

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Kontinuierliche Bioprozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Andreas Schmieder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Die Dissertation wurde am 31.03.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 26.06.2016 angenommen.

*Die wichtigste Eigenschaft eines Wissenschaftlers ist es,
zu erkennen, wann es an der Zeit ist,
sich von seinen lieb gewonnenen Ideen und Vorstellungen zu verabschieden.*

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte!

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung. Ich hatte stets das Gefühl in besonderem Maße gefordert und gefördert zu werden. Durch seine Fähigkeit in kürzester Zeit Schwachstellen sowie Chancen zu erkennen, seinen Ideenreichtum und seine stets konstruktive Kritik hat er sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei dem Coreferenten Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Tanja Kurzrock, Klaus Kaufmann, Michael Fischer und Kai Kress (2mag AG) sowie Daniela Achatz und Christian Krause (PreSens Precision Sensing GmbH) danke ich sehr für die konstruktive und offene Zusammenarbeit.

Ansgar Stratmann und Ulrich Giesecke (W42 Industrial Biotechnology GmbH und W42 Consulting GmbH) danke ich für die Bereitstellung des Stammes *Pichia pastoris* CaL-B2.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, sowie der Fachgebiete für Selektive Trenntechnik und Systembiotechnologie bedanke ich mich herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und das großartige Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Christina Pfaffinger, Samantha Hensler, Benjamin Kick und Ludwig Klermund sowie meiner Mutter und meinem Bruder für das Korrekturlesen und die wertvollen fachlichen Hinweise bei der Anfertigung meiner Dissertation. Bei Nils Janzen und Georg Faust möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung und bei Xenia Priebe und Samantha Hensler für die Unterstützung zum Ende meiner Laborzeit bedanken. Des Weiteren möchte ich insbesondere den Festangestellten des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik Gabriele Herbrik, Ellen Truxius, Markus Amann, Florian Sedlmaier, Georg Kojro und Norbert Werth für ihre Hilfe bei allen organisatorischen sowie technischen Belangen danken.

Dominik Maslak und Markus Weise danke ich herzlich für die Möglichkeit der Nutzung der Anlagen im Pilotmaßstab am TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie, sowie für ihre unglaubliche Flexibilität bei der Versuchsplanung und Unterstützung zu den unmöglichsten Arbeitszeiten.

Bei Florentine Haug, Marina Lang, Kornelia Veith, Maria Hermann, Sebastian Gumplinger, Karl Behler, Richard Schmid, Lukas Reiser, Christian Preischl, Björn Eckhard, Johannes Cremer, Mark Rubenbauer, Fabian Schmitz und Felix Schottroff bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten und ihrer Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskräfte.

Meiner Familie danke ich für ihren bedingungslosen Rückhalt und ihre vollste Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Miniaturisierte Bioreaktoren.....	6
3.1.1	Parallele Bioreaktoren	7
3.1.2	Kontinuierliche Bioprozesse in miniaturisierten Bioreaktoren.....	10
3.1.3	Maßstabsübertragung	12
3.2	Betriebsweisen von mikrobiologischen Prozessen	15
3.2.1	Kinetik von Wachstum und Produktbildung.....	15
3.2.2	Betrieb von Bioreaktoren	19
3.2.3	Verweilzeitverteilungen von idealen und realen Reaktoren.....	25
3.3	Mikrobielle Herstellung von rekombinanten Proteinen	33
3.3.1	Herstellung rekombinanter Proteine mit <i>Komagataella pastoris</i>	35
3.3.2	Herstellung rekombinanter Proteine mit <i>Escherichia coli</i>	41
3.4	Biokatalytische Prozesse in der organischen Synthese	50
3.4.1	Enzymkinetik.....	53
3.4.2	Betriebsweisen von enzymatischen Prozessen	58
3.4.3	Herstellung von <i>N</i> -Acetyl-D-Neuraminsäure	62
4	Material und Methoden	67
4.1	Allgemeines Material	67
4.2	Spezielle Materialien	67
4.2.1	Mikroorganismen, Stammhaltung und Vektoren	67
4.2.2	Computerprogramme	69
4.3	Verwendete Bioreaktoren.....	69
4.3.1	Parallele Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab	69
4.3.2	Rührkesselreaktoren im Labormaßstab.....	72
4.3.3	Rührkesselreaktoren im Pilot-Maßstab.....	75

4.4	Verfahrenstechnische Charakterisierung von parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab	77
4.4.1	Bestimmung des Verweilzeitverhaltens	77
4.4.2	Proteinrückhaltung	77
4.5	Kultivierung von <i>Komagataella pastoris</i>	79
4.5.1	Hochzelldichtekultivierung von <i>Komagataella pastoris</i> DSM70382.....	79
4.5.2	Herstellung von <i>Candida antarctica</i> Lipase B mit <i>Pichia pastoris</i> CaL-B2.....	81
4.6	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	84
4.6.1	Kultivierung im Schüttelkolben.....	84
4.6.2	Satzkultivierung.....	85
4.6.3	Kontinuierliche Kultivierung	85
4.6.4	Kultivierung in kontinuierlicher Rührkesselkaskade	87
4.6.5	Hochzelldichtekultivierung im Zulaufverfahren.....	88
4.7	Herstellung von <i>N</i> -Acetyl-D-Neuraminsäure.....	90
4.8	Molekularbiologische Methoden	91
4.8.1	Isolation von Plasmid-DNS aus <i>Escherichia coli</i>	91
4.8.2	Polymerasekettenreaktion	91
4.8.3	DNS-Aufreinigung	91
4.8.4	Agarosegelelektrophorese.....	92
4.8.5	Restriktion und Ligation von DNS.....	92
4.8.6	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen und Transformation.....	92
4.8.7	Sequenzierung von DNS	92
4.9	Proteinbiochemische Methoden	93
4.9.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	93
4.9.2	Densitometrische Proteinquantifizierung	93
4.9.3	Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure.....	93
4.9.4	Zellaufschluss	93
4.9.5	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie	94
4.9.6	Pufferaustausch	94
4.10	Analytische Methoden	95

4.10.1	Bestimmung der Zellkonzentration	95
4.10.2	Bestimmung von Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration	95
4.10.3	Gravimetrische Bestimmung von Reaktionsvolumina und Volumenströmen....	96
4.10.4	Gaschromatographie zur Quantifizierung von Alkoholen	96
4.10.5	Bestimmung des Methanoleintrags in miniaturisierte Bioreaktoren.....	96
4.10.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	97
4.10.7	Fluoreszenzmessung der PAmCherry- und eGFP-Konzentration.....	97
4.10.8	Bestimmung der Aktivität der Lipase CaL-B2	97
4.10.9	Bestimmung der Leitfähigkeit	98
4.10.10	Druckmessung in miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren	98
4.11	Modellbasierte Identifikation formalkinetischer Parameter	99
5	Kontinuierliche Substratzufuhr über die Gasphase.....	102
5.1	Kontinuierliche Methanolzufuhr in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab.....	103
5.2	Hochzelldichteprozess mit <i>Komagataella pastoris</i> DSM70382	107
5.2.1	Hochzelldichteprozess im Milliliter-Maßstab	107
5.2.2	Maßstabsübertragung	109
5.3	Herstellung von <i>Candida antarctica</i> Lipase B mit <i>Pichia pastoris</i> CaL-B2.....	112
5.3.1	Herstellung von <i>Candida antarctica</i> Lipase B im Milliliter-Maßstab.....	112
5.3.2	Maßstabsübertragung	114
6	Parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab	118
6.1	Kontinuierlicher Betrieb von parallelen Rührkesselreaktoren.....	119
6.2	Analyse des Verweilzeitverhaltens	123
6.3	Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit <i>Escherichia coli</i>	125
6.4	Identifikation der Wachstumskinetik von <i>Escherichia coli</i> im Parallelansatz.....	128
6.5	Reaktionstechnische Untersuchungen zur kontinuierlichen Proteinproduktion mit <i>Escherichia coli</i>	135
6.5.1	Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion.....	136
6.5.2	Einfluss der Induktorkonzentration auf die Proteinproduktion	140
6.5.3	Maßstabsübertragung	146

6.5.4	Dynamische Erhöhung der Induktorkonzentration bei der kontinuierlichen Herstellung rekombinanter Proteine	150
6.6	Herstellung von PAmCherry im Zulaufverfahren.....	155
6.6.1	Etablierung eines Referenzprozesses	155
6.6.2	Anpassung der Induktionsstrategie	158
7	Fließgleichgewichtsuntersuchungen in der Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab	162
7.1	Analyse des Verweilzeitspektrums kontinuierlicher Rührkesselkaskaden.....	163
7.2	Mikrobielle Herstellung von PAmCherry in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade	165
7.2.1	Zweistufige Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab.....	165
7.2.2	Maßstabsübertragung	172
8	Enzymatische Prozesse in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren.....	174
8.1	Kontinuierlicher Betrieb von miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren	176
8.2	Kontinuierliche Herstellung von <i>N</i> -Acetyl-D-Neuraminsäure in Enzym-Membran-Reaktoren	180
8.3	Herstellung von <i>N</i> -Acetyl-D-Neuraminsäure in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskaden	186
9	Zusammenfassung.....	195
10	Ausblick	202
	Literaturverzeichnis	204
	Abkürzungsverzeichnis	225
	Symbolverzeichnis.....	229
	Anhang.....	233
A1	Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien	233
A2	Chemikalien.....	243
A3	Materialien für molekularbiologische Arbeiten.....	246
A4	Standards und Tests	247
A5	Medien und Lösungen	248

1 Einleitung

Die Biotechnologie stellt eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts dar. Neben dem Einsatz im Landwirtschafts- und Umweltsektor ist sie vor allem für die pharmazeutische und stoffwandelnde Industrie von hoher Bedeutung (Weuster-Botz 2006; Bareither und Pollard 2011). Mit dem fortschreitenden Erkenntnisgewinn in der Molekularbiologie und der Reaktionstechnik wurde es möglich eine Vielzahl an Produkten mit Biokatalysatoren wie Mikroorganismen oder Enzymen hochspezifisch und ressourcenschonend zu gewinnen (Chmiel 2011). Um wirtschaftlich konkurrenzfähige Herstellungsverfahren zu erhalten, müssen jedoch neben den Produktionskosten der experimentelle Aufwand und die Kosten für die Entwicklung von Biokatalysatoren sowie der entsprechenden technischen Prozesse minimiert werden (Bareither und Pollard 2011).

Einen Lösungsansatz hierfür bietet die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren (Hortsch und Weuster-Botz 2010). Nach der Einführung von Mikrotiterplatten mit automatisierten Methoden der prozessbegleitenden Analytik für die Entwicklung von Biokatalysatoren hat sich der limitierende Schritt hin zu deren Charakterisierung sowie der folgenden Prozessentwicklung und -optimierung verschoben (Bareither und Pollard 2011). Herkömmlicherweise werden diese Studien ebenfalls in geschüttelten Bioreaktoren wie Mikrotiterplatten oder Schüttelkolben durchgeführt (Chmiel 2011). Aufgrund der oftmals unzureichenden Prozesskontrolle und der geringen Sauerstoffeintragsraten dieser Bioreaktoren können die gewonnenen Erkenntnisse allerdings häufig nicht direkt in den technischen Maßstab übertragen werden (Schäpper et al. 2009; Marques et al. 2010).

Deshalb wurden in den letzten Jahren zahlreiche Bioreaktoren im Mikroliter- und Milliliter-Maßstab entwickelt, die bereits erfolgreich für die Übertragung von Bioprozessen in den Labor- und Pilotmaßstab eingesetzt wurden (Long et al. 2014). Bislang erfüllt jedoch keines der miniaturisierten Bioreaktorsysteme sämtliche Anforderungen der biotechnologischen Forschung und Industrie (Bareither und Pollard 2011). Unter anderem ist die Nutzbarkeit der Bioreaktoren aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur kontinuierlichen Zufuhr von Substratlösungen meist auf Satz- oder Zulaufprozesse mit intermittierender Substratzufuhr begrenzt (Long et al. 2014). Um das Einsatzspektrum von miniaturisierten Bioreaktoren zu erweitern, müssen geeignete Dosierstrategien für bestehende oder neue Technologien verfügbar gemacht werden. So können diese zukünftig effizienter für die Gewinnung von Prozessinformationen bei der Entwicklung und Optimierung von Bioprozessen im Zulaufverfahren und im kontinuierlichen Betrieb eingesetzt werden.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die effiziente Gewinnung von Prozessinformationen stellt einen bedeutenden Engpass für die Entwicklung und Optimierung von biotechnologischen Verfahren dar. Um diese Problematik zu überwinden, wurde bereits eine Vielzahl an miniaturisierten und parallelisierten Bioreaktoren präsentiert (Bareither und Pollard 2011; Long et al. 2014). Allerdings erfüllt bislang keines der bestehenden Systeme sämtliche Anforderungen der biotechnologischen Industrie. Neben oftmals eingeschränkten Volumina für die Probenahme und unzureichender Prozesskontrolle ist in vielen Fällen eine direkte Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse in den technischen Maßstab nicht gegeben (Bareither und Pollard 2011; Takors 2012). Da der Rührkesselreaktor der am häufigsten eingesetzte Reaktortyp in der Bioverfahrenstechnik ist, sollten für die Gewährleistung der Skalierbarkeit von Prozessen vergleichbare physikalische Bedingungen in miniaturisierten Systemen und Rührkesselreaktoren im Labor- und Pilotmaßstab vorherrschen (Weuster-Botz et al. 2007). Für die meisten miniaturisierten Bioreaktoren sind außerdem keine Strategien für die kontinuierliche Zufuhr von Substratlösungen verfügbar, wodurch sich deren Anwendung auf Satzprozesse oder Zulaufprozesse mit intermittierender Substratzugabe beschränkt (Bareither und Pollard 2011).

Ein besonders fortgeschrittenes Bioreaktorsystem stellt der an der Technischen Universität München entwickelte und kommerziell verfügbare bioREACTOR 48 dar. Damit ist der parallele Betrieb von 48 Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab möglich. Durch die Nutzung von speziellen gasinduzierenden Rührorganen können sehr hohe volumenbezogene Sauerstofftransportkoeffizienten ($k_L a > 0,4 \text{ s}^{-1}$) erreicht werden (Puskeiler et al. 2005a; Weuster-Botz 2005). Des Weiteren stellen die Möglichkeit der kontrollierten Prozessführung und die Ähnlichkeit der gerührten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab zu technischen Rührkesselreaktoren entscheidende Vorteile im Vergleich zu anderen miniaturisierten Bioreaktoren dar. Die Eignung dieses Bioreaktorsystems für die Bioprozessentwicklung konnte bereits für einige mikrobielle und enzymatische Prozesse gezeigt werden (Knorr et al. 2007; Vester et al. 2009; Hoefel et al. 2010; Hortsch et al. 2011; Schmidt und Weuster-Botz 2012; Hoefel et al. 2012; Riedlberger und Weuster-Botz 2012; Bendig und Weuster-Botz 2013).

Mit Hilfe von Pipettierrobotern, aber auch mit dem Einsatz eines Prototyps einer speziellen Mikrodosiereinheit war die Anwendung dieser Parallelbioreaktoren bislang auf Satz- oder Zulaufprozesse mit intermittierender Substratzugabe beschränkt (Gebhardt et al. 2011; Faust et al. 2014). Die intermittierende Zugabe von Substraten führt jedoch zu einem ständigen Wechsel der Konzentration von Nährstoffen im Reaktionsansatz, was einen negativen Einfluss auf die Prozessleistung zur Folge haben kann (Hewitt et al. 2000). Vor allem bei hohen Zelldichten in Zulaufverfahren sind vorübergehende Sauerstofflimitierungen möglich, die zur

Bildung von inhibierenden Nebenprodukten führen können (Xu et al. 1999). Aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der Prozessführung in miniaturisierten und technischen Bioreaktoren kann es unter Umständen zu einer falschen Auswahl von geeigneten Reaktionsbedingungen und erstellten Mutanten für Zulaufprozesse im industriellen Maßstab kommen (Funke et al. 2010). Deshalb soll in dieser Arbeit zunächst die kontinuierliche Zugabe von flüchtigen Substraten über die Gasphase der miniaturisierten Bioreaktoren realisiert werden, um parallele reaktionstechnische Untersuchungen von Zulaufprozessen unter technischen Bedingungen im Milliliter-Maßstab zu ermöglichen.

Die kontinuierliche Substratzugabe ist insbesondere bei Zulaufprozessen mit methylotrophen Hefen erforderlich, da diese beim Wachstum mit dem Substrat Methanol einen hohen Sauerstoffbedarf (Jenzsch et al. 2004) und eine erhöhte Wärmeproduktion aufweisen (Weast 1980). Deshalb wurde für die Charakterisierung der neu gestalteten, kontinuierlichen Zufuhr von flüchtigen Substraten über die Gasphase die methylotrophe Hefe *Komagataella pastoris* (früher *Pichia pastoris*) als Modellorganismus gewählt. Dabei ist es zunächst von besonderer Bedeutung den Methanoleintrag in die Flüssigphase der Parallelbioreaktoren in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen zu ermitteln, um definierte und zum technischen Maßstab vergleichbare Eintragsraten zu erreichen. Anschließend sollen als Prozessbeispiele Hochzell-dichteverfahren mit verschiedenen Stämmen der methylotrophen Hefe *Komagataella pastoris* und die sekretorische Herstellung einer *Candida antarctica* Lipase B im Milliliter-Maßstab realisiert werden, um die Nutzbarkeit der neuen kontinuierlichen Substratzugabe über die Gasphase zu evaluieren. Ein besonderes Augenmerk muss dabei auf die Gewährleistung der direkten Skalierbarkeit der Zulaufprozesse vom Milliliter- in den Liter- und Kubikmeter-Maßstab gelegt werden.

Bislang konnte der bioREACTOR 48 nur für Bioprozesse im Satz- und Zulaufbetrieb genutzt werden. Um den Freiheitsgrad bei der Wahl der Prozessführung zu erhöhen, ist eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit die Erweiterung der Parallelbioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb von mikrobiellen Prozessen. Hierfür soll der simultane Zu- und Ablauf von Medium realisiert werden, um die miniaturisierten Bioreaktoren als Chemostaten betreiben zu können. Chemostaten stellen kontinuierlich betriebene Reaktoren dar, bei denen durch die Vorgabe einer konstanten Verdünnungsrate in gleichem Maße frisches Medium zu- und Reaktionslösung abgeführt wird. Damit können Fließgleichgewichtszustände mit konstanten Reaktionsbedingungen erreicht werden (Chmiel 2011). Nach der Realisierung des Zu- und Ablaufs von Medium soll die Nutzbarkeit der Parallelbioreaktoren im Milliliter-Maßstab für den kontinuierlichen Betrieb von mikrobiellen Prozessen evaluiert werden. Dabei sind insbesondere die parallele und sequentielle Reproduzierbarkeit sowie die Skalierbarkeit der Bioprozesse vom Milliliter- in den Liter-Maßstab von hoher Wichtigkeit. Als Modellorganismus wurde *Escherichia coli* gewählt.

Ein bedeutendes Einsatzgebiet von Chemostaten in der Bioverfahrenstechnik stellt die Bestimmung der Wachstumskinetik von Mikroorganismen unter konstanten Umwelteinflüssen, wie beispielsweise Medienzusammensetzung, pH oder Temperatur, dar (Hoskisson und Hobbs 2005). Durch die Vorgabe von konstanten Verdünnungsraten können definierte Wachstumsraten der Mikroorganismen erreicht werden (Chmiel 2011). Mit der Bestimmung der beiden Zustandsgrößen Zelldichte und Substratkonzentration im Fließgleichgewicht bei verschiedenen Verdünnungsraten ist die Schätzung von formalkinetischen Modellparametern von Mikroorganismen über nichtlineare Regression möglich (Chmiel 2011). Herkömmlicherweise werden diese Untersuchungen in aufwendigen, sequentiellen Bioprozessen im Liter-Maßstab durchgeführt. In dieser Arbeit soll deshalb beispielhaft die Möglichkeit zur parallelen Einstellung verschiedener Fließgleichgewichtszustände mit dem Modellorganismus *Escherichia coli* in miniaturisierten Chemostaten unter kontrollierten Prozessbedingungen untersucht werden. Die mit geringem experimentellem Aufwand gewonnenen Prozessdaten können anschließend für die Identifizierung der Wachstumskinetik verwendet werden.

Derzeit werden industrielle Prozesse zur mikrobiellen Herstellung rekombinanter Proteine vor allem im Zulaufbetrieb durchgeführt. Die Identifizierung geeigneter Reaktionsbedingungen erfolgt zumeist in aufwendigen sequentiellen Zulaufprozessen im Liter-Maßstab (Tripathi 2009; Zou et al. 2014). Um die Entwicklungszeit von mikrobiellen Herstellungsprozessen zu verkürzen, soll in dieser Arbeit evaluiert werden, ob die Erkenntnisse aus parallelen Untersuchungen von Fließgleichgewichtszuständen in miniaturisierten Chemostaten für die Verbesserung von Zulaufverfahren zur mikrobiellen Herstellung rekombinanter Proteine genutzt werden können. Von hoher Bedeutung für die Effizienz dieser Bioprozesse ist die Wahl einer geeigneten Induktionsstrategie, die jeweils experimentell für das produzierte Protein und den verwendeten Wirtsorganismus bestimmt werden muss (Tripathi 2009; Fernández-Castané et al. 2012a). Deshalb sollen in dieser Arbeit beispielhaft verschiedene Induktionsstrategien für die Herstellung des Fluoreszenzproteins PAmCherry (*photoactivatable* mCherry, fotoaktivierbares mCherry) mit *Escherichia coli* in parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab charakterisiert werden. Anschließend soll überprüft werden, ob die gewonnenen Erkenntnisse auf die Herstellung von PAmCherry mit *Escherichia coli* im Zulaufverfahren übertragen werden können.

Die effiziente Herstellung von Bioprodukten kann in vielen Fällen nicht durch den Einsatz eines einfachen kontinuierlichen Bioreaktors erreicht werden. Vor allem bei der intrazellulären Herstellung rekombinanter Proteine mit Mikroorganismen sind die erreichbaren Produktkonzentrationen durch den ständigen Austrag der Zellen mit dem Produkt aus dem Reaktionsansatz begrenzt. Des Weiteren kann die Expression rekombinanter Proteine einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen haben, was im Extremfall zum

Absterben der Zellen führen kann (Striedner et al. 2003). Um die Ausbeute von mikrobiellen Herstellungsprozessen rekombinanter Proteine im Zulaufbetrieb zu erhöhen, wird herkömmlicherweise eine zeitliche Entkopplung des Wachstums und der Produktbildung durch die Induktion der Expression des Zielproteins bei einer definierten Zelldichte vorgenommen (Rosano und Ceccarelli 2014a). Diese Trennung von Wachstum und Produktbildung kann in kontinuierlichen Verfahren nur durch die räumliche Trennung der beiden Prozessphasen in mindestens zwei Bioreaktoren, die in einer Reaktorkaskade betrieben werden, erreicht werden. Der erste Reaktor dient dabei dem Wachstum der Zellen ohne Induktion der Proteinexpression. Die Zellen werden in den zweiten Reaktor überführt und dort wird die Herstellung des Zielproteins induziert (Rhee und Schügerl 1998). Kontinuierlichen Herstellungsprozessen hochpreisiger Stoffe wird aufgrund der im Vergleich zum Satz- und Zulaufbetrieb oftmals höheren Produktivität und Flexibilität ein hohes Potential zugeschrieben. Allerdings finden bislang wegen der hohen Kosten und der langen Zeiträume für die Entwicklung kontinuierlicher Verfahren nur wenige kontinuierliche, mikrobielle Herstellungsprozesse industrielle Anwendung (Croughan et al. 2015). Um die Entwicklung von kontinuierlichen Prozessen zu beschleunigen, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Realisierung von parallelen, kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskaden für mikrobielle Prozesse im Milliliter-Maßstab. Als Applikationsbeispiel wurde die intrazelluläre Herstellung des Fluoreszenzproteins PAmCherry mit *Escherichia coli* in einer zweistufigen kontinuierlichen Rührkesselkaskade reaktionstechnisch untersucht.

Eine weitere Anwendung kontinuierlicher Prozesse ist die enzymatische Produktion von Chemikalien (Chmiel 2011). Eine erhebliche Steigerung der Ökonomie dieser Prozesse kann durch eine Verweilzeitentkopplung von Biokatalysatoren und Medium erreicht werden (Tufvesson et al. 2011). Neben einigen Techniken zur Immobilisierung können Enzyme über verschiedene Filtrationsmethoden im Reaktionsgefäß zurückgehalten werden (Dijkstra et al. 2002; Chmiel 2011). Bei der Integration von Filtrationsmembranen in den Ablaufstrom eines kontinuierlichen Reaktors für die Rückhaltung der Enzyme spricht man von einem sogenannten Enzym-Membran-Reaktor (Chmiel 2011). Bislang war eine Verweilzeitentkopplung von Biokatalysatoren in den Parallelreaktoren des bioREACTOR 48 nicht möglich. Deshalb sollen in dieser Arbeit die Rückhaltung von Enzymen über eine Ultrafiltrationsmembran im Ablauf der kontinuierlich betriebenen Reaktoren realisiert werden und so parallele Enzym-Membran-Reaktoren im Milliliter-Maßstab eingeführt werden. Die neuen, miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren sollen beispielhaft für die reaktionstechnische Untersuchung der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure aus *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat in einer zweistufigen Enzymreaktion mit einer *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und einer *N*-Acetylneuraminat-Lyase eingesetzt werden.

3 Theoretische Grundlagen

Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit wichtigen theoretischen Grundlagen eingegangen. Nachdem ein Überblick über verfügbare miniaturisierte Bioreaktoren gegeben wird, soll die Betriebsweise von mikrobiellen Prozessen betrachtet werden. Anschließend wird der Stand der Forschung zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mit den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen *Komagataella pastoris* (*K. pastoris*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie zum Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese dargestellt.

3.1 Miniaturisierte Bioreaktoren

In der Regel gliedert sich die Entwicklung eines biotechnologischen Produktionsprozesses in drei miteinander verknüpfte Bereiche. Dazu zählen die Entwicklung eines Biokatalysators, die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Prozessentwicklung im technischen Maßstab (Chmiel 2011). Da die Auswahl eines Biokatalysators und die Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen eine Vielzahl an Versuchsansätzen erfordern, ist es notwendig diese Studien im Hochdurchsatzverfahren durchzuführen, um den Aufwand und die Kosten der Durchmusterung zu minimieren. Deshalb greift man hierfür oftmals auf parallelisierte und automatisierte Bioreaktoren mit kleinen Reaktionsvolumina zurück (Weuster-Botz 2005; Hortsch und Weuster-Botz 2010).

Bareither und Pollard (2011) definierten Anforderungen für parallele Bioreaktorsysteme zur Kultivierung von Mikroorganismen im kleinen Maßstab, die von industriell relevanten Prozessen mit Hefen und *E. coli* abgeleitet wurden. Demnach sollte eine Zelldichte von über 100 g L^{-1} Biotrockenmasse möglich sein. Außerdem ist ein hoher volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient Voraussetzung, um bei maximalen Sauerstoffaufnahmeleistungen (*oxygen uptake rate*, *OUR*) der Zellen von bis zu $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ einen Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) von über 20 % Luftsättigung in der Flüssigphase gewährleisten zu können. Dabei sollte durch ausreichende Begasung zudem ein Kohlenstoffdioxidpartialdruck von unter 5 % Luftsättigung im Medium erreicht werden können. Neben wichtigen Parametern wie pH und $p\text{O}_2$ ist für die effiziente Bestimmung von Prozessinformationen die prozessbegleitende Messung der Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid (CO_2) im Abgas von hoher Wichtigkeit. Des Weiteren sollte durch die automatisierte Zugabe von Titrationsmitteln oder Gasen ein pH zwischen 4 und 8 eingestellt werden können. Außerdem müssen komplexe Zulaufprofile realisierbar sein. Um die Maßstabsübertragung zu vereinfachen, sollte geometrische Ähnlichkeit zu herkömmlichen Rührkesselreaktoren bestehen. Daneben ist es entscheidend ausreichend große Reaktionsvolumina für stetige Probenahmen während Bioprozessen mit einer Gesamtdauer von bis zu einer Woche zu gewährleisten. Des Weiteren

sollte eine hohe Anzahl an Bioreaktoren parallel betrieben werden können. Um möglichst geringe Personalkosten zu erreichen, sollten die Vorbereitungszeit möglichst kurz und die Bioreaktoren nach Möglichkeit mit einer nachgeschalteten automatisierten Analytik und Bioproduktaufarbeitung kompatibel sein. Nachfolgend werden die bestehenden miniaturisierten Bioreaktorsysteme vorgestellt. Dabei wird zwischen geschüttelten Bioreaktoren, Blasensäulen, Mikrobioreaktoren und miniaturisierten Rührkesselreaktoren unterschieden.

3.1.1 Parallele Bioreaktoren

Für Durchmusterungsstudien kommen oftmals geschüttelte Bioreaktoren zum Einsatz. Dabei sind vor allem die einfache Handhabung und die Möglichkeit zur Automatisierung von Vorteil (Büchs 2001). Das höchste Maß an Parallelisierbarkeit kann hierbei mit Mikrotiterplatten (MTP) erreicht werden. Es existieren zahlreiche Applikationsbeispiele mit verschiedenen Bioreaktoren, die eine Messung wichtiger Prozessparameter wie pH, pO_2 und optischer Dichte (OD) erlauben (Bareither und Pollard 2011). Die am weitesten fortgeschrittene Technologie stellt wohl das von m2p-laps (Baesweiler, Deutschland) kommerziell vertriebene BioLector[®] System mit bis zu 48 parallelen Ansätzen und einem Reaktionsvolumen von bis zu 1,5 mL dar. Damit ist neben der Messung der genannten Parameter eine Kontrolle des pH mit Titrationsmitteln sowie die Zufuhr von Substratlösungen möglich (Funke et al. 2010). Durch speziell entwickelte Geometrien für die Vertiefungen der Mikrotiterplatten können maximale volumenbezogene Sauerstofftransportkoeffizienten von etwa $0,16 \text{ s}^{-1}$ erreicht werden (Funke et al. 2009). Trotz der Entwicklungen der letzten Jahre stellt der immer noch zu geringe Sauerstoffeintrag im Vergleich zu herkömmlichen Rührkesselreaktoren mit volumenbezogenen Sauerstofftransportkoeffizienten von $0,3 \text{ s}^{-1}$ (Van't Riet 1979) eine Einschränkung für die Kultivierung von aeroben Mikroorganismen in Mikrotiterplatten dar. Dadurch ist die Prozessentwicklung mit hohen Zulaufströmen analog zu industriellen Prozessen nicht möglich (Zimmermann et al. 2006; Bareither und Pollard 2011). Des Weiteren ist durch das geringe Kulturvolumen die Probenahme während des Prozesses stark eingeschränkt und die Prozesskontrolle erschwert (Schäpper et al. 2009; Hegab et al. 2013).

Ein weiteres geschütteltes Bioreaktorsystem für Durchmusterungsstudien stellt klassischerweise der Schüttelkolben dar (Chmiel 2011). Hierbei ist mittlerweile ebenfalls die Messung von pH und pO_2 über nicht invasive Fluoreszenzmessung etabliert (Bareither und Pollard 2011). Außerdem ist die Zugabe von Substratlösungen und Titrationsmitteln möglich, was den apparativen Aufwand allerdings deutlich erhöht (Weuster-Botz et al. 2001a; Listner et al. 2006). Sehr vielversprechend ist die Entwicklung der RAMOS-Technologie, die eine Messung der Kohlenstoffdioxid- und Sauerstoffkonzentration im Abgas und somit die Bestimmung des Respirationskoeffizienten erlaubt (Seletzky et al. 2007a). Da der Gaseintrag in Schüttelkolben, wie in Mikrotiterplatten nur an der Gas-Flüssig-Phasengrenze stattfindet, können in

Schüttelkolben mit einem volumenbezogenen Sauerstofftransportkoeffizienten ($k_L a$) von zumeist unter $0,1 \text{ s}^{-1}$ (Marques et al. 2010) ebenfalls keine ausreichenden Sauerstofftransferaten (*oxygen transfer rate, OTR*) für die direkte Übertragung von Bioprozessen in gerührte Bioreaktoren erreicht werden (Bareither und Pollard 2011).

Höhere Sauerstofftransferaten können ohne großen apparativen Aufwand mit miniaturisierten Blasensäulen realisiert werden. Dabei erfolgt der Leistungseintrag durch den am Reaktorboden eingebrachten Gasvolumenstrom (F_{Gas}), der zumeist über eine Sinterglasfritte oder eine perforierte Platte verteilt wird (Weuster-Botz 2005). So wurden einige Reaktoren entwickelt, die aus 8 bis 16 parallelen Blasensäulen bestehen (zum Beispiel Frachon et al. 2006; Weuster-Botz et al. 2001b). Von Tang et al. (2006) und Isett et al. (2007) vorgestellte parallele Blasensäulen mit einem Reaktionsvolumen von je 10 mL bieten die Möglichkeit der prozessbegleitenden Messung von pH und pO_2 sowie der Regelung des pH mit der Zugabe von Ammoniak und Kohlenstoffdioxid über die Gasphase. Der höchste volumenbezogene Sauerstofftransportkoeffizient wurde von Weuster-Botz et al. (2002) in gerührten Blasensäulen mit einem $k_L a > 0,3 \text{ s}^{-1}$ erreicht. Die in Blasensäulen erzielten Resultate können jedoch aufgrund des geringeren Verhältnisses von maximaler zu integraler Energiedissipation von Blasensäulen im Vergleich zu Rührkesselreaktoren (Weuster-Botz 2005) nur schwer in Rührkesselreaktoren im technischen Maßstab übertragen werden.

Einen interessanten Ansatz, um parallelisierte Versuche bei Reaktionsvolumina von unter 1 mL zu realisieren, stellen Mikrobioreaktoren dar. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Mikrobioreaktoren entwickelt, die von den Fortschritten der Mikrofluidik profitieren (Schäpper et al. 2009; Hegab et al. 2013). In Mikrobioreaktoren wird eine ausreichende Gaseintragsrate zumeist mit der Begasung über Polydimethylsiloxan-Membranen gewährleistet. Um Verdunstung zu minimieren, können die Reaktoren in Inkubatoren mit wassergesättigter Atmosphäre betrieben werden (Schäpper et al. 2009). In fortgeschrittenen Reaktorsystemen können wichtige Prozessparameter wie Temperatur, pH, pO_2 und OD nicht-invasiv gemessen werden (Schäpper et al. 2009; Hegab et al. 2013). Außerdem kann der pH durch die Zugabe von Kohlenstoffdioxid und Ammoniak über die Gasphase kontrolliert werden (Schäpper et al. 2010). Allerdings ist eine ausreichende Durchmischung aufgrund des kleinen Reaktionsvolumens nur schwer möglich und Wandwachstum tritt im Vergleich zu größeren Bioreaktoren überproportional stark auf. Weiterhin ist die verlässliche Durchführung von Zulaufprozessen analog zum industriellen Maßstab aufgrund der bislang zu ungenauen Dosierung von Volumina im Nanoliterbereich nicht möglich (Schäpper et al. 2009). So wurde bisher eine maximale Zelldichte mit einer OD von 40 – 60 in einem Mikrobioreaktor mit 1 mL Reaktionsvolumen im Zulaufverfahren mit *E. coli* erreicht (Bower et al. 2012). Ein offensichtlicher Nachteil dieser Bioreaktoren ist das begrenzte Probevolumen für die weitere Analyse der Zellen und des Reaktionsansatzes.

Um die Limitierungen der bisher beschriebenen Bioreaktoren zu umgehen, haben einige Forschungsgruppen miniaturisierte Rührkesselreaktoren mit einem Reaktionsvolumen von 10 – 100 mL entwickelt. Diese weisen oftmals geometrische Ähnlichkeit zu herkömmlichen Rührkesselreaktoren auf und bieten die Möglichkeit der Kontrolle von pH und pO_2 sowie der Zugabe von Substraten (Bareither und Pollard 2011). Für einige dieser parallelisierten Reaktorsysteme konnte die Übertragbarkeit von Bioprozessen mit *E. coli* und *Bacillus subtilis* in größere Maßstäbe gezeigt werden (Sia und Whitesides 2003; Betts und Baganz 2006; Betts et al. 2006; Gill et al. 2008). Allerdings wurden die Untersuchungen bei geringen Zelldichten ($< 10 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse) durchgeführt, wodurch keine Aussage über die Übertragbarkeit von Bioprozessen mit hohen Zelldichten getroffen werden kann (Bareither und Pollard 2011).

Es wurden jedoch bereits Bioreaktoren vorgestellt, mit denen höhere Zelldichten im Zulaufverfahren erreicht werden konnten (Bareither und Pollard 2011; Long et al. 2014). So entwickelten Ali et al. (2012) miniaturisierte Bioreaktoren, die bezüglich Geometrie und Aufbau herkömmlichen Rührkesselreaktoren nachempfunden sind. Damit konnte ein Produktionsprozess eines Antikörperfragments im Zulaufverfahren aus dem 7 L Maßstab in den 25 mL Maßstab übertragen werden, wobei eine maximale OD von 114 erreicht wurde.

Ein weiteres fortgeschrittenes Bioreaktorsystem bestehend aus 48 parallelen Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 8 – 15 mL wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München realisiert. Dabei sorgen gasinduzierende Rührorgane für den Eintrag von Gasblasen aus dem Kopfraum der Reaktoren und ermöglichen so einen volumenbezogenen Sauerstofftransportkoeffizienten von über $0,4 \text{ s}^{-1}$ (Puskeiler et al. 2005a; Weuster-Botz 2005). Die prozessbegleitende Messung von pH und pO_2 wird über nichtinvasive fluorometrische Sensoren erreicht. Die Regelung der Temperatur der Reaktionsansätze sowie die Kühlung des Kopfraums zur Verringerung der Verdunstung erfolgt hierbei über Wärmetauscher (Kusterer et al. 2008). Die Bioreaktoren können in einen Laborroboter integriert werden, der die automatisierte Kontrolle des pH, die Probenahme und komplexe intermittierende Zulaufstrategien erlaubt. Damit konnten verschiedene Prozesse im Satz- und Zulaufbetrieb für eine Reihe von Mikroorganismen erfolgreich aus dem Labor- in den Millilitermaßstab übertragen werden (Knorr et al. 2007; Vester et al. 2009; Hoefel et al. 2010; Gebhardt et al. 2011; Hortsch et al. 2011; Hoefel et al. 2012; Schmidt und Weuster-Botz 2012; Bendig und Weuster-Botz 2013). Mit dem Einsatz eines Prototyps einer speziellen Mikrodosiereinheit sowie der Implementierung von Strategien zur kontrollierten Substratfreigabe mit Enzymsystemen während des intermittierenden Zulaufs konnten in Bioprozessen mit *E. coli* hohe Zelldichten von bis zu 70 g L^{-1} mit Glucose beziehungsweise Saccharose als Substrat erreicht werden (Faust et al. 2014). Des Weiteren wurden die Bioreaktoren bereits erfolgreich für verschiedene enzymatische Umsetzungen im Satzbetrieb eingesetzt (Dennewald et al. 2012; Riedlberger und Weuster-Botz 2012).

Neben diesen miniaturisierten Bioreaktoren wurden in den letzten Jahren verschiedene oftmals kommerziell erhältliche Technologien mit einem Reaktionsvolumen von unter 1 L entwickelt. Dabei handelt es sich zumeist um herkömmliche Rührkesselreaktoren im Labormaßstab mit reduziertem Reaktionsvolumen, die modular kombiniert und zentral gesteuert werden können. Somit kann ein hoher Grad an Parallelisierbarkeit erreicht werden. Die Reaktoren sind zumeist mit zum industriellen Maßstab äquivalenter Mess- und Regelungstechnik sowie externer Peripherie ausgerüstet (Bareither und Pollard 2011; Bareither et al. 2013; Long et al. 2014). Allerdings ist für die manuelle Vorbereitung und Probenahme in den meisten Fällen hoher Personalaufwand vonnöten. Die Entwicklung von Einmalreaktoren aus Kunststoff (Glaser 2011) sowie weiterer Automatisierungsstrategien könnte diesen kommerziell erhältlichen Bioreaktoren in den nächsten Jahren weitere Marktanteile eröffnen. Da diese Bioreaktoren per Definition zu den Rührkesselreaktoren im Labormaßstab gezählt werden können, soll in der Folge nicht näher auf sie eingegangen werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass bislang keines der zur Verfügung stehenden miniaturisierten Bioreaktionssysteme sämtliche von Bareither und Pollard (2011) definierten Anforderungen erfüllt und somit eine Erweiterung der bestehenden Bioreaktoren von großer Wichtigkeit für die Bioprozessentwicklung im Hochdurchsatz ist. Dabei steht vor allem die Implementierung von neuen Technologien zur kontinuierlichen Substratzufuhr für die Realisierung von komplexen Zulaufprofilen im Vordergrund, um Mikroorganismen unter industriell relevanten Bedingungen charakterisieren zu können und die Entwicklung von Bioprozessen kostengünstig und zeitsparend im Milliliter-Maßstab durchführen zu können.

3.1.2 Kontinuierliche Bioprozesse in miniaturisierten Bioreaktoren

Der kontinuierliche Betrieb von Rührkesselreaktoren wird seit 1950 für physiologische Studien von Zellen unter definierten und kontrollierten Bedingungen eingesetzt (Monod 1950; Novick und Szilard 1950). Die Wachstumsrate von Zellen kann in Chemostaten durch das Vorgeben der Verweilzeit des Mediums kontrolliert werden. Da heutzutage ein fundamentales Wissen des mikrobiellen Genoms sowie Methoden zur Analyse der intrazellulären Proteine, der mRNA, des Metaboloms und der intrazellulären Stoffflüsse zur Verfügung stehen, ist die Charakterisierung der Physiologie von Mikroorganismen auf molekularem Level möglich. Dafür stellen kontinuierliche Rührkesselreaktoren das optimale Reaktionssystem dar, da Parameter wie die Medienzusammensetzung, der pH, die Temperatur, und der Sauerstoffeintrag kontrolliert werden können. Durch die Einstellung von Fließgleichgewichtszuständen kann der zelluläre Metabolismus außerdem unter substratlimitierten Bedingungen untersucht werden (Hoskisson und Hobbs 2005).

Die wesentlichen Nachteile von kontinuierlichen Kultivierungen stellen der hohe experimentelle Aufwand und der hohe Medienverbrauch dar. Letzterer ist vor allem beim Einsatz von teuren isotonenmarkierten Substraten problematisch (Niklas et al. 2010). Eine generelle Möglichkeit diese Limitierungen zu umgehen ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktorsystemen (Weuster-Botz 2005; Akgün et al. 2008). Bisher sind jedoch nur wenige miniaturisierte Bioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb entwickelt worden.

Nanthen et al. (2006) stellten parallele Bioreaktoren für die kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* in Hungateröhrchen mit einem Arbeitsvolumen von 10 mL vor. Dabei wird zur Begasung wassergesättigte Luft über das Anlegen von Unterdruck in die Bioreaktoren eingebracht und kleine Magnetrührkörper ermöglichen die ausreichende Durchmischung und den Sauerstofftransfer. Die Reaktoren wurden durch die Implementierung von prozessbegleitender pH- und pO_2 -Messung sowie einer Abgasanalytik erweitert (Klein et al. 2013).

Seletzky et al. (2007b) konnten in von Akgün et al. (2004) entwickelten kontinuierlich betriebenen Schüttelkolben die Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* mit Milchsäure als Substrat etablieren und die Bioprozesse basierend auf dem Sauerstofftransfer und dem pH in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab übertragen. Die Begasung erfolgt dabei wie die Zufuhr von frischem Medium über Einlässe im Deckel der Schüttelkolben. Der Abfluss wird über eine Durchführung in der Wand der Schüttelkolben realisiert, der auf einer definierten Höhe angebracht werden kann, wodurch die Ablafrate über den Füllstand des Mediums kontrolliert wird. Mit einer Weiterentwicklung der Bioreaktoren durch die Einführung von zylindrischen Kulturgefäßen konnte die maximale Sauerstofftransferate auf bis zu $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erhöht werden. So konnten skalierbare kontinuierliche Bioprozesse mit aeroben Mikroorganismen durchgeführt werden (Akgün et al. 2008).

Des Weiteren wurden verschiedene Mikrobioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb mit einem Reaktionsvolumen $< 1 \text{ mL}$ entwickelt (Zhang et al. 2006; Lee et al. 2011), die teilweise als Chemostat und Turbidostat betrieben werden können. Dabei können durch miniaturisierte Messtechnik wichtige Prozessparameter wie Temperatur, pH, pO_2 oder Zelldichte gemessen und kontrolliert werden (Lee et al. 2011).

Allerdings weist die Mehrzahl der entwickelten miniaturisierten Bioreaktoren geringe Sauerstofftransferaten auf, was die maximalen Zelldichten und Zulaufraten einschränkt (Kirk und Szita 2013). Weitere Nachteile sind die oftmals unzureichende Prozesskontrolle sowie das geringe Reaktionsvolumen von teilweise deutlich unter 1 mL , wodurch die Probenahme für die weiteren Analysen der Zellen und des Reaktionsansatzes eingeschränkt wird. Die Realisierung von neuen Kultivierungssystemen, mit denen sich kontinuierliche Studien kostengünstig und zeitsparend durch parallele Ansätze mit geringen Reaktionsvolumina

durchführen lassen und die genannten Limitierungen der bisher verfügbaren miniaturisierten Bioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb überwunden werden, wäre von großem Vorteil für die Bioprozesstechnik. Diese Bioreaktoren könnten sowohl für metabolische Studien unter definierten Bedingungen als auch für die Bioprozessentwicklung eingesetzt werden.

3.1.3 Maßstabsübertragung

Da immer mehr Produkte biotechnologisch hergestellt werden, müssen neue Bioprozesse nicht nur im kleinen Maßstab sondern auch im Produktionsmaßstab optimale Ausbeuten erreichen. Hierfür müssen die in Durchmusterungsstudien gewonnenen Ergebnisse aus miniaturisierten Bioreaktoren möglichst direkt auf Bioprozesse in industriellen Anlagen übertragen werden können (Takors 2012). Es existieren verschiedene Ansätze und Kenngrößen, die als Kriterium für die Maßstabsübertragung verwendet werden (Junker 2004; Schmidt 2005). In der Folge sollen einige dieser Kriterien vorgestellt werden, die am häufigsten Verwendung finden. Dabei spielt die geometrische Ähnlichkeit der Reaktoren für viele Kenngrößen eine entscheidende Rolle. Sie ist jedoch in der Praxis nur selten zu erreichen (Junker 2004).

Wichtige Parameter, die vor allem bei Bioprozessen mit mycelbildenden oder scherempfindlichen Mikroorganismen für die Maßstabsübertragung eingesetzt werden, sind die Rührerspitzen geschwindigkeit und die damit verbundene Scherrate. Sie sind unter anderem abhängig von der Rührerdrehzahl und dem Durchmesser des Kessels. Allerdings vermindert sich bei gleicher Rührerspitzen geschwindigkeit oftmals der Leistungseintrag in größeren Reaktoren, was sich negativ auf die Sauerstofftransfer rate auswirken kann (Junker 2004).

Weiter kann die Reynoldszahl des Rührers für verschiedene Maßstäbe konstant gehalten werden. Für Bioprozesse ist diese Kenngröße jedoch nicht besonders geeignet, da der Einfluss der Begasung auf den Prozess nicht berücksichtigt wird (Ju und Chase 1992) und sich die Reynoldszahl des Rührers in der Regel mit dem Reaktionsvolumen erhöht (Junker 2004).

Da in industriellen Bioreaktoren mit großen Reaktionsvolumina keine ideale Durchmischung gewährleistet werden kann (Takors 2012), wird oftmals die Mischzeit der Reaktoren als Kriterium für die Maßstabsübertragung verwendet. Allerdings sind vergleichbare Mischzeiten in herkömmlichen Reaktionssystemen verschiedener Maßstäbe kaum zu erreichen und liegen in der Regel bei Laborreaktoren im niedrigen Sekundenbereich, wohingegen in industriellen Anlagen Mischzeiten von mehreren Minuten realistisch sind (Junker 2004). Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene Reaktoren im Labormaßstab entwickelt, die aus einer Kombination von mehreren Rührkesselreaktoren oder Rührkesselreaktoren und

Strömungsrohren bestehen. Damit können die durch hohe Mischzeiten entstehenden Substrat-, pH- und pO_2 -Gradienten in Reaktoren im Produktionsmaßstab und die resultierenden negativen Auswirkungen auf Bioprozesse simuliert werden (Neubauer und Junne 2010; Takors 2012). Diese Konfigurationen werden allerdings weniger für die Maßstabsübertragung von Bioprocessen als vielmehr für die Evaluation der Auswirkungen der nichtidealen Bedingungen auf den Metabolismus der Zellen eingesetzt (Neubauer und Junne 2010).

Ein weiteres Kriterium für die Maßstabsübertragung von Bioprocessen ist der volumetrische Leistungseintrag (Junker 2004). Allerdings erhöhen sich mit zunehmendem Reaktionsvolumen bei gleichem Leistungseintrag die Zirkulationszeit, die Mischzeit sowie die Rührerspitzen geschwindigkeit und damit die Scherrate (Brown 1982). Des Weiteren ist bei größeren Maßstäben ein geringerer Leistungseintrag für einen zu miniaturisierten Reaktoren vergleichbaren Sauerstoffeintrag nötig (Ju und Chase 1992), weshalb eine Übertragung basierend auf dieser Kenngröße zum Einsatz unnötig großer Motoren führen kann (Junker 2004).

Eine wichtige Kenngröße vieler Bioprocessen ist der im Medium vorliegende Sauerstoffpartialdruck, da aerobe Mikroorganismen eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff für Wachstum und Produktbildung benötigen. Für einen optimalen Verlauf des Bioprozesses kann beispielsweise bei Kultivierungen von Hefen oder *E. coli* ein unterer Grenzwert von 10 – 30 % Luftsättigung ausreichen (Junker 2004). Bei der Maßstabsübertragung basierend auf dem Sauerstoffanteil im Medium ist jedoch zu beachten, dass dieser in industriellen Anlagen durch die nichtideale Durchmischung innerhalb des Reaktors starken Schwankungen unterliegt (Neubauer und Junne 2010). Deshalb sollte der pO_2 an kritischen Stellen wie dem Ort der Substratzugabe gemessen werden und auch dort den kritischen Wert nicht unterschreiten.

Eng mit dem im Medium vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck verknüpft sind der volumenbezogene Sauerstofftransportkoeffizient und die davon linear abhängige Sauerstofftransfer rate. Der Sauerstoffeintrag in Bioreaktoren kann mit dem Penetrationsmodell, mit der Theorie der Oberflächenerneuerung oder mit der am häufigsten verwendeten Zweifilmtheorie, bei der der gesamte Stofftransportwiderstand auf der Seite des Flüssigkeitsfilms liegt, beschrieben werden (Chmiel 2011). Dabei wird angenommen, dass die Sauerstoffaufnahme rate der Zellen gleich der Sauerstofftransfer rate ist. Man erhält somit für die Sauerstofftransfer rate den in Gleichung (3.1) dargestellten Zusammenhang in Abhängigkeit der Differenz zwischen der Sauerstoffsättigungskonzentration $c_{O_2}^*$ und der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration im Medium c_{O_2} (Junker 2004). Der $k_L a$ setzt sich aus dem

flüssigkeitsseitigen Stoffdurchgangskoeffizienten k_L und der flüssigvolumen-spezifischen Stoffaustauschfläche a zusammen.

$$OTR = OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (3.1)$$

Mit:	OTR	Sauerstofftransferrate, $\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
	OUR	Sauerstoffaufnahme, $\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
	$k_L a$	Volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s^{-1}
	$c_{O_2}^*$	Sauerstoffsättigungskonzentration, mmol L^{-1}
	c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration im Medium, mmol L^{-1}

Da der benötigte $k_L a$ jedoch prozessspezifisch ist und im Prozessverlauf aufgrund der Änderung der Medienzusammensetzung variieren kann, ist er nur bedingt als Kriterium für die Maßstabsübertragung von Bioprocessen geeignet (Junker 2004). Allerdings kann vereinfachend die maximal mögliche Sauerstofftransferrate OTR_{max} eines Bioreaktors bei definierten Betriebsbedingungen im Medium ohne Zellen bestimmt werden. Dafür muss der entsprechende $k_L a$ bekannt sein und für die Sauerstoffkonzentration im Medium werden $c_{O_2} = 0 \text{ mmol L}^{-1}$ angenommen. Wenn mit dieser maximal möglichen Sauerstofftransferrate im kleinen Maßstab keine Sauerstofflimitierung auftritt, kann sie als Kriterium für die Maßstabsübertragung eingesetzt werden (Junker 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für jeden Bioprozess bekannt sein muss, welche Größe die Kultivierung maßgeblich beeinflusst, um eine reibungslose Maßstabsübertragung zu gewährleisten. Außerdem muss der Zusammenhang einiger der beschriebenen Größen, wie zum Beispiel Leistungseintrag und Rührerspitzen-geschwindigkeit, beachtet werden. Bei aeroben Prozessen mit einzelligen Mikroorganismen wie Hefen und *E. coli* werden vor allem p_{O_2} , $k_L a$ und OTR als Kriterien für die Maßstabsübertragung eingesetzt (Junker 2004).

3.2 Betriebsweisen von mikrobiologischen Prozessen

Mikrobielle Prozesse können mit Hilfe mathematischer Modelle beschrieben werden, die jeweils eine Kombination aus formalkinetischen Ansätzen und Stoffbilanzen des verwendeten Reaktionssystems beinhalten. Nachfolgend soll die Kinetik von Wachstum und Produktbildung unter kontrollierten Bedingungen dargestellt werden. Anschließend soll auf verschiedene Betriebsweisen von mikrobiellen Prozessen im idealen Rührkesselreaktor eingegangen werden. Die mathematischen Herleitungen in diesem Abschnitt sind, falls nicht anders vermerkt, nach Schügerl (1985), Kato und Yoshida (2009) sowie Chmiel (2011) dargestellt.

3.2.1 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Grundvoraussetzung für das Wachstum und die Produktbildung von heterotrophen Mikroorganismen ist die adäquate Versorgung der Zellen mit organischen Kohlenstoff- und Energiequellen, Stickstoffverbindungen, Mineralsalzen, Spurenelementen und Sauerstoff. Dies erfolgt durch den gezielten Stoffaustausch über das wässrige Kulturmedium.

Als Wachstum wird dabei die Massenzunahme von Mikroorganismen verstanden, wohingegen Vermehrung der Zunahme der Zellzahl entspricht. Bei Mikroorganismen, die sich mittels Zellteilung vermehren, kann unter der Annahme einer konstanten mittleren Zellgröße Wachstum und Vermehrung vereinfachend gleichgesetzt werden (Bergter 1983).

Unter unlimitierten Bedingungen im Satzverfahren treten die in Abbildung 3.1 dargestellten sechs Wachstumsphasen auf (Monod 1949). Nach der Inokulation ist zunächst eine Adaption der Zellen an die vorliegenden Reaktionsbedingungen zu beobachten (Verzögerungsphase). Anschließend setzt das Wachstum der Zellen mit steigender Rate ein (Übergangsphase) bis schließlich die maximal mögliche spezifische Wachstumsrate erreicht wird (Exponentielle Phase). Sobald das Wachstum der Zellen durch den Verbrauch eines oder mehrerer essentieller Zusätze begrenzt wird, nimmt die spezifische Wachstumsrate ab (Substratlimitierungsphase). Daraufhin stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Wachstums- und Sterberate der Mikroorganismen ein (Stationäre Phase). Neben der Limitierung durch Substrate können zu hohe Zelldichten oder das Auftreten von inhibierenden und toxischen Stoffwechselprodukten weitere Gründe für das verringerte Wachstum sein. Schließlich überwiegt die Sterberate und die Zellmasse nimmt ab (Absterbephase).

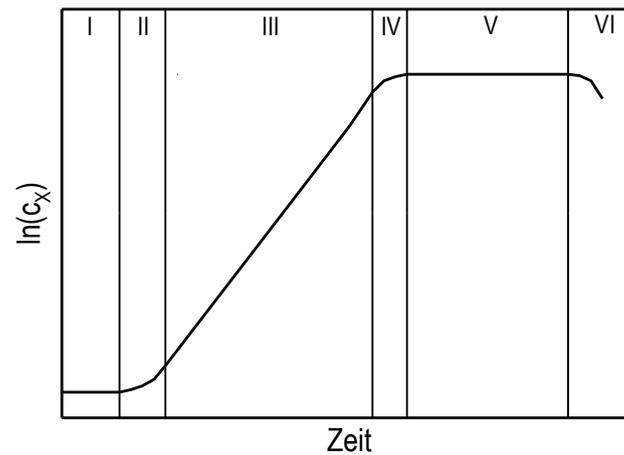


Abbildung 3.1: Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren: Verzögerungsphase (I), Übergangsphase (II), Exponentielle Phase (III), Substratlimitierungsphase (IV), Stationäre Phase (V) und Absterbephase (VI).

Bei der mathematischen Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen wird zumeist vereinfachend auf ein unstrukturiertes und unsegregiertes Modell zurückgegriffen. Damit werden die Unterscheidung von Individuen der Zellpopulation und das Auftreten von Subpopulationen ausgeschlossen (Chmiel 2011). Die Wachstumsrate r_X kann so als Veränderung der Biomassekonzentration c_X über die Zeit t beschrieben werden.

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

Mit:

r_X	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
c_X	Biomassekonzentration, g L^{-1}
t	Zeit, h
μ	Spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Hierbei ist die spezifische Wachstumsrate μ folgendermaßen definiert:

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

Die Integration von Gleichung (3.3) über der Zeit ermöglicht die Beschreibung der exponentiellen Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der initialen Biomassekonzentration $c_{X,0}$.

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

Mit:

$c_{X,0}$	Initiale Biomassekonzentration, g L^{-1}
-----------	---

In (chemisch) definierten Medien ist die Zusammensetzung qualitativ und quantitativ exakt definiert. Das Wachstum ist hierbei üblicherweise durch die Kohlenstoffquelle begrenzt. Der Zusammenhang der spezifischen Wachstumsrate μ und der Konzentration des limitierenden Substrats c_S kann über eine Sättigungsfunktion beschrieben werden (Monod 1949).

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

Mit:	μ_{max}	Maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
	c_S	Substratkonzentration, $g L^{-1}$
	K_S	Affinitätskonstante des Substrats, $g L^{-1}$

Dabei stellt die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} eine im absoluten Substratüberschuss erreichbare theoretische Größe dar. Die Affinitätskonstante des Substrats K_S entspricht der Substratkonzentration, bei welcher die halbmaximale spezifische Wachstumsrate auftritt.

Die volumetrischen und spezifischen Substrataufnahmeraten r_S und q_S beziehungsweise Produktbildungsraten r_P beziehungsweise q_P können analog zur Wachstumsrate beschrieben werden. Dabei sollen Reaktionsgeschwindigkeiten für Substrate negativ und für Produkte positiv definiert werden.

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

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

Mit:	r_S	Volumetrische Substrataufnahmerate, $g L^{-1} h^{-1}$
	q_S	Spezifische Substrataufnahmerate, $g g^{-1} h^{-1}$
	r_P	Volumetrische Produktbildungsrate, $g L^{-1} h^{-1}$
	q_P	Spezifische Produktbildungsrate, $g g^{-1} h^{-1}$
	c_P	Produktkonzentration, $g L^{-1}$

Zur mathematischen Darstellung des Biomasseertragskoeffizienten $Y_{X,S,\mu}$ und der Produktausbeute $Y_{P,S}$ bezogen auf die zugeführte Substratkonzentration können die entsprechenden spezifischen Raten ins Verhältnis gesetzt werden.

$$Y_{XS,\mu} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{\mu}{q_S} \quad (3.8)$$

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

Mit: $Y_{XS,\mu}$ Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1}
 Y_{PS} Produktausbeute, g g^{-1}

Unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels muss Gleichung (3.5) um die Substrataufnahmegeschwindigkeit des Erhaltungsstoffwechsels m_S und den Biomasseertragskoeffizienten erweitert werden.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \quad (3.10)$$

Mit: m_S Substrataufnahmerate des
 Erhaltungsstoffwechsels, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Der Zusammenhang zwischen Biomasseertragskoeffizient, spezifischer Substrataufnahmerate und Wachstumsrate muss im Falle der Produktbildung und unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels der Zellen nach Gleichung (3.11) um die Substrataufnahmegeschwindigkeit des Erhaltungsstoffwechsels m_S und der Produktbildung $q_{S,P}$ erweitert werden.

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S + q_{S,P} \quad (3.11)$$

Mit: $q_{S,P}$ Substrataufnahmerate für die
 Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Um Ergebnisse verschiedener Bioprozesse zur Herstellung intrazellulärer Produkte zu vergleichen, kann der Anteil an gebildetem Produkt pro gebildeter Zellmasse Y_{PX} herangezogen werden.

$$Y_{PX} = \frac{c_P}{c_X} \quad (3.12)$$

Mit: Y_{PX} Produktanteil, g g^{-1}

3.2.2 Betrieb von Bioreaktoren

Die in dieser Arbeit eingesetzten Rührkesselreaktoren stellen die wichtigste Gruppe an Produktionsreaktoren in der Biotechnologie dar (Weuster-Botz 2006) und werden meist mit Scheibenrührern als Rührorgane betrieben. Durch die im Grenzfall erreichte ideale Durchmischung sollen räumlich konstante (isotrope) Prozessbedingungen (Konzentration, Reaktionsgeschwindigkeit) gewährleistet werden. Weiter werden für ideale Rührkesselreaktoren isobare und isotherme Reaktionsbedingungen angenommen. Als Grundlage für sämtliche folgende Berechnungen dient die allgemeine Form der Massenbilanz von idealen Rührkesselreaktoren in Gleichung (3.13), die örtliche und zeitliche Konzentrationsgradienten berücksichtigt (Chmiel 2011). Die Stoffbilanz wird für jede Betriebsweise entsprechend vereinfacht und kann anschließend mit einem formalkinetischen Modell gekoppelt werden.

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

Mit:	m_i	Masse der Komponente i , g
	c_i	Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L ⁻¹
	$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L ⁻¹
	F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, L h ⁻¹
	F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, L h ⁻¹
	r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , g L ⁻¹ h ⁻¹

Dabei sollen die Reaktionsgeschwindigkeiten r_i für Substrate negativ und für Produkte sowie Biomasse positiv definiert sein. Des Weiteren soll der Reaktor als ideal durchmischt betrachtet werden, wodurch die Konzentration aller Komponenten c_i im Reaktor der Konzentration der Komponenten im Ablauf des Reaktors entspricht.

Satzprozesse

Satzprozesse werden in geschlossenen Systemen durchgeführt. Das vorgelegte Medium wird mit dem Inokulum beimpft und mit Ausnahme von Gasen und geringen Mengen an Titrationsmitteln werden keine weiteren Substanzen zu- oder abgeführt. Somit stellt sich ein annähernd konstantes Reaktionsvolumen ein. Über die Prozesszeit ändern sich die Konzentrationen von Nährstoffen, Produkten und Zellen. Die Stoffbilanz für ideale Rührkesselreaktoren in Gleichung (3.13) kann folgendermaßen vereinfacht werden.

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

Zulaufprozesse

Zulaufprozesse werden in halboffenen Systemen durchgeführt, bei denen in der Regel nach einer kurzen Satzphase mit geringen Substratkonzentrationen die Zugabe von konzentrierten Substratlösungen erfolgt. Zulaufprozesse werden eingesetzt, um metabolische Regulationen, Inhibitionen oder Toxizitäten bei hohen Substratkonzentrationen zu umgehen. Des Weiteren werden die Nachteile der hohen Totzeiten von Satzbetrieben umgangen, was die Produktivität und Wirtschaftlichkeit der Prozesse erhöht.

Das Reaktionsvolumen nimmt beim Zulaufprozess über die Prozesszeit zu, da $F_{ein} > 0$ und $F_{aus} = 0$. Somit kann die Stoffbilanz für ideale Rührkesselreaktoren in Gleichung (3.13) wie folgt vereinfacht werden.

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

Aufgrund der Verdünnung des Reaktionsvolumens wird eine getrennte Beschreibung der zeitlichen Abhängigkeiten von V_R und c_i nötig.

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

Die Volumenzunahme wird hierbei durch den Zulaufvolumenstrom beschrieben.

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

Somit kann durch das Einsetzen von Gleichung (3.17) in Gleichung (3.16) und anschließender Umformung folgende Beschreibung der zeitlichen Konzentrationsänderung einer Komponente i für Zulaufprozesse in idealen Rührkesselreaktoren aufgestellt werden:

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

Eine Erweiterung stellt der geregelte Zulaufprozess dar, bei dem die Substratkonzentration im Reaktor auf den gewünschten Wert geregelt wird. Diese Strategie, die eine Messung der Substratkonzentration und einen Regelkreis erfordert, wird oft beim Einsatz von toxischen Substraten, wie beispielsweise Methanol, angewendet (zum Beispiel Charoenrat et al. 2005, Cos et al. 2005). Des Weiteren ist es ohne aufwendige Analytik und Regelung möglich, ein vorab definiertes Zulaufprofil für die Begrenzung der spezifischen Substrataufnahmerate und somit der Wachstumsrate einzustellen (Korz et al. 1995, Jenzsch et al. 2006). Dabei sollte eine konstante Wachstumsrate unter der kritischen Wachstumsrate gewählt werden, um Nebenproduktbildung zu vermeiden (Jenzsch et al. 2006). Die Kultur stabilisiert sich so bei

unterschiedlichen Inokulationsmengen und verändertem metabolischen Zustand der Vorkultur mit der Einstellung einer konstanten Wachstumsrate μ_{set} , die deutlich unter der maximalen Wachstumsrate μ_{max} liegt, selbst (Jenzsch et al. 2006). Das Zulaufprofil kann unter der Annahme einer zeitlich konstanten Substratkonzentration ($dc_S/dt = 0$) wie folgt berechnet werden:

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

Während der Biomassebildung kann unter Berücksichtigung der Gleichungen (3.4), (3.6) und (3.11) mit Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Substrataufnahme für die Produktbildung, der Voraussetzung $\mu = \mu_{set} = \text{konstant}$ und den Annahmen der Volumenkonstanz sowie $c_S \ll c_{S,ein}$ bei substratlimitiertem Wachstum beispielsweise folgendes exponentielles Zulaufprofil berechnet werden.

$$F_{ein}(t) = \frac{\mu_{set} \cdot c_{X,0} \cdot V_{R0}}{Y_{XS,\mu} \cdot c_{S,ein}} \cdot e^{(\mu_{set} \cdot \Delta t)} \quad (3.20)$$

Mit: μ_{set} Sollwert der spezifischen Wachstumsrate, h^{-1}
 V_{R0} Initiales Reaktionsvolumen, L

Bei Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels ergibt sich folgendes Zulaufprofil.

$$F_{ein}(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{XS,\mu}} + m_S \right) \cdot \frac{c_{X,0} \cdot V_{R0}}{c_{S,ein}} \cdot e^{(\mu_{set} \cdot \Delta t)} \quad (3.21)$$

Eine wichtige Kenngröße von Bioprozessen ist die Raum-Zeit-Ausbeute RZA , die die gebildete Produktkonzentration pro Prozesszeit darstellt. Für Satz- und Zulaufprozesse gilt:

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

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

Kontinuierliche Prozesse

Kontinuierliche Prozesse werden in offenen Systemen durchgeführt. Mit der Einstellung von äquivalenten Zu- und Ablaufvolumenströmen ($F = F_{ein} = F_{aus}$) kann das Reaktionsvolumen konstant gehalten werden ($dV_R/dt = 0$), wodurch die Reaktion in einen sogenannten Fließgleichgewichtszustand gebracht werden kann. Dabei sind sämtliche Konzentrationen im Reaktor zeitlich konstant ($dc_i/dt = 0$) und Gleichung (3.13) vereinfacht sich zu:

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

Die Verdünnungsrate D wird als das Verhältnis des Volumenstroms und des Reaktionsvolumens definiert.

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

Mit: D Verdünnungsrate, h^{-1}

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

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

Mit: τ Hydraulische Verweilzeit, h

Damit lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i mit Gleichung (3.23) vereinfacht darstellen:

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

Mit der Bedingung eines sterilen Zulaufmediums ($c_{X, \text{ein}} = 0$) und der Annahme, das Wachstum sei eine strikt autokatalytische Reaktion, ergibt sich für die Biomasse durch Einsetzen von Gleichung (3.2) in Gleichung (3.26) und Umformung folgende Bilanz.

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

Dabei stellen sich unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Substratlimitierung im Fließgleichgewicht für $D < \mu_{\text{max}}$ stabile Werte für c_X und c_S größer Null ein, wohingegen für $D \geq \mu_{\text{max}}$ gilt: $c_X = 0$ und $c_S = c_{S, \text{ein}}$.

Durch das Einbeziehen der Substratlimitierung und des Erhaltungsstoffwechsels ergibt sich für die kritische Verdünnungsrate D_C , bei der $c_X = 0$ ist, mit den Gleichungen (3.27) und (3.5) unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels mit Gleichung (3.11) folgender Zusammenhang:

$$D_C = \mu_{\text{max}} \cdot \frac{c_{S, \text{ein}}}{c_{S, \text{ein}} + K_S} - m_S \cdot Y_{XS, \mu} \quad (3.28)$$

Mit: D_C Kritische Verdünnungsrate, h^{-1}

Damit ergibt sich über die Verdünnungsrate ein in Abbildung 3.2 dargestellter Verlauf für die Biomasse- und Substratkonzentration sowie der Raum-Zeit-Ausbeute für die Biomasse RZA_X .

Die Raum-Zeit-Ausbeute RZA berechnet sich für kontinuierliche Prozesse aus dem Produkt der Verdünnungsrate und der Konzentration des Produktes:

$$RZA = D \cdot c_p \quad (3.29)$$

Damit ergibt sich für die Raum-Zeit-Ausbeute für die Biomasse:

$$RZA_X = D \cdot c_X \quad (3.30)$$

Mit: RZA_X Raum-Zeit-Ausbeute für die Biomasse, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

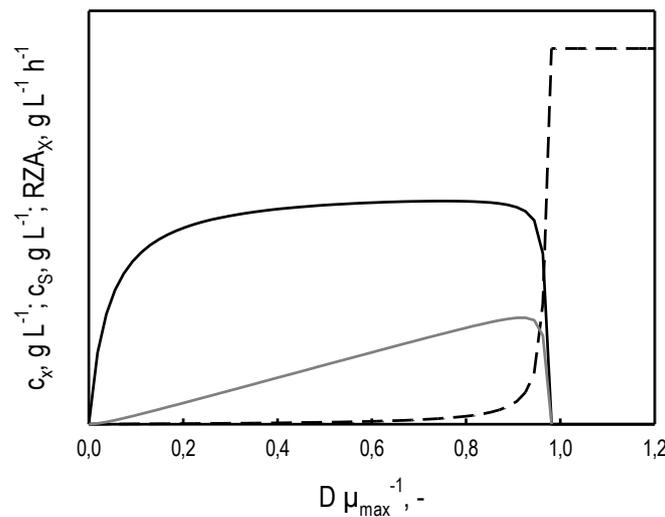


Abbildung 3.2: XD-Diagramm für das Wachstum von Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels bei kontinuierlichen Prozessen. Dargestellt sind die Biomassekonzentration (c_X , durchgehende Linie), die Substratkonzentration (c_S , unterbrochene Linie) und die Raum-Zeit-Ausbeute für die Biomasse (RZA_X , graue Linie) gegen die auf die maximale Wachstumsrate μ_{max} normierte Verdünnungsrate D .

Dabei wird ersichtlich, dass der Prozess in der Nähe des Auswaschpunktes ($D = D_C$) sehr sensitiv auf Änderungen der Verdünnungsrate reagiert. Für den Betrieb der kontinuierlichen Kultur in einem Fließgleichgewichtszustand durch die Einstellung einer definierten Verdünnungsrate wird der Begriff Chemostat verwendet. Um einen Prozess langfristig und robust bei Fließgleichgewichtszuständen nahe des Auswaschpunktes betreiben zu können, ist durch die hohe Sensitivität des Systems gegenüber kleinsten Änderungen der Verdünnungsrate eine anspruchsvollere Prozesssteuerung notwendig. Hierfür ist es zweckmäßig eine Zustandsgröße im Prozessverlauf zu messen und die Verdünnungsrate als manipulierbare Variable wirken zu lassen. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung der Trübung (Turbidität) als Maß für die Zelldichte, weshalb man in diesem Fall von einem Turbidostaten

spricht. Weiter kann die Konzentration des limitierenden Substrats (*nutrient*) als Regelgröße verwendet werden. Diese Betriebsweise wird als Nutristat bezeichnet.

Kontinuierliche Rührkesselkaskade

Eine kontinuierliche Rührkesselkaskade entsteht durch die Hintereinanderschaltung einer beliebigen Anzahl N an Rührkesseln. Dabei kann theoretisch für jeden Reaktor ein variables Reaktionsvolumen gewählt werden, um eine optimale Prozessführung zu gewährleisten (Müller-Erlwein 2015). In dieser Arbeit sollen ausschließlich Kaskaden aus idealen Rührkesselreaktoren mit gleichem Volumen betrachtet werden. In Abbildung 3.3 ist beispielhaft eine Kaskade aus zwei Reaktoren gezeigt.

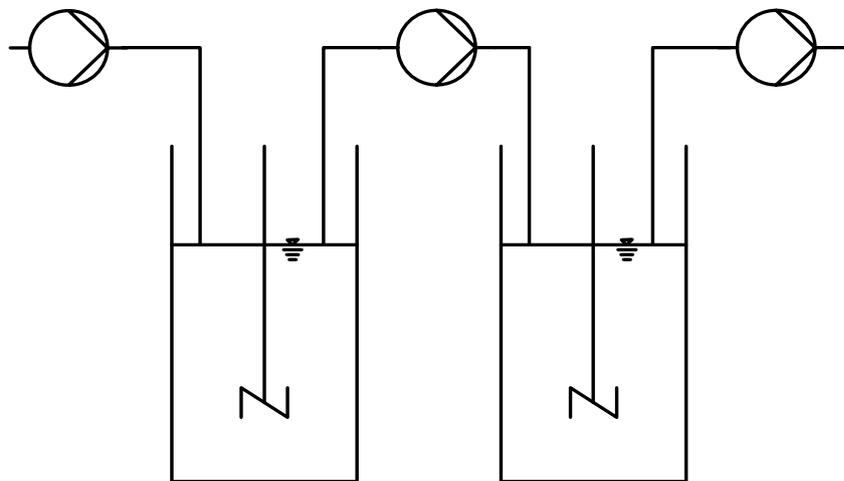


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau einer Rührkesselkaskade mit zwei Reaktoren.

Um die Stoffbilanz einer Reaktorkaskade zu beschreiben, bedarf es einer Erweiterung der Stoffbilanz eines einzelnen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors (Gleichung (3.23)). Dabei entspricht die Eingangskonzentration des ersten Reaktors $c_{i, \text{ein}}$ der Eingangskonzentration der Kaskade und die Ausgangskonzentration (und damit Konzentration im Reaktor) des $(j - 1)$ -ten Reaktors $c_{i, j-1}$ entspricht der Eingangskonzentration des j -ten Reaktors. Die Konzentration am Auslass der Kaskade ist gleich der Konzentration im letzten Reaktor n der Kaskade $c_{i, n}$. Unter der Annahme der Volumenkonstanz in jedem Reaktor ($dV_{R, n}/dt = 0$) durch die Einstellung eines konstanten Volumenstroms in allen Reaktoren ($F = F_1 = \dots = F_n$) kann die Stoffbilanz einer Kaskade von N idealen, kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren wie folgt hergeleitet werden. Für die Stoffbilanz des ersten Reaktors gilt im Fließgleichgewicht mit ($dc_i/dt = 0$):

$$\frac{d(c_{i,1} \cdot V_{R,1})}{dt} = 0 = F \cdot (c_{i, \text{ein}} - c_{i,1}) + r_{i,1} \cdot V_{R,1} \quad (3.31)$$

Womit sich die Konzentration am Ausgang des ersten Reaktors ergibt:

$$c_{i,1} = c_{i,ein} + r_{i,1} \cdot \frac{V_{R,1}}{F} \quad (3.32)$$

Für den zweiten Reaktor der Kaskade folgt somit:

$$\frac{d(c_{i,2} \cdot V_{R,2})}{dt} = 0 = F \cdot (c_{i,1} - c_{i,2}) + r_{i,2} \cdot V_{R,2} \quad (3.33)$$

Damit ergibt sich für die Konzentration am Ausgang des zweiten Reaktors:

$$c_{i,2} = c_{i,ein} + r_{i,1} \cdot \frac{V_{R,1}}{F} + r_{i,2} \cdot \frac{V_{R,2}}{F} \quad (3.34)$$

Wird diese Vorgehensweise bis zum n -ten Reaktor der Kaskade fortgeführt und für jeden Reaktor j der Kaskade das gleiche Volumen vorausgesetzt ($V_{R,j} = V_{R,1} = \dots = V_{R,n}$), folgt für die Ausgangskonzentration der Kaskade:

$$c_{i,n} = c_{i,ein} + \sum_{j=1}^n \frac{r_{i,j} \cdot V_{R,j}}{F} = c_{i,ein} + \sum_{j=1}^n r_{i,j} \cdot D_j \quad (3.35)$$

3.2.3 Verweilzeitverteilungen von idealen und realen Reaktoren

Die Vermischung in einem Reaktor spielt eine maßgebliche Rolle beim Ablauf von chemischen und biotechnologischen Reaktionen, da sie die zu einem definierten Zeitpunkt an einer bestimmten Stelle im Reaktor vorherrschenden Konzentrations- und Temperaturverhältnisse bestimmt. Somit hat die Vermischung einen Einfluss auf den Umsatzgrad der Edukte, die Ausbeute der Produkte und die Reaktorleistung im Allgemeinen (Müller-Erlwein 2015).

Da die Strömungsverhältnisse in Reaktoren nicht oder nur schwer zugänglich sind, wird für die quantitative Charakterisierung des Mischverhaltens oftmals das sogenannte Verweilzeitverhalten mittels experimenteller Methoden bestimmt. In diesem Abschnitt werden die zugrunde liegenden mathematischen Zusammenhänge sowie mögliche experimentelle Vorgehensweisen und die Auswertung der erhaltenen Daten beschrieben. Die Herleitung der komplexen mathematischen Grundlagen soll dabei nur so ausführlich erfolgen, dass die experimentelle Vorgehensweise dieser Arbeit nachvollzogen werden kann. Dies wird, soweit nicht anders vermerkt, auf Grundlage von Wolf und Resnick (1963), Schügerl (1985), Hertwig und Martens (2012), Schwister und Leven (2013) sowie Müller-Erlwein (2015) dargestellt.

Es existieren Modelle für das Verweilzeitverhalten von idealen Reaktortypen. Nachdem für den vorliegenden realen Reaktor das Verweilzeitverhalten experimentell bestimmt wurde, kann es mit dem idealen Verhalten verglichen werden. Anschließend wird der Reaktor hinsichtlich seiner Idealität beurteilt, wobei jeder reale Reaktor vom idealen Mischverhalten abweichen

wird. Falls er als „hinreichend ideal“ definiert wird, kann auf das entsprechende Idealmodell zurückgegriffen werden. Liegen jedoch signifikante Abweichungen vor, wird entweder versucht durch apparative Veränderungen das Idealverhalten anzunähern oder es werden Modelle für reale Reaktoren herangezogen, mit denen die Abweichungen vom Idealverhalten quantifiziert werden können.

Zunächst sollen die Modelle für ideale Reaktortypen – kontinuierlicher Rührkessel, kontinuierliche Rührkesselkaskade und Strömungsrohr – beschrieben werden. Dabei treten zwei Extreme auf. Zum einen wird für den ideal durchmischten Rührkessel vollständige Vermischung angenommen, wodurch folgt, dass der Zulaufstrom unmittelbar mit dem Reaktorinhalt vermischt wird und dass die Zusammensetzung des Ablaufvolumenstroms der des Reaktorinhalts entspricht. Dahingegen wird für das ideale Strömungsrohr keine Vermischung in Strömungsrichtung angenommen. Unter technischen Bedingungen kann hierbei zum einen laminare Strömung auftreten, bei der eine Änderung der Strömungsgeschwindigkeit in radialer Richtung auftritt. Die Geschwindigkeitsverteilung der Volumenelemente ist symmetrisch zur Rohrachse und parabolisch. Zum anderen kann turbulente Strömung auftreten, bei der stärkere Geschwindigkeitsgradienten in Wandnähe auftreten. Dabei wird die Hauptmenge des Fluides mit nahezu gleicher Geschwindigkeit in der Kernströmung transportiert. Für technische Anwendungen wird meist turbulente Strömung angestrebt, wodurch folgende Idealisierungen angenommen werden können: Die Strömungsgeschwindigkeiten, Temperatur und Zusammensetzung der Flüssigphase ist über den Reaktorquerschnitt konstant und kann sich nur in axialer Richtung verändern.

Bestimmung der Verweilzeitverteilung

Um stetige Verweilzeitverteilungen wiederzugeben, werden zwei äquivalente Darstellungsweisen verwendet. Zum einen kann das Verweilzeitspektrum $E(t)$ bestimmt werden, das die Auftretswahrscheinlichkeit eines Volumenelementes zum Zeitpunkt $t = t$ am Reaktorausgang angibt. Es kann unter anderem mit einer Nadelfunktion bestimmt werden. Hierfür wird der Reaktor mit konstantem Reaktionsvolumen und Volumenstrom betrieben. Nun wird ein sogenannter zeitabhängiger Dirac-Impuls am Eingang des Reaktors mit einer definierten Markierungslösung und der Eingangskonzentration der Markierungssubstanz $c_0(t)$ eingebracht. Dabei soll der Zeitraum der Auftragung der Markierungssubstanz infinitesimal sein und die Eintragung der Markierungslösung das Reaktionsvolumen geringstmöglich verfälschen. Des Weiteren soll die Markierungssubstanz chemisch inert sein und somit nicht mit dem Reaktorinhalt reagieren. Anschließend wird die Konzentration der Markierungssubstanz am Reaktorausgang $c(t)$ in Abhängigkeit von der Zeit gemessen und das Verweilzeitspektrum nach Gleichung (3.36) bestimmt.

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^\infty c(t)dt} = \tau^{-1} \cdot \frac{c(t)}{c_0(t)} \quad (3.36)$$

Mit:	$E(t)$	Verweilzeitspektrum, h^{-1}
	$c(t)$	Konzentration der Markierungssubstanz am Reaktorausgang, g L^{-1}
	$c_0(t)$	Eingangskonzentration der Markierungssubstanz am Reaktoreingang, g L^{-1}

Als Markierungssubstanz sind Stoffe geeignet, die sich einfach quantifizieren lassen, wie beispielsweise Elektrolyte, Farbstoffe oder radioaktiv markierte Substanzen. Eine schematische Darstellung der Eingangsfunktion der Markierungssubstanz nach dem Anlegen einer Nadelfunktion wird in Abbildung 3.4 gezeigt.

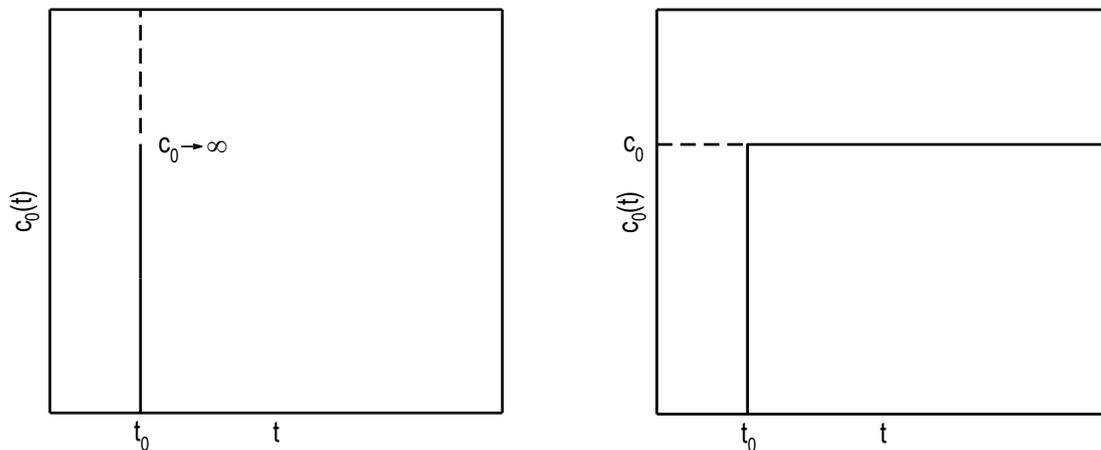


Abbildung 3.4: Auftragung einer Nadel- (links) und Sprungfunktion (rechts) zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens. Dabei stellt $c_0(t)$ die Konzentration der Markierungssubstanz im Zulauf als Funktion der Zeit t und c_0 die initiale Konzentration der Markierungssubstanz im Zulauf zum Zeitpunkt der Auftragung t_0 dar.

Zum anderen kann die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ bestimmt werden, die die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Volumenelementes im Reaktor zwischen $t = 0$ und $t = t$ wiedergibt. Diese kann unter anderem mit einer Sprungfunktion bestimmt werden. Hierfür wird der Reaktor mit konstantem Reaktionsvolumen und Volumenstrom betrieben. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird die Zulauflösung, die der Zusammensetzung des Reaktionsvolumens entspricht, durch eine Zulauflösung mit einer definierten Konzentration an Markierungssubstanz $c_0(t)$ ersetzt. Anschließend wird wiederum der Konzentrations-Zeit-Verlauf der Markierungssubstanz am Reaktorausgang $c(t)$ gemessen und die Verweilzeitsummenkurve nach Gleichung (3.37) bestimmt.

$$F(t) = \frac{c(t)}{c_0(t)} \quad (3.37)$$

Mit: $F(t)$ Verweilzeitsummenkurve, -

Eine schematische Darstellung der Eingangsfunktion der Markierungssubstanz nach dem Anlegen einer Sprungfunktion wird in Abbildung 3.4 gezeigt.

Dabei können das Verweilzeitspektrum und die Verweilzeitsummenkurve einfach über Gleichung (3.38) umgerechnet werden.

$$dF(t) = E(t)dt \quad (3.38)$$

Um das Verweilzeitverhalten von Reaktoren, die mit unterschiedlichem Reaktionsvolumen und variablen Verdünnungsraten betrieben werden, vergleichen zu können, werden Verweilzeitspektrum und Verweilzeitsummenkurve üblicherweise nicht in Abhängigkeit der Zeit t sondern der normierten Verweilzeit θ angegeben, die sich nach Gleichung (3.39) berechnet. Dabei bezieht sich die Gesamtverweilzeit τ_{ges} immer auf das Gesamtreaktionsvolumen einer Reaktorkonfiguration. Es gilt $\tau_{ges} = \tau$ für den idealen Rührkessel und das ideale Strömungrohr und $\tau_{ges} = \tau \cdot N$ für eine ideale Rührkesselkaskade aus N gleichgroßen Kesseln.

$$\theta = \frac{t}{\tau_{ges}} \quad (3.39)$$

Mit: θ Normierte Verweilzeit, -
 τ_{ges} Gesamtverweilzeit, h

Experimentell bestimmte Verweilzeitverteilungen bestehen immer aus einer begrenzten Anzahl aus Messwerten, die zu diskreten Zeitpunkten erhoben wurden. Um Verteilungen miteinander zu vergleichen, kann auf Zahlenwerte zurückgegriffen werden, die aus dem Verweilzeitspektrum berechnet werden können. Dabei wird zum einen der Mittelwert der Verteilung \bar{t} bestimmt, der die Lage der Verteilung auf der Zeitachse beschreibt.

