



# Escherichia coli batch Fermentation



## Einleitung

Bei *Escherichia coli* handelt es sich um stäbchenförmige, nach der Gramfärbung als Gram negativ bezeichnetes Bakterium. Die Bakterienart gehört zur natürlichen Flora des Dickdarms und somit zur Familie der Enterobacteriaceae. *E.coli* ist fakultativ aerob und ist in der Lage sowohl durch Atmung als auch durch Gärung Energie zu gewinnen. Wegen der kurzen Verdopplungszeit (ca. 20 min) und des vollständig untersuchten Genoms wird dieser Mikroorganismus als Expressionssystem für heterologe Proteine eingesetzt.

## 1. Equipment

- BIOSTAT® Aplus 5L, MO-Ausstattung
- Waage (z. B. Sartorius CP-Model)
- pH-Meter
- Photometer
- Thermo Shaker (z. B. Certomat, Sartorius)
- Küvetten
- Heizbarer Magnetrührer
- 5 Petrischalen
- 1 Impföse
- 2 Schottflaschen, 500 mL
- 2 Schottflaschen, 500 mL mit Edelstahlkopfstück
- 1 Schottflasche, 1000 mL
- 3 Messpipetten, 10 mL
- 2 Animpfkolben, 1000 mL
- 1 Erlenmeyerkolben, 1000 mL
- 1 Braunglasflasche, 100 mL
- Laktose-Testkit
- Trockenschrank, Mikrowelle oder Moisture Analyzer (Sartorius)
- Zentrifugenröhrchen
- Brutschrank
- *E.coli* DSM 498

## 2. Vorbereitung

### a) Zeitplan

1. Tag: Herstellen der Agarplatten
2. Tag: Animpfen der Agarplatten
2. Tag: Ansetzen und Autoklavieren der Vorkultur I
3. Tag: Animpfen der Vorkultur I
3. Tag: Ansetzen und Autoklavieren der Vorkultur II
4. Tag: Animpfen der Vorkultur II
5. Tag: Ansetzen der Hauptkultur und Vorbereitung des Fermenters

### b) Bioreaktor | Fermenter

- Kalibrierung und Einbau der pH-Elektrode
- Einbau der pO<sub>2</sub>-Sonde
- Kalibrierung der Pumpen
- Ansetzen und Autoklavieren der Korrekturmittel
- Sterilisation des Kulturgefäßes mit dem Hauptkulturmedium
- Kalibrierung der pO<sub>2</sub>-Sonde bei Kultivierungstemperatur und -drehzahl
- Schläuche für Korrekturmittel manuell füllen

### c) Anzucht in Petrischalen

- Es werden 100 mL Nährmedium pH = 7,0 auf 5 Petrischalen verteilt:
- |                |          |
|----------------|----------|
| Pepton         | 5,0 g/L  |
| Fleischextrakt | 3,0 g/L  |
| Agar           | 15,0 g/L |

Nährmedium autoklavieren, bei ca. 50°C steril auf die Petrischalen verteilen und trocknen lassen. Mit *E.coli* im 13-Strich-Verfahren animpfen und für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubieren.

### d) Vorkultur I

- Es werden 250 mL Nährmedium, pH = 7,0 für die Vorkultur I vorbereitet, beimpft und für 24 h bei 37°C und 100 U/min im Schüttelschrank inkubiert.
- |                    |       |
|--------------------|-------|
| Pepton aus Casein  | 5 g/L |
| Pepton aus Fleisch | 3 g/L |

### e) Stammlösung der Spurenelemente

Es werden jeweils 1 g der aufgeführten Spurenelemente abgewogen und in 1000 mL dest. Wasser gelöst. 5 mL dieser Stock-Lösung werden pro Liter Kulturmedium eingesetzt.

- |   |
|---|
| FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                                |
| CoSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O                                |
| ZnCl <sub>2</sub>   |
| CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O                                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  |
| NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O                                |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  |
| NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O                                |
| MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O                                  |
| Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> * 18 H <sub>2</sub> O |

### f) Vorkultur II

Es werden zwei 1L-Animpfkolben mit je 250 mL Medium, pH = 6,9 vorbereitet, mit je 5 mL Vorkultur beimpft und im Schüttelschrank 24 h bei 37°C und 100 U/min inkubiert.

