteilung statt, ob und welche weiteren Aufgaben zum gleichen Zeitpunkt ausführbar gewesen wären. Das Prozessende wird nur ausgeführt, wenn dies durch den Nutzer manuell ausgewählt wurde.....	29
Abbildung 6: Schematischer Überblick über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze der Biotransformationen für Messpositionen (oben) und die Kalibriermessungen (unten). Nach Ende der Expressionsphase im mL-Maßstab wurden 25 µL aus jedem Reaktor entnommen und in eine Vertiefung der „Deep Well Plate“ (DWP) gegeben. Dazu wurden bei den Messpositionen 250 µL 10 mM 3-Hydroxybenzoesäure gelöst in PBS, 225 µL PBS und 500 µL Mineralmedium gegeben. Bei den Kalibrierpositionen wurden 0-250 µL 12 mM Hydroxybenzaldehyd gelöst in PBS gegeben und anschließend auf 1 mL Gesamtvolumen aufgefüllt.....	35
Abbildung 7: Konzept für den Transfer von Zellsuspension	41

- Abbildung 8:** Neu gestaltete Vorlagebehälter zum Transfer von Zellsuspensionen. Der braune Rahmen hat als Grundfläche das SBS-Format. Dies ist ein ANSI/SLAS-Standard für die Grundfläche einer Mikrotiterplatte und beträgt 127.76 mm x 85.48 mm. Die grauen Vorlagebehälter sind jeweils einzeln verwendbar. Die Abbildung wurde mit FreeCAD erstellt.43
- Abbildung 9:** Foto des 48-fach Parallelbioreaktorsystems (A) mit den 4 Vorlagebehältern im Behälterrahmen (B) auf einer SBS-Position der Arbeitsfläche Pipettierroboters. Auf der rechten Seite sind die 4 Rührkesselreaktoren im L-Maßstab (D). Die Mehrkanalpumpe (C) verbindet jeden Rührkesselreaktor des L-Maßstabs mit jeweils einem Transfergefäß.45
- Abbildung 10:** Vergleich von Biomassekonzentration und Fluoreszenz von *E. coli* mit (blaue Kreise) und ohne (rote Vierecke) vorhergehender Prozessunterbrechung von 30 Minuten. Während der Prozesszeit wurden pH-Regelung, Rührer und die Begasung ausgeschaltet. Außerdem wurden die Zellen auf Raumtemperatur (22 °C) temperiert. Die Prozesszeit von 0 bezeichnet den Zeitpunkt der Induktion mit 5 µM IPTG. Die Zellen wurden vor der Induktion mit einem Satzprozess (5 g L⁻¹ Glucose) und einem darauffolgenden Zulaufprozess ($\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$) kultiviert. Die Standardabweichungen basieren auf zwei biologischen Replikaten mit drei unabhängigen Messungen pro Datenpunkt ($V = 500 \text{ mL}$, $F_{\text{in}} = 2,4 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ °C}$, $\text{pH} = 7$, $\text{DO} > 30 \%$).49
- Abbildung 11:** Ausschnitt aus der Venus-Software zur Programmierung des Hamilton STARlet Pipettierroboters. In dem dargestellten Abschnitt erfolgt eine repetitive Abfolge von Aspirations- und Dispensierungsschritten aus einer Ursprungssequenz („seqSource“) in eine Zielsequenz („seqBioreactorpositions“). Anschließend werden die Nadeln mit Ethanol desinfiziert.51
- Abbildung 12:** Überblick über die Gestaltung der Einbindung der Venus Software. Die Kommunikation lässt sich in insgesamt 4 Schritte unterteilen. In der linken Hälfte der Abbildung (hellblau dargestellt) sind die beiden Schritte für die Parametrisierung der Pipettieraufgaben. Im Schritt (1) werden die Parameter für die Pipettieraufgabe von der Ablaufsteuerung auf den gRPC Server geschrieben. Im Schritt (2) werden die Parameter der Pipettieraufgabe vom gRPC Client der Venus Software gelesen und so der Venus Software verfügbar gemacht. Damit die Ablaufsteuerung weiß, wann der Roboter bereit ist, neue Aufgaben auszuführen, wurden die Kommunikationsschritte (3) und (4) rechts in der Darstellung hinzugefügt. Während des gesamten Prozesses erhält die Ablaufsteuerung einen kontinuierlichen Strom an Nachrichten über die Verfügbarkeit des Pipettierroboters, dies ist im Bild mit (3) beschriftet. Wenn auf dem gRPC Server keine Pipettieraufgabe hinterlegt war, klinkt sich der gRPC Client der Venus Software beim gRPC Server ein und wartet auf eine Benachrichtigung, dass eine neue Pipettieraufgabe vorliegt, im Bild mit (4) dargestellt.55