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t \cdot E(t)dt \quad (3.40)$$

Mit: \bar{t} Mittelwert der Verteilung, h

Zum anderen wird die Streuung der Verweilzeitverteilung um den Mittelwert σ^2 berechnet. Dabei kann Gleichung (3.41) wie im rechten Teil der Gleichung dargestellt vereinfacht werden,

indem Gleichung (3.40) und die Voraussetzung $\int_0^{\infty} E(t) dt = 1$ nach dem Ausmultiplizieren des mittleren Teils berücksichtigt werden.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 \cdot E(t) dt = \int_0^{\infty} t^2 \cdot E(t) dt - \bar{t}^2 \quad (3.41)$$

Mit: σ^2 Streuung der Verweilzeit um den Mittelwert, h^2
 σ Varianz, h

Eine weitere Methode zur Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens von realen Reaktoren ist der Vergleich mit dem idealen Verhalten, das im Folgenden genauer beschrieben wird.

Verweilzeitverhalten von idealen Reaktoren

Für die Beschreibung des Verweilzeitverhaltens von idealen Reaktoren werden die instationären Mengenbilanzen für den kontinuierlichen Betrieb verwendet, da eine zeitlich veränderliche Konzentration der Markierungssubstanz angelegt wird. Diese lassen sich aus den allgemeinen Bilanzgleichungen aus Kapitel 3.2.2 herleiten. Da die Markierungssubstanz chemisch inert sein soll, wird der Reaktionsterm der Stoffbilanz vernachlässigt. In der Folge soll nur auf die Herleitung des Verweilzeitverhaltens über eine Pulsfunktion eingegangen werden.

Für einen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor mit idealem Mischverhalten kann Gleichung (3.13) unter Vernachlässigung des Reaktionsterms und der Annahme von Volumenkonstanz für den instationären Zustand folgendermaßen umgewandelt werden.

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} = F \cdot (c_{i,ein} - c_i) \quad (3.42)$$

Beziehungweise mit der hydraulischen Verweilzeit:

$$\frac{dc_i}{dt} = \tau^{-1} \cdot (c_{i,ein} - c_i) \quad (3.43)$$

Für Verweilzeituntersuchungen durch pulsartige Zugabe mit einer Markierungssubstanz folgt somit mit der für die Aufbringung eines Markierungspulses zum Zeitpunkt $t = 0$ gültigen Anfangsbedingung $c_0(t) = c_0$ der in Gleichung (3.44) dargestellte Zusammenhang. Dabei entspricht c_0 der Konzentration an Markierungssubstanz im Reaktor nach der pulsartigen Zugabe.

$$\frac{dc(t)}{dt} = \tau^{-1} \cdot (c_0(t) - c(t)), \text{ mit der Bedingung } c_0(t) = c_0 \quad (3.44)$$

Mit: c_0 Konzentration der Markierungssubstanz im Reaktor nach Zugabe eines Markierungspulses, g L⁻¹

Damit wird deutlich, dass in einem instationär betriebenen und ideal durchmischten Rührkesselreaktor die zeitliche Änderung der Konzentration einer chemisch inerten Komponente i ausschließlich durch den Konzentrationsunterschied von Reaktoreingang und -ausgang verursacht wird.

Um eine allgemeine Lösung für die Stoffbilanz der Markierungssubstanz zu erhalten, muss die lineare inhomogene Differentialgleichung erster Ordnung (3.44) gelöst werden. Hierfür wird die für die Aufbringung eines Markierungspulses zum Zeitpunkt $t = 0$ gültige Anfangsbedingung $c_0(t) = c_0$ eingesetzt. Damit erhält man für den zeitlichen Verlauf der Konzentration der Markierungssubstanz am Reaktorausgang folgenden Zusammenhang für den idealen Rührkesselreaktor.

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.45)$$

Mit Gleichung (3.36) folgt für $E(t)$:

$$E(t) = \tau^{-1} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.46)$$

Und mit Gleichung (3.37) für $F(t)$:

$$F(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.47)$$

Eine kontinuierlich betriebene Rührkesselkaskade besteht aus der Hintereinanderschaltung von N idealen Rührkesseln. Damit kann die Stoffbilanz der gesamten Kaskade durch eine wiederholte Anwendung der Bilanzgleichung (3.45) für N ideale Rührkesselreaktoren ermittelt werden. Für den ersten Reaktor gilt Gleichung (3.45), wobei $c(t)$ der Konzentration im Ablauf des ersten Reaktors $c_{R1}(t)$ entspricht. Für den zweiten Kessel einer Kaskade entspricht die Eingangskonzentration an Markierungssubstanz der Konzentration im Ablauf des ersten Kessels und damit gilt für die Konzentration im Ablauf des zweiten Reaktors $c_{R2}(t)$:

$$\frac{dc_{R2}(t)}{dt} = \tau^{-1} \cdot (c_{R1}(t) - c_{R2}(t)) \quad (3.48)$$

Mit: $c_{R1}(t)$ Konzentration im Ablauf des ersten Reaktors, g L⁻¹
 $c_{R2}(t)$ Konzentration im Ablauf des zweiten Reaktors, g L⁻¹

Durch Einsetzen von Gleichung (3.45) erhält man für die Auftragung eines Markierungspulses mit der Konzentration c_0 wiederum eine inhomogene Differenzialgleichung erster Ordnung.

$$\frac{dc_{R2}(t)}{dt} = \tau^{-1} \cdot (c_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} - c_{R2}(t)) \quad (3.49)$$

Die Differenzialgleichung wird anschließend in den homogenen (linke Seite) und inhomogenen Teil (rechte Seite) der Gleichung (3.50) aufgespaltet.

$$\frac{dc_{R2}(t)}{dt} + \tau^{-1} \cdot c_{R2}(t) = \tau^{-1} \cdot c_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.50)$$

Mit dem separaten Lösen des homogenen und inhomogenen Teils mittels bestimmter Integration und dem Vereinigen der beiden Lösungen folgt für die Konzentration im Ablauf des zweiten Reaktors:

$$c_{R2}(t) = \frac{t}{\tau} \cdot c_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.51)$$

Verallgemeinert man diese Gleichung nun für die Hintereinanderschaltung von N idealen Rührkesseln, ergibt sich für die Ausgangskonzentration des letzten Kessels N und damit der Kaskade folgender Zusammenhang.

$$c_{RN}(t) = c_0 \cdot \frac{t^{(N-1)}}{(N-1)!} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.52)$$

Mit: N Anzahl der Kessel einer Reaktorkaskade, -

Damit ergibt sich $E(t)$ wiederum durch Einsetzen von Gleichung (3.52) in Gleichung (3.36) zu:

$$E(t) = \tau^{-1} \cdot \frac{t^{(N-1)}}{(N-1)!} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.53)$$

Die Verweilzeitspektren von Kaskaden mit unterschiedlicher Anzahl an Kesseln können miteinander verglichen werden, indem sie gegen die normierte Verweilzeit θ aufgetragen werden. Die resultierende Funktion $E(\theta)$ wird folglich dimensionslos.

Das Verweilzeitverhalten von idealen Strömungsrohren soll nicht explizit hergeleitet werden. Aufgrund der fehlenden Rückvermischung im idealen Strömungsrohr tritt die Markierungssubstanz unter der Annahme der Auftragung eines idealen Pulses innerhalb eines unendlich kleinen Zeitraums zum Zeitpunkt $t = \tau$ wieder aus dem Reaktor aus.

Damit gilt:

- $c(t) = 0$ für $t \neq \tau$ und $c(t) = c_0$ für $t = \tau$
- $E(t) = 0$ für $t \neq \tau$ und $E(t) = \infty$ für $t = \tau$
- $F(t) = 0$ für $t < \tau$ und $F(t) = 1$ für $t \geq \tau$

Eine vergleichende Darstellung des normierten idealen Verweilzeitverhaltens der erläuterten Reaktorformen ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass mit einer Rührkesselkaskade aus $N = \infty$ Kesseln ein Strömungsrohr angenähert werden kann.

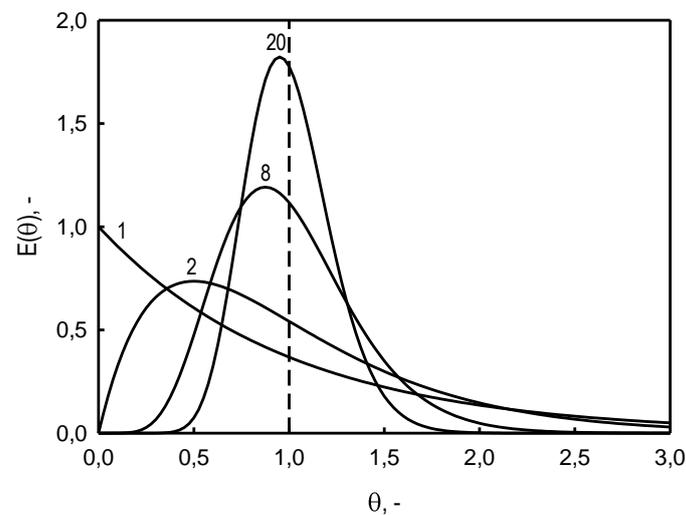


Abbildung 3.5: Verweilzeitverhalten von idealen Rührkesselkaskaden. Dabei ist das normierte Verweilzeitspektrum $E(\theta)$ für Rührkesselkaskaden mit 1, 2, 8 und 20 Kesseln dargestellt. Die vertikale unterbrochene Linie stellt das Verweilzeitverhalten eines idealen Strömungsrohres dar. Mit einer Kaskade aus $N = \infty$ Kesseln kann ein ideales Strömungsrohr angenähert werden.

3.3 Mikrobielle Herstellung von rekombinanten Proteinen

Proteine stellen die essentiellen Bausteine des Lebens dar und werden deshalb von allen lebenden Organismen auf natürliche Weise produziert. Dabei zählt die Rolle als natürliche Katalysatoren und Strukturproteine des Zytoskelletts zu den wichtigsten Funktionen von Proteinen. Des Weiteren sind sie unter anderem an der Kommunikation von Zellen, der Immunantwort oder der Zelladhäsion maßgeblich beteiligt. Homologe und rekombinante Proteine finden in der biopharmazeutischen, chemischen und agrarwirtschaftlichen Industrie Anwendung (Demain und Vaishnav 2009). Nachdem Proteine zunächst vorrangig aus Pflanzen oder Tieren gewonnen wurden, begann die mikrobielle Herstellung von Proteinen um 1970 mit der Verfügbarmachung der rekombinanten DNS-Technologie, womit der Grundstein der modernen biotechnologischen Industrie gelegt wurde (Demain und Vaishnav 2009; Ferrer-Miralles und Villaverde 2013; Rosano und Ceccarelli 2014b).

Um rekombinante Proteine mit Mikroorganismen zu produzieren, muss zunächst die heterologe DNS in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Hierfür steht aktuell eine Vielzahl an Expressionsorganismen zur Verfügung. Auf die wichtigsten Vertreter soll in der Folge eingegangen werden.

Am häufigsten werden bakterielle Wirte zur Herstellung rekombinanter Proteine verwendet. Dabei stellt *Escherichia coli* nach wie vor das Arbeitspferd der biotechnologischen Industrie dar (Andersen und Krummen 2002; Demain und Vaishnav 2009; Ferrer-Miralles und Villaverde 2013; Rosano und Ceccarelli 2014b). Dieser Mikroorganismus kann leicht genetisch modifiziert werden, weist schnelles Wachstum in definierten Medien auf und liefert hohe Zelldichten mit hohen Ausbeuten an rekombinanten Proteinen (Demain und Vaishnav 2009). Allerdings hat sich gezeigt, dass *E. coli* für viele Proteine nicht der optimale Expressionsorganismus ist. So können Proteine komplexer Struktur unter anderem durch die fehlende Bildung von Disulfid-Brücken in *E. coli* nicht korrekt gefaltet werden. Deshalb werden Proteine oftmals als Einschlusskörperchen gebildet, was eine aufwendigere Aufarbeitung mit der Rückfaltung von Proteinen nötig macht (Andersen und Krummen 2002). Des Weiteren stellen in der biopharmazeutischen Industrie die Bildung von Endotoxinen sowie die fehlende Glycosylierung von Proteinen entscheidende Nachteile dar (Demain und Vaishnav 2009). Deshalb wird *E. coli* vorzugsweise bei der Produktion von funktionellen nicht glycosylierten Proteinen eingesetzt. Ein detaillierter Überblick zur Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* findet sich in Kapitel 3.3.2.

Für die sekretorische Herstellung homologer Proteine, wie Proteasen oder Amylasen, werden häufig Vertreter der Gattung *Bacillus* eingesetzt. Zu den wichtigsten Arten für industrielle Anwendungen zählen *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* oder

Bacillus brevis. Damit können extrazelluläre Proteinkonzentrationen von bis zu 3 g L⁻¹ erreicht werden (Demain und Vaishnav 2009; Ferrer-Miralles und Villaverde 2013). Allerdings kann es zum Abbau des Zielproteins durch Wirtproteasen kommen, von denen mindestens fünf extrazellulär auftreten (He et al. 1991). Um den proteolytischen Abbau von rekombinanten Proteinen zu vermeiden, können jedoch proteasedefiziente Stämme verwendet werden (Wu et al. 1991).

Neben bakteriellen Wirten wird insbesondere bei der Produktion von Biopharmazeutika häufig auf Hefen (20 % aller bekannten Herstellungsprozesse von Biopharmazeutika) zurückgegriffen (Rosano und Ceccarelli 2014b). Diese einzelligen eukaryotischen Pilze gewährleisten die korrekte Faltung von Proteinen und können posttranslationale Modifikationen durchführen. Weiter können sie kosteneffizient in definierten Medien kultiviert werden und liefern hohe Zelldichten sowie Proteinkonzentrationen. Heterologe Gene werden mittels homologer Rekombination stabil in das Genom integriert und rekombinante Proteine können effizient sekretiert werden (Demain und Vaishnav 2009). Zu den wichtigsten Vertretern zählt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), mit der etwa Insulin oder Hepatitis B Oberflächenantigen hergestellt wird (Demain und Vaishnav 2009). Allerdings kann es zu falschen Glycosylierungsmustern bei der Herstellung von Säugerproteinen mit *S. cerevisiae* kommen, da zum einen Hyperglycosylierungen auftreten können und zum anderen keine Sialylierung von Proteinen möglich ist (Gellissen et al. 1992; Demain und Vaishnav 2009). Neben *S. cerevisiae* werden vor allem methylotrophe Hefen, wie beispielsweise *Hansenula*, *Komagataella* (früher *Pichia*), *Candida* und *Torulopsis*, für die extrazelluläre Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Diese können schnell hohe Zelldichten von bis 130 g L⁻¹ erreichen (Gellissen et al. 1992) und liefern hohe Konzentrationen von bis zu 22 g L⁻¹ Zielprotein (Hasslacher et al. 1997; Cereghino et al. 2002), indem die Kohlenstoffquelle Methanol gleichzeitig als Induktor für starke Promotoren dient (Demain und Vaishnav 2009). In Kapitel 3.3.1 wird detailliert auf die Herstellung rekombinanter Proteine mit der methylotrophen Hefe *Komagataella pastoris* eingegangen.

Oftmals werden auch filamentöse Pilze in der biotechnologischen Industrie eingesetzt, um Proteine sekretorisch zu produzieren (Rosano und Ceccarelli 2014b). Als besonders effizienter Wirtsorganismus hat sich dabei *Aspergillus niger* herauskristallisiert, mit dem extrazelluläre Proteinkonzentrationen von maximal 25 g L⁻¹ erreicht wurden (Ward et al. 2005). Dabei können bis zu 100 Kopien der heterologen Gene über Plasmide stabil in die Chromosomen von filamentösen Pilzen eingebracht werden (Demain und Vaishnav 2009). Des Weiteren sind die Glycosylierungsmuster von filamentösen Pilzen wie *Trichoderma reesei* denen von Säugerzellen sehr ähnlich (Salovuori et al. 1987). Allerdings treten oftmals Limitierungen der Transkription auf (Verdoes et al. 1995) und heterologe Proteine können durch wirtseigene Proteasen abgebaut werden (Machida 2002). Des Weiteren erfordert die komplexe

Morphologie dieser Mikroorganismen eine fortgeschrittene Reaktortechnologie (Hortsch et al. 2010).

Seit einigen Jahren werden auch alternative Organismen wie Mikroalgen, Moose oder Protozoen für die Herstellung von rekombinanten Proteinen erforscht (Ferrer-Miralles und Villaverde 2013; Rosano und Ceccarelli 2014b). Des Weiteren finden durch die Fortschritte der Zellkulturtechnologie oftmals auch höhere Organismen wie Insekten-, Pflanzen- oder Säugerzellen Anwendung (Andersen und Krummen 2002; Ferrer-Miralles und Villaverde 2013), auf die in dieser Arbeit jedoch nicht genauer eingegangen werden soll.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass seit der Verfügbarmachung der rekombinanten DNS-Technologie eine Vielzahl von Expressionswirten zur Herstellung rekombinanter Proteine identifiziert und weiterentwickelt wurde. Dabei weisen alle charakteristische Vor- und Nachteile auf, weshalb die Wahl des Wirtsorganismus immer auf das gewünschte Produkt abgestimmt werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei der weitverbreitetsten Mikroorganismen – *Escherichia coli* und *Komagataella pastoris* – gearbeitet, die in den folgenden Abschnitten detailliert betrachtet werden sollen.

3.3.1 Herstellung rekombinanter Proteine mit *Komagataella pastoris*

Nachdem das Wachstum von einigen Hefen mit der Kohlenstoffquelle Methanol beschrieben wurde (Ogata et al. 1969), erregten methylotrophe Hefen Aufmerksamkeit als mögliche Quelle für proteinreiches Futtermittel. So wurden in den 1970-er Jahren von der Phillips Petroleum Company (Barlesville, OK, USA) Medien und kontinuierliche Hochzeldichteverfahren für die Herstellung von *K. pastoris* aus Methanol entwickelt (Wegner 1990). Durch den Anstieg des Methanpreises während der Ölkrise und dem gleichzeitigen Fall der Kosten für Sojabohnen als alternative Proteinquelle für Futtermittel war die Herstellung von Futtermitteln mittels methylotrophen Hefen zu keinem Zeitpunkt wirtschaftlich sinnvoll (Cereghino und Cregg 2000).

In der Folge entwickelte die Phillips Petroleum Company in Zusammenarbeit mit dem Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates die Hefe *K. pastoris* zu einem Organismus für die Herstellung heterologer Proteine weiter und verkaufte 1993 die Rechte an Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, USA). Des Weiteren werden die Komponenten des entwickelten Expressionssystems von der Invitrogen Corporation (Carlsbad CA, USA) vertrieben (Cereghino und Cregg 2000). So dient heute der *EasySelect™ Pichia Expression Kit* als Standardprotokoll für die Erstellung von Mutanten zur rekombinanten Proteinproduktion (Invitrogen 2010). Die vielfältige Nutzung des eukaryotischen Mikroorganismus *K. pastoris* für die Herstellung von heterologen Proteinen begründet sich hauptsächlich durch die Möglichkeit genetische Modifikationen einfach und stabil in das Genom einbringen zu können und durch

die erreichbaren hohen intra- und extrazellulären Produktkonzentrationen. Daneben sind die Fähigkeit der Hefe viele eukaryotische posttranslationalen Modifikationen durchzuführen sowie die kommerzielle Verfügbarkeit des kompletten Expressionssystems von Vorteil (Cereghino und Cregg 2000).

In der Folge wird genauer auf den Stoffwechsel von *K. pastoris*, auf die verfügbaren Vektoren und Promotoren sowie die Strategien für Hochzelllichtverfahren eingegangen, bevor das in dieser Arbeit hergestellte Beispielprotein *Candida antarctica* Lipase B vorgestellt wird.

Methanol-Stoffwechsel

Die Grundlage der effizienten Proteinproduktion mit *K. pastoris* stellt die Erkenntnis dar, dass einige Enzyme, die im Methanol-Stoffwechsel benötigt werden, nur unter der Anwesenheit von Methanol in nennenswerten Konzentrationen auftreten (Egli et al. 1980; Veenhuis et al. 1983). Dabei wurde nachgewiesen, dass für das Wachstum mit Methanol ein Stoffwechselweg mit einigen speziellen Enzymen nötig ist (Egli et al. 1980).

Die Eingangsreaktion der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid wird dabei durch die Alkoholoxidasen (AOX) 1 und 2 katalysiert, die in den Peroxisomen von *K. pastoris* lokalisiert sind. Eine Katalase baut in den Peroxisomen das Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser ab. Ein Teil des Formaldehyds verlässt das Peroxisom und wird durch zwei cytoplasmatische Dehydrogenasen zu Formiat und Kohlenstoffdioxid abgebaut. Diese Reaktionen stellen Energie bereit. Das restliche Formaldehyd wird verwendet, um in einem zirkulären Stoffwechselweg zelluläre Komponenten aufzubauen. Hierfür erfolgt eine initiale Kondensation von Formaldehyd und Xylulose-5-monophosphat, die durch eine peroxisomale Dihydroxyaceton Synthase (DHAS) katalysiert wird. Die Produkte Glyceraldehyd-3-phosphat und Dihydroxacetone verlassen das Peroxisom und gehen in einen cytoplasmatischen Stoffwechselweg ein, der Xylulose-5-monophosphat regeneriert und in drei Zyklen ein Molekül Glyceraldehyd-3-phosphat bereitstellt (Cereghino und Cregg 2000). Dabei treten AOX und DHAS in hohen Konzentrationen bei Vorhandensein von Methanol auf, wohingegen sie bei Abwesenheit von Methanol nicht nachweisbar sind. AOX kann beim Wachstum von *K. pastoris* unter limitierten Bedingungen über 30 % des löslichen Proteins einer Zelle ausmachen (Couderc und Baratti 1980). Die Regulation der beiden AOX-Gene erfolgt auf Transkriptionsebene, indem zum einen eine Repression durch viele Kohlenstoffquellen wie zum Beispiel Glucose vorliegt und zum anderen eine Induktion durch Methanol notwendig ist. Obwohl die Aminosäuresequenzen der beiden Alkoholoxidasen eine Homologie > 90 % aufweisen, erfolgt der Großteil der Stoffwechselaktivität über AOX1 (Cregg et al. 1989). Die geringe Affinität beider Alkoholoxidasen zum Substrat Sauerstoff wird durch das hohe Expressionsniveau kompensiert. Somit wird oftmals der Promotor des Gens *aox1* (P_{aox1}) für die Regulation der Transkription eines heterologen Gens genutzt (Invitrogen 2010, Vogl und Glieder 2013). Dafür

können verschiedene Phänotypen der zur Verfügung stehenden Produktionsstämme eingesetzt werden. Die Mehrzahl der *K. pastoris*-Stämme weist ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum mit Methanol auf, was dem Phänotyp Mut⁺ entspricht. Des Weiteren existiert eine Unterscheidung in langsam Methanol verstoffwechselnde Stämme (Mut^s), bei denen das *aox1*-Gen deletiert ist, und nicht Methanol verstoffwechselnde Stämme (Mut⁻), bei denen beide *aox*-Gene deletiert sind.

Expressionsvektoren und Promotoren

Die für die molekulare genetische Manipulation von *K. pastoris* benötigten Methoden wie zum Beispiel Transformation oder Klonierung sind äquivalent zu den für *S. cerevisiae* entwickelten Techniken. Zumeist wird das Zielgen in speziell konstruierte Expressionsvektoren mit Selektionsmarkern für *E. coli* und *K. pastoris* eingebracht. Die multiple Klonierungsstelle liegt dabei zwischen einer 5'-Sequenz, die der nativen P_{aox1}-Sequenz äquivalent ist, und einer kurzen Sequenz des *aox1*-Gens. Anschließend wird der Vektor in *E. coli* vervielfältigt, aufgereinigt und über Elektroporation in *K. pastoris* eingebracht. Dort wird das Zielgen über homologe Rekombination zwischen den P_{aox1}-Lokus und dem Gen für AOX1 integriert. Somit wird das erfolgreich inserierte Zielgen nach Zugabe von Methanol gemeinsam mit dem Gen *aox1* transkribiert. Des Weiteren kann auf Vektoren zurückgegriffen werden, die *in-frame* ein Sekretionssignal des α -Faktors aus *S. cerevisiae* aufweisen, um Produkte extrazellulär herzustellen. Eine Vielzahl an Vektoren ist kommerziell erhältlich (Cereghino und Cregg 2000; Invitrogen 2010).

Neben dem beschriebenen Promotor P_{aox1} kommen auch alternative Promotoren zum Einsatz, wenn Methanol zum Beispiel bei der Produktion von Lebensmitteln oder als brennbarer und explosionsfähiger Stoff in der vorhandenen Anlage nicht genutzt werden kann (Cereghino und Cregg 2000). Mit dem Promotor der Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase P_{gap} können mit Glucose als Kohlenstoffquelle vergleichbare Proteinkonzentrationen zum P_{aox1} erreicht werden. Hierbei kann auf eine Umstellung der Kultur auf Methanol für die Induktion verzichtet werden. Allerdings handelt es sich bei P_{gap} um einen konstitutiven Promotor, der für die Herstellung von toxischen Proteinen nicht einsetzbar ist (Waterham et al. 1997; Cereghino und Cregg 2000).

Die starke Expression von heterologen Proteinen kann unter Umständen den posttranslationalen Apparat von *K. pastoris* überfordern und zur Bildung von falsch gefalteten oder unprozessierten Proteinen führen (Brierley 1998). Um dies zu umgehen, können beispielsweise die schwächeren Promotoren für ein peroxisomales Matrixprotein P_{pex8} (Liu et al. 1995) oder für eine GTPase P_{ypt1} (Sears et al. 1998) Verwendung finden.

Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *K. pastoris* in Bioreaktoren

Nach der Wahl eines geeigneten Wirtstammes und der Einbringung des rekombinanten Proteins muss ein Bioprozess entwickelt werden, der an die Bedürfnisse des verwendeten Stammes angepasst ist. Die Hefe *K. pastoris* eignet sich dabei optimal für die effiziente Produktion von Proteinen in Bioreaktoren, da Medien bestehend aus Mineralsalzen, Spurenelementen, Biotin und einer Kohlenstoffquelle verwendet werden können, die chemisch exakt definiert und preiswert sind. Dabei ist es besonders wichtig, dass Parameter wie der pH, die Verfügbarkeit von gelöstem Sauerstoff und Substratzulaufraten geregelt werden. Damit können Zelldichten $> 100 \text{ g L}^{-1}$ und Proteinkonzentrationen von bis zu 22 g L^{-1} erreicht werden (Haslacher et al. 1997; Cereghino et al. 2002). Da die Durchmusterung der erstellten Bibliotheken an Mutanten und die Bestimmung von optimalen Reaktionsbedingungen meist parallelisiert in Mikrotiterplatten und Schüttelkolben mit komplexen Medien und unter unkontrollierten Bedingungen im Satzverfahren oder intermittierendem Zulaufverfahren durchgeführt wird, kommt es allerdings oftmals zu Problemen bei der Maßstabsübertragung in den Labor- und Produktionsmaßstab (Cereghino und Cregg 2000; Cereghino et al. 2002; Invitrogen 2010).

Bei der Produktion von heterologen Proteinen mit *K. pastoris* im industriellen Maßstab mit Methanol als Kohlenstoffquelle und Induktor kommt typischerweise ein dreistufiger Prozess zum Einsatz (Cregg 2007). Zuerst wird eine Satzphase mit einer P_{aox1} reprimierenden Kohlenstoffquelle wie Glycerin durchgeführt, um Biomasse bei der maximalen Wachstumsrate zu generieren. Anschließend wird ein substratlimitierter Zulauf mit Glycerin für die Steigerung der Biomasse gestartet. Dabei wird eine definierte Wachstumsrate unterhalb der maximalen Wachstumsrate gewählt um Nebenproduktbildung und Sauerstofflimitierung vorzubeugen. Die dritte Stufe ist die Induktionsphase, in der Methanol mit einer geeigneten Zulauftrate zugegeben und das heterologe Protein gebildet wird (Cereghino et al. 2002). In einigen Fällen wurde ein positiver Effekt einer Adaptionsphase zwischen der Glycerin-Zulaufphase und der Induktionsphase beschrieben, bei der die Zellen durch die einmalige Zugabe von Methanol oder den gemischten Zulauf von Glycerin und Methanol für die Umstellung auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle vorbereitet wurden (Katakura et al. 1998; Zhang et al. 2003).

K. pastoris wird bei der Herstellung einer Vielzahl von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Eine ausführliche Zusammenstellung kann unter anderem den Übersichtsartikeln von Cereghino und Cregg (2000) sowie Cereghino et al. (2002) entnommen werden. Es wurden Proteinkonzentrationen von bis zu 22 g L^{-1} bei der Produktion einer Hydroxynitillyase aus dem tropischen Gummibaum *Hevea brasiliensis* berichtet, was die Effizienz dieses Expressionsorganismus unterstreicht (Haslacher et al. 1997). Eom et al. (2013) stellten die Herstellung einer *Candida antarctica* Lipase B mit *K. pastoris* vor. Sie erreichten in einer

Prozesszeit von 110 h eine Biotrockenmasse von $135,7 \text{ g L}^{-1}$ und eine Konzentration des Proteins *Candida antarctica* Lipase B (CalB) von $1,18 \text{ g L}^{-1}$ durch den Einsatz eines angepassten dreistufigen Prozesses.

Candida antarctica Lipase B

Lipasen stellen eine Enzymgruppe dar, die oftmals in der organischen Synthese Verwendung findet. Da diese Enzyme natürlicherweise an der Grenzfläche von organischer und wässriger Phase aktiv sind, weisen sie eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln auf. Lipase B aus *Candida antarctica* ist ein sehr vielseitiges Enzym, das für eine Vielzahl von Herstellungsprozessen im Labor und im industriellen Maßstab eingesetzt wird (Anderson et al. 1998). Es weist ein Molekulargewicht von 33 kDa und einen isoelektrischen Punkt von pH 6,0 auf und ist besonders aktiv in Bezug auf Ester, Amide und Thiole. Verschiedene Varianten wie beispielsweise Novozyme435 (Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark) oder Chirazyme L-2 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) sind kommerziell erhältlich.

Die Aminosäuresequenz und die Tertiärstruktur von CalB sind aufgeklärt (Uppenberg et al. 1994a; Uppenberg et al. 1994b). Die Polypeptidkette besteht aus 317 Aminosäuren, aus der sich ähnlich zu anderen Hydrolasen eine α/β Hydrolase Faltung ergibt (Ollis et al. 1992). CalB agiert katalytisch analog zu Serinproteasen, wobei eine Serin-Histidin-Asparaginsäure Triade ursächlich für die katalytische Aktivität ist (siehe Abbildung 3.6). Dafür benötigt CalB keine Aktivierung durch eine Interphase und kann so als eine Zwischenform einer Lipase und Esterase betrachtet werden (Martinelle et al. 1995).

Bei CalB handelt es sich um ein sehr robustes Enzym. Obwohl der optimale pH für die Biokatalyse bei pH 7 liegt, ist das Enzym von pH 3,5 bis pH 9,5 in wässriger Umgebung stabil. Eine Denaturierung findet je nach Puffer und pH ab einer Temperatur von etwa $50 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $60 \text{ }^\circ\text{C}$ statt. Des Weiteren kann die Stabilität durch die Isolation des Enzyms noch weiter gesteigert werden (Anderson et al. 1998).

CalB kann in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden. Dazu zählen unpolare Lösungsmittel wie Hexan oder Oktan und polare Lösungsmittel wie Butanol, Aceton oder Acetonitril. Außerdem akzeptiert CalB verschiedene Acyl-Donoren und ist in seiner katalytischen Aktivität nicht auf freie Carboxylsäuren eingeschränkt, sondern kann unter anderem auch Methyl- und Ethylester sowie aktivierte Komponenten umsetzen (Anderson et al. 1998). Deshalb kann CalB für viele Anwendungen verwendet werden. Dazu zählen beispielsweise die Bereitstellung von homogenen Triglyceriden (zum Beispiel Akoh et al. 1996), die Synthese und Hydrolyse von einfachen Estern (zum Beispiel Multzsch et al. 1994) oder die regioselektive Acylierung von Glucoseestern (Kirk et al. 1995).

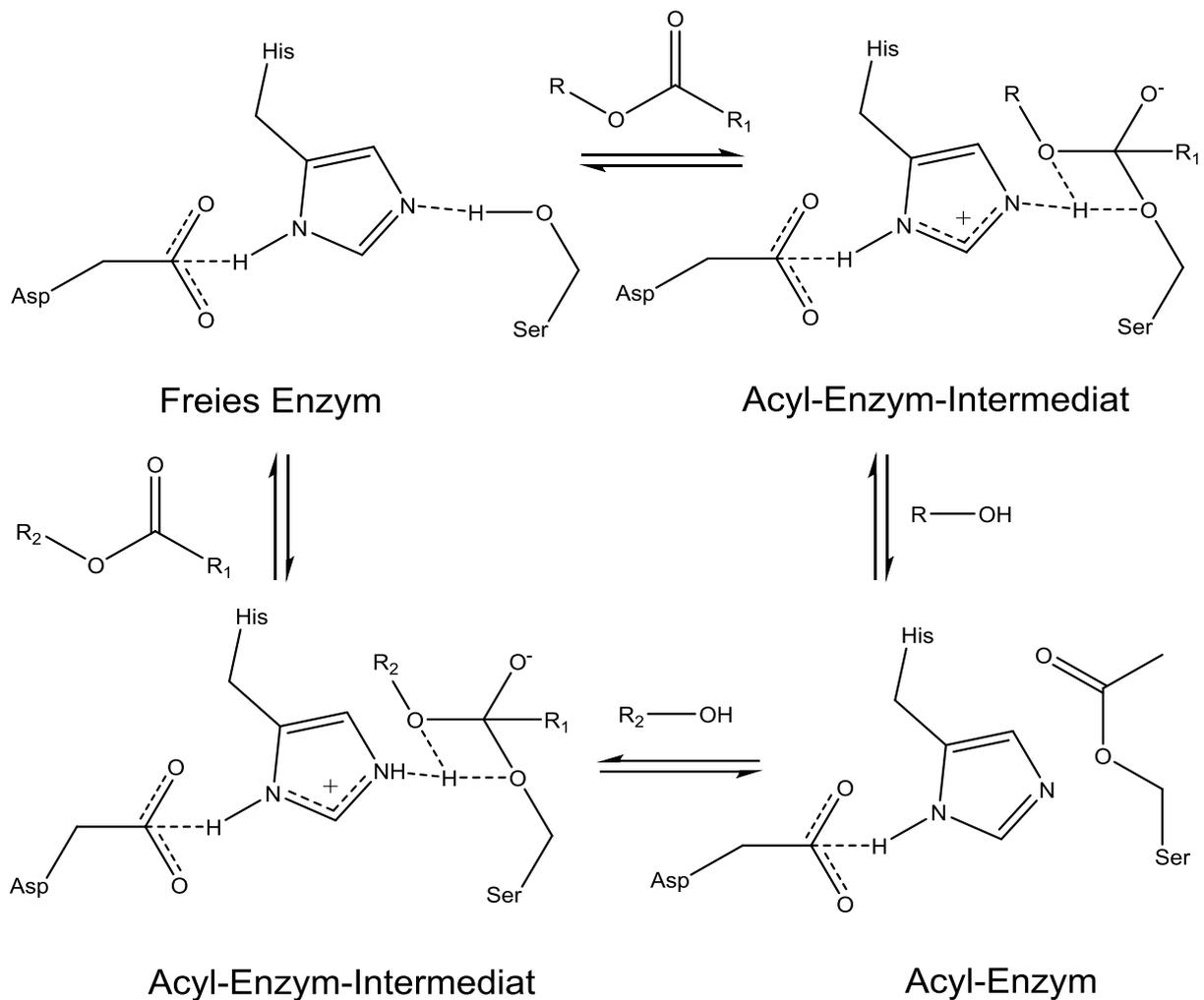


Abbildung 3.6: Der katalytische Mechanismus von *Candida antarctica* Lipase B basierend auf einer Serin-Histidin-Asparaginsäure Triade. Modifiziert nach Anderson et al. (1998).

Das dargelegte breite Anwendungsspektrum zeigt die Relevanz des Enzyms in der organischen Synthese, woraus eine unmittelbare Notwendigkeit der Entwicklung effizienter Herstellungsverfahren folgt.

In dieser Arbeit wurde eine Variante (CaL-B2, von W42 Industrial Biotechnology GmbH, Marl, Deutschland zur Verfügung gestellt, siehe Kapitel 4.2.1) der CaIB mit einer gezielten Veränderung von vier Aminosäuren verwendet, die in einer etwa verdoppelten Aktivität gegenüber dem Substrat *p*-Nitro-phenol Butyrat resultieren. Die Enzymaktivität wird üblicherweise mit der Einheit *Unit* (U) angegeben. Ein *Unit* definiert dabei die Enzymmenge, die unter bestimmten Bedingungen 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt. Weiter kann die spezifische Aktivität berechnet werden, die angibt wie viele *Units* pro Milligramm Enzym vorliegen.

3.3.2 Herstellung rekombinanter Proteine mit *Escherichia coli*

Obwohl eine Vielzahl an Wirtsorganismen für die Herstellung rekombinanter Proteine bekannt ist, wird in industriell relevanten Produktionsprozessen zumeist auf *Escherichia coli* zurückgegriffen (Andersen und Krummen 2002; Demain und Vaishnav 2009; Ferrer-Miralles und Villaverde 2013; Rosano und Ceccarelli 2014b).

Bei *E. coli* handelt es sich um ein fakultativ anaerobes, gramnegatives Enterobakterium, das viele Kohlenstoffquellen für heterologes Wachstum nutzen kann (Förster und Gescher 2014). Zu den wichtigsten positiven Eigenschaften dieses Bakteriums zählen die Möglichkeit der einfachen genetischen Modifikation, das schnelle Wachstum in definierten Medien sowie die erreichbaren hohen Zelldichten und Produktkonzentrationen (Demain und Vaishnav 2009). Des Weiteren sind viele verschiedene Stämme, Vektoren und Promotoren verfügbar (Terpe 2006).

In der Folge wird zunächst auf den Stoffwechsel von *E. coli* eingegangen, bevor verschiedene Strategien und Prozessführungen zur Herstellung rekombinanter Proteine vorgestellt werden. Zuletzt sollen die Eigenschaften des in dieser Arbeit hergestellten fotoaktivierbaren Fluoreszenzproteins PAmCherry erläutert werden.

Stoffwechsel von *E. coli*

E. coli ist in der Lage verschiedenste Kohlenstoffquellen wie unter anderem fünf- und sechsfach Zucker oder Glycerin zu nutzen (Xia et al. 2012; Förster und Gescher 2014). Allerdings wird hauptsächlich Glucose als Substrat für die Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* verwendet, weshalb in der Folge auf den zugrunde liegenden Stoffwechselweg eingegangen werden soll.

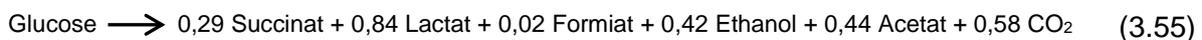
Glucose wird dabei vor allem über das glucosespezifische Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System in die Zelle aufgenommen. Dabei wird Glucose zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, wobei die Phosphatgruppe durch die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat bereitgestellt wird (Steinsiek und Bettenbrock 2012). Bei mikromolaren extrazellulären Konzentrationen kann Glucose jedoch auch über ein ABC-Transportsystem (ABC: Adenosintriphosphat (ATP) *binding cassette*) in die Zelle geschleust werden (Ferenci 1996). Daneben stehen auch das Manose-Phosphotransferase-System sowie die ABC-Transporter für Galactose und Maltose zur Verfügung. Glucose wird dabei unphosphoryliert aufgenommen und anschließend je nach Transporter mit Hilfe einer Glucokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert (Steinsiek und Bettenbrock 2012).

Anschließend wird Glucose über die Glykolyse zum zentralen Stoffwechselprodukt Pyruvat abgebaut. Dabei generiert die Zelle pro Mol Glucose zwei Mol ATP und zwei Mol

Nicotinamidadenindinukleotid (NADH). Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches als Ausgangsstoff des Citratzyklus (TCA: *tricarboxylic acid cycle*) fungiert. In der Atmungskette werden die gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) schließlich schrittweise mit Sauerstoff unter Bildung von Wasser oxidiert. Dabei wird ein Protonengradient aufgebaut, der ATP-Synthasen antreibt, wodurch mittels oxidativer Phosphorylierung 32 Mol ATP gebildet werden können. Außerdem werden im Citratzyklus weitere zwei Mol GTP generiert. Insgesamt können so unter aeroben Bedingungen pro Mol Glucose 36 Mol an energiereichen Mononucleotid-Triphosphaten gewonnen werden (Chmiel 2011). Die Stöchiometrie des Stoffwechselwegs ist in Gleichung (3.54) dargestellt.



Bei anaeroben Bedingungen ist aufgrund des fehlenden Sauerstoffs die Umsetzung von Reduktionsäquivalenten in der Atmungskette nicht möglich und der Citratzyklus wird inaktiviert. Um die in der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente zu regenerieren, wandelt *E. coli* Glucose in der sogenannten gemischten Säuregärung zu verschiedenen organischen Säuren, Ethanol und Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit der in Gleichung (3.55) dargestellten Stöchiometrie um (Clark 1989; Fuchs et al. 2007).



Bei diesem Stoffwechselweg stehen nur 2 Mol ATP aus der Glykolyse zur Verfügung (Chmiel 2011). Da die gebildeten Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Acetat zudem das Zellwachstum und die Produktbildung hemmen, muss für die effiziente rekombinante Proteinproduktion eine Sauerstofflimitierung vermieden werden (Eiteman und Altman 2006).

Acetat wird von *E. coli* jedoch auch unter aeroben Bedingungen bei hohen Glucosekonzentrationen oder hohen Wachstumsraten gebildet, was als Überschussmetabolismus bezeichnet wird. Bei Hochzelldichteverfahren wirken sich Acetatkonzentrationen von über 5 g L⁻¹ negativ auf die Wachstumsrate, den Biomasseausbeutekoeffizienten und die maximal erreichbare Biotrockenmasse aus (Lee 1996). Bei auftretendem Überschussmetabolismus kann die aufgenommene Glucose die Kapazität der Atmungskette übersteigen (Lee 1996) und Acetyl-CoA kann nicht im Citratzyklus abgebaut werden. Es sind zwei Arten der aeroben Acetatbildung beschrieben (Dittrich et al. 2005). In der stationären Phase ist hauptsächlich das Enzym *poxB* aktiv, während in der exponentiellen Wachstumsphase Acetat vor allem durch die Enzyme *pta* und *ackA* gebildet wird. Mit diesem Stoffwechselweg wird wahrscheinlich der Akkumulation von NADH aus der Glykolyse vorgebeugt (Vemuri et al. 2006).

Die Bildung von Acetat ist abhängig von der vorherrschenden Wachstumsrate. Dabei hängt die kritische Wachstumsrate, ab welcher eine Akkumulation von Acetat auftritt, vom eingesetzten Stamm, dem Medium und der Kohlenstoffquelle ab (Lee 1996). Mit Glucose als Substrat gelten Wachstumsraten von über $0,2 \text{ h}^{-1}$ bis $0,35 \text{ h}^{-1}$ als kritisch (Tripathi 2009). Acetat kann unter Abwesenheit von Glucose wieder abgebaut werden (Xu et al. 1999), weshalb eine Limitierung der Wachstumsrate mittels eines geeigneten Zulaufprofils die einfachste Strategie zur Vermeidung der Bildung von Acetat während der aeroben Kultivierung mit *E. coli* ist (Lee 1996; Korz et al. 1995).

Strategien zur effizienten Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli*

Bei der Produktion von heterologen Proteinen mit *E. coli* akkumuliert das Produkt zumeist im Zytoplasma, kann jedoch auch sekretiert werden (Georgiou und Segatori 2005). Zu den häufigsten Problemen, die bei der Überexpression von Proteinen auftreten können, zählen das Absterben von Zellen bei der Herstellung toxischer Proteine, die Bildung von Einschlusskörperchen beziehungsweise falsch gefalteter Proteine sowie die fehlende Bildung von Proteinen (Terpe 2006; Rosano und Ceccarelli 2014a). Diese können zum einen durch prozesstechnische Anpassungen, wie der Reduktion der Temperatur und der damit verbundenen verringerten Stoffwechselaktivität oder der Steuerung der Produktbildungsrate durch die vorgegebene Induktorkonzentration gelöst werden (Terpe 2006).

Zum anderen wurden zahlreiche *E. coli*-Stämme für die Produktion von heterologen Proteinen entwickelt, wobei zumeist der K12-Stamm oder der BL21-Stamm und deren Derivate verwendet werden. Dabei weist *E. coli* BL21 eine Deletion der Proteasen *lon* und *ompT* auf, wodurch der zytoplasmatische Abbau des Zielproteins vermieden werden kann (Terpe 2006). Darunter sind Stämme wie Origami oder BL21 *trxB*, die eine verbesserte Bildung von Disulfidbrücken aufweisen. Des Weiteren ist es möglich fehlende Produktbildung aufgrund des Auftretens von seltenen Aminosäurecodons in der Gensequenz des heterologen Proteins durch den Einsatz von speziellen Stämmen wie beispielsweise Rosetta oder BL21 Codon-Plus-RIL zu umgehen. Für die Herstellung von Proteinen, die in die Membran von Zellen inserieren und das Zellwachstum deutlich verringern, wurden die Stämme C41 und C43 entwickelt (Miroux und Walker 1996; Terpe 2006).

Durch die Wahl des Expressionsvektors kann außerdem die Produktbildungsrate reguliert werden. So wurden beispielsweise Vektoren wie pWKS29 beschrieben, die durch die Regulation mittels des pSC101 Replikationsursprungs lediglich in sechs bis acht Kopien in der Zelle auftreten (Wang 1991). Damit kann der starken Überexpression von Proteinen vorgebeugt werden. Im Gegensatz dazu kommen oftmals verschiedene Varianten von pUG- oder pET-Vektoren zum Einsatz, die mit hoher Kopienzahl in der Zelle vorhanden sind und so

die Produktbildungsrate für lösliche Proteine deutlich steigern können (Baneyx 1999). Daneben gibt es spezielle Vektoren, die für die Co-Expression von Chaperonen verwendet werden, um die korrekte Faltung des Zielproteins zu unterstützen (Marco 2007).

Darüber hinaus ist die Wahl des Promotors von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung eines effizienten Prozesses zur Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli*. Eine Vielzahl an Promotoren steht zur Verfügung, jedoch werden nur wenige häufig eingesetzt. Dabei sollte ein Promotor stark sein, einfach auf viele *E. coli*-Stämme übertragbar sein und die Induktion der Expression einfach, preiswert und unabhängig von weiteren Medienbestandteilen erfolgen können. Des Weiteren sollte eine möglichst geringe Basalexpression auftreten (Terpe 2006; Rosano und Ceccarelli 2014a). Mit dem verwendeten Promotor kann die gewünschte Induktionsstrategie vorgegeben werden. So kann die Induktion beim Phagenpromotor p_L durch eine Temperaturerhöhung (Elvin et al. 1990) oder wie in den meisten Fällen durch die Zugabe von Chemikalien wie L-Arabinose (*araBAD* Promotor, Guzman et al. 1995) oder Anhydrotetracyclin (*tetA* Promotor, Skerra 1994) erfolgen. Am häufigsten wird jedoch mit dem Lactoseanalogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, wie beispielsweise bei der Verwendung des *trc* Promotors (Brosius et al. 1985). Mit der Wahl des Promotors kann außerdem das Expressionsniveau reguliert werden. Es existieren schwache Promotoren wie der *lac* Promotor (Gronenborn 1976) bis hin zu sehr starken, wie dem am häufigsten verwendeten T7-RNS-Polymerase-System (Studier und Moffatt 1986).

Da in dieser Arbeit ausschließlich *E. coli* BL21-Stämme mit einem pET28a(+)-Vektor und dem T7-RNS-Polymerase-System verwendet wurden, soll im Folgenden genauer auf das zugrunde liegende Prinzip der Expression eingegangen werden. Beim Einsatz des von Studier und Moffatt (1986) entwickelten T7-Expressionssystems muss auf dem chromosomalen Genom des Wirtsorganismus das Lysegen λ -DE3 codiert sein, das das Gen für die T7-RNS-Polymerase unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors trägt. Das Zielgen ist auf dem pET-Vektor hinter einem hybriden T7/*lac*-Promotor codiert, welcher keine Ankersequenz für die *E. coli*-RNS-Polymerase darstellt. Als weitere Absicherung gegen Basalexpression dient der *lac*-Operator des T7-Promotors. Der entsprechende Repressor LacI ist sowohl auf dem Chromosom als auch auf dem pET-Plasmid codiert, um eine ausreichende Repression durch das Tetramer von LacI für beide Promotoren zu erreichen.

Die Induktion kann mit Lactose oder dessen Analogon IPTG erfolgen. Dabei bindet IPTG an das LacI-Tetramer, was dessen Bindung an die T7-Operator-Sequenz verhindert. Somit wird nach erfolgter Induktion zuerst das T7-Gen durch die zelleigene RNS-Polymerase abgelesen und exprimiert. Die T7-RNS-Polymerase ist etwa fünfmal aktiver als die native RNS-Polymerase von *E. coli* und kann an den T7-Promotor auf dem Vektor binden und das Zielgen transkribieren, welches anschließend translatiert wird. Die Aufnahme von IPTG ist dabei bei

hohen Konzentrationen diffusionsabhängig, während IPTG bei Konzentrationen $< 20 \mu\text{M}$ aktiv durch die Lactose Permease LacY aufgenommen und intrazellulär angereichert wird (Fernández-Castané et al. 2012a; b). So kann durch die Anpassung der Induktionsstrategie das Expressionsniveau beeinflusst werden (Alfasi et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Auswahl des optimalen Expressionssystems bestehend aus Wirt, Vektor und Promotor proteinabhängig ist und für jeden Einzelfall ohne allgemein gültige Empfehlungen aufwendig bestimmt werden muss (Long et al. 2014; Rosano und Ceccarelli 2014a).

Bioprozesse zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *E. coli*

Nach der Wahl eines geeigneten Mikroorganismus muss proteinspezifisch ein dem Wirt angepasster Bioprozess entwickelt werden. Dabei wird zumeist auf Hochzelldichteverfahren im Zulaufverfahren zurückgegriffen, da sich im Vergleich zum Satzbetrieb höhere Zellkonzentrationen und damit höhere Produktkonzentrationen und volumetrische Produktivitäten erreichen lassen. Dadurch können die Dimensionen der Anlagen und damit die nötigen Investitionen verringert werden (Lee 1996; Choi et al. 2006). Probleme, die bei Hochzelldichteverfahren auftreten können, wie beispielsweise Substratinhibierung, begrenzte Sauerstofftransferaten, hoher Kohlenstoffdioxid-Gehalt und das Auftreten von inhibierenden Nebenprodukten (Baneyx 1999; Tripathi 2009), können durch die Wahl einer geeigneten Zulauftrate umgangen werden.

So konnten in ausgewählten Prozessen Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) von 145 g L^{-1} mit limitierendem Glycerinzulauf (Korz et al. 1995) sowie 148 g L^{-1} mit nicht-limitierendem Glucose-geregeltem Wachstum (Horn et al. 1996) erreicht werden. Eine weitere Steigerung der Zelldichte war durch einen stetigen Medien austausch bei simultaner Zellrückhaltung über eine Dialysemembran (190 g L^{-1} Biotrockenmassekonzentrationen) mit Glucose als Kohlenstoffquelle möglich (Nakano et al. 1997). Damit konnte annähernd die theoretisch mögliche Biotrockenmassekonzentration bei der Kultivierung mit *E. coli* von 200 g L^{-1} (Rosano und Ceccarelli 2014a) erreicht werden.

Eine Maximierung der Zelldichte geht jedoch nicht in allen Fällen mit einer Optimierung der erreichbaren Konzentration an rekombinantem Protein einher, da sich die metabolische Last durch die Bildung des Zielproteins und der damit verbundenen Notwendigkeit der Erhaltung der Fremd-DNS negativ auf das Zellwachstum auswirkt (Striedner et al. 2003; Tripathi 2009). Besonders bei der Verwendung von starken Promotoren wie dem T7-System tritt eine hohe metabolische Last für die Zellen auf, die bis zum Absterben der Zellen führen kann (Striedner et al. 2003). Ursächlich hierfür könnte neben der nötigen Replikation der eingebrachten

Plasmide der hohe Bedarf an ATP, Aminosäuren sowie Transferribonukleinsäuren (tRNS) für die Translation des Zielproteins sein (Dong et al. 1995). Folglich treten durch den Selektionsdruck verlangsamtes Wachstum sowie Plasmidverlust auf. Des Weiteren kann die verstärkte Expression von Stressgenen und die Bildung von Proteasen beobachtet werden (Gill et al. 2000; Hoffmann und Rinas 2004). Da einige Stunden nach der Induktion des T7-Systems eine deutliche Abnahme der Zellviabilität zu beobachten ist (Dong et al. 1995; Striedner et al. 2003), wird der maximal mögliche Ertrag an heterologem Protein oftmals nicht erreicht.

Um einen negativen Einfluss der Produktbildung auf das Wachstum von *E. coli* zu vermeiden, wird meist ein zweistufiger Zulaufprozess mit initialer Biomassebildung und anschließender Produktbildung durchgeführt (Rosano und Ceccarelli 2014a). Aufgrund der starken Proteinabhängigkeit der Expression (Rosano und Ceccarelli 2014a) müssen für jeden Produktionsprozess Parameter wie Medium, Temperatur oder Induktionsstrategie optimiert werden (Terpe 2006; Chmiel 2011). So können in Zulaufprozessen intrazelluläre Konzentrationen an rekombinantem Protein zwischen 2 g L^{-1} und 10 g L^{-1} erreicht werden (Scott 2008), wobei meistens Konzentrationen von $3 - 5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden und $8 - 10 \text{ g L}^{-1}$ als maximal gelten (Guldager 2009). Die höchsten bekannten Produktkonzentrationen mit *E. coli* liegen bei $7 - 9,7 \text{ g L}^{-1}$ mit einem zellspezifischen Proteingehalt von $0,05 - 0,19 \text{ g g}^{-1}$ (Choi et al. 2006).

Einen weiteren prozesstechnischen Ansatz zur rekombinanten Proteinproduktion stellen kontinuierliche Bioprozesse dar. Besonders geeignet sind Anwendungen, bei denen ein Substrat inhibierend für den Mikroorganismus ist oder einen negativen regulatorischen Einfluss auf dessen Metabolismus aufweist (Chmiel 2011). Weiterhin ist die Instabilität von manchen Produkten ein Grund für die Wahl von kontinuierlichen Verfahren (Croughan et al. 2015). Allerdings benötigt man im Vergleich zu Satz- oder Zulaufprozessen eine bessere Prozessregelung und einen höheren apparativen Aufwand. Außerdem ist es schwieriger die Sterilität über lange Prozesszeiten aufrecht zu erhalten und es kann zu genetischen Instabilitäten der Zellen wie Plasmidverlust kommen. Die Nachteile durch geringe Zell- und Produktkonzentrationen im Vergleich zu Satz- oder Zulaufprozessen aufgrund des ständigen Medienaustauschs und der damit verbundenen höheren Kosten für die folgende Produktaufarbeitung überwiegen meist die mögliche Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute. So konnten sich kontinuierliche, mikrobielle Produktionsprozesse für rekombinante Proteine in der Industrie bisher nicht durchsetzen (Chmiel 2011; Croughan et al. 2015).

Insbesondere die herkömmliche intrazelluläre Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* im kontinuierlichen Betrieb ist problematisch, da sich deren Expression negativ auf das Wachstum auswirkt (Striedner et al. 2003), wodurch es zu einer Anpassung der Kultur an den

Selektionsdruck durch ausgeprägten Plasmidverlust kommen kann (Rhee und Schügerl 1998). Eine Möglichkeit dies zu umgehen ist die Implementierung einer kontinuierlichen mehrstufigen Reaktorkaskade, um Zellwachstum und Produktbildung zu entkoppeln. So stellten Rhee und Schügerl (1998) einen Prozess zur Produktion des Fusionsproteins EcoRI::SPA mit *E. coli* JM109 vor, bei dem eine zweistufige Reaktorkaskade verwendet wurde. Dabei wurde der erste Reaktor für das Zellwachstum von nicht induzierten Zellen genutzt und die Zellsuspension in den zweiten Reaktor übertragen, wo die Produktbildung durch eine Temperaturerhöhung induziert wurde. Um höhere Zell- und Produktkonzentrationen zu erreichen, können mehr als zwei Reaktoren in Kaskade betrieben sowie eine Verweilzeitentkopplung durch Zellrückhaltung vorgenommen werden (Chang et al. 2011; Chang et al. 2014).

Das fotoaktivierbare Fluoreszenzprotein PAmCherry

Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP, *green fluorescent protein*) aus der Qualle *Aequorea victoria* stand der Biotechnologie erstmals ein Fluoreszenzprotein zur Verfügung (Shimomura et al. 1962), das in der Folge hinsichtlich seiner Fluoreszenzeigenschaften optimiert wurde. Ein Beispiel hierfür stellt das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) dar. Des Weiteren wurden Proteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren entwickelt, wie beispielsweise das gelb fluoreszierende Protein (YFP, *yellow fluorescent protein*, Miller et al. 1999) und weitere Fluoreszenzproteine isoliert, wie das rot fluoreszierende dsRED aus der Anemonenart *Discosoma striata* (Shaner et al. 2004). Diese Proteine ermöglichten die Entwicklung spezieller Techniken in der Molekularbiologie, wie die Markierung verschiedener Kompartimente oder Teilbereiche von Zellen (Miller et al. 1999) oder der Fusion von Fluoreszenzproteinen an Zielproteine, um Expressionsvorgänge in Zellen zu verfolgen (Chalfie et al. 1994).

Fotoaktivierbare Fluoreszenzproteine stellen eine Untergruppe der Fluoreszenzproteine dar, deren spektrale Eigenschaften durch die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht verändert werden können. Sie können so für die zeitlich definierte Färbung von Zellkompartimenten bei der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden (Subach et al. 2009b; Piatkevich und Verkhusha 2010). Ein Beispiel dieser Gruppe stellt PAmCherry (*photoactivatable mCherry*, fotoaktivierbares mCherry) als eine Weiterentwicklung des Proteins mCherry, das von dsRED abgeleitet ist, dar (Shaner et al. 2004). PAmCherry zeichnet sich durch eine hohe pH-Stabilität und eine gute Fotoaktivierbarkeit aus (Subach et al. 2009b).

Durch die Anregung mit Licht einer Wellenlänge zwischen etwa 350 nm bis 450 nm kann das Chromophor des Proteins angeregt werden und das Protein wird vom *OFF*- in den *ON*-Zustand versetzt. Anschließend verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 404 nm zu 564 nm.

Nach der Anregung kann die Emission bei 595 nm bestimmt werden. Die Absorptions- und Emissionsspektren von PAmCherry sind in Abbildung 3.7 dargestellt (Subach et al. 2009b).

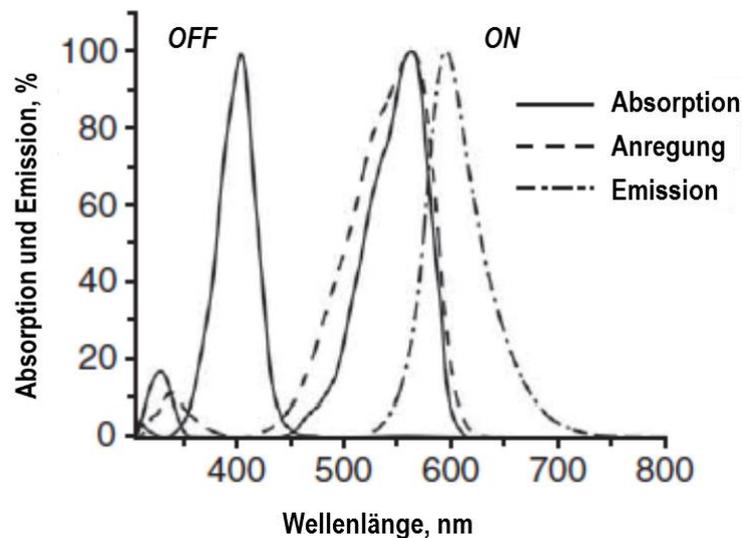


Abbildung 3.7: Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren des fotoaktivierbaren Proteins PAmCherry. Modifiziert nach Subach et al. (2009b). Dabei bezeichnet *OFF* den inaktivierten Zustand und *ON* den Zustand des Proteins nach erfolgter Fotoaktivierung.

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt ist, bilden das Tripeptid [Met-66-Tyr-67-Gly-68] sowie die Aminosäure [Glu-215] das Chromophor von PAmCherry. Das Tripeptid kann im *OFF*-Zustand durch Bestrahlung mit Licht angeregt werden. Anschließend verhält es sich oxidierend und nimmt ein Elektron der Carboxylgruppe von [Glu-215] auf. Das so entstehende [Glu-215 \cdot] Radikal ist instabil, decarboxyliert und es entsteht ein reaktives Carbonradikal. Dieses reagiert mit einem Sauerstoffmolekül zu einem [Glu-215-CH₂-O-O \cdot] Radikal, welches die Carboxylgruppe verdrängt. Somit wird das Chromophor für ein weiteres Sauerstoffmolekül zugänglich. Von Subach et al. (2009a) wurde postuliert, dass das C ^{β} -Atom der Aminosäure [Tyr-67] vom [Glu-215-CH₂-O-O \cdot] Radikal dehydriert wird und erneut ein instabiles Carbonion entsteht, welches vom zweiten Sauerstoffmolekül oxidiert wird. Das Protein wird so in den *ON*-Zustand versetzt.

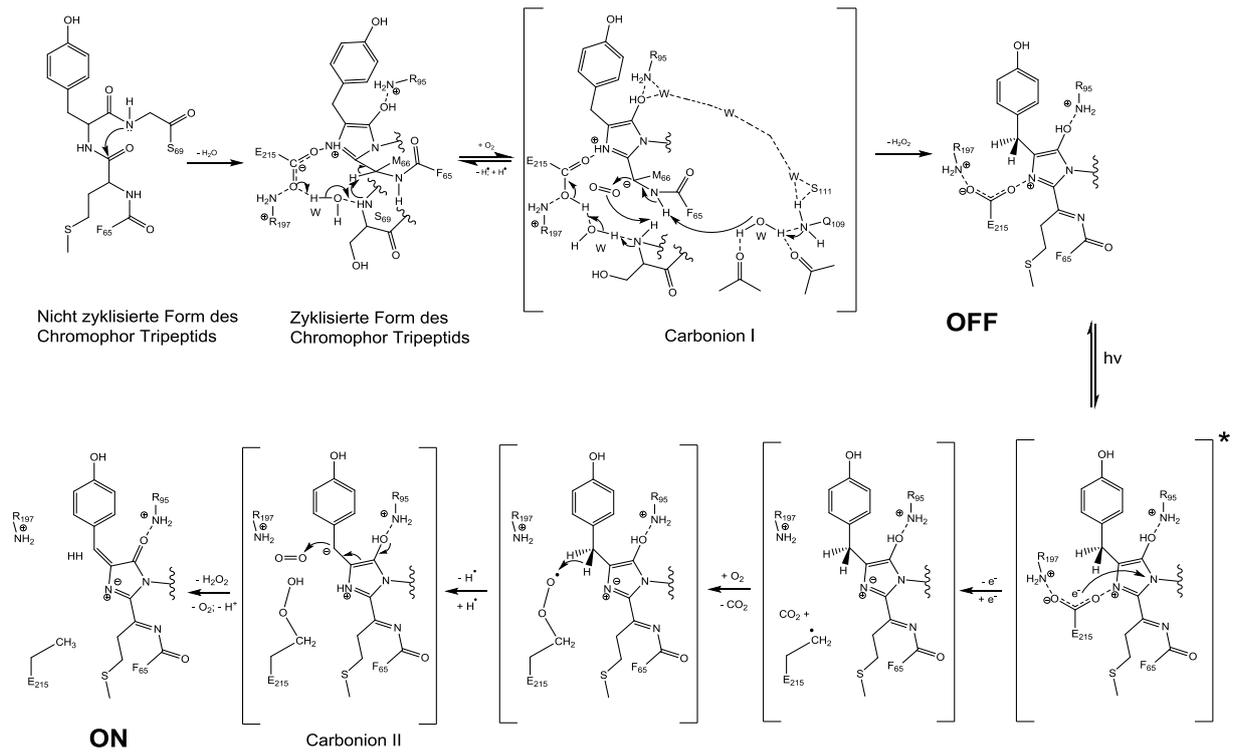


Abbildung 3.8: Mechanismus der Fotoaktivierung von PAmCherry. Modifiziert nach Subach et al. (2009a). Dabei bezeichnet *OFF* den inaktivierten Zustand und *ON* den Zustand des Proteins nach erfolgter Fotoaktivierung. Der Stern markiert den angeregten Zustand des Chromophors und $h\nu$ die Anregung mit Licht.

3.4 Biokatalytische Prozesse in der organischen Synthese

Enzyme werden in der organischen Synthese seit mehr als einem Jahrhundert verwendet (Buchholz et al. 2012). So erkannte Emil Fischer 1898 die charakteristische Chemo-, Regio- und Stereoselektivität dieser Biokatalysatoren (Fischer 1898). Zeitgleich konnte Arthur Croft-Hill mit der Herstellung von Isomaltose aus einer Glucoselösung mit Hefeextrakt die erste enzymatische Synthese verwirklichen (Sumner und Somers 1953). Nur ungefähr 30 Jahre später wurden Enzyme bereits in industriellen Produktionsprozessen eingesetzt (Wenda et al. 2011). Mit den Fortschritten der rekombinanten DNS-Technologie sowie der gezielten Veränderung von Enzymen (*protein engineering*) wurde die industrielle Biokatalyse in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ein wichtiger Wirtschaftszweig. Mittlerweile ist der Großteil der kommerziell erhältlichen Enzyme rekombinanten Ursprungs (Liese et al. 2006; Buchholz et al. 2012). Dabei stieg das Marktvolumen für industriell genutzte Enzyme von 1998 mit 1,6 Milliarden Dollar auf 5,1 Milliarden Dollar im Jahr 2009 und weist weiterhin steigende Tendenz auf (Sanchez und Demain 2011).

Klassifizierung von Enzymen

Enzyme werden nach der *International Union of Biochemistry* in sechs Klassen eingeteilt (Tabelle 3.1) und sind durch ihre vierstellige *Enzyme commission* (EC) Nummer charakterisiert. Dabei bezeichnet die erste Nummer die Enzymklasse, gefolgt von zwei weiteren Nummern für die Unterklassen. Die letzte Nummer definiert die spezifische Enzymfunktion (Webb 1992).

Tabelle 3.1: Enzymklassen mit der entsprechenden katalytischen Funktion.

Enzymklasse	Katalytische Funktion
Oxidoreduktasen	Oxidation/Reduktion durch den Transfer von Wasserstoff und Sauerstoffatomen oder Elektronen zwischen Molekülen
Transferasen	Transfer funktioneller Gruppen (zum Beispiel Methyl-, Hydroxyl- oder Acylgruppen) zwischen Molekülen
Hydrolasen	Bildung oder Trennung von chemischen Bindungen mit dem Einsatz von Wassermolekülen
Lyasen	Bildung oder Trennung von chemischen Bindungen ohne den Einsatz von Wassermolekülen
Isomerasen	Veränderung der chemischen Struktur von Molekülen
Ligasen	Bildung chemischer Bindungen mit dem Einsatz von Triphosphaten

Vor- und Nachteile von enzymatischen Synthesen

Enzymatische Synthesen weisen einige charakteristische Vorteile auf. Dazu zählt die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen, wodurch die Bildung unerwünschter Nebenprodukte und deren aufwendige Abtrennung weitestgehend vermieden werden kann und hohe Ausbeuten zu erzielen sind (Rozzell 1999). Außerdem kann durch die hohe Selektivität im Vergleich zu vielen chemischen Synthesen auf das Einbringen und Entfernen von Schutzgruppen verzichtet werden, was die Effizienz der Prozesse weiter erhöht (Ishige et al. 2005). Enzyme können die von ihnen katalysierten Reaktionen schon bei geringen molaren Konzentrationen von 10^{-4} % bis 10^{-3} % um einen Faktor von 10^8 bis 10^{10} beschleunigen und sind damit wesentlich effizienter als die korrespondierenden chemischen Katalysatoren, die in der Regel mit einem molaren Anteil von 0,1 % bis 1,0 % eingesetzt werden (Wolfenden und Snider 2001; Faber 2011).

Des Weiteren können im Gegensatz zur chemischen Synthese oftmals mildere Prozessbedingungen mit niedrigen Temperaturen, neutralem pH und Atmosphärendruck gewählt werden. Enzymatische Synthesen sind daneben umweltfreundlicher als das chemische Pendant, da aufgrund der Aktivität von Enzymen in wässrigen Lösungen auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann. Weiter wird der Einsatz von schwermetallhaltigen Katalysatoren vermieden (Liese et al. 2006).

Eine Besonderheit beim Einsatz von mehreren Enzymen ist deren Aktivität bei ähnlichen Reaktionsbedingungen, was die Kombination mehrerer Enzyme in Reaktionskaskaden in einem einzelnen Prozessschritt ermöglicht (Faber 2011). So kann auf die Aufreinigung von Zwischenprodukten verzichtet werden und die Verschiebung von ungünstigen Reaktionsgleichgewichten in Richtung der Produkte wird durch eine geeignete Prozessführung möglich (Liese et al. 2006; Faber 2011).

Allerdings sind mit dem Einsatz von Enzymen auch Nachteile verbunden. So ist bisher nur ein begrenztes Substratspektrum für industrielle Synthesen vorhanden (Faber 2011), weshalb der Suche nach neuen Enzymen eine wichtige Rolle zukommt. Des Weiteren bestehen Enzyme natürlicherweise aus L-Aminosäuren und können so jeweils nur ein Enantiomer eines Stoffes produzieren. Um das entsprechend andere Enantiomer zu erhalten, ist immer eine Veränderung des Enzyms oder die Identifikation neuer Enzyme notwendig (Faber 2011).

Mit der Ausnahme von Hydrolasen benötigen die meisten Enzyme Cofaktoren für biokatalytische Umsetzungen. Diese können als Redoxäquivalente (zum Beispiel Flavine oder NAD(P)H) oder als chemische Energielieferanten (zum Beispiel ATP) dienen und sind meist instabil und teuer. Um den stöchiometrischen Einsatz von Cofaktoren zu umgehen, werden in ökonomisch sinnvollen Prozessen Regenerationsstrategien eingesetzt (Gröger et al. 2012).

Ein weiteres Problem in industriellen Prozessen stellt die geringe Stabilität von Enzymen gegenüber extremen Bedingungen wie saurem und basischem pH, hohen Temperaturen, hohen Ionenstärken und dem Einsatz von organischen Lösungsmitteln dar (Bommarius und Riebel 2004; Iyer und Ananthanarayan 2008). Besonders problematisch ist dies aufgrund des teilweise hohen Preises von Enzymen. Deren Herstellungskosten können sich je nach Aufreinigungsgrad und der Größenordnung des Produktionsprozesses stark unterscheiden. Jedoch kann die Verwendung von Enzymen aufgrund deren hoher Effizienz bei der Herstellung hochpreisiger Produkte ökonomisch sinnvoll sein (Faber 2011). Die Durchmusterung von extremophilen Mikroorganismen und die gezielte Veränderung von Enzymen kann zudem stabilere Enzyme liefern (Phillips 1996; Schoemaker et al. 2003). Für eine zusätzlich erhöhte Wirtschaftlichkeit kann die Isolation von Enzymen sorgen, die einen mehrfachen Einsatz von stabilen Biokatalysatoren erlaubt, jedoch auch einen kostenintensiven Prozessschritt darstellt (DiCosimo et al. 2013).

Die Effizienz von enzymatischen Synthesen kann weiterhin unter inhibierenden Einflüssen von Edukten, Intermediaten oder Produkten der Reaktionen auf die Biokatalysatoren leiden. Diesen Phänomenen kann durch die Identifikation neuer Enzyme (Klermund et al. 2013), der Veränderung des Biokatalysators (Binay und Karagüler 2007; Dippe et al. 2015) oder einer veränderten Prozessführung begegnet werden (Woodley und Lilly 1994). So kann mit geeigneten Dosierstrategien eine Substratinhibierung umgangen und durch eine Abtrennung des Produktes aus dem Reaktionsansatz eine Produktinhibierung vermieden werden. Neben der Verwendung von Zweiphasensystemen mit der zweiten Phase als Eduktreservoir und *in situ*-Produktextraktionsmittel (Faber 2011) kann auch hier die Isolation der Enzyme und die Einführung einer kontinuierlichen Betriebsweise von großem Vorteil sein, um definierte Edukt- und Produktkonzentrationen im Reaktionsansatz zu gewährleisten (Woodley und Lilly 1994).

Isolierte Enzyme in der organischen Synthese

Enzyme werden für Biotransformationen zumeist in zwei unterschiedlichen Modifikationen eingesetzt. Diese gliedern sich in Ganzzellansätze und in die Verwendung von aufgereinigten Enzymen. Beide Konfigurationen weisen charakteristische Vor- und Nachteile auf, die in der Folge dargestellt werden sollen.

Ganzzellbiokatalysatoren sind in der Herstellung durch die reduzierten Aufarbeitungskosten um den Faktor 70 billiger als isolierte Enzyme (Tufvesson et al. 2011). Jedoch können durch zelleigene Enzyme unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden, die die Kosten für die Aufreinigung erhöhen und die erreichbaren Ausbeuten vermindern (Rozzell 1999; León et al. 1998). Des Weiteren kann eine Stofftransportlimitierung durch die Diffusion über die Zellwand auftreten und toxische Substrate oder Nebenprodukte können den Ganzzellbiokatalysator schädigen (León et al. 1998; Schmid et al. 2001; Schrewe et al. 2013; Smith et al. 2015).

Deshalb werden Enzyme oftmals in aufgereinigter Form eingesetzt, was die Bildung unerwünschter Nebenprodukte verhindert (DiCosimo et al. 2013). Jedoch ist die Aufreinigung von Enzymen sehr teuer und zeitintensiv, verursacht Verluste und führt gegebenenfalls zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität (Tufvesson et al. 2011; Secundo 2013; Rodrigues et al. 2013). Allerdings können isolierte Enzyme durch geeignete Immobilisierungsmethoden und Rückhaltungsstrategien wiederverwendet werden (Cantone et al. 2013; DiCosimo et al. 2013). Neben einigen Techniken zur Immobilisierung können Enzyme über verschiedene Filtrationsmethoden im Reaktionsgefäß zurückgehalten werden (Dijkstra et al. 2002; Chmiel 2011; siehe Kapitel 3.4.2).

3.4.1 Enzymkinetik

Michaelis-Menten-Modell

Bei der einfachsten von Enzymen katalysierten Reaktion wird ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt (*Uni-Uni-Mechanismus*). Hierfür wurde von Michaelis und Menten (1913) ein kinetisches Modell beschrieben, das in der Folge weiterentwickelt wurde (Briggs und Haldane 1925). Dabei wird angenommen, dass das Substrat (S) und das Enzym (E) einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) bilden und dieser Komplex anschließend zum einen wieder zu Enzym und Substrat dissoziieren kann oder zum anderen das Substrat zum entsprechenden Produkt umgesetzt wird und der Komplex zu Enzym und Produkt (P) dissoziiert. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Reaktion irreversibel ist und keine Rückreaktion möglich ist (siehe Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Reaktionsmodells mit einem Substrat und einem Produkt (*Uni-Uni-Mechanismus*) nach Michaelis-Menten.

Damit lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} , der Substratkonzentration c_S und der Michaelis-Konstante K_m herleiten.

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_S}{K_m + c_S} \quad (3.56)$$

Mit:	v	Reaktionsgeschwindigkeit, mol s ⁻¹
	v_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mol s ⁻¹
	c_S	Substratkonzentration, mol L ⁻¹
	K_m	Michaelis-Konstante, mol L ⁻¹

Die Michaelis-Konstante kann aus den Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen (k) berechnet werden und wird oftmals als Halbsättigungskonstante bezeichnet, da sie die Substratkonzentration darstellt, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird (Segel 1993).

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.57)$$

Mit: k Geschwindigkeitskonstante, s^{-1}

Effektorkinetik

Die Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymen wird oftmals durch niedermolekulare Substanzen, sogenannte Effektoren beeinflusst. Dabei erhöhen Aktivatoren (A) die Reaktionsgeschwindigkeit meist durch eine Veränderung der Konformation des Enzyms, während Inhibitoren (I) die Aktivität des Enzyms auf verschiedene Arten verringern können.

Ein Beispiel hierfür sind reversible Inhibitionen, die in kompetitive, nicht-kompetitive, unkompetitive und partiell-kompetitive Inhibition unterschieden werden (Chmiel 2011). Da in dieser Arbeit lediglich eine kompetitive Hemmung von Enzymen auftritt, soll in der Folge nur auf diesen Fall eingegangen werden.

Von kompetitiver Hemmung wird gesprochen, wenn das Substrat mit einem Inhibitor um das aktive Zentrum konkurriert. Dies wird oft bei Substanzen mit vergleichbarer Struktur beobachtet. Dabei können Substrat und Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, aufgrund sterischer Effekte nur die Bindung von Substrat oder Inhibitor möglich sein oder Substrat und Inhibitor eine zusätzliche, gemeinsame Bindungsstelle aufweisen. Diese Möglichkeiten der kompetitiven Hemmung mit der Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) sind in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt.

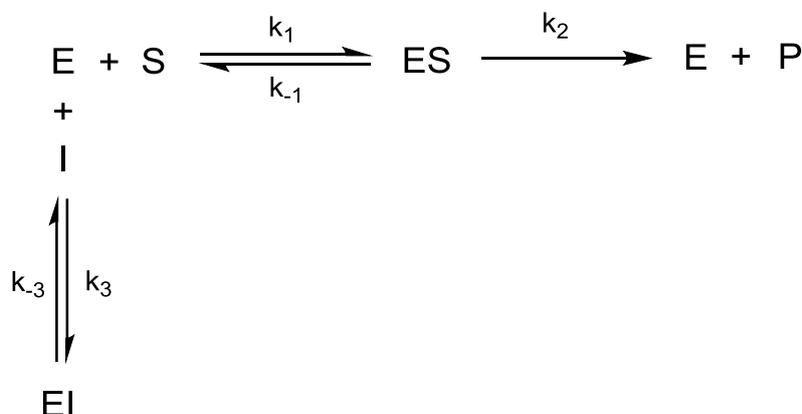


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der kompetitiven Inhibition bei enzymatischen Reaktionen.

Durch das Aufstellen von Massenbilanzen und der Anwendung der Gleichgewichtsannahme erhält man folgende Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit, die im Gegensatz zum Michaelis-Menten-Modell die Konzentration des Inhibitors c_I und die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_3 berücksichtigt (Chmiel 2011).

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_3}\right) + c_S} \quad (3.58)$$

Mit: c_I Konzentration des Inhibitors, mol L⁻¹
 K_3 Dissoziationskonstante von EI, mol L⁻¹

Dabei berechnet sich K_3 aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation k_{-3} und der Assoziation k_3 des Inhibitors an das Enzym (Chmiel 2011).

Reversible Enzymreaktionen

Für die kinetische Beschreibung der meisten enzymkatalysierten Reaktionen sind komplexere Modelle als die Michaelis-Menten-Kinetik nötig. So sind die Umsetzungen meist reversibel, das heißt sowohl das Substrat als auch das Produkt können einen Komplex mit dem Enzym eingehen und umgesetzt werden. Im einfachsten Fall der 1-Substrat-1-Produkt-Reaktion mit reversiblen *Uni-Uni*-Mechanismus muss das Modell nach Michaelis-Menten, wie in Abbildung 3.11 dargestellt, um den Enzym-Produkt-Komplex (EP) und die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten erweitert werden.

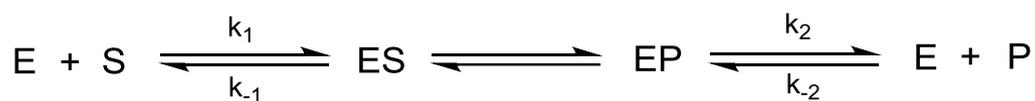


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Ablaufs von reversiblen enzymatischen Reaktionen nach dem *Uni-Uni*-Mechanismus.

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung und Anwendung der Gleichgewichtsannahme ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeit von reversiblen enzymatischen Reaktionen laut Gleichung (3.59) mit der Michaelis-Konstante für die Rückreaktion K_p und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für die Rückreaktion $v_{max,r}$ (Chmiel 2011):

$$v = \frac{v_{max} \cdot c_S - \frac{K_m}{K_p} \cdot v_{max,r} \cdot c_P}{K_m + c_S + \frac{K_m}{K_p} \cdot c_P} \quad (3.59)$$

Mit: K_p Michaelis-Konstante für die Rückreaktion, mol L⁻¹
 $v_{max,r}$ Maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion, mol s⁻¹

Weiter definiert die Gleichgewichtskonstante K_{eq} , unter der Annahme, dass die Umwandlung des Enzym-Substrat-Komplexes zum Enzym-Produkt-Komplex deutlich schneller als die Bildung der Komplexe ist, das Verhältnis der Produktkonzentration $c_{P,eq}$ zur Substratkonzentration $c_{S,eq}$ im Gleichgewicht (Chmiel 2011).

$$K_{eq} = \frac{c_{P,eq}}{c_{S,eq}} \quad (3.60)$$

Mit: K_{eq} Gleichgewichtskonstante, -
 $c_{P,eq}$ Produktkonzentration im Gleichgewicht, mol L⁻¹
 $c_{S,eq}$ Substratkonzentration im Gleichgewicht, mol L⁻¹

Enzymreaktionen mit zwei Substraten

Weiter treten bei vielen enzymkatalysierten Reaktionen zwei Substrate auf. Dabei werden die Umsetzungen anhand der Reihenfolge, in der die Substrate an das Enzym binden, unterschieden. So bindet beim *Ping-Pong*-Mechanismus zunächst ein Substrat an das Enzym und wird in das entsprechende Produkt umgewandelt, das abdissoziiert. Dabei tritt eine Konformationsänderung des Enzyms auf, wodurch das zweite Substrat umgesetzt werden kann, bevor das Enzym wieder die ursprüngliche Konformation annimmt. Beim *Random-Bi-Bi*-Mechanismus hingegen binden beide Substrate in zufälliger Reihenfolge, woraufhin beide Produkte in beliebiger Reihenfolge wieder dissoziieren. Eine weitere Möglichkeit stellt der *Ordered-Bi-Bi*-Mechanismus dar (siehe Abbildung 3.12). Hier muss zunächst ein Substrat an das Enzym binden, bevor sich das zweite Substrat anlagern kann. Entsprechend verläuft auch die Dissoziation der Produkte (Chmiel 2011).

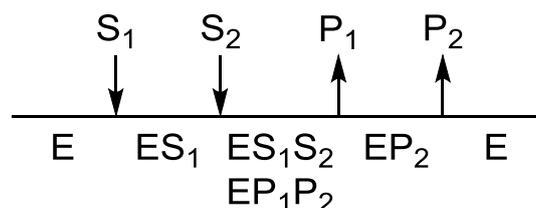


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des *Ordered-Bi-Bi*-Mechanismus bei Enzymreaktionen mit zwei Substraten.

Bei der Bildung von chemischen Bindungen zum Beispiel mittels Lyasen kann sich dieser Ablauf verändern, indem aus zwei Substraten ein Produkt gebildet wird. Dabei existieren auch verschiedene Möglichkeiten. Ein Sonderfall ist der *Ordered-Bi-Uni-Mechanismus* (siehe Abbildung 3.13), bei dem zunächst das erste Substrat einen Komplex mit dem Enzym eingeht, worauf das zweite Substrat binden kann und nach der Umsetzung das Produkt dissoziiert (zum Beispiel Groher und Hoelsch 2012).

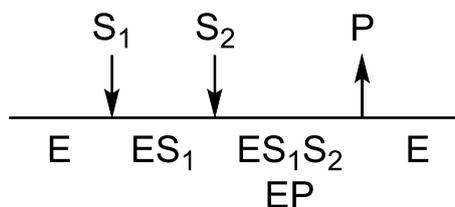


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des *Ordered-Bi-Uni-Mechanismus* bei Enzymreaktionen mit zwei Substraten.

Kinetik von Enzymkaskaden

Unter einer Kaskade von Enzymen werden sequentielle Reaktionen verstanden, bei denen das Produkt eines Enzyms als Substrat für ein anderes Enzym fungiert. Dabei kann man vier verschiedene Gruppen unterscheiden. Bei linearen Kaskaden wird das Substrat enzymatisch in ein oder mehrere Intermediate umgewandelt, woraufhin weitere Reaktionen folgen, die diese sukzessive in das Endprodukt umwandeln. Von orthogonalen Kaskaden spricht man bei Reaktionsfolgen, bei denen Nebenreaktion, zum Beispiel für die Regeneration von Cofaktoren oder die Beseitigung von Nebenprodukten, auftreten. Weiter existieren parallele Kaskaden, bei denen mehrere Reaktionen gleichzeitig ablaufen, die über Cofaktoren oder Cosubstrate miteinander verlinkt sind. Zyklische Kaskaden hingegen werden für die Erhöhung der Konzentration von Substraten verwendet, da hier das Substrat zu einem Intermediat umgesetzt wird, welches dann in der Folge wieder zum initialen Substrat umgewandelt wird (Ricca et al. 2011).

Die Kinetik von Enzymkaskaden ist stark abhängig vom jeweiligen Reaktionstyp. So werden basierend auf dem Gesetz der Massenerhaltung Differenzialgleichungen für sämtliche Teilreaktionen aufgestellt, welche anschließend kombiniert werden können. Diese Gleichungssysteme werden schnell komplexer und sind ab einem gewissen Punkt nicht mehr analytisch lösbar (Welch 1985; Cornish-Bowden 2012).

3.4.2 Betriebsweisen von enzymatischen Prozessen

Nachdem in Kapitel 3.4.1 die Grundlagen der Kinetik enzymatischer Reaktionen dargestellt wurden, soll im Folgenden auf deren technische Nutzung eingegangen werden. Dabei sollen die in Kapitel 3.2 erläuterten Grundlagen idealer Bioreaktoren und deren Stoffbilanzen als Grundlage dienen. Enzymatische Umsetzungen können analog zu mikrobiellen Prozessen in verschiedenen Reaktortypen durchgeführt werden. Dazu zählen die Grenzfälle des idealen Rührkesselreaktors im Satz- oder Zulaufbetrieb, des kontinuierlich betriebenen idealen Rührkesselreaktors und des kontinuierlichen Strömungsrohrs mit Pfropfenströmung, was dem idealen Rohrreaktor entspricht (Chmiel 2011; Faber 2011). Eine Annäherung des Rohrreaktors kann durch das Betreiben von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren in einer Reaktorkaskade erreicht werden (Müller-Erlwein 2015).