- |  |          |
|--|----------|
| Diammoniumhydrogencitrat                             | 0,5 g/L  |
| Ammoniumsulfat                                       | 12 g/L   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,6 g/L  |
| Na <sup>2</sup> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O | 6,6 g/L  |
| NaCl   | 2,0 g/L  |
| Hefeextrakt  | 1,0 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O               | 0,3 g/L  |
| Laktose  | 7,0 g/L  |
| Spurenelemente                                       | 5,0 mL/L |

### Beachte

Laktose ist nur bis max. 30% löslich

Es werden 40 g Laktose in 133,4 mL dest. Wasser unter Erwärmung gelöst (=30%ige Lösung) und separat autoklaviert. Salze und Hefeextrakt werden in 244 mL dest. Wasser gelöst und der pH auf 6,9 eingestellt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 5 mL der Vorkultur I in jeden Kolben und Inkubation für 24 h bei 37°C und 100 u/min im Inkubationsschüttler.

In Vorkultur II werden 5,8 mL der Laktoselösung pro Kolben und in die Hauptkultur 116,7 mL (Rest) zugegeben.

### g) Hauptkultur

Das Hauptmedium entspricht dem der Vorkultur II. Die Nährbestandteile werden auf 5 L hochgerechnet, in 4,5 L dest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6,9 eingestellt. Die Lösung wird in das Kulturgefäß überführt und autoklaviert.

### h) Inokulum

Den Rest der Laktose-Lösung für das Hauptmedium in die Animpfkolben überführen und den Reaktor steril mit den beiden Kolben der Vorkultur II animpfen.

### i) Korrekturmittel

Antischaum: 1% (w | w) Silikonöl  
Lauge: 10 M NaOH

### j) Kulturbedingungen

Kulturvolumen: 5 L  
Belüftungsrate: ab 0,125 vvm  
Rührerdrehzahl: ab 200 U/min  
Temperatur: 37°C  
pO<sub>2</sub>: 40% geregelt  
pH-Wert: 6,9 geregelt

## 3. Analytik

### Bestimmung der optischen Dichte

Das Wachstum der Bakterien wird über die zunehmende Trübung der Fermentationsbrühe verfolgt. Die Bestimmung der Optischen Dichte (OD) erfolgt mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Probe sollte so verdünnt werden, dass die gemessene Extinktion zwischen 0,2 und 0,4 liegt. Die Messung erfolgt in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Optische Dichte errechnet sich nach folgender Formel:

$$OD_{600nm} = E * F [-]$$

mit E = gemessene Extinktion  
F = Verdünnungsfaktor

### Bestimmung der Biotrockensubstanz

Für die Bestimmung der Biotrockensubstanz stehen verschiedene Methoden zur Auswahl:

- BTS-Bestimmung mit dem Moisture Analyzer (Sartorius)
- BTS-Bestimmung im Trockenschrank
- BTS-Bestimmung in der Mikrowelle

### Bestimmung $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Da es sich bei der  $\beta$ -Galactosidase um ein intrazellulär gebildetes Enzym handelt, müssen die Bakterien vor der Aktivitätsmessung aufgeschlossen werden. Der Aufschluss erfolgt chemisch mit Toluol. Dabei werden pro mL Bakteriensuspension 2 Tropfen Toluol zugegeben und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Bestimmung wird folgende Testlösungen benötigt:

Test-Lösung:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,165 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,158 g
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,010 g
2-Mercaptoethanole	0,367 g
ONPG	0,069 g

Mit dest. H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen und den pH-Wert auf 7,6 einstellen..

Testlösung bei 4°C in einer Braunglasflasche lagern.

Der Testansatz lautet wie folgt:

Test-Lösung	2,00 mL
aufgeschlossene Probe	0,02 – 0,1 mL

Das Probevolumen sollte so gewählt werden, dass die ermittelte Extinktionsänderung  $\Delta E/min$  zwischen 0,02 – 0,2 E/min liegt (ggf. mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert = 7,6 verdünnen). Die Extinktionsänderung wird in einem Photometer (z. B. Philips-Photometer PU 8625) mit temperierbaren Küvettenhalter bei 30°C und einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = V_{\text{gesamt}} = \frac{* \text{Verdünnung} * E/min}{V_{\text{Probe}} * 3,1}$$

With F = dilution factor  
V = volume

### Bestimmung der Laktosekonzentration

Die Laktosekonzentration wird mit dem Laktose-Testkit Nr. 176303 (Boehringer Mannheim) bestimmt.

Sartorius Stedim Biotech GmbH  
August-Spindler-Strasse 11  
37079 Goettingen, Germany

Phone +49.551.308.0  
Fax +49.551.308.3289  
www.sartorius-stedim.com

USA Toll-Free +1.800.368.7178  
UK +44.1372.737159  
France +33.442.845600  
Italy +39.055.63.40.41  
Spain +34.91.3586102  
Japan +81.3.3740.5407

Specifications subject to change without notice. Printed and copyrighted by Sartorius Stedim Biotech GmbH  
W · G  
Publication No.: SBT1007-d09061  
Order No.: 85034-538-40  
Ver. 06 | 2009