

Charakterisierung der zellbezogenen Enzymproduktion
prokaryontischer Systeme
innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Michael G. Büring,
geboren am 08.03.1974 in Meppen.

Hannover, im Mai 2009

Referent Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Drittprüfer Prof. Dr. Karl Friehs
Lehrstuhl für Fermentationstechnik
Universität Bielefeld

Tag der Promotion: 22. Mai 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe.

Hannover, im Mai 2009

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VII
Kurzbeschreibung	1
Abstract	2
1 Einleitung und Aufgabenstellung	3
2 Theoretisches	4
2.1 Fermenterkombination	4
2.2 Medien zur Kultivierung	7
2.3 Photo- und Fluoreszenzspektrometrie	11
2.3.1 BioView-Sensor	11
2.3.2 Enzym-Analytik	14
2.3.3 Ermittlung der Verweilzeit	19
2.4 Spezifikationen der verwendeten Stämme	21
2.4.1 <i>E. coli</i> 5K pHM12	21
2.4.2 <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	22
2.4.3 <i>B. megaterium</i> pMM 1525	23
2.5 Experimentelle Schwerpunkte	27
3 Experimentelles	29
3.1 Vorversuche	29
3.1.1 Medienkompatibilität	29
3.1.2 Verweilzeitverhalten der Fermenterkombination	31
3.1.3 Zellaufschluss	35
3.2 <i>E. coli</i> 5K pHM12 in der Fermenterkombination	40
3.2.1 Wachstum von <i>E. coli</i> 5K pHM12 in CgXII im 10 l-Maßstab	42
3.2.2 Entwicklung der Penicillin G-Amidase-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur in Komplexmedium	43
3.2.3 Entwicklung der Penicillin G-Amidase-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur in CgXII	49
3.2.4 Fazit der Versuchsreihe mit <i>E. coli</i> 5K pHM12	56
3.3 <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702 in der Fermenterkombination	58
3.3.1 Vorabüberlegungen	58
3.3.2 Schüttelkolbenversuche zur Inhibierung der Wachstumsrate	59
3.3.3 Entwicklung der pNBE-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur	60
3.3.4 Enzym-Aktivitäten während der Induktion in unterschiedlichen Wachstumsphasen	64

3.3.5	Einfluss des Zufütterungsbetriebs in der stationären Phase auf den Verlauf der Enzym-Aktivität	68
3.3.6	Fazit der Versuchsreihe mit <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	71
3.4	<i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination	74
3.4.1	Vorversuche im Schüttelkolben	74
3.4.2	<i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination mit CgXII-Medium	81
3.4.3	<i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination mit LB-Medium	89
3.4.4	Fazit der Versuchsreihe mit <i>B. megaterium</i> pMM 1525	93
4	Zusammenfassung und Ausblick	96
A	Anhang	99
A.1	Methodisches	99
A.1.1	Gefrierkulturen	99
A.1.2	Submersschüttelkulturen	99
A.1.3	Fermenterkultivierungen	99
A.1.4	Sterilisation	101
A.1.5	Messung der Optischen Dichte	101
A.1.6	Bestimmung der Glucose-Konzentration	102
A.1.7	Zellaufschluss	102
A.1.8	Photometrische Bestimmung des Enzymgehalts	103
A.2	Materielles	105
A.2.1	Geräte	105
A.2.2	Reagenzien	105
A.3	Foto des Versuchsaufbaus	108
A.4	Restriktionskarte von pJOE2702	108
	Literatur- und Quellenverzeichnis	109
	Curriculum vitae	112
	Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