Zunächst sollen einige wichtige Prozessgrößen eingeführt werden, die die Effizienz einer enzymatischen Umsetzung charakterisieren. Dazu zählt der Umsatz des Substrates $X(t)$, der sich in Abhängigkeit der initialen, molaren Substratkonzentration $c_{S,0}$ und der molaren Substratkonzentration zum Zeitpunkt t $c_S(t)$ berechnet.

$$X(t) = \frac{c_{S,0} - c_S(t)}{c_{S,0}} \cdot 100 \% \quad (3.61)$$

Mit:

- $X(t)$ Umsatz zum Zeitpunkt t , %
- $c_{S,0}$ Initiale Substratkonzentration, mol L⁻¹
- $c_S(t)$ Substratkonzentration zum Zeitpunkt t , mol L⁻¹

Das Verhältnis der Differenz der molaren Produktkonzentration zum Zeitpunkt t $c_P(t)$ und der initialen, molaren Produktkonzentration $c_{P,0}$ zur initialen, molaren Substratkonzentration stellt die Ausbeute (*yield*) $Y(t)$ dar.

$$Y(t) = \frac{c_P(t) - c_{P,0}}{c_{S,0}} \cdot 100 \% \quad (3.62)$$

Mit:

- $Y(t)$ Ausbeute zum Zeitpunkt t , %
- $c_P(t)$ Produktkonzentration zum Zeitpunkt t , mol L⁻¹

Die Effizienz des gesamten Prozesses wird oftmals durch die Raum-Zeit-Ausbeute beschrieben. Diese Parameter können neben der erreichten Produktkonzentration zum Vergleich verschiedener Betriebsweisen von enzymatischen Prozessen verwendet werden, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

Ideale Reaktoren für enzymatische Prozesse

Der Satzreaktor weist weder einen Zu- noch einen Abfluss auf und wird zu Beginn der Reaktion mit allen Reaktanden befüllt, woraufhin die Reaktion durch die Zugabe von Enzym oder Substrat gestartet wird. Die Reaktion kann entweder mit der Inaktivierung des Enzyms oder durch eine Abtrennung des Enzyms mittels Filtration beendet werden. Dabei startet die Reaktion bei hohen Substrat- und niedrigen Produktkonzentrationen während zum Prozessende ein umgekehrtes Verhältnis vorliegt (Chmiel 2011). Somit stellt sich im Satzreaktor kein stationärer Zustand ein. Eine Erweiterung des Satzreaktors um einen Substratzulauf kann beispielsweise beim Auftreten von Substratinhibition auf das Enzym die erreichbaren Raum-Zeit-Ausbeuten steigern (Faber 2011).

In einem kontinuierlich betriebenen idealen Rührkesselreaktor treten keine Konzentrationsgradienten im Reaktor auf und es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein. Damit entsprechen die Konzentrationen aller Substanzen im Reaktor den Konzentrationen im Ablauf. So kann durch die Vorgabe einer definierten Verweilzeit ein gewünschter Umsatz eingestellt werden (Chmiel 2011).

Im Fall des idealen Rohrreaktors bewegt sich die Reaktionslösung pfropfenförmig durch das Strömungrohr, wobei sich weder laminare oder turbulente Strömungsprofile ausbilden, noch eine Rückvermischung auftritt. Damit verweilt jedes Flüssigkeitselement für die gleiche Zeit im Reaktor. So kann jedes Volumenelement vereinfachend als Satzreaktor betrachtet werden, der sich mit definierter Geschwindigkeit durch das Rohr bewegt. Die Reaktionszeit entspricht so der mittleren Verweilzeit im Strömungrohr. Somit ist die mathematische Beschreibung des idealen Rohrreaktors äquivalent zum idealen Rührkesselreaktor im Satzbetrieb. Dabei wird lediglich die Reaktionszeit t durch die Verweilzeit τ ersetzt, wodurch sich die Konzentrationen nicht über die Zeit sondern über den Ort des Rohrreaktors verändern (Chmiel 2011). Wie in Kapitel 3.2 beschrieben lässt sich durch eine Kaskade aus N idealen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren ein ideales Strömungrohr annähern (Müller-Erlwein 2015).

Reaktorwahl

Vor der Entwicklung eines enzymatischen Prozesses sollte eine geeignete Reaktorkonfiguration gewählt werden. Die grundlegenden Überlegungen sollen im Folgenden dargelegt werden. Dabei ist zu beachten, dass sich der Satzreaktor und der ideale Rohrreaktor unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Enzymkinetik gleich verhalten. So ist die Rüstzeit des Satzreaktors die entscheidende Größe, die die Wahl zwischen diesen beiden Reaktortypen beeinflusst (Chmiel 2011).

Bei starker Substratinhibition kann der Satzreaktor um einen Substratzulauf erweitert werden, um den Prozess zu verbessern (Faber 2011). Allerdings bietet der kontinuierlich betriebene

Rührkesselreaktor hier ebenfalls einen Vorteil gegenüber dem Satz- und Rohrreaktor, da im Reaktor die Konzentrationen der Reaktanden den Konzentrationen im Auslauf entsprechen und so deutlich niedrigere Substratkonzentrationen vorliegen. Damit sind im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor jedoch zeitunabhängig auch hohe Produktkonzentrationen vorhanden, was im Falle der Produktinhibition negative Auswirkungen auf den Prozess hat. So ist in diesem Fall ein Satz- oder Rohrreaktor vorzuziehen, da hier nur zum Prozessende beziehungsweise am Reaktorausgang hohe Produktkonzentrationen vorliegen und die Reaktionsgeschwindigkeit zum Prozessbeginn beziehungsweise am Reaktoreingang nicht durch die Produktinhibition verringert wird (Chmiel 2011).

Des Weiteren sind Satz- beziehungsweise Rohrreaktoren für das Erreichen hoher Produktkonzentrationen und Umsätze bei Reaktionen ohne Substratinhibition besser als der kontinuierliche Rührkesselreaktor geeignet, da die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt, je näher sich die Reaktion dem thermodynamischen Gleichgewichtszustand annähert. Während im Satz- und Rohrreaktor die Reaktionsgeschwindigkeit nur zum Prozessende beziehungsweise am Reaktorausgang deutlich abnimmt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit im kontinuierlichen Rührkesselreaktor durch die Einstellung eines Fließgleichgewichts zeitlich konstant. So müssen für hohe Umsätze, die nahe am thermodynamischen Gleichgewicht liegen, höhere Enzymkonzentrationen eingesetzt werden oder die Verweilzeit deutlich verlängert werden (Chmiel 2011).

Falls das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion ungünstig auf der Seite der Edukte liegt, kann eine selektive Produktabtrennung den Umsatz steigern (Liese et al. 1996). Dies kann über *in-situ* Produktabtrennung mit einer zweiten Phase (Faber 2011) oder über spezielle Membranen, die lediglich das Produkt nicht aber das Substrat und Enzym passieren lassen, erreicht werden (Chmiel 2011).

Enzym-Membran-Reaktoren

Ein wichtiger Kostenfaktor für industrielle Enzymprozesse ist die Bereitstellung der benötigten Enzyme, wodurch der wiederholte Einsatz der Biokatalysatoren für ökonomisch sinnvolle Prozesse oftmals von hoher Bedeutung ist (Tufvesson et al. 2011). Neben verschiedenen Immobilisierungsmethoden können die Enzyme durch Filtration über spezielle Membranen zurückgehalten werden. Die Membranen können entweder diffusiv oder konvektiv betrieben werden. Im Diffusionsreaktor wird der Zulauf mit dem Substrat an der Membran vorbeigeleitet und das Substrat diffundiert in den Reaktionsraum mit Enzymen, während das gebildete Produkt in den Ablauf übergeht. Diese Konfiguration ist vor allem bei scherempfindlichen Biokatalysatoren von Vorteil, liefert allerdings nur geringe Produktivitäten, da es sich bei der Diffusion um einen sehr langsamen Prozess handelt (Chmiel 2011).

Hohe Produktivitäten können somit nur mit konvektiv betriebenen Membran-Reaktoren erreicht werden. Um ausreichende Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen, werden hier oftmals hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt, wodurch der mögliche Transmembranfluss durch Deckschichtbildung relativ gering ist. Deshalb werden oftmals separate Membranmodule außerhalb des Reaktors mit hoher Membranfläche eingesetzt. Für diesen Zweck eignet sich insbesondere die Filtration mit Ultrafiltrationsmembranen, die eine Porengröße von 2 nm bis 200 nm aufweisen (Kraume 2012). Sie sind in der Regel aus einer dünnen Trennschicht und einer stabilen Trägerschicht mit größeren Poren aufgebaut. So können Proteine mit einem Druckverlust von maximal 10 bar zurückgehalten werden (Kraume und Peters 2005), während wässrige Lösungen mit Zuckern, Salzen und kleinen Molekülen die Membran passieren können (Kraume 2012). Ultrafiltrationsmembranen werden durch ihren *cut-off* (MWCO) charakterisiert, der das Molekulargewicht (MW) von Substanzen darstellt, die von der Membran je nach Definition zu 90 % beziehungsweise 95 % zurückgehalten werden. Die Retention R wird nach Gleichung (3.63) in Abhängigkeit der Konzentration der zu filtrierenden Substanz im Permeat c_{Per} und der Konzentration im Retentat c_{Ret} berechnet.

$$R = \left(1 - \frac{c_{Per}}{c_{Ret}}\right) \cdot 100 \% \quad (3.63)$$

Mit:	R	Retention, %
	c_{Per}	Konzentration im Permeat, g L ⁻¹
	c_{Ret}	Konzentration im Retentat, g L ⁻¹

Ultrafiltrationsmembranen weisen eine hohe Stabilität in einem breiten pH-Bereich (pH 1 – 14) und gegenüber hohen Temperaturen bis zu 95 °C auf (Dijkstra et al. 2002; Melin und Rautenbach 2007). Durch die Rückhaltung der Enzyme kann eine kontinuierliche Prozessführung mit Verweilzeitkopplung realisiert werden (Kraume und Peters 2005). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass für lange Prozesszeiten eine ausreichende Retention erreicht werden muss. Eine Retention von 95 % führt so zu einem fast vollständigen Verlust des Enzyms nach 100 Verweilzeiten, wohingegen bei einer Retention von 99,99 % die Konzentration des Biokatalysators nahezu konstant bleibt (Lütz et al. 2005).

Es wurden zahlreiche Prozesse mit allen Klassen an Enzymen in Enzym-Membran-Reaktoren beschrieben (Kragl et al. 1991; Liese et al. 2005; Hildebrand et al. 2007; Merz et al. 2015; Rodríguez Gastón et al. 2015). Dabei können auch Multi-Enzymreaktionen durchgeführt werden (Kragl et al. 1991; Wichmann et al. 2000). Es ist jedoch anzumerken, dass für die Mehrzahl der Prozesse Hydrolasen eingesetzt wurden. Dies kann unter anderem durch deren Eigenschaft Reaktionen ohne den Verbrauch von Cofaktoren zu katalysieren erklärt werden. Cofaktoren sind sehr teuer und instabil (Gröger et al. 2012) und müssen gegebenenfalls per

Nanofiltration im Reaktor zurückgehalten werden oder chemisch an größere Moleküle gebunden werden, um ein Auswaschen zu verhindern (Kragl et al. 1992; Lütz et al. 2005).

Im Gegensatz zu den häufig beschriebenen enzymatischen Synthesen in Enzym-Membran-Reaktoren sind nur wenige Prozesse mit Enzymen in Kaskaden von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren bekannt. So stellten Jandel et al. (1982) L-Alanin mit einem Zweienzymsystem her, bei dem die beiden Enzyme deutlich unterschiedliche pH-Optima aufwiesen. Durch die räumliche Trennung der Biokatalysatoren in zwei Reaktoren, die sequentiell mit den jeweils optimalen Reaktionsbedingungen betrieben wurden, konnten ausreichende Produktkonzentrationen erreicht werden.

Ein Vergleich der L-*tert*-Leucin Produktion im Satzbetrieb, im kontinuierlichen Betrieb und in einer Kaskade aus zwei Reaktoren zeigte aufgrund der starken Produktinhibition deutlich erhöhte Raum-Zeit-Ausbeuten im Satzverfahren und der Kaskade (Kragl et al. 1996).

Einen weiteren positiven Effekt bei der Verwendung von Reaktorkaskaden konnten Liese und Kragl (2013) zeigen, da der Enantiomerenüberschuss bei der Hydrolyse eines Esters eine steigende Tendenz mit der Erhöhung der Reaktoren der Kaskade zeigte und so das Verhalten im Strömungsrohr angenähert werden konnte.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die gewählte Reaktorkonfiguration einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Leistung enzymatischer Prozesse aufweist und so für jeden Produktionsprozess individuell die optimale Betriebsweise gewählt werden muss.

3.4.3 Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure

N-Acetyl-D-Neuraminsäure

Sialinsäuren stellen eine vielseitige Familie der α -Ketosäuren mit einem Rückgrat aus neun Kohlenstoffatomen dar (Schauer 1991; Angata und Varki 2002). Sie treten typischerweise an der terminalen Position von Glycanketten auf, die auf der Zelloberfläche von vielen Eukaryoten an Glycoproteinen und Glycolipiden exponiert sind. Sie besitzen eine wichtige Funktion für viele biologische Vorgänge, wie Zellerkennung und -adhäsion oder bakterielle beziehungsweise virale Infektionen (Schauer 1991; Traving und Schauer 1998; Gorelik et al. 2001; Itzstein 2007). Von den mehr als 50 Formen tritt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) am häufigsten auf (Angata und Varki 2002). Aufgrund ihrer wichtigen Rolle in vielen (patho)physiologischen Prozessen, ist Neu5Ac ein wichtiger Ausgangsstoff für die Herstellung zahlreicher pharmakologisch aktiver Moleküle. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Zanamivir, der bei der Behandlung von Influenzaviren verwendet wird (Itzstein 2007). Weiter

wird Neu5Ac in der Lebensmittelindustrie als Zusatz für Säuglingsnahrung verwendet, um das Wachstum des Gehirns zu unterstützen (Wang und Brand-Miller 2003).

Ansätze zur Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure

Aus dem vielfältigen Einsatz von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure leitet sich ein hoher Bedarf und damit die Notwendigkeit der Entwicklung von effizienten Herstellungsverfahren ab. Bislang wurden verschiedene Methoden wie die Isolation aus natürlichen Substanzen, chemische Synthesen und biotechnologische Prozesse entwickelt, die in der Folge beschrieben werden sollen.

Neu5Ac kann aus verschiedenen Rohmaterialien wie Weizen, Vogeleiern und Vogelnestern gewonnen werden. Da die Konzentration von Neu5Ac in diesen Substanzen vergleichbar gering ist und sich somit die Isolation und Aufreinigung als sehr kostenintensiv und ineffizient darstellt, ist diese Methode für die industrielle Herstellung von Neu5Ac nicht geeignet (Maru et al. 2002; Tao et al. 2010).

Die organische Synthese von Neu5Ac wird von einigen Firmen derzeit industriell eingesetzt. Dabei kann unter anderem eine Kondensation von *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und Oxaloacetat unter basischen Bedingungen und die folgende Decarboxylierung des Kondensationsproduktes genutzt werden. Dabei müssen allerdings Schutzgruppen eingefügt werden und es entstehen Nebenprodukte, die die Produktaufarbeitung erschweren (Tao et al. 2010). Des Weiteren kann Neu5Ac durch die Hydrolyse von Kolominsäure, einem Homopolymer aus α -2,8-verknüpften *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure Monomeren aus *Escherichia coli*, hergestellt werden. Die Aufreinigung von Kolominsäure erfordert jedoch eine Vielzahl an Prozessschritten und verringert so die Wirtschaftlichkeit des Herstellungsverfahrens (Uchida et al. 1973). Generell findet die chemische Synthese von Neu5Ac unter hohen Temperaturen und dem Einsatz großer Volumina von Lösungsmitteln statt. Des Weiteren sind die Endprodukte nicht enantiomerenrein, was einen direkten Einsatz als pharmakologische Wirkstoffe ohne eine weitere Aufreinigung verhindert (Tao et al. 2010).

N-Acetyl-D-Neuraminsäure kann aus einer Kombination von chemischen und enzymatischen Umsetzungen gewonnen werden. Dabei wird für die enzymkatalysierte Reaktion in der Regel die teure Substanz *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) verwendet (Groher und Hoelsch 2012). Diese kann durch baseninduzierte Epimerisierung aus GlcNAc hergestellt werden. Damit können ungefähr 20 % ManNAc aus GlcNAc gewonnen werden. Neben der geringen Ausbeute sind der Bedarf an starken Basen und die anschließende Aufreinigung von ManNAc weitere Nachteile dieser Methode (Simon et al. 1988). Tsukada und Ohta (1995) kombinierten die baseninduzierte Epimerisierung mit der durch eine *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) katalysierten Aldolkondensation von ManNAc und Pyruvat unter alkalischen Bedingungen (pH

10,5) und konnten so etwa 40 % des eingesetzten *N*-Acetyl-D-Glucosamin in *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure umwandeln. Die bei hohem pH instabile NAL konnte durch die Zugabe von Substrat im Überschuss stabilisiert werden (Maru et al. 2002).

Mit dem Einsatz des Enzyms *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) konnten Ghosh und Roseman (1965) erstmals die biokatalytische Umsetzung von GlcNAc zu ManNAc verwirklichen. Allerdings liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite des Eduktes GlcNAc ($K_{eq} = 0,26$). Eine Steigerung der Ausbeute kann durch die Kombination von zwei Enzymen erreicht werden, um das entstandene ManNAc wieder aus dem Gleichgewicht abzuziehen. Für die enzymatische Herstellung von Neu5Ac aus ManNAc sind zwei Möglichkeiten beschrieben. Die Umsetzung kann zum einen mit einer *N*-Acetylneuraminat-Synthase (EC 4.1.3.19) mit Phosphoenol als zweitem Edukt erfolgen (Vann et al. 1997). Zum anderen können ManNAc und Pyruvat mit einer Neu5Ac Aldolase (auch als *N*-Acetylneuraminat-Lyase, EC 4.1.3.3 bekannt) zu Neu5Ac reagieren (Groher und Hoelsch 2012). Dabei wird die NAL bevorzugt, da Pyruvat kostengünstiger und besser verfügbar als Phosphoenolpyruvat ist. So stellten Kragl et al. (1991) einen kombinierten Prozess in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren vor. Bei der Epimerisierung sowie der Aldolkondensation liegt jedoch das Reaktionsgleichgewicht auf der Eduktseite. Deshalb wird versucht mit einem Überschuss an Pyruvat das Gleichgewicht in Richtung der Neu5Ac-Synthese zu verschieben. So konnten Zimmermann et al. (2007) mit einem 10-fachen Überschuss an Pyruvat im Vergleich zu GlcNAc einen Umsatz von 85 % erreichen. Es wurde jedoch eine Inhibition der humanen AGE (Lee et al. 2004) und der AGE aus *Anabaena sp.* CH1 durch Pyruvat nachgewiesen (Lee et al. 2007a). So konnten Maru et al. (1998) die Ausbeute der biokatalytischen Produktion von Neu5Ac aus GlcNAc mit einem Pyruvatlauf auf 77 % steigern. Der größte Nachteil der biokatalytischen Produktion von Neu5Ac ist jedoch die nötige Aktivierung der Epimerisierung durch ATP (Lee et al. 2007a).

So wird *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure derzeit größtenteils chemoenzymatisch hergestellt, jedoch wurden auch schon ausschließlich enzymatische Prozesse implementiert (Liese et al. 2006). Des Weiteren wurden in letzter Zeit auch neue Ansätze zur Ganzzellbiotransformation entwickelt, wodurch der Cofaktor ATP von den Zellen bereitgestellt wird. Allerdings kann dabei eine Stofftransportlimitierung über die Zellwand auftreten und die Bioproduktbearbeitung durch Nebenprodukte und weitere Metabolite deutlich aufwendiger werden (Lee et al. 2007a; Tao et al. 2010; Kang et al. 2012). Trotz aller Bemühungen ist die Synthese von Neu5Ac immer noch sehr teuer und eine Optimierung der bestehenden Herstellungsverfahren ist nötig (Tao et al. 2010).

Verwendete Enzyme

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure aus *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat ein Zweienzymsystem aus einer *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und einer *N*-Acetylneuraminat-Lyase verwendet.

Das in dieser Arbeit für die Herstellung von Neu5Ac verwendete Enzym AGE (EC 5.1.3.8) wird als Isomerase klassifiziert. Weiter zählt es zu den Racemasen/Epimerasen, welche die Struktur von Molekülen durch die Umkehrung der Stereochemie verändern. Im Speziellen handelt es sich dabei um eine Racemase/Epimerase, die Kohlenhydrate umsetzt.

In dieser Arbeit wurde eine AGE aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 mit einem Molekulargewicht von 42 kDa eingesetzt, die eine zehnfach erhöhte Inhibitionskonstante gegenüber Pyruvat aufweist, um den Effekt der Inhibition zu reduzieren. Des Weiteren zeigt dieses Enzym die höchste katalytische Effizienz für diese Art von Epimerasen mit GlcNAc als Substrat (Klermund et al. 2013). Bei der katalysierten Reaktion handelt es sich um eine 1-Substrat-1-Produkt-Reaktion, die nach einem reversiblen Uni-Uni-Mechanismus abläuft (Abbildung 3.14).

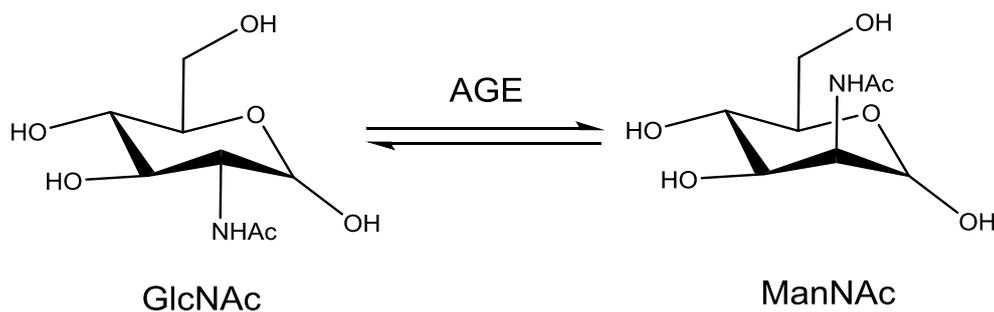


Abbildung 3.14: Isomerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) mit dem Enzym *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE).

Es können sowohl GlcNAc als auch ManNAc einen aktivierten Enzym-Substrat-Komplex bilden und in das jeweils andere Stereoisomer umgewandelt werden. Lee et al. (2007b) schlugen zwei Histidine im aktiven Zentrum als Säure-Base-Katalysatoren für die Stabilisierung des Übergangszustandes vor. Dabei wird das Substrat linearisiert und das C-2 Atom abgetrennt, wodurch ein geladener und instabiler Übergangszustand entsteht. In folgenden Schritten wird ein Proton eingefügt, was in einer Änderung der Stereoisomerie des Kohlenhydrates resultieren könnte.

Das Enzym weist eine hohe Stabilität bei den optimalen Reaktionsbedingungen mit einer Temperatur von 30 °C und pH 7,5 auf (Klermund et al. 2013). Allerdings wird das Enzym durch das für die folgende Aldolkondensation notwendige Pyruvat inaktiviert. Diese Inaktivierung kann durch eine erhöhte Zugabe des allosterischen Aktivators ATP reduziert werden, was

darauf schließen lässt, dass Pyruvat die ATP-Bindestelle der AGE modifiziert. Um die Stabilität des Enzyms für lange Prozesse in Enzym-Membran-Reaktoren zu gewährleisten, wurde eine am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik erstellte Mutante mit einem Aminosäureaustausch von Lysin zu Isoleucin an der Position 160 verwendet. Diese zeigt neben einer deutlich verringerten Inaktivierung durch Pyruvat jedoch auch eine niedrigere Aktivität (persönliche Mitteilung, Ludwig Klermund, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, am 01.06.2015). Des Weiteren wird die AGE kompetitiv durch Pyruvat und das Endprodukt der Zweienzymreaktion Neu5Ac inhibiert (Klermund et al. 2013), weshalb sich als Reaktionssystem für die effiziente kontinuierliche Herstellung von Neu5Ac mit diesen beiden Enzymen ein Strömungsrohr beziehungsweise eine Kaskade von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren eignen sollte. Daneben könnten durch eine räumliche Trennung der Enzyme beide Inhibitionen umgangen werden. Allerdings muss für eine effiziente Herstellung von Neu5Ac das Zwischenprodukt ManNAc aus dem Gleichgewicht der ersten Reaktion entzogen werden, da das Gleichgewicht der von AGE katalysierten Reaktion auf der Seite des Edukts liegt (Klermund et al. 2013). Eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung von ManNAc durch die Erhöhung des pH hätte eine Reduktion der Aktivität der für die folgende Aldolkondensation eingesetzten NAL zur Folge (Uchida et al. 1984).

Beim zweiten Enzym NAL (EC 4.1.3.3) handelt es sich um eine Lyase, genauer um eine Oxosäure-Lyase, die chemische C-C-Bindungen ohne den Einsatz von Wasser spaltet. Für die reversible Aldolkondensation von Pyruvat und ManNAc zu Neu5Ac (siehe Abbildung 3.15) mit dem Enzym NAL aus *E. coli* K12 mit einem Molekulargewicht von 35 kDa wurde von Groher und Hoelsch (2012) ein *Ordered-Bi-Uni*-Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem zunächst Pyruvat an das Enzym bindet. Das Temperaturoptimum wurde bei 30 °C bestimmt. Das ungünstige Reaktionsgleichgewicht ($K_{eq} = 2,49 \pm 1,65 \text{ L mol}^{-1}$) kann durch eine Erhöhung der Pyruvatkonzentration oder eine Absenkung der Temperatur in Richtung des Produktes verschoben werden (Kragl et al. 1991).

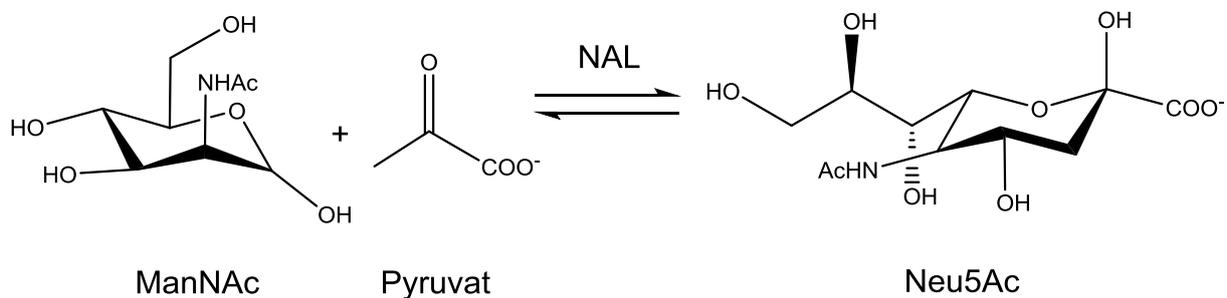


Abbildung 3.15: Aldolkondensation von *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) und Pyruvat zu *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) mit dem Enzym *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL).

4 Material und Methoden

Im Folgenden wird ein Überblick über die während dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden gegeben.

4.1 Allgemeines Material

Alle Materialien, die üblicherweise in biotechnologischen Arbeiten verwendet werden, sind im Anhang aufgeführt. Hierzu zählen die verwendeten Geräte und speziellen Verbrauchsmaterialien (Anhang A1), Chemikalien (Anhang A2), Materialien für molekularbiologische Arbeiten (Anhang A3), Standards und Tests (Anhang A4) sowie Medien und Lösungen (Anhang A5). Spezielle Materialien, die explizit erwähnt werden sollen, sind in Kapitel 4.2 zusammengefasst

4.2 Spezielle Materialien

4.2.1 Mikroorganismen, Stammhaltung und Vektoren

Mikroorganismen und Vektoren

Für Klonierungen und Plasmidvervielfältigungen bei der mikrobiellen Herstellung von PAmCherry (*photoactivatable* mCherry, fotoaktivierbares mCherry) wurde mit *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α gearbeitet. Zur Identifikation der Wachstumskinetik und rekombinanten Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) eingesetzt. Als Vektor wurde pET28a(+) mit einer Kanamycin-Resistenz verwendet, der das heterologe Gen für PAmCherry aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pPACherry (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) trug. Der resultierende Stamm soll in der Folge als *E. coli* PAmCherry bezeichnet werden.

Für die Herstellung der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE K160I) und der *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) zur enzymatischen Produktion von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure wurde ebenfalls der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) mit einem pET28a(+)-Vektor verwendet, der die heterologen Gene für AGE K160I beziehungsweise NAL trug. Bei der AGE K160I handelt es sich um eine Variante des Wildtyp-Enzyms mit einer erhöhten Stabilität gegenüber Pyruvat (persönliche Mitteilung, Ludwig Klermund, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, am 01.06.2015). Da in dieser Arbeit nur die Variante AGE K160I verwendet wurde, wird sie in der Folge als AGE bezeichnet. Für die effiziente Herstellung dieses Enzyms wurde das Chaperonsystem GroEL/ES eingesetzt, das auf einem pGro7-Vektor mit einer Chloramphenicol-Resistenz codiert war und ebenfalls in den

entsprechenden *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) eingebracht wurde (Klermund et al. 2015). Die Stämme waren als Stammkulturen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik vorrätig und werden in der Folge als *E. coli* AGE und *E. coli* NAL bezeichnet.

Die Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme können Tabelle 4.1 entnommen werden.

Tabelle 4.1: Genotypen der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 rec-A1 relA1 gyrA96 deoR nup G</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r κ^+ -m κ^+), λ -Tet ^r <i>D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F ⁻ <i>dcm opmT hsdS(rBmB) gal</i> λ (DE3)

Für initiale Untersuchungen von Hochzelllichtprozessen wurde der *Komagataella pastoris* (*K. pastoris*) DSM70382 Wildtyp-Stamm (Mut⁺) ohne genetische Modifikationen eingesetzt.

Die extrazelluläre Herstellung von *Candida antarctica* Lipase B2 (CaL-B2) erfolgte mit dem von W42 Industrial Biotechnology (Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellten *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) Stamm W42-A/pWL3-1 (W42-19) (Mut⁺). Hierfür wurde ein pWL-Vektor mittels homologer Rekombination genomisch in den P_{aox1}-Lokus von *P. pastoris* W42-A aus der Stammsammlung von W42 Industrial Biotechnology integriert, der die Resistenzen für Zeocin und Ampicillin sowie den Replikationsursprung pBR322ori, den Promotor P_{aox1} und eine Transkriptions-Terminationssequenz (AOX1TT) trägt. Vor der genomischen Integration des Vektors wurde das Gen für CaL-B2 in das Plasmid kloniert. Bei CaL-B2 handelt es sich um eine Variante der *Candida antarctica* Lipase B, die durch den Austausch von vier Aminosäuren charakterisiert ist und so im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine ungefähr 2-fach erhöhte Aktivität gegenüber den Substraten *p*-Nitro-phenol Butyrat und Tributyrin aufweist (persönliche Mitteilung Ansgar Stratmann, W42 Industrial Biotechnology GmbH, am 16.03.2016). Dieser Stamm soll im Folgenden mit *P. pastoris* CaL-B2 abgekürzt werden.

Stammhaltung

Zur Herstellung von *E. coli*- und *K. pastoris*-Stammkulturen wurden 50 mL *Lysogeny Broth* (LB) beziehungsweise Hefeextrakt-Pepton (YP) Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle in 500 mL Schüttelkolben mit einer Kolonie des jeweiligen Stammes oder mit 100 μ L einer früheren Stammkultur beimpft. Das Wachstum erfolgte bei 250 U min⁻¹ und 37 °C für *E. coli* und 200 U min⁻¹ und 30 °C für *K. pastoris* bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von etwa OD₆₀₀ = 1. Die Kulturen wurden anschließend im Verhältnis 4 : 1 mit einer 60 %igen (Verhältnis

des Gewichtanteils bezogen auf das Volumen (w/v)) Glycerinlösung versetzt und zu je 1 mL in sterilen Kryoröhrchen aliquotiert. Die Stammkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Computerprogramme

Für die Verwaltung und Bearbeitung von Gen- und Proteinsequenzen sowie für den Vergleich von Gensequenzen wurde das Programm GENTle 1.9.4 (<http://gentle.magnusmanske.de/>) verwendet.

Für die Auswertung von Messdaten wurde das Programm Microsoft® Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet.

Für die Präsentation von Messdaten diente das Programm SigmaPlot 12.3 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

Alle weiteren Computerprogramme, die für spezielle Anwendungen eingesetzt wurden, sind im jeweiligen Kapitel genannt.

4.3 Verwendete Bioreaktoren

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Erweiterung von bestehenden parallelen Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab (bioREACTOR 48) für verschiedene mikrobielle und enzymatische Prozesse. Dabei wurde die kontinuierliche Zufuhr von flüchtigen Substraten über die Gasphase, die kontinuierliche Betriebsweise für Fließgleichgewichtsuntersuchungen und die Rückhaltung von Enzymen im Milliliter-Maßstab etabliert. Die in den miniaturisierten Bioreaktoren entwickelten mikrobiellen Beispielprozesse wurden in der Folge auf den Laborbeziehungswise Pilotmaßstab übertragen. Die Bioreaktoren, die hierfür Verwendung fanden, sowie die Modifikationen für die kontinuierliche Prozessführung im Labormaßstab, werden in der Folge beschrieben. Auf die implementierten Erweiterungen des bioREACTOR 48 wird in den Kapiteln 5 – 8 eingegangen.

4.3.1 Parallele Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

Bei den in dieser Arbeit verwendeten parallelen Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab handelt es sich um den bioREACTOR 48 (Abbildung 4.1), der kürzlich von der Firma 2mag (München, Deutschland) kommerzialisiert wurde. Eine detaillierte Auflistung der Gerätekomponenten kann Tabelle A.5 entnommen werden.

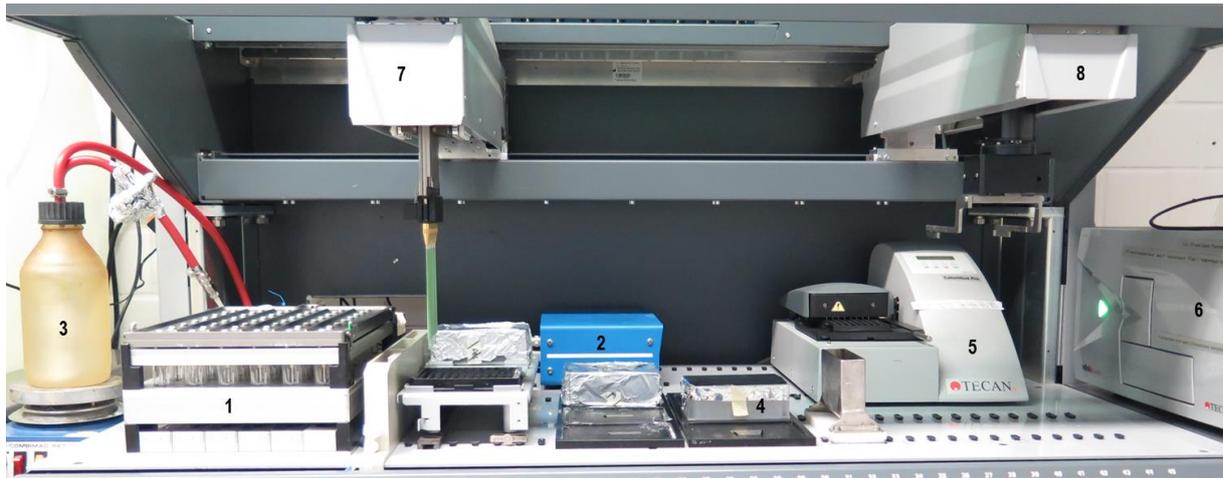


Abbildung 4.1: Aufbau des bioREACTOR 48: (1) Miniaturisierte Bioreaktoren, (2) Steuergerät der gasinduzierenden Rührkörper, (3) Flasche zur Aufsättigung der Zuluft mit Wasser, (4) Vorlagegefäß für Titrationsmittel oder Substratlösungen, (5) MTP-Waschstation, (6) MTP-Photometer, (7) Pipettierarm, (8) Robotergreifarm.

Der Bioreaktorblock besteht aus 48 parallelen Einweg-Rührkesselreaktoren mit Strömungsbrechern aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 20 mm und einem Arbeitsvolumen von 8 – 15 mL. Zur Durchmischung und dem Eintrag der Gasphase wurden gasinduzierende Rührer eingesetzt (Puskeiler et al. 2005a; Hortsch und Weuster-Botz 2010). Die Bioreaktoren können in einen Laborroboter integriert werden, der mit einem Pipettier- und Robotergreifarm, einem Photometer für Mikrotiterplatten (MTP) sowie einer MTP-Waschstation ausgerüstet ist. Die acht teflonbeschichteten Pipettierspitzen des Laborroboters werden für die intermittierende Zugabe von Titrationsmitteln zur pH-Regelung und von Substratlösungen für Zulaufverfahren sowie für *atline*-Messungen, wie zum Beispiel der Bestimmung der optischen Dichte, verwendet. Der Robotergreifarm transportiert dabei die MTP-Platten auf der Arbeitsfläche. Entsprechend verdünnte Proben können so im MTP-Photometer vermessen und die MTP-Platten anschließend in der MTP-Waschstation gereinigt werden.

Der Bioreaktorblock ist mit einem – über ein Steuergerät geregelten – magnetisch-induktiven Antrieb für die Rührkörper und zwei Wärmetauschern für die Temperaturkontrolle der Reaktoren und für die Kühlung des Kopfraumes zur Reduktion der Verdunstung ausgestattet. Die steril gelieferten Bioreaktoren werden in den Bioreaktorblock eingesetzt und mit einer autoklavierbaren Sterilgasabdeckung verschlossen. In dieser Abdeckung sind Hohlräume für gasinduzierende Rührer angebracht, in welche Dauermagneten verbaut sind. Durch die Drehung der Rührkörper mittels magnetisch-induktivem Antrieb wird über die Hohlachse Medium aus dem Reaktor und Gas aus dem Kopfraum angesaugt und im Reaktormedium dispergiert. Damit können hohe Sauerstofftransferaten mit einem maximalen $k_L a$ von $0,4 \text{ s}^{-1}$

realisiert werden (Puskeiler et al. 2005a). Zudem sind Öffnungen für die Pipettieradeln in die Sterilgasabdeckung integriert. Der Kopfraum eines jeden Reaktors wird über die Abdeckung individuell mit Prozessgas versorgt, welches über die Pipettieröffnungen entweichen kann, wodurch Kontaminationen vermieden werden. Dabei kann die Versorgung mit verschiedenen Gasmischungen bestehend aus Druckluft, Sauerstoff, Stickstoff oder Kohlenstoffdioxid über eine Gasmischstation realisiert werden.

Die miniaturisierten Einweg-Bioreaktoren sind am Reaktorboden mit fluorometrischen Sensoren zur Messung von pH und Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ausgestattet, welche über entsprechende Sensorriegel ausgelesen werden können. Die Messung der beiden Prozessparameter erfolgt über die sogenannte *Dual-Lifetime-Referencing* (DLR) Methode (Kusterer et al. 2008; Janzen et al. 2015). Dafür ist eine Kombination zweier Fluoreszenzfarbstoffe (Luminophore) in die Sensoren eingeschlossen. Der erste Luminophor fungiert dabei als Referenz, da sein Signal unabhängig vom aktuellen Wert des Prozessparameters ist. Er weist eine lange Abklingzeit auf und erzeugt somit ein konstantes Hintergrundsignal. Der zweite Luminophor ist sensitiv gegenüber dem Prozessparameter und weist eine kurze Abklingzeit auf. Beide Luminophore zeigen überlappende Absorptions- und Emissionsspektren und können so bei denselben Wellenlängen angeregt und ausgelesen werden. Das Antwortsignal zeigt so abhängig vom aktuellen Prozessparameter eine Phasenverschiebung, die für die Messung des pO_2 linear und bei der Bestimmung des pH sigmoidal zum jeweiligen Prozessparameter korreliert werden kann.

Janzen et al. (2015) konnten zeigen, dass mit zunehmender Zelldichte eine Verfälschung der pH-Messung bei der aktuellen Anregungswellenlänge von 470 nm und dem Auslesen des Antwortsignals bei 550 nm auftritt, die durch die Eigenfluoreszenz der Zellen begründet scheint. Deshalb war die maximal erreichbare Zelldichte in den Bioprozessen je nach Sensor-Charge auf etwa $BTM = 50 - 60 \text{ g L}^{-1}$ limitiert, um eine Abweichung des gemessenen vom reellen pH kleiner pH 0,2 zu gewährleisten. Des Weiteren lag das pH-Spektrum der pH-Sensoren je nach Sensor-Charge zwischen pH 6,0 beziehungsweise pH 6,2 und pH 8,5. Deshalb konnte der pH bei Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* lediglich auf pH 6,3 beziehungsweise pH 6,5 und nicht wie für methylotrophe Hefen üblich auf pH 4,0 bis pH 5,5 reguliert werden.

Die Steuerung und Dokumentation der Prozesse zur pH-Kontrolle, Substratzugabe und Probenahme erfolgt über die Prozessleitsoftware Fedbatch-XP. Sie wertet die Signale der Sensorik aus und steuert über die Kommunikationssoftware FBXP Server die Robotersoftware Gemini an. Diese gibt die Befehle direkt an den Laborroboter und die MTP-Waschstation weiter. Daneben steuert sie über die Automatisierungssoftware AutoIT die Software Fluostar

Galaxy des MTP-Photometers, wodurch die optische Dichte der verdünnten Proben automatisiert vermessen werden kann.

4.3.2 Rührkesselreaktoren im Labormaßstab

Für Untersuchungen zur Maßstabsübertragung der mikrobiellen Bioprozesse im Milliliter-Maßstab wurden zwei Bioreaktoren im Labormaßstab eingesetzt, deren Aufbau und Funktionsweise in der Folge detailliert beschrieben werden soll. Des Weiteren soll auf die Modifikationen eingegangen werden, die den kontinuierlichen Betrieb sowie die Kultivierung in einer zweistufigen Rührkesselkaskade ermöglichen.

Parallele 1,5 L-Glasrührkesselreaktoren im DASGIP®Bioblock

Für Bioprozesse im 0,5 Liter-Maßstab wurde das parallele Bioreaktorsystem DASGIP®Bioblock (DASGIP, Jülich, Deutschland) verwendet (siehe Abbildung 4.2). Eine Auflistung der Gerätekomponenten ist in Tabelle A.6 aufgeführt.

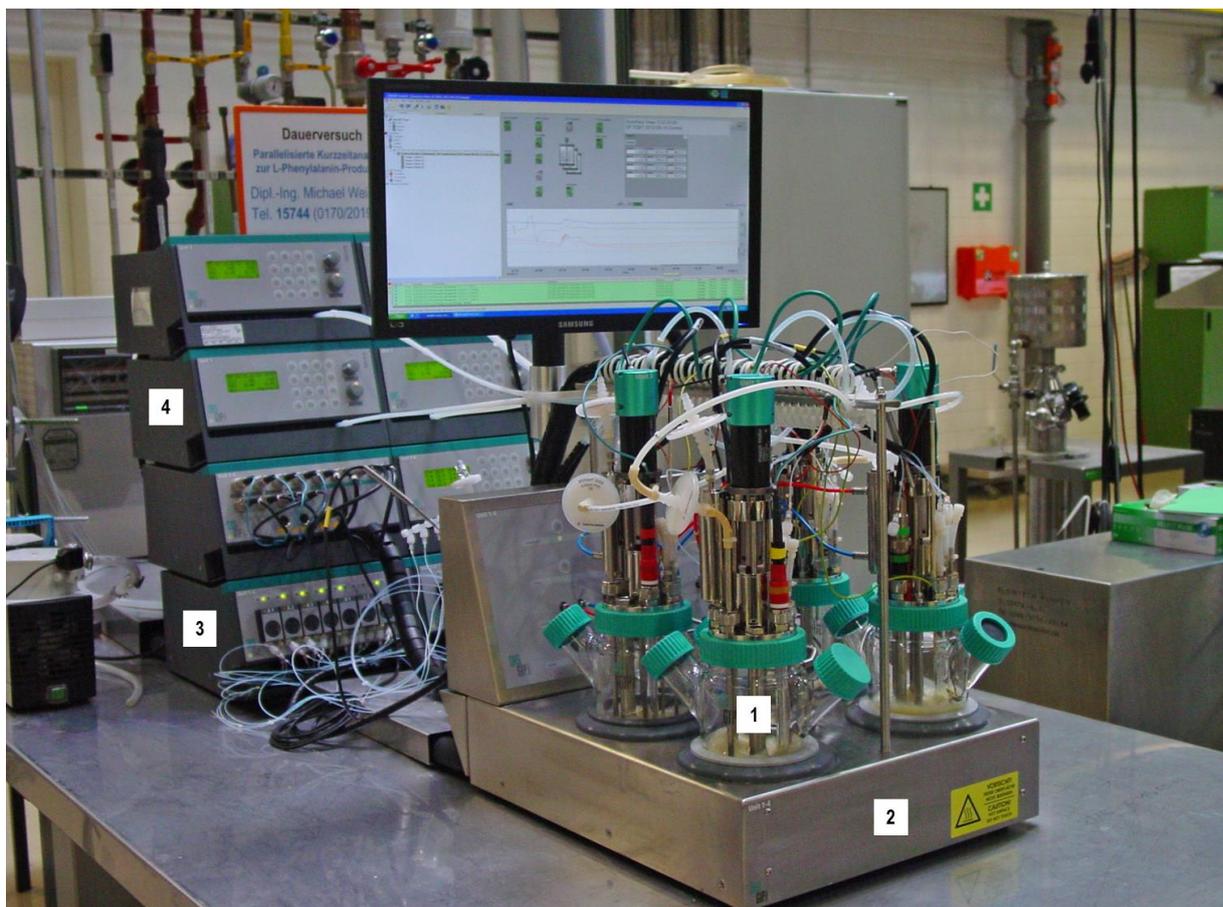


Abbildung 4.2: Aufbau des DASGIP®Bioblock: (1) Glasrührkesselreaktoren, (2) Heizblock, (3) Mikro-pumpen für die Zufuhr von Titrationsmitteln, Substratlösungen oder Antischaummitteln, (4) Steuer-einheiten zur Messung und Regelung von Drehzahl, pH, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur sowie vier Gasmischstationen.

Das Kultivierungssystem besteht aus vier identischen einwandigen Rührkesselreaktoren mit einem Flachboden und einem Nominalvolumen von 1,5 L. Das Arbeitsvolumen beträgt 0,3 – 0,8 L. Die Reaktoren sind jeweils mit zwei Seitenarmen und einer von oben eintauchenden Rührwelle mit zwei 6 Blatt-Scheibenrührern ausgestattet, die von einem Elektromotor angetrieben wird. Für die separate Regelung der Temperatur ist der untere Teil jedes Reaktors von einem Heizblock umgeben. Im Deckel der Reaktoren sind Durchführungen für pH-Sonde, pO₂-Sonde, Füllstandssonde, Temperaturfühler, Begasungsrohr, Abluftkühlung, Probenahmerohr und insgesamt fünf Luer-Lock-Schraubanschlüsse für Säure, Base, Antischaummittel und Zulaufmedium angebracht. Für die Dosierung der Lösungen stehen pro Reaktor vier Mikropumpen zur Verfügung. Für die manuelle Zugabe von Inokulum und weiteren Lösungen mit Spritzen ist ein Septum in einem Seitenarm der Reaktoren angebracht. Die Begasung erfolgt über vier getrennte Gasmischstationen, die eine individuelle Begasung mit Druckluft, Sauerstoff und Stickstoff oder mit beliebigen Mischungen der drei Gase erlauben. Ab einem Reaktordruck von 0,4 bar wird der Zuluftvolumenstrom automatisch reduziert, um eine Schädigung der Glaskessel zu vermeiden. Der O₂- und CO₂-Gehalt im Abgas jedes Reaktors kann über eine vierfach parallele Abgasanalytik aufgezeichnet werden. Die Prozesssteuerung sowie Dokumentation erfolgt mit der Software DASGIP Control, die eine separate Einstellung der Prozessparameter für jeden Reaktor erlaubt.

Die Bioreaktoren wurden in der dargestellten Konfiguration für die Vorkulturherstellung bei der Produktion von CaL-B2 mit *P. pastoris* im Milliliter- und Liter-Maßstab und für mikrobielle Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* im Zulaufverfahren (siehe Kapitel 6.6) eingesetzt.

Für die Maßstabsübertragung der mikrobiellen Herstellung von PAmCherry in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade (siehe Kapitel 7.2.2) wurden die Bioreaktoren erweitert. Hierfür wurde der Zulauf der beiden Reaktoren einer Kaskade mit definiertem Mineralmedium über die integrierten Mikropumpen durchgeführt. Der kontinuierliche Ablauf von Medium wurde über eine externe Mehrkanalschlauchpumpe (Reglo ICC, IDEX, Wertheim, Deutschland) realisiert. Die Ablaufrate wurde über den Füllstand der Reaktoren gesteuert, indem ein V4A-Rohr über eine Durchführung für Luer-Lock-Anschlüsse auf einer definierten Höhe in den Reaktoren fixiert wurde. Damit konnte ein konstantes Volumen und ein dem Zulauf eines jeden Reaktors äquivalenter Ablaufvolumenstrom erreicht werden.

7.5 Liter-Glasrührkesselreaktor Labfors

Für die Maßstabsübertragung der Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* im Zulaufverfahren (siehe Kapitel 5) und von ausgewählten Fließgleichgewichten mit *E. coli* (siehe Kapitel 6) in den 2 Liter-Maßstab wurde ein Glasrührkesselreaktor vom Typ Labfors 2 (Infors, Bottmingen, Schweiz) eingesetzt. Der Aufbau ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Eine detaillierte Auflistung der Gerätekomponenten ist in Tabelle A.7 aufgeführt.

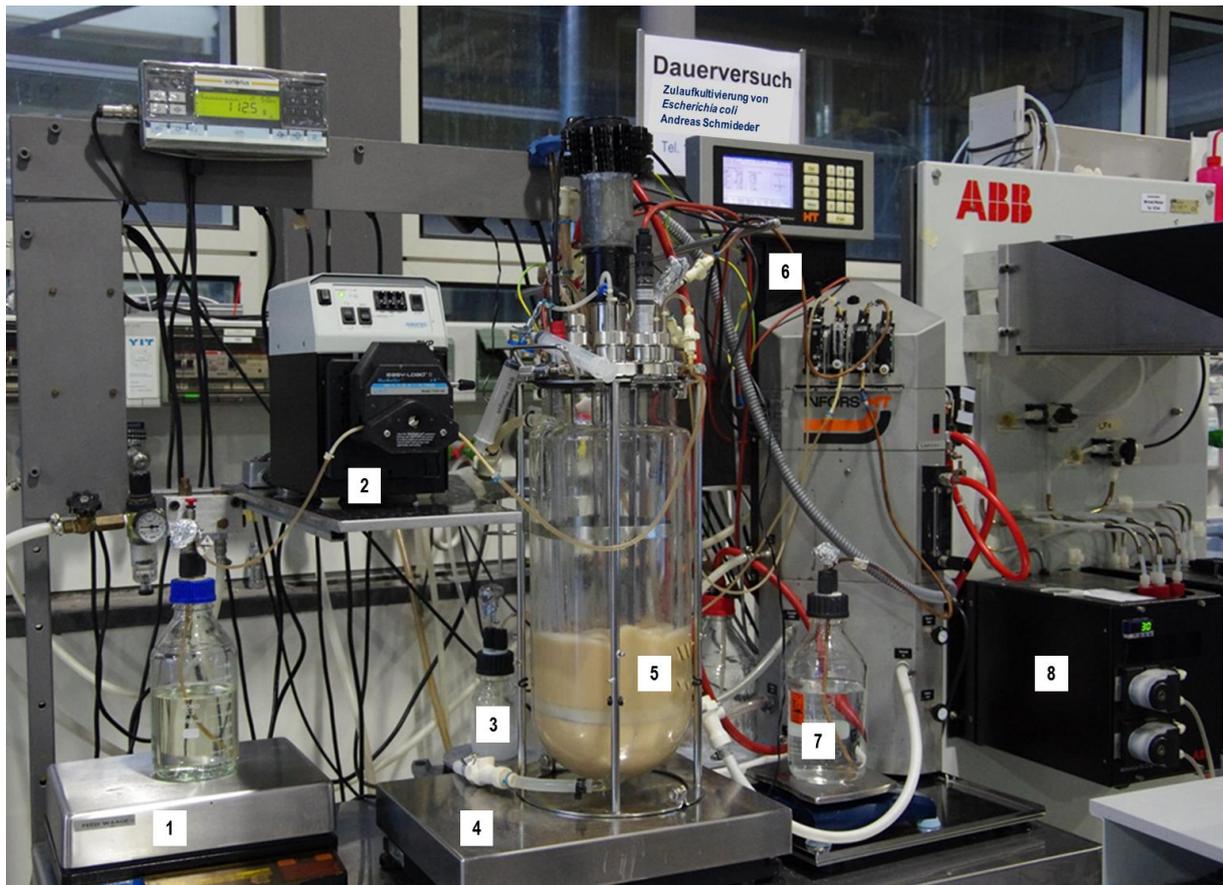


Abbildung 4.3: Aufbau des Labfors 2: (1) Waage mit Vorlageflasche für das Zulaufmedium, (2) Zulaufpumpe, (3) Vorlageflasche für Antischaummittel, (4) Waage für die Bestimmung der Massenzunahme des Reaktorinhalts, (5) Glasrührkesselreaktor, (6) Steuereinheit zur Messung und Regelung von Drehzahl, pH, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur, (7) Vorlageflasche für Titrationsmittel, (8) Abgasanalytik.

Der Reaktor besteht aus einem doppelwandigen Glaskessel mit einem Nominalvolumen von 7,5 L. Die Durchmischung wird durch eine von oben eintauchende Rührwelle mit drei 6 Blatt-Scheibenrührern realisiert, die mit einem auf dem Reaktor montierten Elektromotor angetrieben wird. Der Deckel des Reaktors weist Durchführungen für pH-Sonde, pO_2 -Sonde, Temperaturfühler, Antischaumsonde, Abgaskühler, Begasungsrohr und Probenahmerohr auf. Des Weiteren sind Durchführungen mit Schnellkupplungen für die Zugabe von Titrations- und Antischaummitteln über Pumpen der Steuerungseinheit vorhanden. Zulaufmedium wurde ebenfalls über eine Durchföhrung mit Schnellkupplung mit einer externen Schlauchpumpe zugeföhrt. Für die manuelle Zugabe von weiteren Lösungen mit Spritzen ist eine Durchföhrung mit einem Septum verschlossen. Der O_2 - und CO_2 -Gehalt im Abgas kann über eine Abgasanalytik bestimmt werden. Die Prozesssteuerung sowie Dokumentation erfolgt über die Prozesssoftware IRIS.

Der Reaktor wurde in der dargestellten Konfiguration für die Maßstabsübertragung der Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* im Zulaufverfahren verwendet.

Für die Maßstabsübertragung der Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit *E. coli* wurde der Bioreaktor für den kontinuierlichen Betrieb erweitert. Eine zweite externe Schlauchpumpe wurde für den Ablauf von Medium integriert. Die Ablaufrate wurde über den Füllstand des Reaktors gesteuert, indem ein zweites Probenahmerohr auf einer definierten Höhe fixiert wurde. Damit konnte ein konstantes Volumen und ein dem Zulauf äquivalenter Ablaufvolumenstrom erreicht werden.

4.3.3 Rührkesselreaktoren im Pilot-Maßstab

Für die Maßstabsübertragung von Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* in den 1 000 Liter-Maßstab (siehe Kapitel 5) wurden Edelstahlrührkesselreaktoren der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz) für die Vorkulturherstellung (LP75) und die Hauptkultur (P1500) im TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie der Technischen Universität München eingesetzt (siehe Abbildung 4.4). Eine detaillierte Übersicht der Gerätekomponenten ist in Tabelle A.8 und Tabelle A.9 aufgelistet.

Für die Herstellung der Vorkultur und für die Hauptkultur wurden doppelwandige Edelstahlrührkesselreaktoren mit einem Nominalvolumen von 75 L (LP75) und 1 500 L (P1500) eingesetzt. Die Durchmischung wird in beiden Reaktoren durch von unten eintauchende Rührwellen mit zwei (LP75) beziehungsweise drei (P1500) 6 Blatt-Scheibenrührern realisiert, die mit unter den Reaktoren verbauten Elektromotoren angetrieben werden. Die pH-Sonden, pO₂-Sonden und der Temperaturfühler können über Seitenstutzen in die Reaktoren eingeführt werden. Die Deckel der Reaktoren weisen Durchführungen für Antischaumsonde, Abgaskühler, Begasungseinheit sowie für die Zugabe von Titrationsmitteln und Antischaummittel über die Steuerungseinheit der Reaktoren auf. Zulaufmedium wurde im P1500 über eine externe Pumpe durch eine Durchführung im Deckel mit einer Schnellkupplung realisiert. Die Probenahme erfolgt über sterilisierbare Ventile, die an den seitlichen Stutzen der Reaktoren angebracht sind. Für die manuelle Zugabe von weiteren Lösungen mit Spritzen wurde jeweils eine Durchführung mit einem Septum verschlossen. Der O₂- und CO₂-Gehalt im Abgas der Reaktoren kann über eine Abgasanalytik bestimmt werden. Die Prozesssteuerung sowie Dokumentation erfolgt über die Prozesssoftware BioScada Lab.



Abbildung 4.4: Bioreaktoren im TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie: (1 a) Edelstahlrührkesselreaktor mit einem Nominalvolumen von 75 L, (1 b) Edelstahlrührkesselreaktor mit einem Nominalvolumen von 1 500 L, (2) Pumpen für die Zufuhr von Titrationsmitteln, Substratlösungen und Antischaummitteln, (3) Steuereinheit für die Messung und Regelung von Drehzahl, Druck, pH, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur.

4.4 Verfahrenstechnische Charakterisierung von parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

Vor dem Einsatz der erweiterten, miniaturisierten Bioreaktoren (bioREACTOR 48) für die kontinuierliche Betriebsweise zur Realisierung von Fließgleichgewichtsuntersuchungen in parallelen Bioreaktoren (siehe Kapitel 6) und in der Rührkesselkaskade (siehe Kapitel 7), wurden diese verfahrenstechnisch charakterisiert. Hierfür wurde das Verweilzeitspektrum der Reaktoren analysiert und die Rückhaltung von Proteinen in den entwickelten Enzym-Membran-Reaktoren untersucht.

4.4.1 Bestimmung des Verweilzeitverhaltens

Für die Bestimmung des Verweilzeitspektrums der miniaturisierten Bioreaktoren in der kontinuierlichen Betriebsweise beziehungsweise in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade, mit zwei, vier oder acht Reaktoren in Reihe, wurde ein Dirac-Impuls simuliert (siehe Abbildung 3.4). Im Falle des einstufigen kontinuierlichen Betriebs wurde eine NaCl-Lösung mit definierter Leitfähigkeit in den Reaktor gefüllt, während bei den Rührkesselkaskaden nur der erste Reaktor mit Salzlösung und alle weiteren mit bidestilliertem Wasser (H_2O bidest) gefüllt wurden. Anschließend wurde der Zulauf mit H_2O bidest gestartet und alle weiteren Pumpen für die Übertragung des Ablaufs in den nächsten Reaktor der Kaskade beziehungsweise für den Ablauf aus der Kaskade mit derselben Pumprate betrieben. Dabei wurde in allen Ansätzen eine Verweilzeit von $\tau = 1$ h, bezogen auf das Gesamtvolumen der eingesetzten Reaktoren ($V_R = 10$ mL), eingestellt. Die Rührerdrehzahl betrug 500 U min^{-1} , was der minimalen Rührerdrehzahl in Bioprozessen mit dem bioREACTOR 48 entspricht.

Am Ablauf der Kaskade wurden in definierten Intervallen Fraktionen gesammelt, die hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit analysiert wurden (siehe Kapitel 4.10.9). Basierend auf den Messungen wurde das Verweilzeitspektrum $E(t)$ mit Hilfe von Gleichung (3.36) berechnet und mit dem idealen Spektrum aus Gleichung (3.53) verglichen. Durch die Integration des bestimmten Verweilzeitspektrums konnte die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ abgeschätzt werden.

4.4.2 Proteinrückhaltung

Um die Funktionalität der miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren zu charakterisieren, wurde vorab die Proteinrückhaltung über die Membran (Größenausschlussgrenze 10 kDa) der Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® 4 Turbo bestimmt. Hierfür wurde das Protein *enhanced green fluorescent protein* (eGFP, ~27 kDa) verwendet, das vom TUM-Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie aufgereinigt zur Verfügung gestellt wurde. Das für diese Tests verwendete Protein wurde gewählt, da es einfach fluorometrisch nachzuweisen ist und ein geringeres

Molekulargewicht als die für enzymatische Umsetzungen verwendeten Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (~42 kDa) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (~35 kDa) aufweist. Das Protein eGFP wurde mit einer Konzentration von 500 mg L⁻¹ (maximal 400 mg L⁻¹ Gesamteproteinkonzentration bei enzymatischen Umsetzungen) in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5) gelöst und im Reaktor vorgelegt. Nach dem druckdichten Verschluss des Reaktors wurde der Zu- (500 mg L⁻¹ eGFP-Lösung) und Ablauf mit Schlauchpumpen bei verschiedenen Volumenströmen gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden Fraktionen des Ablaufs gesammelt und die Proteinkonzentration der Proben fluorometrisch bestimmt (siehe Kapitel 4.10.7). Die Proteinkonzentrationen im Reaktor während der Versuchsläufe wurde mit der Proteinkonzentration der Ausgangslösung und des Permeats sowie des Volumenstroms berechnet, da Probenahmen aus dem Reaktor während dem Betrieb aufgrund des aufgebauten Transmembrandrucks nicht möglich waren. Mit diesen Werten konnte die Rückhaltung des Proteins nach Gleichung (3.63) berechnet werden.

4.5 Kultivierung von *Komagataella pastoris*

4.5.1 Hochzelldichtekultivierung von *Komagataella pastoris* DSM70382

Vorkulturherstellung

Vorkulturen für die Hochzelldichteverfahren von *K. pastoris* DSM70382 im Milliliter- und Liter-Maßstab wurden in Schüttelkolben (500 mL) mit 100 mL YP Medium und 1,25 g L⁻¹ Glycerin als Kohlenstoffquelle angesetzt. Die Schüttelkolben wurden mit 100 – 500 µL einer Stammkultur beimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 200 U min⁻¹ und 30 °C bis zur stationären Phase im Inkubator. Alle Kultivierungsansätze in den Bioreaktoren im Milliliter- und 2 Liter-Maßstab wurden mit 10 % (Volumenanteil (v/v)) Vorkultur inokuliert.

Für die Hochzelldichteverfahren im 1 000 L-Maßstab wurde eine erste Vorkulturstufe in Schüttelkolben (2 000 mL) mit 400 mL YP Medium und 1,25 g L⁻¹ Glycerin als Kohlenstoffquelle angesetzt. Die Schüttelkolben wurden mit 1 mL einer Stammkultur beimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 200 U min⁻¹ und 30 °C bis zur stationären Phase im Inkubator. Ungefähr 2,4 L der ersten Vorkultur wurden in einen 75-Liter Edelstahlrührkesselreaktor eingebracht, der mit 39,6 L YP Medium und 2,50 g L⁻¹ Glycerin als Kohlenstoffquelle befüllt war. Als Startbedingungen dieser zweiten Vorkultur wurden eine Rührerdrehzahl von 200 U min⁻¹, ein Zuluftvolumenstrom von 50 L min⁻¹ und eine Temperatur von 30 °C gewählt. Der pO₂ wurde durch die automatische Steigerung der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks auf einen Wert von über 30 % Luftsättigung geregelt. Der pH wurde mit Phosphorsäure (25 %) und NH₄OH (25 %) auf pH 6,0 geregelt. Nach dem Erreichen der stationären Phase wurde die zweite Vorkulturstufe für die Inokulation des 1 500 Liter-Edelstahlrührkesselreaktors mit 5 % (v/v) verwendet. Die Glycerinkonzentration wurde im Vergleich zur Vorkulturherstellung für die Hochzelldichteverfahren im Milliliter- und Liter-Maßstab von 1,25 g L⁻¹ auf 2,50 g L⁻¹ erhöht, um bei einer Halbierung des Inokulationsvolumens auf 5 % (v/v) nach der Inokulation der Hauptkultur äquivalente Zelldichten in allen Bioreaktoren der unterschiedlichen Maßstäbe zu erhalten.

Hochzelldichteverfahren mit *Komagataella pastoris* DSM70382

Die Hochzelldichteverfahren für die Untersuchungen zum Wachstum von *K. pastoris* DSM70382 im Milliliter-, Liter- und 1 000 Liter-Maßstab unterschieden sich lediglich in der Zusammensetzung des Satzmediums. Während für Bioprozesse im Milliliter- und Liter-Maßstab 12 mL beziehungsweise 3 L Basales Salz Medium (BSM) mit 20 g L⁻¹ Glycerin verwendet wurde, wurden dem Satzmedium (840 L) im 1 000 L Maßstab Komplexbestandteile (1,0 g L⁻¹ Pepton und 0,5 g L⁻¹ Hefeextrakt) zugesetzt. Damit wurden die fehlenden, komplexen Medienbestandteile durch das verringerte Inokulationsvolumen an YP Vorkultur im

Pilotmaßstab (5 % (v/v)) im Gegensatz zum Milliliter- und Liter-Maßstab (10 % (v/v)) kompensiert.

Nach einer 14-stündigen initialen Satzphase wurde ein exponentielles Zulaufprofil mit Glycerin (500 g L⁻¹, 12 mL L⁻¹ PTM1 Spurenelementlösung) gestartet. Mit einer Zulauftrate von 0,77 g L⁻¹ h⁻¹ zum Beginn dieser exponentiellen Wachstumsphase wurde eine Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ vorgegeben. Nach 6 h wurde die maximale Zulauftrate von 1,41 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Zu Beginn der folgenden Adaptionsphase wurde einmalig Methanol (3 g L⁻¹) zugegeben und die Glycerinzulauftrate wurde für 2 h auf den halbmaximalen Wert reduziert, um die Zellen an Methanol zu adaptieren. Im Milliliter-Maßstab wurde die Rührerdrehzahl nach Methanolzugabe von 2 800 U min⁻¹ auf 3 200 U min⁻¹ erhöht, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. In den folgenden 2 h wurde der Glycerinzulauf linear auf 0 reduziert. Anschließend wurde der Zulauf auf 5,3 g L⁻¹ h⁻¹ Methanol umgestellt. Der pO₂ wurde im Liter- und 1 000 Liter-Maßstab durch die automatische Steigerung der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks über 15 % Luftsättigung geregelt. Der pH wurde mit NH₄OH (12,5 % im 12 Milliliter- und 3 Liter-Maßstab; 25,0 % im 1 000 Liter-Maßstab) auf pH 6,3 geregelt. Die Startbedingungen sowie die Maximalwerte des Volumens, der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks der verschiedenen Bioreaktoren können Tabelle 4.2 entnommen werden. Dabei wurde während der Bioprozesse im Milliliter-Maßstab auf Volumenkonstanz (12 mL) geachtet, um eine Variation des Methanoleintrags über die Gasphase durch verändertes Reaktionsvolumen zu vermeiden. Bei der Berechnung des Endvolumens der Bioreaktoren wurden Probenahmen sowie die Zugabe von Titrationsmitteln berücksichtigt. Proben zur Bestimmung der Zelldichte, der Methanol-, Ethanol- und Ammoniumkonzentration wurden im Milliliter-Maßstab automatisch durch den Laborroboter oder im Liter- beziehungsweise 1 000 Liter-Maßstab manuell genommen. Als Kriterium für die Maßstabsübertragung wurde die maximale Sauerstofftransferrate des bioREACTOR 48 bei einem Reaktionsvolumen von 12 mL, einer Rührerdrehzahl von 3 200 U min⁻¹, einer Begasungsrate von 0,1 L min⁻¹ und einer Temperatur von 30 °C gewählt. Basierend auf einem $k_L a$ von 0,3 s⁻¹ (Daten nicht gezeigt) und einer Sauerstoffsättigungskonzentration von 6,8 mg L⁻¹ in BSM Medium (Berechnung nach Schumpe 1993, Weisenberger und Schumpe 1996), wurde der maximale Sauerstofftransportkoeffizient bei den genannten Bedingungen auf $OTR_{max} = 230 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ geschätzt. Für die Bestimmung des $k_L a$ wurde in vorangegangenen Arbeiten die kombinierte Sulfitmethode verwendet (Puskeiler und Weuster-Botz 2005).

Tabelle 4.2: Startbedingungen und Maximalwerte des Volumens, der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks bei den Hochzeldichteverfahren zur Untersuchung des Wachstums von *K. pastoris* DSM70382 im Milliliter-, Liter- und 1 000 Liter-Maßstab.

Parameter	mL-Maßstab	L-Maßstab	1 000 L-Maßstab
Startbedingungen			
Volumen, L	0,012	2	840
Rührerdrehzahl, U min ⁻¹	2 800	1 000	120
Zuluftvolumenstrom, L min ⁻¹	0,1	6	200
Überdruck, bar	0,00	0,00	0,15
Maximalwerte			
Volumen, L	0,012	3,2	1 050
Rührerdrehzahl, U min ⁻¹	3 200	1 300	300
Zuluftvolumenstrom, L min ⁻¹	0,1	9	1 500
Überdruck, bar	0,00	0,00	1,75

4.5.2 Herstellung von *Candida antarctica* Lipase B mit *Pichia pastoris* CaL-B2

Vorkulturherstellung

Für alle Bioprozesse zur Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 wurde eine erste Vorkulturstufe in Vorkulturröhrchen (15 mL) mit 5 mL YP Medium ohne weitere Kohlenstoffquelle vorbereitet. Die Vorkulturröhrchen wurden mit 50 µL einer Stammkultur beimpft und die Zellen im Inkubator bei 200 U min⁻¹ und 30 °C bis zur stationären Phase kultiviert.

Die zweite Vorkultur wurde in Schüttelkolben (500 mL) mit 100 mL YP Medium für den Milliliter- und Liter-Maßstab beziehungsweise in Schüttelkolben (2 000 mL) mit 400 mL YP Medium für den 1 000 Liter-Maßstab angesetzt, die jeweils mit 5 % (v/v) der ersten Vorkultur inokuliert wurden. Dem Medium wurden 10 g L⁻¹ Glycerin als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Das Wachstum erfolgte im Inkubator bei 200 U min⁻¹ und 30 °C bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 18.

Der Reaktionsansatz wurde als Inokulum (5 % (v/v)) für die dritte Vorkulturstufe verwendet. Diese wurde in 1,5 L-Glasrührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 0,5 L für Bioprozesse im Milliliter- und Liter-Maßstab oder im 75 L-Edelstahlrührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 42 L für Bioprozesse im 1 000 Liter-Maßstab bei 30 °C kultiviert. Die

Startbedingungen der verschiedenen Bioreaktoren können Tabelle 4.3 entnommen werden. Für die dritte Vorkultur wurde YP Medium mit 10 g L⁻¹ Glycerin eingesetzt. Eine Regelung des pO₂ durch die automatische Steigerung der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks war bei den gewählten Kultivierungsbedingungen nicht nötig, da keine limitierenden Werte des pO₂ erreicht wurden. Der pH wurde mit Phosphorsäure (25 %) und NH₄OH (25 %) auf pH 6,0 geregelt. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 18 wurden die Zellen für die Inokulation der Hauptkulturen (5 % (v/v)) verwendet.

Tabelle 4.3: Startbedingungen der Bioreaktoren bei der Vorkulturherstellung zur Produktion von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 im Milliliter- und Liter-Maßstab (1,5 L-Glasrührkessel) und im 1 000 Liter-Maßstab (75 L-Edelstahlrührkesselreaktor).

Parameter	1,5 L-Glasrührkessel	75 L-Edelstahlrührkessel
Startvolumen, L	0,5	42
Rührerdrehzahl, U min ⁻¹	750	200
Zuluftvolumenstrom, L min ⁻¹	2	50
Überdruck, bar	0,00	0,15

Hochzelldichteverfahren zur Herstellung von CaL-B2 mit *Pichia pastoris* CaL-B2

Für die Hochzelldichteverfahren zur Herstellung von CaL-B2 mit *Pichia pastoris* CaL-B2 im Milliliter-, Liter- und 1 000 Liter-Maßstab wurden 12 mL, 2 L beziehungsweise 840 L BSM Medium mit 30 g L⁻¹ Glycerin als Kohlenstoffquelle sowie die zusätzlichen Komplexbestandteile Pepton (1,0 g L⁻¹) und Hefeextrakt (0,5 g L⁻¹) für das Satzmedium verwendet. Die Komplexbestandteile wurden dem BSM Medium beigefügt, um die fehlenden Medienbestandteile durch das verringerte Inokulationsvolumen (5 % (v/v)) im Vergleich zum Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* DSM70382 im Milliliter- und Liter-Maßstab (10 % (v/v)) zu kompensieren. Nach dem Ende der Satzphase, das durch einen sprunghaften Anstieg des pO₂ markiert wurde, wurden der Kultur zu Beginn der Adaptionsphase für die Anpassung der Zellen an Methanol 3,0 g L⁻¹ Methanol, 3,0 g L⁻¹ Glycerin, und 7,3 g L⁻¹ di-Ammoniumsulfat zugegeben. Im Milliliter-Maßstab wurde die Rührerdrehzahl nach Methanolzugabe von 2 800 U min⁻¹ auf 3 200 U min⁻¹ erhöht. Als die Kohlenstoffquellen komplett verbraucht waren, wurde ein konstanter Methanolzulauf von 3,0 g L⁻¹ h⁻¹ gestartet. Nach 14 h wurde die Methanolzulauf rate auf 5,3 g L⁻¹ h⁻¹ erhöht. Die Startbedingungen sowie die Maximalwerte des Volumens, der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks der verschiedenen Bioreaktoren waren mit Ausnahme des Startvolumens von 2,00 L und Endvolumens von 2,15 L im 7,5 Liter-Laborrührkesselreaktor und des Endvolumens von 1 150 Liter- im 1 500 Liter-Rührkesselreaktor analog zu den Hochzelldichteverfahren mit

K. pastoris DSM70382 und können Tabelle 4.2 entnommen werden. Der pO_2 wurde im Liter- und 1 000 Liter-Maßstab durch die automatische Steigerung der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Überdrucks auf einen Wert von über 15 % Luftsättigung geregelt. Der pH wurde mit NH_4OH (12,5 % im Milliliter- und Liter-Maßstab; 25,0 % im 1 000 Liter-Maßstab) auf pH 6,5 geregelt. Proben zur Bestimmung der Zelldichte, der Methanol-, Ethanol- und Ammoniumkonzentration sowie der Proteinkonzentration und -aktivität wurden im Milliliter-Maßstab automatisch durch den Laborroboter und im Liter-beziehungsweise 1 000 Liter-Maßstab manuell genommen.

Als Kriterium für die Maßstabsübertragung wurde der OTR_{max} des bioREACTOR 48 ($230 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) gewählt, dessen Berechnung bei den vorgegebenen Bedingungen ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, $3\,200 \text{ U min}^{-1}$, $0,1 \text{ L min}^{-1} \text{ Reaktor}^{-1}$, 12 mL BSM Medium) in Kapitel 4.5.1 dargestellt ist.

4.6 Kultivierung von *Escherichia coli*

In der Folge wird zunächst das Vorgehen zur Herstellung von *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) mit *Escherichia coli* im Schüttelkolben dargestellt. Die weiteren Abschnitte erläutern die Vorkulturherstellung und Bioprozesse mit *E. coli* PAmCherry.

4.6.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Herstellung von AGE und NAL mit *E. coli* im Schüttelkolben

Für die Herstellung von Vorkulturen der beiden Stämme *E. coli* AGE und NAL wurden Vorkulturröhrchen (15 mL) mit 5 mL LB Medium und den entsprechenden Antibiotika (30 mg L⁻¹ Kanamycin und gegebenenfalls 20 mg L⁻¹ Chloramphenicol) befüllt und mit 50 µL einer Stammkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 250 U min⁻¹ und 30 °C über Nacht im Inkubator. 2 mL der Vorkultur wurden für die Inokulation von Schüttelkolben (2 000 mL) mit 400 mL LB Medium und 0,5 g L⁻¹ Arabinose (AGE) beziehungsweise *Terrific Broth* (TB) Medium (NAL) und den entsprechenden Antibiotika verwendet. Das Wachstum erfolgte im Inkubator bei 250 U min⁻¹ und 37 °C bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8. Anschließend wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Herstellung der Enzyme erfolgte bei 250 U min⁻¹ für 4 h bei 37 °C (AGE) oder über Nacht bei 20 °C (NAL) im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen für die weitere Verarbeitung geerntet und aufgeschlossen (siehe Kapitel 4.9.4).

Vorkulturherstellung für Bioprozesse mit *E. coli* PAmCherry

Für die Herstellung von Vorkulturen für die Inokulation von Bioprocessen mit *E. coli* wurden als erste Stufe Vorkulturröhrchen (15 mL) mit 5 mL LB Medium beschickt und mit 50 µL einer Stammkultur inokuliert. Kanamycin (30 mg L⁻¹) diente als Selektionsmarker. Die Kultivierung erfolgte für mindestens 15 h in einem Inkubator bei 200 U min⁻¹ und 30 °C.

Anschließend wurden 5 mL Zellsuspension der ersten Vorkulturstufe für die Inokulation von Schüttelkolben (500 mL) mit 95 mL definiertem Mineralmedium nach Riesenberg et al. (1991) verwendet. Dabei wurden 2 g L⁻¹ Glucose als Kohlenstoffquelle und 30 mg L⁻¹ Kanamycin als Selektionsmarker zugegeben. Das Wachstum erfolgte für 4,5 h bei 250 U min⁻¹ und 37 °C im Inkubator bis zu einer Zelldichte von etwa OD₆₀₀ = 2. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (Standzentrifuge, 4 500 U min⁻¹, 5 min) geerntet und im Satzmedium des entsprechenden Bioprocesses resuspendiert (OD₆₀₀ = 5). Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte für sämtliche Bioprozesse mit 10 % (v/v) der resuspendierten Vorkultur, um eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 in der Hauptkultur zu erhalten.

4.6.2 Satzkultivierung

Um die maximale Wachstumsrate und den Biomasseertragskoeffizienten des verwendeten *E. coli*-Stammes PAmCherry im Satzbetrieb abzuschätzen, wurde eine Satzkultivierung (Anzahl der Reaktionsansätze $n = 3$) im bioREACTOR 48 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in 12 mL definiertem Mineralmedium (20 g L⁻¹ Glucose, 30 mg L⁻¹ Kanamycin) bei einer Temperatur von 30 °C, einer Rührerdrehzahl von 3 000 U min⁻¹ und einem Zuluftvolumenstrom von 0,1 L min⁻¹ pro Reaktor. Der pH wurde mit NH₄OH (12,5 %) auf pH 7,0 geregelt. Die Zelldichte wurde über die Messung der OD₆₀₀ in Intervallen von 1 h bestimmt, bis die Glucose komplett verbraucht war. Die maximale Wachstumsrate wurde mittels exponentieller Regression und der Biomasseertragskoeffizient als Verhältnis der erhaltenen Endbiotrockenmassekonzentration zur verbrauchten Konzentration an Glucose bestimmt.

4.6.3 Kontinuierliche Kultivierung

Parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit *E. coli* PAmCherry im Milliliter-Maßstab wurden im erweiterten bioREACTOR 48 (siehe Kapitel 6.1) bei einem Reaktionsvolumen von 10 mL, einer Rührerdrehzahl von 3 000 U min⁻¹ und einem Zuluftvolumenstrom von 0,1 L min⁻¹ pro Reaktor durchgeführt. Für Untersuchungen zur Maßstabsübertragung ausgewählter Fließgleichgewichte in den Liter-Maßstab wurde ein erweiterter 7,5 L-Glasrührkesselreaktor (siehe Kapitel 4.3.2) bei einem Reaktionsvolumen von 2 L einer Rührerdrehzahl von 1 000 U min⁻¹ beziehungsweise 1 200 U min⁻¹ und einem Zuluftvolumenstrom von 8 L min⁻¹ eingesetzt. Dabei waren die Protokolle für die Bioprozesse in beiden Maßstäben äquivalent. Die Temperatur betrug bei sämtlichen Bioprozessen 30 °C. Der pH des verwendeten definierten Mineralmediums wurde durch die Zugabe von NH₄OH (12,5 %) auf pH 7,0 geregelt. Nach einer Satzphase (15 h) mit variabler Glucosekonzentration zur Biomassebildung wurde die kontinuierliche Kultivierung durch den Start der entsprechenden Zu- und Ablaufpumpen gestartet. Als Zulaufmedium wurde in sämtlichen Fließgleichgewichtsuntersuchungen definiertes Mineralmedium mit 25 g L⁻¹ Glucose als Kohlenstoffquelle und 30 mg L⁻¹ Kanamycin als Selektionsmarker eingesetzt. Dabei wurde als Kriterium für das Erreichen eines Fließgleichgewichts der Austausch von mehr als 99,9 % des Mediums nach fünf Verweilzeiten gewählt. Proben zur Bestimmung der Zelldichte, der Glucose- und Acetatkonzentration sowie gegebenenfalls der Proteinkonzentration wurden im Milliliter-Maßstab automatisch durch den Laborroboter und im Liter-Maßstab manuell genommen. Die Vorgehensweise für die jeweiligen Fließgleichgewichtsuntersuchungen sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit *E. coli*

Um die parallele Reproduzierbarkeit der Fließgleichgewichtszustände im Milliliter-Maßstab zu validieren, wurde eine Kultivierung in acht parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab durchgeführt (siehe Kapitel 6.3). Hierfür wurde nach einer Satzphase mit 20 g L^{-1} Glucose der kontinuierliche Betrieb mit einer Verdünnungsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ und 25 g L^{-1} Glucose im Zulaufmedium gestartet.

Parallele Identifikation der Wachstumskinetik von *E. coli*

Zur parallelen Identifikation der Wachstumskinetik von *E. coli* im Milliliter-Maßstab (siehe Kapitel 6.4) wurden nach einer Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose zunächst acht Fließgleichgewichte mit Verdünnungsraten von $0,08 \text{ h}^{-1}$ bis $0,45 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Nach fünf Verweilzeiten wurde die Verdünnungsrate in zwei Bioreaktoren auf $0,52 \text{ h}^{-1}$ und $0,90 \text{ h}^{-1}$ erhöht. Die erhaltenen Biotrockenmasse- und Glucosekonzentrationen im Fließgleichgewicht wurden für die modellbasierte Bestimmung formalkinetischer Parameter verwendet (siehe Kapitel 4.11).

Anschließend wurden drei Fließgleichgewichtszustände mit Verdünnungsraten von $0,20 \text{ h}^{-1}$, $0,33 \text{ h}^{-1}$ und $0,50 \text{ h}^{-1}$ in den Liter-Maßstab übertragen.

Reaktionstechnische Untersuchungen zur kontinuierlichen Proteinproduktion mit *E. coli*

Für die reaktionstechnischen Untersuchungen zur kontinuierlichen Proteinproduktion mit *E. coli* (siehe Kapitel 6.5) wurden nach einer Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose verschiedene Fließgleichgewichtszustände eingestellt. Dabei wurde zum Beginn der kontinuierlichen Kultivierung die Proteinproduktion mit der Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Die Induktion erfolgte dabei mit einem IPTG-Puls durch die Zugabe einer konzentrierten IPTG-Lösung ($100 \mu\text{L}$ im 10 Milliliter-Maßstab; 1 mL im 2-Liter-Maßstab) zum Start der kontinuierlichen Kultivierung. Bei diesem Ansatz wurde die entsprechende IPTG-Konzentration ebenfalls im Zulaufmedium eingestellt, um konstante Bedingungen im Reaktor während den Fließgleichgewichtsuntersuchungen zu gewährleisten. Dabei wurde zunächst der Einfluss der Wachstumsrate in acht Kultivierungen im Milliliter-Maßstab untersucht ($5 \mu\text{M}$ IPTG, $0,1 \text{ h}^{-1} \leq D = \mu \leq 0,55 \text{ h}^{-1}$). Außerdem wurde der Einfluss der Induktorkonzentration auf die Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* bei acht verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen charakterisiert ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $0 - 1000 \mu\text{M}$ IPTG).

Um den Einfluss der Proteinproduktion auf den Stoffwechsel von *E. coli* genauer zu untersuchen und die Skalierbarkeit der Fließgleichgewichtszustände zu charakterisieren,

wurde ein Bioprozess mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ und einer IPTG-Konzentration von $100 \text{ }\mu\text{M}$ in den 2 Liter-Maßstab übertragen.

In einem weiteren Ansatz wurde die Proteinproduktion im kontinuierlichen Betrieb mit einer dynamischen Erhöhung der Induktorkonzentration charakterisiert. Hierfür wurden in vier Bioprosessen im Milliliter-Maßstab lediglich im Zulaufmedium die entsprechenden IPTG-Konzentrationen ($1 - 100 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG) vorgelegt, wodurch sich über die Kultivierung ein IPTG-Gradient ausbildete, der nach fünf Verweilzeiten mehr als 99,9 % der im Zulaufmedium eingestellten IPTG-Konzentration erreichte.

4.6.4 Kultivierung in kontinuierlicher Rührkesselkaskade

Für die Charakterisierung der mikrobiellen Herstellung von PAmCherry in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade wurden zwei Reaktoren in Reihe betrieben. Dabei diente der erste Reaktor der Biomassebildung, während im zweiten Reaktor der Kaskade die Proteinexpression erfolgte. Für Bioprosesse im Milliliter-Maßstab wurde der modifizierte bioREACTOR 48 (siehe Kapitel 7) bei einem Reaktionsvolumen von 10 mL pro Reaktor, einer Rührerdrehzahl von $3\,000 \text{ U min}^{-1}$ und einem Zuluftvolumenstrom von $0,1 \text{ L min}^{-1}$ pro Reaktor eingesetzt. Für Untersuchungen zur Maßstabsübertragung in den Liter-Maßstab wurde der modifizierte DASGIP®Bioblock (siehe Kapitel 4.3.2) bei einem Reaktionsvolumen von $0,5 \text{ L}$ pro Reaktor, einer Rührerdrehzahl von $1\,000 \text{ U min}^{-1}$ und einem Zuluftvolumenstrom von 2 L min^{-1} eingesetzt. Dabei waren die Protokolle für die Bioprosesse in beiden Maßstäben äquivalent. Die Temperatur betrug bei sämtlichen Bioprosessen $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Der pH des verwendeten definierten Mineralmediums wurde durch die Zugabe von NH_4OH (12,5 %) auf pH 7,0 geregelt.

Nach einer Satzphase mit 25 g L^{-1} Glucose in beiden Reaktoren wurde der kontinuierliche Betrieb durch das Anschalten der entsprechenden Zu- und Ablaufpumpen gestartet. Dabei wurde im ersten Reaktor zur Biomassebildung eine Verdünnungsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,3 \text{ h}^{-1}$ mit einer Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} im Zulaufmedium vorgegeben. Der Ablauf des ersten Reaktors wurde in den zweiten Reaktor zur Proteinproduktion eingebracht, um einen konstanten Eintrag von exponentiell wachsenden Zellen zu gewährleisten. Im zweiten Reaktor wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe eines $100 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG-Pulses ($100 \text{ }\mu\text{L}$ im 10 Milliliter-Maßstab; 1 mL im 0,5 Liter-Maßstab) zum Start der kontinuierlichen Betriebsweise induziert. Zudem wurde in den zweiten Reaktor definiertes Mineralmedium (25 g L^{-1} Glucose) mit einer Zulauftrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ eingebracht, um die Zellen mit einer Kohlenstoffquelle zu versorgen. Zusätzlich wurde dem Zulaufmedium des zweiten Reaktors $300 \text{ }\mu\text{M}$ beziehungsweise $400 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG zugesetzt, um konstante Induktorkonzentrationen von $100 \text{ }\mu\text{M}$ im Prozessverlauf zu gewährleisten. Die resultierenden

Verdünnungsraten im zweiten Reaktor betragen somit $0,3 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,4 \text{ h}^{-1}$ und $0,15 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,2 \text{ h}^{-1}$ für die gesamte Kaskade.