Abbildung 13: Arbeitsdauer des Pipettierroboters bei der Methode „Feed300gLGlucose“ in Abhängigkeit von den aktiven Bioreaktorpositionen. Es wurden nur jeweils benachbarte Positionen betrachtet. Die gestrichelte Linie ist eine lineare Interpolation der Messdaten. Die blauen Punkte sind Arbeitsdauern basierend auf historischen Prozessdaten.65

Abbildung 14: Arbeitsdauer des Pipettierroboters bei der Methode „pHControlBaseAmmonium“ in Abhängigkeit von den aktiven Bioreaktorpositionen. Die Methode wurde für die Zugabe von 12.5 % Ammoniakwasser für die pH-Regelung genutzt. Es wurden beliebige Positionskombinationen betrachtet. Die blauen Punkte sind Arbeitsdauern basierend auf historischen Prozessdaten. Die gestrichelte Linie ist eine polynomische Interpolation der Messdaten.66

Abbildung 15: Leerlaufzeit des digitalen Zwilling des Pipettierroboters während der simulierten Durchführung von Bioprozessen in 48 Parallelreaktoren. Es wurden pH-Regelung (Säure und Base), Probenahme, Zulauf und Induktion simuliert durchgeführt. Die Leerlaufzeit ist die Zeit die der digitale Zwilling zwischen zwei Methodenausführungen zur Verfügung gestanden hätte. Es wurde der Betrieb von 48 Reaktoren simuliert. Die pH-Regelung und der Zulauf wurden mit einer Frequenz von 6 h^{-1} durchgeführt. Die Probenahme erfolgte etwa stündlich, die Induktion erfolgte nach einer Stunde Prozesszeit. Die Konfiguration der Ablaufsteuerung stellte bei diesem Versuch eine typische Zulaufkultivierung mit *E. coli* dar.68

Abbildung 16: Biomassekonzentrationen von *E. coli* BL21(DE3) mCherry in Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben nach 1 Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Die Biomassekonzentrationen wurden anhand der automatisiert *at-line* gemessenen OD_{600} geschätzt. Jedes Diagramm zeigt den Mittelwert der Biomassekonzentrationen von 4-5 parallelen Bioreaktoren, die mit der angegebenen IPTG-Konzentration induziert wurden. Die graue Linie stellt eine lineare Regression der Biomassekonzentrationen aller 48 parallelen Bioreaktoren als Funktion der Prozesszeit unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration dar ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....72

Abbildung 17: Automatisiert *at-line* gemessene mittlere Fluoreszenz als Abschätzung der mCherry-Konzentration in Rührkesselreaktoren mit *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugabe nach einer Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Jede Grafik zeigt den Mittelwert der Fluoreszenz von 4-5 parallelen Bioreaktoren, die mit der angegebenen IPTG-Konzentration induziert wurden. Die graue Linie zeigt die individuelle lineare Regression des Fluoreszenzanstiegs zwischen einer Prozessdauer von 3 - 11 h bei der angegebenen IPTG-Ausgangskonzentration ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....74