2.1	Wachstumsverlauf einer Kultur unter limitierten Bedingungen	4
2.2	Schematische Darstellung der Fermenterkombination	6
2.3	BioView-Diagramme einer Kultivierung von <i>E. coli</i> 5K pHM12 bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase	9
2.4	Wachstumscharakteristika unterschiedlicher Stämme von <i>Corynebacte-</i> <i>rium glutamicum</i> in CgXII	10
2.5	Substrate für die Bestimmung der Enzymaktivität von Penicil- lin G-Amidase	16
2.6	Enzymatische Amidspaltung verschiedener Substrate durch Penicil- lin G-Amidase	17
2.7	Reaktionsmechanismus der Spaltung von <i>para</i> -Nitrophenylacetat durch <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase	17
2.8	Bestimmung der enzymatisch gebildeten D-Glucose mittels DNS	18
2.9	Skizze zum Versuchsablauf der Verweilzeitbestimmung	19
2.10	Vergleich von Modelldaten und Messwerten bei der Bestimmung der mittleren Verweilzeit.	20
2.11	Reaktionsmechanismus von Penicillin G-Amidase	21
2.12	Restriktionskarte des Plasmids pMM1525	24
2.13	Abbau von Saccharose durch Levansucrase	25
2.14	Genetische Organisation und Regulation des Xylose-Operons in <i>Bacil-</i> <i>lus megaterium</i>	26
3.1	Wachstumsverlauf der drei verwendeten Bakterienstämme im modifi- zierten CgXII-Medium	30
3.2	Kalibration des Messsignals in Abhängigkeit zu der eingesetzten Tra- cer-Konzentration im Verweilzeit-Experiment	32
3.3	Riboflavinsignale in Abhängigkeit von der Pumprate der Fermenter- kombination	32
3.4	Mittlere Verweilzeiten sowohl mit als auch ohne Begasung	33
3.5	Timedrive-Messungen zur Ermittlung der Schwankungsbreite des Mess- signals für die Bestimmung der OD	35
3.6	Fehlerquelle Photometer: Detektionsgrenze	37
3.7	Dreifachbestimmung beim NIBAB-Test vor und nach Veränderung der Zellaufschluss-Parameter	39
3.8	Ergebnis der Variation zeitlicher Aufschluss-Parameter	39
3.9	Flussdiagramm eines Einzelexperiments in der Fermenterkombination .	41
3.10	Wachstum von <i>E. coli</i> 5K pHM12 im 10 l-Fermenter in CgXII	42

3.11	Zeitlicher Verlauf der OD innerhalb einer Kultivierung mit LB-Medium in der Fermenterkombination	45
3.12	Verhältnis der gemessenen Optischen Dichte von Versuchsfermenter zu Hauptkultur.	45
3.13	Enzymkonzentrationen der Hauptkultur in der Fermenterkombination mit LB-Medium	46
3.14	Verlauf der Enzymkonzentration im Vergleich zum Verlauf der Abgaswerte bei der Kultivierung von <i>E. coli</i> 5K pHM12 in LB-Medium . . .	47
3.15	Vergleich der gemessenen Penicillin G-Amidase-Aktivitäten von Hauptkultur und Versuchsfermenter.	48
3.16	Verhältnis der gemessenen Enzym-Aktivitäten von Versuchsfermenter zu Hauptkultur.	48
3.17	Beispiel für eine online-Messung des Penicillin G-Amidase-Gehalts . . .	50
3.18	Entwicklung der Biomasse und des Zielproteins in CgXII	51
3.19	Verlauf von FAD, NADH und Proteinen in CgXII	51
3.20	Vermuteter Verlauf von OD und Glucose der CgXII-Kultur	52
3.21	Vergleich von NIPAB- und PMC-Daten	53
3.22	Vergleich der spezifischen Enzym-Aktivität der NIPAB- und PMC-Messungen	53
3.23	Direkter Vergleich von absoluter mit spezifischer Enzym-Aktivität . . .	54
3.24	Differenz zwischen online- und offline-Werten in Prozent	55
3.25	Wachstumsversuch <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702 in CgXII mit unterschiedlichen Antibiotika-Konzentrationen	60
3.26	Verlauf von OD, CO ₂ und Enzym-Aktivität in der Fermenterkombination mit <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	61
3.27	Wachstum, Substratverbrauch und spezifische Enzym-Aktivität in der Fermenterkombination	62
3.28	Verlauf der pNBE-Aktivitäten im Versuchsfermenter nach zweistündiger Induktion	63
3.29	Vergleich der OD des Versuchsfermenters mit der OD der Hauptkultur einer batch-Kultur von <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	64
3.30	Verlauf von ODs, Substratkonzentration und <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität einer batch-Kultur von <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	65
3.31	BioView-Daten der batch-Kultur von <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	66
3.32	BioView-Daten einer Induktionsmessung im Versuchsfermenter	67
3.33	Säulendiagramm der Produktentwicklung innerhalb der einzelnen Induktionsphasen	68