Um die Skalierbarkeit der mikrobiellen Herstellung von PAmCherry in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade zu untersuchen, wurde der Bioprozess mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ bezogen auf die gesamte Kaskade in den 0,5 Liter-Maßstab übertragen.

4.6.5 Hochzelldichtekultivierung im Zulaufverfahren

Um die Nutzbarkeit der in Fließgleichgewichtsuntersuchungen zur kontinuierlichen Proteinproduktion gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung und Optimierung von Zulaufprozessen zu evaluieren, wurden Hochzelldichteverfahren zur Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* mit verschiedenen Induktionstrategien untersucht. Diese wurden in vier parallelen 1,5 Liter-Glasrührkesselreaktoren im DASGIP®Bioblock in 0,5 L definiertem Mineralmedium nach Riesenberg et al. (1991) durchgeführt. Um eine Verfälschung der Glucoseeintragsrate durch eine Veränderung des Volumens während der Zulaufkultivierung zu vermeiden, wurde der Eintrag an Zulaufmedium und Titrationsmittel durch die entsprechend gewählte Probenahme ausgeglichen. Die Proben wurden hinsichtlich Zelldichte (OD_{600} , BTM), Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration sowie Proteinkonzentration (Fluoreszenzmessung) untersucht. Der pH wurde durch Zugabe von NH_4OH (25 %) auf pH 7,0 geregelt. Der pO_2 wurde durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Sauerstoffpartialdrucks der Zuluft auf einen Wert von über 20 % Luftsättigung geregelt. Die Startbedingungen sowie die Maximalwerte des Volumens, der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Sauerstoffpartialdrucks der Zuluft können Tabelle 4.4 entnommen werden.

Tabelle 4.4: Startbedingungen und Maximalwerte des Volumens, der Rührerdrehzahl, des Zuluftvolumenstroms und des Sauerstoffpartialdrucks der Zuluft bei den Hochzelldichteverfahren im Zulaufverfahren zur Produktion von PAmCherry mit *E. coli* PAmCherry im Liter-Maßstab.

Parameter	Startbedingungen	Maximalwerte
Volumen, L	0,5	etwa 0,5
Rührerdrehzahl, U min^{-1}	750	1 200
Zuluftvolumenstrom, L min^{-1}	2	4
Sauerstoffpartialdruck der Zuluft, %	20,95	30,00

Die entwickelten Hochzelldichteverfahren gliederten sich in die im Folgenden detailliert dargestellten Prozessabschnitte der initialen Biomassebildung (Satzphase und Zulaufphase) und der darauf folgenden Proteinproduktion (Produktionsphase).

Satzphase

Die sterilen 1,5 Liter-Glasrührkesselreaktoren wurden mit je 450 mL definiertem Mineralmedium (5 g L⁻¹ Glucose, 30 mg L⁻¹ Kanamycin) befüllt. Anschließend wurden 50 mL Inokulum aus der in Kultivierungsmedium resuspendierten zweiten Vorkulturstufe (siehe Kapitel 4.6.1) zugegeben, um eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 zum Prozessbeginn zu erhalten. Die Temperatur während der Satzphase betrug 37 °C. Das Ende der Satzphase wurde durch einen sprunghaften Anstieg des pO₂ markiert.

Zulaufphase

Nach der Satzphase wurde die Temperatur für die weiteren Prozessphasen auf 30 °C verringert, um den metabolischen Stress auf die Zellen zu reduzieren, und ein exponentieller Zulauf mit einer vorgegebenen Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Hierfür wurde die Zufuhr einer Substratlösung (500 g L⁻¹ Glucose, 12,5 g L⁻¹ MgSO₄) von 0,71 g L⁻¹ h⁻¹ über 15,2 h exponentiell auf 6,90 g L⁻¹ h⁻¹ gesteigert. Anschließend wurde die maximale Zulauftrate für 2,6 h konstant beibehalten, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden.

Produktionsphase

Nach der Biomassebildungsphase wurde die rekombinante Produktion von PAmCherry durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Zulauftrate wurde auf 3,00 g L⁻¹ h⁻¹ Glucose verringert, um eine Substratakkumulation während der Proteinproduktion auszuschließen. Als Referenzversuche dienten ein Bioprozess ohne Induktion, um den Einfluss der Induktion auf die Biomassebildung zu untersuchen und ein repräsentativer Bioprozess, bei dem die Proteinproduktion mit 1 000 µM IPTG induziert wurde (siehe zum Beispiel Jenzsch et al. 2006). Weiter wurde die Herstellung von PAmCherry mit verringerten IPTG-Konzentrationen von 5 µM und 100 µM IPTG untersucht. IPTG wurde hierbei als Puls mit einer entsprechend konzentrierten Lösung (1 mL) in die Reaktoren gegeben. Als zusätzliche Induktionsstrategie wurde der Eintrag von IPTG mit der Zulauflösung getestet. Hierfür wurde zu Beginn der Produktionsphase eine Zulauflösung mit 1 600 µM IPTG verwendet, worauf nach 9 h auf eine Zulauflösung mit 210 µM IPGT umgestellt wurde. So wurde 27 h nach Beginn der Produktionsphase eine IPTG-Konzentration von 100 µM IPTG erreicht und für den weiteren Prozessverlauf eine Zulauflösung ohne IPTG eingesetzt. Eine detaillierte Darstellung der unterschiedlichen Prozessführungen ist in Kapitel 6.6 aufgeführt.

4.7 Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure

Für die enzymatische Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) aus *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat wurden zunächst die Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) mit *E. coli* BL21(DE3) hergestellt, aufgereinigt und in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert (siehe Kapitel 4.6.1, 4.9.4, 4.9.5 und 4.9.6). In den folgenden Abschnitten sollen die Methoden zur kontinuierlichen Herstellung von Neu5Ac in miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren erläutert werden. Die Entwicklung der Enzym-Membran-Reaktoren wird in Kapitel 8 detailliert beschrieben.

Zum Start der Umsetzung wurden die Reaktoren für die einstufige kontinuierliche Betriebsweise beziehungsweise für die Herstellung von Neu5Ac in einer zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade mit einer Lösung von Enzymen und Substraten in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5) gefüllt und druckdicht verschlossen. Die Enzym- und Substratkonzentrationen wurden, wie in Tabelle 4.5 dargestellt, gewählt, sodass die Aktivität der AGE als limitierende Größe der Umsetzung auftrat. So konnten die Effekte der Produktinhibition der AGE durch Neu5Ac betrachtet werden. Die Reaktion wurde bei einer Rührerdrehzahl von 500 U min⁻¹ und einer Temperatur von 30 °C mit einer dreistündigen Satzphase gestartet. Anschließend wurde der kontinuierliche Betrieb durch das Anschalten der Zu- und Ablaufpumpen für die Zudosierung von Substratlösung ohne Enzym und die Überführung beziehungsweise den Ablauf von Reaktionslösung gestartet. Proben wurden während der Umsetzung am Ablauf der Kaskade genommen und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Enzyme AGE und NAL in zwei Enzym-Membran-Reaktoren, die in einer Kaskade betrieben wurden, räumlich getrennt. Dabei wurden 48 µg mL⁻¹ AGE im ersten Reaktor und 328 µg mL⁻¹ NAL im zweiten Reaktor vorgelegt. Als Substratlösung wurde 50 mM GlcNAc und 1 mM ATP in den ersten Reaktor mit einem Volumenstrom von 1,32 mL h⁻¹ zugeführt und nach der Umsetzung mit AGE in den zweiten Reaktor überführt. In diesen wurde eine zweite Dosierleitung zur Versorgung mit einer Pyruvatlösung (400 mM) mit einem Volumenstrom von 0,44 mL h⁻¹ eingebracht.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Substratlösung und eingesetzte Enzymkonzentrationen bei der enzymatischen Synthese von Neu5Ac. Alle Komponenten wurden in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5) gelöst.

Komponente	AGE	NAL	ATP	GlcNAc	Pyruvat
Konzentration	24 µg mL ⁻¹	164 µg mL ⁻¹	1 mM	50 mM	100 mM

4.8 Molekularbiologische Methoden

Alle Geräte und Lösungen, die für die folgenden molekularbiologischen Methoden verwendet wurden, sind im Anhang A1 und A5 zusammengefasst.

4.8.1 Isolation von Plasmid-DNS aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid-DNS aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Plasmid Miniprep Kits nach Herstellerangaben.

4.8.2 Polymerasekettenreaktion

Amplifikation von DNS-Fragmenten

Die Amplifikation von DNS-Fragmenten wurde in einer dreistufigen Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) realisiert. Dabei wurde die PHUSION™ HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE nach Herstellerangaben verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µL mit einer Primerkonzentration von 4 µM. Die Konzentrationen der weiteren Komponenten sowie die Reaktionsbedingungen während der Zyklen wurden nach Herstellerangaben bei jeder Amplifikation individuell angepasst.

Nach der Amplifikation wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.8.4) aufgetrennt und mit dem GenElute™ Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Kolonie-PCR

Zur Validierung der Klonierungen wurde nach der Insertion und Ligation eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde ein Teil der Kolonien von einer Agarplatte in 10 µL H₂O bidest suspendiert, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend als Templat für eine dreistufige PCR verwendet. Dabei wurde eine Taq DNA Polymerase verwendet. Die Primer (4 µM) wurden wie die Konzentrationen der restlichen Komponenten jeder Reaktion nach Herstellerangaben angepasst. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 4.8.4).

4.8.3 DNS-Aufreinigung

Die DNS-Aufreinigung erfolgte mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben.

4.8.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auswertung von PCR-Experimenten wurde jeweils eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in 6x Ladepuffer suspendiert und in einem 1 % (w/v) Agarosegel bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Ein 100 bp-Standard wurde zur Größenbestimmung der Fragmente mitgeführt.

4.8.5 Restriktion und Ligation von DNS

500 – 900 ng Plasmid und 10 µL der PCR-Produkte wurden mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym nach Herstellerangaben verdaut. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Plasmide für 1 h bei 37 °C mit 5 U Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 65 °C inaktiviert und die Plasmide sowie PCR-Produkte aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben mit der T4 DNA-Ligase. Das PCR-Produkt wurde in dreifach molarem Überschuss eingesetzt.

4.8.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen und Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte mit Hilfe des Kits Roti[®]-Transform nach Herstellerangaben. Die erhaltenen CaCl₂-kompetenten *E. coli* DH5α und BL21 (DE3) wurden bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 200 µL Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 – 100 ng DNS transformiert. Anschließend erfolgte für 30 min eine Inkubation auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 min wurden 600 µL NZY⁺ Medium zugegeben und die Reaktionsansätze bei 37 °C und 250 U min⁻¹ geschüttelt. Die Zellen wurden schließlich auf 200 µL aufkonzentriert (Tischzentrifuge 1 000 U min⁻¹, 10 min, Raumtemperatur) und über Nacht auf Agarplatten mit Kanamycin im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.8.7 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS wurde von MWG Eurofins durchgeführt.

4.9 Proteinbiochemische Methoden

Alle Geräte und Lösungen, die für die im Folgenden beschriebenen proteinbiochemischen Methoden eingesetzt wurden, sind im Anhang A1 und A5 zusammengefasst.

4.9.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die Auftrennung von Proteingemischen herangezogen. Die Proben wurden mit 5x-Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Trennung der Proteine wurde mit Hilfe von diskontinuierlichen Gelen realisiert. Das Aufkonzentrieren der Proben erfolgte auf einem Sammelgel (3 %). Anschließend wurden die Proteine durch ein Trenngel (12,5 %) separiert. Die Trennung erfolgte mit Rotiphorese®-SDS-PAGE-Puffer bei 35 mA pro Gel. Der mitgeführte Roti®-Mark Standard diente der Größenidentifikation der Fragmente.

Zur Visualisierung der SDS-PAGE wurde eine Färbemethode nach Fairbanks et al. (1971) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst mit Fairbanks-Puffer A bedeckt, welcher in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht wurde. Daraufhin wurde das Gel in Fairbanks-Puffer A für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Vorgehensweise wurde mit Fairbanks-Puffer B und C wiederholt.

4.9.2 Densitometrische Proteinquantifizierung

Für die densitometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration wurden die Gele digitalisiert (hp Scanjet 5470c, Hewlett-Packard, Berlin, Deutschland) und mit Hilfe des Programms Win Image Studio Lite 4.0.21 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) analysiert. Der Anteil eines Proteins in einer Probe wurde als das Verhältnis der Signalstärke der gesamten Spur im Vergleich zur entsprechenden Bande bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde anschließend mittels Bicinchoninsäure bestimmt (siehe Kapitel 4.9.3).

4.9.3 Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Verdünnung der Proben mit phosphatgepufferter Saline (PBS) mit Hilfe des Pierce Bicinchonin-Säure Protein Assay Kit nach Herstellerangaben.

4.9.4 Zellaufschluss

Vor der Aufreinigung der intrazellulär produzierten Proteine AGE, NAL und PAmCherry wurden die Zellen geerntet (Standzentrifuge, 4 500 U min⁻¹, 7 min, 4 °C) und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in IMAC Bindepuffer resuspendiert (5 mL Puffer auf 1 g Zellfeuchtgewicht). Phenylmethylsulfonylfluorid wurde als Proteaseinhibitor mit einer finalen Konzentration von 1 mM zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einer

Ultraschallsonde (Sonotrode MS 73, 5 min, 50 %, *cycle 5*) auf Eis aufgeschlossen, die etwa 1 cm in die Zellsuspension eintauchte. Das Zelllysate wurde sedimentiert (Tischzentrifuge, 15 000 U min⁻¹, 30 min, 4 °C) und der Überstand für die weitere Aufreinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) verwendet.

4.9.5 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Proteine PAmCherry, AGE und NAL, die am C- oder N-Terminus einen exponierten Polyhistidin-Affinitätsanker (His-Tag) aufweisen, erfolgte mittels HisTrap-Säulen mit einem Säulenvolumen von 5 mL, deren Matrix aus mit Nickelionen (Ni²⁺) beladener hochvernetzter Agarose besteht. Zunächst wurde die Säule bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ mit IMAC Bindepuffer gespült und in die *fast protein liquid chromatography* Anlage (FPLC) eingebaut. Anschließend wurde die Säule mit dem Probevolumen bei einer Flussrate von 5 mL min⁻¹ beladen. Durch das Spülen mit IMAC Bindepuffer (etwa 20 Säulenvolumina) wurde ungebundenes Material von der Säule entfernt. Mit einem linearen Gradienten (0 % bis 100 % IMAC Elutionspuffer) wurden die Proteine von der Säule eluiert und in 2 mL Fraktionen aufgeteilt. Die Reinheit der Fraktionen wurde per SDS-PAGE evaluiert (siehe Kapitel 4.9.1).

4.9.6 Pufferaustausch

Für die Bestimmung der Aktivität und Quantifizierung von CaL-B2 unter definierten Bedingungen erfolgte ein Pufferaustausch der Überstände der Proben aus Bioprozessen. Die Größenausschlussgrenze der Membran entsprach dabei 12 – 14 kDa. Es wurden 600 µL der Probe in ein Reaktionsgefäß gegeben, das mit einem Dialyseschlauch verschlossen wurde. Der Pufferaustausch von BSM Medium zu TrisHCl Puffer (pH 8,0) erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren in mindestens 100-fachem Probevolumen.

Für die Messung der PAmCherry-Konzentration beziehungsweise für die enzymatische Herstellung von Neu5Ac mit AGE und NAL nach der Aufreinigung der Proteine mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (siehe Kapitel 4.9.4), erfolgte ebenfalls ein Pufferaustausch von IMAC Elutionspuffer zu PBS beziehungsweise Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) über eine Membran mit einer Größenausschlussgrenze von 12 – 14 kDa. Nach dem Befüllen des Dialyseschlauches wurden beide Öffnungen mit Schlauchklemmen verschlossen. Der Pufferaustausch wurde mit mindestens 100-fachem Probevolumen über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

4.10 Analytische Methoden

Alle Geräte und Lösungen, die für die folgenden analytischen Methoden verwendet wurden, sind im Anhang A1 und A5 zusammengefasst.

4.10.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde zum einen durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und zum anderen durch die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration (BTM) bestimmt.

Die OD_{600} wurde bei Bioprozessen im Liter- und Pilot-Maßstab nach der manuellen Verdünnung der Proben mit PBS in einer Küvette im Einstrahlphotometer vermessen. Im Milliliter-Maßstab wurde die Verdünnung der Proben mit PBS durch den Pipettierroboter vorgenommen und die OD_{600} in Mikrotiterplatten im MTP-Photometer Fluostar Galaxy bestimmt. Die lineare Korrelation zwischen MTP-Photometer und Einstrahlphotometer ermöglichte trotz der unterschiedlichen Schichtdicken bei der Messung die Berechnung der entsprechenden OD_{600} im Milliliter-Maßstab.

Die BTM wurde gravimetrisch bestimmt. Hierfür wurden leere 2 mL Reaktionsgefäße bei 80 °C für mindestens 24 h getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Anschließend wurden 2 mL des Reaktionsansatzes in den Reaktionsgefäßen sedimentiert (Tischzentrifuge, 13 000 U min⁻¹, 10 min), der Überstand entfernt und das Zellpellet bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die gefüllten Reaktionsgefäße erneut gewogen und aus der Massedifferenz und dem eingesetzten Probevolumen die BTM berechnet. Bei Bioprozessen im Labor- und Pilot-Maßstab wurde die BTM regelmäßig bestimmt, wohingegen durch das geringe Reaktionsvolumen im Milliliter-Maßstab nur zum Prozessende die BTM gemessen werden konnte. Eine lineare Korrelation zwischen BTM und OD_{600} erlaubt die Berechnung der BTM während der Bioprozesse im Milliliter-Maßstab.

Die Bestimmung der Anzahl an teilungsfähigen Zellen wurde mittels Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden 50 µL von verdünnten Prozessproben in Dreifachansätzen steril auf Agarplatten mit und ohne Selektionsmarker ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C.

4.10.2 Bestimmung von Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration

Die Messung der Glucose-, Acetat- und Ammoniumkonzentration wurde nach Verdünnung der Überstände der Reaktionsansätze (Tischzentrifuge, 13 000 U min⁻¹, 10 min) mit H₂O bidest mit den entsprechenden UV-Tests (siehe Tabelle A.14) von R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eingesetzten Volumina wurden für den Einsatz in Mikrotiterplatten abgeändert. Dabei wurde die Bildung von NADH (Acetat) aus

NAD⁺ beziehungsweise NADPH (Glucose) aus NADP⁺ oder der Abbau von NADH (Ammonium) zu NAD⁺ im MTP-Photometer Genesis bei 340 nm verfolgt.

4.10.3 Gravimetrische Bestimmung von Reaktionsvolumina und Volumenströmen

Zur Ermittlung der Reaktorvolumina zum Ende der Bioprozesse wurde das Gewicht des Reaktionsvolumens des entsprechenden Bioreaktors bestimmt und das Volumen mit der Dichte des Reaktionsansatzes berechnet.

Für die Bestimmung der Volumenströme bei kontinuierlichen Bioprozessen wurde das Gewicht der Zulaufgefäße des entsprechenden Bioreaktors vor und nach der Kultivierung gravimetrisch gemessen. Das Volumen wurde mit der vorab bestimmten Dichte des Zulaufmediums von 1,03 g L⁻¹ abgeschätzt. Probenahmen und die Zugabe von Titrationsmitteln wurden für die Bestimmung der Volumenströme berücksichtigt.

4.10.4 Gaschromatographie zur Quantifizierung von Alkoholen

Zur Bestimmung der Alkohole Methanol und Ethanol wurde der Gaschromatograph CP-3800 mit einer OPTIMA[®] WAXplus Säule (Innendurchmesser 300 x 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) eingesetzt. Propan-1-ol diente als interner Standard. Die Detektortemperatur betrug 260 °C. Der isothermische Temperaturgradient wurde für 5 min und 5,0 °C min⁻¹ von 40 °C bis 65 °C und anschließend für 2,33 min und 23,6 °C min⁻¹ von 65 °C bis 120 °C programmiert. Helium wurde als Trägergas mit einer Flussrate von 4 mL min⁻¹ verwendet. Die Retentionszeiten betragen 1,9 min für Methanol, 2,1 min für Ethanol und 3,2 min für Propan-1-ol. Salzfremde Proben wurden mit H₂O bidest verdünnt, wohingegen Proben aus Bioprozessen mit einem CROMAFIX[®] PS-Mix Filter (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsalzt wurden. Die Konzentrationen von Methanol und Ethanol wurden mit einer Korrelation der Signalfäche des Detektors und einer Standardkurve berechnet.

4.10.5 Bestimmung des Methanoleintrags in miniaturisierte Bioreaktoren

Methanol wurde in die Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab über die Gasphase bei einer Temperatur von 30 °C und einem Gasvolumenstrom von 0,1 L min⁻¹ für jeden Reaktor zugeführt. Zunächst wurde die Begasung mit Methanol-gesättigter Zuluft (mit Sättiger; 23 °C) für 5 min ohne Durchmischung der Bioreaktoren mit den gasinduzierenden Rührkörpern betrieben, um die Zuluftleitungen mit Methanol-gesättigter Luft zu füllen. Mit dem Start der Rührer wurden über einen Zeitraum von 22 min regelmäßig 200 µL Probe aus den Bioreaktoren entnommen. Die Methanolkonzentration in der Flüssigphase wurde mittels Gaschromatographie (siehe Kapitel 4.10.4) bestimmt. Die Methanoleintragsrate wurde durch lineare Regression der Methanolkonzentration in den Bioreaktoren über die Zeit bestimmt. Einige Einflussfaktoren auf die Methanoleintragsrate, wie der Füllstand der Bioreaktoren

(8 – 14 mL), der volumetrische Leistungseintrag der gasinduzierenden Rührer (15,3 – 32,0 W L⁻¹) und die Methanolkonzentration im Sättiger (Blasensäule, 20 – 60 g L⁻¹), wurden charakterisiert.

4.10.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung der Konzentration von GlcNAc, Pyruvat, ManNAc und Neu5Ac bei der enzymatischen Herstellung von Neu5Ac erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Hierfür wurden regelmäßig Proben genommen und die Reaktion wurde mit 9 Probevolumen Schwefelsäure (0.1 M) gestoppt und anschließend über einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm aufgereinigt. Die Messung erfolgte in einer HPLC-Anlage (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit einer Aminex HPX-87H Säule (Biorad, München, Deutschland). Als mobile Phase wurde Schwefelsäure (5 mM) verwendet. Die Säule wurde bei 60 °C und einer Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ betrieben. Die Elution wurde mit einem UV-Detektor bei 210 nm verfolgt. Die Konzentrationen wurden mit einer Korrelation der Signalfäche des UV-Detektors und einer Standardkurve der vier Analyten berechnet.

4.10.7 Fluoreszenzmessung der PAmCherry- und eGFP-Konzentration

Die Konzentration von aufgereinigtem eGFP bei der Bestimmung der Retention mit verschiedenen Ultrafiltrationsmembranen wurde per Fluoreszenzmessung bestimmt. Hierfür wurde eGFP manuell mit PBS verdünnt und im MTP-Photometer Genesis mit einer Wellenlänge von 395 nm angeregt und anschließend die Emission bei 509 nm bestimmt. Eine lineare Korrelation aus vorangegangenen Arbeiten zwischen Fluoreszenz und Proteinkonzentration ermöglichte die Abschätzung der vorliegenden eGFP-Konzentration.

Die Konzentration von PAmCherry im Verlauf von Bioprozessen wurde ebenfalls fluorometrisch bestimmt. Zunächst wurden die Proben mit PBS auf OD₆₀₀ = 2,5 verdünnt, um eine Verfälschung der Messung bei Zelldichten von OD₆₀₀ > 5,0 zu vermeiden. Da es sich hierbei um ein fotoaktivierbares Protein handelt, erfolgte vor der Messung eine Anregung von 200 µL Probevolumen in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für 10 min im UV-Transilluminator. Anschließend wurden die Proben im MTP-Photometer Genesis bei einer Wellenlänge von 564 nm angeregt und die Emission bei 595 nm bestimmt. Eine lineare Korrelation zwischen Fluoreszenz und Proteinkonzentration, die mit aufgereinigtem PAmCherry angefertigt wurde, ermöglichte die Abschätzung der vorliegenden PAmCherry-Konzentration.

4.10.8 Bestimmung der Aktivität der Lipase CaL-B2

Der zellfreie Überstand aus Bioprozessen mit *P. pastoris* CaL-B2 wurde nach der Sedimentation der Zellen (Tischzentrifuge, 13 000 U min⁻¹, 10 min) und Pufferaustausch zu Tris-HCl Puffer (pH 8,0) für die Aktivitätsbestimmung der Lipase verwendet. Die Enzymaktivität

wurde spektrometrisch (Blank et al. 2006) mit *p*-Nitro-phenol Butyrat als Substrat gemessen. Hierfür wurden 50 μL Überstand, der gegebenenfalls mit Lipase-Phosphat-Puffer verdünnt wurde, zu 900 μL Lipase-Phosphat-Puffer (pH 7,0, Raumtemperatur) gegeben und die Reaktion mit 50 μL Substratlösung gestartet. Die Spaltung von *p*-Nitro-phenol Butyrat wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm im Einstrahlphotometer über maximal 5 min verfolgt. Die Aktivität der Lipase wurde über die Messung der Absorptionzunahme im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne Enzym dokumentiert. Die Berechnung der Aktivität erfolgte mit Gleichung (4.1).

$$EA = \frac{V_A \cdot \text{Verdünnung} \cdot \Delta A}{V_P \cdot d \cdot \varepsilon_{405}} \quad (4.1)$$

Mit:	EA	Enzymaktivität, U mL^{-1}
	V_A	Volumen Reaktionsansatz, mL
	ΔA	Absorptionzunahme, min^{-1}
	V_P	Volumen Probe, mL
	d	Küvettdurchmesser, 1 cm
	ε_{405}	Extinktionskoeffizient für <i>p</i> -Nitro-phenol bei 405 nm, 9,1 $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

4.10.9 Bestimmung der Leitfähigkeit

Für die Messung des Verweilzeitverhaltens wurde die Leitfähigkeit einer NaCl-Lösung bestimmt. Hierfür wurden Fraktionen von mindestens 2 mL in einem 15 mL Reaktionsgefäß gesammelt und die elektrische Leitfähigkeit mit Hilfe einer Konnektivitäts-Sonde bestimmt.

4.10.10 Druckmessung in miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren

Für die Messung des Überdrucks in miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren wurde ein digitales Druckmessgerät über einen etwa 3 m langen Schlauch an eine Öffnung der Reaktoren angeschlossen und der Druck während des Betriebs der Enzym-Membran-Reaktoren bei verschiedenen Verdünnungsraten manuell notiert.

4.11 Modellbasierte Identifikation formalkinetischer Parameter

Die Identifikation formalkinetischer Parameter von *Escherichia coli* mit Hilfe von parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab erfolgte auf der Grundlage der Massenbilanzen für kontinuierliche Bioprozesse in idealen Rührkesselreaktoren mit konstantem Volumen (Gleichung (3.23)). Gleichung (4.2) und (4.3) wurden verwendet, um die Biomasse- (c_X) und Glucosekonzentration (c_S) im Reaktor zu beschreiben.

$$\frac{dc_X}{dt} = D \cdot (0 - c_X) + \mu \cdot c_X \quad (4.2)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = D \cdot (c_{S,0} - c_S) - \left(\frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S \right) \cdot c_X \quad (4.3)$$

Die Wachstumsrate wurde dabei durch das Monod-Modell für bakterielles Wachstum (Sättigungskinetik) unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels mit Gleichung (4.4) beschrieben.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \quad (4.4)$$

Die Gleichungen (4.2) und (4.3) wurden auf ihre Lösungen für das Fließgleichgewicht überprüft ($dc_i/dt = 0$). Somit erhält man die Biomasse- und Substrat-Konzentration für das Fließgleichgewicht nach Gleichung (4.5) und (4.6) für Verdünnungsraten, die kleiner als die maximale Wachstumsrate sind und $c_S = c_{S,0}$ beziehungsweise $c_X = 0$ für Verdünnungsraten, die größer als die maximale Wachstumsrate sind.

$$c_X = \frac{D \cdot (c_{S,0} - c_S)}{\frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S} \quad (4.5)$$

$$c_S = \frac{K_S \cdot (D + m_S \cdot Y_{XS,\mu})}{\mu_{max} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} - D} \quad (4.6)$$

Anschließend wurden die Parameter der Differentialgleichungen bestimmt, indem die Restfunktion r in Gleichung (4.7) in Abhängigkeit der gemessenen Konzentration $c_{i,mess}$ und der simulierten Konzentration $c_{i,sim}$ der Komponenten mit Hilfe der nichtlinearen Optimierungsroutine *lsqnonlin* aus der *Optimization Toolbox* in MATLAB2014b (MathWorks, Natick, MA, USA) mit dem *Trust-Region-Reflective* Algorithmus minimiert wurde.

$$r = \min \sum (c_{i,mess} - c_{i,sim})^2 \quad (4.7)$$

Mit:	r	Restfunktion, $g^2 L^{-2}$
	$c_{i,mess}$	Gemessene Konzentration der Komponente i , $g L^{-1}$
	$c_{i,sim}$	Simulierte Konzentration der Komponente i , $g L^{-1}$

Biotrockenmasse- und Substratkonzentrationen wurden bei zehn verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen gemessen. Die initialen Schätzungen für die Parameter wurden der Literatur entnommen (Jenzsch et al. 2006; Riesenberg et al. 1991; Senn et al. 1994; Kovárová-Kovar und Egli 1998; Wunderlich et al. 2014) und sind zusammen mit den vorgegebenen unteren und oberen Schranken der Parameter in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Initiale Parameterschätzungen und Schranken für die Identifikation von formalkinetischen Parametern des Wachstums von *E. coli* mit Glucose als limitierendem Substrat.

Parameter	Initiale Schätzung	Untere Schranke	Obere Schranke
μ_{max}, h^{-1}	0,5	0	1
$Y_{XS,\mu}, g g^{-1}$	0,5	0	1
$K_S, g L^{-1}$	0,2	0	100
$m_S, g g^{-1} h^{-1}$	0,02	0	0,1

Für die Abschätzung der Standardabweichungen der Parameter wurde eine *Monte Carlo Bootstrap* Analyse durchgeführt (Kremling 2014). Hierfür wurden artifizielle Messungen generiert, indem zu den Messwerten ein normalverteilter Fehler mit einer Standardabweichung von 5 % (geschätzter maximaler Messfehler) hinzugefügt wurde. Diese Vorgehensweise wurde 100 000-mal wiederholt und lieferte verschiedene Parametersätze, die auf ihre Mittelwerte und Standardabweichungen evaluiert wurden. Der Einfluss des Fehlers der Affinitätskonstante des Substrates ΔK_S auf den Fehler bei der Berechnung der spezifischen Wachstumsrate $\Delta \mu$ wurde analysiert, indem eine Abschätzung des Fehlers der Wachstumsrate mittels Fehlerfortpflanzung vorgenommen wurde.

$$\Delta\mu = \sqrt{\left(\frac{\partial\mu}{\partial K_S} \cdot \Delta K_S\right)^2} \quad (4.8)$$

Mit: $\Delta\mu$ Fehler der spezifischen Wachstumsrate, h^{-1}
 ΔK_S Fehler der Affinitätskonstante des Substrats, g L^{-1}

Für die weitere Validierung des generierten Modells, wurden die Ergebnisse der Simulation mit zusätzlichen Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter- und Liter-Maßstab verglichen.

5 Kontinuierliche Substratzufuhr über die Gasphase*

Für die Bioprozessentwicklung im Milliliter-Maßstab ist eine direkte Übertragbarkeit der Bioprozesse in den technischen Maßstab von großer Bedeutung. Diese ist jedoch in den meisten Fällen aufgrund der fehlenden Möglichkeit der kontinuierlichen Zufuhr von Substratlösungen in miniaturisierte Bioreaktoren nur eingeschränkt möglich. So werden die Kohlenstoffquellen oftmals mit einem intermittierenden Zulauf eingebracht, was negative Auswirkungen auf die Mikroorganismen durch die wechselnde Verfügbarkeit von Substraten haben kann. Dabei herrscht ein ständiger Wechsel von Substratlimitierung und -überschuss vor, auf den die Zellen innerhalb von Sekunden reagieren. Veränderte Umgebungsbedingungen können die Zellphysiologie und die Biomasseausbeute beeinflussen sowie die Produktausbeute verringern. Des Weiteren kann es bei hohen Substratkonzentrationen durch den auftretenden Überschussmetabolismus und durch zeitweise auftretende Sauerstofflimitierungen zur Bildung von inhibierenden Nebenprodukten kommen. Deshalb sollten in dieser Arbeit die miniaturisierten Rührkesselreaktoren des bioREACTOR 48 (2mag AG, München, Deutschland) für die kontinuierliche Substratzufuhr von flüchtigen Komponenten, wie zum Beispiel Alkoholen, über die Gasphase modifiziert werden. Als Grundlage hierfür diene ein weit verbreitetes Prinzip der Minimierung der Verdunstung in Bioreaktoren durch die Aufsättigung der Zuluft mit Wasser. So kann die Zuluft durch die Einführung eines Sättigers auch mit variablen Mischungen von Wasser und dem gewünschten flüchtigen Substrat beladen werden, welches wiederum durch den Stofftransport zwischen Gas- und Flüssigphase entsprechend dem thermodynamischen Gleichgewicht in den Reaktionsansatz übergeht.

Als Applikationsbeispiel wurde die Versorgung der methylotrophen Hefen *Komagataella pastoris* (früher *Pichia pastoris*) mit der Kohlenstoff- und Energiequelle Methanol gewählt, da hier insbesondere die gesteigerte Wärmeproduktion bei hohen Zelldichten sowie der hohe Sauerstoffbedarf der Hefe beim Wachstum mit Methanol eine kontinuierliche Substratzufuhr erfordern. Mit den existierenden Bioreaktoren für die Durchmusterung von Mutanten im Hochdurchsatzverfahren bei niedrigen Zelldichten und mit intermittierendem Methanolzulauf können erstellte Mutanten bevorzugt werden, die unter technischen Bedingungen keine optimalen Ausbeuten erzielen. Somit wären miniaturisierte Bioreaktoren zur Durchmusterung von methylotrophen Hefen im Milliliter-Maßstab, mit denen kontrollierte Zulaufprozesse analog zum industriellen Maßstab möglich sind, sehr nützlich.

* Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in: 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, 451: 177-184.

5.1 Kontinuierliche Methanolzufuhr in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

Für die kontinuierliche Methanolzufuhr über die Gasphase wurde der verwendete parallele Bioreaktorblock mit 48 Rührkesselreaktoren erweitert, indem ein Sättiger (Blasensäule, Raumtemperatur: $T = 23\text{ °C}$, Volumen $V = 5,0\text{ L}$) in die Versorgungsleitung mit steriler Prozessluft installiert wurde. Der Sättiger wurde mit 2,5 L einer Methanol-Wasser Lösung befüllt. Um einen konstanten Eintrag von Methanol in die Zuluft zu gewährleisten, wurden die Methanolkonzentration und der Füllstand des Sättigers konstant gehalten. Die Verdunstung von Methanol und Wasser aus dem Sättiger wurde mit einem kontinuierlichen Zulauf einer Methanol-Wasser Lösung kompensiert (siehe Abbildung 5.1).

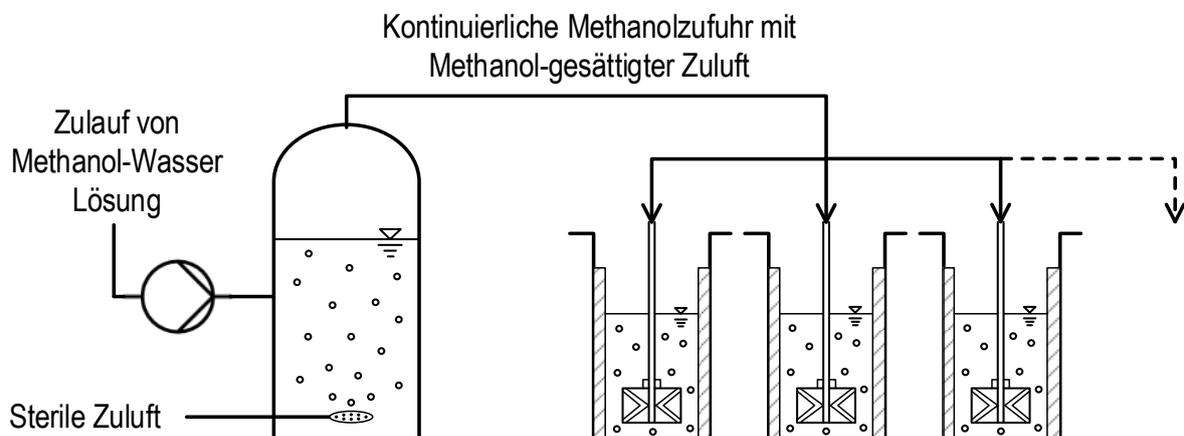


Abbildung 5.1: Modifizierte, parallele Bioreaktoren für den kontinuierlichen Eintrag von Methanol über die Gasphase mit schematischer Darstellung von 3 der 48 parallelen Bioreaktoren. Der kontinuierliche Eintrag von Methanol wurde durch die Aufsättigung der Zuluft mit Methanol in einem Sättiger (Blasensäule, $V = 5\text{ L}$, Raumtemperatur: $T = 23\text{ °C}$), der mit 2,5 L einer Wasser-Methanol Lösung gefüllt wurde, realisiert. Um die Verdunstung von Wasser und Methanol aus dem Sättiger auszugleichen, wurde ein Zulauf einer Wasser-Methanol Lösung installiert.

So konnte den Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab kontinuierlich Methanol über die sterile Zuluft zugeführt werden. Dabei war es möglich die Methanolkonzentration in der Gasphase in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration im Sättiger einzustellen. Die Massentransferrate von Methanol in die Flüssigphase der Bioreaktoren bei definierten Bedingungen konnte nicht theoretisch abgeschätzt werden, da der Anteil der Zuluft, der mit den gasinduzierenden Rührern bei verschiedenen Rührerdrehzahlen in das Reaktionsvolumen eingebracht wird, nicht bekannt war. Des Weiteren konnte der Einfluss der Rückvermischung der mit Methanol gesättigten Zuluft und des Abgases im Kopfraum der Bioreaktoren nicht bestimmt werden. Deshalb wurde der Methanoleintrag als Funktion der

Methanolkonzentration im Sättiger $c_{MeOH,S}$ ($20 - 60 \text{ g L}^{-1}$), des volumetrischen Leistungseintrags P_V ($15 - 32 \text{ W L}^{-1}$) der gasinduzierenden Rührer sowie des Reaktionsvolumen V_R ($8 - 14 \text{ mL}$) experimentell bestimmt (siehe Abbildung 5.2 A-C).

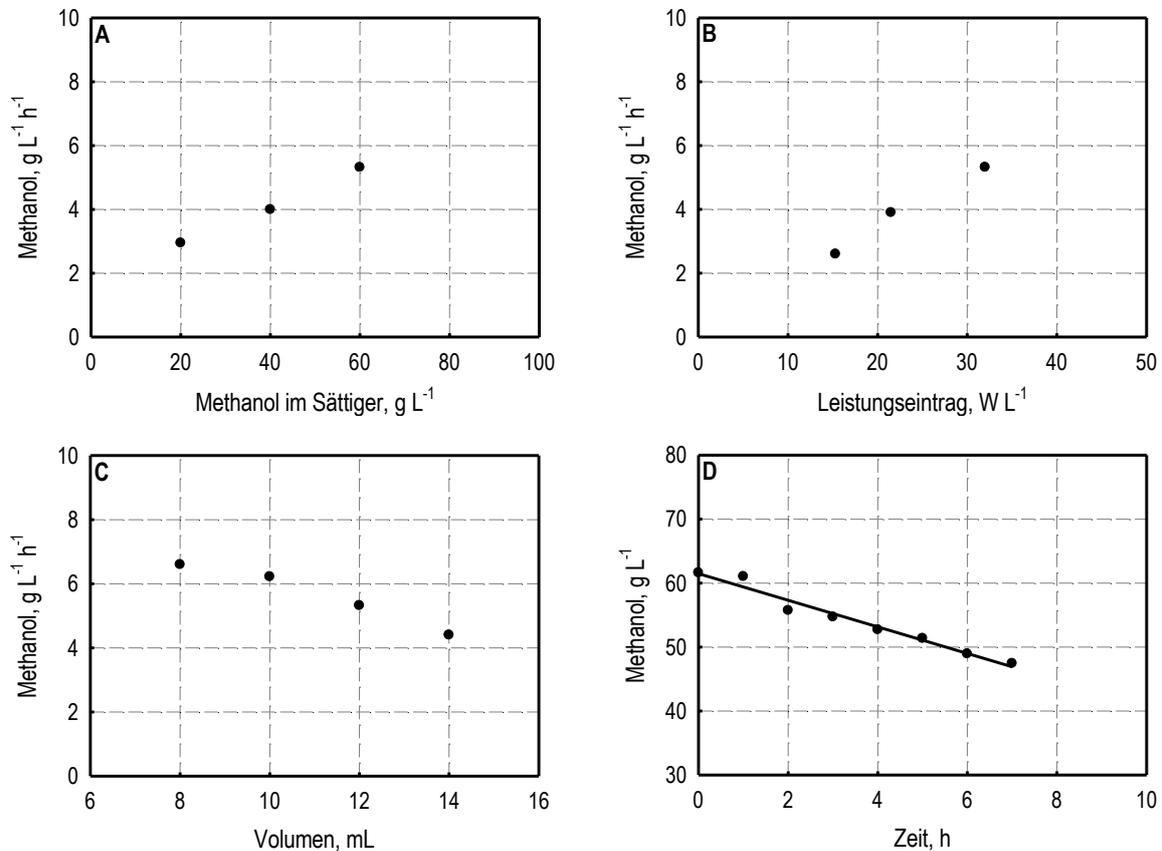


Abbildung 5.2: Charakterisierung des Methanoleintrags in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab (Anzahl der Reaktionsansätze $n = 3$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) mittels Spülung des Kopfraums der Reaktoren mit Zuluft (Gasvolumenstrom $F_{Gas} = 0,1 \text{ L min}^{-1}$ pro Reaktor) und Charakterisierung der Methanolkonzentration im Sättiger über die Prozesszeit ($n = 1$, $c_{MeOH,S} = 60 \text{ g L}^{-1}$, Raumtemperatur: $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{Gas} = 4,8 \text{ L min}^{-1}$). Dargestellt sind der Methanoleintrag bei (A) Variation der Methanolkonzentration im Sättiger $c_{MeOH,S}$ (bei konstantem $V_R = 12 \text{ mL}$ und $P_V = 32 \text{ W L}^{-1}$); (B) Variation des volumetrischen Leistungseintrags der gasinduzierenden Rührer P_V (bei konstantem $V_R = 12 \text{ mL}$ und $c_{MeOH,S} = 60 \text{ g L}^{-1}$); (C) Variation des Reaktionsvolumens V_R (bei konstantem $P_V = 32 \text{ W L}^{-1}$ und $c_{MeOH,S} = 60 \text{ g L}^{-1}$) sowie (D) die Abnahme der Methanolkonzentration im Sättiger.

Der Massentransfer von Methanol zwischen Gas- und Flüssigphase stieg wie erwartet mit zunehmender Methanolkonzentration im Sättiger, zunehmendem Leistungseintrag der gasinduzierenden Rührer und abnehmendem Reaktionsvolumen. Somit konnten Methanolzulaufraten zwischen $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ und $6,6 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ erreicht werden. Der Methanoleintrag kann weiter erhöht oder verringert werden, indem die Methanolkonzentration im Sättiger verändert wird.

Um während der Kultivierung von methylo trophen Hefen einen konstanten Methanoleintrag gewährleisten zu können, wurden die Methanolkonzentration und der Füllstand des Sättigers kontrolliert, indem eine Wasser-Methanol Lösung in die Blasensäule dosiert wurde. Die benötigten Zulaufraten konnten nicht theoretisch bestimmt werden, da sich beschriebene Henry-Konstanten für Methanol bei 23 °C signifikant unterschieden. Daher wurde über einen Zeitraum von 7 h gravimetrisch der Volumenverlust im Sättiger und zeitgleich mittels Gaschromatographie die Abnahme der Methanolkonzentration bestimmt. Dies wurde für Konzentrationen von 20 g L⁻¹ und 60 g L⁻¹ Methanol im Sättiger (siehe Abbildung 5.2 D) durchgeführt. Dabei wurden die in Tabelle 5.1 dargestellten Verdunstungsraten für Wasser und Methanol gemessen.

Tabelle 5.1: Verdunstung von Wasser und Methanol aus dem Sättiger für die Anreicherung der Zuluft von parallelen Bioreaktoren zur kontinuierlichen Zufuhr mit Methanol für Methanolkonzentrationen im Sättiger $c_{MeOH,S}$ von 20 g L⁻¹ und 60 g L⁻¹ bei einem Flüssigkeitsvolumen von 2,5 L und 23 °C.

$c_{MeOH,S}$, g L ⁻¹	Verdunstung Wasser, g h ⁻¹	Verdunstung Methanol, g h ⁻¹
20	5,33	1,94
60	7,74	4,59

So konnte die Methanolkonzentration in der Blasensäule mit einer Abweichung < 5 % über eine Prozesszeit von 50 h konstant gehalten werden, indem ein Zulauf von 7,5 mL h⁻¹ einer 29 %-igen (v/v) Methanol Lösung bei einer Methanolkonzentration von 20 g L⁻¹ im Sättiger und ein Zulauf von 12,9 mL h⁻¹ einer 40 %-igen (v/v) Methanol Lösung bei einer Methanolkonzentration von 60 g L⁻¹ im Sättiger installiert wurde. Der Füllstand der Blasensäule zeigte eine Abweichung < 2 %.

Diskussion

Mit der Implementierung eines Sättigers in die Gasversorgung von parallelen Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab konnte die kontinuierliche Methanolzufuhr über die Zuluft in die Reaktionsansätze realisiert werden. Neben dem Applikationsbeispiel Methanol kann das entwickelte Prinzip auf andere flüchtige Substanzen übertragen werden. So sind beispielsweise mikrobielle Prozesse mit Ethanol oder Propanol als Substrat bekannt (Swaaf et al. 2003; Guo et al. 2015). Des Weiteren kann die Dosierstrategie in weiteren parallelen Bioreaktoren mit aktiver Begasung eingesetzt werden. Entscheidende Vorteile dieses Dosiervorgangs im Gegensatz zu beschriebenen kontinuierlichen Dosierstrategien für miniaturisierte Bioreaktoren (Weuster-Botz et al. 2001a; Listner et al. 2006; Funke et al. 2010; Gebhardt et al. 2011) stellen der einfache Aufbau und die damit verbundenen geringen Kosten dar.

Die Massentransferrate von Methanol in die Rührkesselreaktoren zeigte wie erwartet eine Abhängigkeit von der Methanolkonzentration in der Gasphase, dem volumetrischen Leistungseintrag der gasinduzierenden Rührer und dem Reaktionsvolumen. Durch die Variation dieser Parameter konnten Zulaufraten von $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $6,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Methanol erreicht werden, welche im Bereich von Zulaufraten in technischen Prozessen mit *Komagataella pastoris* (*K. pastoris*) von etwa $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis $10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ liegen (Werten et al. 1999; Jahic et al. 2003; Eom et al. 2013). Darüber hinaus kann der Methanoleintrag ohne größeren Aufwand durch die Variation der Methanolkonzentration im Sättiger weiter erhöht oder verringert werden.

Durch die Einführung von Mess- und Regelkreisen könnte in zukünftigen Anwendungen mit diesem Dosierprinzip die Methanolzulauftrate wie in einigen technischen Anwendungen über den Sauerstoffpartialdruck oder die Methanolkonzentration im Medium (Haslacher et al. 1997; Jahic et al. 2003) geregelt werden.

5.2 Hochzelldichteprozess mit *Komagataella pastoris* DSM70382

5.2.1 Hochzelldichteprozess im Milliliter-Maßstab

Mit den für die kontinuierliche Substratdosierung erweiterten Bioreaktoren sollte ein Hochzelldichteverfahren mit der methylo trophen Hefe *K. pastoris* im Milliliter-Maßstab realisiert werden. Dabei wurde das Wachstum des Wildtyps *K. pastoris* DSM70382 betrachtet. Folgende Einschränkungen mussten beachtet werden: Die Biotrockenmassekonzentration war im bioREACTOR 48 auf ein Maximum von 50 g L^{-1} bis 60 g L^{-1} begrenzt, da bei höheren Zelldichten die Eigenfluoreszenz der Hefezellen die fluorometrische pH-Messung beeinflusst. So wurde eine mittlere Abweichung von $\text{pH } 0,22 \pm 0,20$ bei einer Biotrockenmassekonzentration von $c_X = 60 \text{ g L}^{-1}$ ($n = 8$) beobachtet. Als Abbruchkriterium für die folgenden Bioprozesse wurde eine Abweichung des fluorometrisch gemessenen pH von $\text{pH } 0,2$ gewählt. Um die Methanolzulauf rate über 24 h aufrecht erhalten zu können ohne Zelldichten über 50 g L^{-1} zu erreichen, wurde im Vergleich zu herkömmlichen Hochzelldichteverfahren mit *K. pastoris* im Labormaßstab eine geringere Glycerinkonzentration im Satzmedium (20 g L^{-1}) eingesetzt. Weiterhin konnte die Methanolzulauf rate nicht über den Sauerstoffpartialdruck oder die Methanolkonzentration im Medium geregelt werden. Um eine Akkumulation von Methanol und damit negative Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen zu vermeiden, wurde eine Adaption sphase zwischen der limitierenden Glycerinzulauf phase und der Induktionsphase mit Methanol eingeführt, damit die Enzyme des Methanolstoffwechsels vor der kontinuierlichen Methanolzufuhr exprimiert werden konnten. In Vorarbeiten zeigte sich, dass bei den gewählten Reaktionsbedingungen ($V_R = 12 \text{ mL}$ und $P_V = 32 \text{ W L}^{-1}$) eine maximale Methanolzulauf rate von $5,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gewählt werden kann, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration und des Sauerstoffpartialdrucks können Abbildung 5.3 entnommen werden.

Mit dem realisierten Bioprozess wurde nach 49,4 h eine Biotrockenmassekonzentration von $49,5 \pm 3,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die Standardabweichung der Biotrockenmassekonzentration betrug während der Kultivierung maximal 10,5 % ($n = 12$). Die Wachstumsrate konnte in der exponentiellen Wachstumsphase durch die intermittierende Zugabe von Glycerin mit einem Zugabeintervall von etwa 10 min auf $0,093 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$) geregelt werden (14 – 20 h). Der Füllstand der Reaktoren lag über die komplette Prozesszeit bei $12,0 \pm 0,2 \text{ mL}$, indem die Zugabe von Titrationsmitteln und die Substratzufuhr durch ein optimiertes Probe nahmeprotokoll ausgeglichen wurden. So konnte eine Variation des Methanoleintrags in die Bioreaktoren durch eine Veränderung der Prozessbedingungen vermieden werden. Während des unlimitierten Wachstums mit Methanol (24,0 – 30,1 h) wurde nach 26,5 h eine maximale Methanolkonzentration von $0,84 \text{ g L}^{-1}$ gemessen, die deutlich unter der für diesen Stamm inhibierenden Konzentration von 3 g L^{-1} Methanol lag, ab welcher eine Abnahme der

Wachstumsrate der methylotrophen Hefe zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde ein minimaler Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 7,3 % Luftsättigung (29,9 h) in den Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab beobachtet. Trotz des unlimitierten Wachstums der Zellen auf Methanol und eines Sauerstoffpartialdrucks unter 10 % Luftsättigung konnte keine Bildung von Nebenprodukten nachgewiesen werden. Nach einer Prozesszeit von 30,2 h war das Wachstum der Hefen substratlimitiert, da bis zum Prozessende Methanolkonzentrationen von $0,02 - 0,05 \text{ g L}^{-1}$ im Medium nachgewiesen wurden, die unter der für *K. pastoris* typischen Affinitätskonstante für Methanol von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ lagen (Jahic et al. 2002). Der pH konnte während des Bioprozesses durch die Zugabe von Ammonium (12,5 %) auf pH 6,3 geregelt werden. Aufgrund der intermittierenden Zugabe des Titrationsmittels kam es zu maximalen Schwankungen von pH 0,15 um den Sollwert. Zum Prozessende nach 49,4 h betrug die Abweichung vom Sollwert $\text{pH } 0,19 \pm 0,09$ aufgrund der Störung der fluorometrischen Sensoren durch die Eigenfluoreszenz der Zellen ($n = 12$), weshalb der Bioprozess zu diesem Zeitpunkt abgebrochen wurde.

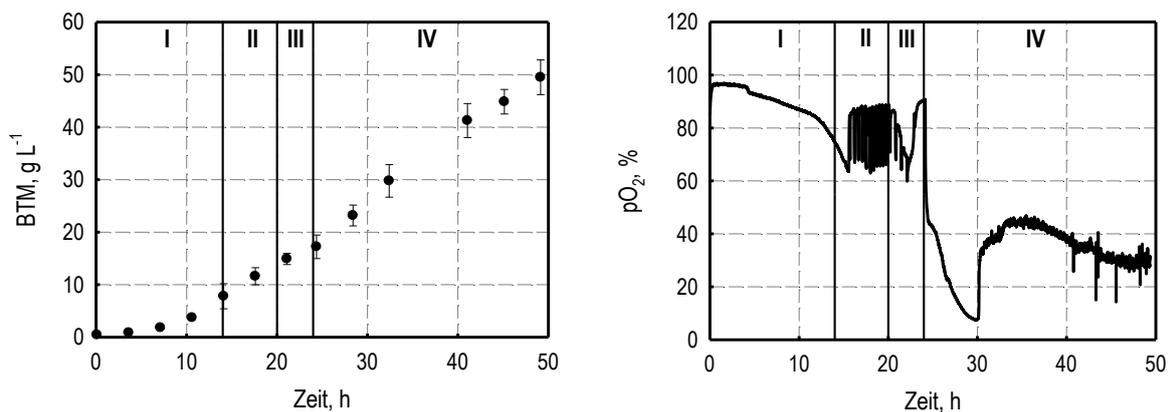


Abbildung 5.3: Biotrockenmassekonzentration (BTM) mit Standardabweichung während des Hochzell-dichteverfahrens mit *K. pastoris* DSM70382 ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,3$, $n = 12$) und ein exemplarischer Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab. Die vertikalen Linien kennzeichnen: (I) Satzphase (14 h); (II) exponentielle Glycerinzulauphase (6 h); (III) Adaptionsphase (4 h) und (IV) kontinuierliche Methanolzulauphase (25 h).

Diskussion

Mit den für die kontinuierliche Methanolzufuhr über die Gasphase modifizierten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab konnte ein Hochzell-dichteverfahren für *K. pastoris* DSM70382 mit einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von $49,5 \pm 3,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 49,4 h realisiert werden. Damit konnte eine mit Bioprocessen im technischen Maßstab vergleichbare Zelldichte nach 50 h erreicht werden (Kobayashi et al. 2000; Eom et al. 2013). Allerdings ist die Biotrockenmassekonzentration aufgrund der Beeinflussung der fluorometrischen pH-Messung der Bioreaktoren auf $50 - 60 \text{ g L}^{-1}$ beschränkt, wodurch Zelldichten $> 100 \text{ g L}^{-1}$, die für viele

technische Anwendungen von *K. pastoris* beschrieben wurden (Cereghino et al. 2002), bislang technisch nicht möglich waren. Mit der Verlängerung der Prozesszeit und der Einführung von optisch isolierten pH-Sensoren oder von neuen pH-Sensoren mit anderen Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Minimierung des Einflusses der Eigenfluoreszenz von Mikroorganismen (Janzen et al. 2015) könnte die maximal mögliche Zelldichte weiter erhöht werden. In diesem Zusammenhang wäre auch der Einsatz von kürzlich entwickelten pH-Sensoren mit einem Messbereich im Sauren von Vorteil. So könnte der pH im Reaktionsansatz auf pH 4,0 – 5,5 reduziert werden (Janzen et al. 2015), bei dem viele herkömmliche Zulaufprozesse mit *K. pastoris* durchgeführt werden (Jahic et al. 2003; Eom et al. 2013).

Mit dem etablierten Hochzelldichteverfahren konnte erstmals gezeigt werden, dass parallele Bioreaktoren für Untersuchungen des Wachstums von methylotrophen Hefen unter technischen Bedingungen im Milliliter-Maßstab eingesetzt werden können. Dabei stellt die Einführung der kontinuierlichen Zufuhr von Methanol über die Gasphase den entscheidenden Vorteil im Gegensatz zu bisher für die Durchmusterung von methylotrophen Hefen verwendeten miniaturisierten Bioreaktoren dar (Cereghino und Cregg 2000; Cereghino et al. 2002). Des Weiteren kann der pH eines jeden Reaktors individuell geregelt werden und der Zulauf von Glycerin mit dem Laborroboter sowie das Reaktionsvolumen der Reaktoren und damit der Methanoleintrag für die einzelnen Bioreaktoren variiert werden. So können die miniaturisierten Bioreaktoren in der Bioprozessentwicklung für die parallele Optimierung von Prozessparametern wie pH und Glycerin- oder Methanolzulaufstrategien verwendet werden.

5.2.2 Maßstabsübertragung

Um die direkte Übertragbarkeit des in Kapitel 5.2.1 etablierten Hochzelldichteverfahrens mit *K. pastoris* DSM70382 in den technischen Maßstab zu überprüfen, wurden Zulaufverfahren im Labor- und Pilotmaßstab durchgeführt. Dabei diente die maximale Sauerstofftransferrate der Reaktoren im Milliliter-Maßstab ($OTR_{max} = 230 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) als Kriterium für die Maßstabsübertragung. Ein Vergleich der Prozessverläufe im 12 Milliliter-, 3 Liter- und 1 000 Liter-Maßstab ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

Dabei konnte unter Berücksichtigung der Messfehler sowohl eine Übereinstimmung der Verläufe als auch der Endwerte der Biotrockenmassekonzentrationen im 12 Milliliter-, 3 Liter- und 1 000 Liter-Maßstab beobachtet werden. Im 1 000 Liter-Maßstab setzte das substratlimitierte Wachstum in der exponentiellen Glycerinzulaufphase, das durch den plötzlichen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks nach 18,2 h gekennzeichnet ist, im Vergleich zu den beiden anderen Maßstäben etwas verspätet ein. Dies kann mit dem veränderten Protokoll zur Vorkulturherstellung in diesem Maßstab begründet werden. Der Sauerstoffpartialdruck im 1 000 Liter-Maßstab schwankte nach 35 h aufgrund von nicht

optimalen Einstellungen des verwendeten Reglers. Nach dem Einsetzen der Variationen des pO_2 war das Wachstum der Zellen im 1 000 Liter-Maßstab leicht verzögert.

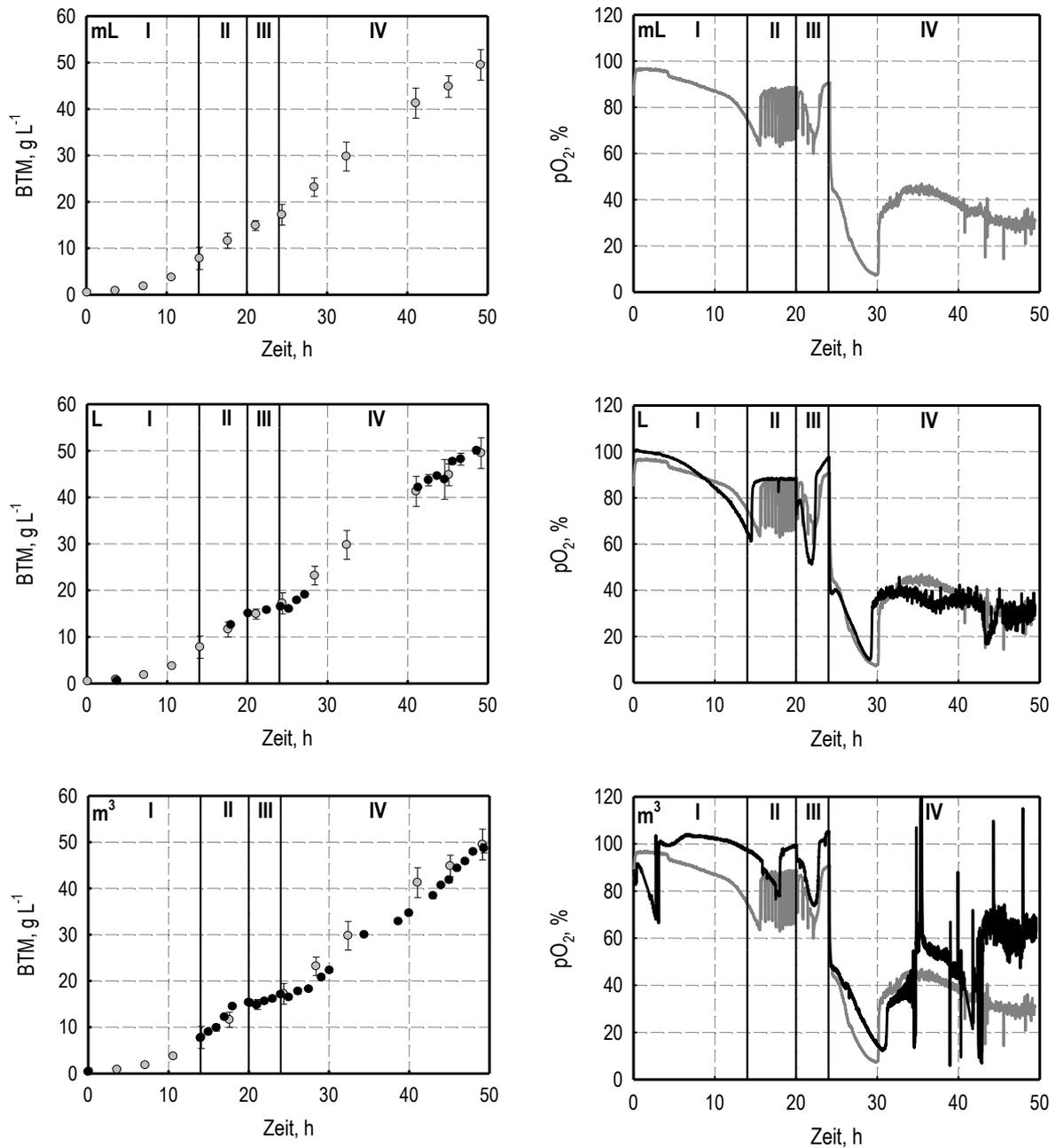


Abbildung 5.4: Biotrockenmassekonzentration (BTM) mit Standardabweichung während des Hochzelldichteverfahrens mit *K. pastoris* DSM70382 ($T = 30\text{ °C}$, $pH\ 6,3$) im 12 Milliliter- (mL, ●, $n = 12$), 3 Liter- (L, ●) und 1 000 Liter-Maßstab (m^3 , ●) und der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) im 12 Milliliter- (mL, grau), 3 Liter- (L, schwarz) und 1 000 Liter-Maßstab (m^3 , schwarz). In den Darstellungen der BTM und des pO_2 im Liter- und 1 000 Liter-Maßstab sind für den Vergleich mit dem Bioprozess im Milliliter-Maßstab jeweils die Daten aus den Prozessen im Milliliter-Maßstab in grau hinterlegt. Die vertikalen Linien kennzeichnen: (I) Satzphase (14 h); (II) exponentielle Glycerinzulaufphase (6 h); (III) Adaptionsphase (4 h) und (IV) Methanolzulaufphase (25 h).

Die Methanolkonzentration im Medium während des unlimitierten Wachstums mit Methanol (24 – 32 h) lag in allen Maßstäben unter der für den verwendeten Stamm inhibitorischen Konzentration von 3 g L^{-1} . Nach 32 h trat in allen Bioreaktoren substratlimitiertes Wachstum auf, da Methanolkonzentrationen $< 0,05 \text{ g L}^{-1}$ gemessen wurden, die deutlich unter der Affinitätskonstante von Methanol für *K. pastoris* von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ lagen (Jahic et al. 2002).

Diskussion

Mit dem entwickelten Hochzelldichteverfahren für *K. pastoris* DSM70382 konnte die direkte Übertragbarkeit des Wachstums der methylotrophen Hefe von Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab in den Liter- und den Kubikmeter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransfertrate als Übertragungskriterium gezeigt werden. Die Unterschiede bei der Zufuhr des flüchtigen Substrates Methanol (über die Gasphase im Milliliter-Maßstab und über die Flüssigphase im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) sowie der Einsatz verschiedener Arten von Rührern in den drei Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) zeigten dabei keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen.

Somit können zukünftig durch den Einsatz der modifizierten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab der Aufwand und die Kosten für die Durchmusterung von methylotrophen Hefen sowie für die folgende Bioprozessentwicklung deutlich reduziert werden.

5.3 Herstellung von *Candida antarctica* Lipase B mit *Pichia pastoris* CaL-B2

Nachdem in Kapitel 5.2 die Eignung des für die kontinuierliche Zufuhr von Methanol erweiterten bioREACTOR 48 zur Untersuchung des Wachstums von *K. pastoris* unter technischen Bedingungen gezeigt werden konnte, sollte in der Folge die Möglichkeit der Herstellung von rekombinanten Proteinen mit methylotrophen Hefen in miniaturisierten Bioreaktoren evaluiert werden. Hierfür sollten ein Prozess zur Produktion des Enzyms *Candida antarctica* Lipase B2 (CaL-B2) mit *Pichia pastoris* CaL-B2 im Milliliter-Maßstab entwickelt werden und anschließend eine Maßstabsübertragung bis zum Kubikmeter-Maßstab vorgenommen werden.

5.3.1 Herstellung von *Candida antarctica* Lipase B im Milliliter-Maßstab

Für die Herstellung von CaL-B2 mit *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) wurde das in Kapitel 5.2.1 dargestellte Hochzelldichteverfahren mit *Komagataella pastoris* DSM70382 verändert. So wurde die initiale Glycerinkonzentration im Satzmedium auf 30 g L^{-1} erhöht, um höhere Zelldichten vor der Induktion der Produktbildung mit Methanol zu erhalten. Die substratlimitierte Glycerinzulaufphase wurde übersprungen, um die Prozesszeit zu verkürzen. So folgte direkt auf die Satzphase eine Adaptionsphase mit der Zugabe von 3 g L^{-1} Glycerin und 3 g L^{-1} Methanol. Außerdem wurden $7,3 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben, um eine Ammoniumkonzentration von 1 g L^{-1} bis 3 g L^{-1} und damit eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Stickstoff während der Produktionsphase aufrechterhalten zu können. Da der verwendete Stamm eine geringere Methanolaufnahmerate als der Wildtyp-Stamm *K. pastoris* DSM70382 aufwies (Daten nicht gezeigt), wurde die initiale Methanolzulaufphase auf $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ reduziert, um eine Akkumulation von Methanol nach der Adaptionsphase bei niedrigen Zelldichten zu vermeiden. Nach 14 h wurde die Zulaufphase auf $5,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erhöht. Die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration und der Aktivität der Lipase können Abbildung 5.5 entnommen werden.

Nach einer Prozesszeit von 69 h wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $59,4 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Vor der Induktion der Produktion von CaL-B2 mit der Zugabe von 3 g L^{-1} Methanol zu Beginn der Adaptionsphase (27 h) wurde nur eine geringe Lipaseaktivität von 640 U L^{-1} gemessen, die nach der kontinuierlichen Dosierung von $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Methanol auf 5714 U L^{-1} zunahm. Nach der Erhöhung der Methanolzulaufphase auf $5,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konnte weiter ein deutlicher Anstieg der Aktivität auf 16604 U L^{-1} zum Prozessende nach 69 h beobachtet werden. Dies entsprach einer Enzymkonzentration von $1,03 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ und somit einer spezifischen Enzymaktivität von $16,1 \text{ U mg}^{-1}$.

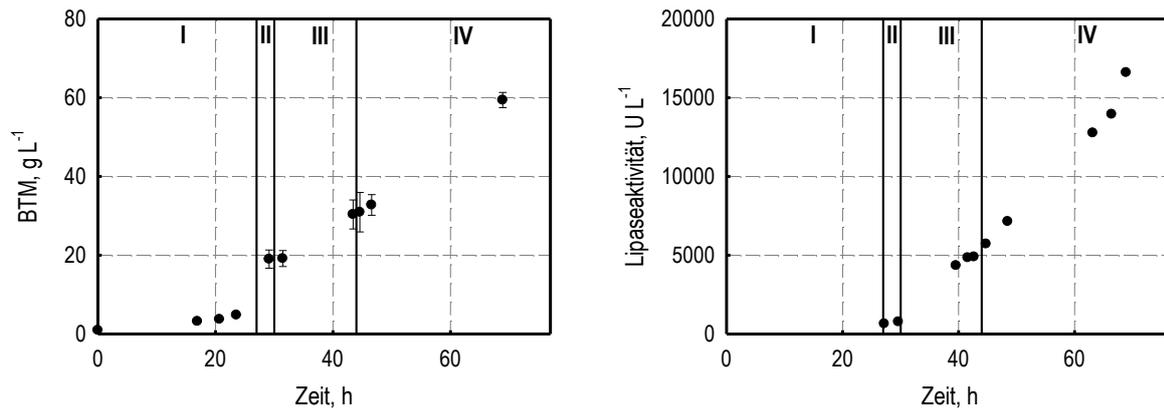


Abbildung 5.5: Biotrockenmassekonzentration (BTM) mit Standardabweichung und Lipaseaktivität während der Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 ($T = 30\text{ °C}$, $\text{pH } 6,5$, $n = 3$) im 12 Milliliter-Maßstab. Die vertikalen Linien kennzeichnen: (I) Satzphase (27 h); (II) Adaptionsphase (3 h); (III) Methanolzulauf $3\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ (14 h) und (IV) Methanolzulauf $5,3\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ (25 h).

Der pH konnte während des Bioprozesses durch die Zugabe von Ammonium (12,5 %) auf pH 6,5 geregelt werden. Aufgrund der intermittierenden Zugabe des Titrationsmittels kam es zu maximalen Schwankungen von pH 0,15 um den Sollwert. Zum Prozessende betrug die Abweichung des Messwerts $\text{pH } 0,20 \pm 0,05$ wegen der Störung der fluorometrischen Sensoren durch die Eigenfluoreszenz der Zellen ($n = 3$), weshalb der Bioprozess zu diesem Zeitpunkt abgebrochen wurde.

Durch die Verringerung der initialen Methanolzulauftrate nach der Adaptionsphase trat bereits ab dem Start der Produktionsphase substratlimitiertes Wachstum auf, da die gemessenen Methanolkonzentrationen ($< 0,04\text{ g L}^{-1}$) unterhalb der für *P. pastoris* typischen Affinitätskonstante für Methanol von $0,1\text{ g L}^{-1}$ lagen (Jahic et al. 2002). So wurde ein minimaler Sauerstoffpartialdruck von 20 % Luftsättigung nicht unterschritten, wodurch über den gesamten Prozessverlauf eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet werden konnte. Mit einer Ammoniumkonzentration zwischen $0,8\text{ g L}^{-1}$ und $1,6\text{ g L}^{-1}$ ab der Adaptionsphase (27 h) konnte eine Stickstofflimitierung der Hefen während der Produktion von CaL-B2 ausgeschlossen werden.

Diskussion

Der Vergleich des neu etablierten Verfahrens zur Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 mit einem von Eom et al. (2013) vorgestellten Prozess zur Produktion einer Lipase B aus *Candida antarctica* zeigte, dass die nach 69 h erreichte Biotrockenmassekonzentration von $59,4 \pm 1,9\text{ g L}^{-1}$ deutlich unter der beschriebenen von etwa 95 g L^{-1} lag. Die Enzymkonzentration von $1,03 \pm 0,08\text{ g L}^{-1}$ entsprach jedoch nahezu der veröffentlichten Endkonzentration an *Candida antarctica* Lipase B (CaLB) von $1,18\text{ g L}^{-1}$ nach einer Prozesszeit von 110 h. Damit konnte die beschriebene Raum-Zeit-Ausbeute von $10,7\text{ mg L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ auf

14,9 mg L⁻¹ h⁻¹ gesteigert werden. Mit einer spezifischen Aktivität von 16,1 U mg⁻¹ mit dem Substrat p-Nitro-phenol Butyrat zeigte die hier produzierte Lipase eine um den Faktor 1,5 erhöhte spezifische Aktivität im Vergleich zu einer Wildtyp-CalB, die mit *E. coli* hergestellt wurde (Blank et al. 2006). Die erhöhte Aktivität ist auf den gezielten Austausch von vier Aminosäuren zurückzuführen (persönliche Mitteilung Ansgar Stratmann, W42 Industrial Biotechnology GmbH, am 16.03.2016).

Die Verläufe der Biotrockenmasse sowie der Lipaseaktivität lassen darauf schließen, dass bei einer Verlängerung der Prozesszeit höhere Werte für beide Prozessgrößen erzielt werden könnten, was allerdings aufgrund der Beeinflussung der fluorometrischen pH-Messung der Bioreaktoren ab einer Zelldichte von 50 – 60 g L⁻¹ nicht überprüft werden konnte.

Mit der Etablierung eines Hochzelldichteverfahrens zur Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 konnte somit gezeigt werden, dass die verwendeten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab im Gegensatz zu weiteren miniaturisierten Bioreaktoren (Cereghino und Cregg 2000; Cereghino et al. 2002) für die Durchmusterung einer Bibliothek von methylotrophen Hefen zur Herstellung rekombinanter Proteine unter technischen Bedingungen verwendet werden kann. Weiter konnte mit der Anpassung eines Hochzelldichteverfahrens zur Biomassebildung des Wildtyp-Stammes *K. pastoris* DSM70382 (siehe Kapitel 5.2.1) an die Anforderungen des gentechnisch veränderten Stammes *P. pastoris* CaL-B2 verdeutlicht werden, dass die parallelen Bioreaktoren durch die individuelle Anpassung von pH und Zulaufprofilen in den einzelnen Reaktoren für die Entwicklung und Verbesserung von Bioprozessen mit methylotrophen Hefen geeignet ist.

5.3.2 Maßstabsübertragung

Um die Skalierbarkeit des in Kapitel 5.3.1 gezeigten Hochzelldichteverfahrens zur Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* zu evaluieren, wurden Zulaufverfahren im Labor- und Pilotmaßstab mit der maximalen Sauerstofftransferrate der Reaktoren im Milliliter-Maßstab ($OTR_{max} = 230 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) als Übertragungskriterium durchgeführt. Ein Vergleich der Prozessverläufe im 12 Milliliter-, 2 Liter- und 1 000 Liter-Maßstab ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

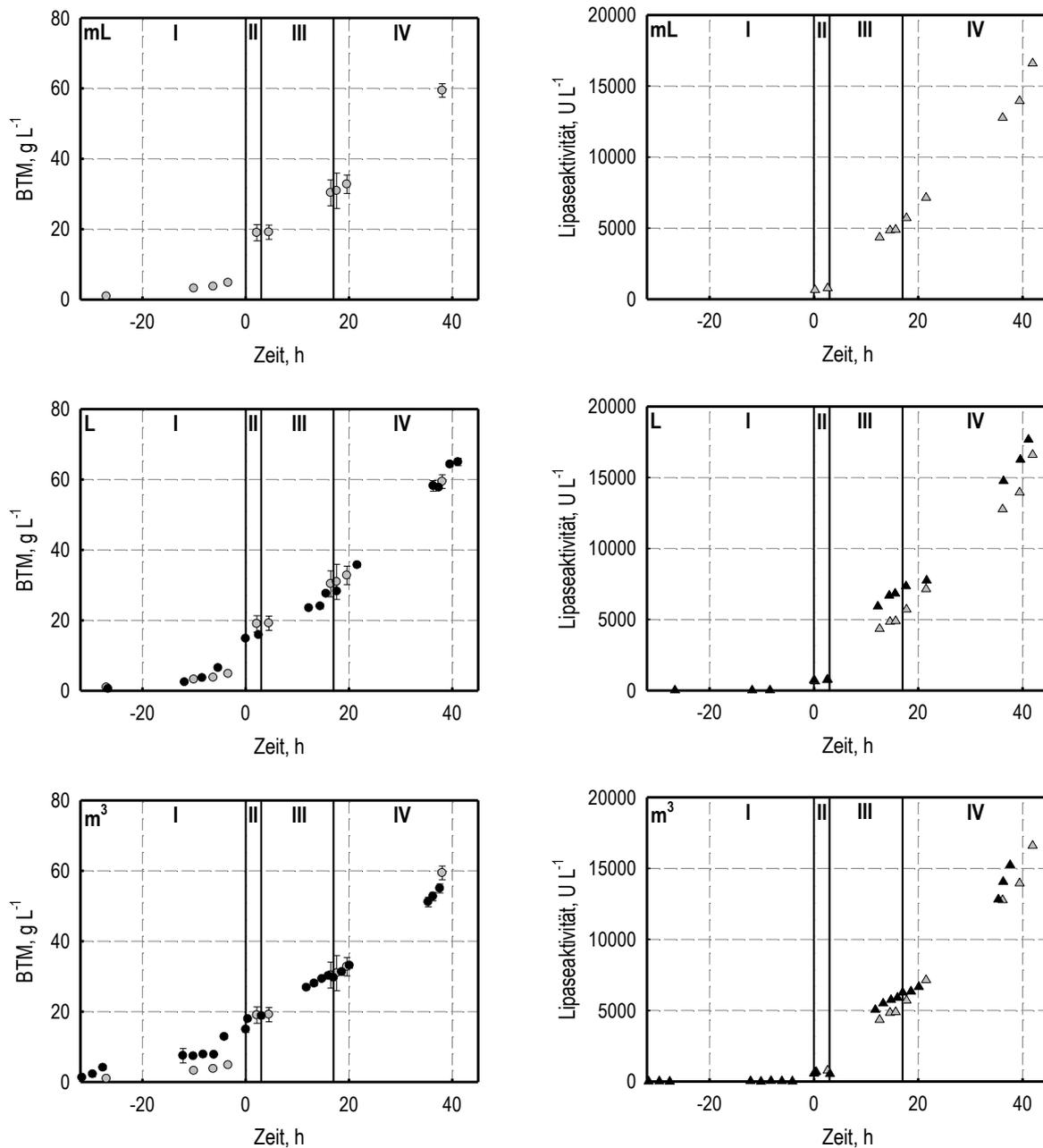


Abbildung 5.6: Biotrockenmassekonzentration (BTM) mit Standardabweichung und Lipaseaktivität während der Herstellung von *Candida antarctica* Lipase B2 (CaL-B2) mit *P. pastoris* CaL-B2 ($T = 30\text{ °C}$, pH 6,5) im 12 Milliliter- (mL, ●, ▲, $n = 12$), 3 Liter- (L, ●, ▲) und 1 000 Liter-Maßstab (m^3 , ●, ▲). In den Darstellungen der BTM und der Lipaseaktivität im Liter- und 1 000 Liter-Maßstab sind für den Vergleich mit dem Bioprozess im Milliliter-Maßstab jeweils die Daten aus den Prozessen im Milliliter-Maßstab in grau hinterlegt. Die vertikalen Linien kennzeichnen: (I) Satzphase (variabel bis zum kompletten Verbrauch des Glycerins im Satzmedium); (II) Adaptionsphase (3 h); (III) kontinuierliche Methanolzulaufphase (3 g L⁻¹ h⁻¹, 14 h) und (IV) kontinuierliche Methanolzulaufphase (5,3 g L⁻¹ h⁻¹, 25 h). Die Prozesszeit wurde zum Beginn der Adaptionsphase auf null gesetzt, da die Prozesszeit der Satzphase zwischen den Maßstäben variierte.

Die Zulaufprozesse in den drei Bioreaktoren zeigten in Bezug auf den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration im Rahmen der Messgenauigkeit eine hohe Übereinstimmung. Die Abweichungen der Biotrockenmassekonzentration im 1 000 Liter-Maßstab während der Satzphase können mit der Messungenauigkeit der gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse bei geringen Zelldichten durch präzipitierte Salze des Mediums begründet werden (Brady et al. 2001). Im Verlauf einer Kultivierung nimmt der Anteil an ungelösten Medienkomponenten und somit deren Einfluss auf die Messung aufgrund der Aufnahme von gelösten Salzen durch die wachsenden Zellen ab. Die Präzipitation von Komponenten des Mediums könnte durch die Verwendung von Salzen technischer Qualität im 1 000 Liter-Maßstab durch auftretende Unreinheiten verstärkt worden sein. So waren die Biotrockenmassekonzentrationen zum Prozessende im Milliliter-Maßstab 39 h nach der Induktion im Rahmen der Messgenauigkeit mit $55 - 59 \text{ g L}^{-1}$ in den drei Maßstäben vergleichbar.

Sowohl der Verlauf als auch die erreichten finalen Werte der Lipaseaktivität (LA) zeigten im Rahmen der Messgenauigkeit eine hohe Übereinstimmung in den drei Maßstäben. Ebenso verhielt es sich mit den erreichten Enzymkonzentrationen und den spezifischen Lipaseaktivitäten (SLA). Die leicht reduzierten Endwerte der Enzymkonzentration und der Lipaseaktivität im 1 000 Liter-Maßstab resultierten aus einer um etwa 4 h verkürzten Produktionsphase (siehe Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Erreichte CaL-B2 Konzentration, Lipaseaktivität (LA) und spezifische Lipaseaktivität (SLA) bei der Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* im 12 Milliliter-, 2 Liter- und 1 000 Liter-Maßstab.

Maßstab	Produktionszeit, h	CaL-B2, g L^{-1}	LA, U L^{-1}	SLA, U mg^{-1}
12 mL	41,9	$1,03 \pm 0,08$	16 604	$16,1 \pm 1,20$
2 L	41,1	$1,11 \pm 0,07$	17 677	$15,9 \pm 0,09$
1 000 L	37,6	$0,95 \pm 0,01$	15 243	$16,1 \pm 0,01$

Durch die Verringerung der initialen Methanolzulauftrate nach der Adaptionphase trat bereits ab dem Start der Produktionsphase in allen Maßstäben substratlimitiertes Wachstum auf, da die gemessenen Methanolkonzentrationen ($< 0,06 \text{ g L}^{-1}$) unterhalb der für *P. pastoris* typischen Affinitätskonstante für Methanol von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ lagen (Jahic et al. 2002). Dabei wurde ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % Luftsättigung in den drei Bioreaktoren nicht unterschritten, wodurch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet werden konnte. Mit einer Ammoniumkonzentration zwischen $0,8 \text{ g L}^{-1}$ und $2,6 \text{ g L}^{-1}$ ab der Adaptionphase konnte eine Ammoniumlimitierung der Hefen während der Produktion von CaL-B2 in allen Maßstäben ausgeschlossen werden.

Diskussion

Die direkte Übertragbarkeit von Bioprozessen zur effizienten Herstellung von rekombinanten Proteinen mit methylotrophen Hefen vom 12 Milliliter- bis zum 1 000 Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransferrate als Übertragungskriterium konnte am Beispiel der Herstellung von CaL-B2 mit *P. pastoris* CaL-B2 gezeigt werden. Die Unterschiede bei der Zufuhr des flüchtigen Substrates Methanol (über die Gasphase im Milliliter-Maßstab und über die Flüssigphase im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) sowie der Einsatz verschiedener Arten von Rührern in den drei Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) zeigten dabei keine signifikanten Auswirkungen auf den Verlauf des Bioprozesses.

Somit können zukünftig durch den Einsatz der modifizierten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab der Aufwand und die Kosten für die Durchmusterung von methylotrophen Hefen für die effiziente Herstellung rekombinanter Proteine sowie für die folgende Bioprozessentwicklung deutlich reduziert werden. So können diese Untersuchungen erstmals in parallelisierten Ansätzen im Milliliter-Maßstab bei hohen Zelldichten, kontrollierten Prozessbedingungen und mit kontinuierlicher Methanolzugabe erfolgen.

6 Parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab*

Der Betrieb von Bioreaktoren als Chemostaten ermöglicht die physiologische Charakterisierung von Zellen bei definierten und kontrollierten Bedingungen im Fließgleichgewicht. Die wesentlichen Nachteile von Chemostaten stellen der zeitintensive experimentelle Ablauf und der hohe Substratverbrauch dar. Letzterer ist vor allem bei der Verwendung teurer, isotonenmarkierter Substrate problematisch. Diese Einschränkungen können im Allgemeinen durch die Miniaturisierung und Parallelisierung der verwendeten Bioreaktoren überwunden werden. Bislang wurden jedoch nur wenige für den kontinuierlichen Betrieb geeignete miniaturisierte Bioreaktoren entwickelt. Die bestehenden Bioreaktoren weisen zudem meist geringe Sauerstofftransferraten auf, wodurch die maximal erreichbaren Biotrockenmassekonzentrationen und die Substratzulaufzeiten limitiert sind. Des Weiteren sind oftmals die unzureichende Prozesskontrolle und das geringe Reaktionsvolumen, welches die Probenahme einschränkt, von Nachteil.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit bestehende parallele Bioreaktoren (bioREACTOR 48) für den kontinuierlichen Betrieb im Milliliter-Maßstab erweitert werden. Insbesondere der hohe volumetrische Sauerstofftransportkoeffizient von bis zu $0,4 \text{ s}^{-1}$, die ausgezeichnete Prozesskontrolle mit der Regelung des pH sowie der Messung des Sauerstoffpartialdrucks ($p\text{O}_2$) und der hohe Automatisierungsgrad durch die Integration in einen Laborroboter sind Vorteile dieses Kultivierungssystems gegenüber anderen miniaturisierten Bioreaktoren. In dieser Arbeit sollte der kontinuierliche Betrieb von acht Bioreaktoren ermöglicht werden. Das entwickelte Prinzip für den simultanen Zu- und Ablauf der Reaktoren sollte sowohl für den kommerziell erhältlichen bioREACTOR 8 mit acht parallelen Bioreaktoren anwendbar sein als auch durch einen modularen Aufbau auf bis zu 48 Reaktoren des bioREACTOR 48 erweitert werden können.

Im Folgenden wird die Erweiterung der bestehenden Bioreaktoren und deren verfahrenstechnische Charakterisierung für die chemostate Betriebsweise vorgestellt. Anschließend wird auf die kontinuierliche Kultivierung des Modellorganismus *E. coli* zur Untersuchung des Wachstums und der Herstellung des fotoaktivierbaren Fluoreszenzproteins PAmCherry (*photactivatable* mCherry, fotoaktivierbares mCherry) eingegangen. Dabei stehen vor allem die parallele und sequentielle Reproduzierbarkeit sowie die Skalierbarkeit der Ergebnisse in den Labormaßstab im Vordergrund.

* Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in: Schmideder A, Severin TS, Cremer J, 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.