Abbildung 18: Steigungen der *at-line* gemessenen Fluoreszenz von *E. coli* BL21(DE3) mCherry im Zulaufbetrieb im mL-Maßstab bei einer Prozessdauer von 3 - 11 h als Funktion

der zugesetzten IPTG-Konzentrationen. ** bedeuten $p < 0.01$ bei Welch's T-test (Virtanen et al., 2020) ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....75

Abbildung 19: Mittlere Biomassekonzentrationen von *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben von 1,82 bis 13,63 μM nach 1 Stunde (vertikale gestrichelte Linie). Die Biomassekonzentrationen wurden anhand der *at-line* gemessenen OD_{600} geschätzt. Jedes Diagramm zeigt den Mittelwert der Biomassekonzentrationen, die bei Zellen beobachtet wurden, die mit der gleichen Wachstumsrate im Zulaufverfahren im L-Maßstab produziert wurden, bevor sie automatisch in die Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab übertragen wurden. Die grauen Linien stellen die lineare Regression dieser mittleren BTM-Konzentrationen ($n = 16$) als Funktion der Prozesszeit unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration dar ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).77

Abbildung 20: Biomassespezifische Fluoreszenz als Schätzung der spezifischen mCherry-Konzentration bei *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei unterschiedlichen IPTG-Zugaben nach 1 Stunde (senkrechte gestrichelte Linie). Außerdem wurde im gleichen Parallelansatz die Zulauftrate μ_{set} von 0,1 bis 0,2 h^{-1} bei der Zellherstellung im L-Maßstab variiert (Spalten). Die graue Linie zeigt die individuelle lineare Regression des Anstiegs der spezifischen Fluoreszenz zwischen einer Prozessdauer von 3 und 11 Stunden bei der angegebenen IPTG-Ausgangskonzentration. Jede Grafik zeigt den Mittelwert der biomassespezifischen Fluoreszenz von mindestens 3 parallelen Bioreaktoren ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....79

Abbildung 21: Anstieg der biomassespezifischen Fluoreszenz mit *E. coli* BL21(DE3) mCherry im mL-Maßstab bei einer Prozesszeit von 3 - 11 h als Funktion der zugesetzten IPTG-Konzentrationen und Zulaufraten in der Zellbildungsphase (blau: $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 14,5 \text{ g L}^{-1}$; rot: $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 17,0 \text{ g L}^{-1}$; grün: $\mu_{set} = 0,2 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 20,2 \text{ g L}^{-1}$). Zum Vergleich ist der biomassespezifische Anstieg der Fluoreszenz aus der Untersuchung zu Einfluss der Induktorkonzentration hinzugefügt (hellblau: $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $c_{X0} = 13,4 \text{ g L}^{-1}$). * bedeuten $p < 0,1$ nach Welch's t-test (Virtanen et al., 2020). Jeder Balken zeigt den Mittelwert des konstanten Anstiegs der biomassespezifischen Fluoreszenz von mindestens 3 parallelen Bioreaktoren ($V = 11 \text{ mL}$, $F_{in} = 2,4 \text{ g Glukose L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,9$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....80

Abbildung 22: Versuchsplan der durchgeführten Experimente mit *E. coli* NoCAR, um optimale Produktionsbedingungen für die Expression zu finden. Jeder Punkt beschreibt eine einzigartige Kombination von Zulauftrate und Induktorkonzentration, die während der Proteinexpression angewandt wurde. Jede Kombination wurde mit 4 bis 8 biologischen Replikaten untersucht. Insgesamt wurden 192 Experimente in vier aufeinanderfolgenden Parallelexperimenten im mit jeweils 48 Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab durchgeführt. 82

Abbildung 23: Biomassekonzentration (abgeschätzt über die *at-line* Messung der optischen Dichte) bei drei Expressionsbedingungen von *E. coli* NoCAR im Rührkesselreaktor im mL-