3.34	ODs und Enzymaktivitäten von vier Induktions-Experimenten einer batch-Kultur von <i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	69
3.35	Säulendiagramm der Entwicklung von <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase mit und ohne Glucose-Feed	70
3.36	Spezifische <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten mit und ohne Glucose-Feed	71
3.37	Wachstum und Substratverbrauch von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 im Schüttelkolben	75
3.38	Vergleich von Levansucrase-Aktivität-Werten im Schüttelkolben	76
3.39	Wachstum von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 in CgXII mit alternativer Medienkomposition	77
3.40	Wachstum und Levansucrase-Ausbeute in CgXII mit Glycerin	79
3.41	Variation der Induktorkonzentration im Schüttelkolben mit <i>B. megaterium</i> pMM 1525	80
3.42	Kultivierung von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination bei 28 °C	82
3.43	Wachstum und Substratverbrauch in Abhängigkeit von der Antibiotika-Konzentration	83
3.44	Levansucrase-Konzentrationen in der Fermenterkombination bei unterschiedlichem Selektionsdruck	84
3.45	BioView-Daten des Selektionsdruck-Experiments mit <i>B. megaterium</i> pMM 1525	84
3.46	Kulturfluoreszenz im Bezug zur Entwicklung der LSA	85
3.47	Verlauf des Gelöstsauerstoffs während der Induktion im Versuchsfermenter	86
3.48	Wachstumsphasen-bezogene Messung der LSA-Ausbeute bei einer Induktorkonzentration von 0,2 %	88
3.49	Wachstumsphasen-bezogene Messung der LSA-Ausbeute bei einer Induktorkonzentration von 1,0 %	88
3.50	Wachstumsverläufe von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination unter Verwendung von LB-Medium	90
3.51	LSA-Werte von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination unter Verwendung von LB-Medium bei 30 °C	91
3.52	LSA-Werte von <i>B. megaterium</i> pMM 1525 in der Fermenterkombination unter Verwendung von LB-Medium bei 37 °C	91
A.1	Versuchsaufbau	108
A.2	Restriktionskarte des Plasmids pJOE2702	108

Tabellenverzeichnis

2.1	Störfaktoren bei Fluoreszenzmessungen	13
2.2	Gemessene biogene Fluorophore	14
2.3	Kultivierungs-Schwerpunkte der einzelnen Stämme	28
3.1	Enzymausbeute in Abhängigkeit unterschiedlicher Aufschlussparameter	40

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika / Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AqBidest	zweifach entsalztes Wasser
Amp	Ampicillin
aq.	wässrig
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BTM	Biotrockenmasse
CgXII	Synthetisches Medium nach Keilhauer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
$x \cdot g$	x fache Erdbeschleunigung
em [n] nm	Emissionswellenlänge (Fluoreszenzspektroskopie) bei [n] Nanometer
EtOH	Ethanol
ex [n] nm	Anregungswellenlänge (Fluoreszenzspektroskopie) bei [n] Nanometer
h	Stunde(n)
HK	Hauptkultur (Kultivierung im 10 l Fermenter)
$i_{(n)}$	Induktionszeitpunkt bei n Minuten
IFTC	Institut für Technische Chemie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LSA	Levansucrase-Aktivität
M	molar
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ml*	Milliliter multipliziert mit dem dimensionslosen Wert für die Optische Dichte (ml \cdot OD) als Volumeneinheit für die <i>spezifische</i> Enzymaktivität
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (als Puffer)

mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NIPAB	6-Nitro-3-phenylacetamidbenzoesäure
NPP	Natriumphosphatpuffer (hier grundsätzlich: 50 mM, pH 7,5)
OD (bzw. ODs)	Optische Dichte (bzw. Optische Dichten); hier: bei 580 nm
PBS	Phosphate buffered saline
PMC	7-Phenylacetyl-4-methylcoumarinylamid
pNBE	<i>para</i> -Nitrobenzylesterase
pNPA	<i>para</i> -Nitrophenylacetat
rel. AU	relative Absorptionseinheiten (Verhältnis zwischen Extinktion der Probe und der Referenz)
RFI	relative Fluoreszenz-Intensität
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SL	Stammlösung; Lösung erhöhter Konzentration (bis 1000fach)
Tet	Tetracyclin
$t_K(x)$	Zeitpunkt der Kultivierung [(x)Stunden]
VE-Wasser	voll entsalztes („destilliertes“) Wasser
VF	Versuchsfermenter (0,5 l-Fermenter)
VK	Vorkultur
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben werden SI-Einheiten verwendet, sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

Kurzbeschreibung

Im Bereich biotechnologischer Produktionsprozesse sind wichtige Einflussgrößen auf die Produktbildung rekombinanter Organismen neben systemischen Faktoren auch im Bereich der Genetik dieser Organismen zu finden.

Da die Ausbeute von der Gesamtheit aller Faktoren abhängt, ist es für die Entwicklung eines neuen Organismus notwendig, in der Praxis herauszufinden, unter welchen Bedingungen eine Kultivierung ihr Effizienzmaximum erreicht. Da hierzu wegen der scale-up-Problematik im Technikums-Maßstab gearbeitet werden sollte, aber andererseits auch ein kosteneffizientes Screening notwendig ist, ist es sinnvoll, ein Fermentationssystem zu entwickeln, welches beiden Anforderungen gerecht werden kann und zudem die Möglichkeit bietet, Messungen innerhalb einer batch-Phase an einer einzigen Kultur durchzuführen.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Kombination eines ausschließlich zu Kultivierungszwecken herangezogenen 10 l-Fermenters mit einem temporär zuschaltbaren 0,5 l-Versuchsfermenter zeigte sehr gute Ergebnisse im Hinblick auf eine wachstumsphasenbezogene Beobachtung der Entwicklung rekombinanter Proteine sowohl im batch- als auch im fed-batch-Betrieb.

Zur Überprüfung prozesstechnischer Eigenschaften des Setups wurden zwei rekombinante Bakterienstämme, *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702 verwendet. Die Produktbildung wurde sowohl in offline durchgeführten photometrischen Verfahren als auch online mithilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie (BioView) verfolgt.

Darauf aufbauend wurde die Fermenterkombination dazu genutzt, eine Prozessoptimierung anhand des rekombinanten Bakterienstammes *B. megaterium* pMM 1525 durchzuführen. Hierbei wurden schwerpunktmäßig die Aspekte Induktorkonzentration, Selektionsdruck und Kultivierungstemperatur variiert – und dies in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt innerhalb der batch-Kultur. Anhand der Untersuchungen konnten im Bereich der unterschiedlichen Parameter Hierarchien und verlässliche Prognosen aufgestellt werden, um die Produktausbeute zu verbessern.

Stichworte:

Bioreaktorkombination, Wachstumsphase, rekombinante Proteine

Abstract

The yield of recombinant protein in biotechnological processes is determined by a combination of systemic factors and the genetics of the producing organism. Therefore, optimizing a fermentation process for a novel strain requires an investigation of the conditions under which maximum process efficiency is achieved.

For this purpose it is necessary to develop a fermentation system, which not only addresses scale-up challenges on the pilot-fermentation scale, but also provides an opportunity for cost-efficient screening of process parameters. In addition to adequately meeting these requirements, the fermentation system should offer the possibility of performing measurements within a batch-phase on one single culture.