6.1 Kontinuierlicher Betrieb von parallelen Rührkesselreaktoren

Bei der Erweiterung des bioREACTOR 48 für den kontinuierlichen Betrieb mussten einige Voraussetzungen beachtet werden. So musste für das Erreichen eines stabilen Fließgleichgewichtszustandes eine vollständig kontinuierliche Dosierung realisiert werden, das heißt eine Zu- und Abfuhr von Medium mit dem Laborroboter konnte aufgrund der intermittierenden Betriebsweise nicht gewählt werden. Dabei sollten sowohl sehr niedrige als auch hohe Dosieraten möglich sein. Des Weiteren sollten die eingebrachten Veränderungen weiterhin einen Zugang der Pipettiernadeln des Laborroboters für die automatisierte pH-Regelung, Probenahme sowie Zugabe von weiteren Flüssigkeiten wie zum Beispiel Induktorlösungen erlauben. Da über die lange Laufzeit von kontinuierlichen Kultivierungen oftmals Kontaminationen auftreten, musste ein besonderes Augenmerk auf eine aseptische Betriebsweise gelegt werden. Dabei stellen oftmals nicht nur externe Kontaminationen ein Problem dar, sondern es kann auch zum Wachstum der Zellen durch die Dosierleitung aus dem Reaktor in die Medienvorlagegefäße kommen.

Unter Berücksichtigung der dargelegten Voraussetzungen wurde der bioREACTOR 48 erweitert, wie in Abbildung 6.1 dargestellt. Der Zu- und Ablauf von Medium wurde mit kontinuierlich fördernden, peristaltischen Pumpen realisiert. Hierfür wurde ein Aufsatz aus Polyetheretherketon konstruiert, der in die Abgaseinheit der Bioreaktoren integriert werden kann. Dieser weist eine Öffnung für die Pipettiernadeln (Durchmesser 3,5 mm) und für zwei gebogene Winkelrohre (Durchmesser 0,5 mm) auf. Folglich konnte zum einen die Automatisierung der Rührkesselreaktoren mit einem Laborroboter für pH-Regelung, Probenahme und Zugabe von weiteren Lösungen gewährleistet werden. Zum anderen konnte über ein Winkelrohr, das 1 cm in den Reaktionsansatz eintauchte, der Zulauf von Medium direkt in den Reaktionsansatz realisiert werden. Dies verhinderte eine Tropfenbildung am Auslass des Winkelrohrs bei niedrigen Dosieraten und hatte eine vollständig kontinuierliche Medienzufuhr zur Folge. Das zweite Winkelrohr für den Ablauf wurde auf einer definierten Höhe fixiert, um ein konstantes Reaktionsvolumen von 10 mL bei einer Rührerdrehzahl von $3\,000\text{ U min}^{-1}$ zu erreichen. Mit den eingesetzten Pumpen (Mehrkanalschlauchpumpe MP8, DASGIP, Jülich, Deutschland; Mehrkanalschlauchpumpe Reglo ICC, IDEX, Wertheim, Deutschland) und Pumpschläuchen (0,25 mm oder 0,50 mm Innendurchmesser, siehe Tabelle A.10) war ein konstanter Volumenstrom von $0,8 - 100\text{ mL h}^{-1}$ mit Glucoselösungen (maximal 100 g L^{-1}) über Prozesszeiten bis zu einer Woche möglich. Das entsprach bei einem Reaktionsvolumen von 10 mL Verdünnungsraten von $0,08\text{ h}^{-1} \leq D \leq 10\text{ h}^{-1}$. Des Weiteren konnte eine individuelle Sterilisation der Dosierleitung durchgeführt werden. Durch den Austritt des Prozessgases über die Pipettieröffnungen im Deckel des bioREACTOR 48 werden Kontaminationen der einzelnen Reaktoren durch die Gasphase verhindert. Ein Wachstum von

Zellen durch die Dosierleitung aus dem Reaktor in die Mediovorlagegefäße sollte durch den geringen Innendurchmesser der Winkelrohre von 0,25 mm und einer damit verbundenen hohen Leerrohrgeschwindigkeit (minimal $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ bei $0,8 \text{ mL h}^{-1}$) verhindert werden.

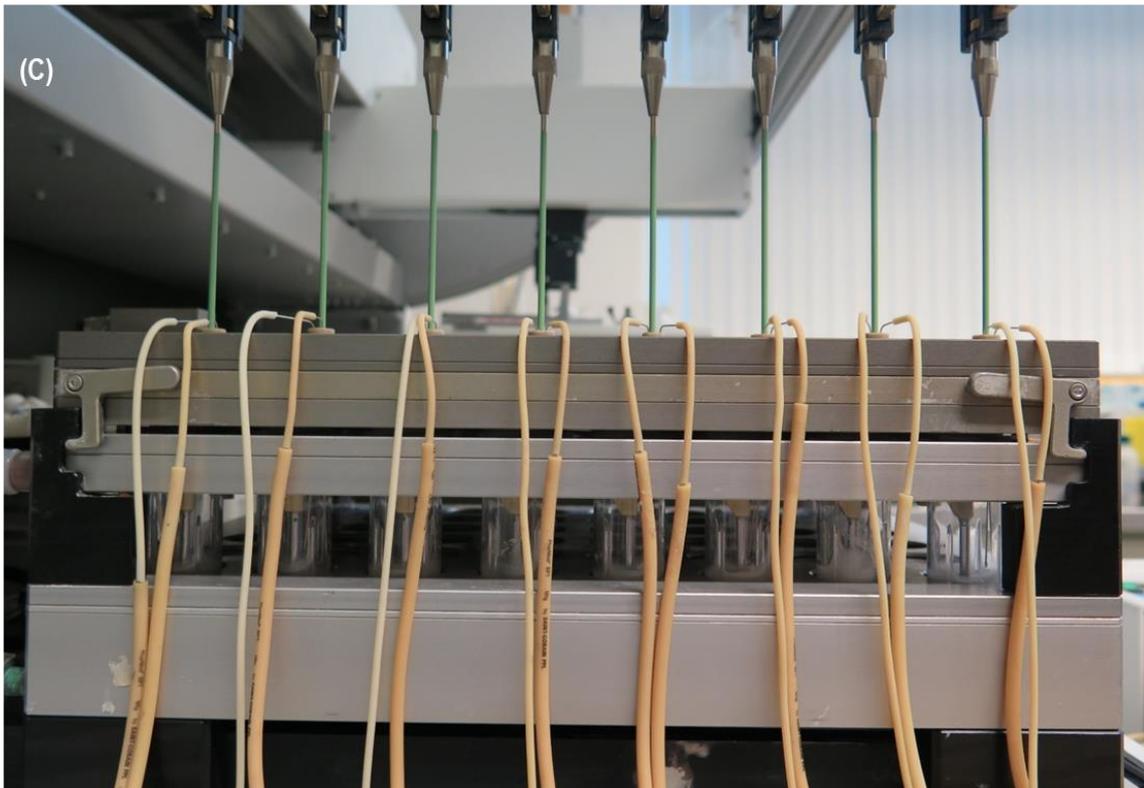
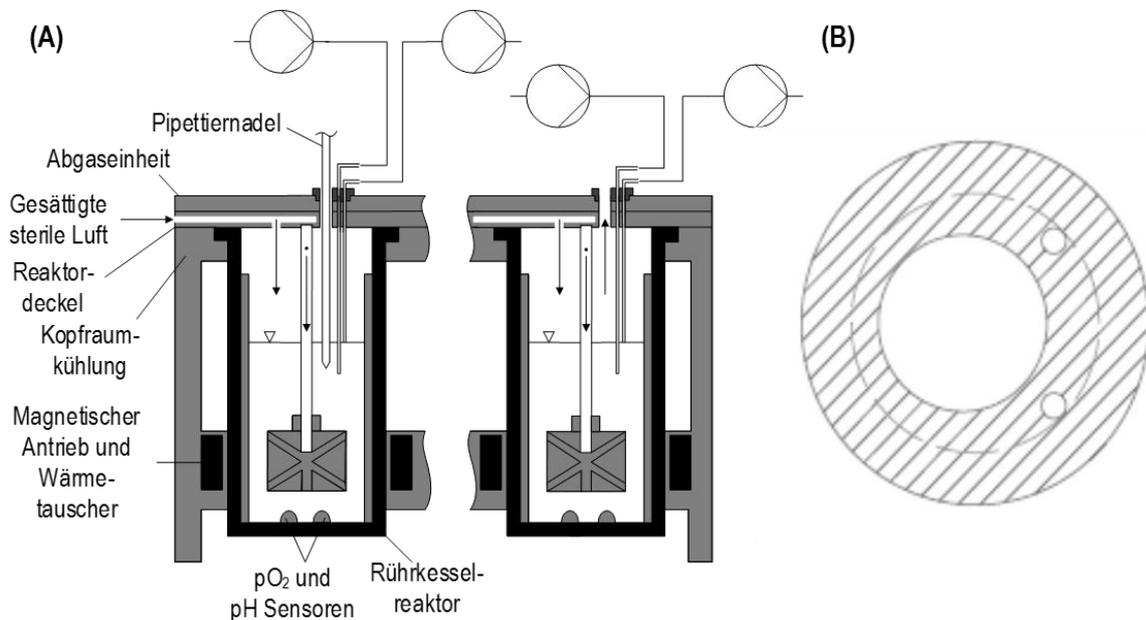


Abbildung 6.1: (A) Schematische Darstellung des Aufbaus der neuen Bioreaktoren. Dabei sind zwei von acht Einheiten gezeigt. (B) Aufsicht des konstruierten Aufsatzes, der in die Abgaseinheit des Bioreaktorblocks integriert werden kann. Er weist Öffnungen für die Pipettieradeln des Laborroboters (3,5 mm Durchmesser) und zwei gebogene Winkelrohre (Durchmesser 0,5 mm) für den Zu- und Ablauf des Mediums auf. (C) Foto der modifizierten Bioreaktoren im achtfach parallelen Betrieb.

Neben den eingeführten Modifikationen für den kontinuierlichen Betrieb der miniaturisierten Bioreaktoren konnte auf die bestehende Mess- und Regelungstechnik des bioREACTOR 48 zurückgegriffen werden. Dabei werden nach dem Prozessstart über fluorometrische Sensoren automatisiert der pO_2 und der pH der Reaktoren aufgezeichnet. Der pH in jedem Reaktor kann individuell durch die intermittierende Zugabe von minimal 10 μL an Titrationsmitteln (entspricht 0,10 % des Reaktionsvolumens) auf pH 6,0 bis pH 8,5 geregelt werden. Weiter wird die Temperatur des Reaktionsansatzes über einen integrierten Wärmetauscher kontrolliert. Um die in vorangegangenen Arbeiten trotz der Kühlung des Kopfraums über einen weiteren Wärmetauscher beobachtete Verdunstung des Reaktionsansatzes zu vermeiden, wurde eine mit Wasser gefüllte, gerührte 1 L-Glasflasche in die Zuluftleitung integriert. In diese wurde die Zuluft über ein Begasungsrohr eingebracht und so die Zuluft mit Wasser aufgesättigt (23 °C). Durch die Kühlung des Abgasstroms auf 20 °C wurde die Verdunstung auf 5 $\mu\text{L h}^{-1}$ pro Reaktor minimiert (entspricht 0,05 % des Reaktionsvolumens) und konnte in der Folge vernachlässigt werden. Für externe Analysen des Reaktionsansatzes wurden automatisiert maximal 200 μL Probevolumen entnommen (entspricht 2,00 % des Reaktionsvolumens).

Diskussion

Mit den eingeführten Modifikationen konnten acht Reaktoren des bioREACTOR 48 parallel für den kontinuierlichen Betrieb eingesetzt werden. Durch die Nutzung von peristaltischen Pumpen konnte eine kontinuierliche Dosierung gewährleistet werden, was eine Grundvoraussetzung für das Erreichen eines stabilen Fließgleichgewichtszustandes war. Dabei kann in jedem der acht Reaktoren individuell eine Verdünnungsrate zwischen 0,08 h^{-1} bis 10 h^{-1} eingestellt werden, was den Großteil an möglichen Wachstumsraten von aeroben Mikroorganismen abdeckt. Des Weiteren können die Bioreaktoren auch für schnellere Reaktionen wie beispielsweise enzymatische Umsetzungen eingesetzt werden. Eine weitere Erhöhung der Verdünnungsrate könnte durch den Einsatz von Pumpleitungen mit Innendurchmessern $> 0,50 \text{ mm}$ erreicht werden. Der von den Herstellern (IDEX, Wertheim, Deutschland beziehungsweise DASGIP, Jülich, Deutschland) angegebene maximale Volumenstrom für die verwendeten Pumpen beträgt 2 100 mL h^{-1} beziehungsweise 420 mL h^{-1} . Das Konzept kann durch den modularen Aufbau einfach auf bis zu 48 Reaktoren des bioREACTOR 48 erweitert werden. Durch die individuelle Sterilisierbarkeit der Dosierleitung sollten Kontaminationen auch bei langen Prozesszeiten verhindert werden können und durch hohe Leerrohrgeschwindigkeiten innerhalb der Winkelrohre $> 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ sollte ein Wachstum der Zellen durch die Dosierleitungen in die Medienvorlagegefäße vermieden werden.

Eine Verdünnung des Mediums durch die Zugabe von Titrationsmitteln kann durch den Einsatz von konzentrierten Säuren und Basen mit einem minimalen Zugabevolumen von 10 μL pro

Intervall ausgeschlossen werden. Durch die Aufsättigung der Zuluft mit Wasser konnte die Verdunstung auf $5 \mu\text{L h}^{-1}$ minimiert werden und in der Folge vernachlässigt werden. Des Weiteren konnte bei einem Reaktionsvolumen von 10 mL mit einem maximalen Probevolumen von 200 μL für externe Analysen auch über lange Prozesszeiten eine Verfälschung des Reaktionsansatzes durch regelmäßige Probenahme ausgeschlossen werden. So sollten auch über mehrere Verweilzeiten konstante Bedingungen im Reaktor herrschen und ein Fließgleichgewichtszustand erreicht werden können.

Durch den hohen Automatisierungsgrad der parallelen Bioreaktoren kann der Personalaufwand für kontinuierliche Prozesse deutlich reduziert werden. Außerdem bietet die bestehende Prozesskontrolle mit der Regelung des pH und der Temperatur sowie der Messung des $p\text{O}_2$ einen Vorteil gegenüber den meisten bestehenden miniaturisierten Bioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb. Des Weiteren können mit den gasinduzierenden Rührorganen hohe Sauerstofftransferaten mit einem volumenbezogenen Sauerstofftransportkoeffizienten $k_L a$ von bis zu $0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht werden, was die Kultivierung bei höheren Zelldichten und Zulaufraten als bei den bestehenden Bioreaktoren ermöglichen sollte (Kirk und Szita 2013).

6.2 Analyse des Verweilzeitverhaltens

Vor der Nutzung der neuen Bioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb im Milliliter-Maßstab, sollte deren Verweilzeitverhalten charakterisiert werden. Damit sollte untersucht werden, inwieweit sich die Bioreaktoren dem idealen Verhalten von Rührkesselreaktoren annähern. Hierfür wurde, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durch die Einbringung einer NaCl-Lösung ein Dirac-Impuls (siehe Abbildung 3.4) aufgegeben und die Salzkonzentration über die Messung der Leitfähigkeit am Reaktorausgang in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Dabei wurde eine niedrige Rührerdrehzahl von 500 U min^{-1} gewählt, die als minimale Rührerdrehzahl in Bioprocessen mit dem bioREACTOR 48 zum Einsatz kommt. So konnte mit den Gleichungen (3.36) und (3.39) das normierte Verweilzeitspektrum $E(\theta)$ aus dem Konzentrationsverlauf am Reaktorausgang berechnet werden. Durch die Integration von $E(\theta)$ konnte die Verweilzeitsummenkurve $F(\theta)$ abgeschätzt werden. Da ein Dirac-Impuls mit einer unendlich hohen Konzentration der Messsubstanz, die in einem infinitesimalen Zeitintervall zugegeben wird, in der Praxis nicht erreicht werden kann, wurde die Eingangskonzentration normiert, um die Voraussetzung $F(\infty) = 1$ zu erfüllen. Ein Vergleich des gemessenen Verweilzeitspektrums und der daraus berechneten Verweilzeitsummenkurve mit den idealen Verläufen ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

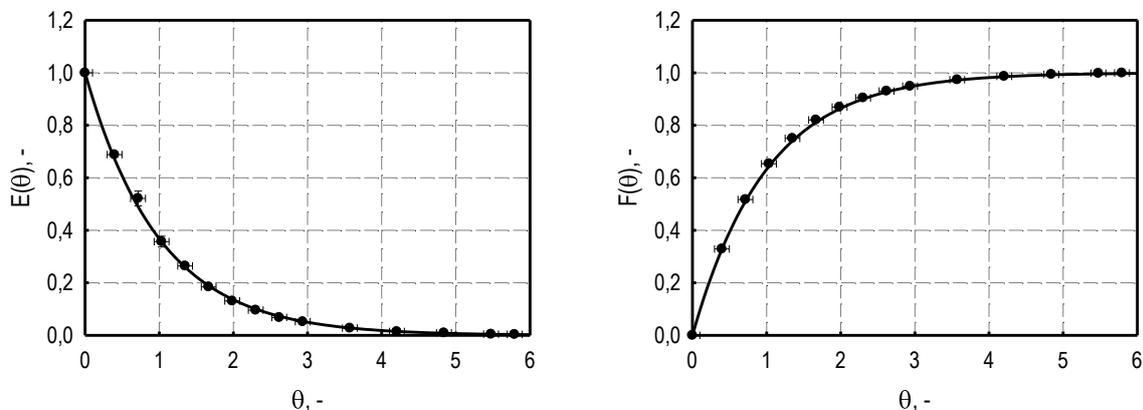


Abbildung 6.2: Gemessene (●) und ideale (schwarze Linie) Verläufe des Verweilzeitspektrums $E(\theta)$ und der Verweilzeitsummenkurve $F(\theta)$ der kontinuierlichen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab bei einer Rührerdrehzahl von 500 U min^{-1} . Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte für $E(\theta)$ wurden aus $n = 3$ unabhängigen Ansätzen bestimmt.

Die kontinuierlich betriebenen Reaktoren zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem idealen Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren. So nahm die Konzentration der Markierungssubstanz über die Prozesszeit exponentiell ab, bis nach 5 Verweilzeiten ein Medianaustausch $> 99,9 \%$ erfolgt war.

Diskussion

Mit der Bestimmung des Verweilzeitverhaltens konnte nachgewiesen werden, dass mit den eingeführten Modifikationen des bioREACTOR 48 ideale Rührkesselreaktoren im kontinuierlichen Betrieb angenähert werden können. Somit konnten in der Folge Beeinflussungen der Bioprozesse durch Phänomene wie Totzonen oder Kurzschlussströme, die in realen Reaktoren auftreten können (Müller-Erlwein 2015), ausgeschlossen werden. Auch bei einer geringen Rührerdrehzahl von 500 U min^{-1} kann so von einer idealen Durchmischung newtonscher Fluide (Wasser) ausgegangen werden.

6.3 Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit *Escherichia coli*

Um die Eignung der Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab für die kontinuierliche Kultivierung von Mikroorganismen zu evaluieren, wurde derselbe Bioprozess mit dem Modellorganismus *E. coli* in acht parallelen Reaktoren durchgeführt. Dabei wurde der kontinuierliche Betrieb mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ und einer Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} im Zulaufmedium nach einer Satzphase (15 h, 20 g L^{-1} Glucose im Satzmedium) gestartet. Die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration, des Sauerstoffpartialdrucks und des pH im Medium sind als Mittelwerte der acht Reaktoren in Abbildung 6.3 dargestellt. Des Weiteren ist der beispielhafte Verlauf des pH in einem Reaktor gezeigt.

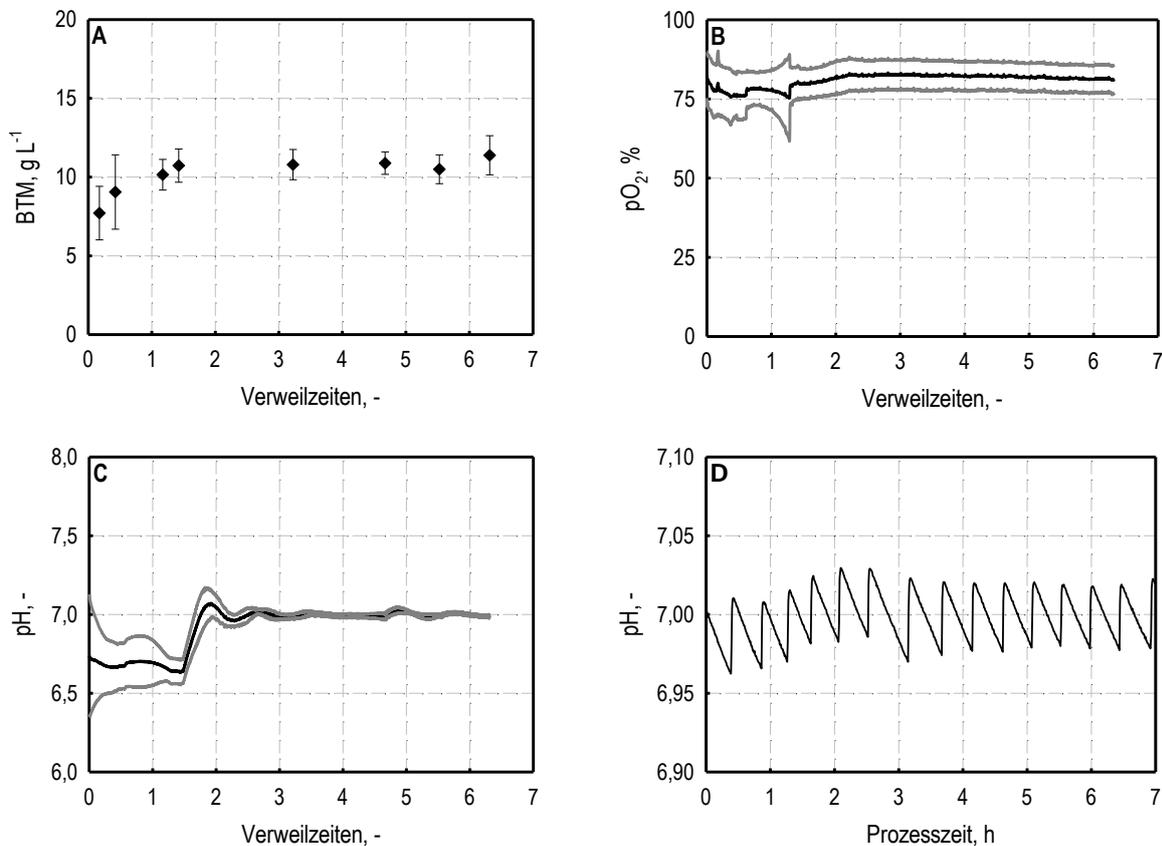


Abbildung 6.3: Mittelwerte (schwarz) der (A) Biotrockenmassekonzentration (BTM), des (B) Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) und des (C) pH mit Standardabweichungen (grau) über die Verweilzeiten bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* in acht parallelen Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab ($V = 10 \text{ mL}$, $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 5 \text{ h}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$). (D) Exemplarischer Verlauf des pH in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor im Millilitermaßstab bei der Kultivierung von *E. coli*. Der pH wurde dabei durch die intermittierende Zugabe von Ammonium (12,5 % (v/v)) mit dem Laborroboter auf pH 7,0 geregelt.

Zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung konnte ein charakteristischer Anstieg der Zelldichte bis nach 1,5 Verweilzeiten beobachtet werden. Anschließend betrug die Biotrockenmassekonzentration bis zum Prozessende konstant $10,5 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$. Auch der konstante Sauerstoffpartialdruck (Standardabweichung der acht Reaktoren $< 5 \%$) deutet auf das Erreichen eines Fließgleichgewichtszustandes nach etwa zwei Verweilzeiten hin. Der Substrateintrag von $5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose resultierte bei vollständigem Verbrauch der Glucose (Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 25 mg L^{-1}) in einem Sauerstoffpartialdruck von 84 – 87 % Luftsättigung im Fließgleichgewicht.

Die automatisierte pH-Regelung mittels intermittierender Zugabe von Ammonium (12,5 %) durch den Laborroboter konnte mit einer Standardabweichung der acht Reaktoren $< 1 \%$ des mittleren pH im Fließgleichgewicht erfolgreich etabliert werden. Der exemplarische Verlauf des pH in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor zeigte eine Schwankung $< \text{pH } 0,05$ um den Mittelwert durch die intermittierende Zugabe von im Mittel $11 \mu\text{L}$ Ammonium pro Dosierintervall, die in einem Abstand von durchschnittlich 0,5 h erfolgte.

Das Reaktionsvolumen konnte durch die Fixierung der abführenden Winkelrohre bei einer definierten Höhe auf $10,5 \pm 0,2 \text{ mL}$ eingestellt werden. Der Volumenstrom konnte über die komplette Prozesszeit auf den Sollwert von $2,0 \text{ mL h}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $0,1 \text{ mL h}^{-1}$ in den acht Reaktoren konstant gehalten werden. Dies resultierte durch das leicht vom Sollwert $10,0 \text{ mL}$ abweichende Reaktionsvolumen bei einer Verdünnungsrate von $0,19 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Des Weiteren konnten über eine Prozesszeit von 47 h keine Kontaminationen in den Reaktoren sowie kein Wachstum der Zellen über die Dosierleitung in die Medienvorlagegefäße beobachtet werden, was auf die Funktionalität des Sterilkonzeptes hindeutet.

Diskussion

Mit der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* in acht parallelen Bioreaktoren unter identischen Prozessbedingungen konnte die Eignung der erweiterten Bioreaktoren für kontinuierliche Bioprozesse mit aeroben Mikroorganismen im 10 Milliliter-Maßstab nachgewiesen werden. Die Mittelwerte der Biotrockenmassekonzentration, des Sauerstoffpartialdrucks und des pH wiesen Standardabweichungen unter 5 % des Mittelwertes der acht Rührkesselreaktoren auf. So konnte die hohe Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen, parallelen Bioreaktoren gezeigt werden. Des Weiteren konnte in diesem Bioprozess mit $10,5 \text{ g L}^{-1}$ die bislang höchste Zelldichte in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab erreicht werden (Nanchen et al. 2006; Seletzky et al. 2007b). Der mittlere Sauerstoffpartialdruck von 84 – 87 % im Fließgleichgewicht deutet darauf hin, dass mit den Rührkesselreaktoren kontinuierliche Bioprozesse bei höheren Zelldichten und Substratzulaufzeiten möglich sind.

Die Schwankung des pH in den einzelnen Reaktoren durch die intermittierende Zugabe des Titrationsmittels konnte im Fließgleichgewicht durch geeignete Einstellungen des PID-Reglers auf pH 0,05 um den Sollwert von pH 7,0 minimiert werden. Daneben diente die verwendete Base Ammonium als Stickstoffquelle für die Zellen. Mit einer einmaligen Basenzugabe von durchschnittlich 11 μL Ammonium (12,5 % (v/v)) wurden unter der Annahme, dass sämtliches Ammonium im Reaktionsansatz gelöst vorlag, jeweils ungefähr 0,14 g L^{-1} Ammonium eingetragen. Das maximale Volumen pro Zugabe wurde für sämtliche folgende Kultivierungen auf 20 μL begrenzt, um auch bei höheren Verdünnungsraten und somit höheren Substrataufnahmeraten die maximale Auslenkung des pH auf pH 0,15 (Daten nicht gezeigt) und den einmaligen Ammoniumeintrag auf etwa 0,28 g L^{-1} zu begrenzen. Somit kann auch eine Auslenkung des Fließgleichgewichts durch eine periodische Veränderung der Ammoniumkonzentration vernachlässigt werden, da *E. coli* keine Inhibition des Wachstums bei Ammoniumkonzentration bis 3 g L^{-1} zeigt (Thompson et al. 1985).

Auch im Hinblick auf das Reaktionsvolumen und den Volumenstrom mit einer Abweichung von 5,0 % beziehungsweise 0,2 % vom Sollwert und einer Standardabweichung von 1,9 % beziehungsweise 5,3 % konnte eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit innerhalb der acht Bioreaktoren beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit der Integration von kontinuierlichen Zu- und Ablaufleitungen in miniaturisierte, pH-kontrollierte Rührkesselreaktoren die parallele Kultivierung von Mikroorganismen mit einer hohen Reproduzierbarkeit möglich wird. Dabei können auch über Prozesszeiten von mehreren Tagen ein hohes Maß an Prozesskontrolle, exakte Zulaufraten und die Aufrechterhaltung der Sterilität gewährleistet werden.

6.4 Identifikation der Wachstumskinetik von *Escherichia coli* im Parallelansatz

Für die Entwicklung eines Bioprozesses werden oftmals formalkinetische Parameter des eingesetzten Mikroorganismus benötigt, um beispielsweise ein geregeltes exponentielles Zulaufprofil zu berechnen (siehe 3.2.2). Hierfür wird allerdings eine Vielzahl an Fließgleichgewichtszuständen benötigt, um eine genaue modellbasierte Schätzung der Parameter gewährleisten zu können. Deshalb ist dieses Verfahren sehr zeitintensiv und arbeitsaufwendig. Mit den entwickelten miniaturisierten Bioreaktoren für den parallelen Betrieb von acht Chemostaten könnte der Aufwand für die Gewinnung von Messwerten zur modellgestützten Identifikation der Wachstumskinetik von Mikroorganismen deutlich reduziert werden. So sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wachstumskinetik eines rekombinanten *E. coli*-Stammes auf der Basis von in parallelen Bioprozessen bestimmten Daten abgeschätzt werden. Anschließend sollte das erstellte Modell validiert werden und ausgewählte Fließgleichgewichtszustände in den Labormaßstab übertragen werden.

Identifikation formalkinetischer Parameter im Milliliter-Maßstab

Um die Eignung der entwickelten Bioreaktoren für parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen zu zeigen, wurden Kultivierungen zur Identifikation der Wachstumskinetik von *E. coli* im Chemostaten durchgeführt. Hierfür wurden acht verschiedene Verdünnungsraten von $D_1 = 0,08 \text{ h}^{-1}$, $D_2 = 0,17 \text{ h}^{-1}$, $D_3 = 0,19 \text{ h}^{-1}$, $D_4 = 0,25 \text{ h}^{-1}$, $D_5 = 0,27 \text{ h}^{-1}$, $D_6 = 0,33 \text{ h}^{-1}$, $D_7 = 0,44 \text{ h}^{-1}$ und $D_8 = 0,45 \text{ h}^{-1}$ in den acht parallelen Bioreaktoren eingestellt. Die Wahl der höchsten Verdünnungsrate D_8 erfolgte auf der Grundlage der Bestimmung der maximalen Wachstumsrate von $0,36 \text{ h}^{-1}$ des verwendeten *E. coli* BL21(DE3) Stammes in Satzprozessen. D_1 war durch die minimale verlässliche Dosierate der Pumpen limitiert. Der kontinuierliche Betrieb mit einer Glucosekonzentration von 25 g L^{-1} im Zulaufmedium wurde nach einer Satzphase (15 h) mit 25 g L^{-1} Glucose im Satzmedium gestartet. Die Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration bei den vorgegebenen Verdünnungsraten wurde im Fließgleichgewicht (nach mindestens fünf Verweilzeiten) gemessen. Nachdem kein Auswaschen der Zellen bei D_8 beobachtet werden konnte, wurde nach fünf Verweilzeiten die Verdünnungsrate in zwei Bioreaktoren auf $D_9 = 0,52 \text{ h}^{-1}$ und $D_{10} = 0,90 \text{ h}^{-1}$ erhöht. So konnten zehn Fließgleichgewichtszustände in einer Prozesszeit von lediglich 80 h eingestellt werden. Die zugehörigen Biotrockenmasse- und Glucosekonzentrationen wurden für die Identifikation der formalkinetischen Parameter des kinetischen Modells verwendet (siehe Abbildung 6.4 A).

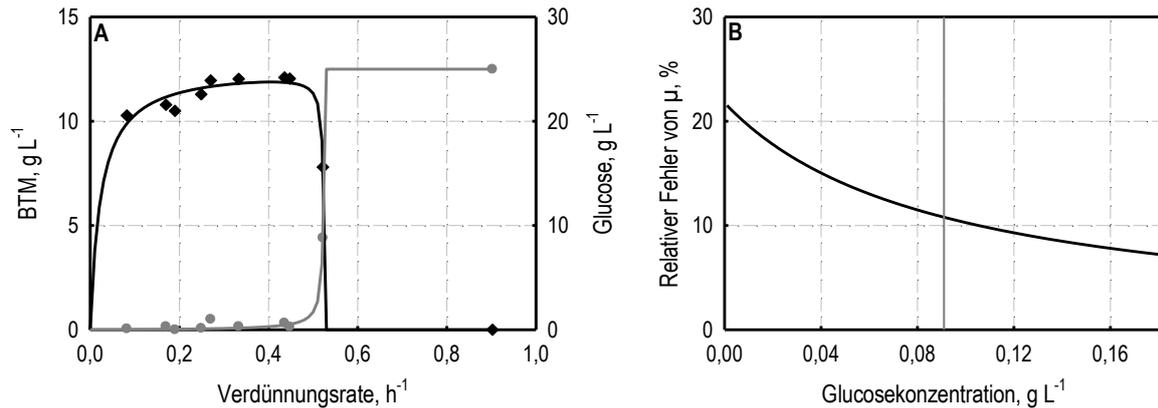


Abbildung 6.4: Parallele Untersuchungen mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$) im Chemostaten. (A) Gemessene Biotrockenmasse- (BTM, \blacklozenge) und Glucosekonzentration (\bullet) im Fließgleichgewicht und deren modellbasiert abgeschätzte Verläufe über die Verdünnungsrate. (B) Relativer Fehler der geschätzten Wachstumsrate μ als Funktion der Glucosekonzentration für die normalverteilte Affinitätskonstante des Substrats K_S . Die vertikale graue Linie markiert den bestimmten Mittelwert für K_S (90 mg L^{-1}).

Bei der Auftragung der gemessenen und simulierten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentrationen zeigte sich der charakteristische Verlauf der Wachstumskinetik von Mikroorganismen über verschiedene Wachstumsraten (siehe Abbildung 3.2). Dabei kam es bei niedrigen Wachstumsraten $< 0,25 \text{ h}^{-1}$ zu einem stetigen Anstieg der Biotrockenmasse mit der Wachstumsrate. Anschließend konnte eine konstante Biotrockenmassekonzentration von etwa 12 g L^{-1} bis $D = 0,45 \text{ h}^{-1}$ beobachtet werden. Bis zu dieser Verdünnungsrate wurde die Glucose nahezu vollständig verbraucht (maximal $1,0 \text{ g L}^{-1}$ im Reaktionsansatz). Als die Verdünnungsrate der maximalen Wachstumsrate von $0,55 \text{ h}^{-1}$ angenähert wurde, kam es bei D_9 zu einer charakteristischen Abnahme der Biotrockenmassekonzentration, da die zugeführte Glucose nicht mehr komplett aufgenommen werden konnte. Nach dem Überschreiten der kritischen Verdünnungsrate von $0,55 \text{ h}^{-1}$ kam es zum Auswaschen der Zellen, was bei D_{10} nach fünf Verweilzeiten beobachtet werden konnte.

Die in Tabelle 6.1 dargestellten Werte der geschätzten kinetischen Parameter zeigten eine hohe Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten. Während die maximale Wachstumsrate μ_{max} und der Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{XS,\mu}$ mit hoher Genauigkeit identifiziert werden konnten, zeigten die Affinitätskonstante für das Substrat K_S und die Substrataufnahmegeschwindigkeit für den Erhaltungsstoffwechsel m_S höhere Parameterunsicherheiten.

Die hohe Standardabweichung des modellbasiert bestimmten Parameters K_S zeigte so einen großen Einfluss auf die berechnete Wachstumsrate μ bei Glucosekonzentrationen im Bereich

von K_S mit 90 mg L^{-1} (siehe Abbildung 6.4 B). Dieser Einfluss wird jedoch ab einer Glucosekonzentration von mehr als $1,86 \text{ g L}^{-1}$ auf einen relativen Fehler von $\mu < 1 \%$ reduziert.

Tabelle 6.1: Modellbasiert identifizierte, formalkinetische Parameter des Wachstums eines rekombinanten *E. coli* BL21 Stamms mit Glucose als Substrat im Vergleich zu veröffentlichten Daten für *E. coli* (Riesenberg et al. 1991; Senn et al. 1994; Kovárová-Kovar und Egli 1998; Jenzsch et al. 2006; Wunderlich et al. 2014).

Parameter	Bestimmter Wert	Relativer Fehler	Literatur
μ_{max}	$0,55 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$	1,53 %	$0,45\text{-}0,67 \text{ h}^{-1}$
$Y_{XS,\mu}$	$0,51 \pm 0,019 \text{ g g}^{-1}$	3,76 %	$0,49 \text{ g g}^{-1}$
K_S	$90 \pm 19 \text{ mg L}^{-1}$	21,8 %	$5\text{-}99 \text{ mg L}^{-1}$
m_S	$46 \pm 15 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	32,0 %	$32 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Prozesskontrolle

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit der bestehenden Prozesskontrolle auch bei extremen Bedingungen wie sehr hohen Wachstumsraten und Glucoseeintragsraten stabile Bedingungen gewährleistet werden können. So wurde durch die intermittierende Zugabe von maximal $20 \mu\text{L}$ Ammonium ($12,5 \%$ (v/v)) eine Auslenkung des pH von $< \text{pH } 0,12$ pro Dosierschritt beobachtet. Somit konnte auch bei hohen Wachstumsraten und damit verbundenen hohen Glucose- und Ammoniumaufnahmeleistungen eine Auslenkung des Fließgleichgewichts durch eine starke Variation des pH bei der intermittierenden pH-Regelung ausgeschlossen werden.

Des Weiteren konnten mit der prozessbegleitenden Aufzeichnung des Sauerstoffpartialdrucks Rückschlüsse auf die Einstellung von Fließgleichgewichtszuständen während den Bioprozessen gezogen werden. In Abbildung 6.5 sind exemplarisch die Verläufe des Sauerstoffpartialdrucks von vier kontinuierlichen Bioprozessen mit Verdünnungsraten von $D_1 = 0,08 \text{ h}^{-1}$, $D_5 = 0,27 \text{ h}^{-1}$, $D_8 = 0,45 \text{ h}^{-1}$ und $D_{10} = 0,90 \text{ h}^{-1}$ über vier Stunden dargestellt.

Bei Verdünnungsraten unterhalb der maximalen Wachstumsrate $0,55 \text{ h}^{-1}$ stellten sich im Fließgleichgewicht konstante Werte des Sauerstoffpartialdrucks ein, die wie erwartet mit der Erhöhung der Verdünnungsrate eine abnehmende Tendenz aufweisen. Dabei konnte auch bei sehr hohen Glucoseeintragsraten von bis zu $11,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff (Sauerstoffpartialdruck $> 20 \%$ Luftsättigung) beobachtet werden. Bei der Verdünnungsrate D_{10} , die deutlich über der maximalen Wachstumsrate lag, war hingegen das Auswaschen der Zellen innerhalb von vier Stunden zu beobachten, bevor sich der

Sauerstoffpartialdruck einem Wert von 100 % Luftsättigung annäherte und sich ein Fließgleichgewichtszustand bei $c_x \approx 0$ einstellte.

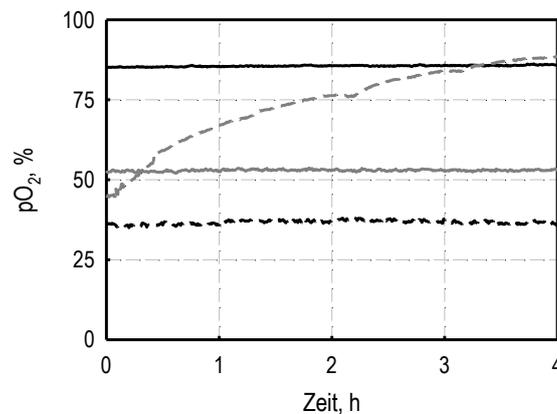


Abbildung 6.5: Exemplarischer Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks bei vier parallelen, kontinuierlichen Kultivierungen von *E. coli* mit Verdünnungsraten von $D_1 = 0,08 \text{ h}^{-1}$ (schwarz), $D_5 = 0,27 \text{ h}^{-1}$ (dunkelgrau), $D_8 = 0,45 \text{ h}^{-1}$ (schwarz unterbrochen) und $D_{10} = 0,90 \text{ h}^{-1}$ (dunkelgrau unterbrochen).

Modellvalidierung und Maßstabsübertragung

Um das erstellte Modell für die Wachstumskinetik des rekombinanten *E. coli*-Stammes zu validieren, wurden in weiteren kontinuierlichen Prozessen fünf Fließgleichgewichtszustände bei Verdünnungsraten von $D_1 = 0,09 \text{ h}^{-1}$, $D_2 = 0,19 \text{ h}^{-1}$, $D_3 = 0,44 \text{ h}^{-1}$, $D_4 = 0,49 \text{ h}^{-1}$ und $D_5 = 0,78 \text{ h}^{-1}$ im Milliliter-Maßstab untersucht. Des Weiteren wurde die Skalierbarkeit der Bioprozesse durch die Übertragung von drei ausgewählten Fließgleichgewichtszuständen mit Verdünnungsraten von $D_1 = 0,20 \text{ h}^{-1}$, $D_2 = 0,33 \text{ h}^{-1}$, $D_3 = 0,50 \text{ h}^{-1}$ in den Labormaßstab überprüft. Dabei diente die maximale Sauerstofftransferrate der miniaturisierten Bioreaktoren als Kriterium für die Maßstabsübertragung. Die im jeweiligen Fließgleichgewicht bestimmten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentrationen können im Vergleich zur Simulation Abbildung 6.6 entnommen werden.

Die für die Validierung des Modells und die Evaluierung der Skalierbarkeit gewonnenen Werte im Fließgleichgewichtszustand im 10 Milliliter- und 2 Liter-Maßstab demonstrieren unter Berücksichtigung der Standardabweichungen eine hohe Genauigkeit des erstellten Modells. Eine Ausnahme stellen Werte bei Verdünnungsraten, die sich der maximalen Wachstumsrate annähern, dar. Dies kann mit der höheren Unsicherheit der Schätzungen von K_S und m_S begründet werden.

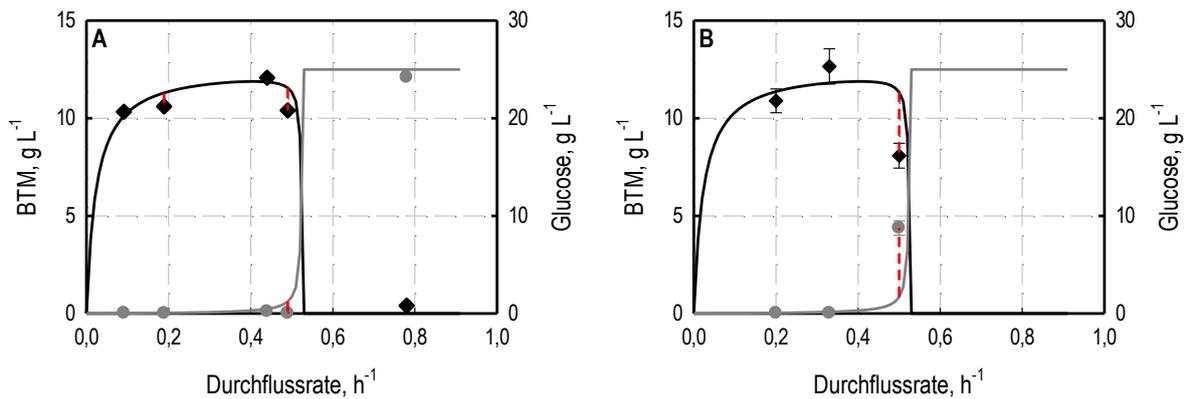


Abbildung 6.6: (A) Parallele Untersuchungen mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$) im Milliliter-Maßstab und (B) sequentielle Untersuchungen ($V = 2 \text{ L}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$) im Liter-Maßstab in Chemostaten: Gemessene Biotrockenmasse- (BTM, \blacklozenge) und Glucosekonzentrationen (\bullet) mit Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen bei verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen im Vergleich zu deren (BTM: schwarz; Glucose: grau) modellbasiert abgeschätzten Verläufen über die Verdünnungsrate. Die Abweichungen der Messwerte vom identifizierten Modell sind rot dargestellt.

Diskussion

Mit der parallelen Einstellung verschiedener Fließgleichgewichtszustände konnte ein Modell für das Wachstum eines rekombinanten *E. coli*-Stammes erstellt werden. Dabei wurde ein charakteristischer Verlauf der Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration als Funktion der Wachstumsrate beobachtet. Bei niedrigen Wachstumsraten kommt es aufgrund des sinkenden Einflusses der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel bei der Erhöhung der Verdünnungsrate zu einer Steigerung der erreichbaren Zelldichte. Sobald die Verdünnungsrate die maximale Wachstumsrate erreicht, stellt sich der stabile Fließgleichgewichtszustand $c_X = 0$ und $c_S = c_{S,0}$ ein (Chmiel 2011).

Die identifizierten formalkinetischen Parameter zeigten eine hohe Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten (Riesenberg et al. 1991; Senn et al. 1994; Kovárová-Kovar und Egli 1998; Jenzsch et al. 2006; Wunderlich et al. 2014). Während μ_{max} und $Y_{XS,\mu}$ mit hoher Genauigkeit identifiziert werden konnten, wiesen K_S und m_S höhere Parameterunsicherheiten auf. Diese können mit den fehlenden Daten bei niedrigen Verdünnungsraten (m_c) aufgrund der Limitierung der minimalen Dosierrate durch die verwendeten peristaltischen Pumpen und bei Verdünnungsraten nahe dem Auswaschpunkt (K_S) durch die zu niedrige Schätzung der maximalen Wachstumsrate in Satzversuchen erklärt werden.

Ein Nachteil des gewählten experimentellen Vorgehens mit der parallelen Einstellung von Fließgleichgewichtszuständen ist die Notwendigkeit die eingestellten Verdünnungsraten im Vorfeld auszuwählen. Dabei kann es vor allem durch die oftmals beobachtete falsche

Schätzung von formalkinetischen Parametern in vorhergehenden Untersuchungen im Satzbetrieb (Hoskisson und Hobbs 2005) zu einer Wahl von nicht optimalen Verdünnungsraten für die Bestimmung formalkinetischer Parameter im kontinuierlichen Betrieb kommen. Eine mögliche Lösung hierfür wäre die Erhöhung der Anzahl an parallel betriebenen Chemostaten. So kann beispielsweise die Wahrscheinlichkeit für die Einstellung von Verdünnungsraten nahe der maximalen Wachstumsrate erhöht werden. Das bestehende Kultivierungssystem könnte durch den modularen Aufbau auf bis zu 48 parallele Chemostaten erweitert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die sequentielle Anwendung von parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit einer sukzessiven Parameterschätzung und einer folgenden Anwendung von Methoden der statistischen Versuchsplanung dar. So könnte nach jedem parallelen Versuchslauf ein Satz von optimalen Verdünnungsraten für die Identifikation von kinetischen Parametern gewählt werden (Takors et al. 1997).

Bei der Validierung des erstellten Modells durch Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter- und Liter-Maßstab konnte eine gute Genauigkeit der Simulation sowie die Skalierbarkeit der Fließgleichgewichtszustände gezeigt werden. Eine Ausnahme stellten Verdünnungsraten nahe dem Auswaschpunkt dar. Dies kann zum einen mit den hohen Standardabweichungen der geschätzten Parameter K_S und m_S begründet werden, da die berechnete Wachstumsrate eine Abhängigkeit von den beiden Parametern zeigt (siehe Gleichung (4.4)). Des Weiteren sind die Fließgleichgewichtszustände in Chemostaten in der Nähe des Auswaschpunktes sehr sensitiv gegenüber kleinsten Änderungen der Verdünnungsrate (Chmiel 2011). So können bereits geringe Variationen der Verdünnungsrate durch eine nicht optimale Dosierleistung der Pumpen zu einer deutlichen Verfälschung der Ergebnisse führen.

Für eine robuste Einstellung von Fließgleichgewichten nahe dem Auswaschpunkt sind andere Reaktorkonzepte als der Chemostat bekannt. So kann durch die prozessbegleitende Messung von Zustandsgrößen und die Einführung eines einfachen Reglers die Verdünnungsrate als manipulierbare Größe gewählt werden. Damit kann beispielsweise in Turbidostaten ein Sollwert für die Zellkonzentration vorgegeben werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Regelung der Konzentration des limitierenden Substrates (*nutrient*) durch die Anpassung der Verdünnungsrate im Nutristaten (Chmiel 2011). Mit den erweiterten Bioreaktoren für den kontinuierlichen Betrieb sind bislang nur Bioprozesse im Chemostaten möglich. Durch die Einführung eines Reglers zur Anpassung der Pumprate auf die gemessene Zelldichte könnten die Bioreaktoren jedoch auch für den Betrieb als Turbidostat modifiziert werden, da die verwendeten Pumpen jeweils digital gesteuert werden können. Allerdings wäre hierfür die Entwicklung einer prozessbegleitenden Messung der Zelldichte von Vorteil, da aktuell die Zellkonzentration durch den Laborroboter lediglich mit einem minimalen Abtastintervall von 15 min bestimmt werden kann. Des Weiteren könnte es durch zu häufige Probenahme (jeweils

2 % des Reaktionsvolumens) zu einer Auslenkung des Fließgleichgewichtszustandes kommen.

Die Skalierbarkeit der kontinuierlichen Bioprozesse mit *E. coli* vom Milliliter- in den Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransferrate als Kriterium für die Maßstabsübertragung konnte trotz der unterschiedlichen Rührorgane in beiden Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter-Maßstab) demonstriert werden. Damit konnten die Erkenntnisse aus bereits berichteten Untersuchungen zur Skalierbarkeit von Satz- und Zulaufbetrieben vom Milliliter- in den Labormaßstab bestätigt werden (Knorr et al. 2007; Kusterer et al. 2008; Hoefel et al. 2010; Hortsch et al. 2011).

Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der direkten Skalierbarkeit der kontinuierlichen Bioprozesse im Milliliter-Maßstab kann der experimentelle Aufwand für Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit dem parallelen Betrieb von acht miniaturisierten Chemostaten zukünftig deutlich reduziert werden. Außerdem reduziert das geringe Reaktionsvolumen von 10 mL die Kosten im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierungen im Labormaßstab deutlich. Dies ist vor allem beim Einsatz von isotoopenmarkierten Substraten, die beispielsweise für die Abschätzung intrazellulärer Flussverteilungen im Fließgleichgewicht verwendet werden, von Vorteil (Niklas et al. 2010).

Mit den parallelen Chemostaten konnten die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen ($12,1 \text{ g L}^{-1}$) und Glucoseeintragsraten ($12,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) erreicht werden, die bislang für kontinuierliche Kultivierungssysteme im Milliliter-Maßstab beschrieben wurden (Nanchen et al. 2006; Seletzky et al. 2007b). Dabei konnte bei nahezu vollständigem Substratverbrauch eine Sauerstofflimitierung vermieden werden ($pO_2 > 20 \%$ Luftsättigung), da das modifizierte Bioreaktorsystem den höchsten Sauerstoffeintrag ($k_L a$ bis zu $0,4 \text{ s}^{-1}$) der bestehenden miniaturisierten Bioreaktoren aufweist (Kirk und Szita 2013). Daneben können durch die prozessbegleitende Messung des Sauerstoffpartialdrucks während der Kultivierung Rückschlüsse auf die Einstellung von Fließgleichgewichten gezogen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass eine Auslenkung der Fließgleichgewichtszustände durch die intermittierende Basenzugabe und der damit verbundenen plötzlichen Änderung des pH auch bei hohen Wachstumsraten vernachlässigt werden kann. Mit der Vorgabe des maximalen Zugabevolumens an Titrationsmittel von $20 \mu\text{L}$ konnte bei der Verwendung von Ammonium ($12,5 \%$ v/v) der Anstieg des pH nach jeder Basenzugabe auf pH 0,12 begrenzt werden. Somit stellt die hervorragende Prozesskontrolle des bioREACTOR 48 einen weiteren Vorteil gegenüber existierenden miniaturisierten Bioreaktoren für kontinuierliche Bioprozesse dar.

6.5 Reaktionstechnische Untersuchungen zur kontinuierlichen Proteinproduktion mit *Escherichia coli*

Die kontinuierliche Produktion rekombinanter Proteine hat sich bislang für industrielle Anwendungen noch nicht durchgesetzt. Aufgrund des Medienaustausches kommt es ohne die Einführung von Techniken zur Verweilzeitentkopplung zu einem durchgehenden Austrag von Biomasse und Produkt, weshalb die gesteigerten Kosten für die Bioproduktaufarbeitung meist die Vorteile durch die in vielen kontinuierlichen Prozessen gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute überwiegen. Dabei ist vor allem die Herstellung von intrazellulär produzierten Proteinen problematisch, da zum einen eine Verweilzeitentkopplung der Zellen bei kontinuierlichem Austrag der Produkte aus dem Reaktionsansatz nicht möglich ist. Zum anderen kann sich die Expression intrazellulärer Produkte negativ auf das Wachstum der Zellen auswirken. Dies kann ein Auswaschen der Zellen bei hohen Verdünnungsraten oder ausgeprägte Selektionseffekte, wie beispielsweise Plasmidverlust, zur Folge haben.

So wird die Mehrzahl an Bioprozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine im Zulaufbetrieb durchgeführt. Dabei müssen für jeden Wirtsorganismus und jedes Produkt geeignete Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise die Temperatur, die Medienzusammensetzung, die Induktionsstrategie oder die vorgegebene Wachstumsrate empirisch ermittelt werden. Diese Parameterstudien werden oftmals im Satzverfahren durchgeführt. Dabei kann es allerdings zu unerwünschten Nebeneffekten wie Substratüberschussmetabolismus und Nebenproduktbildung kommen, weshalb die erhaltenen Ergebnisse oft schwer zu interpretieren sind.

Fließgleichgewichtsuntersuchungen in Chemostaten bieten die Möglichkeit zur Analyse des Metabolismus von Zellen unter definierten und zeitlich konstanten Bedingungen. So stellt der Chemostat eine geeignete Betriebsweise für die unabhängige Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen dar. Darüber hinaus kann der Einfluss der Expression von rekombinanten Proteinen auf den Metabolismus der Zellen untersucht werden.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die parallelen Chemostaten im Milliliter-Maßstab für die reaktionstechnische Charakterisierung der kontinuierlichen Proteinproduktion eingesetzt werden. Dabei wurde der Einfluss der Wachstumsrate und der Induktionsstrategie auf die kontinuierliche Herstellung des Proteins PAmCherry mit *E. coli* charakterisiert. Neben der Entwicklung von kontinuierlichen Produktionsverfahren stand die Untersuchung des Metabolismus von *E. coli* unter dem Einfluss der Produktbildung im Vordergrund, um geeignete Bedingungen für die Herstellung von PAmCherry im Zulaufverfahren (siehe Kapitel 6.6) zu bestimmen.

6.5.1 Einfluss der Wachstumsrate auf die Proteinproduktion

In einem ersten Schritt sollte der Einfluss der Wachstumsrate auf die intrazelluläre Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* in Fließgleichgewichtsuntersuchungen charakterisiert werden. Hierfür wurde im Reaktionsansatz nach einer Satzphase (25 g L^{-1} Glucose) eine Induktorkonzentration von $5 \mu\text{M}$ Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) durch die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ einer konzentrierten IPTG-Lösung mit dem Laborroboter eingestellt und der kontinuierliche Betrieb mit 25 g L^{-1} Glucose und $5 \mu\text{M}$ IPTG im Zulaufmedium gestartet. Dabei wurde eine niedrige Induktorkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gewählt, um den Einfluss von Selektionseffekten und eine Reduktion des Wachstums bei einer starken Induktion des T7-Promotors zu vermeiden. So wurden acht Reaktoren parallel bei Verdünnungsraten von $D_1 = 0,10 \text{ h}^{-1}$, $D_2 = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $D_3 = 0,20 \text{ h}^{-1}$, $D_4 = 0,25 \text{ h}^{-1}$, $D_5 = 0,30 \text{ h}^{-1}$, $D_6 = 0,40 \text{ h}^{-1}$, $D_7 = 0,50 \text{ h}^{-1}$ und $D_8 = 0,54 \text{ h}^{-1}$ betrieben. Im Prozessverlauf wurden die Biotrockenmasse-, Glucose-, Acetat- und Proteinkonzentrationen bestimmt. Ein exemplarischer Verlauf der Biotrockenmasse- und Proteinkonzentration im kontinuierlichen Betrieb ($D_2 = 0,15 \text{ h}^{-1}$) ist in Abbildung 6.7 dargestellt.

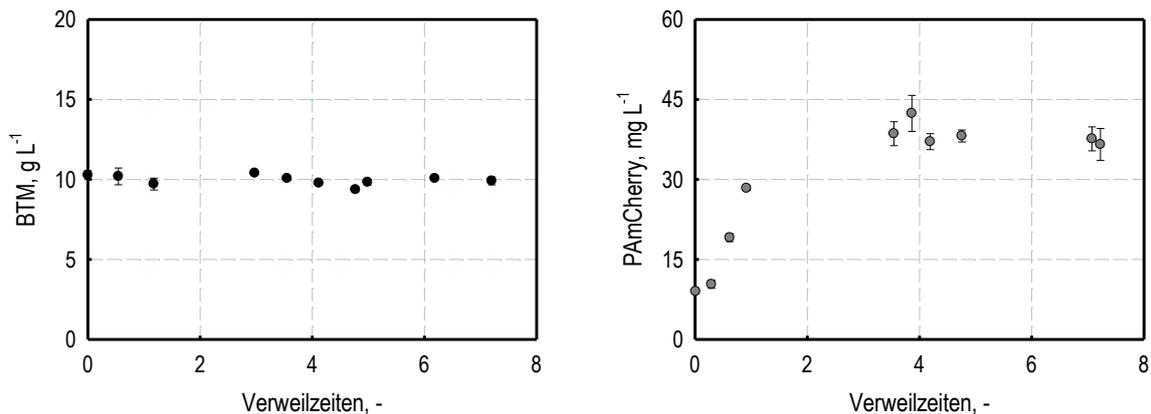


Abbildung 6.7: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $5 \mu\text{M}$ IPTG, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$). Dargestellt sind die Biotrockenmasse (BTM, ●) und PAmCherry-Konzentration (●) mit Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen eines kontinuierlich betriebenen Reaktors.

Nach dem Start der kontinuierlichen Betriebsweise konnte bis zum Prozessende nach 7,2 Verweilzeiten eine konstante Biotrockenmassekonzentration von im Mittel $10,0 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration stieg von anfänglich $9,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ bis zum Prozessende nach 7,2 Verweilzeiten auf einen ab 3,5 Verweilzeiten konstanten Wert von $36,3 \pm 3,4 \text{ mg L}^{-1}$. Die im Zulaufmedium vorgelegte Glucose wurde nahezu vollständig verbraucht ($< 0,19 \text{ g L}^{-1}$ Glucose im Medium), wobei maximal $0,05 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vorlagen.

Ein Vergleich der erreichten Biotrockenmasse-, Glucose- und Proteinkonzentrationen sowie der Produktanteile und der spezifischen Produktbildungsrate im jeweiligen Fließgleichgewicht bei acht unterschiedlichen Wachstumsraten ist in Abbildung 6.8 dargestellt. Dabei wurden die gemessenen Biotrockenmasse- und Glucosekonzentrationen mit dem in Kapitel 6.4 bestimmten Modell für das Wachstum des verwendeten *E. coli*-Stammes ohne Induktion der Produktbildung verglichen.

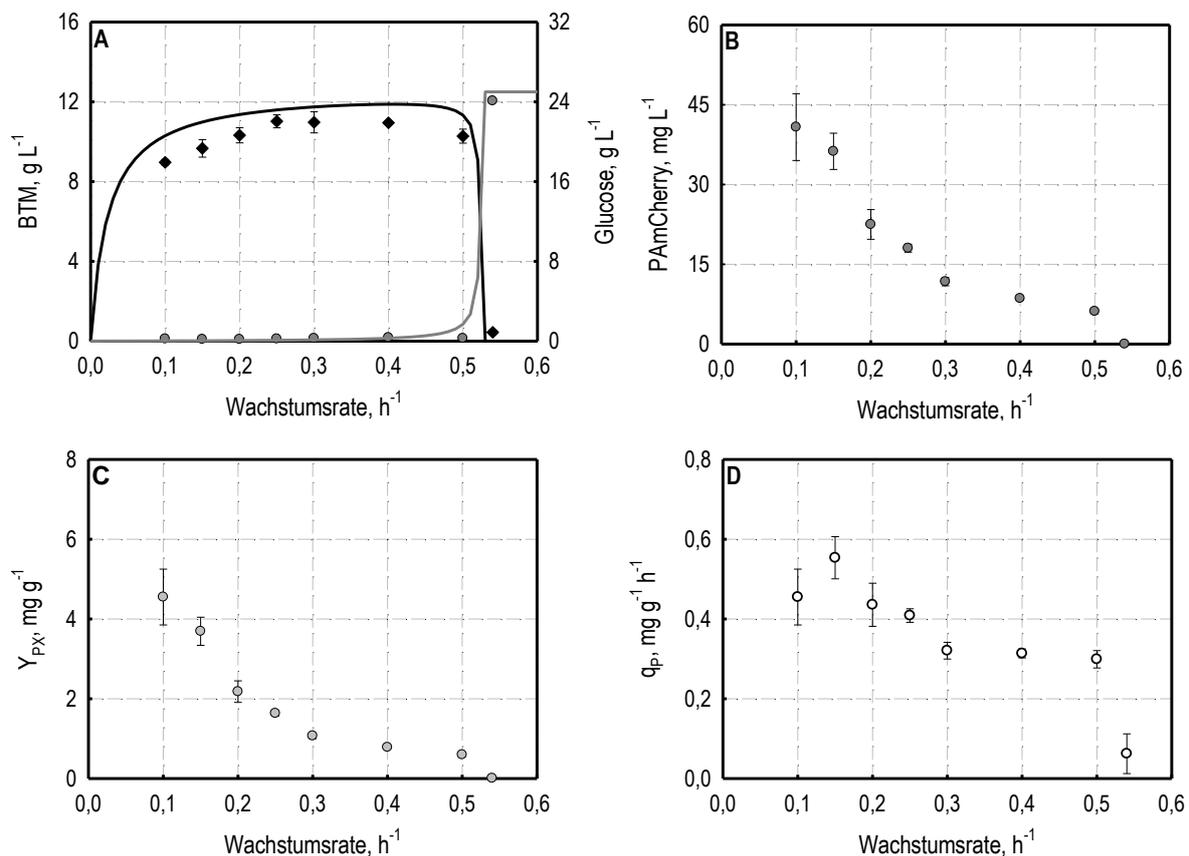


Abbildung 6.8: Mittelwerte mit Standardabweichungen der (A) Biotrockenmasse- (BTM, \blacklozenge) und Glucosekonzentration (\bullet) im Vergleich mit dem in Kapitel 6.4 identifizierten Modell. Biotrockenmasse- (schwarze Linie) und Glucosekonzentration (graue Linie) über die Verdünnungsrate für das Wachstum von *E. coli* ohne Induktion der Produktbildung, der (B) PAmCherry-Konzentration, des (C) Produktanteils (Y_{PX}) und der (D) spezifischen Produktbildungsrate (q_p) im Fließgleichgewicht (nach mindestens fünf Verweilzeiten) von Bioprozessen in Chemostaten zur Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* in Abhängigkeit der Wachstumsrate.

Dabei stimmte der Verlauf der Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration qualitativ mit dem erstellten Modell für das Wachstum des verwendeten *E. coli*-Stammes ohne Induktion der Produktbildung überein. Allerdings lag die Biotrockenmassekonzentration bis zu einer Verdünnungsrate von $0,5 h^{-1}$ zwischen $0,56 g L^{-1}$ und $1,33 g L^{-1}$ unter den simulierten Werten für die Biotrockenmassekonzentration ohne Induktion der Produktbildung. Da intrazellulär gebildetes Protein zur Biotrockenmasse beiträgt, konnte die verringerte Biotrockenmasse-

konzentration nicht wie bei der Bildung extrazellulärer Produkte mit der Substrataufnahme für die Produktbildung erklärt werden. Um die Ursache der verringerten Biotrockenmassekonzentration bei simultaner Produktbildung zu evaluieren, wurden mit den gemessenen Werten für die Zelldichte und die Glucosekonzentration bei verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen die formalkinetischen Parameter während der Expression von PAmCherry bestimmt (siehe Tabelle 6.2). Dabei wurde die Substrataufnahmerate für die Produktbildung aufgrund der geringen PAmCherry-Konzentrationen (maximal $40,8 \text{ mg L}^{-1}$ bei $D_1 = 0,10 \text{ h}^{-1}$) im Vergleich zur Biomasse vernachlässigt und erneut das in Kapitel 6.4 verwendete Modell angewendet.

Tabelle 6.2: Modellbasiert bestimmte, formalkinetische Parameter des Wachstums eines rekombinanten *E. coli* BL21-Stamms mit Glucose als Substrat bei der intrazellulären Herstellung des Proteins PAmCherry im Vergleich zu Daten des *E. coli*-Stamms ohne Produktbildung (siehe Kapitel 6.4, Tabelle 6.1).

Parameter	Ohne Produktbildung	Mit Produktbildung
μ_{max}	$0,55 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$	$0,56 \pm 0,032 \text{ h}^{-1}$
$Y_{XS,\mu}$	$0,51 \pm 0,019 \text{ g g}^{-1}$	$0,48 \pm 0,022 \text{ g g}^{-1}$
K_S	$90 \pm 19 \text{ mg L}^{-1}$	$150 \pm 109 \text{ mg L}^{-1}$
m_S	$46 \pm 15 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$63 \pm 19 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Dabei wurde im Rahmen der Messgenauigkeit kein Einfluss der Produktbildung auf die maximale Wachstumsrate beobachtet. Im Vergleich zum Wachstum ohne Produktbildung konnte eine verminderte Biotrockenmassekonzentration bei den unterschiedlichen Fließgleichgewichtszuständen beobachtet werden (siehe Abbildung 6.8 A). Dies kann zum einen durch einen verringerten Biomasseausbeutekoeffizient und zum anderen durch eine erhöhte Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel begründet werden. Allerdings konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikante Änderung der identifizierten formalkinetischen Parameter nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte mit steigender Wachstumsrate eine Abnahme der Proteinkonzentration im Medium von maximal $40,8 \pm 6,3 \text{ mg L}^{-1}$ und des Produktanteils von maximal $4,6 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$ bei $D_1 = 0,10 \text{ h}^{-1}$ beobachtet werden, bis bei einer Wachstumsrate von $0,54 \text{ h}^{-1}$ durch das Auswaschen der Zellen ($0,44 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse) nahezu keine Produktbildung mehr nachgewiesen werden konnte ($c_{PAmCherry} = 0,05 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$, $Y_{PX} = 0,006 \pm 0,005 \text{ mg g}^{-1}$).

Mit der Erhöhung der Wachstumsrate von $0,10 \text{ h}^{-1}$ auf $0,15 \text{ h}^{-1}$ stieg die spezifische Produktbildungsrate von $0,46 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,56 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. In der Folge war eine stetige

Abnahme der spezifischen Produktbildungsrate bis zu einer Wachstumsrate von $0,30 \text{ h}^{-1}$ zu beobachten, woraufhin sich bis zu einer Wachstumsrate von $0,50 \text{ h}^{-1}$ ein konstanter Wert von etwa $0,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ einstellte. Mit der Annäherung an den Auswaschpunkt bei $D_8 = 0,54 \text{ h}^{-1}$ nahm die Produktbildungsrate auf $0,06 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab. Folglich wurde die maximale Raum-Zeit-Ausbeute ($5,4 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bei $D_2 = 0,15 \text{ h}^{-1}$ erreicht.

Diskussion

Mit den modifizierten Bioreaktoren war die parallele Einstellung stabiler Fließgleichgewichtszustände bei der Expression von PAmCherry möglich. So konnte die Wachstumskinetik und Produktbildung mit einer Induktorkonzentration von $5 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG in Abhängigkeit von der Wachstumsrate charakterisiert werden. Dabei zeigte die Expression des rekombinanten Proteins PAmCherry im Gegensatz zu beschriebenen Bioprozessen (Sørensen und Mortensen 2005; Carneiro et al. 2013) keinen Einfluss auf die maximale Wachstumsrate der Zellen. Dies kann auf die geringe metabolische Last bei niedrigen Induktorkonzentrationen zurückgeführt werden (Fernández-Castané et al. 2012b). So konnten Sevastyanovich et al. (2009) im Satzbetrieb ebenfalls keine signifikante Reduktion der maximalen Wachstumsrate von *E. coli* nach der Induktion des T7-Promotors mit $8 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG beobachten.

Im Vergleich zum Wachstum ohne Produktbildung wurde ein geringerer Biomasseausbeutekoeffizient und eine erhöhte Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel bestimmt. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte jedoch keine signifikante Veränderung der identifizierten formalkinetischen Parameter nachgewiesen werden. Da die Zellen nach der Induktion des T7-Promotors zellinterne Ressourcen für die Bildung des Expressionsapparates und des heterologen Proteins bereitstellen müssen, wird der Zentralstoffwechsel hin zu energetisch ungünstigeren Zuständen ausgelenkt (Hoffmann und Rinas 2004; Sørensen und Mortensen 2005), was eine verminderte Biomassebildung zur Folge hat (Carneiro et al. 2013). Weiter wird für den erhöhten Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP), Aminosäuren oder Transfer-Ribonukleinsäure (tRNS) nach der Induktion (Dong et al. 1995) mehr Substrat für die Erhaltung der Zelle benötigt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Verringerung der Biotrockenmassekonzentration in verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen auf die Verschiebung des Stoffwechsels von *Escherichia coli* hin zu energetisch ungünstigeren Zuständen zurückzuführen ist.

Mit zunehmender Wachstumsrate wurde zudem durch die verringerte Verweilzeit der Zellen im Reaktor eine Abnahme der Produktkonzentration und des Produktanteils beobachtet, da die Produktbildung nur geringfügig von der Wachstumsrate abhängig war. Dagegen konnte ein Maximum der spezifischen Produktbildungsrate und somit der Raum-Zeit-Ausbeute bei einer Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ nachgewiesen werden.

Die Wachstumsrate ist eine wichtige Zielgröße für die Optimierung von vielen mikrobiellen Produktionsprozessen von extrazellulären und intrazellulären Produkten im kontinuierlichen Betrieb sowie bei Zulaufverfahren, da zumeist eine Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Wachstumsrate besteht (Turner et al. 1994; Rhee und Schügerl 1998; Tripathi 2009; Brethauer und Wyman 2010). So können mit Hilfe der modifizierten Bioreaktoren zukünftig Fließgleichgewichtsuntersuchungen für die Bestimmung der Kinetik von Wachstum und Produktbildung bei der Entwicklung oder Verbesserung von Bioprozessen durchgeführt werden. Durch die Parallelisierbarkeit und das geringe Reaktionsvolumen der Reaktoren, können so der experimentelle Aufwand und die Kosten im Vergleich zu bisherigen sequentiellen Untersuchungen in Chemostaten im Labormaßstab oder im Zulaufbetrieb deutlich reduziert werden.

6.5.2 Einfluss der Induktorkonzentration auf die Proteinproduktion

Ein weiterer wichtiger Parameter für die effiziente Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* ist die Induktionsstrategie. Dabei wird im Zulaufbetrieb zumeist nach einer Biomassebildungsphase einmalig eine IPTG-Lösung zugegeben, um Induktorkonzentrationen von 5 bis 5 000 μM im Medium zu erhalten. In vielen Anwendungen wurde eine starke Abhängigkeit der Effizienz des Bioprozesses von der vorgelegten Induktorkonzentration beobachtet. Deshalb sollte der Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Produktion von PAmCherry im kontinuierlichen Betrieb mit *E. coli* untersucht werden. Hierfür wurden neun Bioprozesse im Milliliter-Maßstab durchgeführt, bei denen nach einer Satzphase (25 g L^{-1} Glucose) die Induktorkonzentration durch die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ einer konzentrierten IPTG-Lösung mit dem Laborroboter auf $0 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ und $1\,000 \mu\text{M}$ eingestellt wurde. Zeitgleich wurde der kontinuierliche Betrieb mit 25 g L^{-1} Glucose und der jeweiligen IPTG-Konzentration im Zulaufmedium gestartet. Dabei wurde eine Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ gewählt, bei der die höchste Raum-Zeit-Ausbeute mit einer Induktorkonzentration von $5 \mu\text{M}$ erreicht wurde (siehe Kapitel 6.5.1). Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu charakterisieren, wurden die Bioprozesse mit $5 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ IPTG im Dreifachansatz durchgeführt. Der Ansatz mit $0 \mu\text{M}$ IPTG diente als Negativkontrolle für das Wachstum der Zellen ohne Induktion und die Proteinproduktion bei $1\,000 \mu\text{M}$ IPTG als Referenz für die in Bioprozessen am häufigsten eingesetzte Induktorkonzentration. Ein Vergleich der im Fließgleichgewicht erreichten Biotrockenmassenkonzentrationen und spezifischen Produktbildungsrate ist in Abbildung 6.9 dargestellt.

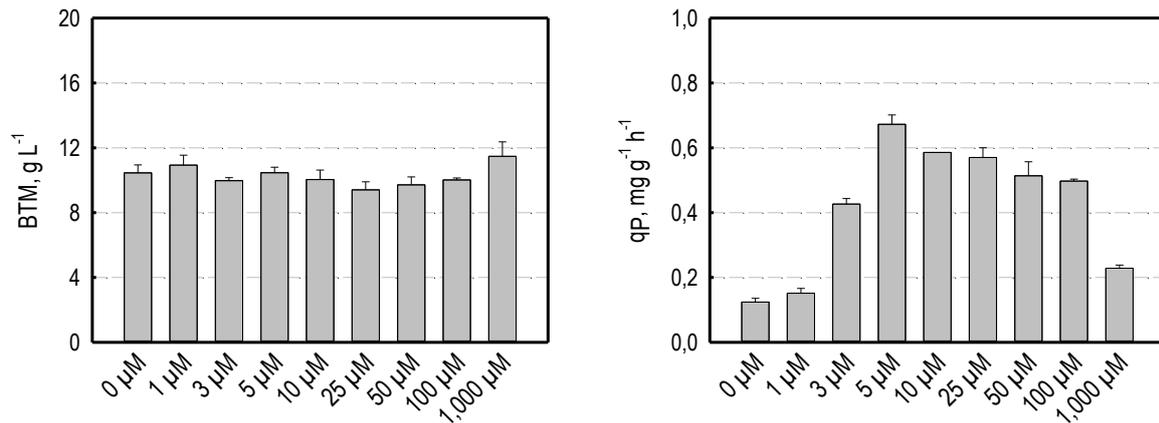


Abbildung 6.9: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$). Dargestellt sind die im Fließgleichgewicht erreichten Werte der Biotrockenmassekonzentration und der spezifischen Produktbildungsrate in Abhängigkeit der eingestellten IPTG-Konzentration. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für IPTG-Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ aus den Werten im Fließgleichgewicht von drei unabhängigen Bioprozessen und für die weiteren IPTG-Konzentrationen aus den ermittelten Werten ab der Einstellung des Fließgleichgewichtes (nach mindestens fünf τ) einer Kultivierung berechnet.

Im Rahmen der Messgenauigkeit konnte kein signifikanter Einfluss der Induktorkonzentration auf die Biotrockenmassekonzentration im Fließgleichgewicht, welche in allen Ansätzen zwischen $9,4 \text{ g L}^{-1}$ und $11,4 \text{ g L}^{-1}$ betrug, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die spezifische Produktbildungsrate im Fließgleichgewicht eine Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration im Medium. So wurde bei $0 \mu\text{M}$ beziehungsweise $1 \mu\text{M}$ IPTG lediglich Basalexpression beobachtet, während ab einer IPTG-Konzentration von $3 \mu\text{M}$ eine Induktion der Proteinexpression sichtbar wurde. Die höchste spezifische Produktbildungsrate wurde mit $0,67 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $5 \mu\text{M}$ IPTG gemessen. Mit der weiteren Erhöhung der Induktorkonzentration sank die spezifische Produktbildungsrate auf etwa $0,58 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $10 \mu\text{M}$ beziehungsweise $25 \mu\text{M}$ IPTG und auf etwa $0,50 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $50 \mu\text{M}$ beziehungsweise $100 \mu\text{M}$ IPTG. Eine deutliche Verringerung der spezifischen Produktbildungsrate konnte mit $0,23 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Induktorkonzentration von $1\,000 \mu\text{M}$ beobachtet werden.

Um die Ursache für die Abnahme der Produktbildungsrate im Fließgleichgewicht ab einer IPTG-Konzentration von über $5 \mu\text{M}$ zu evaluieren, wurden die PAmCherry-Konzentrationen der neun Bioprozesse über die Prozesszeit aufgetragen (siehe Abbildung 6.10). Für IPTG-Konzentrationen von $3 \mu\text{M}$ beziehungsweise $5 \mu\text{M}$ IPTG wurde ein stetiger Anstieg der Proteinkonzentration bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichtszustandes nach etwa 3,5 Verweilzeiten beobachtet, während es bei der Induktion mit $10 \mu\text{M}$ IPTG zu einer leichten Überexpression bis nach etwa zwei Verweilzeiten kam und das Fließgleichgewicht nach etwa fünf Verweilzeiten erreicht wurde. Dahingegen konnte ab der Induktion mit $25 \mu\text{M}$ IPTG eine

hohe Produktbildung bis nach etwa einer Verweilzeit beobachtet werden. So nahm die maximale Proteinkonzentration im Prozessverlauf mit steigender Induktorkonzentration bis auf maximal $974 \pm 53 \text{ mg L}^{-1}$ bei $100 \mu\text{M}$ IPTG zu. Nach etwa einer Verweilzeit kam es zu einer signifikanten Abnahme der Produktbildungsrate und zu einem Auswaschen des Produktes, bis sich nach etwa sieben Verweilzeiten ein Fließgleichgewicht einstellte. Bei einer weiteren Erhöhung der IPTG-Konzentration auf $1\,000 \mu\text{M}$ trat eine verringerte Überexpression mit maximal $314 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ PAmCherry nach 0,66 Verweilzeiten auf, bis nach etwa vier Verweilzeiten ein Fließgleichgewicht bei einer Proteinkonzentration von $17 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht wurde.

Dabei konnte in sämtlichen Bioprozessen mit einer IPTG-Konzentration $\geq 25 \mu\text{M}$ eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration bis etwa 1,5 Verweilzeiten nachgewiesen werden, die zwischen 10 – 30 % der Zelldichte zum Start der kontinuierlichen Kultivierung betrug. Währenddessen kam es zu einer Akkumulation des Substrates (maximal $3,1 \text{ g L}^{-1}$ Glucose). Anschließend wurde eine erneute Zunahme der Zellmasse beobachtet, bis nach etwa 3,5 Verweilzeiten die Biotrockenmassekonzentration des Fließgleichgewichtszustandes erreicht wurde. Während der kontinuierlichen Kultivierungen konnten keine inhibierenden Konzentrationen an Acetat ($< 0,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat) gemessen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte mit den im Rahmen der Messgenauigkeit äquivalenten Verläufen der Biotrockenmasse- (Daten nicht gezeigt) und Proteinkonzentration bei jeweils drei Bioprozessen mit IPTG-Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ gezeigt werden.

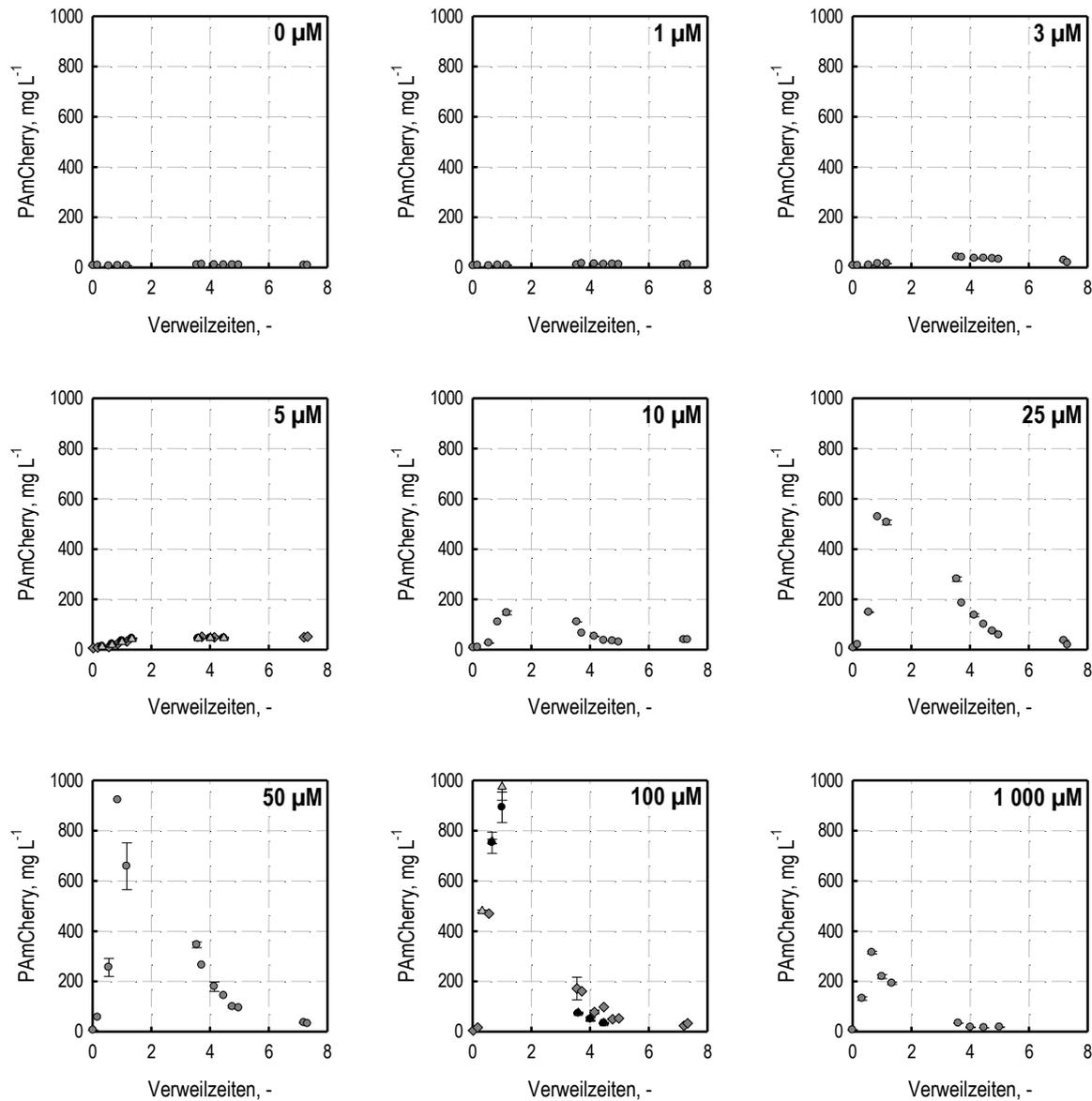


Abbildung 6.10: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$). Dargestellt sind die PAmCherry-Konzentrationen im Prozessverlauf bei der Induktion mit IPTG-Konzentrationen zwischen $0 \text{ } \mu\text{M}$ und $1\,000 \text{ } \mu\text{M}$. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus einer Dreifachbestimmung ermittelt. Für IPTG-Konzentrationen von $5 \text{ } \mu\text{M}$ und $100 \text{ } \mu\text{M}$ sind jeweils drei Bioprozesse dargestellt.

Diskussion

Mit der spezifischen Anpassung der IPTG-Konzentration kann die Ausbeute bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* deutlich erhöht werden (Tripathi 2009; Fernández-Castané et al. 2012a). Herkömmlicherweise werden Konzentrationen von $5 \text{ } \mu\text{M}$ bis $5\,000 \text{ } \mu\text{M}$ eingesetzt, wobei die Expression meist mit $1\,000 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG induziert wird (Donovan et al. 1996). Allerdings kann es oftmals bereits wenige Stunden nach der Induktion des T7-Promotors zum Absterben der Zellen kommen (Striedner et al. 2003). Eine Verringerung

der Induktorkonzentration kann in einigen Fällen aufgrund der geringeren metabolischen Belastung zu einer erhöhten Effizienz des Bioprozesses führen (Sevastyanovich et al. 2009). Dabei muss für jeden Herstellungsprozess eine empirische Optimierung der Induktionsstrategie vorgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der IPTG-Konzentration auf die kontinuierliche Produktion des intrazellulär gebildeten Proteins PAmCherry bei einer Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ untersucht. Bei einer Induktorkonzentration von $0 \mu\text{M}$ beziehungsweise $1 \mu\text{M}$ wurde lediglich Basalexpression nachgewiesen. Nach der Induktion mit $3 \mu\text{M}$ beziehungsweise $5 \mu\text{M}$ IPTG konnte eine stetige Zunahme der Proteinkonzentration bis zur Einstellung der Fließgleichgewichtszustände nach 3,5 Verweilzeiten beobachtet werden, während mit einer Induktorkonzentration von $10 \mu\text{M}$ nach einer leichten Überexpression zum Beginn des kontinuierlichen Betriebs erst nach etwa fünf Verweilzeiten ein Fließgleichgewichtszustand erreicht wurde. Im Rahmen der Messgenauigkeit war die Biotrockenmasse in diesen Ansätzen über die gesamte Dauer der kontinuierlichen Kultivierung konstant. In sämtlichen Ansätzen mit einer IPTG-Konzentration $\geq 25 \mu\text{M}$ wurde eine hohe Produktbildungsrate bis nach etwa einer Verweilzeit gemessen. Des Weiteren konnte in den ersten 1,5 Verweilzeiten eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und eine Akkumulation von Glucose nachgewiesen werden, was für ein Auswaschen der Zellen sprach. Anschließend kam es zu einer erneuten Zunahme der Zellmasse und einer deutlichen Abnahme der Produktbildungsrate. In diesen Bioprozessen wurde nach vier bis sieben Verweilzeiten ein Fließgleichgewichtszustand erreicht. Während im Fließgleichgewicht in allen Ansätzen vergleichbare Biotrockenmassekonzentrationen gemessen wurden, wies die Produktbildungsrate ein Maximum bei $5 \mu\text{M}$ IPTG auf und nahm mit zunehmender Induktorkonzentration ab.

Diese Erkenntnisse stimmen mit Untersuchungen zur Herstellung rekombinanter Proteine im Satz- und Zulaufbetrieb überein. So wurde für die Expression mit geringen Induktorkonzentrationen von $8 \mu\text{M}$ kein Einfluss der Produktbildung auf die Wachstumsrate von *E. coli* beobachtet, da mit der schwachen Induktion die metabolische Last auf die Zellen durch eine sehr geringe Expression der T7-Polymerase und somit einer verminderten Produktion des Zielproteins deutlich verringert wird (Sevastyanovich et al. 2009). Des Weiteren konnten Fernández-Castané et al. (2012a, b) zeigen, dass bei IPTG-Konzentrationen $< 20 \mu\text{M}$ eine aktive Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung von IPTG mit Hilfe der Lactose-Permease LacY stattfindet. Damit können die Zellen vermutlich bei niedrigen Induktorkonzentrationen durch die kontrollierte Aufnahme von IPTG aktiv die Stärke der Produktbildung regulieren. So kann über einen langen Zeitraum eine konstante Produktbildung ohne die Abnahme der Wachstumsrate erreicht werden (Sevastyanovich et al. 2009).