Maßstab. Alle Reaktoren wurden nach einer Stunde Prozesszeit im mL-Maßstab mit IPTG induziert (vertikale gestrichelte Linie). In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. Jede Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von 4 parallelen Reaktoren ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....84

Abbildung 24: pO_2 -Signal von drei exemplarischen Expressionsbedingungen im mL-Maßstab. Nach einer Stunde Prozesszeit erfolgte die Induktion mit IPTG. In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. Die Substratdosierung erfolgte mit einer Frequenz von 6 h^{-1} . Der Übersichtlichkeit halber ist jeweils nur ein Reaktor dargestellt. Das pO_2 -Signal wurde mit einer Abtastzeit von 30 Sekunden aufgezeichnet ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....85

Abbildung 25: pH-Messwerte bei drei exemplarischen Expressionsbedingungen im mL-Maßstab. Nach einer Stunde Prozesszeit erfolgte die Induktion mit IPTG. In der oberen Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $0,48 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der mittleren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $6 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. In der unteren Abbildung erfolgte ein konstanter Zulauf von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose und eine Induktion mit $12 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG. Die Substratdosierung und die pH-Regelung erfolgte mit einer Frequenz von 6 h^{-1} . Der Übersichtlichkeit halber ist jeweils nur ein Reaktor dargestellt. Das pH-Signal wurde mit einer Abtastzeit von 30 Sekunden aufgezeichnet ($V = 10 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3000 \text{ rpm}$).....87

Abbildung 26: Spezifische NoCAR-Enzymaktivität bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* NoCAR. Jeder Punkt entspricht der biomassespezifischen Anfangsaktivität bei einer bestimmten Induktorkonzentration und Zulauftrate. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus 4 bis 8 unabhängigen Bioreaktoren. Bei den Fehlergrenzen handelt es sich um 90%ige Glaubwürdigkeitsintervalle.....89

Abbildung 27: Gesamt NoCAR-Enzymaktivität bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* NoCAR. Jeder Messpunkt entspricht der volumetrischen Anfangsaktivität bei einer bestimmten Induktorkonzentration und Zulauftrate. Das Volumen wurde auf die Bioreaktoren bezogen, aus denen die Proben entnommen wurden. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus 4 bis 8 unabhängigen Bioreaktoren. Bei den Fehlergrenzen handelt es sich um 90%ige Glaubwürdigkeitsintervalle. Die Anfangsaktivität wurde berechnet mit einer Substratkonzentration von $2,5 \text{ mM}$91

11 Anhang

11.1 Medien

In dem folgenden Abschnitt werden die Rezepturen aller verwendeten Medien- und Stammlösungen dargestellt.

11.1.1 Herstellung von Mineralmedium nach Riesenberg

Für die Herstellung von 1 L 50-fach Spurenelementelösung wurden folgende Chemikalien eingewogen:

Tabelle 1: Komponenten von 1 L 50-fach Spurenelementelösung

Komponente	Stoffmenge, g
EDTA	0,42
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,42
MnCl ₂ 3H ₂ O	0,75
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,075
H ₃ BO ₃	0,15
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,125
Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	0,65
Fe(III)citrat	5

Für die Herstellung von 1 L 10-fach Salzlösung wurden folgende Komponenten eingewogen:

Tabelle 2: Komponenten von 1 L 10-fach Salzlösung

Komponente	Stoffmenge, g
NaOH	24
Citronensäure H ₂ O	17
(NH ₄) ₂ HPO ₄	40
KH ₂ PO ₄	133

Für die Herstellung von Mineralmedium abgewandelt nach Riesenberg (Riesenberg, 1991) wurden pro Liter 20 mL Spurenelemente-Lösung mit 100 mL Salzlösung versetzt und mit VE-Wasser auf etwa einen Liter aufgefüllt und bei 20 min bei 121 °C sterilisiert. Für die Versuche in der adaptiven Laborevolution wurden 75 mL Salzlösung pro L verwendet.