This thesis presents a synergetic combination of bioreactors that consists of a 10-L reactor exclusively used for fermentation purposes and a 0.5-L test-reactor. Using this system, very good results were obtained in the process monitoring of the growth-phase related production of recombinant protein in batch as well as in fed-batch mode.

For an assessment of the process parameters of the experimental setup, two recombinant bacterial strains *E. coli* 5K pHM12 and *E. coli* K12 pJOE 2702 were used. The product formation was analyzed both offline by photometric methods, and online by 2D-fluorescence spectroscopy (BioView).

Subsequently, the bioreactor combination was employed for optimization of a fermentation process of the recombinant bacterial strain *B. megaterium* pMM 1525. The focus of this investigation was the variation of parameters such as elicitor concentration, selection pressure and fermentation temperature in dependence of the induction point within the batch culture. Based on these experiments, a hierarchy of process parameters was established and successfully implemented to deliver reliable forecasts for product yield improvement.

Key words

bioreactor combination, growth phase, recombinant proteins

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Einsatz biologischer Prozesse im Rahmen technischer Verfahren ist seit mehreren Jahrhunderten eine Möglichkeit zur Gewinnung organisch chemischer Verbindungen. Seit der Entdeckung der Antibiotika gewinnt diese Sparte global zunehmend einen immer höheren marktwirtschaftlichen Anteil im Bereich industrieller Produktionen. Die verwendeten Mikroorganismen werden dazu in Fermentationsanlagen im großen Maßstab kultiviert und die Produktionsmedien werden anschließend bioprozesstechnisch aufgearbeitet.

Innerhalb einer Satzkultur durchläuft eine Population typische Wachstumsphasen, innerhalb derer das jeweilige Zielprotein in unterschiedlichen Mengen produziert wird. Eine Notwendigkeit der Optimierung derartiger Wachstumsprozesse ist das Definieren eines effizienten Erntezeitpunkts, bei welchem die Ausbeute unter den gegebenen Bedingungen maximal ist. Hierbei ist es wünschenswert, dass das vorgelegte Substrat zu einem möglichst geringen Teil in reine Biomasse umgesetzt wird; vielmehr ist dabei – bezogen auf den Anteil der Biomasse – eine hohe spezifische Produktbildung anzustreben.

Wichtige Einflussgrößen auf die spezifische Produktbildung rekombinanter Organismen sind neben der Medienkomposition, der Kultivierungstemperatur, dem pH-Wert und ähnlichen systemischen Faktoren auch im Bereich der Genetik des kultivierten Organismus zu finden. Die Charakterisierung des Einflusses der Gesamtheit vieler unterschiedlicher Größen wie Sekretions-Pfade, Promotor-Abhängigkeit, Deletierungen und Überexprimierungen produktbildender Gene wird im Labormaßstab durchgeführt. Dies verläuft im Allgemeinen unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich beispielsweise Medienkompositionen, Induktorkonzentrationen und Induktionszeitpunkten. Dem Aspekt des scale-up auf industrielle Maßstäbe kann dabei nicht hinreichend Rechnung getragen werden. Hierzu werden kostenintensivere Fermentationsanlagen im Technikums-Maßstab herangezogen, welche in dieser Hinsicht verlässlichere Aussagen liefern können.

Für die Entwicklung eines neuen und damit wenig erforschten rekombinanten Organismus ist es daher notwendig herauszufinden, unter welchen Bedingungen eine Kultivierung ihr Effizienzmaximum erreicht. Da hierzu wegen der scale-up-Problematik im Technikums-Maßstab gearbeitet werden sollte, aber andererseits auch ein kosteneffizientes Screening notwendig ist, ist es sinnvoll, ein Fermentationssystem zu entwickeln, welches beiden Anforderungen gerecht werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Fermenterkombination aus einem 10 l Kultivierungsreaktor, welcher mit einem 0,5 l Testreaktor gekoppelt ist, sollte auf diese Anforderungen untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es, die intra- bzw. extrazelluläre Enzymproduktion dreier ausgewählter prokaryontischer Mikroorganismen unter limitierten Substratbedingungen zu charakterisieren.