Ab einer Konzentration von 20 μM gelangt IPTG diffusiv über die Zellmembran in das Zytoplasma von *E. coli* (Fernández-Castané et al. 2012a, b), wodurch es direkt nach der Induktion zu einer starken Expression des Zielproteins und einer damit verbundenen hohen metabolischen Last auf die Zellen kommt (Alfasi et al. 2011). Diese kann bereits nach wenigen Stunden zu einem Absterben von Zellen mit hohen Produktbildungsraten führen (Striedner et al. 2003). Für Satzprozesse mit *E. coli* BL21 zur Herstellung eines Fusionsproteins (500 μM IPTG) beschrieben Sevastsyanovich et al. (2009) und Alfasi et al. (2011) nach anfänglich ausgeprägter Produktbildung eine Zunahme des Anteils an nicht produzierenden Zellen. So konnte weiterhin das Wachstum aufrechterhalten werden, wohingegen die Produktbildungsrate deutlich abnahm. Eine Analyse der Kultur ergab die Bildung von vier Subpopulationen. Zum einen wurden tote Zellen mit und ohne Protein detektiert. Zum anderen konnten Zellen ohne Produktbildung nachgewiesen werden, die keinen Expressionsvektor mehr trugen. Eine weitere Subpopulation bestand aus Zellen, die weiterhin Produktbildung aufwiesen. Dabei handelte es sich zum Teil um Zellen im Ursprungszustand, die aus stochastischen Gründen während der Kultivierung ihre Teilungsfähigkeit erhielten. Weiter wurden die Zellen mit der höchsten intrazellulären Proteinkonzentration per Durchflusszytometrie isoliert und genetisch charakterisiert. In diesen Klonen wurden durchgehend Mutationen in der Regulationssequenz der T7-Polymerase nachgewiesen, die analog zu den für die Expression von toxischen Proteinen entwickelten Walker-Stämmen C41 und C43 (Miroux und Walker 1996) eine verringerte Bildung der T7-Polymerase zur Folge hatten (Sevastsyanovich et al. 2009; Alfasi et al. 2011). Die damit verbundene geringere metabolische Last stellt so einen Selektionsvorteil dieser Mutanten gegenüber Zellen mit einer intakten T7-Regulationssequenz dar.

So kann davon ausgegangen werden, dass es bei der kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry mit IPTG-Konzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ zum Auswaschen von Zellen mit hohen Produktbildungsraten aufgrund der hohen metabolischen Last zum Beginn der kontinuierlichen Kultivierung kam. Anschließend kam es zur Zunahme des Anteils von Zellen mit geringen Produktbildungsraten und höheren Wachstumsraten, wodurch das Wachstum aufrecht erhalten werden konnte, aber die Produktkonzentration im Medium abnahm. Um herauszufinden, ob der für kontinuierliche Prozesse häufig beschriebene Plasmidverlust (Rhee und Schügerl 1998) oder eine genetische Veränderung der Zellen ursächlich für die verringerte Produktbildung im Fließgleichgewicht bei hohen Induktorkonzentrationen sind, sollte der Bioprozess mit 100 μM IPTG aufgrund des größeren Probevolumens in den Liter-Maßstab übertragen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die modifizierten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab unter anderem für die parallele Optimierung von kontinuierlichen Bioprozessen eingesetzt werden können. Des Weiteren kann es für die reproduzierbare, metabolische

Charakterisierung von Zellen während der Produktbildung im kontinuierlichen Betrieb genutzt werden. Hierbei steht derzeit vor allem die Auswirkung verschiedener Induktionsstrategien auf den Metabolismus der Zellen im Fokus der Forschung. Ziele dieser Untersuchungen sind die Optimierung der Effizienz von Zulaufprozessen durch eine spezifische Anpassung der Induktionsstrategie (Sevastyanovich et al. 2010) sowie die Isolation von Stämmen mit einer erhöhten Produktbildungsrate (Alfasi et al. 2011). Letzteres wird bislang mit der zeitintensiven, sequentiellen Kultivierung und Analyse der Zellen in Satzversuchen erreicht. Dabei werden Fusionsproteine aus dem Zielprotein und einem leicht nachweisbaren Fluoreszenzprotein verwendet, um die Analytik zu vereinfachen. Der experimentelle Aufwand könnte mit den parallelen Chemostaten im Milliliter-Maßstab deutlich verringert werden. So könnten aus dem Ablauf der kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit einem Durchflusszytometer automatisiert Zellen mit hoher Produktbildungsrate isoliert werden und in einen weiteren kontinuierlich betriebenen Reaktor überführt werden. So könnten nach einigen Durchläufen die für Produktionsprozesse am besten geeigneten Klone selektiert werden.

6.5.3 Maßstabsübertragung

Um die Skalierbarkeit der kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* vom Milliliter- in den Labormaßstab zu überprüfen wurde ein ausgewählter Bioprozess in den 2 Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransferrate als Kriterium für die Maßstabsvergrößerung übertragen. Daneben sollte eine weitere Analyse der Ursache für die anfänglich hohe Produktbildungsrate und der folgenden Abnahme der Produktbildung bei hohen IPTG-Konzentrationen (siehe Kapitel 6.5.2) durchgeführt werden. Hierfür wurde der spezifische Plasmidgehalt der Zellen bestimmt. Nach einer Satzphase (25 g L^{-1} Glucose) wurde eine IPTG-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ im Reaktionsansatz eingestellt und der kontinuierliche Betrieb mit 25 g L^{-1} Glucose und $100 \mu\text{M}$ IPTG im Zulaufmedium bei einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ gestartet.

Ein Vergleich der Verläufe der Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration während des kontinuierlichen Betriebes im Milliliter- und Liter-Maßstab, der Verlauf des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidanteils im Abgas sowie der auf die Biomasse bezogene Plasmidgehalt im Liter-Maßstab sind in Abbildung 6.11 dargestellt.

Die Verläufe der Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration zeigten während des kontinuierlichen Betriebs der Bioreaktoren im Milliliter- und Liter-Maßstab im Rahmen der Messgenauigkeit eine hohe Übereinstimmung, was auf eine direkte Skalierbarkeit des Bioprozesses mit der maximalen Sauerstofftransferrate als Kriterium für die Maßstabsübertragung schließen lässt.

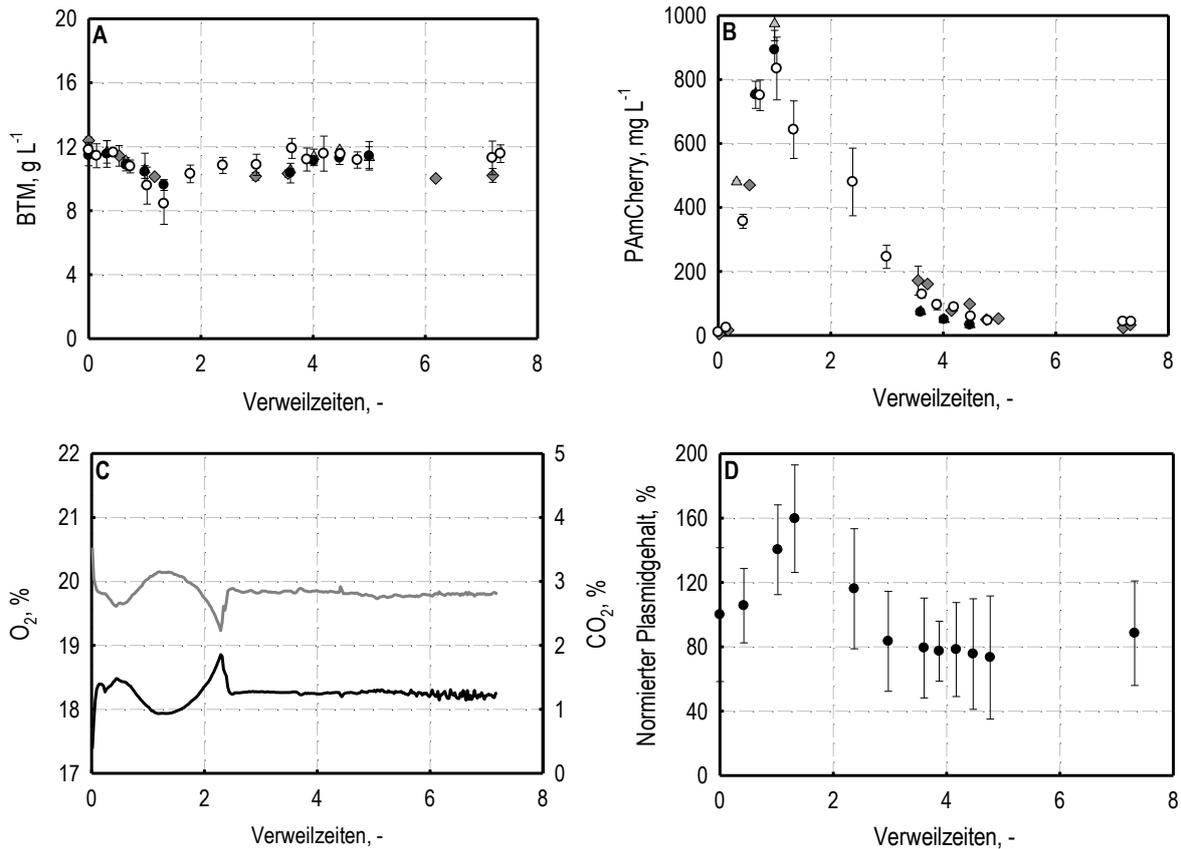


Abbildung 6.11: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$, $100 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG). Dargestellt ist ein Vergleich der (A) Biotrockenmasse- und (B) PAmCherry-Konzentration von drei Bioprozessen im 10 Milliliter-Maßstab (\bullet , \blacklozenge , \blacktriangle) und einem Bioprozess im 2 Liter-Maßstab (\circ), sowie (C) die Sauerstoff- (graue Linie) beziehungsweise Kohlenstoffdioxidanteile (schwarze Linie) im Abgas und (D) der auf die Biomasse bezogene und auf die zum Start der kontinuierlichen Kultivierung vorliegende Plasmidkonzentration normierte Plasmidgehalt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Die Zelldichte nahm im Liter-Maßstab von anfänglich $11,8 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $8,4 \pm 1,2 \text{ g L}^{-1}$ nach 1,3 Verweilzeiten ab. Dabei kam es zu einer Akkumulation von bis zu $4,8 \text{ g L}^{-1}$ Glucose. Anschließend war eine erneute Zunahme der Zellmasse zu beobachten, bis sich nach etwa 3,8 Verweilzeiten ein Fließgleichgewichtszustand bei circa $11,3 \text{ g L}^{-1}$ einstellte. In der Folge konnte von substratlimitiertem Wachstum ausgegangen werden, da die Glucosekonzentration mit maximal 50 mg L^{-1} unter der Affinitätskonstante für Glucose des verwendeten *E. coli*-Stammes (90 mg L^{-1}) lag.

Der Verlauf des Wachstums konnte anhand des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidanteils im Abgas nachvollzogen werden. So kam es zwischen 0,5 und 1,3 Verweilzeiten zu einer Abnahme der Stoffwechselaktivität, was an der verringerten Kohlenstoffdioxidkonzentration im Abgas zu erkennen ist. Anschließend trat unlimitiertes Wachstum mit dem Verbrauch der

überschüssigen Glucose im Medium, gekennzeichnet durch eine erhöhte Kohlenstoffdioxidbildungsrate, bis nach 2,3 Verweilzeiten auf. Daraufhin ließen die konstanten Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentrationen im Abgas auf eine konstante Stoffwechselrate unter substratlimitierten Bedingungen schließen.

Auch im Liter-Maßstab konnte eine ausgeprägte Produktbildung zu Beginn des kontinuierlichen Betriebs mit einer maximalen PAmCherry-Konzentration von $843 \pm 98 \text{ mg L}^{-1}$ nach 1,0 Verweilzeiten nachgewiesen werden. Anschließend kam es zu einer verringerten Produktion des Zielproteins, bis sich zum Prozessende ein Fließgleichgewicht bei etwa $43 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ PAmCherry einstellte.

Um die Ursache für die Verringerung der Produktbildung im Prozessverlauf zu evaluieren, wurde der Plasmidgehalt der Zellen bestimmt. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde die Plasmidkonzentration pro Gramm Biotrockenmasse auf den Ausgangswert zum Start des kontinuierlichen Betriebs normiert. Dabei zeigte sich, dass es bis nach 1,3 Verweilzeiten zu einem Anstieg des spezifischen Plasmidgehaltes auf bis zu $159 \pm 33 \%$ kam. Mit dem anschließenden Anstieg der Biotrockenmasse konnte eine Abnahme des spezifischen Plasmidgehaltes bis nach drei Verweilzeiten auf einen Wert von etwa 80 % im Fließgleichgewicht beobachtet werden. Um den Anteil der Zellen ohne Plasmid zu quantifizieren, wurden Verdünnungen der Proben aus einer Kultivierung im Milliliter-Maßstab auf Agarplatten mit und ohne Selektionsmarker ausgestrichen. Dabei konnte jedoch keine signifikante Abnahme der koloniebildenden Einheiten nachgewiesen werden.

Diskussion

Bei der kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry im Liter-Maßstab konnte analog zum Milliliter-Maßstab nach der Induktion mit $100 \mu\text{M}$ ein negativer Einfluss der hohen Produktbildungsrate auf das Wachstum der Kultur nachgewiesen werden. Neben der Abnahme der Biotrockenmassekonzentration in den ersten 1,3 Verweilzeiten konnte ab 0,5 Verweilzeiten eine verminderte Kohlenstoffdioxidbildungsrate gemessen werden, was eine Abnahme der Stoffwechselaktivität kennzeichnet. Anschließend wurde wiederum eine Zunahme der Zellmasse bei einer geringen Produktbildungsrate beobachtet, bis sich nach 3,9 Verweilzeiten eine konstante Biotrockenmassekonzentration bei substratlimitiertem Wachstum mit konstanten Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidbildungsraten einstellte. Im Fließgleichgewicht, das nach etwa sieben Verweilzeiten erreicht wurde, konnten im Liter- und Milliliter-Maßstab vergleichbare Werte für die Produktbildung und die Zelldichte gemessen werden.

So konnte zum einen die direkte Skalierbarkeit von Bioprozessen zur kontinuierlichen Produktion von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* vom Milliliter- in den Liter-Maßstab mit der

maximalen Sauerstofftransferrate als Übertragungskriterium trotz der unterschiedlichen Rührorgane in beiden Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter-Maßstab) demonstriert werden. Folglich können mit den parallelen Chemostaten im Milliliter-Maßstab zukünftig der experimentelle Aufwand und die Kosten für die Optimierung von Parametern kontinuierlicher Bioprozesse sowie für metabolische Analysen während der Produktbildung deutlich reduziert werden.

Zum anderen war durch das erhöhte Probevolumen eine erweiterte Analyse der Auswirkung der metabolischen Last auf die Zellen möglich. Wie in Kapitel 6.5.2 erläutert kann es in Bioprocessen im Satz- und Zulaufbetrieb bereits wenige Stunden nach der starken Induktion des T7-Promotors (500 μM) zu einem Wachstumsstopp der Zellen mit hohen Produktbildungsraten kommen, woraufhin der Anteil an Zellen mit geringer Produktbildung in der Kultur zunimmt (Sevastyanovich et al. 2009; Alfasi et al. 2011). Dabei kann es sich einerseits um Zellen handeln, die aufgrund von Plasmidverlust das Zielprotein nicht mehr exprimieren. Andererseits können Mutanten mit einer veränderten T7-Regulationssequenz und der damit verbundenen geringeren Expression der T7-Polymerase und des Zielproteins ebenfalls auftreten (Alfasi et al. 2011). Um zwischen den Effekten des Plasmidverlustes und der genetischen Anpassung der Kultur zu unterscheiden, wurde der auf die Ausgangsbedingungen normierte spezifische Plasmidgehalt der Zellen während des Bioprozesses gemessen. Dabei wurde bis nach 1,3 Verweilzeiten ein Anstieg des spezifischen Plasmidgehalts beobachtet. Dies kann mit der verringerten Wachstumsrate der Zellen und der damit verbundenen geringeren Verdünnung des Plasmids bei der Zellteilung in diesem Zeitraum erklärt werden. Mit der erneuten Zunahme der Zellmasse nahm der Plasmidgehalt bis zum Fließgleichgewicht auf etwa 80 % des ursprünglichen Wertes ab. Im Gegensatz zu beschriebenen Studien im Satz- und Zulaufbetrieb, bei denen nur noch 1 – 10 % der Zellen mit dem Expressionsvektor auftraten und so auf Kulturplatten mit Selektionsmarker lebensfähig waren (Alfasi et al. 2011), konnte in dieser Arbeit keine signifikante Abnahme der koloniebildenden Einheiten auf Kulturplatten mit Selektionsmarker im Verlauf der Kultivierung nachgewiesen werden. Dies sprach gegen das Auftreten von Zellen mit vollständigem Plasmidverlust, was wahrscheinlich auf die verwendeten Antibiotika zurückgeführt werden kann. In den Untersuchungen von Alfasi et al. (2011) wurde Carbenicillin als Selektionsmarker eingesetzt, welcher durch extrazelluläre β -Lactamasen abgebaut wird. Damit können Zellen ohne Plasmid von den extrazellulär produzierten Enzymen der Zellen mit Plasmid profitieren und leichter in der Kultur überleben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein pET-Vektor, der in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommt (20 – 50 Plasmide pro Zelle, Herstellerangabe (Novagen 2003)), mit Kanamycin als Selektionsmarker verwendet, welches aktiv aus der Zelle transportiert werden muss. Folglich sollten Zellen ohne Plasmid nicht lebensfähig sein. Des Weiteren wurde Kanamycin während des kontinuierlichen Betriebs mit dem Zulauf stetig in

den Reaktionsansatz eingebracht, während bei Untersuchungen von Alfasi et al. (2011) im Satzverfahren ein Abbau des Carbenicillins im Prozessverlauf stattgefunden haben muss.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass lediglich der mittlere Plasmidgehalt pro Zelle während der Kultivierung reduziert wurde und eine Abnahme der Produktbildungsrate durch die Zunahme des Anteils von Zellen ohne Plasmid ausgeschlossen werden kann. Deshalb sollten die Fluoreszenz und damit der Proteingehalt der Zellen im Verlauf der Kultivierung mittels Durchflusszytometrie, analog zu Alfasi et al. (2011) bestimmt werden. Jedoch konnte die Fluoreszenz von PAmCherry (maximale Anregung bei 564 nm) mit dem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik vorhandenen Durchflusszytometer nicht gemessen werden, da lediglich ein Laser mit einer Anregungswellenlänge von maximal 488 nm vorhanden war. So konnte keine endgültige Aussage über die auftretende Anpassung von *E. coli* an die hohe metabolische Last durch die Produktion von PAmCherry bei hohen Induktorkonzentrationen getroffen werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die miniaturisierten Bioreaktoren ein hohes Potential für metabolische Analysen während der Produktbildung aufweisen.

6.5.4 Dynamische Erhöhung der Induktorkonzentration bei der kontinuierlichen Herstellung rekombinanter Proteine

Die kontinuierliche Produktion rekombinanter Proteine hat sich bislang nicht für industrielle Anwendungen durchgesetzt. Zum einen werden im Vergleich zu Zulaufverfahren durch das ständige Austragen von Biomasse und Produkt geringere Zelldichten und Proteinkonzentrationen im Medium erreicht, was hohe Kosten bei der Bioproduktaufarbeitung zur Folge hat. Zum anderen wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, dass es nach der Induktion der Expression zu einer Anpassung der Zellen an den Selektionsdruck durch die Produktion von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* kommen kann. Dies hatte eine verminderte Produktbildungsrate im Fließgleichgewicht zur Folge, wodurch ein ökonomischer, kontinuierlicher Bioprozess zur Herstellung von PAmCherry bislang nicht sinnvoll erscheint.

Um die in Kapitel 6.5.2 beschriebene Überexpression zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung bei der pulsartigen Zugabe von IPTG-Konzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ zu umgehen, sollte in der Folge der Einfluss einer dynamischen Erhöhung der Induktorkonzentration auf die kontinuierliche Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* untersucht werden. Hierfür wurde nach einer Satzphase (25 g L^{-1} Glucose) der kontinuierliche Betrieb mit 25 g L^{-1} Glucose im Medium und einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Dabei wurde jedoch im Gegensatz zu bisherigen Bioprozessen auf die einmalige Zugabe von IPTG mit dem Laborroboter zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung verzichtet und lediglich eine definierte IPTG-Konzentration ($0 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ IPTG) im Zulaufmedium vorgelegt. Abbildung 6.12 zeigt den berechneten Verlauf der IPTG-Konzentration im Reaktionsansatz in Abhängigkeit von der im Zulaufmedium vorgelegten Induktormenge. Dabei kommt es zu einer stetigen Steigerung

der Induktorkonzentration analog dem Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren und einer asymptotischen Annäherung der Zusammensetzung des Kulturmediums an das Zulaufmedium. So sollte eine langsame Anpassung der Zellen an die einsetzende Induktion erreicht werden, um auftretende Selektionseffekte zu minimieren.

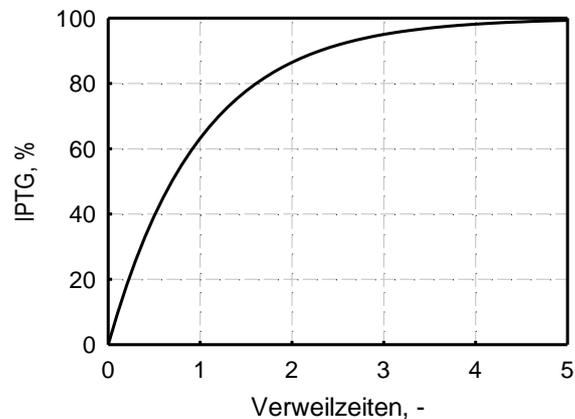


Abbildung 6.12: Berechnete IPTG-Konzentration im Prozessverlauf bei der kontinuierlichen Prozessführung mit der Vorlage einer definierten IPTG-Konzentration im Zulaufmedium.

In Abbildung 6.13 sind die Verläufe der Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration bei kontinuierlichen Prozessen mit 5 μM und 100 μM IPTG im Zulaufmedium gezeigt.

Im Rahmen der Messgenauigkeit nahm die Biotrockenmassekonzentration in den Bioprozessen mit 5 μM und 100 μM im Zulaufmedium zum Prozessbeginn (etwa 12,3 g L^{-1}) stetig ab, bis sich nach etwa fünf Verweilzeiten eine konstante Zelldichte von etwa 10,5 g L^{-1} einstellte. Bei der Kultivierung mit 5 μM IPTG im Zulaufmedium zeigte sich ein stetiger Anstieg der Proteinkonzentration, bis nach etwa 3 Verweilzeiten (4,8 μM IPTG im Reaktionsansatz) eine konstante Konzentration von $28 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht wurde. Im Gegensatz dazu war bei der Induktion mit 100 μM IPTG im Zulaufmedium ein Anstieg der PAmCherry-Konzentration bis maximal $226 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$ nach 1,9 Verweilzeiten (85,0 μM IPTG im Reaktionsansatz) zu beobachten. Anschließend kam es zu einer Abnahme der Produktbildungsrate und somit der Proteinkonzentration. Nach etwa 4 Verweilzeiten (98,2 μM IPTG im Reaktionsansatz) stellte sich eine konstante PAmCherry-Konzentration von $150 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$ ein.

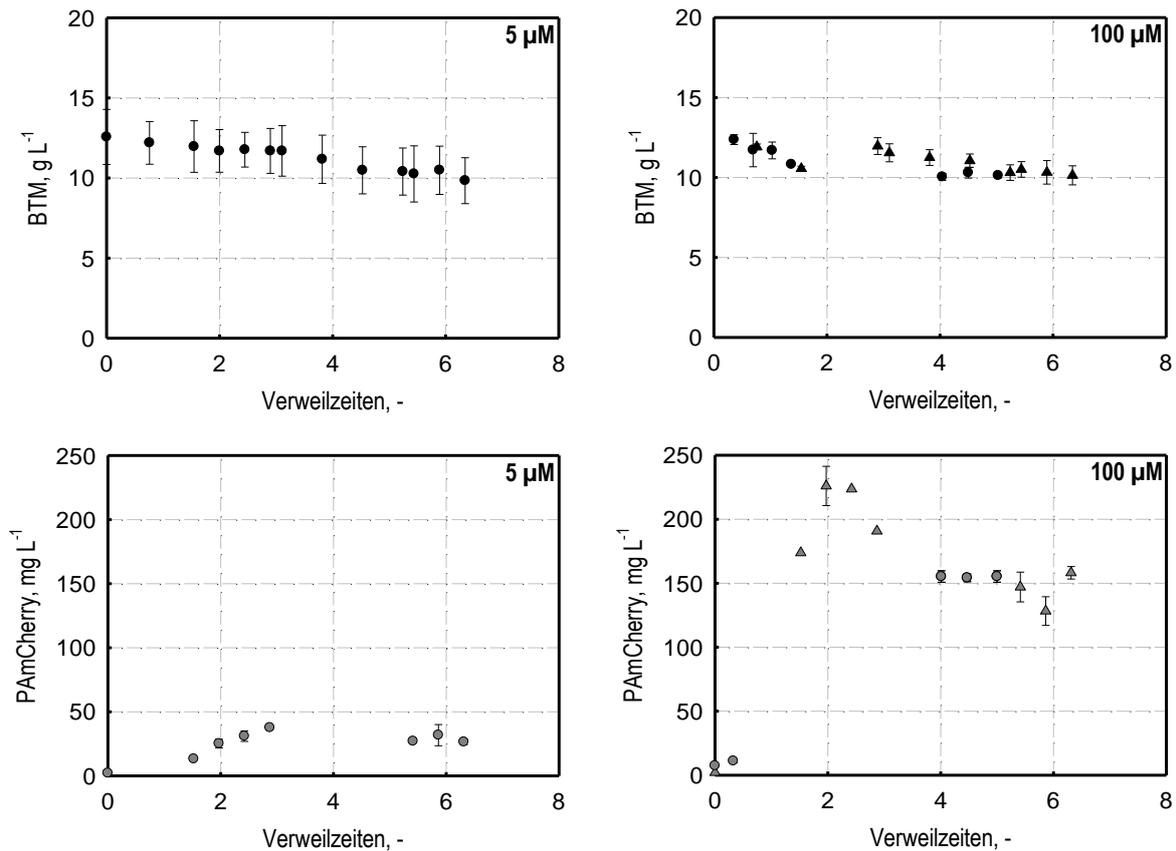


Abbildung 6.13: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$) mit der Vorlage von $5 \text{ } \mu\text{M}$ ($n = 1$) und $100 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG ($n = 2$) im Zulaufmedium und der Erhöhung der IPTG-Konzentration analog dem Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren während des Prozesses. Dargestellt ist der Verlauf der Biotrockenmasse- (schwarz) und PAmCherry-Konzentration (grau) während der Bioprozesse. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Die zum Prozessende nach 6,3 Verweilzeiten (> 99,9 % IPTG) erreichten PAmCherry-Konzentrationen und Produktbildungsraten bei der dynamischen Erhöhung der Induktorkonzentration werden in Abbildung 6.14 mit den erreichten Werten bei der chemostaten Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* aus Kapitel 6.5.2 verglichen.

Bei der Induktion mit $0 \text{ } \mu\text{M}$ beziehungsweise $1 \text{ } \mu\text{M}$ IPTG im Zulaufmedium trat wie bei der chemostaten Kultivierung mit äquivalenten Induktorkonzentrationen lediglich Basalexpression auf. Wohingegen mit Induktorkonzentrationen von $3 \text{ } \mu\text{M}$ und $5 \text{ } \mu\text{M}$ im Zulauf die Expression von PAmCherry zu beobachten war. Allerdings lagen die Proteinkonzentrationen und Produktbildungsraten zum Prozessende unterhalb der für die kontinuierliche Kultivierung im Chemostaten gemessenen Werte im Fließgleichgewicht. Eine deutliche Steigerung auf $150 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$ PAmCherry und eine Produktbildungsrate von $2,2 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konnte mit einer IPTG-Konzentration von $100 \text{ } \mu\text{M}$ im Zulaufmedium erreicht werden. Damit konnte die maximale Raum-Zeit-Ausbeute für die kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli*

auf $22,5 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Biotrockenmassekonzentration von $10,3 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden.

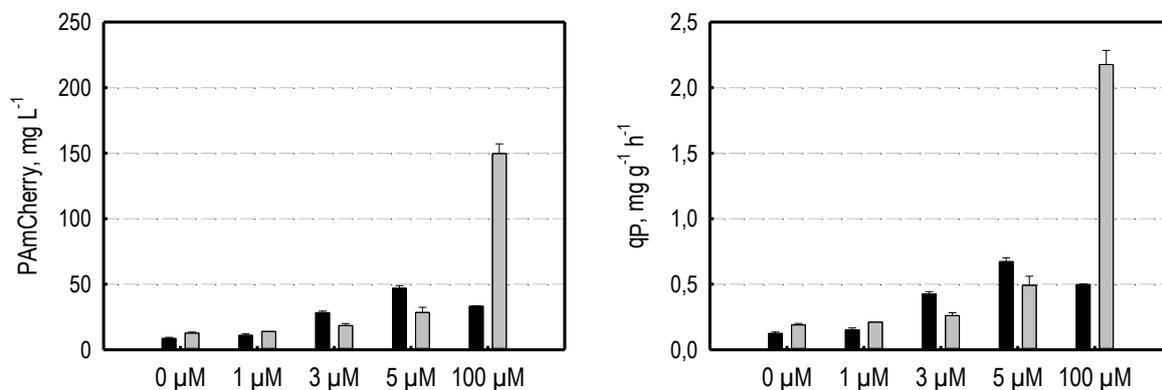


Abbildung 6.14: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 6,7 \text{ h}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,0$). Dargestellt sind die erreichten PAmCherry-Konzentrationen und die spezifischen Produktbildungsraten in Abhängigkeit der eingestellten IPTG-Konzentration. Dabei werden die Werte für Prozesse im Chemostaten mit konstanten IPTG-Konzentrationen (schwarz, siehe Kapitel 6.5.2) und der Erhöhung der IPTG-Konzentration analog dem Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren während des Prozesses (grau) verglichen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die ermittelten Werte ab der Einstellung des Fließgleichgewichtes (nach mindestens fünf Verweilzeiten) bei den Prozessen mit konstanten IPTG-Konzentrationen berechnet. Für die Prozesse mit der Erhöhung der IPTG-Konzentration analog dem Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselreaktoren wurden diese hingegen ab der Einstellung konstanter Werte berechnet.

Diskussion

Bei der kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* und einer kontinuierlichen Erhöhung der Induktorkonzentration durch die Vorlage einer definierten IPTG-Konzentration im Zulaufmedium konnte bei Induktorkonzentrationen $\leq 5 \text{ } \mu\text{M}$ eine verringerte Produktbildung im Vergleich zur Produktion von PAmCherry in Chemostaten mit konstanten Induktorkonzentrationen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Steigerung der Produktbildungsrate zum Prozessende bei einer IPTG-Konzentration von $100 \text{ } \mu\text{M}$ im Zulauf. Dabei wurde lediglich eine geringe Überexpression bis nach etwa 1,9 Verweilzeiten ohne eine signifikante Abnahme der Biotrockenmassekonzentration beobachtet, bevor sich nach etwa vier Verweilzeiten eine konstante Proteinkonzentration von $150 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$ mit einer Produktbildungsrate von $2,2 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ einstellte. So kann davon ausgegangen werden, dass die metabolische Last durch die Bildung von heterologen Proteinen aufgrund des eingeführten IPTG-Profiles reduziert wurde und somit eine geringere Selektion auf Zellen mit niedrigen Produktbildungsraten auftrat. Vergleichbare Resultate wurden bei einigen Herstellungsprozessen von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* im Zulaufbetrieb erzielt, bei

denen durch die kontinuierliche Zugabe von Induktoren des T7-Promotors wie IPTG oder Lactose eine erhöhte Ausbeute erzielt werden konnte (Altenbach-Rehm et al. 1999; Zou et al. 2014; Su et al. 2015).

Die maximal erreichte Raum-Zeit-Ausbeute bei der Induktion der Expression mit 100 μM IPTG im Zulauf von $22,5 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ lag damit im Bereich der Raum-Zeit-Ausbeuten von Produktionsprozessen im Zulaufverfahren mit Proteinkonzentrationen von $2 - 10 \text{ g L}^{-1}$ und einer Prozesszeit von zwei bis drei Tagen (Scott 2008; Guldager 2009). Mit einer Erhöhung der Zelldichte von bislang $10,3 \text{ g L}^{-1}$ könnte die Raum-Zeit-Ausbeute weiter gesteigert werden. Bislang konnten bei kontinuierlichen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab allerdings keine Zelldichten $> 20 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$ erreicht werden, da hierbei trotz der Zugabe von 0,1 % Antischaummittel starke Schaumbildung mit zeitweiser Sauerstofflimitierung auftrat.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die miniaturisierten Bioreaktoren aufgrund der hohen Parallelisierbarkeit zukünftig die Entwicklung und Optimierung von kontinuierlichen Prozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine deutlich beschleunigen können. Weiter können die Auswirkungen der Produktbildung auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen untersucht werden und die Erkenntnisse zum Beispiel für die Optimierung von Zulaufprozessen genutzt werden.

6.6 Herstellung von PAmCherry im Zulaufverfahren

Die Herstellung von intrazellulären Produkten wie rekombinanten Proteinen wird im industriellen Maßstab zumeist im Zulaufbetrieb durchgeführt. Um einen ökonomischen Prozess zu entwickeln, ist für jedes Produkt und den verwendeten Wirtsorganismus eine spezifische Anpassung der Reaktionsbedingungen und der Prozessführung notwendig.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die in Fließgleichgewichtsuntersuchungen zur kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* BL21(DE3) PAmCherry gewonnenen Erkenntnisse auf einen Zulaufprozess im Labormaßstab übertragen werden können. Hierbei sollten die bestimmten formalkinetischen Parameter des *E. coli*-Stammes (siehe Kapitel 6.4) eingesetzt werden und die Induktionsstrategie angepasst werden (siehe Kapitel 6.5.2 und 6.5.4).

6.6.1 Etablierung eines Referenzprozesses

Zunächst wurde in Anlehnung an beschriebene Bioprozesse ein Referenzprozess für die Herstellung von PAmCherry im Zulaufbetrieb realisiert. Der Bioprozess wurde in eine Biomassebildungsphase und eine anschließende Produktionsphase durch die Induktion mit 1 000 μM IPTG unterteilt. Dabei wurde wie in kontinuierlichen Prozessen ein von Riesenberg et al. (1991) für Hochzelldichteverfahren mit *E. coli* entwickeltes definiertes Medium (pH 7,0) eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte im DASGIP®Bioblock mit einem initialen Reaktionsvolumen von 0,5 L. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch die Anpassung der Rührerdrehzahl, der Begasungsrate und des Überdrucks im Reaktor auf über 25 % Luftsättigung geregelt, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Nach einer vierstündigen Satzphase (5 g L⁻¹ Glucose, 37 °C) wurde ein geregelter exponentieller Zulauf (500 g L⁻¹ Glucose, 12,5 g L⁻¹ Magnesiumsulfat-Heptahydrat) mit einer Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ für die Biomassebildung unter kontrollierten Bedingungen gestartet und die Temperatur auf 30 °C reduziert. Das entsprechende exponentielle Zulaufprofil wurde mittels Gleichung (3.21) anhand der in Kapitel 6.4 bestimmten formalkinetischen Parameter für das Wachstum des verwendeten *E. coli*-Stammes berechnet. Um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden, wurde zwischen 19,2 h und 21,8 h eine konstante Glucosezulauftrate von 6,9 g L⁻¹ h⁻¹ eingestellt. Anschließend wurde die Produktbildung mit 1 000 μM induziert und die Glucosezulauftrate auf 3,0 g L⁻¹ h⁻¹ reduziert, um eine Akkumulation des Substrates während der Expressionsphase zu umgehen (siehe Abbildung 6.15 A). Die Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration von zwei Bioprozessen sowie der exemplarische Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks einer Kultivierung sind in Abbildung 6.15 (B-D) dargestellt.

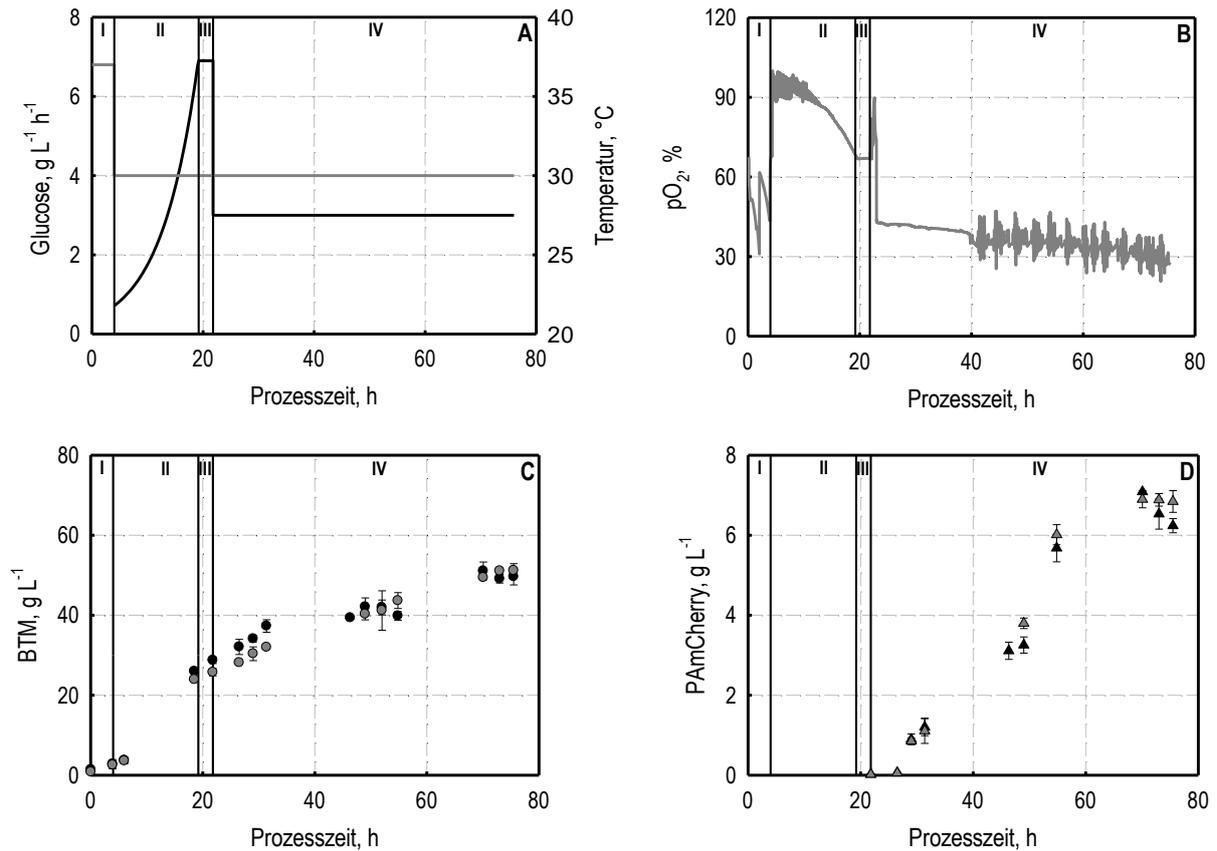


Abbildung 6.15: Produktion von PAmCherry mit *E. coli* im Zulaufverfahren (pH 7,0, $n = 2$) mit einem initialen Reaktionsvolumen von 0,5 L. Dargestellt sind: (A) Glucosezulaufrate (schwarz) und Temperatur (dunkelgrau) im Prozessverlauf, (B) Exemplarischer Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks einer Kultivierung, (C) Biotrockenmassekonzentration (●, ●) von zwei Bioprozessen und (D) PAmCherry-Konzentration (▲, ▲) von zwei Bioprozessen. Die vertikalen Linien kennzeichnen: (I) Satzphase (5 g L⁻¹ Glucose, 4 h, $T = 37$ °C), (II) exponentielle Zulaufphase ($\mu_{set} = 0,15$ h⁻¹, 15,2 h, $T = 30$ °C), (III) konstante Zulaufphase (6,9 g L⁻¹ h⁻¹ Glucose, 2,6 h, $T = 37$ °C), (IV) Produktionsphase mit der Zugabe von 1 000 μ M IPTG (3,0 g L⁻¹ h⁻¹ Glucose, 53,7 h, $T = 37$ °C).

Das entwickelte Hochzelldichteverfahren zeigte im Hinblick auf den Verlauf der Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration im Rahmen der Messungengenauigkeit eine hohe Reproduzierbarkeit. Nach der Satzphase konnte in der exponentiellen Zulaufphase eine Wachstumsrate von 0,154 h⁻¹ ($\mu_{set} = 0,150$ h⁻¹) vorgegeben werden, was für eine exakte Schätzung der formalkinetischen Parameter mit der Einstellung verschiedener Fließgleichgewichtszustände im kontinuierlichen Betrieb spricht. Mit dem Start des Zulaufs konnte bis zum Prozessende von substratlimitiertem Wachstum ausgegangen werden, da die Glucosekonzentration im Medium (< 25 mg L⁻¹) unter der für den verwendeten *E. coli*-Stamm bestimmten Affinitätskonstante für Glucose ($K_S = 90$ mg L⁻¹) lag. Die Induktion erfolgte nach 21,8 h bei einer Zelldichte von etwa 29 g L⁻¹. Anschließend war ein linearer Anstieg der Biotrockenmassekonzentration zu beobachten, bis zum Prozessende nach 75,5 h eine maximale Zelldichte von $48,1 \pm 1,5$ g L⁻¹ erreicht wurde.

Nach der Induktion mit 1 000 μM IPTG (21,8 h) war bis zu einer Prozesszeit von 55 h eine näherungsweise lineare Zunahme der Proteinkonzentration zu beobachten. Anschließend nahm die Produktbildungsrate ab und es konnte nach 70 h eine maximale PAmCherry-Konzentration von $7,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden.

Durch die Regelung des Sauerstoffpartialdrucks über 25 % Luftsättigung konnte eine Sauerstofflimitierung vermieden werden. Die Schwankungen des pO_2 ab einer Prozesszeit von 40 h wurden durch eine nicht optimale Einstellung des verwendeten Reglers verursacht, zeigten jedoch keine negativen Auswirkungen auf den Bioprozess. Des Weiteren konnte mit dem gewählten Zulaufprofil die Bildung von inhibierenden Acetatkonzentrationen ($< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ Acetat) verhindert werden. Eine ausreichende Versorgung der Zellen mit einer Stickstoffquelle konnte über die Regelung des pH mit einer Ammoniumlösung (25 % (v/v)) gewährleistet werden. Die Ammoniumkonzentration im Reaktionsansatz betrug so über die gesamte Prozesszeit zwischen $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $1,3 \text{ g L}^{-1}$.

Diskussion

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Anlehnung an beschriebene Bioprozesse zur Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* erstmals ein effizienter Produktionsprozess für PAmCherry im Zulaufverfahren entwickelt werden konnte. Mit maximal $7,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ des Zielproteins wurden Produktkonzentrationen erreicht, die im Bereich der höchsten beschriebenen Konzentrationen an rekombinatem Protein bei der Herstellung mit *E. coli* lagen (Choi et al. 2006; Scott 2008; Guldager 2009).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die formalkinetischen Parameter, die in parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit den modifizierten Bioreaktoren gewonnen wurden, eine ausgezeichnete Grundlage für die Berechnung von geregelten, exponentiellen Substratzulaufprofilen in Zulaufprozessen darstellten. Die Wachstumskinetik wird aufgrund des hohen experimentellen Aufwands von kontinuierlichen Kultivierungen in der Regel in Satzprozessen abgeschätzt, was aufgrund von Einflüssen wie Substratüberschussmetabolismus, Nebenproduktbildung oder der Änderung der Medienzusammensetzung während der Bioprozesse zu einer falschen Schätzung der Wachstumskinetik führen kann (Hoskisson und Hobbs 2005). Mit den parallelen Bioreaktoren kann zukünftig eine kostengünstige, schnelle und exakte Bestimmung der formalkinetischen Parameter von Produktionsorganismen erfolgen, wodurch unter anderem die Entwicklung von Herstellungsprozessen rekombinanter Proteine im Zulaufverfahren deutlich beschleunigt werden kann.

6.6.2 Anpassung der Induktionsstrategie

Nachdem ein Referenzprozess für die Herstellung von PAmCherry im Zulaufprozess etabliert worden war, sollte untersucht werden, ob die Effizienz des Bioprozesses durch eine Optimierung der Induktionsstrategie verbessert werden kann. In herkömmlichen Bioprozessen mit *E. coli* wird die Produktbildung unter Kontrolle des T7-Promotors wie im beschriebenen Referenzprozess oftmals durch die einmalige Zugabe von 1 000 μM IPTG induziert. In Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab zur kontinuierlichen Produktion von PAmCherry (siehe Kapitel 6.5.2) wurde jedoch beobachtet, dass mit einer IPTG-Konzentration von 5 μM die höchste Produktbildungsrate im Fließgleichgewicht erreicht werden konnte. Weiter wurde die höchste Produktbildungsrate zum Beginn des kontinuierlichen Betriebs bei der Induktion mit 100 μM IPTG nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die dynamische Erhöhung der Induktorkonzentration eine verminderte metabolische Last für die Zellen verursacht, wodurch mit der Vorlage von 100 μM IPTG im Zulaufmedium die höchste Produktbildungsrate nach fünf Verweilzeiten erreicht wurde (siehe Kapitel 6.5.4).

Diese Erkenntnisse sollten für die Anpassung der Induktionsstrategie bei der Herstellung von PAmCherry im Zulaufprozess genutzt werden. So wurden vier weitere Bioprozesse ($n = 2$) unter den Reaktionsbedingungen des Referenzprozesses (siehe Abbildung 6.15 A) durchgeführt. Dabei wurde im Vergleich zur Referenzkultivierung zum einen die Konzentration des Induktors mit der einmaligen Zugabe von 5 μM beziehungsweise 100 μM verringert. Zum anderen wurde eine dynamische Erhöhung der Induktorkonzentration über eine Variation der IPTG-Konzentration im Zulaufmedium bis auf maximal 100 μM vorgenommen. Der Verlauf der IPTG-Konzentration über die Zeit ist im Vergleich zur kontinuierlichen Kultivierung in Abbildung 6.16 dargestellt. In einer weiteren Kultivierung erfolgte keine Induktion der Proteinexpression, um einen Vergleich für das Wachstum der Zellen ohne Produktbildung zu erhalten.

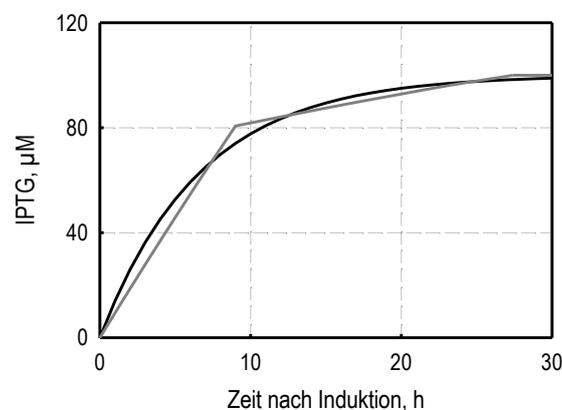


Abbildung 6.16: Berechnete IPTG-Konzentration im Prozessverlauf bei der kontinuierlichen Prozessführung mit der Vorlage einer definierten IPTG-Konzentration im Zulaufmedium (schwarz) im Vergleich zum Verlauf des vorgegebenen Konzentrationsgradienten im Zulaufprozess (grau).

In Abbildung 6.17 sind die mit verschiedenen Induktionsstrategien erreichten Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentrationen der Bioprozesse mit verschiedenen Induktionsstrategien dargestellt. Dabei sind die Mittelwerte aus je zwei Bioprozessen nach einer Prozesszeit von 70 h dargestellt, da in allen Bioprozessen nach 70 h bis zum Prozessende nach 75,5 h keine Zunahme der Proteinkonzentration mehr zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

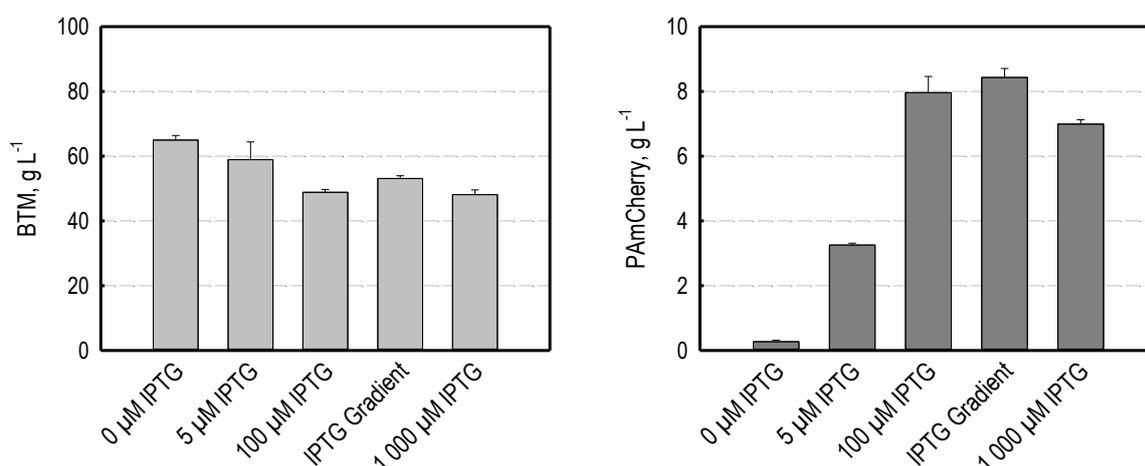


Abbildung 6.17: Herstellung von PAmCherry im Zulaufverfahren mit verschiedenen Induktionsstrategien. Dargestellt sind die erreichten Biotrockenmasse- (hellgrau) und PAmCherry-Konzentrationen (dunkelgrau) bei Bioprozessen ($n = 2$) ohne Induktion ($0 \mu\text{M}$), der Induktion durch die einmalige Zugabe von $5 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ oder $1\,000 \mu\text{M}$ IPTG sowie der Induktion durch eine dynamische Erhöhung der IPTG-Konzentration auf maximal $100 \mu\text{M}$ (IPTG Gradient).

In sämtlichen Zulaufverfahren mit Induktion der Produktbildung konnte im Vergleich zum Wachstum ohne Induktion eine Verringerung der finalen Biotrockenmassekonzentration nachgewiesen werden. Dabei wurde bei $5 \mu\text{M}$ IPTG die höchste Zelldichte der induzierten Ansätze erreicht. Weiter konnte mit einer dynamischen Erhöhung der IPTG-Konzentration ein besseres Wachstum als bei der einmaligen Induktion mit $100 \mu\text{M}$ und $1\,000 \mu\text{M}$ IPTG erreicht werden.

Im Ansatz ohne Induktion der Produktbildung trat wie erwartet lediglich Basalexpression auf. Bei der Induktion mit $5 \mu\text{M}$ IPTG wurde im Vergleich zur Referenzkultivierung ($1\,000 \mu\text{M}$ IPTG) eine um 53 % reduzierte Konzentration an PAmCherry nach einer Prozesszeit von 70 h nachgewiesen, während die erreichte Produktkonzentration bei der Induktion mit $100 \mu\text{M}$ IPTG um 14 % auf $8,0 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden konnte. Mit der dynamischen Erhöhung der IPTG-Konzentration auf maximal $100 \mu\text{M}$ IPTG wurde die höchste Proteinkonzentration von $8,4 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 70 h gemessen. So konnte mit der Anpassung der Induktionsstrategie eine Steigerung der Produktkonzentration, der Raum-Zeit-Ausbeute ($120 \pm 4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und der

auf die eingesetzte Glucose bezogene Produktausbeute ($75 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$) um 21 % erreicht werden. Der Produktanteil Y_{PX} konnte um 10 % auf 165 mg g^{-1} erhöht werden.

Diskussion

Bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* im Zulaufverfahren stellt die produkt- und wirtsspezifische Anpassung der Induktionsstrategie einen wichtigen Optimierungsansatz dar (Tripathi 2009; Fernández-Castané et al. 2012a). In Bioprozessen wird die Expression herkömmlicherweise durch die Zugabe von $5 \mu\text{M}$ bis $5\,000 \mu\text{M}$ IPTG induziert, wobei zumeist eine Induktorkonzentration von $1\,000 \mu\text{M}$ eingesetzt wird (Donovan et al. 1996). Allerdings können sich hohe IPTG-Konzentrationen negativ auf den Stoffwechsel der Zellen auswirken, was eine verminderte Zelldichte und eine verkürzte Produktbildungsphase zur Folge haben kann (Striedner et al. 2003).

In der Regel muss die Induktionsstrategie empirisch in einer Vielzahl an sequentiellen Zulaufprozessen angepasst werden (Tripathi 2009; Zou et al. 2014). Um diese aufwendige Vorgehensweise zu umgehen, sollten die in dieser Arbeit bei parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen zur kontinuierlichen Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* im Milliliter-Maßstab gewonnenen Erkenntnisse für die Optimierung der Induktionsstrategie eines Zulaufprozesses eingesetzt werden.

Im Vergleich zum Referenzbioprozess (einmalige Zugabe von $1\,000 \mu\text{M}$ IPTG) konnte mit einer Reduktion der IPTG-Konzentration auf $5 \mu\text{M}$ wie erwartet aufgrund der geringeren metabolischen Belastung bei niedrigen Induktorkonzentrationen (Fernández-Castané et al. 2012b) eine höhere Biotrockenmassekonzentration erreicht werden. Dies ging allerdings mit einer um 53 % verringerten PAmCherry-Konzentration einher. Somit konnte die erhöhte Produktbildungsrate bei $5 \mu\text{M}$ IPTG im Fließgleichgewicht der kontinuierlichen Produktionsprozesse nicht auf den Zulaufprozess übertragen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür stellen Untersuchungen dar, die neben der absoluten IPTG-Konzentration im Medium das Verhältnis von IPTG zur Zelldichte als entscheidenden Parameter für eine optimale Induktion beschreiben (Striedner et al. 2003). So könnte das reduzierte Verhältnis von IPTG zur Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion mit $0,48 \mu\text{M g}^{-1}$ im kontinuierlichen Betrieb gegenüber $0,17 \mu\text{M g}^{-1}$ im Zulaufprozess eine geringere Produktbildung zur Folge haben.

Bei der Induktion mit $100 \mu\text{M}$ IPTG konnte ein zum Referenzprozess äquivalentes Wachstum der Zellen beobachtet werden, was eine vergleichbare metabolische Last auf die Zellen während der Produktbildung nahelegt. Vergleichbare Ergebnisse wurden unter anderem von Donovan et al. (1996) beschrieben, wonach eine vollständige Induktion des T7-Promotors ab einer IPTG-Konzentration deutlich unter $100 \mu\text{M}$ möglich ist. Dagegen konnte die Produktkonzentration in diesem Ansatz aufgrund einer höheren Produktbildungsrate in den

ersten 30 h nach der Induktion im Vergleich zum Referenzprozess (Daten nicht gezeigt) um 14 % gesteigert werden.

Die höchsten Produktkonzentrationen von $8,4 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ konnten mit der dynamischen Erhöhung der Induktorkonzentration auf maximal $100 \mu\text{M IPTG}$ erreicht werden. Ursächlich hierfür war die Steigerung der finalen Biotrockenmassekonzentration (10 %) sowie die Verlängerung der Phase mit maximaler Produktbildungsrate (Daten nicht gezeigt) und somit der um 10 % gesteigerte Produktanteil im Vergleich zum Referenzprozess. So konnte auch in diesem Ansatz von einer verringerten metabolischen Last auf die Zellen während der Produktionsphase ausgegangen werden. Eine Steigerung der Ausbeute bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* durch die kontinuierliche Zugabe von Induktoren über das Zulaufmedium wurde analog zu den Erkenntnissen dieser Arbeit bereits für einige weitere Bioprozesse beschrieben (Altenbach-Rehm et al. 1999; Zou et al. 2014; Su et al. 2015).

Mit der Optimierung der Induktionsstrategie konnte ein Herstellungsprozess für PAmCherry mit einer Proteinkonzentration von $8,4 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ und einem Produktanteil von $159 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}$ entwickelt werden. Dieser kann nach einer Übersicht von Choi et al. (2006) im Bereich der effizientesten Prozesse zur Produktion von heterologen Proteinen mit *E. coli* ($c_P = 7,0 - 9,7 \text{ g L}^{-1}$, $Y_{PX} = 50 - 190 \text{ mg g}^{-1}$) angesiedelt werden (Shin et al. 1997; Jeong und Lee 1999; Vallejo et al. 2002; Hu et al. 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die für die Herstellung von PAmCherry in Fließgleichgewichtsuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse für die Anpassung der Induktionsstrategie von Zulaufprozessen genutzt werden konnten. Obwohl eine direkte Übertragbarkeit aller Ergebnisse nicht gegeben ist, können in parallelen Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb mit geringem experimentellem Aufwand erste Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Induktionsstrategien auf den Metabolismus der Zellen durchgeführt werden. Auf dieser Basis kann der Versuchsraum für eine weitere Optimierung der Induktionsstrategie von Zulaufprozessen deutlich eingeschränkt werden, was die Entwicklung von effizienten Herstellungsverfahren für rekombinante Proteine zukünftig in großem Maße beschleunigen könnte.

7 Fließgleichgewichtsuntersuchungen in der Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab

Eine Rührkesselkaskade besteht aus N sequentiell betriebenen kontinuierlichen Rührkesselreaktoren. Dabei stellt der Ablauf des Reaktors $n - 1$ den Zulauf des n -ten Reaktors dar (siehe Abbildung 3.3). Des Weiteren kann jeder Kessel um einen separaten Zulauf erweitert werden, um beispielsweise Substrate individuell zuzuführen.

Eine Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab konnte im Rahmen dieser Arbeit durch eine Erweiterung der in Kapitel 6.1 vorgestellten Reaktoren für die kontinuierliche Prozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren realisiert werden (siehe Abbildung 7.1).

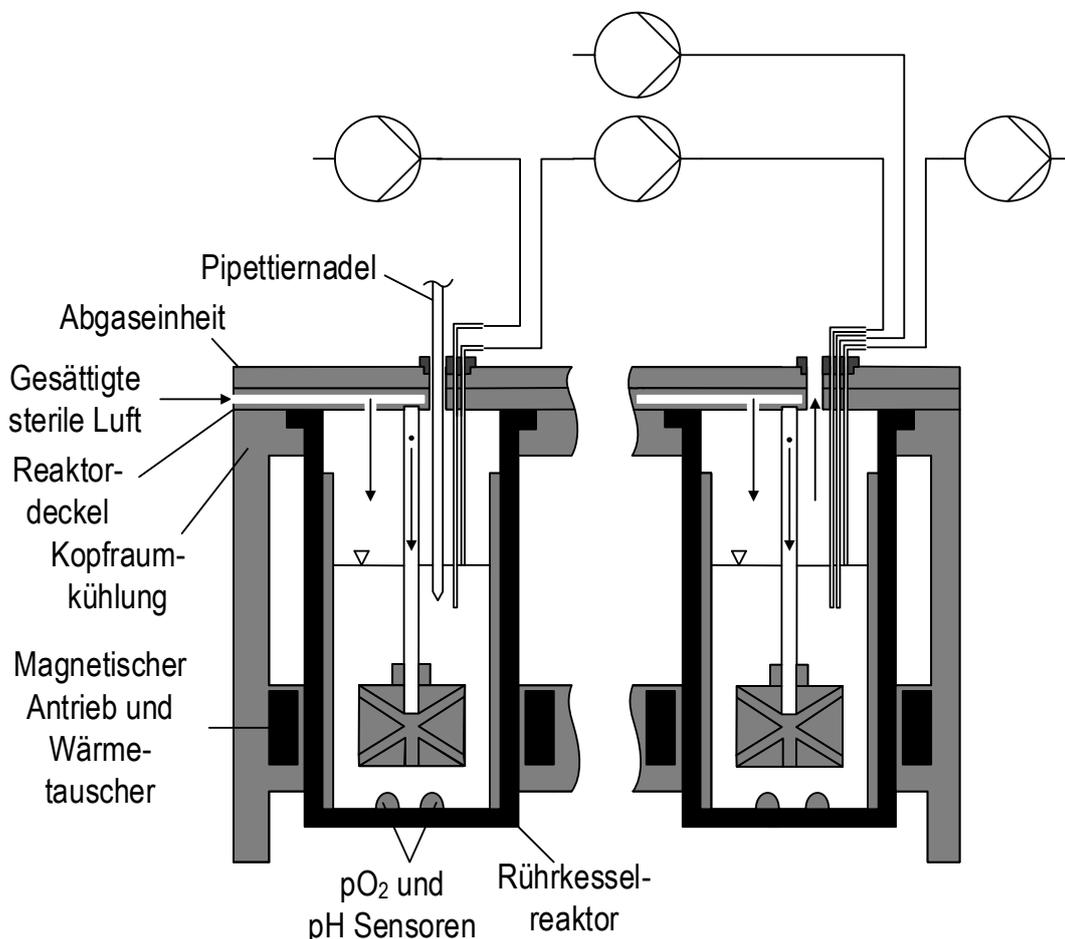


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung einer zweistufigen Reaktorkaskade im Milliliter-Maßstab. Es sind zwei von acht Einheiten gezeigt.

So wurde dem ersten Reaktor der Kaskade kontinuierlich Medium zugeführt und dessen Ablauf über eine Schlauchpumpe in den zweiten Reaktor überführt. Folglich konnten maximal acht Reaktoren in einer Kaskade betrieben werden. Durch den modularen Aufbau des

Bioreaktorblocks könnte die Kaskade auf bis zu 48 Bioreaktoren erweitert werden. Das Reaktionsvolumen wurde mit der Fixierung der Ablaufkanülen auf jeweils 10 mL eingestellt. Um die zusätzliche Versorgung eines jeden Reaktors mit Zulaufmedium zu ermöglichen, wurde dem für die kontinuierliche Betriebsführung entwickelten Aufsatz (siehe Abbildung 6.1) eine weitere Öffnung für ein drittes Winkelrohr hinzugefügt. Das Volumen der Leitungen zwischen den Reaktoren einer Kaskade betrug mit 0,03 mL lediglich 0,3 % des Reaktionsvolumens eines Reaktors.

7.1 Analyse des Verweilzeitspektrums kontinuierlicher Rührkesselkaskaden

Vor der Nutzung der neuen Reaktoren für den kontinuierlichen Betrieb von Rührkesselkaskaden im Milliliter-Maßstab sollte das Verweilzeitverhalten charakterisiert werden. Hierfür wurde, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durch die Einbringung einer NaCl-Lösung ein Dirac-Impuls (siehe Abbildung 3.4) im jeweils ersten Reaktor der Kaskade aufgegeben und die Salzkonzentration über die Messung der Leitfähigkeit am Ablauf der Kaskade in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Dabei wurde erneut eine Rührerdrehzahl von 500 U min^{-1} in jedem Reaktor gewählt.

So konnte mit den Gleichungen (3.36) und (3.39) das normierte Verweilzeitspektrum $E(\theta)$ aus dem Konzentrationsverlauf am Kaskadenausgang berechnet werden. Durch die Integration von $E(\theta)$ konnte die Verweilzeitsummenkurve $F(\theta)$ abgeschätzt werden. Da ein Dirac-Impuls mit einer unendlich hohen Konzentration der Messsubstanz, die in einem infinitesimalen Zeitintervall zugegeben wird, in der Praxis nicht erreicht werden kann, wurde die Eingangskonzentration nachträglich normiert um die Voraussetzung $F(\infty) = 1$ zu erfüllen.

Ein Vergleich der gemessenen Verweilzeitspektren und der daraus berechneten Verweilzeitsummenkurven mit den idealen Verläufen für Rührkesselkaskaden mit zwei, vier und acht Reaktoren ist in Abbildung 7.2 dargestellt.

Dabei konnte im Rahmen der Messgenauigkeit eine in der Regel gute Übereinstimmung des bestimmten Verweilzeitverhaltens mit Verweilzeitspektren und Verweilzeitsummenkurven von idealen Reaktorkaskaden beobachtet werden.

Diskussion

Mit den miniaturisierten Rührkesselkaskaden konnte das Verweilzeitverhalten von idealen Rührkesselkaskaden angenähert werden. Somit konnten in der Folge Beeinflussungen der Bioprozesse durch Phänomene wie Totzonen oder Kurzschlussströme, die gegebenenfalls in realen Reaktoren auftreten (Müller-Erlwein 2015), ausgeschlossen werden.

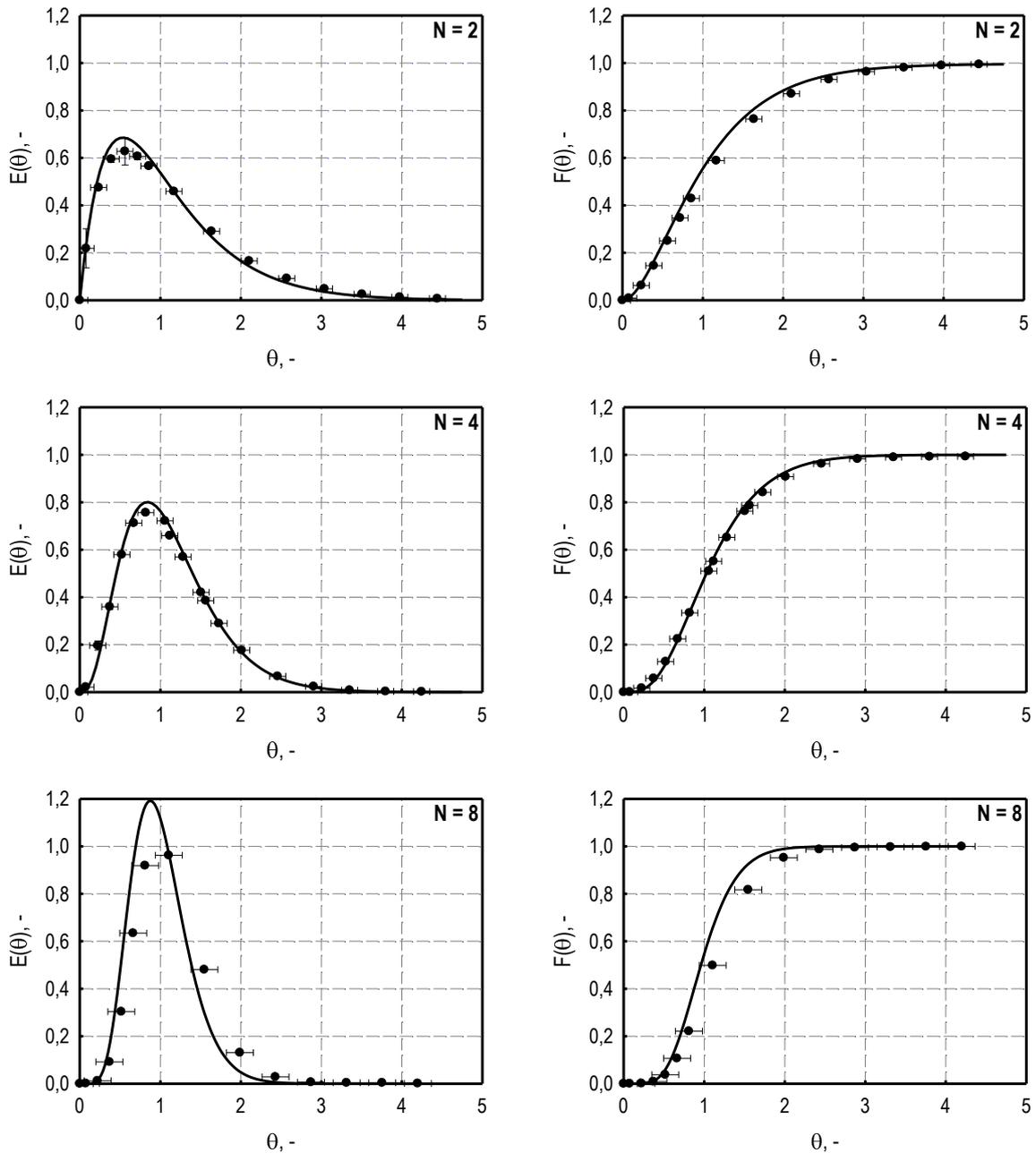


Abbildung 7.2: Verweilzeitverhalten von kontinuierlichen Rührkesselkaskaden im Milliliter-Maßstab. Dargestellt sind die experimentell bestimmten Verweilzeitspektren $E(\theta)$ (●) und Verweilzeitsummenkurven $F(\theta)$ (●) von Kaskaden bestehend aus $N = 2, 4, 8$ Reaktoren sowie deren ideale Verläufe (schwarze Linien). Die Mittelwerte und Standardabweichungen von $E(\theta)$ für die zweistufige und vierstufige Kaskade wurden aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt, während für das Verweilzeitverhalten der achtstufigen Kaskade nur eine Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

7.2 Mikrobielle Herstellung von PAmCherry in der kontinuierlichen Rührkesselkaskade

Für die Gestaltung eines effizienten, mikrobiellen Bioprozesses müssen hohe Produktkonzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden. Hierfür werden meist Zulaufprozesse eingesetzt, da im Satzbetrieb und in kontinuierlichen Prozessen oftmals nur geringe Zelldichten und damit geringe Produktkonzentrationen erreicht werden können. Eine alternative Betriebsweise stellen kontinuierliche Reaktorkaskaden dar. Dabei können beliebig viele Rührkesselreaktoren in Reihe betrieben werden, wobei in jeden Reaktor Substrat zugeführt werden kann. So findet in jedem Reaktor eine Umsetzung des Substrats statt, wodurch die Produktkonzentration schrittweise erhöht wird.

Bei der Herstellung extrazellulärer Produkte wie Ethanol, Milchsäure oder sekretierte Proteine wird oftmals eine Verweilzeitkopplung mittels Zellrückhaltung eingeführt. So können hohe Biotrockenmassekonzentrationen und Produktbildungsraten erreicht werden. Für die Herstellung intrazellulärer Produkte wie rekombinante Proteine ist das Verfahren aufgrund der Rückhaltung des Produktes mit den Zellen im Reaktor nicht geeignet. Ein weiteres Problem bei der kontinuierlichen Produktion heterologer Proteine mit *Escherichia coli* (*E. coli*) ist die mögliche Inhibition des Wachstums der Zellen während der Expression. Um dies zu umgehen, kann eine zweistufige Kaskade eingesetzt werden, wodurch die Möglichkeit besteht Wachstum und Produktbildung zu entkoppeln. So wird der erste Reaktor für die Biomassebildung ohne Produktbildung genutzt und die Zellen in den zweiten Reaktor überführt, in dem die Expression des heterologen Proteins induziert wird.

In dieser Arbeit sollte die Herstellung des Fluoreszenzproteins PAmCherry (*photoactivatable mCherry*, fotoaktivierbares mCherry) in einer zweistufigen, kontinuierlichen Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab etabliert werden. Durch die Entkopplung von Wachstum (Reaktor 1) und Expression (Reaktor 2) sollte die in Kapitel 6.5 beschriebene Selektion auf Zellen mit niedriger Produktbildungsrate im kontinuierlichen Betrieb umgangen werden. Anschließend sollte die Skalierbarkeit der Bioprozesse in den Labormaßstab überprüft werden.

7.2.1 Zweistufige Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab

Die im Folgenden beschriebenen Bioprozesse wurden bei einer Temperatur von 30 °C und pH 7,0 durchgeführt. Nach einer Satzphase (25 g L⁻¹ Glucose, 0 µM IPTG) in beiden Reaktoren der Kaskade wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Hierfür wurde dem ersten Reaktor Kulturmedium mit 25 g L⁻¹ Glucose ohne Induktor zugeführt. Im zweiten Reaktor wurde eine IPTG-Konzentration von 100 µM eingestellt, indem vor dem kontinuierlichen Betrieb eine konzentrierte IPTG-Lösung zugegeben wurde und anschließend Zulaufmedium mit 25 g L⁻¹ Glucose und IPTG zugeführt wurde. Dabei wurde die Induktorkonzentration im

Zulaufmedium des zweiten Reaktors so angepasst, dass unter Berücksichtigung der Verdünnung durch den Ablauf des ersten Reaktors konstant $100 \mu\text{M}$ IPTG im zweiten Reaktor vorhanden waren. Der erste Reaktor sollte zunächst bei einer Verdünnungsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ betrieben werden, um eine hohe Biomasseausbeute zu erreichen (siehe Kapitel 6.4). In den zweiten Reaktor wurde ein Zulauf von 1 mL h^{-1} Medium mit $400 \mu\text{M}$ IPTG dosiert, um eine Versorgung der Zellen mit Substrat und eine konstante IPTG-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ IPTG im zweiten Reaktor zu gewährleisten (siehe Abbildung 7.3). Somit betrug die Verdünnungsrate des zweiten Reaktors $0,4 \text{ h}^{-1}$ und die Verdünnungsrate der gesamten Kaskade $0,2 \text{ h}^{-1}$.

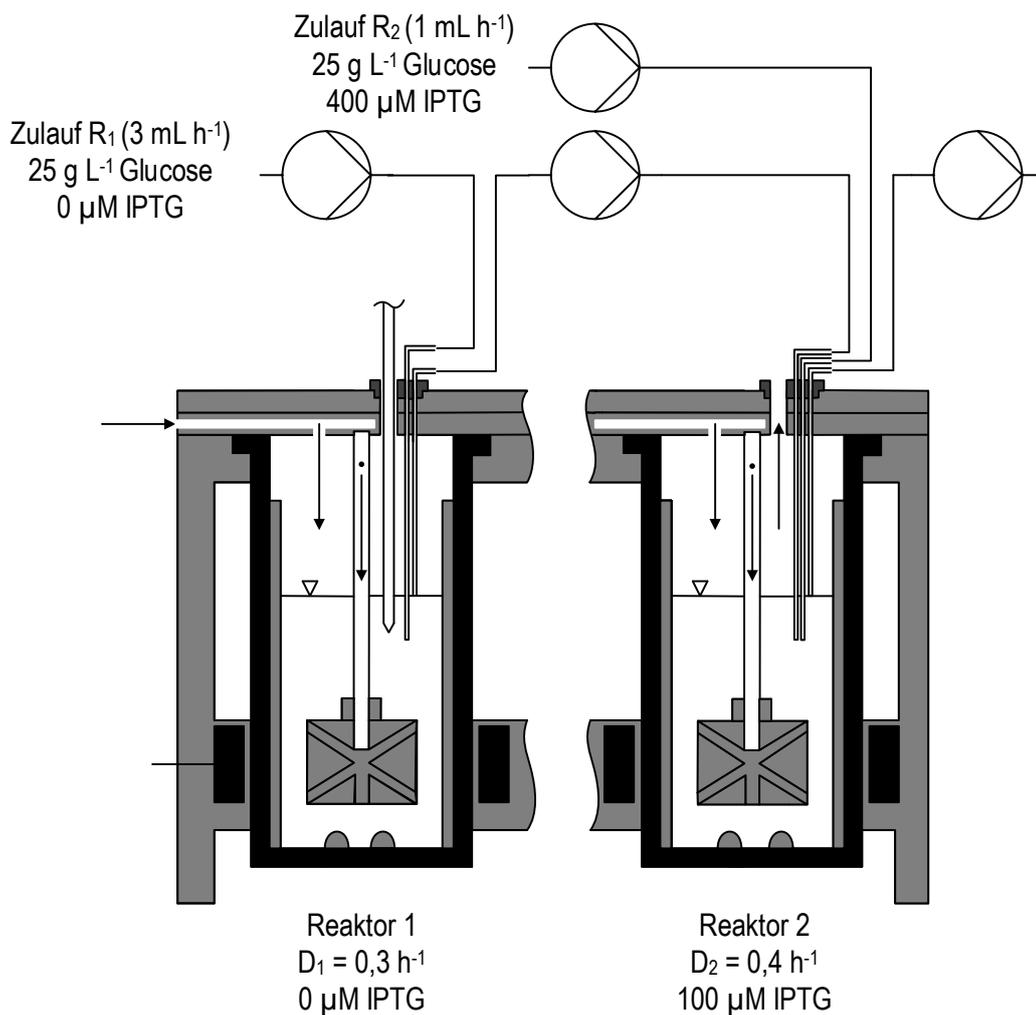


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung einer zweistufigen Reaktorkaskade zur Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* im Milliliter-Maßstab. Der erste Reaktor R₁ ($D_1 = 0,3 \text{ h}^{-1}$) wurde für die Biomassebildung eingesetzt. Nachdem die Zellen in den zweiten Reaktor R₂ ($D_2 = 0,4 \text{ h}^{-1}$) übertragen wurden, wurde die Produktbildung mit $100 \mu\text{M}$ IPTG induziert. Die Verdünnungsrate der Kaskade betrug somit $D_{ges} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ($\tau_{ges} = 5 \text{ h}$).

In Abbildung 7.4 sind die Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentrationen ($n = 2$) sowie der Sauerstoffpartialdruck in beiden Reaktoren der Kaskade über die Prozesszeit dargestellt.

Um einen Fließgleichgewichtszustand zu erreichen, wurde die Kaskade für mehr als fünf Verweilzeiten ($\tau_{ges} = 5$ h) betrieben.

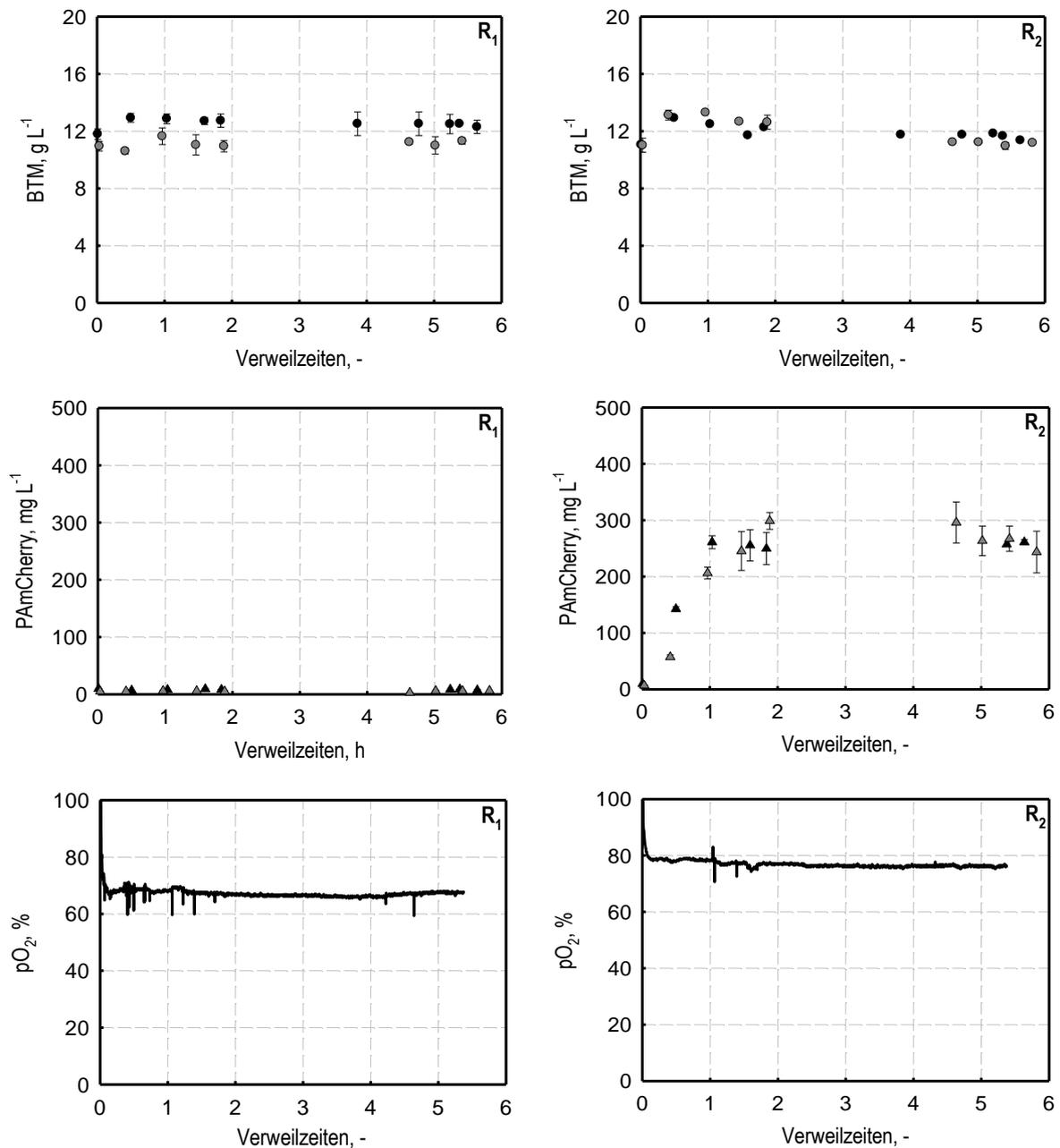


Abbildung 7.4: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* in einer zweistufigen Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab ($T = 30$ °C, pH 7,0, $n = 2$). Der erste Reaktor R_1 wurde für die Biomassebildung eingesetzt ($V_{R1} = 10$ mL, $c_{S,F1} = 25$ g L⁻¹ Glucose, $D_1 = 0,30$ h⁻¹, $\tau_1 = 3,3$ h, 0 μ M IPTG), während im zweiten Reaktor R_2 ($V_{R2} = 10$ mL, $D_2 = 0,40$ h⁻¹, $\tau_2 = 2,5$ h, 100 μ M IPTG) die Expression von PAmCherry induziert und ein separater Zulauf ($c_{S,F2} = 25$ g L⁻¹ Glucose, 400 μ M IPTG $F_2 = 1$ mL h⁻¹) eingeführt wurde. Die Verweilzeit der Kaskade betrug somit $\tau = 5$ h. Dargestellt sind für beide Reaktoren die Biotrockenmasse- (●, ●) und PAmCherry-Konzentration (▲, ▲) von zwei Bioprozessen sowie der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks im Prozessverlauf einer Kultivierung (schwarze Linien). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus einer Dreifachbestimmung berechnet.

Dabei konnte im ersten Reaktor ab dem Start der kontinuierlichen Betriebsweise eine konstante Biotrockenmassekonzentration von $11,0 - 12,5 \text{ g L}^{-1}$ gemessen werden. Im zweiten Reaktor war ein Anstieg der Zelldichte auf maximal $13,3 \text{ g L}^{-1}$ bis nach einer Verweilzeit zu beobachten, woraufhin sich nach einer folgenden stetigen Abnahme der Biotrockenmassekonzentration im Fließgleichgewicht (nach mindestens fünf Verweilzeiten) eine Zelldichte von $11,3 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ einstellte.

Während im ersten Reaktor ohne Induktor wie erwartet über die komplette Prozesszeit lediglich Basalexpression mit PAmCherry-Konzentrationen $< 10 \text{ mg L}^{-1}$ nachgewiesen wurde, nahm die Produktkonzentration im zweiten Reaktor nach dem Start der kontinuierlichen Betriebsweise stetig bis auf maximal $298 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$ nach 1,8 Verweilzeiten zu. Im Fließgleichgewicht wurde eine PAmCherry-Konzentration von $261 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ im Ablauf der Kaskade gemessen, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $52 \pm 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entsprach. Ab dem Beginn des kontinuierlichen Betriebs lag substratlimitiertes Wachstum vor, da die Glucosekonzentrationen in beiden Reaktoren ($< 50 \text{ mg L}^{-1}$) deutlich unter der für den Stamm bestimmten Affinitätskonstante für Glucose ($K_S = 90 \text{ mg L}^{-1}$) lagen. Mit Acetatkonzentrationen $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ konnte ein negativer Einfluss von Acetat auf die Produktbildung ausgeschlossen werden.

Die Reproduzierbarkeit von parallelen Reaktorkaskaden konnte mit der im Rahmen der Messungengenauigkeit äquivalenten Verläufe der Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration gezeigt werden. Dabei konnte für beide Bioprozesse eine hohe Präzision der eingestellten Volumenströme und Reaktionsvolumina mit Abweichungen $< 3 \%$ erreicht werden. So konnte über die Zeit der kontinuierlichen Betriebsweise in beiden Reaktoren ein konstanter Sauerstoffpartialdruck im Medium gewährleistet und mit einem $\text{pO}_2 > 65 \%$ Luftsättigung eine Sauerstofflimitierung verhindert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte der Einfluss der Verdünnungsrate der Kaskade auf die Produktbildung charakterisiert werden. In der Literatur wurde eine Abhängigkeit der Effizienz des Bioprozesses von der Verdünnungsrate im zweiten Reaktor (Produktbildung) bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* beschrieben (Park et al. 1990; Hortacsu und Ryu 1991; Rhee und Schügerl 1998). So wurde die Verdünnungsrate im ersten Reaktor auf $0,2 \text{ h}^{-1}$ reduziert, weshalb im Zulauf des zweiten Reaktors (1 mL h^{-1} , 25 g L^{-1} Glucose) eine IPTG-Konzentration von $300 \text{ }\mu\text{M}$ eingestellt wurde. Damit lagen bei einer Verdünnungsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ im zweiten Reaktor konstant $100 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG im Medium vor. Die Verdünnungsrate der Kaskade konnte über den gesamten Prozess mit einer Abweichung $< 2 \%$ vom Sollwert auf $0,15 \text{ h}^{-1}$ eingestellt werden. Die Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentration im zweiten Reaktor der Kaskade sind für zwei unabhängige Bioprozesse in Abbildung 7.5 dargestellt. Der Bioprozess wurde nach dem Erreichen einer im Rahmen der Messgenauigkeit

konstanten Biotrockenmasse- und Proteinkonzentration im Ablauf der Rührkesselkaskade über mindestens eine Verweilzeit abgebrochen.

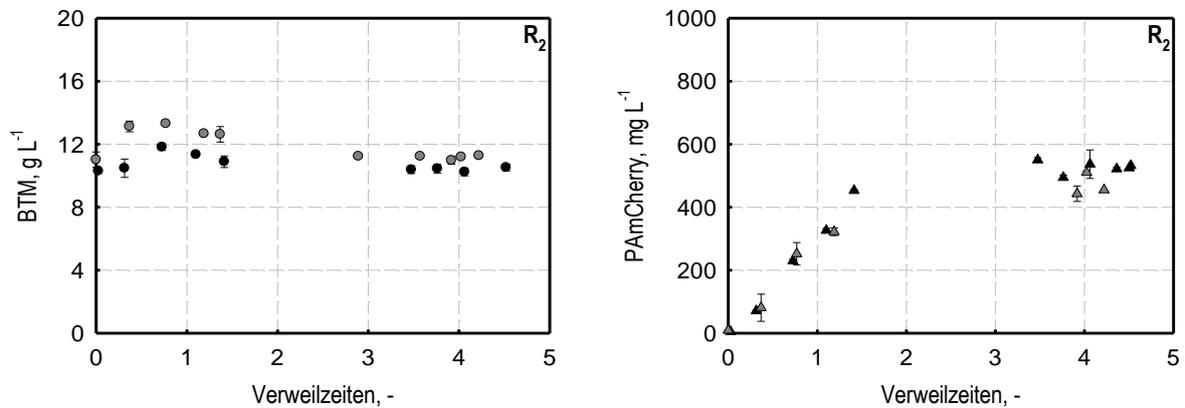


Abbildung 7.5: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* in einer zweistufigen Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab ($T = 30\text{ °C}$, $\text{pH } 7,0$, $n = 2$). Der erste Reaktor R_1 wurde für die Biomassebildung eingesetzt ($V_{R1} = 10\text{ mL}$, $c_{S,F1} = 25\text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D_1 = 0,20\text{ h}^{-1}$, $\tau_1 = 5,0\text{ h}$, $0\text{ }\mu\text{M IPTG}$), während im zweiten Reaktor R_2 ($V_{R2} = 10\text{ mL}$, $D_2 = 0,30\text{ h}^{-1}$, $\tau_2 = 3,3\text{ h}$, $100\text{ }\mu\text{M IPTG}$) die Expression von PAmCherry induziert und ein separater Zulauf ($c_{S,F2} = 25\text{ g L}^{-1}$ Glucose, $300\text{ }\mu\text{M IPTG}$, $F_2 = 1\text{ mL h}^{-1}$) eingeführt wurde. Die Verweilzeit der Kaskade betrug somit $\tau = 6,7\text{ h}$. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (●, ●) und PAmCherry-Konzentration (▲, ▲) des zweiten Reaktors bei zwei Bioprozessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus einer Dreifachbestimmung berechnet.