Anschließend wurde die Kohlenstoffquelle (Glukose oder Glycerin), MgSO₄ sowie ggfs. das verwendete Antibiotikum aseptisch hinzugefügt. Für Kultivierungen mit *E. coli* mCherry wurde Kanamycin verwendet, für Kultivierungen mit *E. coli* NoCAR wurde Ampicillin verwendet und für die Kultivierungen mit *E. coli* K12 MG1655 wurde kein Antibiotikum verwendet.

Tabelle 3: Zusätzliche Komponenten des verwendeten Riesenbergmediums

Komponente	Zugabevolumen, mL
500 g L ⁻¹ Glukose-Lösung	10
500 g L ⁻¹ MgSO ₄	2,4
50 g L ⁻¹ Ampicillin / Kanamycin	1
500 g L ⁻¹ Glycerin-Lösung	24

Diese Komponenten wurden separat autoklaviert (Glukose-Lösung, MgSO₄, Glycerin-Lösung) oder sterilfiltriert (Ampicillin / Kanamycin). Für Versuche im Rahmen der ALE wurde nach dem Autoklavievorgang zusätzlich 1 mL L⁻¹ Antischaummittel (Antifoam 204, Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, USA) zugegeben. Der pH-Wert des erhaltenen Mediums wurde nicht vor der Zugabe in den Bioreaktor eingestellt.

Für die Herstellung von Vorkulturmedium wurden die Komponenten aus der Tabelle unten eingewogen. Nach dem Lösen der Komponenten wurde das Medium mit 2 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 4: Komponenten von 1 L LB-Medium

Komponente	Stoffmenge, g
NaCl	5
Hefeextrakt	5
Pepton	10

Für die im Rahmen der Biotransformation von E. coli NoCAR verwendete ABAO-Lösung wurde folgender Puffer hergestellt:

Tabelle 5: Komponenten von 1 L ABAO-Pufferlösung

Komponente	Stoffmenge, g	Volumen, mL
Natriumacetat	3,69	-
Essigsäure (99,5 %)	-	3,15
DMSO (99,5 %)	-	50

Der pH der erhaltenen Lösung wurde mit 2 M NaOH auf pH 4,5 eingestellt. In diesem Puffer wurden dann 10 mM ABAO gelöst.

11.2 Chemikalienliste

Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
1-Propanol	6776.1	Carl Roth GmbH
Aceton	9372.1	Carl Roth GmbH

Aminobenzamidoxime (ABAO)	H51782	Alfa Aesar
Ammoniakwasser	54602	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ampicillin	K029.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Antifoam 204	A6426-500G	Sigma-Aldrich GmbH
Borsäure	1.00165.0500	Merck KGaA
Citronensäure	X863.4	Carl Roth GmbH + Co. KG
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	1.02539.0250	Merck KGaA
D(+)-Glukose Monohydrat	6887.5	Carl Roth GmbH + Co. KG
Di- Ammoniumhydrogenphosphat	0268.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Di-Kaliumhydrogenphosphat	T875.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dimethylsulfoxid	A994.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Di-Natriumhydrogenphosphat	T876.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
EDTA	141026.1211	AppliChem GmbH
Eisen(III)-Citrat	F6129-250G	Sigma-Aldrich GmbH
Essigsäure	607-002-00-5	Fisher Scientific GmbH
Glycerin	3783.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt	1.03753.0500	Merck KGaA
Hydroxybenzaldehyd	4493.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hydroxybenzoesäure	H20008-5G	Sigma-Aldrich GmbH
Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid (IPTG)	1122GR100	neoFroxx GmbH
Kaliumchlorid	6781.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	LC-4508.1	neoFroxx GmbH
Kanamycin	T832.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	CN82.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumsulfat Heptahydrat	141404.0914	AppliChem GmbH
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	T881.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumacetat	6773.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid	3957.4	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid	9356.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriummolybdat Dihydrat	0274.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pepton	1298GR250	neoFroxx GmbH
Zinkacetat Dihydrat	1.08802.0250	Merck KGaA