2 Theoretisches

2.1 Fermenterkombination

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau besteht aus zwei Edelstahlfermentern mit einem Arbeitsvolumen von 10 l bzw. 300 ml (vgl. Skizze des Aufbaus auf Seite 6). Der Aufbau dient in dieser Arbeit dazu, die Enzymproduktionsrate unterschiedlicher Mikroorganismen innerhalb einer batch-Kultur zu charakterisieren (vgl. Abb. 2.1). Er basiert auf einer Kombination von zwei Fermentern, die von Rode et al. [32] zur Kultivierung und Analyse von oszillierenden Hefen verwendet wurden.

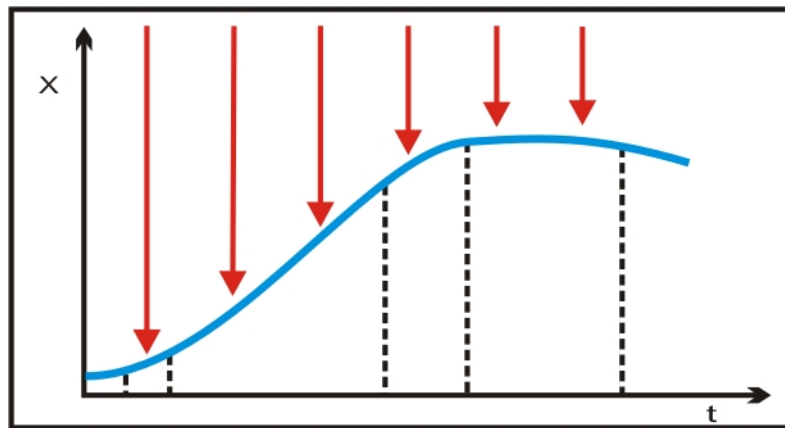


Abb. 2.1: Unter limitierten Bedingungen verläuft die Entwicklung der Zellmassenkonzentration X einer Kultur in mehreren aufeinander folgenden Teilabschnitten. Mithilfe der Fermenterkombination wird ermöglicht, die Produktion innerhalb einer einzigen Kultivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (mit roten Pfeilen markiert) zu untersuchen.

Um eine Aussage über das Wachstumsphasen-bezogene Produktionsverhalten von submers kultivierten Mikroorganismen treffen zu können, ist es üblicherweise notwendig, mehrere Kulturen (beispielsweise in Schüttelkolben) anzupflanzen und diese in unterschiedlichen zeitlichen Abständen zu untersuchen. Hierbei wird im Regelfall (z.B. bei thermischer bzw. chemischer Induktion oder im Fall eines produktionseinleitenden Substratwechsels) eine Schüttelkultur pro Versuch benötigt, da durch die Induktion ein irreversibler Einfluss auf die Zellen ausgeübt wird. Die Möglichkeit eines weiteren Versuchs mit derselben Kultur ist damit ausgeschlossen.

Besteht ein Interesse daran, im Hinblick auf die restlichen Nährstoffe des Mediums einen Zeitpunkt zu bestimmen, bei welchem die Produktausbeute maximiert und somit das Substrat effizient ausgenutzt worden ist, ist der Einsatz mehrerer Schüttelkolbenexperimente unabdinglich. Diese Vorgehensweise erfordert eine hohe Reproduzierbarkeit der Einzelerperimente, um diese miteinander vergleichen zu können. Die Aussage, zu welchem Zeitpunkt die Ausbeute maximal ist, darf nicht von Differenzen zwischen den Einzelkultivierungen beeinträchtigt werden.