Im ersten Reaktor der Kaskade ohne Induktor (Daten nicht gezeigt) wurde nach etwa drei Verweilzeiten eine konstante Biotrockenmasse ($10,8 - 11,6\text{ g L}^{-1}$) und lediglich Basalexpression ($< 12\text{ mg L}^{-1}$ PAmCherry) nachgewiesen. Im zweiten Reaktor der Kaskade wurde ein Anstieg der Zelldichte zum Beginn der kontinuierlichen Kultivierung bis maximal $13,3\text{ g L}^{-1}$ nach $0,8$ Verweilzeiten beobachtet, bevor sich nach etwa $3,5$ Verweilzeiten eine konstante Biotrockenmassekonzentration von $10,8 \pm 0,4\text{ g L}^{-1}$ einstellte. Die PAmCherry-Konzentration stieg im Prozessverlauf stetig an bis nach etwa $3,5$ Verweilzeiten eine im Rahmen der Messgenauigkeit konstante Produktkonzentration von $502 \pm 36\text{ mg L}^{-1}$ im Ablauf der Kaskade gemessen wurde, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $75 \pm 5\text{ mg L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ entsprach.

So konnte mit der Verringerung der Verdünnungsrate der Rührkesselkaskade von $0,2\text{ h}^{-1}$ auf $0,15\text{ h}^{-1}$ eine deutliche Steigerung der Effizienz für die Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* im Hinblick auf die Produktkonzentration, die Raum-Zeit-Ausbeute und die spezifische Produktbildungsrate (bezogen auf zweiten Reaktor) erreicht werden. Daneben konnte ebenfalls die Produktausbeute und der Produktanteil gesteigert werden. Durch die räumliche Trennung des Wachstums und der Produktbildung in den beiden Reaktoren der Rührkesselkaskaden konnte eine deutliche Steigerung der Prozessleistung im Vergleich zur

Herstellung von PAmCherry in einem kontinuierlichen Rührkesselreaktor erreicht werden (siehe Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Vergleich der PAmCherry-Konzentrationen ($c_{PAmCherry}$), Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA), spezifischen Produktbildungsrate (q_p), Produktausbeuten (Y_{PS}) und Produktanteile (Y_{PX}) bei der Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* in zweistufigen Rührkesselkaskaden mit Verdünnungsraten von $0,20 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,15 \text{ h}^{-1}$ und in einem kontinuierlichen Rührkesselreaktor (Referenz kRK) mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ (siehe Kapitel 6.5.2).

Parameter	Kaskade mit $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$	Kaskade mit $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$	Referenz kRK mit $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$
$c_{PAmCherry}$, mg L^{-1}	261 ± 9	502 ± 36	$33,2 \pm 0,4$
RZA , $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	52 ± 2	75 ± 5	$5,0 \pm 0,1$
q_p , $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$9,3 \pm 0,3$	$14,0 \pm 1,0$	$0,50 \pm 0,01$
Y_{PS} , mg g^{-1}	$5,2 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,7$	$1,32 \pm 0,02$
Y_{PX} , mg g^{-1}	23 ± 1	47 ± 3	$3,3 \pm 0,1$

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass mit den modifizierten Bioreaktoren erstmals der Betrieb einer kontinuierlichen Rührkesselkaskade zur mikrobiellen Herstellung von Proteinen im Milliliter-Maßstab möglich war. Dabei konnte aufgrund der Möglichkeit zur präzisen Einstellung von unterschiedlichen Volumenströmen (Abweichung vom Sollwert $< 3 \%$) eine hohe parallele Reproduzierbarkeit der Kaskaden in Bezug auf die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen im Prozessverlauf bei verschiedenen Verdünnungsraten nachgewiesen werden. Aufgrund der ausgezeichneten Prozesskontrolle mit der Messung des pO_2 und der Regelung des pH können die parallelen Bioreaktoren zukünftig für die Entwicklung von effizienten, mikrobiellen Herstellungsprozessen in Rührkesselkaskaden genutzt werden.

In der Literatur wurden einige Prozesse zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* in zweistufigen Rührkesselkaskaden beschrieben. Hierbei wurde mit hohen Verdünnungsraten von $0,40 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,63 \text{ h}^{-1}$ im zweiten Reaktor der Kaskade die maximale Produktivität erreicht, da bei hohen Verdünnungsraten der Plasmidverlust im zweiten Reaktor weniger ausgeprägt war (Park et al. 1990; Hortacsu und Ryu 1991; Rhee und Schügerl 1998). Im Gegensatz dazu stellte sich bei der Produktion von PAmCherry heraus, dass mit einer Reduktion der Verdünnungsrate im zweiten Reaktor von $0,40 \text{ h}^{-1}$ auf $0,30 \text{ h}^{-1}$ (entsprechende Verdünnungsraten der gesamten Kaskade von $0,20 \text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $0,15 \text{ h}^{-1}$) die Effizienz der Kaskade gesteigert werden konnte. So wurde durch die längere

Verweilzeit wie erwartet eine Steigerung der Proteinkonzentration und des Produktanteils erreicht. Dies kann die Kosten für eine folgende Bioprozessaufarbeitung deutlich reduzieren (Croughan et al. 2015). Daneben wurde im Gegensatz zu beschriebenen Bioprozessen (Park et al. 1990; Hortacsu und Ryu 1991; Rhee und Schügerl 1998) mit einer Reduktion der Verdünnungsrate im zweiten Reaktor auf $0,30 \text{ h}^{-1}$ die Raum-Zeit-Ausbeute und die spezifische Produktbildungsrate um den Faktor 1,5 gesteigert. Daneben konnte die Produktausbeute pro Gramm Substrat nahezu verdoppelt werden. In den dargestellten Bioprozessen zur Herstellung von PAmCherry ging mit der Verringerung der Verdünnungsrate im zweiten Reaktor eine reduzierte Verdünnungsrate im ersten Reaktor einher. Hortacsu und Ryu (1991) beschrieben einen erhöhten Plasmidgehalt bei niedrigen Verdünnungsraten im ersten Reaktor der Kaskade, der für die Biomassebildung genutzt wurde. So kann die erhöhte Produktbildungsrate bei der Herstellung von PAmCherry mit einer Verdünnungsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ im zweiten Reaktor möglicherweise durch einen erhöhten Plasmidgehalt der Zellen aus der ersten Stufe bei niedrigeren Verdünnungsraten ($D_1 = 0,2 \text{ h}^{-1}$) ausgelöst worden sein.

Eine weitere Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute von bisher $75 \pm 5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ könnte zum einen durch eine Maximierung der Biotrockenmassekonzentration in den Reaktoren der Kaskade mit höheren Glucosekonzentrationen in den Zulaufmedien erreicht werden. Zum anderen könnte die Prozessführung weiter optimiert werden. Hortacsu und Ryu (1991) beschrieben hierfür eine Methode, bei der zunächst die optimale Wachstumsrate für die Maximierung der spezifischen Produktbildungsrate im kontinuierlichen Betrieb bestimmt wird. Diese Verdünnungsrate wird für den zweiten Reaktor eingesetzt. Die Verdünnungsrate des ersten Reaktors kann hinsichtlich der Balance zwischen ausreichender Plasmidstabilität bei hohen Verdünnungsraten und dem Plasmidgehalt der Zellen, der bei niedrigen Verdünnungsraten gesteigert wird, optimiert werden. Mit der Variation der Reaktionsvolumina der einzelnen Reaktoren können die jeweils optimalen Verdünnungsraten in den Stufen der Kaskade eingestellt werden.

So wird deutlich, dass insbesondere bei der Herstellung rekombinanter Proteine in einer Rührkesselkaskade für jedes Produkt und jeden Wirtsstamm eine spezielle Anpassung der Reaktionsbedingungen und der Prozessführung vorgenommen werden muss. Aufgrund des hohen Automatisierungsgrades und der Parallelisierbarkeit (bis zu 24 zweistufige Rührkesselkaskaden) sowie des geringen Reaktionsvolumens der in dieser Arbeit entwickelten kontinuierlichen Rührkessel im Milliliter-Maßstab können der experimentelle Aufwand und die Kosten für die Entwicklung von Bioprozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine in Rührkesselkaskaden zukünftig deutlich reduziert werden. Um den Freiheitsgrad bei der Wahl verschiedener Verdünnungsraten in den einzelnen Reaktoren einer Kaskade weiter zu erhöhen, sollten Winkelrohre mit unterschiedlicher Länge für den Ablauf verwendet werden. Damit könnten Reaktionsvolumina von 8 – 15 mL in den Reaktoren eingestellt werden.

7.2.2 Maßstabsübertragung

Um die Skalierbarkeit der im Milliliter-Maßstab entwickelten Bioprozesse zur Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* in einer zweistufigen Rührkesselkaskade zu evaluieren, wurde der Prozess mit einer Verdünnungsrate der Kaskade von $0,15 \text{ h}^{-1}$ in den Labormaßstab übertragen. Als Kriterium für die Maßstabsübertragung wurde die maximale Sauerstofftransferrate der Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab verwendet. Für die Bioprozesse im Labormaßstab wurden zwei Reaktoren des DASGIP®Bioblocks mit einem Reaktionsvolumen von 0,5 L verwendet. Der kontinuierliche Betrieb einer zweistufigen Rührkesselkaskade wurde mit der Implementierung von Schlauchpumpen für die Dosierung von Zulaufmedien in jeden Reaktor, den Transfer des Reaktionsansatzes und den Ablauf der Kaskade realisiert. Die Reaktionsbedingungen wurden analog zu den Kultivierungen im Milliliter-Maßstab gewählt. Ein Vergleich der Biotrockenmasse- und der Proteinkonzentration im Prozessverlauf von zwei Bioprocessen im Milliliter-Maßstab und einem Bioprozess im Liter-Maßstab sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

Dabei konnten im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbare Verläufe der Biotrockenmasse- und Proteinkonzentration in den beiden Reaktoren der Rührkesselkaskade beobachtet werden. Des Weiteren waren die zum Prozessende erreichten Biotrockenmasse- und PAmCherry-Konzentrationen, Raum-Zeit-Ausbeuten, spezifischen Produktbildungsraten (bezogen auf den zweiten Reaktor), Produktausbeuten und Produktanteile im Milliliter- und Liter-Maßstab im Rahmen der Messgenauigkeit äquivalent (siehe Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2: Vergleich der Biotrockenmassekonzentration (BTM) PAmCherry-Konzentrationen ($c_{PAmCherry}$), Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA), spezifischen Produktbildungsraten (q_p), Produktausbeuten (Y_{PS}) und Produktanteilen (Y_{PX}) bei der Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* in zweistufigen Rührkesselkaskaden ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) im Milliliter- und Liter-Maßstab.

Parameter	Milliliter-Maßstab	Liter-Maßstab
BTM, g L^{-1}	$10,8 \pm 0,4$	$11,4 \pm 1,1$
$c_{PAmCherry}$, mg L^{-1}	502 ± 36	487 ± 7
RZA , $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	75 ± 5	73 ± 1
q_p , $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$14,0 \pm 1,0$	$12,8 \pm 0,2$
Y_{PS} , mg g^{-1}	$10,0 \pm 0,7$	$9,7 \pm 0,1$
Y_{PX} , mg g^{-1}	47 ± 3	43 ± 1

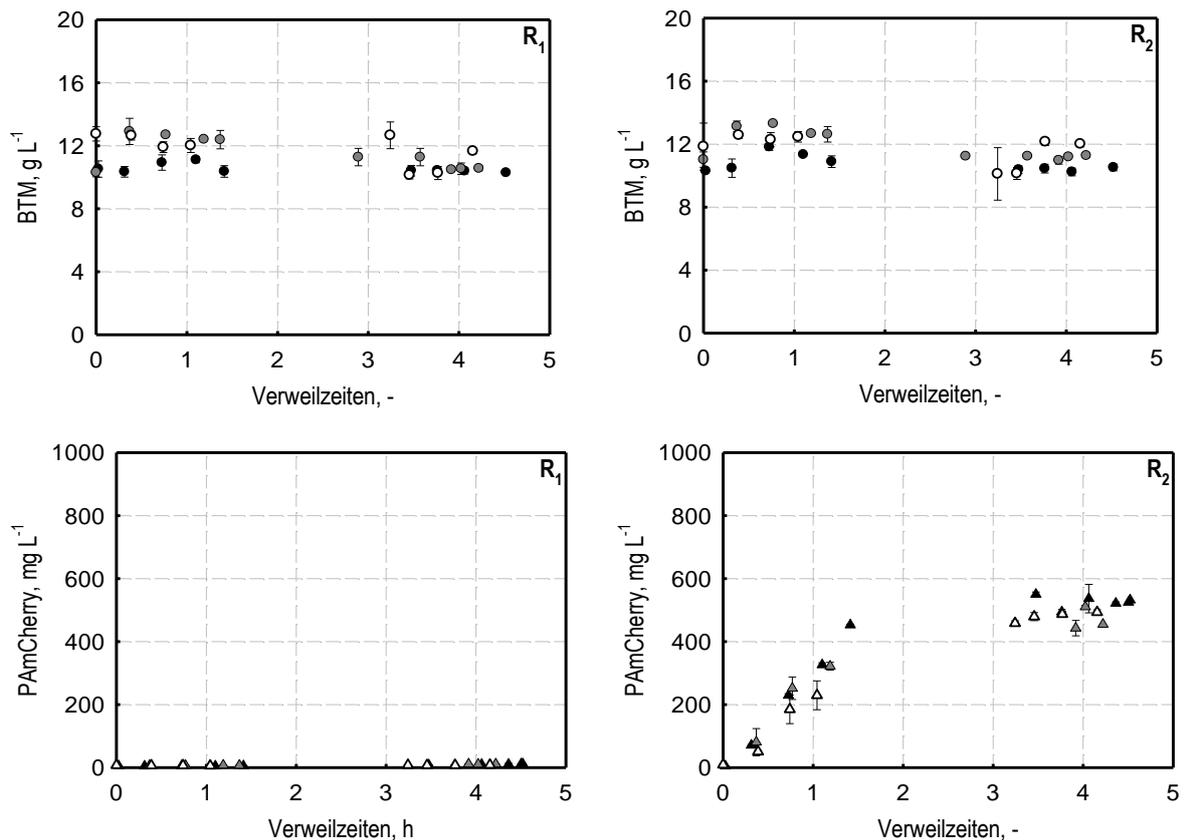


Abbildung 7.6: Kontinuierliche Produktion von PAmCherry mit *E. coli* in einer zweistufigen Rührkesselkaskade ($T = 30\text{ °C}$, $\text{pH } 7,0$). Der erste Reaktor R_1 wurde für die Biomassebildung eingesetzt ($c_{S,F1} = 25\text{ g L}^{-1}$ Glucose, $D_1 = 0,20\text{ h}^{-1}$, $\tau_1 = 5,0\text{ h}$, $0\text{ }\mu\text{M IPTG}$), während im zweiten Reaktor R_2 ($D_2 = 0,30\text{ h}^{-1}$, $\tau_2 = 3,3\text{ h}$, $100\text{ }\mu\text{M IPTG}$) die Expression von PAmCherry induziert und ein separater Zulauf ($c_{S,F2} = 25\text{ g L}^{-1}$ Glucose, $300\text{ }\mu\text{M IPTG}$) eingeführt wurde. Die Verweilzeit der Kaskade beträgt $\tau = 6,7\text{ h}$. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (●, ●) und PAmCherry-Konzentration (▲, ▲) von zwei Bioprozessen im 10-Milliliter- sowie von einem Bioprozess im Liter-Maßstab (○, △).

Diskussion

Die direkte Übertragbarkeit von Bioprozessen zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in zweistufigen Rührkesselkaskaden vom Milliliter- in den Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransfer rate des modifizierten bioREACTOR 48 als Übertragungskriterium konnte am Beispiel der Herstellung von PAmCherry mit *E. coli* gezeigt werden. Die verschiedenen Arten von Rührern in den beiden Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) zeigten dabei keine signifikanten Auswirkungen auf den Verlauf des Bioprozesses.

So konnten diese Untersuchungen erstmals in parallelisierten Ansätzen im Milliliter-Maßstab bei kontrollierten Prozessbedingungen erfolgen, womit zukünftig der Aufwand und die Kosten für die Bioprozessentwicklung zur Herstellung rekombinanter Proteine in Rührkesselkaskaden deutlich reduziert werden können.

8 Enzymatische Prozesse in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren

Viele Bioprodukte lassen sich durch den Einsatz von Enzymen mit hoher Ausbeute in enantiomerenreiner Form herstellen. Um die Raum-Zeit-Ausbeute zu erhöhen, werden oftmals kontinuierliche Verfahren eingesetzt. Da die Herstellung und Aufreinigung der benötigten Enzyme einen Großteil der Prozesskosten darstellt, ist für die Gestaltung von ökonomischen Prozessen eine Verweilzeitentkopplung von Biokatalysatoren und Medium erforderlich. Hierfür können die Enzyme unter anderem auf Trägermaterialien isoliert werden. Bei diesem kostenintensiven Prozessschritt kann es jedoch zu Problemen wie einer Veränderung der katalytischen Aktivität der Biokatalysatoren oder einer Stofftransportlimitierung kommen. Deshalb werden häufig suspendierte Enzyme mittels Filtration im Reaktionsansatz zurückgehalten. Als besonders geeignet hat sich dabei die Ultrafiltration herausgestellt. Die Effizienz von kontinuierlichen Prozessen kann in einigen Fällen durch die Einführung einer Rührkesselkaskade gesteigert werden. So kann beispielsweise der negative Einfluss einer Produktinhibition verringert werden. Des Weiteren können durch die räumliche Trennung von Enzymen einer mehrstufigen Umsetzung die einzelnen Reaktoren bei jeweils geeigneten Bedingungen betrieben werden. Die Entwicklung von kontinuierlichen enzymatischen Herstellungsverfahren gestaltet sich jedoch aufgrund der langen Prozesszeiten sowie der aufwendigen Produktion und Isolation der Biokatalysatoren oftmals sehr zeit- und kostenintensiv.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit miniaturisierte Enzym-Membran-Reaktoren realisiert werden, mit denen die parallele Charakterisierung kontinuierlicher Enzymprozesse im Milliliter-Maßstab möglich wird. Als Applikationsbeispiel sollte die Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) in einer zweistufigen Reaktion betrachtet werden.

Dabei findet zunächst eine Epimerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) mit einer *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) statt, wobei Adenosintriphosphat (ATP) als allosterischer Aktivator der AGE dient. Im zweiten Schritt werden Pyruvat und ManNAc mit einer *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) zu Neu5Ac umgesetzt. Einen Nachteil dieses Zwei-Enzym-Systems stellt die Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch Pyruvat dar, welches in hohen Konzentrationen eingesetzt werden muss, um das Gleichgewicht der Reaktionen auf die Produktseite zu verschieben. Des Weiteren liegt eine Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch das Endprodukt Neu5Ac vor (siehe Abbildung 8.1). Infolgedessen sollte untersucht werden, in

wieweit die Effizienz der kontinuierlichen Produktion von Neu5Ac durch den Einsatz von Rührkesselkaskaden gesteigert werden kann.

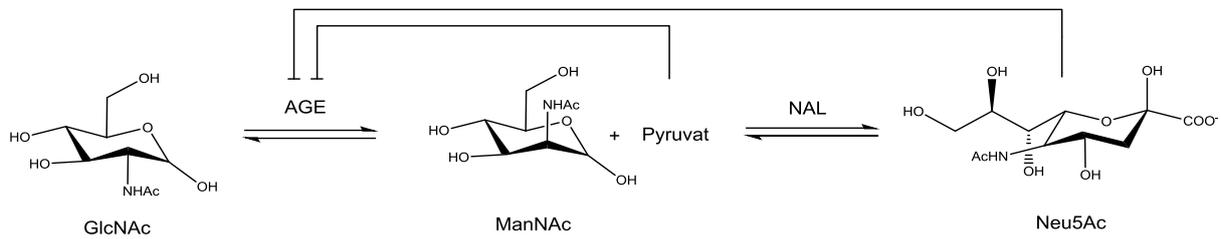


Abbildung 8.1: Enzymatische Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) mit den beiden Enzymen *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL). Nach der reversiblen Isomerisierung des Eduktes *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) mit der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase wird ManNAc mit dem zweiten Edukt Pyruvat mit Hilfe der *N*-Acetylneuraminat-Lyase zum Endprodukt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure umgewandelt. Die schwarzen Linien stellen die Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch das Edukt der zweiten Reaktion Pyruvat und das Endprodukt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure dar.

8.1 Kontinuierlicher Betrieb von miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren

Miniaturisierte Enzym-Membran-Reaktoren

Zunächst sollte der kontinuierliche Betrieb von miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren (EMRs) im bioREACTOR 48 etabliert werden. So wurden die Einwegreaktoren folgendermaßen erweitert: Ein Filtrationssystem (Vivapin® Turbo 4, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Größenausschlussgrenze von 10 kDa wurde in die Reaktoren integriert, um eine ausreichende Rückhaltung der Enzyme mit Molekulargewichten von 42 kDa (AGE) und 35 kDa (NAL) gewährleisten zu können. Hierfür wurde der Boden der Einwegreaktoren abgetrennt und die Ultrafiltrationseinheit eingeklebt. Weiterhin wurden die Reaktoren mit einem selbst gefertigten Deckel aus Polyetheretherketon (PEEK Außendurchmesser 20 mm, Höhe 4 mm) druckdicht verschlossen. Dieser wies zwei Öffnungen für Pumpschläuche auf (Durchmesser 2,2 mm), um zum einen die kontinuierliche Dosierung von Eduktlösung mit peristaltischen Pumpen (Reglo ICC, IDEX, Wertheim, Deutschland) und zum anderen den Druckausgleich beim Befüllen der Reaktoren zu ermöglichen. Zum Prozessstart wurde der Schlauch für den Druckausgleich verschlossen. Infolgedessen konnte ein druckgetriebener, konvektiver Stofftransport über die eingebrachte Filtrationseinheit realisiert werden. In eine dritte Öffnung im selbst gefertigten Deckel der Reaktoren (Durchmesser 3 mm) wurde die mit Klebstoff verschlossene Hohlachse der gasinduzierenden Rührer eingebracht, wodurch die Durchmischung des Reaktionsansatzes während der Umsetzung gewährleistet werden konnte. Somit konnte auf den Deckel des Bioreaktorblocks, der im herkömmlichen Betrieb für die Fixierung der Rührerachsen und das Verschließen der Reaktoren verwendet wird, verzichtet werden. Der selbst gefertigte Deckel und die Filtrationseinheit wurden mit einer Kombination eines druckbeständigen, hochviskosen Klebers und eines niedrigviskosen Klebers (siehe Tabelle A.10) in den miniaturisierten Reaktoren verklebt, um eine hohe Druckstabilität und einen luftdichten Verschluss der Enzym-Membran-Reaktoren zu gewährleisten. Das Arbeitsvolumen der Reaktoren betrug 15,5 mL. Die Enzym-Membran-Reaktoren wurden in den bioREACTOR 48 eingesetzt, wodurch der Antrieb der gasinduzierenden Rührer und die Temperaturkontrolle des Reaktionsansatzes über einen Wärmetauscher in bis zu 48 parallelen Reaktoren realisiert werden kann. Die aseptische Betriebsweise der EMRs kann bei Bedarf durch die Zugabe von Antibiotika zur Reaktionslösung gewährleistet werden. Abbildung 8.2 zeigt eine schematische Darstellung sowie ein Foto eines miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktors.

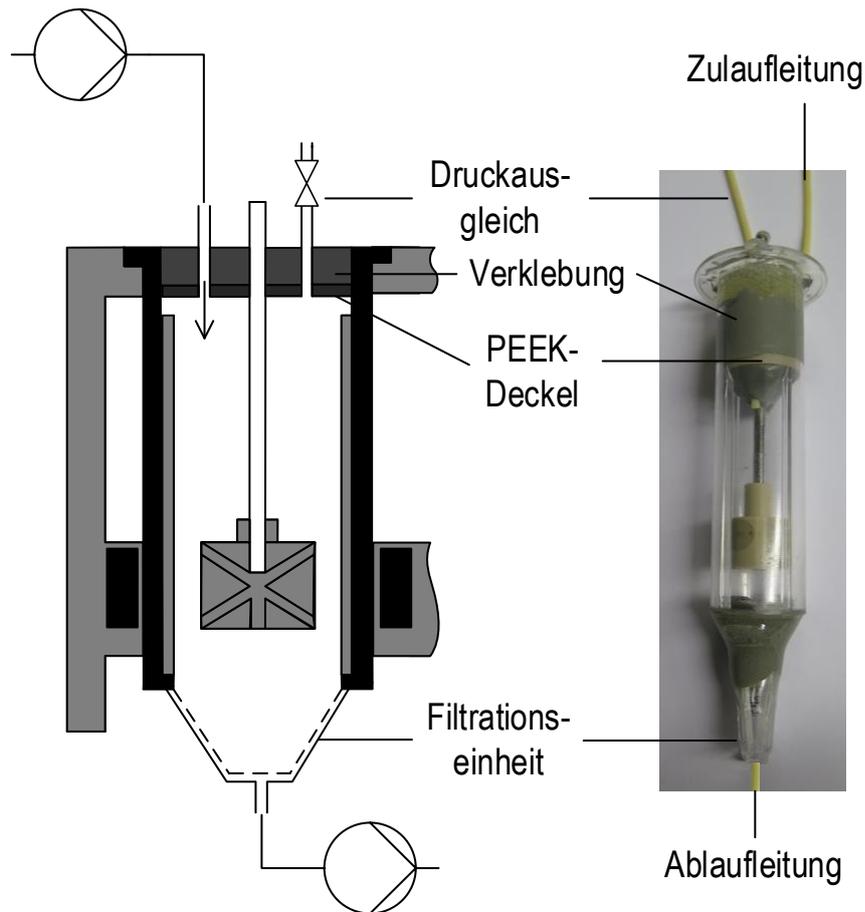


Abbildung 8.2: Aufbau der miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren. Schematische Darstellung eines in den bioREACTOR 48 integrierten Enzym-Membran-Reaktors im kontinuierlichen Betrieb (links) und Foto eines Enzym-Membran-Reaktors (rechts). Die Enzym-Membran-Reaktoren waren komplett mit Reaktionslösung gefüllt, was einem Arbeitsvolumen von 15,5 mL entsprach.

Verfahrenstechnische Charakterisierung der entwickelten Enzym-Membran-Reaktoren

Nach dem Aufbau von miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren sollten diese verfahrenstechnisch charakterisiert werden. Zunächst wurde die Retention der verwendeten Filtrations-einheit im kontinuierlichen Betrieb bestimmt. Hierfür wurde eine Lösung mit dem Fluoreszenzprotein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) eingesetzt, da eGFP mit geringem Aufwand fluorometrisch quantifizierbar ist und mit etwa 28 kDa ein geringeres Molekulargewicht als die für die folgende Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure verwendeten Enzyme (AGE 42 kDa, NAL 35 kDa) aufweist. Mit der Bestimmung der Proteinkonzentration im Permeat und Retentat konnte mit Gleichung (3.63) die Retention während des kontinuierlichen Betriebes bestimmt werden (siehe Abbildung 8.3). Dabei wurde anfänglich eine geringe Retention von lediglich 66 % gemessen, die im Laufe des kontinuierlichen Betriebs stetig zunahm und ab etwa 7 h konstant $98,5 \pm 1,9 \%$ betrug.

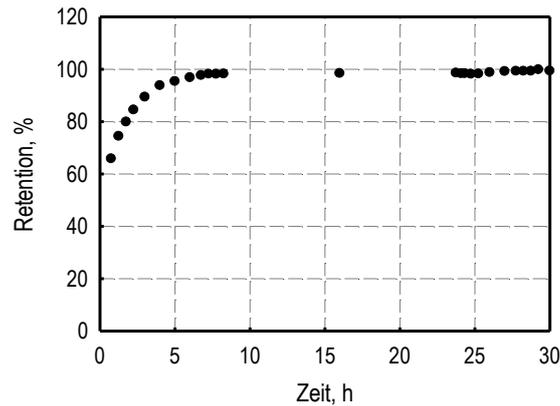


Abbildung 8.3: Retention von eGFP während des kontinuierlichen Betriebs der entwickelten miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren.

Des Weiteren wurde der Druck im Reaktor in Abhängigkeit des zugeführten Volumenstromes bestimmt, indem der Schlauch im Deckel der Reaktoren für den Druckausgleich während des kontinuierlichen Betriebs mit einem Druckmessgerät verbunden wurde. Bei Volumenströmen von $0,9 \text{ mL h}^{-1}$ beziehungsweise $1,5 \text{ mL h}^{-1}$ wurde ein geringer Druckverlust von $0,1 \text{ bar}$ beziehungsweise $1,3 \text{ bar}$ gemessen. Mit einem Druckverlust von $4,1 \text{ bar}$ war der mit den verwendeten Pumpen maximal mögliche Zulaufvolumenstrom auf $2,0 \text{ mL h}^{-1}$ begrenzt.

Diskussion

Mit der Integration einer kommerziell erhältlichen Filtrationseinheit und dem druckdichten Verschluss der Einwegbioreaktoren des bioREACTOR 48 konnten erstmals parallele, gerührte Enzym-Membran-Reaktoren im Milliliter-Maßstab realisiert werden. Damit wurde nach 7 h eine ausreichende Rückhaltung von Proteinen (98,5 %) erreicht. Die anfänglich geringe Retention und der folgende Anstieg kann auf eine initiale Deckschichtbildung an der Ultrafiltrationsmembran zurückgeführt werden (Kessler 2006). Um den Verlust an Enzym zum Prozessbeginn zu minimieren, wäre eine Vorbehandlung der Membran mit biologisch inaktiven Proteinen, wie zum Beispiel Bovinem Serumalbumin, möglich (Kragl et al. 1991). Des Weiteren wird im Prozessverlauf oftmals periodisch Enzym nachdosiert, wodurch der Austrag der Biokatalysatoren über die Membran ausgeglichen werden kann. Dies ist vor allem bei langen Prozesszeiten von Bedeutung, da auch bei einer Retention von 95 % nach mehr als 100 Verweilzeiten ein nahezu vollständiger Austrag der Enzyme auftritt (Lütz et al. 2005).

Mit den verwendeten peristaltischen Pumpen war ein maximaler konstanter Volumenstrom von $2,0 \text{ mL h}^{-1}$ bei einem Druckverlust von $4,1 \text{ bar}$ möglich. Eine weitere Erhöhung des Volumenstroms könnte durch den Einsatz von leistungsfähigeren Pumpen oder eine Vergrößerung der Membranoberfläche erreicht werden.

Eine Automatisierung der Bioreaktoren könnte durch die Einführung von Druckventilen für den Zugang von Pipettiernadeln eines Laborroboters erreicht werden. Neben der Probenahme aus jedem Reaktor wäre damit die intermittierende Zugabe von verschiedenen Flüssigkeiten möglich. So könnte beispielsweise eine Regelung des pH erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die realisierten Enzym-Membran-Reaktoren innerhalb der genannten Grenzen für parallele, kontinuierliche Umsetzungen im Milliliter-Maßstab geeignet sind. So können zukünftig der Aufwand und die Kosten für die Entwicklung von kontinuierlichen Enzymprozessen deutlich reduziert werden.

8.2 Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in Enzym-Membran-Reaktoren

Die entwickelten Enzym-Membran-Reaktoren sollten in der Folge für die parallele, kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im Milliliter-Maßstab verwendet werden. Hierfür wurden die Reaktoren mit 15,5 mL Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM GlcNAc, 100 mM Pyruvat, 1 mM ATP) befüllt. Die Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz wurden mit $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und $164 \mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylneuraminat-Lyase so gewählt, dass die initiale Isomerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin im Vergleich zur folgenden Bildung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellte. Nach einer dreistündigen Umsetzung der Edukte im Satzverfahren wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Dabei wurde 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) mit 50 mM GlcNAc, 100 mM Pyruvat und 1 mM ATP als Zulaufmedium verwendet (siehe Abbildung 8.4).

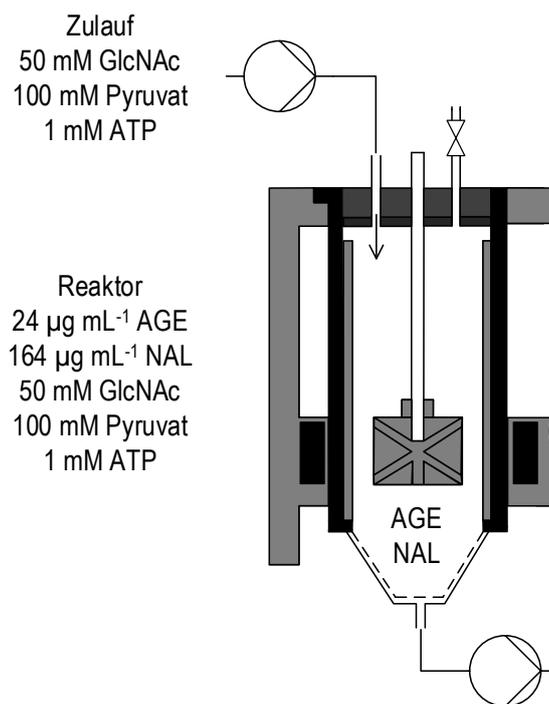


Abbildung 8.4: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in Enzym-Membran-Reaktoren. Die beiden Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) wurden im Reaktor vorgelegt. Nach einer dreistündigen Satzphase mit der initialen Umsetzung der Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), 100 mM Pyruvat, 1 mM Adenosintriphosphat (ATP)) wurde der kontinuierliche Betrieb mit der Zufuhr von Eduktlösung gestartet.

Charakterisierung der Langzeitstabilität und der parallelen Reproduzierbarkeit

Zunächst sollte die Langzeitstabilität der Enzym-Membran-Reaktoren sowie die Reproduzierbarkeit paralleler Ansätze charakterisiert werden. So wurden drei Reaktoren parallel bei einer vorgegebenen Verdünnungsrate von $D_{set} = 0,032 \text{ h}^{-1}$ (Sollwert der Verweilzeit $\tau_{set} = 31 \text{ h}$ und des Volumenstroms $F_{set} = 0,5 \text{ mL h}^{-1}$) betrieben. Die vorgelegten Eduktkonzentrationen im Satz- und Zulaufmedium wurden mit $100,6 \text{ mM}$ für Pyruvat und $45,1 \text{ mM}$ für *N*-Acetyl-D-Glucosamin bestimmt. Nach einer Prozesszeit von 52 h wurde die enzymatische Umsetzung in zwei Reaktoren für weitere Analysen abgebrochen, während ein Reaktor über 156 h betrieben wurde. Die Konzentrationen von *N*-Acetyl-D-Glucosamin, Pyruvat, *N*-Acetyl-D-Mannosamin, und *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im Prozessverlauf sind in Abbildung 8.5 dargestellt.

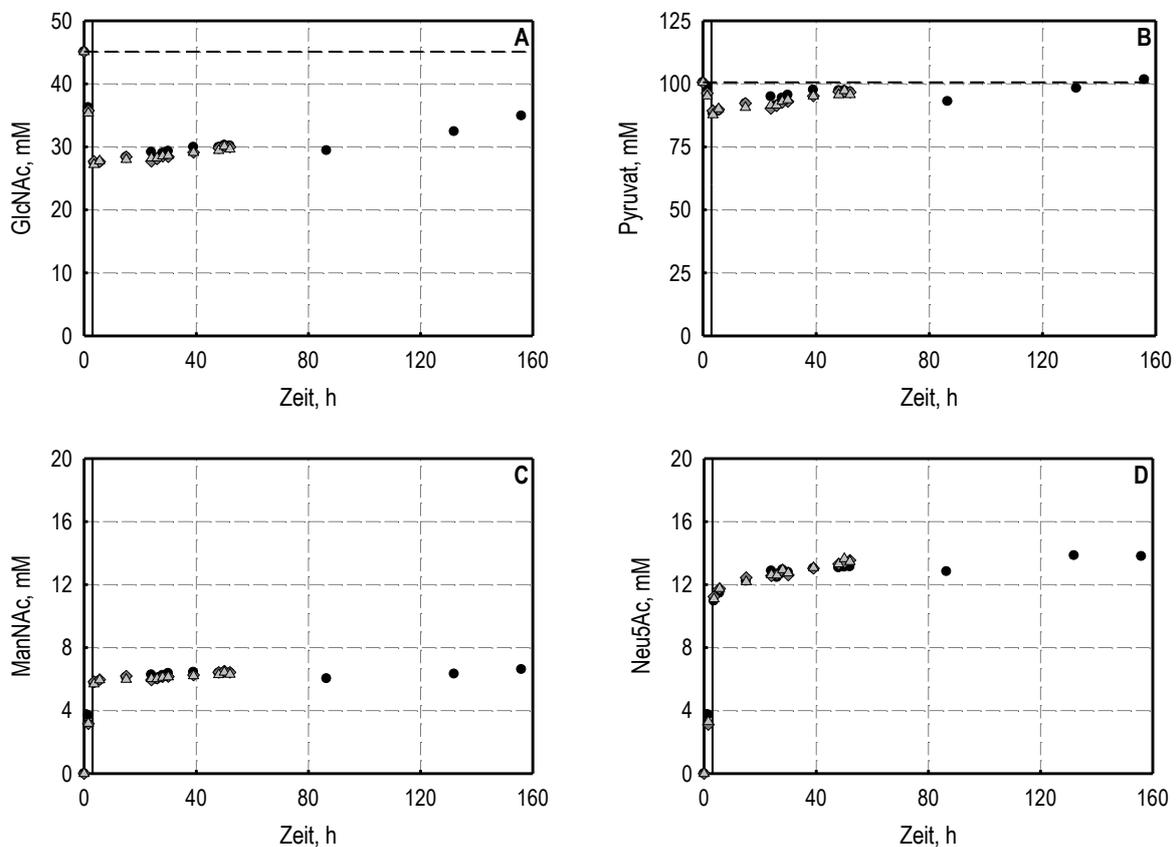


Abbildung 8.5: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in Enzym-Membran-Reaktoren mit einem Zweienzymsystem (AGE $24 \mu\text{g mL}^{-1}$, NAL $164 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer, $\text{pH } 7,5$, $100,6 \text{ mM}$ Pyruvat, $45,1 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $D_{set} = 0,032 \text{ h}^{-1}$, $\tau_{set} = 31 \text{ h}$, $V_R = 15,5 \text{ mL}$). Dargestellt sind die Konzentrationen von (A) *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), (B) Pyruvat, (C) *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) und (D) *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) im Prozessverlauf von drei parallelen Umsetzungen im Milliliter-Maßstab. Die vertikalen schwarzen Linien kennzeichnen den Start des kontinuierlichen Betriebs. Die horizontalen, unterbrochenen, schwarzen Linien kennzeichnen die vorgelegten Konzentrationen von GlcNAc und Pyruvat.

Der Volumenstrom im kontinuierlichen Betrieb wich mit $0,42 \pm 0,05 \text{ mL h}^{-1}$ um 16 % vom Sollwert $F_{set} = 0,5 \text{ mL h}^{-1}$ ab, wodurch sich eine Verweilzeit von 37,1 h ergab. Zwischen den einzelnen Ansätzen wurde jedoch lediglich eine Abweichung $< 5 \%$ bezüglich des Volumenstroms gemessen.

Die Verläufe der Konzentrationen der Edukte *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat, des Intermediates *N*-Acetyl-D-Mannosamin und des Produktes *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure wiesen in der Satzphase sowie im kontinuierlichen Betrieb im Rahmen der Messgenauigkeit eine hohe Übereinstimmung in den drei parallelen Ansätzen auf. Dabei konnte während der Satzphase wie erwartet ein Verbrauch der Edukte und eine Bildung des Intermediates sowie des Produktes beobachtet werden. Während des kontinuierlichen Betriebs konnten im Rahmen der Messgenauigkeit nach etwa einer Verweilzeit konstante Konzentrationen aller Komponenten erreicht werden. Das Fließgleichgewicht konnte maximal bis nach 156 h (4,2 Verweilzeiten) aufrechterhalten werden, bevor der Permeatvolumenstrom deutlich abnahm (Daten nicht gezeigt). Da das Fließgleichgewicht bereits nach einer Verweilzeit erreicht wurde, sollten sämtliche folgende Umsetzungen aus Zeit- und Kostengründen bereits nach dem Erreichen von konstanten Konzentrationen der Komponenten abgebrochen werden. Im Fließgleichgewicht wurden Konzentrationen von $29,5 \pm 1,7 \text{ mM}$ für *N*-Acetyl-D-Glucosamin, $93,7 \pm 2,8 \text{ mM}$ für Pyruvat, $5,9 \pm 0,8 \text{ mM}$ für *N*-Acetyl-D-Mannosamin und $12,4 \pm 0,8 \text{ mM}$ für *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure bestimmt. Im Rahmen der Messgenauigkeit (4 % Messfehler mit der verwendeten HPLC-Methode nach Groher und Hoelsch (2012)) konnte so die stöchiometrische Bilanz zwischen dem Verbrauch von *N*-Acetyl-D-Glucosamin ($15,6 \pm 1,7 \text{ mM}$) und der Bildung von *N*-Acetyl-D-Mannosamin sowie *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure ($18,4 \pm 1,6 \text{ mM}$) geschlossen werden. Dahingegen konnte die Abnahme der Pyruvatkonzentration ($6,3 \pm 2,8 \text{ mM}$) nicht mit der Bildung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure ($12,4 \pm 0,8 \text{ mM}$) korreliert werden. Dies kann mit der ungenauen Messung von hohen Pyruvatkonzentrationen mit der verwendeten HPLC-Methode erklärt werden (persönliche Mitteilung Ludwig Klermund, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, am 01.06.2015).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei den vorgegebenen Bedingungen mit dem Verbrauch von $15,6 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin und der Bildung von $12,4 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und $5,9 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Mannosamin ein Umsatz von $34,6 \pm 0,4 \%$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin und eine Ausbeute von $27,5 \pm 1,8 \%$ *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $110,7 \pm 4,3 \text{ mg}_{\text{Neu5Ac}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden konnten.

Charakterisierung des Einflusses der Verweilzeit auf die Prozessleistung

In der Folge sollte der Einfluss der Verweilzeit auf die Prozessleistung evaluiert werden. Hierfür wurde die Verdünnungsrate von $0,027 \text{ h}^{-1}$ auf $D_{set} = 0,054 \text{ h}^{-1}$ verdoppelt ($\tau_{set} = 18,5 \text{ h}$, $F_{set} = 0,84 \text{ mL h}^{-1}$). Die Eduktkonzentrationen im Satz- und Zulaufmedium wurden mit $98,2 \text{ mM}$ für Pyruvat und $43,8 \text{ mM}$ für *N*-Acetyl-D-Glucosamin bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Edukt-, Intermediat- und Produktkonzentrationen von zwei parallelen Umsetzungen sowie ein Vergleich der bei verschiedenen Verweilzeiten erreichten *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure-Konzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten ist in Abbildung 8.6 dargestellt.

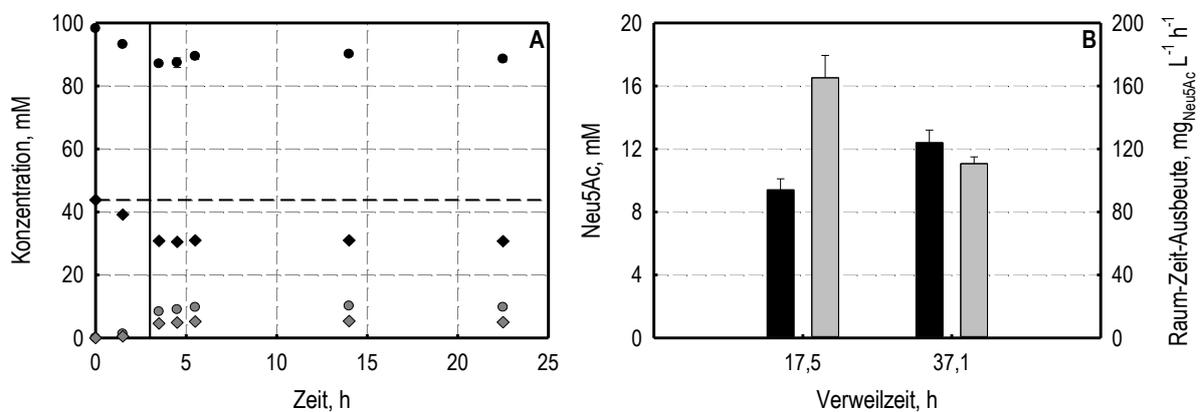


Abbildung 8.6: (A) Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in Enzym-Membran-Reaktoren mit einem Zweienzymsystem (AGE $24 \mu\text{g mL}^{-1}$, NAL $164 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, $98,2 \text{ mM}$ Pyruvat, $43,8 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $D_{set} = 0,054 \text{ h}^{-1}$, $\tau_{set} = 15,5 \text{ h}$, $V_R = 15,5 \text{ mL}$). Dargestellt sind: (A) die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen von *N*-Acetyl-D-Glucosamin (◆), Pyruvat (●), *N*-Acetyl-D-Mannosamin (◊) und *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (●) im Prozessverlauf von zwei parallelen Umsetzungen im Milliliter-Maßstab. Die vertikale schwarze Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Betriebs. Die horizontale, unterbrochene schwarze Linie kennzeichnet die vorgelegte Konzentration von GlcNAc. (B) Vergleich der erreichten Konzentrationen an *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac, schwarz) und Raum-Zeit-Ausbeuten (grau) bei der kontinuierlichen Herstellung von Neu5Ac in Abhängigkeit von der vorgegebenen Verweilzeit.

Dabei wurde in beiden Reaktoren ein mittlerer Volumenstrom von $0,88 \pm 0,03 \text{ mL h}^{-1}$ erreicht, der lediglich um 5 % vom vorgegebenen Sollwert ($F_{set} = 0,84 \text{ mL h}^{-1}$) abwich. Somit lag eine hydraulische Verweilzeit von $17,5 \text{ h}$ vor. Bereits 3 h nach dem Start des kontinuierlichen Betriebs wurde ein Fließgleichgewichtszustand mit konstanten *N*-Acetyl-D-Glucosamin- ($30,8 \pm 0,2 \text{ mM}$), Pyruvat- ($88,5 \pm 1,3 \text{ mM}$), *N*-Acetyl-D-Mannosamin- ($5,0 \pm 0,3 \text{ mM}$) und *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure-Konzentrationen ($9,4 \pm 0,7 \text{ mM}$) erreicht. Im Rahmen der Messgenauigkeit (4 % Messfehler mit der verwendeten HPLC-Methode nach Groher und

Hoelsch (2012)) konnte eine stöchiometrische Umsetzung der Edukte in Intermediat und Produkt nachgewiesen werden.

Mit dem Verbrauch von 13,0 mM *N*-Acetyl-D-Glucosamin und der Bildung von 9,4 mM *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und 5,0 mM *N*-Acetyl-D-Mannosamin wurden ein Umsatz von $29,7 \pm 0,5$ % *N*-Acetyl-D-Glucosamin und eine Ausbeute von $21,5 \pm 1,6$ % *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $165,2 \pm 14,2$ mg_{Neu5Ac} L⁻¹ h⁻¹ erreicht.

Durch die Reduktion der Verweilzeit von 37,1 h auf 17,5 h wurden wie erwartet geringere Produktkonzentrationen (Neu5Ac), Umsätze und Ausbeuten im Fließgleichgewicht erreicht. Allerdings konnte die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 1,5 gesteigert werden.

Diskussion

Mit den neu etablierten Enzym-Membran-Reaktoren konnten erstmals parallel kontinuierliche, enzymatische Prozesse mit der Rückhaltung des Biokatalysators in gerührten Reaktoren im Milliliter-Maßstab realisiert werden. Bei der kontinuierlichen Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit einem Zweienzymsystem wurde eine hohe Reproduzierbarkeit von parallelen Ansätzen im Hinblick auf den Permeatvolumenstrom (Abweichung < 5 %, $n = 3$) und die Konzentrationen der Edukte, des Intermediates sowie des Produktes (Abweichung < 5 %, $n = 3$) erreicht. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren über einen Zeitraum von mehr als 150 h stabil betrieben werden können. Da hierbei keine signifikante Abnahme der enzymatischen Aktivität beobachtet wurde, kann von einer ausreichenden Rückhaltung der Biokatalysatoren in den Reaktoren ausgegangen werden.

In den kontinuierlichen Umsetzungen von *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat zum Zwischenprodukt *N*-Acetyl-D-Mannosamin und zum Endprodukt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit den Enzymen *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und *N*-Acetylneuraminat-Lyase konnten bei einer Verweilzeit von 37,1 h ein Umsatz von $34,6 \pm 0,4$ % GlcNAc und eine Ausbeute von $27,5 \pm 1,8$ % Neu5Ac im Fließgleichgewicht erreicht werden. Mit einer verringerten Verweilzeit auf 17,5 h ging aufgrund der kürzeren Kontaktzeit der Edukte mit den Enzymen eine Reduktion der Neu5Ac-Konzentration (24 %), der Ausbeute (22 %) und des Umsatzes (14 %) einher. Da die Aktivität von Enzymen jedoch mit der Annäherung an das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion abnimmt (Chmiel 2011), kann bei kontinuierlichen, enzymatischen Prozessen mit der Reduktion der Verweilzeit eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden. So wurde bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure die Raum-Zeit-Ausbeute durch eine Halbierung der Verweilzeit um den Faktor 1,5 erhöht.

Eine weitere Steigerung von Produktkonzentration, Ausbeute, Umsatz sowie Raum-Zeit-Ausbeute könnte durch den Einsatz höherer Enzymkonzentrationen erreicht werden. Die Herstellung und Aufreinigung von Enzymen stellt jedoch ebenfalls einen hohen Kostenfaktor dar (Faber 2011). So muss für industrielle Anwendungen jede enzymatische Umsetzung einer Optimierung hinsichtlich der eingesetzten Edukt- und Enzymkonzentrationen im Verhältnis zu den erzielbaren Produktkonzentrationen unterzogen werden, um einen möglichst wirtschaftlichen Prozess zu erhalten. Hierbei können die entwickelten Enzym-Membran-Reaktoren zukünftig aufgrund der hohen Parallelisierbarkeit (bis zu 48 Reaktoren) und des geringen Reaktionsvolumens zu einer Kostenreduktion und Beschleunigung bei der Etablierung von kontinuierlichen, enzymatischen Prozessen beitragen.

8.3 Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskaden

Die Effizienz der enzymatischen Herstellung einiger Bioproducte wird im kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor durch auftretende Inhibitionseffekte eingeschränkt. Um beispielsweise den Einfluss einer Produktinhibition zu minimieren, können kontinuierliche Prozesse stattdessen in Enzym-Membran-Reaktor-Kaskaden durchgeführt werden. Des Weiteren erreichen die einzelnen Enzyme einer mehrstufigen Umsetzung oftmals ihre maximale katalytische Aktivität bei unterschiedlichen Bedingungen. Neben den Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, pH oder Ionenstärke können Inhibitionseffekte einzelner Enzyme durch Edukte oder Intermediate weiterer Reaktionen auftreten. Hierbei können durch die räumliche Trennung der einzelnen Enzyme in einer kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade für jeden Biokatalysator die optimalen Reaktionsbedingungen im jeweiligen Reaktor vorgegeben werden.

Bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure aus *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat mit den Enzymen *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und *N*-Acetylneuraminat-Lyase tritt zum einen eine Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch Pyruvat auf. Pyruvat stellt ein Edukt der *N*-Acetylneuraminat-Lyase dar und wird für eine Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion auf die Produktseite im Überschuss zugegeben. Zum anderen wird die verwendete *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch das Endprodukt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure inhibiert (siehe Abbildung 8.1). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Effizienz der kontinuierlichen Produktion von Neu5Ac durch den Einsatz von zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskaden verbessert werden kann.

Hierfür wurde zunächst die Möglichkeit der räumlichen Trennung der Enzyme in zwei Enzym-Membran-Reaktoren, die in einer zweistufigen, kontinuierlichen Kaskade betrieben wurden, evaluiert. So sollte eine Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und Pyruvat vermieden werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer verminderten Produktinhibition in einer zweistufigen Kaskade aus Enzym-Membran-Reaktoren ohne räumliche Trennung der Enzyme untersucht.

Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit räumlicher Trennung der Enzyme in einer Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Steigerung der Effizienz der kontinuierlichen Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer zweistufigen Kaskade aus Enzym-Membran-Reaktoren mit der räumliche Trennung der beiden Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und *N*-Acetylneuraminat-Lyase in den zwei Reaktoren der Kaskade erreicht werden kann (siehe Abbildung 8.7).

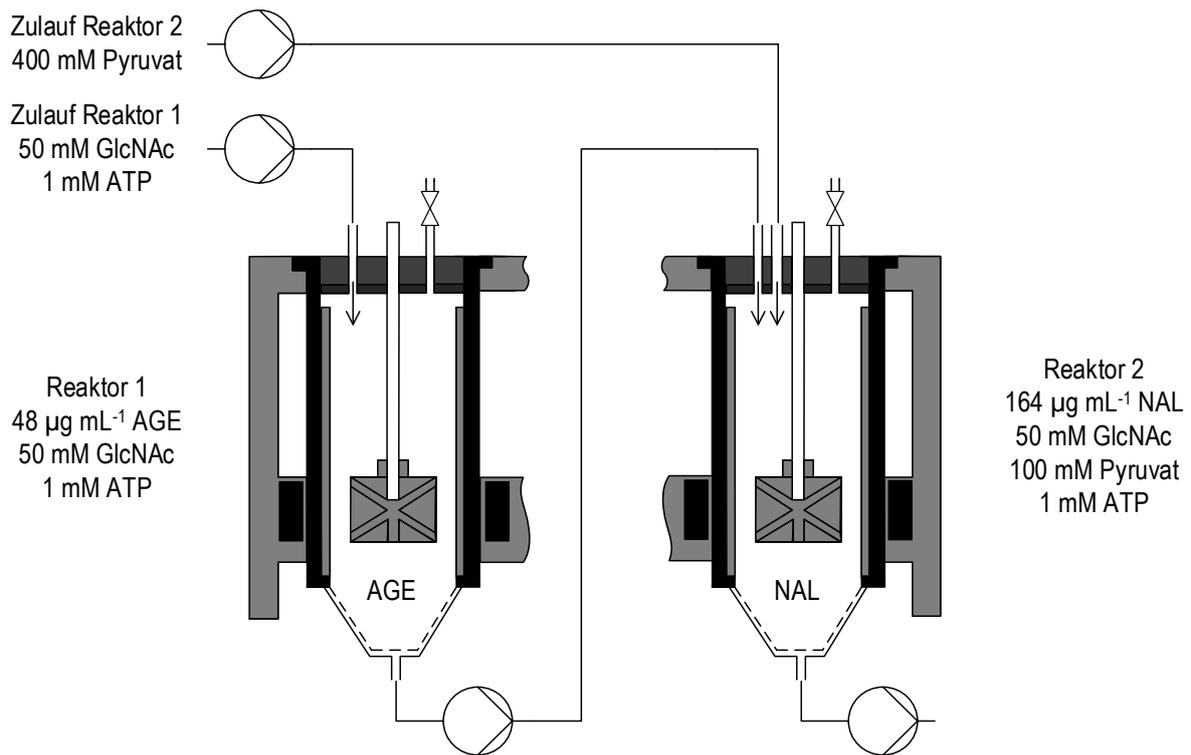


Abbildung 8.7: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade. Die beiden Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) wurden im ersten bzw. zweiten Reaktor vorgelegt. Nach einer dreistündigen Satzphase mit der initialen Umsetzung der Eduktlösungen wurde der kontinuierliche Betrieb mit der Zufuhr von Eduktlösungen in die beiden Reaktoren (Reaktor 1: 1,32 mL h⁻¹; Reaktor 2: 0,44 mL h⁻¹) gestartet. Die Konzentrationen der Enzyme sowie der Edukte *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und Pyruvat sowie des allosterischen Aktivators der AGE Adenosintri-phosphat (ATP) in den Reaktionslösungen im Satzverfahren und den Zulauflösungen kann der Abbildung entnommen werden.

Hierfür wurde der erste Reaktor mit 15,5 mL Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM GlcNAc, 1 mM ATP) ohne Pyruvat befüllt und 48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase zugegeben. Im zweiten Reaktor wurden hingegen 15,5 mL Eduktlösung mit 100 mM Pyruvat und 328 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylneuraminat-Lyase vorgelegt. So wurden bezogen auf das Gesamtvolumen der Kaskade (31 mL) zu den bisherigen Umsetzungen in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren (siehe Kapitel 8.2) äquivalente Enzymkonzentrationen eingesetzt. Nach einer dreistündigen Satzphase wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Dabei wurden dem ersten Reaktor 1,32 mL h⁻¹ der Eduktlösung ohne Pyruvat zugeführt. Dem zweiten Reaktor wurden neben dem Ablauf des ersten Reaktors über eine zusätzliche Dosierstrecke 0,44 mL h⁻¹ eines 0,1 M Kaliumphosphatpuffers mit 400 mM Pyruvat zugeführt. So sollte ein Volumenstrom von 1,76 mL h⁻¹ im Ablauf der Kaskade mit einer zur Herstellung von Neu5Ac im kontinuierliche Enzymmembranreaktor äquivalenten Verdünnungsrate von $D_{set} = 0,057 \text{ h}^{-1}$ und einer

Verweilzeit von $\tau_{set} = 17,5$ h vorgegeben werden. Die etwa halbierte Verweilzeit in den einzelnen Reaktoren wurde durch die Verdopplung der Enzymkonzentrationen in den einzelnen Reaktoren ausgeglichen.

Die Epimerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin mit der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase fand im ersten Reaktor folglich ohne eine Inhibition des Enzyms durch *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und Pyruvat statt. Im zweiten Reaktor wurde das im ersten Reaktor gebildete Intermediat *N*-Acetyl-D-Mannosamin mit dem zugeführten Pyruvat (100 mM im Reaktionsansatz) zum Endprodukt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure umgesetzt. Die vorgelegten Eduktkonzentrationen im Satz- und Zulaufmedium wurden mit 94,6 mM für Pyruvat und 45,8 mM für *N*-Acetyl-D-Glucosamin bestimmt.

Dabei wurde während des kontinuierlichen Betriebs ein mittlerer Permeatvolumenstrom von $1,65 \pm 0,5$ mL h⁻¹ erreicht, der 8 % unter dem vom vorgegebenen Sollwert ($F_{set} = 1,76$ mL h⁻¹) lag. Die hydraulische Verweilzeit der Kaskade betrug somit 18,8 h. Als Ursache für den verminderten Permeatvolumenstrom konnte ein verringerter Zulaufvolumenstrom in den ersten Reaktor identifiziert werden, während der Zulauf in den zweiten Reaktor mit hoher Präzision erfolgte.

Die Konzentrationen der Edukte *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat, des Intermediates *N*-Acetyl-D-Mannosamin sowie des Produktes *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im Ablauf der Kaskade sind in Abbildung 8.8 über die Prozesszeit dargestellt.

Im Verlauf der Satzphase konnte wie erwartet keine Bildung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure beobachtet werden. Hier sollte lediglich die Epimerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin im ersten Reaktor erfolgen. Nach dem Start des kontinuierlichen Betriebes wurde eine Abnahme der *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Konzentration im Ablauf der Kaskade gemessen. Dies kann zum einen auf die Verdünnung durch den zusätzlichen Zulauf im zweiten Reaktor ohne GlcNAc und zum anderen auf die Umsetzung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin mit der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase im ersten Reaktor zurückgeführt werden. Die Konzentration von *N*-Acetyl-D-Mannosamin im Ablauf der Kaskade nahm hingegen im Prozessverlauf stetig zu. Ab einer Prozesszeit von 22 h stellten sich konstante Konzentrationen von $27,7 \pm 0,5$ mM für GlcNAc und $2,2 \pm 0,1$ mM für ManNAc ein.

Während direkt nach dem Start des Zulaufs eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration durch die Bildung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure nachgewiesen wurde, stieg diese ab einer Prozesszeit von 3,75 h aufgrund der nicht optimalen Einstellung der beiden Zulaufvolumenströme und der damit verbundenen zu geringen Verdünnung im zweiten Reaktor stetig an. Die erhöhte Pyruvatkonzentration von maximal 110,8 mM sollte sich jedoch positiv auf die Effizienz der Kaskade auswirken, da das Gleichgewicht im zweiten Reaktor

folglich weiter auf die Seite des Produktes *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure verschoben wird und eine Inhibition der AGE durch die räumliche Trennung ausgeschlossen werden kann.

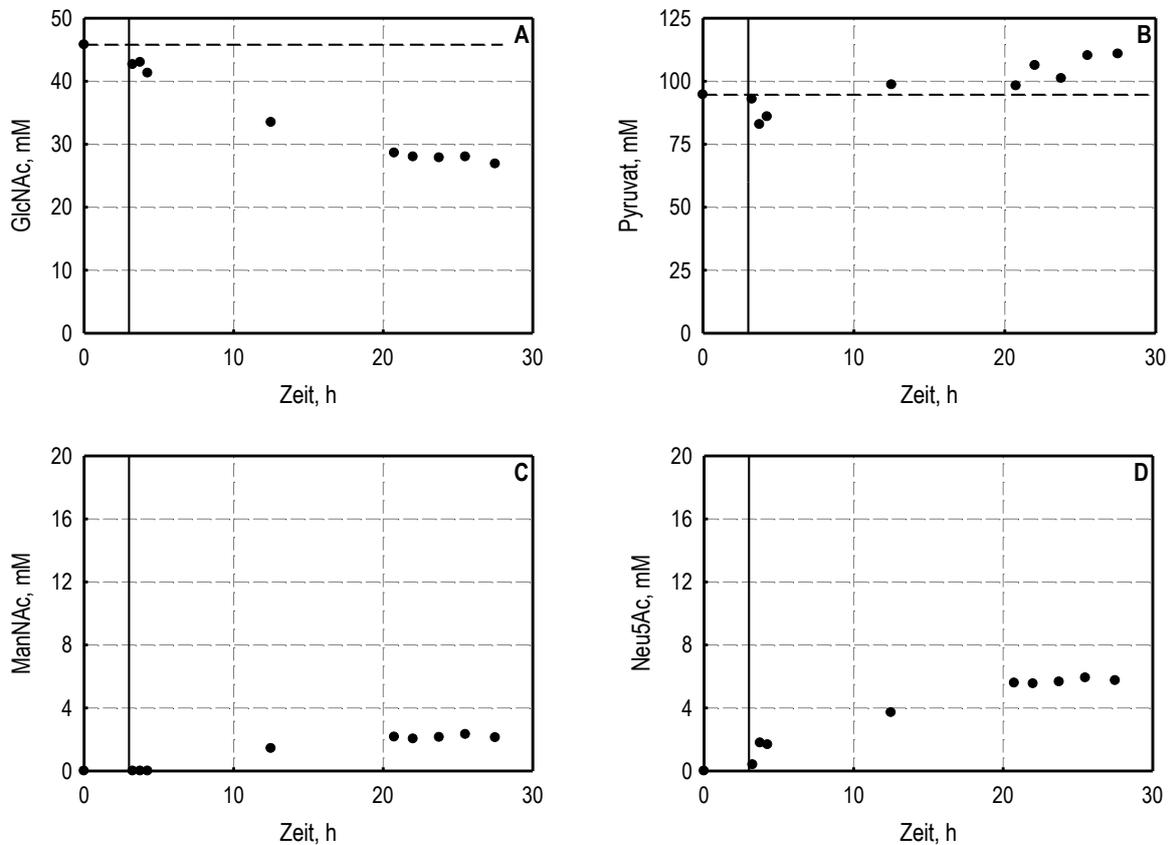


Abbildung 8.8: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade mit einem Zweienzymsystem (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, $T = 30\text{ °C}$, $D_{set} = 0,057\text{ h}^{-1}$, $\tau_{set} = 17,5\text{ h}$, $V_R = 31\text{ mL}$). Die beiden Enzyme (AGE $48\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ im ersten Reaktor und NAL $328\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ im zweiten Reaktor) wurden räumlich getrennt. In der Satzphase wurden im ersten Reaktor $45,8\text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin und im zweiten Reaktor $45,8\text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin sowie $94,6\text{ mM}$ Pyruvat vorgelegt. Im kontinuierlichen Betrieb wurden dem ersten Reaktor $1,32\text{ mL h}^{-1}$ einer Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, $45,8\text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin) ohne Pyruvat zugeführt. In den zweiten Reaktor wurden, neben dem Ablauf des ersten Reaktors, $0,44\text{ mL h}^{-1}$ eines 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit 400 mM Pyruvat dosiert (siehe Abbildung 8.7). Dargestellt sind die Konzentrationen von (A) *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), (B) Pyruvat, (C) *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) und (D) *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) im Prozessverlauf einer parallelen Umsetzung im Milliliter-Maßstab. Die vertikalen schwarzen Linien kennzeichnen den Start des kontinuierlichen Betriebs. Die horizontalen, unterbrochenen, schwarzen Linien kennzeichnen die vorgelegten Konzentrationen an GlcNAc und Pyruvat.

So konnte nach 22 h eine konstante Produktkonzentration von $5,7 \pm 0,2\text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im Ablauf der Kaskade erreicht werden. Obwohl lediglich die Konzentrationen im Ablauf der Kaskade gemessen werden konnten, kann unter Berücksichtigung der Verdünnung der Komponenten im zweiten Reaktor die Prozessleistung des ersten Reaktors

ermittelt werden. So wurde im ersten Reaktor ein Umsatz der Epimerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin von 19,4 % *N*-Acetyl-D-Glucosamin erreicht, der in diesem Fall gleichbedeutend mit dem Umsatz der Kaskade ist. Mit 5,7 mM *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure betrug der Umsatz der Reaktion von *N*-Acetyl-D-Mannosamin und Pyruvat zu *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im zweiten Reaktor 72 % *N*-Acetyl-D-Mannosamin. Die Ausbeute der gesamten Kaskade bezogen auf *N*-Acetyl-D-Glucosamin wurde mit $17,6 \pm 0,7$ % *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure bestimmt. Im Rahmen der Messgenauigkeit konnten so die stöchiometrischen Bilanzen der Umsetzungen in den beiden Reaktoren geschlossen werden. Bezogen auf das Gesamtvolumen der Kaskade wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $93,8 \pm 2,6 \text{ mg}_{\text{Neu5Ac}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Wie in Tabelle 8.1 dargestellt, wurde bei der Herstellung von Neu5Ac mit einer räumlichen Trennung der Enzyme (EMR-Kaskade) im Vergleich zum kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor (EMR) eine geringere Prozessleistung in Bezug auf Umsatz, Ausbeute, Neu5Ac-Konzentration und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) nachgewiesen.

Tabelle 8.1: Vergleich der erreichten Umsätze, Ausbeuten, Konzentrationen an *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren (EMR, $\tau = 17,5$ h) und einer kontinuierlichen, zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade mit räumlicher Trennung der beiden Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (EMR-Kaskade, $\tau = 18,8$ h).

Ansatz	Umsatz, %	Ausbeute, %	Neu5Ac, mM	RZA, $\text{mg}_{\text{Neu5Ac}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
EMR	$29,7 \pm 0,5$	$21,5 \pm 1,6$	$9,4 \pm 0,7$	$165,2 \pm 14,2$
EMR-Kaskade	$19,4 \pm 1,2$	$17,6 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,2$	$93,8 \pm 2,6$

Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade

Um den Einfluss der Produktinhibition auf das Enzym AGE bei der Herstellung von Neu5Ac zu reduzieren, sollte der Prozess aus dem kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor in eine Kaskade bestehend aus zwei sequentiell betriebenen Enzym-Membran-Reaktoren übertragen werden. Die Reaktoren wurden jeweils mit 15,5 mL Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM GlcNAc, 100 mM Pyruvat, 1 mM ATP) befüllt. Des Weiteren wurden jeweils $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ AGE und $164 \mu\text{g mL}^{-1}$ NAL in beiden Enzym-Membran-Reaktoren vorgelegt. Nach einer dreistündigen Satzphase wurde der kontinuierliche Betrieb mit 50 mM GlcNAc und 100 mM Pyruvat im Zulaufmedium (0,1 M Kaliumphosphatpuffer) gestartet (siehe Abbildung 8.9). Um einen Vergleich des Prozesses mit der Umsetzung in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren zu erreichen, wurde eine äquivalente Verdünnungsrate von $D_{\text{set}} = 0,057 \text{ h}^{-1}$ ($\tau_{\text{set}} = 17,5 \text{ h}$, $F_{\text{set}} = 1,76 \text{ mL h}^{-1}$) bezogen auf das Gesamtvolumen der

Kaskade von 31 mL vorgegeben. Dabei wurden drei Rührkesselkaskaden parallel betrieben. Die vorgelegten Eduktkonzentrationen im Satz- und Zulaufmedium wurden mit 96,9 mM für Pyruvat und 42,3 mM für *N*-Acetyl-D-Glucosamin bestimmt.

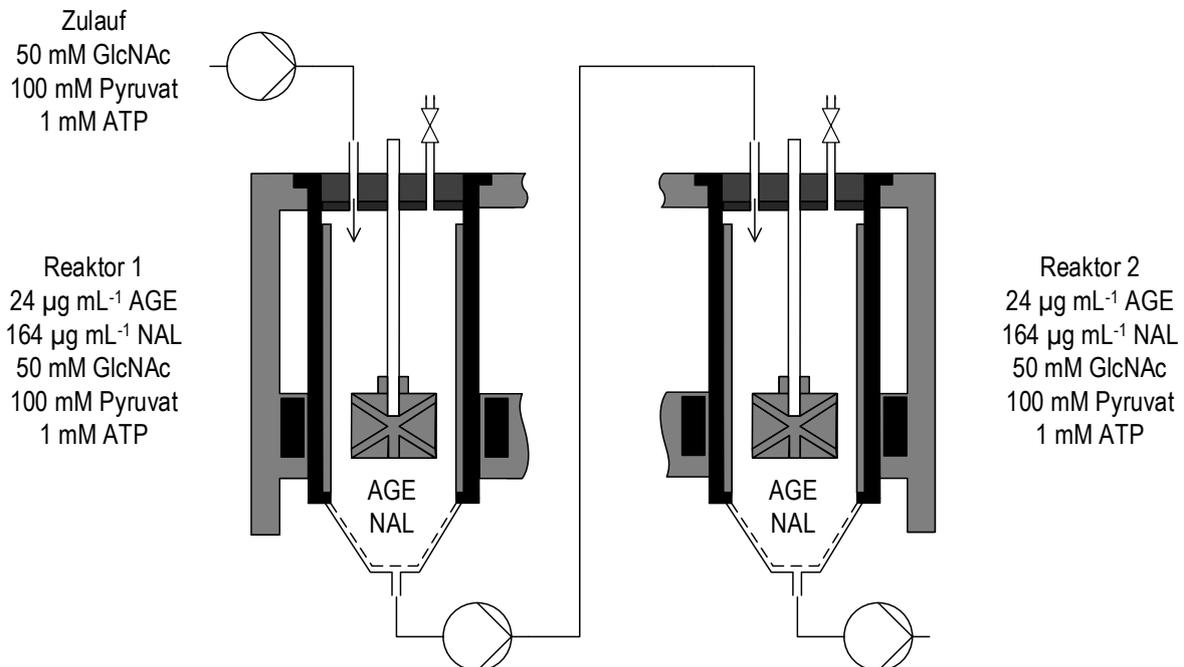


Abbildung 8.9: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade. Die beiden Enzyme *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (AGE) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) wurden in den Reaktoren vorgelegt. Nach einer dreistündigen Satzphase mit der initialen Umsetzung der Eduktlösung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), 100 mM Pyruvat, 1 mM Adenosintriphosphat (ATP)) wurde der kontinuierliche Betrieb mit der Zufuhr von Eduktlösung gestartet.

In den drei Kaskaden wurde ein mittlerer Volumenstrom von $1,86 \pm 0,24 \text{ mL h}^{-1}$ erreicht, der lediglich um 5 % vom vorgegebenen Sollwert ($F_{set} = 1,76 \text{ mL h}^{-1}$) abwich. Somit lag eine hydraulische Verweilzeit von 16,7 h vor.

Die Konzentrationen der Edukte *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Pyruvat, des Intermediates *N*-Acetyl-D-Mannosamin sowie des Produktes *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im Ablauf der Kaskade sind in Abbildung 8.10 über die Prozesszeit dargestellt. Nach einer Prozesszeit von 14 h wurden konstante Konzentrationen der Edukte GlcNAc ($28,3 \pm 0,4 \text{ mM}$) und Pyruvat ($86,6 \pm 0,7 \text{ mM}$), des Intermediates ManNAc ($5,9 \pm 0,1 \text{ mM}$) und des Produktes Neu5Ac ($10,7 \pm 0,1 \text{ mM}$) erreicht. Mit einem relativen Fehler $< 6,5 \%$ bezogen auf die Konzentrationen sämtlicher Komponenten im Fließgleichgewicht konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der Umsetzungen in den drei parallelen Rührkesselkaskaden nachgewiesen werden.

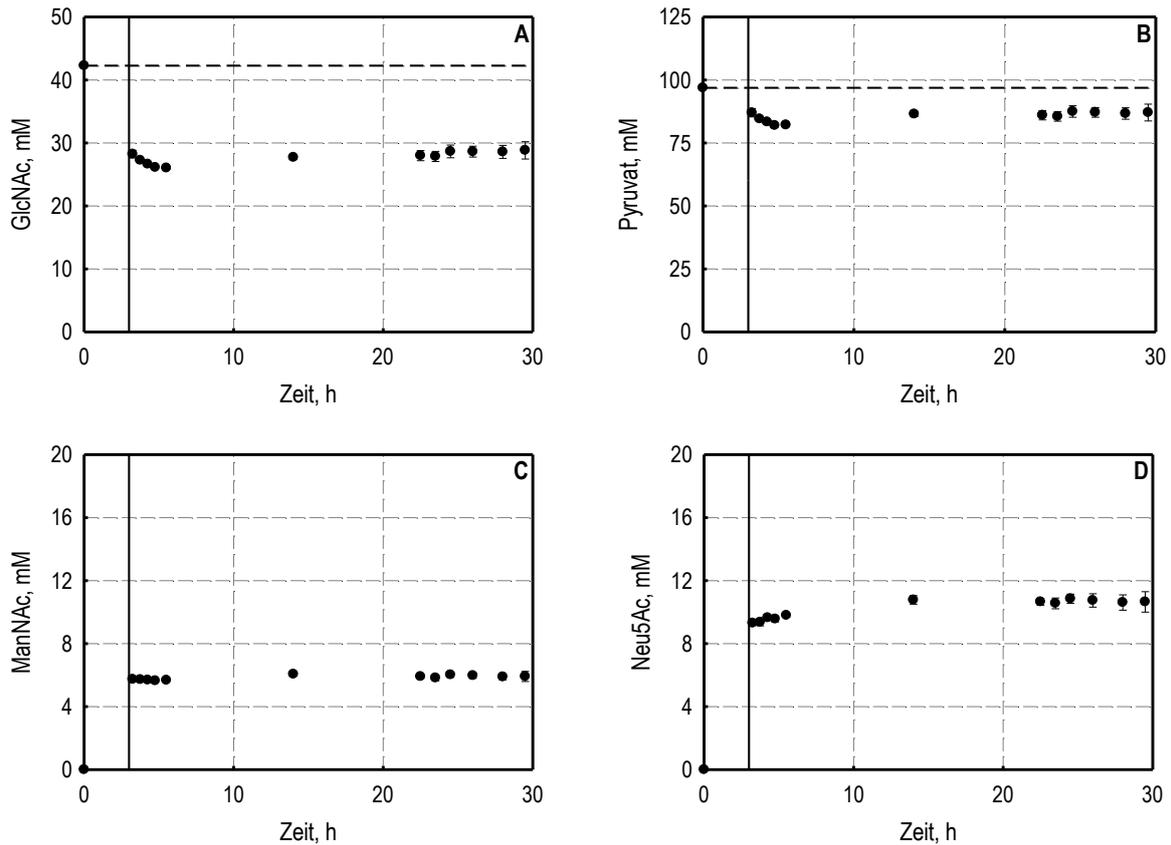


Abbildung 8.10: Kontinuierliche Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in einer zweistufigen Rührkesselkaskade mit einem Zweienzymsystem (AGE $24 \mu\text{g mL}^{-1}$, NAL $164 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, $96,9 \text{ mM}$ Pyruvat, $42,3 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $D_{set} = 0,057 \text{ h}^{-1}$, $\tau_{set} = 17,5 \text{ h}$, $V_R = 31 \text{ mL}$). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen von (A) *N*-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), (B) Pyruvat, (C) *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) und (D) *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) im Prozessverlauf von drei parallelen Umsetzungen im Milliliter-Maßstab. Die vertikalen schwarzen Linien kennzeichnen den Start des kontinuierlichen Betriebs. Die horizontalen, unterbrochenen, schwarzen Linien kennzeichnen die vorgelegten Konzentrationen an GlcNAc und Pyruvat.

Mit dem Verbrauch von $14,0 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin und der Bildung von von $10,7 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und $5,9 \text{ mM}$ *N*-Acetyl-D-Mannosamin wurden im Fließgleichgewicht ein Umsatz von $33,1 \pm 0,4 \%$ *N*-Acetyl-D-Glucosamin, eine Ausbeute von $25,3 \pm 0,2 \%$ *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $198,5 \pm 1,9 \text{ mg}_{\text{Neu5Ac}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der kontinuierlichen, zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade erreicht. Folglich konnte im Vergleich zur Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure im kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor unter den gleichen Reaktionsbedingungen und mit einer vergleichbaren Verweilzeit wie erwartet eine signifikante Steigerung des Umsatzes, der Ausbeute, der Neu5Ac-Konzentration und der Raum-Zeit-Ausbeute erzielt werden (siehe Tabelle 8.2).

Tabelle 8.2: Vergleich der erreichten Umsätze, Ausbeuten, Konzentrationen an *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure (Neu5Ac) und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren (EMR, $\tau = 17,5$ h) und einer kontinuierlichen, zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade (2 EMR, $\tau = 18,8$ h).

Ansatz	Umsatz, %	Ausbeute, %	Neu5Ac, mM	RZA, mg _{Neu5Ac} L ⁻¹ h ⁻¹
EMR	29,7 ± 0,5	21,5 ± 1,6	9,4 ± 0,7	165,2 ± 14,2
2 EMR	33,1 ± 0,4	25,3 ± 0,2	10,7 ± 0,1	198,5 ± 1,9

Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals der kontinuierliche Betrieb einer Kaskade von gerührten Enzym-Membran-Reaktoren im Milliliter-Maßstab etabliert werden. Dabei wurde eine hohe parallele Reproduzierbarkeit im Hinblick auf die erreichten hydraulischen Verweilzeiten und die erreichten Fließgleichgewichtszustände erreicht.

Zunächst wurde die räumliche Trennung von Enzymen in den einzelnen Reaktoren einer Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade mit einer separaten Versorgung der einzelnen Reaktoren mit Eduktlösungen etabliert. Die geringere Prozessleistung bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit den räumlich getrennten Enzymen *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (im ersten Reaktor) und *N*-Acetylneuraminat-Lyase (im zweiten Reaktor) kann auf die ungünstige Lage des Gleichgewichts der Epimerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin ($K_{eq} = 0,262$) zurückgeführt werden (Klermund et al. 2013), wodurch die Bildung von *N*-Acetyl-D-Mannosamin im ersten Reaktor limitiert ist. Dahingegen wird beim Einsatz der beiden Enzyme in einem Reaktionsansatz das gebildete *N*-Acetyl-D-Mannosamin durch die Umsetzung mit Pyruvat zu *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure dem Gleichgewicht der ersten Reaktion stetig entzogen (siehe Abbildung 8.1), wodurch ein höherer Umsatz als bei der räumlichen Trennung der beiden Enzyme erreicht werden kann.

Allerdings können die durchgeführten Studien zur räumlichen Trennung der beiden Enzyme die Grundlage weiterer Untersuchungen darstellen. In Abwesenheit des allosterischen Inhibitors Pyruvat kann möglicherweise die Konzentration des allosterischen Aktivators ATP der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase im Reaktionsansatz deutlich reduziert werden (Klermund et al. 2013). Da ATP einen entscheidenden Kostenfaktor bei der Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure darstellt, ist es somit eventuell möglich die Wirtschaftlichkeit des Prozesses trotz eines geringeren Umsatzes zu verbessern.

Darüber hinaus wurde für die Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure gezeigt, dass der Einfluss der Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch das Produkt *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit dem Einsatz einer zweistufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade im

Vergleich zu einem kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor verringert werden kann. Da die Produktinhibition bei der verwendeten Mutante der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase mit einem Verhältnis der Inhibitionskonstante gegenüber Neu5Ac zur Michaelis-Konstante für GlcNAc von 0,35 (persönliche Mitteilung, Ludwig Klermund, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, 02.06.2015) nicht sonderlich stark ausgeprägt ist (Chmiel 2011), lag eine Zunahme der Produktkonzentration um 14 % im erwarteten Bereich. Eine darüberhinausgehende Steigerung der Effizienz des Prozesses könnte durch die Erweiterung der Kaskade auf bis zu acht Reaktoren erreicht werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren in einer mehrstufigen Enzym-Membran-Reaktor-Kaskade betrieben werden können. Durch die Möglichkeit jeden Reaktor separat mit Zulauflösung zu versorgen, wird die Entwicklung komplexer, kontinuierlicher Herstellungsprozesse mit räumlich getrennten Reaktionskompartimenten im Milliliter-Maßstab ermöglicht. Um den Freiheitsgrad bei der Wahl der Reaktionsbedingungen weiter zu erhöhen, sollte eine industrielle Fertigung der Enzym-Membran-Reaktoren angestrebt werden. Durch eine Vergrößerung der Membranoberfläche wären so höhere Volumenströme realisierbar. Des Weiteren könnte die Wahl der verwendeten Membran spezifisch für jeden Prozess angepasst werden und neben Enzymen auch Ganzzellbiokatalysatoren oder artifizielle Reaktionskompartimente in den Reaktoren zurückgehalten werden. Mit der Automatisierung der Bioreaktoren durch die Einführung von Druckventilen für den Zugang von Pipettieradeln eines Laborroboters wäre neben der Probenahme aus jedem Reaktor der Kaskade die intermittierende Zugabe von Flüssigkeiten möglich. So könnte beispielsweise bei der räumlichen Trennung von Biokatalysatoren die Regelung des pH auf den jeweils optimalen pH eines Prozessschrittes erfolgen.

9 Zusammenfassung

Die effiziente Gewinnung von Prozessinformationen stellt eine wesentliche Aufgabe der Bioverfahrenstechnik dar. Hierfür wurden in den letzten Jahren einige miniaturisierte und parallelisierte Bioreaktoren präsentiert. Eine besonders fortgeschrittene Reaktortechnologie stellt der an der Technischen Universität München realisierte und kommerziell verfügbare bioREACTOR 48 dar, mit dem die kontrollierte Bioprozessführung in 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab realisiert wurde. Trotz der Einführung einer Mikrodosiereinheit konnten Substrate bislang nur in flüssiger Form intermittierend in die Parallelbioreaktoren eingebracht werden. Des Weiteren bestand bisher keine Möglichkeit zur kontinuierlichen Prozessführung oder zur Verweilzeitentkopplung von Biokatalysatoren und Medium in den miniaturisierten Bioreaktoren.

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Realisierung der kontinuierlichen Zugabe von flüchtigen Substraten über die Gasphase der miniaturisierten Bioreaktoren. Als Applikationsbeispiel wurden Hochzelldichteverfahren und die sekretorische Herstellung von rekombinanten Proteinen mit methylotrophen Hefen und der Kohlenstoffquelle Methanol gewählt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Einführung des kontinuierlichen Zu- und Ablaufs von Medium im Milliliter-Maßstab, um die miniaturisierten Bioreaktoren als Chemostaten betreiben zu können. Die neuen miniaturisierten Chemostaten wurden für parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen zur reaktionstechnischen Untersuchung des Wachstums und der Produktbildung des Modellorganismus *Escherichia coli* eingesetzt. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden für die Etablierung von Produktionsprozessen im Zulaufbetrieb und in kontinuierlichen Rührkesselkaskaden genutzt. Abschließend sollte die Rückhaltung von Enzymen über eine Ultrafiltrationsmembran im Ablauf der kontinuierlich betriebenen Reaktoren realisiert werden. Mit diesen neuartigen Enzym-Membran-Reaktoren wurde beispielhaft die enzymatische Herstellung von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure reaktionstechnisch charakterisiert. Die etablierten Reaktorkonfigurationen sind in Abbildung 9.1 schematisch dargestellt.

In einem ersten Schritt wurde die kontinuierliche Zufuhr von Methanol über die Gasphase der miniaturisierten Bioreaktoren realisiert. Die in einem Sättiger mit Methanol angereicherte, sterile Prozessluft wurde in den Kopfraum der Parallelbioreaktoren geleitet und mit den gasinduzierenden Rührern in den Reaktionsansatz eingebracht, wodurch die Zufuhr von Methanol in die parallelen Bioreaktoren über den Stofftransport zwischen Gas- und Flüssigphase möglich wurde. Wie erwartet zeigte der Stofftransport eine Abhängigkeit von der Methanolkonzentration in der wässrigen Phase des Sättigers, dem Leistungseintrag der gasinduzierenden Rührer und dem Reaktionsvolumen der miniaturisierten Bioreaktoren. So konnten Methanoleintragsraten von $2,2 - 6,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Die Eintragsrate über

die Gasphase kann für weitere Anwendungen einfach durch die Variation der Methanolkonzentration im Sättiger angepasst werden.