11.3 Geräteliste

Tabelle 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Parallelbioreaktorsystem im L-Maßstab	DASGIP Parallel Bioreactor System	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierroboter	Microlab STARlet M	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Parallelbioreaktorsystem im mL-Maßstab	bioREACTOR48	2mag AG, München, Deutschland
MTP-Photometer	Synergy HTX	Biotek, Winooski, USA
Einweg-Bioreaktoren für Reaktorsystem im mL- Maßstab	Mini-Reaktoren (HTBD)	2mag AG, München, Deutschland
Peristaltische Pumpe	Reglo ICC	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Einplatinencomputer	BeagleBone Green	BeagleBone.org Foundation, Michigan, USA
Messriegel für die kontaktlose Messung von pH und pO ₂	MCR 8pH, 8oxygen	Presens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Thermostat	Loop 250	Lauda Dr. R. Wobser GmbH + Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Thermostat	MC600	Lauda Dr. R. Wobser GmbH + Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Präzisionswaage	Entris 62	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	Variomag Compact Hp1	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
3D-Drucker	I3 Mk3	Prusa Research, Prag, Tschechien
Abgasanalytik	BlueVary	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland

Nadelwaschstation für Pipettierroboter	Needle Wash Station CR	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Roboter greifer für Bereiche außerhalb der Arbeitsfläche des Roboters	iSWAP	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Roboter greifer für Bereiche innerhalb der Arbeitsfläche des Roboters	CO-RE Gripper	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
MTP-Waschgerät	405 LS	Biotek, Winooski, USA
Mikrotiterplattenschüttel- und Heizgerät für Robotik	Hamilton Heater Shaker	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Öffner für Reaktionsgefäße für die Robotik	FlipTube-Tools	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
PEI Druckplatte für 3D-Drucker	PEI-Sheet	Prusa Research, Prag, Tschechien
Druckoberfläche für 3D-Drucker	Buildtak-Sheet	Buildtak, Maplewood, USA
Düse für 3D-Drucker	Nozzle X, 0,4 mm	E3D, Chalgrove, Vereinigtes Königreich

11.4 Verwendete Druckmaterialien

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Materialien für den FFF-Druck

Material	Bezeichnung	Hersteller
Glasfaserverstärktes Polypropylen	PP GF 30	BASF 3D Printing Solutions, Heidelberg, Deutschland
Glykol-modifiziertes PET (PETG)	Extrudr PETG	Extrudr, Lauterach, Österreich
Co-Polyester	nGEN_flex	Colorfabb, Belfeld, Niederlande

11.5 Verwendete Software

Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Software

Material	Bezeichnung	Hersteller
----------	-------------	------------

Proprietäre Steuerungssoftware des Pipettierroboters	Venus 4.5	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
G-Code Generator für den FFF-Druck	PrusaSlicer	Prusa Research, Prag, Tschechien
CAD-Software	FreeCAD	-, quelloffen
Programmiersprache und Interpreter	Python 3	Python Software Foundation, Delaware, USA, quelloffen
Entwicklungsumgebung und Kompilierer für C#	Visual Studio 2019	Microsoft Corporation, Redmond, USA
http/2 basiertes Kommunikationsframework	gRPC	-, quelloffen
Softwarepaket für numerisches Rechnen innerhalb von Python	numpy	-, quelloffen
Framework für automatisierte Tests innerhalb von Python	pytest	-, quelloffen
Softwarepaket für die Verarbeitung von Tabellendaten innerhalb von Python	pandas	-, quelloffen
Zeitreihendatenbank	InfluxDB v1	InfluxData, San Francisco, USA
Softwarepaket für die Erstellung von Graphen innerhalb von Python	matplotlib	-, quelloffen
Softwarepaket zum wissenschaftlichen Rechnen innerhalb von Python	scipy	-, quelloffen