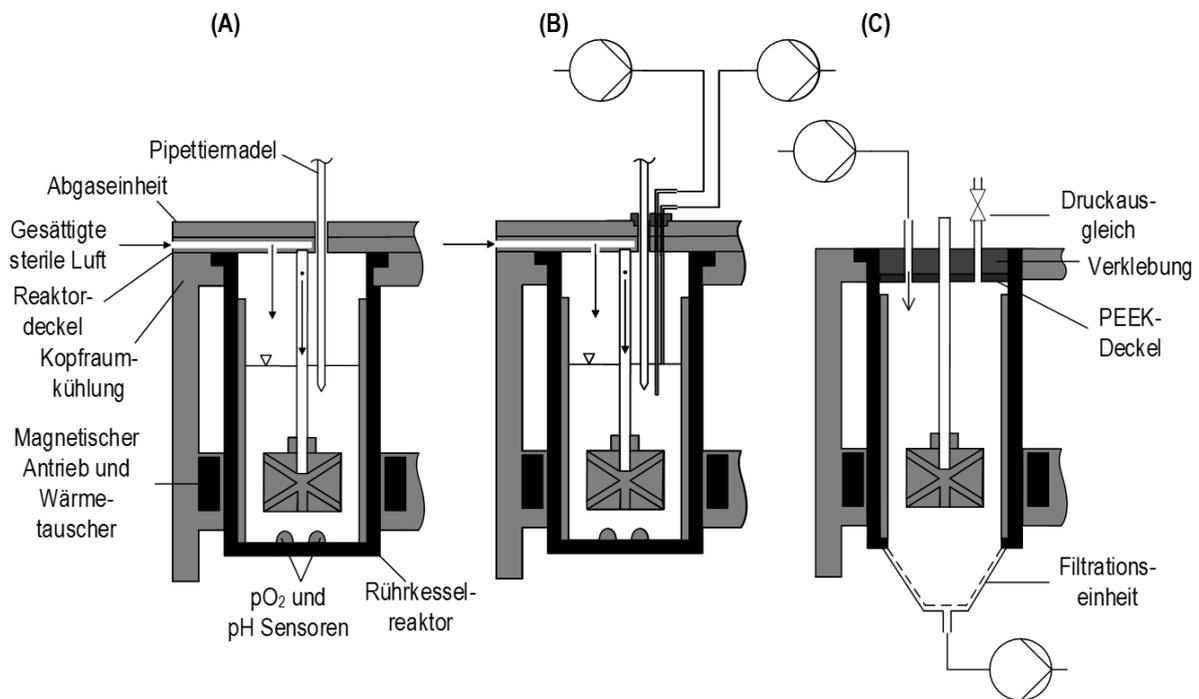


Abbildung 9.1: Gezeigt ist eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingeführten Erweiterungen der miniaturisierten Bioreaktoren des bioREACTOR 48 mit jeweils einer von 48 Einheiten. (A) Kontinuierliche Substratzufuhr über die Gasphase ($V_R = 8-15$ mL); (B) Kontinuierlicher Betrieb der Rührkesselreaktoren ($V_R = 10$ mL) mit peristaltischen Pumpen für den Zu- und Ablauf von Medium; (C) Kontinuierlicher Betrieb von miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren ($V_R = 15,5$ mL) mit einer Filtrationseinheit am Boden der Reaktoren und dem druckdichten Verschluss der Reaktoren.

Anschließend wurden beispielhaft Zulaufverfahren mit der methylophilen Hefe *Komagataella pastoris* im Milliliter-Maßstab etabliert. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen ($V_R = 12$ mL, $P_V = 32$ W L⁻¹) war eine maximale Methanoleintragsrate von 5,3 g L⁻¹ h⁻¹ ohne Sauerstofflimitierung möglich. Der Sauerstofftransfer könnte für weitere Anwendungen durch eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks der Zuluft und des Leistungseintrags der gasinduzierenden Rührer sowie einer Verringerung des Reaktionsvolumens weiter gesteigert werden. In einer Prozesszeit von 49 – 69 h wurden Biotrockenmassekonzentrationen von 50 – 60 g L⁻¹ und die extrazelluläre Produktion von $1,03 \pm 0,08$ g L⁻¹ einer *Candida antarctica* Lipase B erreicht, was einer Enzymaktivität von 16 604 U L⁻¹ entsprach. Die erzielbaren Zelldichten waren auf maximal 50 – 60 g L⁻¹ begrenzt, da es bei höheren Biotrockenmassekonzentrationen zu einer Beeinflussung der fluorometrischen pH-Messung in den Reaktoren durch die Eigenfluoreszenz der Zellen kam.

Die direkte Übertragbarkeit der Hochzelldichteverfahren vom Milliliter- in den Liter- und Kubikmetermaßstab konnte trotz der Unterschiede bei der Zufuhr des flüchtigen Substrates Methanol (über die Gasphase im Milliliter-Maßstab und über die Flüssigphase im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) sowie des Einsatzes verschiedener Arten von Rührern in den drei Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter- und Kubikmeter-Maßstab) gezeigt werden. Somit können zukünftig durch die Methanolzufuhr über die Gasphase im Milliliter-Maßstab der Aufwand und die Kosten für die Durchmusterung von methylo-trophen Hefen und die folgende Bioprozessentwicklung zur effizienten Herstellung rekombinanter Proteine deutlich reduziert werden, da diese Untersuchungen erstmals in parallelisierten Ansätzen im Milliliter-Maßstab bei hohen Zelldichten, kontrollierten Prozessbedingungen und mit kontinuierlicher Methanolzugabe möglich sind.

Um den kontinuierlichen Betrieb der parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab zu ermöglichen, wurde ein Aufsatz für die Abgaseinheit des bioREACTOR 48 gefertigt, der Öffnungen für die Pipettier-nadeln des Laborroboters sowie für zwei Winkelrohre zur Dosierung von Flüssigkeiten mit peristaltischen Pumpen aufwies. Über eines dieser Winkelrohre wurde den Reaktoren frisches Medium zugeführt, während das zweite Winkelrohr für den Ablauf des Mediums auf einer definierten Höhe fixiert wurde, um einen konstanten Füllstand der Bioreaktoren zu gewährleisten. Damit war der Betrieb von acht parallelen Chemostaten bei kontrollierten Bedingungen stabil über Prozesszeiten von mehreren Tagen möglich. Erste Bioprozesse mit dem Modellorganismus *Escherichia coli* zeigten die hohe Reproduzierbarkeit der parallelen Prozesse sowie die Möglichkeit der exakten Regelung des pH in den Reaktoren. Dabei konnten die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen ($12,1 \text{ g L}^{-1}$) und Glucose-eintragsraten ($12,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), die bisher für miniaturisierte Chemostaten beschrieben wurden, ohne Sauerstofflimitierung erreicht werden.

Nachfolgend wurden die parallelen Bioreaktoren für die modelbasierte Schätzung von formalkinetischen Parametern am Beispiel von *Escherichia coli* genutzt. Dabei konnten zehn Fließgleichgewichtszustände bei verschiedenen Verdünnungsraten in einem Versuchsansatz (80 h) eingestellt werden (siehe Abbildung 9.2 A). Die über nichtlineare Regression geschätzten formalkinetischen Modellparameter zeigten eine hohe Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Werten (Riesenberg et al. 1991; Senn et al. 1994; Kovárová-Kovar und Egli 1998; Jenzsch et al. 2006; Wunderlich et al. 2014).

Die Validierung des identifizierten kinetischen Modells mit Hilfe von weiteren Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter- und Liter-Maßstab bestätigte die hohe Genauigkeit der Parameterschätzungen mit Ausnahme von Fließgleichgewichtszuständen nahe des Auswaschpunktes aufgrund der ungenauen Schätzung von einzelnen formalkinetischen Parametern und der grundsätzlichen Schwierigkeit in Chemostaten stabile Fließgleich-

gewichtszustände nahe dem Auswaschpunkt einzustellen (siehe Abbildung 9.2 B). Die Skalierbarkeit der kontinuierlichen Prozesse mit *Escherichia coli* vom Milliliter- in den Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransferrate als Übertragungskriterium konnte trotz der unterschiedlichen Rührorgane in beiden Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter-Maßstab) demonstriert werden (Abbildung 9.2 B).

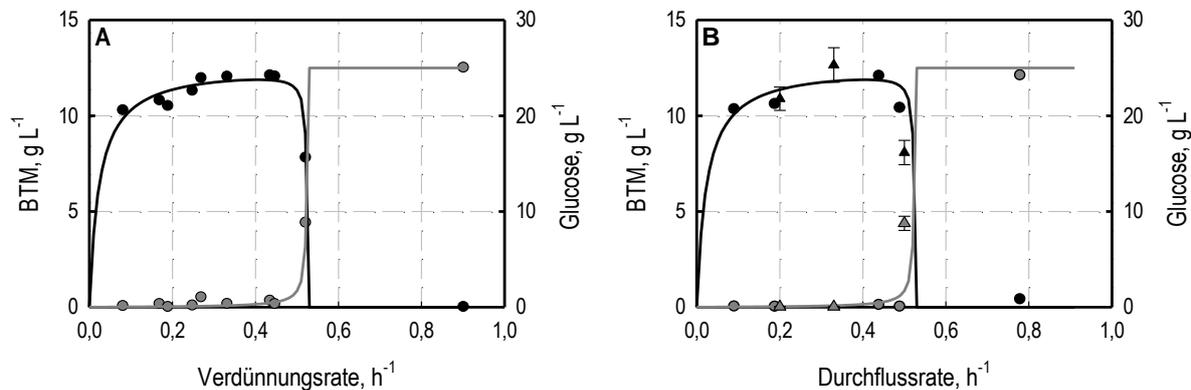


Abbildung 9.2: (A) Parallele Fließgleichgewichtsuntersuchungen mit *Escherichia coli* im Chemostaten ($V = 10 \text{ mL}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH } 7,0$) zur modellbasierten Schätzung der formalkinetischen Parameter und (B) Validierung des identifizierten kinetischen Modells mit parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen im Milliliter-Maßstab und Maßstabsübertragung ausgewählter Fließgleichgewichtszustände in den Litermaßstab ($V = 2 \text{ L}$, $c_{S,F} = 25 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH } 7,0$): Gemessene Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) im Milliliter- (●) und Liter-Maßstab (▲) sowie Glucosekonzentrationen im Milliliter- (●) und Liter-Maßstab (▲) mit Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen bei verschiedenen Fließgleichgewichtszuständen im Vergleich zu deren (BTM: schwarz; Glucose: grau) modellbasiert abgeschätzten Verläufen als Funktion der Verdünnungsrate.

Die Verbesserung von Zulaufprozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine erfolgt herkömmlicherweise in aufwendigen sequentiellen Zulaufprozessen im Labormaßstab. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Entwicklung von Herstellungsverfahren im Zulaufbetrieb mit Erkenntnissen aus parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen beschleunigt werden kann. So wurden exemplarisch verschiedene Induktionsstrategien bei der Herstellung des Proteins PAmCherry (*photoactivatable* mCherry, fotoaktivierbares mCherry) mit *Escherichia coli* reaktionstechnisch untersucht, um eine geeignete Induktionsstrategie für Zulaufprozesse zur Produktion von PAmCherry zu identifizieren.

Fließgleichgewichtsuntersuchungen, bei denen die Produktbildung mit konstanten Konzentrationen von $1 - 1\,000 \mu\text{M}$ Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) im kontinuierlichen Betrieb induziert wurde, zeigten eine schnelle Einstellung von stabilen Fließgleichgewichtszuständen bis zu einer IPTG-Konzentration von $10 \mu\text{M}$. Bei Induktorkonzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ kam es hingegen zu einer starken Überexpression des Proteins zum Beginn der kontinuierlichen Kultivierung, was ein teilweises Auswaschen der Zellen zur Folge hatte.

Anschließend wurde eine Abnahme der Produktbildungsrate und eine erneute Zunahme der Zelldichte beobachtet, bis nach etwa 5 – 7 Verweilzeiten Fließgleichgewichtszustände mit niedrigen Produktbildungsraten erreicht wurden. Während die Biotrockenmassekonzentration im Fließgleichgewicht in allen parallelen Ansätzen vergleichbar war, wurde die maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $0,67 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit $5 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG erreicht. So konnte von einem hohen Selektionsdruck auf die Zellen mit negativen Auswirkungen auf die Produktbildung bei hohen Induktorkonzentrationen ausgegangen werden. Im Gegensatz zu publizierten Daten (Sevastyanovich et al. 2009; Alfasi et al. 2011) konnte allerdings ein vollständiger Verlust von Plasmiden als Ursache für die Abnahme der Produktbildungsrate nach der Induktion mit hohen IPTG-Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Um den Selektionsdruck zu Beginn des kontinuierlichen Betriebs zu reduzieren, wurden in weiteren Bioprozessen lediglich $100 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG im Zulaufmedium vorgelegt, was eine zeitabhängige Erhöhung der IPTG-Konzentration im Reaktionsansatz analog des Verweilzeitverhaltens kontinuierlicher Rührkesselreaktoren zur Folge hatte. Dabei wurde nach etwa vier Verweilzeiten eine konstante Produktbildungsrate von $2,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beobachtet, die deutlich höher als bei der Induktion mit konstanten IPTG-Konzentrationen war. Die erreichte Raum-Zeit-Ausbeute betrug $22,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Nachfolgend wurden die in Fließgleichgewichtsuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse für die Verbesserung eines Hochzelldichteverfahrens im Zulaufbetrieb zur Herstellung von PAmCherry mit *Escherichia coli* genutzt. Hierfür wurde zunächst ein Referenzprozess in Analogie zu bestehenden Hochzelldichteverfahren etabliert. Nach einer initialen Satzphase wurde eine exponentielle Wachstumsphase unter substratlimitierten Bedingungen gestartet. Mit den zuvor identifizierten formalkinetischen Parametern konnte das benötigte Zulaufprofil exakt berechnet werden. Im Anschluss an die Wachstumsphase wurde die Produktbildung wie für zahlreiche Prozesse beschrieben mit der Zugabe von $1\,000 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG induziert (Donovan et al. 1996). Nach 70 h wurde eine Zelldichte von 48 g L^{-1} und eine Proteinkonzentration von $7,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Mit einer Anpassung der Induktionsstrategie konnten die Proteinkonzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute um 20 % gesteigert werden. Dabei wurde IPTG im Zulaufmedium vorgelegt, um eine Erhöhung der Induktorkonzentration auf maximal $100 \text{ }\mu\text{M}$ IPTG analog des Verweilzeitverhaltens kontinuierlicher Rührkesselreaktoren im Reaktionsansatz zu erreichen. Somit ist zukünftig mit der Durchführung von parallelen Fließgleichgewichtsuntersuchungen eine deutliche Reduktion des experimentellen Aufwandes für die Verbesserung von Bioprozessen möglich.

Aufgrund des hohen Selektionsdrucks nach der Induktion der Proteinexpression war eine effiziente Herstellung von PAmCherry mit *Escherichia coli* in Chemostaten nicht möglich. Um analog zu Zulaufprozessen eine Entkopplung von Wachstum und Produktbildung zu erreichen,

wurde die kontinuierliche Produktion von PAmCherry in parallelen zweistufigen Rührkesselkaskaden im Milliliter-Maßstab etabliert. In Anlehnung an beschriebene Prozesse (Park et al. 1990; Hortacsu und Ryu 1991; Rhee und Schügerl 1998) wurde der erste Reaktor für das Wachstum der Zellen und der zweite Reaktor mit separater Substratzufuhr (100 μM IPTG) für die Produktbildung eingesetzt. Dabei wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der Fließgleichgewichtszustände nachgewiesen. Mit einer Verdünnungsrate von $0,15\text{ h}^{-1}$ bezogen auf das Gesamtvolumen der Kaskade konnte eine maximale Proteinkonzentration von 502 mg L^{-1} bei einer Biotrockenmassekonzentration von $10,8\text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute von $75\text{ mg L}^{-1}\text{ h}^{-1}$, die im Bereich des entwickelten Zulaufprozesses für die Herstellung von PAmCherry lag. Eine weitere Steigerung der Effizienz des kontinuierlichen Produktionsverfahrens wäre durch eine Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration im Reaktionsansatz möglich. Eine Übertragung des Bioprozesses in den Liter-Maßstab mit der maximalen Sauerstofftransferate als Kriterium zur Maßstabsübertragung konnte trotz der unterschiedlichen Rührorgane in beiden Maßstäben (gasinduzierende Rührer im Milliliter-Maßstab und Scheiben-Rührer im Liter-Maßstab) demonstriert werden. So war es erstmals möglich einen skalierbaren, mikrobiellen Produktionsprozess in einer mehrstufigen Rührkesselkaskade im Milliliter-Maßstab zu etablieren.

Abschließend wurde für den kontinuierlichen Betrieb von enzymatischen Prozessen die Rückhaltung der Biokatalysatoren in den miniaturisierten Bioreaktoren mittels Ultrafiltration realisiert. Hierfür wurde am Boden der Parallelreaktoren eine Filtrationseinheit mit einer Größenausschlussgrenze von 10 kDa eingeklebt. Die Reaktoren wurden nach oben mit einem Deckel aus Polyetheretherketon druckdicht verschlossen ($V_R = 15,5\text{ mL}$), über den der Zulauf von Substratlösungen, der Druckausgleich beim Befüllen der Reaktoren und die Fixierung der Achse der Rührorgane möglich war. Nach einer initialen Deckschichtbildung konnte eine Retention $> 98,5\%$ für ein grün fluoreszierendes Protein (28 kDa) nachgewiesen werden. Der maximale Volumenstrom über die Ultrafiltrationsmembran mit den verwendeten peristaltischen Pumpen war auf $2,0\text{ mL h}^{-1}$ bei einem Druck von 4,1 bar in den Enzym-Membran-Reaktoren begrenzt.

In der Folge wurden die miniaturisierten Enzym-Membran-Reaktoren für die kontinuierliche Produktion von *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure aus *N*-Acetyl-D-Glucosamin (50 mM) und Pyruvat (100 mM) mit einem Zweienzymsystem (*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase $24\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, *N*-Acetylneuraminat-Lyase $164\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) eingesetzt. Bei der Herstellung in kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktoren konnte nach einer dreistündigen Satzphase kurz nach dem Start des kontinuierlichen Betriebs ($\tau = 37,1\text{ h}$) die Einstellung von reproduzierbaren und stabilen Fließgleichgewichtszuständen über Prozesszeiten $> 150\text{ h}$ mit einer *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure-Konzentration von 12,4 mM beobachtet werden. Wie erwartet wurde eine Abnahme der

Produktkonzentration mit der Verringerung der Verweilzeit ($\tau = 17,5$ h) auf 9,4 mM *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure gemessen, während die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 1,5 zunahm.

Anschließend wurde überprüft, ob die Inhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase durch Pyruvat und *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure mit der Einführung einer zweistufigen Kaskade von Enzym-Membran-Reaktoren verringert werden kann. Die räumliche Trennung der Enzyme in den beiden Reaktoren einer Kaskade hatte wie erwartet eine Verringerung der Prozessleistung zur Folge, da das Gleichgewicht der initialen Isomerisierung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin mit der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase auf der Seite des Eduktes liegt. Durch den sequentiellen Betrieb von zwei Enzym-Membran-Reaktoren mit jeweils $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase und $164 \mu\text{g mL}^{-1}$ *N*-Acetylneuraminat-Lyase konnte aufgrund des verringerten Einflusses der Produktinhibition der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase eine Steigerung der *N*-Acetyl-D-Neuraminsäure-Konzentration (14 %) und der Raum-Zeit-Ausbeute (20 %) erreicht werden.

10 Ausblick

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Fortschritte eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Weiterentwicklung des bioREACTOR 48.

So könnte mit der Einführung von optisch isolierten pH-Sensoren oder von neuen pH-Sensoren mit anderen Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Minimierung des Einflusses der Eigenfluoreszenz von Mikroorganismen (Janzen et al. 2015) die maximal mögliche Zelldichte von derzeit 50 – 60 g L⁻¹ weiter erhöht werden.

Um den Einsatz der kontinuierlichen Bioreaktoren für metabolische Stoffflussanalysen zu ermöglichen, müsste eine individuelle Messung des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalts in den Abgasströmen der parallelen Reaktoren möglich sein, um Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidbildungsrate bestimmen zu können. Weiterhin können Markierungsexperimente mit isopenangereicherten Substraten für die Ermittlung von intrazellulären Stoffflüssen durchgeführt werden (Kelleher 2001; Niklas et al. 2010). Um die entsprechenden Stoffbilanzen erstellen zu können, müsste neben einer Bestimmung der Markierungsmuster der intrazellulären Moleküle die Menge an markierten Substanzen (beispielsweise ¹³CO₂ oder ¹⁵NH₄⁺), die über die Gasphase aus dem Reaktor entweichen, mit einer zu entwickelnden Abgasanalytik quantifizierbar sein.

Der hier ermöglichte Betrieb der kontinuierlichen Bioreaktoren als Chemostaten ist für die untersuchten Fragestellungen ausreichend. In manchen Fällen könnte jedoch der Einsatz von Turbidostaten sinnvoll sein, womit stabile Fließgleichgewichtszustände nahe der maximalen Wachstumsrate (Auswaschpunkt) erreicht werden können. Hierfür wird die Zelldichte als Zustandsgröße gemessen und über einen einfachen Regler die Verdünnungsrate als manipulierbare Größe gewählt (Chmiel 2011). Mit der Entwicklung einer prozessbegleitenden Messung der Zelldichte und der Einführung eines Reglers, der die Ansteuerung der verwendeten Pumpen erlaubt, könnten die miniaturisierten Bioreaktoren als Turbidostaten betrieben werden. Hierdurch könnte das Anwendungsspektrum der miniaturisierten Bioreaktoren erweitert werden. Ein mögliches Beispiel stellt die chemische Evolution von bakteriellen Genomen dar (Neumann et al. 2010; Hoesl und Budisa 2012; Hoesl et al. 2015). Dabei wird versucht den Einbau von nicht natürlichen Aminosäuren in Proteine mit *Escherichia coli* zu realisieren, indem das Genom der Zellen verändert wird. Bislang wird dies unter anderem in sequentiellen Satzversuchen durch eine schrittweise Verringerung der Konzentration einer natürlichen Aminosäure und eine entsprechende Erhöhung der gewünschten nicht natürlichen Aminosäure erreicht. So berichteten Hoesl et al. (2015) die vollständige Adaption des Wachstums von *Escherichia coli* mit einer künstliche Aminosäure nach 506 Tagen und 264 Passagierungen. Mit dem Wachstum der Zellen im Turbidostaten bei

einer kontinuierlichen und geregelten Veränderung der Umgebungsbedingungen könnte der experimentelle Aufwand deutlich reduziert werden.

Eine weiteres wachsendes Forschungsgebiet stellt die physikalische Simulation von industriellen Rührkesselreaktoren ($> 100\,000\text{ L}$) im Labormaßstab dar. Die hohen Mischzeiten im technischen Maßstab führen oftmals zum Auftreten von Substrat-, pH-, und Sauerstoffgradienten, welche eine verringerte Effizienz von Bioprozessen zur Folge haben können. Bisherige physikalische Simulatoren bestehen zumeist aus einer Kombination von zwei oder drei Rührkesselreaktoren und/oder Strömungsrohren mit unterschiedlichen Substrat- oder Sauerstoffkonzentrationen, die die Zellen ständig durchlaufen. Mit diesen Ansätzen wird das Verhalten von Zellen im technischen Maßstab jedoch bislang nicht ausreichend abgebildet (Takors 2012). Um die Durchmischung von industriellen Anlagen im Zulaufbetrieb zu simulieren, könnten bis zu acht der in dieser Arbeit vorgestellten, kontinuierlichen Bioreaktoren miteinander verbunden werden (siehe Abbildung 10.1). Wie in industriellen Anlagen (über den Deckel des Reaktors) sollte die Zugabe von Substrat und Titrationsmittel nur an einer Stelle erfolgen (im ersten Reaktor). So entsteht ein Reaktionskompartiment aus acht Mischzellen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen, Sauerstoffpartialdrücken und pH. Diese Reaktor-konfiguration ist nicht nur für die Charakterisierung des Metabolismus der Zellen bei variablen Reaktionsbedingungen sondern auch für die Isolation von Stämmen mit hoher Toleranz gegenüber wechselnden Umweltbedingungen geeignet.

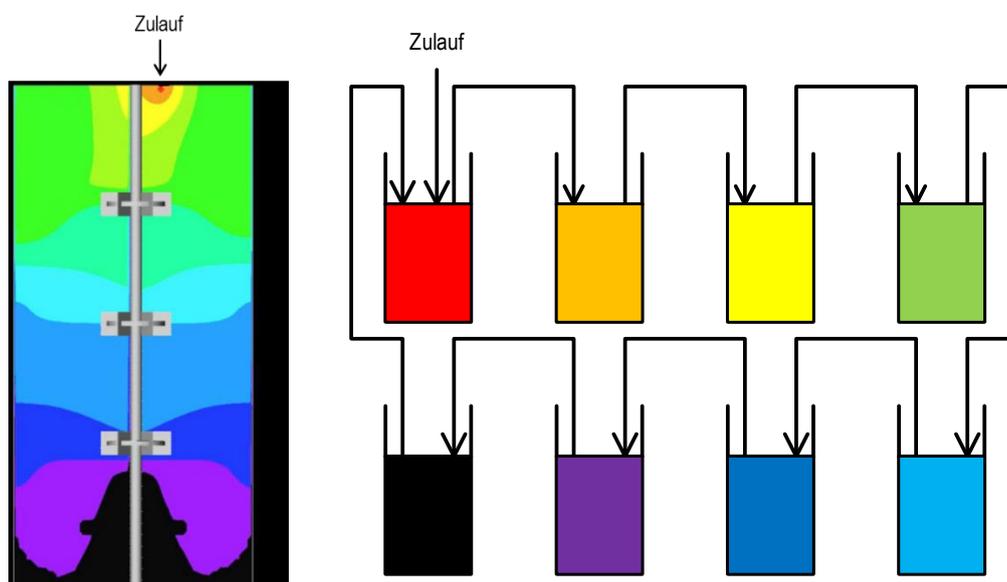


Abbildung 10.1: Betrieb von acht miniaturisierten Bioreaktoren als ein Reaktionskompartiment mit acht Mischzellen (rechts) für die physikalische Simulation von industriellen Rührkesselreaktoren (links, nach Lapin et al. (2006)). Das Reaktionskompartiment kann im Zulaufverfahren mit einer Pumpe für die Substratzufuhr betrieben werden. Die Zellen werden im Kreislauf gepumpt, um im ständigen Wechsel alle Mischzellen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu durchlaufen (abnehmende Konzentration von Rot nach Schwarz).

Literaturverzeichnis

- Akgün A, Maier B, Preis D, Roth B, Klingelhöfer R, Büchs J (2004) A novel parallel shaken bioreactor system for continuous operation. *Biotechnology progress* 20:1718–1724
- Akgün A, Müller C, Engmann R, Büchs J (2008) Application of an improved continuous parallel shaken bioreactor system for three microbial model systems. *Bioprocess and biosystems engineering* 31:193–205
- Akoh CC, Jennings BH, Lillard DA (1996) Enzymatic modification of evening primrose oil. Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73:1059–1062
- Alfasi S, Sevastyanovich Y, Zaffaroni L, Griffiths L, Hall R, Cole J (2011) Use of GFP fusions for the isolation of *Escherichia coli* strains for improved production of different target recombinant proteins. *Journal of biotechnology* 156:11–21
- Ali S, Perez-Pardo MA, Aucamp JP, Craig A, Bracewell DG, Baganz F (2012) Characterization and feasibility of a miniaturized stirred tank bioreactor to perform *E. coli* high cell density fed-batch fermentations. *Biotechnology progress* 28:66–75
- Altenbach-Rehm J, Nell C, Arnold M, Weuster-Botz D (1999) Parallel Bubble Columns with Fed-Batch Technique for Microbial Process Development on a Small Scale. *Chem. Eng. Technol.* 22:1051–1058
- Andersen DC, Krummen L (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13:117–123
- Anderson EM, Larsson KM, Kirk O (1998) One Biocatalyst—Many Applications. The Use of *Candida Antarctica B*-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 16:181–204
- Angata T, Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews* 102:439–469
- Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10:411–421
- Bareither R, Bargh N, Oakeshott R, Watts K, Pollard D (2013) Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: a proof of concept study. *Biotechnology and bioengineering* 110:3126–3138
- 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
- Bendig C, Weuster-Botz D (2013) Reaction engineering analysis of cellulase production with *Trichoderma reesei* RUT-C30 with intermittent substrate supply. *Bioprocess and biosystems engineering* 36:893–900

- Bergter F (1983) Wachstum von Mikroorganismen. Experimente und Modelle, 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim
- Betts JI, Baganz F (2006) Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial cell factories* 5:21
- Betts JI, Doig SD, Baganz F (2006) Characterization and application of a miniature 10 mL stirred-tank bioreactor, showing scale-down equivalence with a conventional 7 L reactor. *Biotechnology progress* 22:681–688
- Binay B, Karagüler NG (2007) Attempting to remove the substrate inhibition of L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* by site-directed mutagenesis. *Applied biochemistry and biotechnology* 141:265–272
- Blank K, Morfill J, Gump H, Gaub HE (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 125:474–483
- Bommarius AS, Riebel BR (2004) *Biocatalysis*. Wiley-VCH, Weinheim
- Bower DM, Lee KS, Ram RJ, Prather KLJ (2012) Fed-batch microbioreactor platform for scale down and analysis of a plasmid DNA production process. *Biotechnology and bioengineering* 109:1976–1986
- Brady CP, Shimp RL, Miles AP, Whitmore M, Stowers AW (2001) High-level production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 23:468–475
- Brethauer S, Wyman CE (2010) Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives. *Bioresource technology* 101:4862–4874
- Brierley RA (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods in molecular biology* 103:149–177
- Briggs GE, Haldane JB (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *The Biochemical journal* 19:338–339
- Brosius J, Erfle M, Storella J (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. *The Journal of biological chemistry* 260:3539–3541
- Brown DE (1982) Industrial-scale operation of microbial processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32:34–46
- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT (2012) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Büchs J (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical engineering journal* 7:91–98
- Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, Gardossi L (2013) Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society reviews* 42:6262–6276

- Carneiro S, Ferreira EC, Rocha I (2013) Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. Highlights from the ChemPor 2011 Conference. *Journal of biotechnology* 164:396–408
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 13:329–332
- Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* 24:45–66
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805
- Chang HN, Jung K, Choi J, Lee JC, Woo H (2014) Multi-stage continuous high cell density culture systems: a review. *Biotechnology Advances* 32:514–525
- Chang HN, Kim N, Kang J, Jeong CM, Choi J, Fei Q, Kim BJ, Kwon S, Lee SY, Kim J (2011) Multi-stage high cell continuous fermentation for high productivity and titer. *Bioprocess and biosystems engineering* 34:419–431
- Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, Jahic M, Enfors S (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and biosystems engineering* 27:399–406
- Chmiel H (2011) *Bioprozesstechnik*, 3rd edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61:876–885
- Clark DP (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 63:223–234
- Cornish-Bowden A (2012) *Fundamentals of enzyme kinetics*, 4th edn. Wiley-Blackwell, Weinheim
- Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F (2005) Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of biotechnology* 116:321–335
- Couderc R, Baratti J (1980) Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 44:2279–2289
- Cregg JM (ed) (2007) *Pichia protocols*, 2nd edn. Humana Press, Totowa
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and cellular biology* 9:1316–1323
- Croughan MS, Konstantinov KB, Cooney C (2015) The future of industrial bioprocessing: batch or continuous? *Biotechnology and bioengineering* 112:648–651

- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27:297–306
- Dennewald D, Hortsch R, Weuster-Botz D (2012) Evaluation of parallel milliliter-scale stirred-tank bioreactors for the study of biphasic whole-cell biocatalysis with ionic liquids. *Journal of biotechnology* 157:253–257
- DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse AJ, Bohlmann G (2013) Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society reviews* 42:6437–6474
- Dijkstra HP, van Klink, Gerard P M, van Koten G (2002) The use of ultra- and nanofiltration techniques in homogeneous catalyst recycling. *Accounts of chemical research* 35:798–810
- Dippe M, Brandt W, Rost H, Porzel A, Schmidt J, Wessjohann LA (2015) Rationally engineered variants of S-adenosylmethionine (SAM) synthase: reduced product inhibition and synthesis of artificial cofactor homologues. *Chemical communications* 51:3637–3640
- Dittrich CR, Bennett GN, San K (2005) Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress* 21:1062–1067
- Dong H, Nilsson L, Kurland CG (1995) Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of bacteriology* 177:1497–1504
- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR (1996) Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 16:145–154
- Egli T, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A (1980) Methanol metabolism in yeasts. Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Archives of Microbiology* 124:115–121
- Eiteman MA, Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology* 24:530–536
- Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, Philip Hendr N, Stamford PJ, Lilley PE, Dixon NE (1990) Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 87:123–126
- Eom GT, Lee SH, Song BK, Chung K, Kim Y, Song JK (2013) High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering* 116:165–170
- Faber K (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook*, 6th edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10:2606–2617

- Faust G, Janzen NH, 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
- Ferenci T (1996) Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS microbiology reviews* 18:301–317
- Fernández-Castané A, Caminal G, López-Santín J (2012a) Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures. *Microbial cell factories* 11:58
- Fernández-Castané A, Vine CE, Caminal G, López-Santín J (2012b) Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *Journal of biotechnology* 157:391–398
- Ferrer-Miralles N, Villaverde A (2013) Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microbial cell factories* 12:113
- Fischer E (1898) Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 26:60–87
- Förster AH, Gescher J (2014) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2:16
- Frachon E, Bondet V, Munier-Lehmann H, Bellalou J (2006) Multiple microfermentor battery: a versatile tool for use with automated parallel cultures of microorganisms producing recombinant proteins and for optimization of cultivation protocols. *Applied and environmental microbiology* 72:5225–5231
- Fuchs G, Schlegel HG, Eitinger T (ed) (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*, 8th edn. Thieme, Stuttgart
- 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
- Gellissen G, Janowicz ZA, Weydemann U, Melber K, Strasser AW, Hollenberg CP (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances* 10:179–189

- Georgiou G, Segatori L (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 16:538–545
- Ghosh S, Roseman S (1965) The Sialic Acids: N-Acyl-D-Glucosamine 2-Epimerase. *The Journal of biological chemistry* 240:1531–1536
- Gill NK, Appleton M, Baganz F, Lye GJ (2008) Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. *Biochemical engineering journal* 39:164–176
- Gill RT, Valdes JJ, Bentley WE (2000) A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering* 2:178–189
- Glaser (2011) Finding a bioreactor that's right for you: choosing between stainless steel and single-use getting easier as niches become better defined. *Genetic Engineering and Biotechnology News* 31:44–47
- Gorelik E, Galili U, Raz A (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 20:245–277
- Gröger H, Drauz K, May O (ed) (2012) *Enzyme catalysis in organic synthesis*, 3rd edn. Wiley-VCH, Weinheim
- Groher A, Hoelsch K (2012) Mechanistic model for the synthesis of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminidase from *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 83:1–7
- Gronenborn B (1976) Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : MGG 148:243–250
- Guldager N (2009) Next-generation facilities for monoclonal antibody production. *Pharmaceutical Technology* July:68–73
- Guo Q, Chu J, Zhuang Y, Gao Y (2015) Controlling the feed rate of propanol to optimize erythromycin fermentation by on-line capacitance and oxygen uptake rate measurement. *Bioprocess and biosystems engineering*
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology* 177:4121–4130
- Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Lückl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1997) High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein expression and purification* 11:61–71
- He XS, Brückner R, Doi RH (1991) The protease genes of *Bacillus subtilis*. *Research in microbiology* 142:797–803

- Hegab HM, Elmekawy A, Stakenborg T (2013) Review of microfluidic microreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. *Biomicrofluidics* 7:21502
- Hertwig K, Martens L (2012) *Chemische Verfahrenstechnik. Berechnung, Auslegung und Betrieb chemischer Reaktoren*, 2nd edn. Oldenbourg, München
- Hewitt CJ, Nebe-Von Caron G, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW (2000) Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and bioengineering* 70:381–390
- Hildebrand F, Kühl S, Pohl M, Vasic-Racki D, Müller M, Wandrey C, Lütz S (2007) The production of (R)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor. *Biotechnology and bioengineering* 96:835–843
- Hoefel T, Faust G, Reinecke L, Rudinger N, Weuster-Botz D (2012) Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnology journal* 7:1277–1287
- Hoefel T, Wittmann E, Reinecke L, Weuster-Botz D (2010) Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Applied microbiology and biotechnology* 88:477–484
- Hoesl MG, Budisa N (2012) Recent advances in genetic code engineering in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 23:751–757
- Hoesl MG, Oehm S, Durkin P, Darmon E, Peil L, Aerni H, Rappsilber J, Rinehart J, Leach D, Söll D, Budisa N (2015) Chemische Evolution eines bakteriellen Proteoms. *Angewandte Chemie* 127:10168–10172
- Hoffmann F, Rinas U (2004) Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 89:73–92
- 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
- Hortacsu A, Ryu DD (1991) Optimization of a two-stage recombinant fermentation process: the dilution rate effect. *Biotechnology and bioengineering* 38:831–837

- Hortsch R, Krispin H, Weuster-Botz D (2011) Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*. *Bioprocess and biosystems engineering* 34:297–304
- 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 (2010) Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms. *Advances in applied microbiology* 73:61–82
- Hoskisson PA, Hobbs G (2005) Continuous culture-making a comeback? *Microbiology* 151:3153–3159
- Hu S, Wu J, Huang J (2004) Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 107:161–171
- Invitrogen (2010) EasySelect™ *Pichia* Expression Kit Cat. No. K1740-01
- 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
- Ishige T, Honda K, Shimizu S (2005) Whole organism biocatalysis. *Current opinion in chemical biology* 9:174–180
- Itzstein M von (2007) The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery* 6:967–974
- Iyer PV, Ananthanarayan L (2008) Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* 43:1019–1032
- Jahic M, Rotticci-Mulder J, Martinelle M, Hult K, Enfors S (2002) Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and biosystems engineering* 24:385–393
- Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors S (2003) Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial cell factories* 2:6
- Jandel A, Hustedt H, Wandrey C (1982) Continuous production of L-alanine from fumarate in a two-stage membrane reactor. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 15:59–63
- Janzen NH, Schmidt M, Krause C, Weuster-Botz D (2015) Evaluation of fluorimetric pH sensors for bioprocess monitoring at low pH. *Bioprocess and biosystems engineering* 38:1685–1692
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006) Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *Journal of biotechnology* 127:84–94

- Jenzsch M, Lange M, Bär J, Rahfeld J, Lübbert A (2004) Bioreactor Retrofitting to Avoid Aeration with Oxygen in *Pichia Pastoris* Cultivation Processes for Recombinant Protein Production. *Chemical Engineering Research and Design* 82:1144–1152
- Jeong KJ, Lee SY (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
- Ju L, Chase GG (1992) Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8:49–53
- Junker BH (2004) Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of bioscience and bioengineering* 97:347–364
- Kang J, Gu P, Wang Y, Li Y, Yang F, Wang Q, Qi Q (2012) Engineering of an N-acetylneuraminic acid synthetic pathway in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering* 14:623–629
- Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y, Suga K (1998) Effect of methanol concentration on the production of human β 2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86:482–487
- Katoh S, Yoshida F (2009) *Biochemical engineering. A textbook for engineers, chemists and biologists.* Wiley-VCH, Weinheim
- Kelleher JK (2001) Flux Estimation Using Isotopic Tracers: Common Ground for Metabolic Physiology and Metabolic Engineering. *Metabolic engineering* 3:100–110
- Kessler H (2006) *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik*, 4th edn. Verlag A. Kessler, München
- Kirk O, Christensen MW, Beck F, Damhus T (1995) Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation and Deacylation of Glucose Derivatives. *Biocatalysis and Biotransformation* 12:91–97
- Kirk TV, Szita N (2013) Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems. *Biotechnology and bioengineering* 110:1005–1019
- Klein T, Schneider K, Heinzle E (2013) A system of miniaturized stirred bioreactors for parallel continuous cultivation of yeast with online measurement of dissolved oxygen and off-gas. *Biotechnology and bioengineering* 110:535–542
- Klermund L, Groher A, Castiglione K (2013) New N-acyl-D-glucosamine 2-epimerases from cyanobacteria with high activity in the absence of ATP and low inhibition by pyruvate. *Journal of biotechnology* 168:256–263

- Klermund L, Riederer A, Groher A, Castiglione K (2015) High-level soluble expression of a bacterial N-acyl-d-glucosamine 2-epimerase in recombinant *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 111:36–41
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann H, Weuster-Botz D (2007) Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical engineering journal* 33:263–274
- Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of bioscience and bioengineering* 89:55–61
- Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 39:59–65
- Kovárová-Kovar K, Egli T (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62:646–666
- Kragl U, Gygax D, Ghisalba O, Wandrey C (1991) Enzymatic Two-Step Synthesis of N-Acetyl-neuraminic Acid in the Enzyme Membrane Reactor. *Angewandte Chemie International Edition in English* 30:827–828
- Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C (1992) Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chemie Ingenieur Technik* 64:499–509
- Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C (1996) Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors. *Bioprocess Engineering* 14:291–297
- Kraume M (2012) *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik. Grundlagen und apparative Umsetzungen*, 2nd edn. Springer Vieweg, Berlin
- Kraume M, Peters T (2005) *Entwicklungen und Perspektiven druckgetriebener Membranverfahren*. *Chemie Ingenieur Technik* 77:473–485
- Kremling A (2014) *Systems biology. Mathematical modeling and model analysis*. CRC Press, Boca Raton
- 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
- Lapin A, Schmid J, Reuss M (2006) Modeling the dynamics of *E. coli* populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor - A structured–segregated approach. *Chemical Engineering Science* 61:4783–4797
- Lee J, Yi J, Lee S, Takahashi S, Kim B (2004) Production of N-acetylneuraminic acid from N-acetylglucosamine and pyruvate using recombinant human renin binding protein and sialic acid aldolase in one pot. *Enzyme and Microbial Technology* 35:121–125

- Lee KS, Boccazzi P, Sinskey AJ, Ram RJ (2011) Microfluidic chemostat and turbidostat with flow rate, oxygen, and temperature control for dynamic continuous culture. *Lab on a chip* 11:1730–1739
- Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology* 14:98–105
- Lee Y, Chien HR, Hsu W (2007a) Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant whole cells expressing *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid lyase. *Journal of biotechnology* 129:453–460
- Lee Y, Wu H, Chang Y, Wang W, Hsu W (2007b) The central cavity from the (α/α)₆ barrel structure of *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase contains two key histidine residues for reversible conversion. *Journal of molecular biology* 367:895–908
- León R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral J (1998) Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 23:483–500
- Liese A, Karutz M, Kamphuis J, Wandrey C, Kragl U (1996) Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and bioengineering* 51:544–550
- Liese A, Kragl U (2013) Einfluss der Reaktorkonfiguration auf die Enantioselektivität einer kinetischen Racematspaltung. *Chemie Ingenieur Technik* 85:826–832
- Liese A, Mertens R, Wandrey C (2005) Reaktionstechnische Aspekte der enzymatischen Herstellung von NADPH im Enzym-Membran-Reaktor. *Chemie Ingenieur Technik* 77:609–616
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2006) *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, Hoboken
- Listner K, Bentley L, Chartrain M (2006) A Simple Method for the Production of Plasmid DNA in Bioreactors. In: Saltzman W, Shen H, Brandsma J (ed) *DNA Vaccines*. Humana Press, pp 295–309
- Liu H, Tan X, Russell KA, Veenhuis M, Cregg JM (1995) PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *Journal of Biological Chemistry* 270:10940–10951
- Long Q, Liu X, Yang Y, Li L, Harvey L, McNeil B, Bai Z (2014) The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. *Advances in Industrial Biotechnology Synthetic Pathways and Reaction Cascades. Journal of biotechnology* 192, Part B:323–338
- Lütz S, Wandrey C, Rao N (2005) Membranen in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik* 77:1669–1682
- Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in applied microbiology* 51:81–106

- Marco A de (2007) Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nature protocols* 2:2632–2639
- Marques MPC, Cabral JMS, Fernandes P (2010) Bioprocess scale-up. Quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85:1184–1198
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1258:272–276
- Maru I, Ohnishi J, Ohta Y, Tsukada Y (1998) Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetylneuraminase lyase. *Carbohydrate research* 306:575–578
- Maru I, Ohnishi J, Ohta Y, Tsukada Y (2002) Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase. *Journal of bioscience and bioengineering* 93:258–265
- Melin T, Rautenbach R (2007) *Membranverfahren. Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, 3rd edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Merz M, Eisele T, Claaßen W, Appel D, Rabe S, Stressler T, Fischer L (2015) Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system. *Biochemical engineering journal* 99:114–123
- Michaelis L, Menten ML (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49:333–369
- Miller DM, Desai NS, Hardin DC, Piston DW, Patterson GH, Fleenor J, Xu S, Fire A (1999) Two-color GFP expression system for *C. elegans*. *BioTechniques* 26:914-8, 920-1
- Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* 260:289–298
- Monod J (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 3:371–394
- Monod J (1950) Continuous culture technique: theory and applications. *Annales de l'Institut Pasteur* 79:390–410
- Müller-Erlwein E (2015) *Chemische Reaktionstechnik*, 3rd edn. Springer Spektrum, Wiesbaden
- Multsch R, Lokotsch W, Steffen B, Lang S, Metzger JO, Schäfer HJ, Warwel S, Wagner F (1994) Enzymatic production and physicochemical characterization of uncommon wax esters and monoglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71:721–725

- 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
- Nanchen A, Schicker A, Sauer U (2006) Nonlinear dependency of intracellular fluxes on growth rate in miniaturized continuous cultures of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 72:1164–1172
- Neubauer P, Junne S (2010) Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology* 21:114–121
- Neumann H, Wang K, Davis L, Garcia-Alai M, Chin JW (2010) Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* 464:441–444
- Niklas J, Schneider K, Heinzle E (2010) Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Current Opinion in Biotechnology* 21:63–69
- Novagen (2003) pET System Manual 2003
- Novick A, Szilard L (1950) Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36:708–719
- Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M (1969) A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricultural and Biological Chemistry* 33:1519–1520
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering* 5:197–211
- Park S, Ryu DD, Kim JY (1990) Effect of cell growth rate on the performance of a two-stage continuous culture system in a recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 36:493–505
- Phillips RS (1996) Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: Prospects for exploitation. *Trends in biotechnology* 14:13–16
- Piatkevich KD, Verkhusha VV (2010) Advances in engineering of fluorescent proteins and photoactivatable proteins with red emission. *Current opinion in chemical biology* 14:23–29
- 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 GT, 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
- Puskeiler R, Weuster-Botz D (2005) Combined sulfite method for the measurement of the oxygen transfer coefficient $k_L a$ in bioreactors. *Journal of biotechnology* 120:430–438

- Rhee JI, Schügerl K (1998) Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli* JM109 in a two-stage cascade reactor and production of the fusion protein EcoRI:SPA. *Process Biochemistry* 33:213–224
- Ricca E, Brucher B, Schrittwieser JH (2011) Multi-Enzymatic Cascade Reactions. Overview and Perspectives. *Advanced Synthesis & Catalysis* 353:2239–2262
- Riedlberger P, Weuster-Botz D (2012) New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource technology* 106:138–146
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl H, Korz D, Sanders EA, Roß A, Deckwer W (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of biotechnology* 20:17–27
- Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R (2013) Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society reviews* 42:6290–6307
- Rodríguez Gastón JA, Costa H, Ferrarotti SA (2015) Continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane reactor, catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Biotechnology progress* 31:695–699
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014a) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5:172
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014b) Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in microbiology* 5:737
- Rozzell JD (1999) Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorganic & medicinal chemistry* 7:2253–2261
- Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, Knowles J, Kääriäinen L (1987) Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma Reesei*. *Nature biotechnology* 5:152–156
- Sanchez S, Demain AL (2011) Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Organic Process Research & Development* 15:224–230
- Schäpper D, Alam, Muhd Nazrul Hisham Zainal, Szita N, Eliasson Lantz A, Gernaey KV (2009) Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 395:679–695
- Schäpper D, Stocks SM, Szita N, Lantz AE, Gernaey KV (2010) Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. *Chemical Engineering Journal* 160:891–898
- Schauer R (1991) Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glycobiology* 1:449–452

- Schauer R (1997) Origin and Biological Role of the Great Chemical Diversity of Natural Sialic Acids. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 9:315–330
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258–268
- Schmidt FR (2005) Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology* 68:425–435
- Schmidt M, Weuster-Botz D (2012) Reaction engineering studies of acetone-butanol-ethanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology journal* 7:656–661
- Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG (2003) Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science* 299:1694–1697
- Schrewe M, Julsing MK, Bühler B, Schmid A (2013) Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chemical Society reviews* 42:6346–6377
- Schügerl K (1985) Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung, 1st edn. Salle, Frankfurt am Main
- Schumpe A (1993) The estimation of gas solubilities in salt solutions. *Chemical Engineering Science* 48:153–158
- Schwister K, Leven V (2013) Verfahrenstechnik für Ingenieure. Lehr- und Übungsbuch: Tabellen. Hanser, München
- Scott C (2008) Proactive debottlenecking: planning ahead for the downstream bottleneck. *BioProcess International* 6:18–23
- Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 14:783–790
- Secundo F (2013) Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society reviews* 42:6250–6261
- Segel IH (1993) Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. Wiley, New York
- Seletzky JM, Noack U, Hahn S, Knoll A, Amoabediny G, Büchs J (2007a) An experimental comparison of respiration measuring techniques in fermenters and shake flasks: exhaust gas analyzer vs. RAMOS device vs. respirometer. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 34:123–130
- Seletzky JM, Noack U, Fricke J, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J (2007b) Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnology and bioengineering* 98:800–811

- Senn H, Lendenmann U, Snozzi M, Hamer G, Egli T (1994) The growth of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostat cultures: a re-examination of the kinetics. *Biochimica et biophysica acta* 1201:424–436
- 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
- Sevastyanovich YR, Alfasi SN, Cole JA (2010) Sense and nonsense from a systems biology approach to microbial recombinant protein production. *Biotechnology and applied biochemistry* 55:9–28
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22:1567–1572
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous Hydromedusan *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223–239
- Shin CS, Hong MS, Bae CS, Lee J (1997) Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology progress* 13:249–257
- Sia SK, Whitesides GM (2003) Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* 24:3563–3576
- Simon ES, Bednarski MD, Whitesides GM (1988) Synthesis of CMP-NeuAc from N-acetylglucosamine. *Journal of the American Chemical Society* 110:7159–7163
- Skerra A (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151:131–135
- Smith MR, Khera E, Wen F (2015) Engineering novel and improved biocatalysts by cell surface display. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54:4021–4032
- Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 115:113–128
- Steinsiek S, Bettenbrock K (2012) Glucose transport in *Escherichia coli* mutant strains with defects in sugar transport systems. *Journal of bacteriology* 194:5897–5908
- Striedner G, Cserjan-Puschmann M, Pötschacher F, Bayer K (2003) Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration. *Biotechnology progress* 19:1427–1432
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189:113–130

- Su L, Hong R, Wu J (2015) Enhanced extracellular expression of gene-optimized *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia coli* by optimization of induction strategy. *Process Biochemistry* 50:1039–1046
- Subach FV, Malashkevich VN, Zencheck WD, Xiao H, Filonov GS, Almo SC, Verkhusha VV (2009a) Photoactivation mechanism of PAmCherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:21097–21102
- Subach FV, Patterson GH, Manley S, Gillette JM, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV (2009b) Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nature methods* 6:153–159
- Sumner JB, Somers GF (1953) *Chemistry and Methods of Enzymes*. Academic Press, New York
- Swaaf M de, Pronk J, Sijtsma L (2003) Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Applied microbiology and biotechnology* 61:40–43
- Takors R (2012) Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions. *Journal of biotechnology* 160:3–9
- Takors R, Wiechert W, Weuster-Botz D (1997) Experimental design for the identification of macrokinetic models and model discrimination. *Biotechnology and bioengineering* 56:564–576
- Tang YJ, Laidlaw D, Gani K, Keasling JD (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
- Tao F, Zhang Y, Ma C, Xu P (2010) Biotechnological production and applications of N-acetyl-D-neuraminic acid: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* 87:1281–1289
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 72:211–222
- Thompson BG, Kole M, Gerson DF (1985) Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnology and bioengineering* 27:818–824
- Traving C, Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 54:1330–1349
- Tripathi N (2009) High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal* 59:137–146

- Tsukada Y, Ohta Y (1995) Method for preparing N-Acetylneuraminic acid by N-Acetylneuraminic acid syase at a pH of 10-12. United States Patent Patent No.: 5,472,860
- Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM (2011) Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. *Organic Process Research & Development* 15:266–274
- Turner C, Gregory ME, Turner MK (1994) A study of the effect of specific growth rate and acetate on recombinant protein production of *Escherichia coli* JM107. *Biotechnology Letters* 16:891–896
- Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T (1973) Improved Microbial Production of Colominic Acid, a Homopolymer of N-Acetylneuraminic Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. *Agricultural and Biological Chemistry* 37:2105–2110
- Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T (1984) Purification and properties of N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*. *Journal of biochemistry* 96:507–522
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA (1994a) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2:293–308
- Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones TA (1994b) Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of molecular biology* 235:790–792
- Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U (2002) Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 94:185–194
- Vann WF, Tavarez JJ, Crowley J, Vimr E, Silver RP (1997) Purification and characterization of the *Escherichia coli* Kl neu B gene product N-acetylneuraminic acid synthetase. *Glycobiology* 7:697–701
- Van't Riet K (1979) Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 18:357–364
- Veenhuis M, van Dijken JP, Harder W (1983) The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Advances in microbial physiology* 24:1–82
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and environmental microbiology* 72:3653–3661

- Verdoes JC, Punt PJ, van den Hondel, C. A. M. J. J. (1995) Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 43:195–205
- Vester A, Hans M, Hohmann H, 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
- Vogl T, Glieder A (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New biotechnology* 30:385–404
- Wang B, Brand-Miller J (2003) The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European journal of clinical nutrition* 57:1351–1369
- Ward OP, Qin WM, Dhanjoon J, Ye J, Singh A (2005) Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in applied microbiology* 58C:1–75
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186:37–44
- Weast RC (1980) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th edn. CRC Press, Boca Raton
- Webb EC (1992) *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, San Diego
- Wegner GH (1990) Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS microbiology reviews* 7:279–283
- Weisenberger S, Schumpe A (1996) Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE Journal* 42:298–300
- Welch GR (1985) *Organized Multienzyme Systems*. Elsevier Science, Oxford
- Wenda S, Illner S, Mell A, Kragl U (2011) Industrial biotechnology - the future of green chemistry? *Green Chemistry* 13:3007
- Werten MW, van den Bosch, T J, Wind RD, Mooibroek H, Wolf FA de (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15:1087–1096
- Weuster-Botz D (2005) Parallel reactor systems for bioprocess development. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 92:125–143
- Weuster-Botz D (2006) *Mikro-Bioverfahrenstechnik*. *Chemie Ingenieur Technik* 78:256–260
- Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M (2001a) Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical engineering journal* 7:163–170
- Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Hawrylenko A (2001b) Process-engineering characterization of small-scale bubble columns for microbial process development.

- Bioprocess and Biosystems Engineering. *Bioprocess and biosystems engineering* 24:3–11
- Weuster-Botz D, Hekmat D, Puskeiler R, Franco-Lara E (2007) Enabling technologies: fermentation and downstream processing. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 105:205–247
- Weuster-Botz D, Stevens S, Hawrylenko A (2002) Parallel-operated stirred-columns for microbial process development. *Biochemical engineering journal* 11:69–72
- Wichmann R, Wandrey C, Bückmann AF, Kula MR (2000) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, No. 12, Pages 2789-2802 (1981). *Biotechnology and bioengineering* 67:791–804
- Wolf D, Resnick W (1963) Residence Time Distribution in Real Systems. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 2:287–293
- Wolfenden R, Snider MJ (2001) The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of chemical research* 34:938–945
- Woodley J, Lilly MD (1994) Biotransformation reactor selection and operation. In: Tramper J (ed) *Applied Biocatalysis : Applied Biocatalysis*. Harwood Academic, Chur, pp 371–393
- Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of bacteriology* 173:4952–4958
- Wunderlich M, Taymaz-Nikerel H, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR (2014) Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains. *Journal of bioscience and bioengineering* 117:336–342
- Xia T, Eiteman MA, Altman E (2012) Simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose in the presence of acetate by a consortium of *Escherichia coli* strains. *Microbial cell factories* 11:77
- Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO (1999) Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 51:564–571
- Zhang W, Hywood Potter KJ, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM (2003) *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 30:210–215
- Zhang Z, Boccazzi P, Choi H, Perozziello G, Sinskey AJ, Jensen KF (2006) Microchemostat-microbial continuous culture in a polymer-based, instrumented microbioreactor. *Lab on a chip* 6:906–913
- Zimmermann HF, Anderlei T, Büchs J, Binder M (2006) Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. *Applied microbiology and biotechnology* 72:1157–1160

- Zimmermann V, Hennemann H, Dausmann T, Kragl U (2007) Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine - new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis. *Applied microbiology and biotechnology* 76:597–605
- Zou C, Duan X, Wu J (2014) Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy. *Bioresource technology* 172:174–179

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung/Definition
A	Aktivator
ABC	ATP <i>binding cassette</i> , ATP Bindekassette
AGE	<i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase
<i>aox</i>	Gen für Alkoholoxidase
AOX	Alkoholoxidase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSM Medium	Basales Salz Medium
BTM	Biotrockenmassekonzentration
C	Celsius
CaIB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CaL-B2	Mutante der <i>Candida antarctica</i> Lipase B
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DHAS	Dihydroxyaceton Synthase
DLR	<i>Dual lifetime referencing</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRED	Rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma striata</i>
E	Enzym
EC	<i>Enzyme commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex

Abkürzung	Beschreibung/Definition
EP	Enzym-Produkt-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Glucosamin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest	Bidestilliertes Wasser
His-Tag	Polyhistidin-Affinitätsanker
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Inhibitor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>K. pastoris</i>	<i>Komagataella pastoris</i>
kDa	Kilodalton
kRK	Kontinuierlicher Rührkesselreaktor
kRKK	Kontinuierliche Rührkesselkaskade
L	Liter
LA	Lipaseaktivität
LB Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
m	Meter
M	Molar
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Mannosamin
min	Minute
mL	Milliliter

Abkürzung	Beschreibung/Definition
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MTP	Mikrotiterplatte
Mut ⁺	<i>Methanol utilizing wildtype</i>
Mut ⁻	<i>Methanol utilizing type minus</i>
Mut ^s	<i>Methanol utilizing type slow</i>
MW	<i>Molecular weight</i> , Molekulargewicht
MWCO	<i>Cut-off</i> , Größenausschlussgrenze
µL	Mikroliter
µmol	Mikromol
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid reduziert
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert
NAL	<i>N-Acetylneuraminat-Lyase</i>
Neu5Ac	<i>N-Acetyl-D-Neuraminsäure</i>
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P	Produkt
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAmCherry	<i>Photoactivatable mCherry</i> , fotoaktivierbares mCherry
P _{aox1}	Promotor des Gens für die Alkoholoxidase 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _{gap}	Promotor des Gens Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

Abkürzung	Beschreibung/Definition
PID	<i>Proportional-integral-derivative</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
P _{pex8}	Promotor des Gens für ein peroxisomales Matrixprotein
P _{ypt1}	Promotor des Gens für eine GTPase
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Rührkesselkaskade mit räumlicher Trennung von Enzymen
s	Sekunde
S	Substrat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodiumdodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SLA	Spezifische Lipaseaktivität
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Puffer
TB Medium	<i>Terrific broth</i> Medium
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i> , Citratzyklus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
U	<i>Unit</i> , Enzymaktivität in $\mu\text{mol min}^{-1}$, oder Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	Vollentsalzt
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf Volumen
YP Medium	Hefeextrakt-Pepton Medium
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> , Gelb Fluoreszierendes Protein

Symbolverzeichnis

Symbol	Beschreibung/Definition
a	Flüssigvolumenspezifische Stoffaustauschfläche, $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$
c_0	Konzentration der Markierungssubstanz im Reaktor nach Zugabe eines Markierungspulses, g L^{-1}
$c_0(t)$	Konzentration der Markierungssubstanz am Reaktoreingang, g L^{-1}
c_i	Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L^{-1}
c_I	Konzentration des Inhibitors, mol L^{-1}
$c_{i,\text{ein}}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
$c_{i,\text{mess}}$	Gemessene Konzentration der Komponente i , g L^{-1}
$c_{i,\text{sim}}$	Simulierte Konzentration der Komponente i , g L^{-1}
$c_{\text{MeOH},S}$	Methanolkonzentration im Sättiger, g L^{-1}
$c_{\text{O}_2}^*$	Sauerstoffsättigungskonzentration, mmol L^{-1}
c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration im Medium, mmol L^{-1}
c_P	Produktkonzentration, g L^{-1} bzw. mol L^{-1}
$c_{\text{PAmCherry}}$	PAmCherry-Konzentration, g L^{-1} oder mg L^{-1}
$c_{P,\text{eq}}$	Produktkonzentration im Gleichgewicht, mol L^{-1}
c_{Per}	Konzentration im Permeat, g L^{-1}
$c_P(t)$	Produktkonzentration zum Zeitpunkt t , g L^{-1} bzw. mol L^{-1}
$c_{R1}(t)$	Konzentration im Ablauf des ersten Reaktors einer Kaskade g L^{-1}
$c_{R2}(t)$	Konzentration im Ablauf des zweiten Reaktors einer Kaskade g L^{-1}
c_{Ret}	Konzentration im Retentat, g L^{-1}
c_S	Substratkonzentration, g L^{-1} bzw. mol L^{-1}
$c_{S,0}$	Initiale Substratkonzentration, g L^{-1} bzw. mol L^{-1}
$c_{S,\text{eq}}$	Substratkonzentration im Gleichgewicht, mol L^{-1}
$c_S(t)$	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t , g L^{-1} bzw. mol L^{-1}

Symbol	Beschreibung/Definition
$c(t)$	Konzentration der Markierungssubstanz am Reaktorausgang zum Zeitpunkt t , g L ⁻¹
c_X	Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
$c_{X,0}$	Initiale Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
d	Küvettendurchmesser, cm
D	Verdünnungsrate, h ⁻¹
D_C	Kritische Verdünnungsrate, h ⁻¹
D_{ges}	Verdünnungsrate bezogen auf das Volumen einer Kaskade, h ⁻¹
D_{set}	Sollwert der Verdünnungsrate, h ⁻¹
ΔA	Absorptionszunahme, min ⁻¹
ΔK_S	Fehler der Affinitätskonstante des Substrats, g L ⁻¹
$\Delta\mu$	Fehler der spezifischen Wachstumsrate, h ⁻¹
EA	Enzymaktivität, U L ⁻¹
$E(t)$	Verweilzeitspektrum, h ⁻¹
ε_{405}	Extinktionskoeffizient für p-Nitro-phenol bei 405 nm, 9,1 L mmol ⁻¹ cm ⁻¹
F	Volumenstrom, L h ⁻¹
F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, L h ⁻¹
F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, L h ⁻¹
F_{Gas}	Gasvolumenstrom, L min ⁻¹
F_{set}	Sollwert des Zulaufvolumenstrom, mL h ⁻¹
$F(t)$	Verweilzeitsummenkurve, -
θ	Normierte Verweilzeit, -
k	Geschwindigkeitskonstante, s ⁻¹
K_3	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, mol L ⁻¹
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante, - oder L mol ⁻¹
K_m	Michaelis-Konstante, mol L ⁻¹

Symbol	Beschreibung/Definition
k_L	Flüssigkeitsseitiger Stoffdurchgangskoeffizient, m s^{-1}
$k_L a$	Volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient, s^{-1}
K_p	Michaelis-Konstante für die Rückreaktion, mol L^{-1}
K_S	Affinitätskonstante des Substrats, g L^{-1}
m_i	Masse der Komponente i, g
m_P	Masse an Produkt, g
m_S	Substrataufnahmerate des Erhaltungsstoffwechsels, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
μ	Spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{max}	Maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{set}	Sollwert der spezifischen Wachstumsrate, h^{-1}
n	Anzahl der Reaktionsansätze, -
N	Anzahl der Kessel einer Reaktorkaskade, -
OTR	<i>Oxygen transfer rate</i> , Sauerstofftransferrate, $\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
OTR_{max}	Maximale Sauerstofftransferrate, $\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
OUR	<i>Oxygen uptake rate</i> , Sauerstoffaufnahmerate, $\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
P_V	Volumetrischer Leistungseintrag, W L^{-1}
q_P	Spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ oder $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_S	Spezifische Substrataufnahmerate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
r	Restfunktion, $\text{g}^2 \text{L}^{-2}$
R	Retention, %
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_P	Volumetrische Produktbildungsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_S	Volumetrische Substrataufnahmerate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_X	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
RZA_X	Raum-Zeit-Ausbeute für die Biomasse, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Symbol	Beschreibung/Definition
σ	Varianz der Verweilzeit, h
σ^2	Streuung der Verweilzeit um den Mittelwert, h ²
t	Zeit, h
\bar{t}	Mittelwert der Verweilzeitverteilung, h
T	Temperatur, °C
t_0	Zeitpunkt der Auftragung einer Markierungssubstanz, h
τ	Hydraulische Verweilzeit, h
τ_{ges}	Gesamtverweilzeit, h
τ_{set}	Sollwert der Verweilzeit, h
v	Reaktionsgeschwindigkeit, mol s ⁻¹
V	Volumen, mL oder L
V_A	Volumen Reaktionsansatz, mL
v_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mol s ⁻¹
$v_{max,r}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion, mol s ⁻¹
V_P	Volumen Probe, mL
V_R	Reaktionsvolumen, L
$V_{R,0}$	Initiales Reaktionsvolumen, L
$x - D$	Zellproduktivität, g L ⁻¹ h ⁻¹
$X(t)$	Umsatz zum Zeitpunkt t , %
Y_{PS}	Produktausbeute, g g ⁻¹
Y_{PX}	Produktanteil, g g ⁻¹
$Y(t)$	Ausbeute zum Zeitpunkt t , %
$Y_{XS,\mu}$	Biomasseertragskoeffizient, g g ⁻¹

Anhang

A1 Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden werden die verwendeten allgemeinen Geräte, Bestandteile von speziellen Messinstrumenten und Bioreaktoren sowie spezielle Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle A.1: Allgemeine Geräte.

Gerät	Hersteller
Analytische Waage Explorer 10 mg – 200 g	Ohaus, Gießen, Deutschland
Analytische Waage Explorer 5 g – 32 kg	Ohaus, Gießen, Deutschland
Analytische Waage Extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav Laboklav	SHP, Detzel Schloß, Deutschland
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Autoklav Varioklav Zyklondampf	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Autoklav 5075 ELV	Systec, Karlsruhe, Deutschland
Dispensette®III 2,5 – 25 mL	Brand, Wertheim, Deutschland
Drucksonde GDH 14 AN	Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Eismaschine AF80	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophorese-Kammer P8DS	Owl, Portsmouth, VA, USA
Elektrophorese-Stromquelle E 802	Consort, Fournhout, Belgien
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	GFL, Hamburg, Deutschland
Magnetrührgerät IKA-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Mehrkanalschlauchpumpe 205 U	Watson Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Mehrkanalschlauchpumpe Reglo ICC	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Mehrkanalschlauchpumpe MP8	DASGIP, Jülich, Deutschland
MTP-Photometer Genesis	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Tabelle A.1 Fortsetzung: Allgemeine Geräte.

Gerät	Hersteller
MTP-Photometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland
MTP-Schüttler Shaker PTS-2	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Heizblock Standard	Henry Troemner, Thorofare, NJ, USA
Inkubator innova® 44	New Brunswick, Edison, NJ, USA
Inkubator Multitron Standard	Infors, Bottmingen-Basel, Schweiz
Konnektivitätssonde INLAB 751-4MM	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Mehrfachrührplatz Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Midi-Gellaufapparatur MGU 402T	CBS Scientific, Del Mar, CA, USA
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, Deutschland
pH-Messgerät SevenMulti	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
pH-Messgerät Lab 870	Schott, Mainz, Deutschland
Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss, Deutschland
Plattformwaage DE60K1D 60kg	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Bottmingen-Basel, Schweiz
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank, Klasse 2	BDK, Sonnenbühl, Deutschland
Sicherheitswerkbank UVF 6.15 S, Klasse1	Weiss Pharmatechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Sicherheitswerkbank SWB, Klasse 1	Waldner, Wangen, Deutschland
Sicherheitswerkbank 85611, Klasse 1	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle A.1 Fortsetzung: Allgemeine Geräte.

Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Ultraschallgerät Sonotrode MS 73	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultrasonic Cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	Edwards, Sussex, England
Vortex Genie 2	Scientific Industries, München, Deutschland

Tabelle A.2: *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage und verwendete Säule.

Komponente	Hersteller
GradiFrac FPLC-Einheit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisTrap FF crude Säule 5 mL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IV-7 Ventil	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pumpe P50	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UV-Spectrophotometer LKB Uvicord S II 280 nm Filter	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

Tabelle A.3: *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Anlage und verwendete Säulen.

Komponente	Hersteller
HPLC 1100 Series	Agilent, Böblingen, Deutschland
HPLC-Säulenofen Mistral	Spark Holland, Emmen, Niederlande
HPLC-Vorsäule Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio-Rad, München Deutschland
HPLC-Säule Aminex HPX-87H	Bio-Rad, München, Deutschland

Tabelle A.4: Gaschromatograph und verwendete Säulen.

Komponente	Hersteller
Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt, Deutschland
Injektor 1079 PTV	Varian, Darmstadt, Deutschland
Splitregelung	Varian, Darmstadt, Deutschland
FID-Detektor	Varian, Darmstadt, Deutschland
Software Star Version 5.51	Varian, Darmstadt, Deutschland
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Trennsäule OPTIMA® WAXplus (Innendurchmesser 300 mm x 0,25 mm)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Helium 99,999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld, Deutschland
Wasserstoff 99,999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld, Deutschland
Synthetische Luft	Hausleitung

Tabelle A.5: Komponenten, Verbrauchsmaterialien und Software des bioREACTOR 48.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorblock	bioREACTOR 48	2mag, München, Deutschland
Steuergerät	k.A.	2mag, München, Deutschland
Optische Sensorriegel für pH- und pO ₂ -Messung	MCR 8pH- 8oxygen	PreSens, Regensburg, Deutschland
Einwegbioreaktoren	k.A.	2mag, München, Deutschland
Laborroboter mit Pipettier- und Roboterarm	Genesis RSP 150	Tecan, Crailsheim, Deutschland
MTP-Photometer	Fluostar Galaxy	BMG, Ortenberg, Deutschland
MTP-Waschstation	Columbus Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Gasmischstation	Brooks 0254	Brooks, Dresden, Deutschland
Wasserbad Reaktortemperaturierung	Haake W 15	PSL, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Wasserbad Kopfraumkühlung	Durchlaufkühler	Fry ka-Kältetechnik, Esslingen, Deutschland
Zuluftfilter	Midisart 2000	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Reinigungsflüssigkeit	Set Up Clean	LVL, Crailsheim, Deutschland
Software für MTP-Photometer	Fluostar 4.31	BMG, Ortenberg, Deutschland
Software für Laborroboter	Gemini V4.2.17.304	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Software für Prozesssteuerung	Fedbatch-XP 1.0.248	DASGIP, Jülich, Deutschland
Software für automatisierte Benutzereingaben	Autolt	Freeware von Jonathan Bennett

Tabelle A.6: Komponenten und Software des parallelen Reaktorsystems von DASGIP.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Steuerungseinheit mit Reaktortemperierung und Abluftkühlung	CWD 4	DASGIP, Jülich, Deutschland
4 x 1,5 L-Rührkesselreaktor mit zwei Seitenarmen, oben eintauchender Rührwelle und zwei 6-Blatt-Scheibenrührern	SR07000DLS	DASGIP, Jülich Deutschland
4 x Gasmischstation	MX4/4	DASGIP, Jülich Deutschland
2 x Mehrkanalschlauchpumpe	MP8	DASGIP, Jülich Deutschland
Sensoreinheit	PH4PO4	DASGIP, Jülich Deutschland
4 x Abgasanalytik	EL2030+SCC-F	ABB, Mannheim, Deutschland
Rührer- und Temperaturregelungseinheit	TC4SC4	DASGIP, Jülich Deutschland
4 x pO ₂ -Elektrode	Visiform D12mm, L225mm	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
4 x pH-Elektrode	405 DPAS SC-K8S/225	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
4 x Temperatursensor	Pt100/0	DASGIP, Jülich Deutschland
4 x Antischaumsonde	Level Sensor OD 4mm, L275 mm, Li 235 mm	DASGIP, Jülich Deutschland
4 x Rührerantrieb	RE40, Maxon Motor	DASGIP, Jülich Deutschland
8 x Luftfilter	Midisart 2000	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Software	DASGIP Control V4.5	DASGIP, Jülich Deutschland
Analysenwaage	XA204 Delta Range	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland

Tabelle A.7: Komponenten und Software des Laborrührkesselreaktors Labfors.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
7,5 L-Glaskessel mit Doppelmantel, oben eintauchender Rührwelle, drei 6-Blatt-Scheibenrührern, Antischaumsonde, Begasungsrohr und Abluftkühlung	Labfors 2	Infors, Bottmingen, Schweiz
Laborsteuerungseinheit mit Rührer, Temperaturfühler und Massendurchflussregler	Labfors, 103746	Infors, Bottmingen, Schweiz
Prozesssteuerungssoftware	Iris V5.34.807.0997	Infors, Bottmingen, Schweiz
pH-Elektrode	405 DPAS-SC- K85/425	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
pO ₂ -Elektrode	InPro 6800	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Reaktorwaage	QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zulaufmedienwaage	IP65 Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schlauchpumpe	BVP easyloadII, Mas-terflex L/S, 77201-60	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Abgasanalytik	Easy Line + Advance SCC-F	ABB, Mannheim, Deutschland

Tabelle A.8: Komponenten und Software des Rührkesselreaktors LP75 im Laborpilot-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
75 L-Edelstahlkessel mit Doppelmantel, unten eintauchender Rührwelle, zwei 6-Blatt- Scheibenrührern, Antischaumsonde, Ringbrause und Abluftkühlung	LP75	Bioengineering, Wald, Schweiz
Laborsteuerungseinheit mit Rührmotor, Temperaturfühler und Massendurchflussregler	IFM	Bioengineering, Wald, Schweiz
Prozesssteuerungssoftware	BioScada Lab	Bioengineering, Wald, Schweiz
pH-Elektrode	405-DPAS-SC- K89/120	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
pO ₂ -Elektrode	InPro [®] 6800	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Schlauchpumpe	Peripex W1	Bioengineering, Wald, Schweiz
Abgasanalytik	BCP-X-large	BlueSens, Herten, Deutschland

Tabelle A.9: Komponenten und Software des Rührkesselreaktors P1500 im Pilot-Maßstab.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
1 500 L-Edelstahlkessel mit Doppelmantel, unten eintauchender Rührwelle, drei 6-Blatt-Scheibenrührern, Antischaumsonde, Ringbrause und Abluftkühlung	P1500	Bioengineering, Wald, Schweiz
Laborsteuerungseinheit mit Rührmotor, Temperaturfühler und Massendurchflussregler	IFM	Bioengineering, Wald, Schweiz
Prozesssteuerungssoftware	BioScada Lab	Bioengineering, Wald, Schweiz
pH-Elektrode	405-DPAS-SC- K89/120	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
pO ₂ -Elektrode	InPro [®] 6800	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Schlauchpumpe	Pumpdrive 5206	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Abgasanalytik	BCP-X-large	BlueSens, Herten, Deutschland

Abgesehen von üblichen Verbrauchsmaterialien, wie zum Beispiel Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäßen, wurde im Folgenden dargestelltes spezielles Verbrauchsmaterial verwendet.

Tabelle A.10: Spezielles Verbrauchsmaterial.

Material	Hersteller
Dialyseschlauch ZelluTrans MWCO: 12-14 kDa	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pumpschläuche PharMed BPT 2,21/0,51 mm	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Pumpschläuche Marprene 0,25-4,8 mm Innendurchmesser	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Pumpschläuche SIK8363 Silikon 0,5/0,25 mm	IDEX, Wertheim, Deutschland
Schlauchverbinder 0,63/0,30 x 15 mm	IDEX, Wertheim, Deutschland
Schlauchverbinder 0,90/0,50 x 15 mm	IDEX, Wertheim, Deutschland
Turbocoll 2000 putty Kleber	Boldt, Wermelskirchen, Deutschland
UHU® Plus Sofortfest Kleber	UHU, Bühl, Deutschland
Vivapin® Turbo 4 Größenausschlussgrenze 10 kDa	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Winkelrohre 0,50/0,25 x 101,9 mm, Werkstoff AISI316 L	Unimed, Lausanne, Schweiz
Winkelrohre 0,50/0,25 x 111,9 mm, Werkstoff AISI316 L	Unimed, Lausanne, Schweiz

A2 Chemikalien

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle A.11: Allgemeine Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit, %	Hersteller
Acrylamid/bisacrylamid (19:1)	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEE0	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniak	25	Honeywell, Morristown, NJ, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	≥ 98,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	≥ 99,0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Antifoam 204	k.A.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Biotin	≥ 99,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	≥ 99,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	≥ 99,8	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	k.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumsulfat-Dihydrat	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure	≥ 99,5	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Cobalt-(II)-chlorid-hexahydrat	≥ 98,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau G250	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Ammoniumhydrogenphosphat	≥ 97,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Kaliumsulfat	≥ 99,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose-monohydrat	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisen-(III)-citrat	k.A.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eisensulfat-dihydrat	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	70,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle A.11 Fortsetzung: Allgemeine Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit, %	Hersteller
Glycerin	≥ 98,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Imidazol	k.A.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	≥ 99,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	k.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	≥ 85,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumiodid	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kupfer-(II)-chlorid-dihydrat	≥ 99,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfer-(II)-sulfat-pentahydrat	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-heptahydrat	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mangan-(II)-chlorid-tetrahydrat	k.A.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 85,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-EDTA	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	k.A.	Avantor, Center Valley, PA, USA
Natriummolybdat-dihydrat	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat	k.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	85,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Nitro-phenol Butyrat	≥ 98,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pepton aus Casein	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	≥ 98,5	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propanol	≥ 99,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle A.11 Fortsetzung: Allgemeine Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit, %	Hersteller
Pufferlösungen	k.A.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	32,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	30,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	≥ 99,0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	k.A.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zeocin	k.A.	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zinkacetat-dihydrat	≥ 99,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zinkchlorid	≥ 99,0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

A3 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

Im Folgenden werden alle für die Klonierung von PAmCherry verwendeten Enzyme und Oligonukleotide aufgelistet.

Tabelle A.12: Für Klonierung von PAmCherry verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
PHUSION™ HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Restriktionsenzym EcoRI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Tabelle A.13: Für Klonierung und Sequenzierung von PAmCherry verwendete Oligonukleotide.

Interne Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Fw-PAmCherry-histag	GATACAGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGA
Rv-PAmCherry-histag	CATGGACGAGCTGTACAAGCTCGAGGATACA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

A4 Standards und Tests

Im Folgenden werden die für molekularbiologische, proteinbiochemische und analytische Zwecke verwendeten Standards und Tests aufgelistet.

Tabelle A.14: Standards und Tests.

Standard/Kit	Hersteller
100 kb DNS-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Desoxynukleotid-Mix	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pierce Bicinchonin-Säure Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Roti®-Gel Stain	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mark Standard	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Transform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese®-SDS-PAGE-Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
UV-Test Essigsäure (Acetat) 10148261035	r-biopharm, Darmstadt, Deutschland
UV-Test Ammonium 11112732035	r-biopharm, Darmstadt, Deutschland
UV-Test D-Glucose 10716251035	r-biopharm, Darmstadt, Deutschland

A5 Medien und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung sämtlicher für Bioprozesse und enzymatische Umsetzungen sowie molekularbiologische, proteinbiochemische und analytische Zwecke verwendeten Medien und Lösungen dargestellt. Alle Medien und Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser angesetzt. Die bei Bioprocessen und enzymatischen Umsetzungen eingesetzten Medien und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Falls die Komponenten nicht thermostabil waren, wurde die Sterilität mittels Filtration durch einen Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser gewährleistet. Der gewünschte pH wurde je nach Bedarf mit Verdünnungen von Phosphorsäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Kaliumhydroxid, Natriumhydroxid oder Ammoniak eingestellt.

Medien und Lösungen für Bioprozesse mit *E. coli*

Tabelle A.15: *Lysogeny broth* (LB, pH 7,0) und *Terrific broth* (TB, pH 7,2) Medium.

Komponente	Konzentration LB, g L ⁻¹	Konzentration TB, g L ⁻¹
Pepton	10,00	12,00
Hefeextrakt	5,00	24,00
Natriumchlorid	5,00	-
Glycerin	-	5,04
Kaliumdihydrogenphosphat	-	2,13
Di-kaliumhydrogenphosphat	-	12,54

Für die Herstellung von LB Agar-Platten wurden 15 g L⁻¹ Agar-Agar zu LB Grundlösung gegeben. Zudem wurde der Selektionsmarker Kanamycin (30 mg L⁻¹) zugesetzt.

Das im Folgende beschriebene definierte Mineralmedium wurde nach Riesenberg et al. (1991) mit folgenden Modifikationen hergestellt: Der verwendete Stamm benötigt kein Thiamin. Die Glucose-Konzentration wurde jedem Bioprozess angepasst. Kanamycin (30 mg L⁻¹) diente als Selektionsmarker.

Tabelle A.16: Definiertes Mineralmedium nach Riesenberg et al. (1971) mit pH 7,0.

Komponente	Endkonzentration, g L ⁻¹
Grundkomponenten	
Kaliumdihydrogenphosphat	13,3
di-Ammoniumhydrogenphosphat	4,0
Citronensäure	1,7
Zusätze als Stocklösung nach Autoklavieren zugegeben	
Magnesiumsulfat-heptahydrat (250 g L ⁻¹)	1,2
Antifoam 204	1,0
D-Glucose-monohydrat (550 g L ⁻¹)	variabel
Spurenelemente als Stocklösung (1:100) nach Autoklavieren zugegeben	
Borsäure	$3,0 \cdot 10^{-3}$
Cobalt-(II)-chlorid	$2,5 \cdot 10^{-3}$
EDTA	$8,4 \cdot 10^{-4}$
Eisen-(III)-citrat	$6,0 \cdot 10^{-2}$
Kupfer-(II)-chlorid	$1,5 \cdot 10^{-3}$
Mangan-(II)-chlorid	$1,5 \cdot 10^{-2}$
Natriummolybdat	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Zinkacetat	$8,0 \cdot 10^{-3}$

Für Bioprozesse mit *E. coli* im Zulauf- und kontinuierlichen Betrieb wurden folgende Zulaufmedien verwendet.

Tabelle A.17: Zulaufmedien für Bioprozesse mit *E. coli*.

Anwendung	Medium	Glucose, g L ⁻¹
Fließgleichgewichtsuntersuchung	Definiertes Mineralmedium	25,0
Kontinuierliche Reaktorkaskade	Definiertes Mineralmedium	25,0
Bioprozesse im Zulaufbetrieb	Glucoselösung mit 12,5 g L ⁻¹ MgSO ₄	500,0

Medien und Lösungen für Bioprozesse mit *K. pastoris*

Das in Tabelle A.18 beschriebene YP Medium wurde bei Bedarf mit dem Selektionsmarker Zeocin (100 mg L^{-1}) und variabler Glycerinkonzentration versetzt.

Tabelle A.18: YP Medium mit pH 6,0.

Komponente	Konzentration, g L^{-1}
Pepton	20,0
Hefeextrakt	10,0

Für die Herstellung von YP Agar-Platten wurden 20 g L^{-1} Agar-Agar zu YP Grundlösung gegeben. Zudem wurde der Selektionsmarker Zeocin (100 mg L^{-1}) zugesetzt.

Dem in Tabelle A.19 dargestellten BSM Medium wurden für Bioprozesse mit *K. pastoris* DSM70382 20 g L⁻¹ und für Bioprozesse mit *P. pastoris* CaL-B2 30 g L⁻¹ Glycerin zugegeben.

Tabelle A.19: Basales Salz Medium (BSM) mit pH 6,3 beziehungsweise pH 6,5.

Komponente	Endkonzentration, g L ⁻¹
Grundkomponenten	
Calciumsulfat-Dihydrat	0,9
Di-Kaliumsulfat	18,2
Kaliumhydroxid	4,1
Phosphorsäure	Zugabe bis pH-Sollwert erreicht
Magnesiumsulfat-heptahydrat	14,9
Zusätze als Stocklösung nach Autoklavieren zugegeben	
Antifoam 204	1,0
Glycerin (500 g L ⁻¹)	variabel
PTM1-Spurenelemente als Stocklösung (1:233) nach Autoklavieren zugegeben	
Kupfersulfat-pentahydrat	$2,6 \cdot 10^{-2}$
Kaliumiodid	$3,8 \cdot 10^{-4}$
Mangan-(II)-sulfat-monohydrat	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Natriummolybdat-dihydrat	$8,6 \cdot 10^{-4}$
Borsäure	$8,6 \cdot 10^{-5}$
Cobalt-(II)-chlorid-hexahydrat	$2,2 \cdot 10^{-3}$
Zinkchlorid	$8,6 \cdot 10^{-2}$
Eisen-(II)-sulfat-dihydrat	$2,8 \cdot 10^{-1}$
Biotin	$8,6 \cdot 10^{-4}$
Schwefelsäure	$4,0 \cdot 10^{-2}$

Für Zulaufkultivierungen mit *K. pastoris* wurden als Zulaufmedien zum einen eine Glycerinlösung (500 g L⁻¹) mit 12 mL L⁻¹ PTM1-Spurenelementen und zum anderen eine reines Methanol (≥ 99,5 %) verwendet.

Medien und Lösungen für molekularbiologische Anwendungen

Als Grundlage für das NZY⁺ Medium diene LB Medium (siehe Tabelle A.15), dem folgende Zusätze zugegeben wurden.

Tabelle A.20: Zusätze für NZY⁺ Medium, pH 7,0.

Komponente	Konzentration, M	Zugabe, mL L⁻¹
Magnesiumchlorid	1,0	12,5
Magnesiumsulfat	1,0	12,5
D-Glucose	2,0	10,0

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der Gele und Puffer für die Herstellung von Agarosegelen dargestellt.

Tabelle A.21: Zusammensetzung des Agarosegels.

Komponente	Konzentration, % (w/v)
Agarose	1,000
Roti [®] -GelStain	0,005
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	98,995

Tabelle A.22: Zusammensetzung des 6x Ladepuffers.

Komponente	Konzentration, % (w/v)
Bromphenolblau	0,25
Saccharose	40,00

Medien und Lösungen für proteinbiochemische Anwendungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der Gele und Puffer für die SDS-PAGE und die Coomassie-Färbung dargestellt.

Tabelle A.23: Zusammensetzung von Sammel- (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) in H₂O bidest.

Komponente	Sammelgel	Trenngel
SDS	0,2 % (w/v)	0,2 % (w/v)
Tris/HCl	0,125 M	0,375 M
Acrylamid/bis-Acrylamid	5,0 % (w/v)	12,5 % (w/v)
Temed	2,0 ‰ (v/v)	1,0 ‰ (v/v)
APS	20,0 ‰ (v/v)	10,0 ‰ (v/v)

Tabelle A.24: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Puffers (pH 6,8).

Komponente	Konzentration
Tris/HCl	300,00 mM
Glycerin	50,00 % (w/v)
SDS	10,00 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5,00 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (v/v)

Tabelle A.25: Zusammensetzung der Fairbanks-Puffer A, B und C.

Komponente	A	B	C
Isopropanol	25,000 % (v/v)	10,000 % (v/v)	-
Tris/HCl	10,000 % (v/v)	10,000 % (v/v)	10,000 % (v/v)
Coomassie Brillantblau	0,050 % (w/v)	0,005 % (w/v)	-

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der Puffer für die Aufreinigung von Proteinen mittels IMAC dargestellt.

Tabelle A.26: Zusammensetzung von Binde- und Elutionspuffer für die Aufreinigung von Proteinen mittels IMAC.

Komponente	IMAC-Bindepuffer	IMAC-Elutionspuffer
Natriumphosphat	20 mM	20 mM
Natriumchlorid	500 mM	500 mM
Imidazol	40 mM	500 mM

Medien und Lösungen für analytische Anwendungen

Tabelle A.27: Zusammensetzung der *phosphate buffered saline* (PBS) mit pH 7,4.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,42
Kaliumdihydrogenphosphat	0,27
Kaliumchlorid	0,20
Natriumchlorid	8,00

Tabelle A.28: Zusammensetzung der Lipase-Phosphat-Puffers mit pH 7,0 für die Aktivitätsbestimmung von CaL-B2.

Komponente	Konzentration
Natriumdihydrogenphosphat	25 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	25 mM
Natriumchlorid	150 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)
2-Propanol	5,0 % (v/v)

Für die Bestimmung der Aktivität der Lipase CaL-B2 wurden zur Herstellung einer Substratlösung 20 mM *p*-Nitro-phenol Butyrat in 2-Propanol gelöst.