Schüttelkolbenexperimente als Methode des Produktions-Screenings sind daher aus mehrerer Hinsicht fehlerbehaftet. Neben Chargenunterschieden der Medienbestandteile wirken sich kleine Unterschiede in der Medienkomposition auf das Wachstum und die Produktivität der Zellen aus. Dies kann beispielsweise durch Pipettierfehler von steril filtrierten Zusätzen wie Stammlösungen von Vitaminen und Antibiotika zu Stande kommen, welche erst kurz vor dem Animpfen hinzugegeben werden. Eine reproduzierbare Animpfdichte ist im Falle der Verwendung von frisch aufgetauten Gefrierkulturen ähnlich fehlerbehaftet.

Zudem ist das Wachstum einer ideal angesetzten Kultur in der Praxis äußeren Einflüssen ausgesetzt. Der Sauerstofftransfer über den Sterilverschluss eines Schüttelkolbens, die Größe der Schikanen (welche im Regelfall manuell hergestellt worden sind) und materialbedingte Schwankungen des Wärmedurchgangskoeffizienten unterschiedlicher Gefäße fallen dabei ebenso ins Gewicht wie beispielsweise die Nähe der Kolben am Heizelement des thermostatisierten Schüttelinkubators.

Hinzu kommt, dass Mikroorganismen in ihrem Teilungsverhalten aufgrund biologischer Vielfalt Schwankungen unterworfen sind. Dies in Verbindung mit vergleichsweise schlechten Wachstumsbedingungen aufgrund von pH-Wert-Änderungen und schlechter Sauerstoffversorgung führt dazu, dass hier im Hinblick auf ein eventuelles Upscaling wenig verlässliche Aussagen erhalten werden können.

Mit der Fermenterkombination sollen derartige Nachteile auf ein Minimum reduziert werden. Generell bietet ein Bioreaktor bessere Konditionen für den Gesamtmetabolismus der Zellen. Temperaturschwankungen können reduziert werden, der pH-Wert wird permanent im idealen Bereich gehalten, was den Einsatz von Puffersubstanzen senkt und die Zellen damit einem geringeren osmotischen Druck aussetzt.

Die Sauerstoffzufuhr ist im Vergleich zu Schüttelkolbenexperimenten deutlich verbessert, was sich in erster Linie in Bereichen erhöhter Zelldichte auf Wachstum und Produktivität niederschlägt. Da die Zelldichte mit dem Verlauf der Zeit kontinuierlich steigt und Zellernten zu dem Zeitpunkt durchgeführt werden, wenn die Kultur das Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreicht bzw. überschritten hat, wirkt sich eine Sauerstofflimitierung im Schüttelkolben umso stärker auf die Zellernte aus. Somit ist im Schüttelkolben die Sauerstoffzufuhr ein wachstums- und gleichzeitig produktionslimitierender Faktor; Substratkompositionen fallen dadurch eher sekundär ins Gewicht.

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, online Prozessdaten erfassen und somit den Wachstumsverlauf mittelbar beobachten (und gegebenenfalls beeinflussen) zu können. Dies betrifft nicht ausschließlich die Regelungs-Sensorik, wie Temperatur-, pH- und pO_2 -Sensoren, sondern auch das Verfolgen von zellbezogenen Bioprozessdaten mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie (BioView).

Damit mit einer („Haupt“-)Kultivierung mehrere Momentaufnahmen hinsichtlich der jeweils aktuellen Enzymproduktion durchgeführt werden können, wurde ein Fermenter mit einem weiteren gekoppelt (vgl. Abb. 2.2). Im Hauptfermenter (im Bild links) findet ausschließlich das Wachstum der Zellen statt, bis das Medium verbraucht ist. Der Versuchsfermenter, welcher deutlich kleiner dimensioniert ist, kann zu beliebigen Zeitpunkten über eine Silikonschlauchverbindung mit dem Hauptfermenter gekoppelt werden. In ihm werden üblicherweise ähnliche Kultivierungsbedingungen eingestellt. (Alternativ dazu kann der Versuchsfermenter auch auf andere Art betrieben werden; ist beispielsweise eine thermische Induktion notwendig, ergibt sich hier von technischer Seite her eine einfache Möglichkeit, einen direkten Temperatursprung zu ermöglichen.)

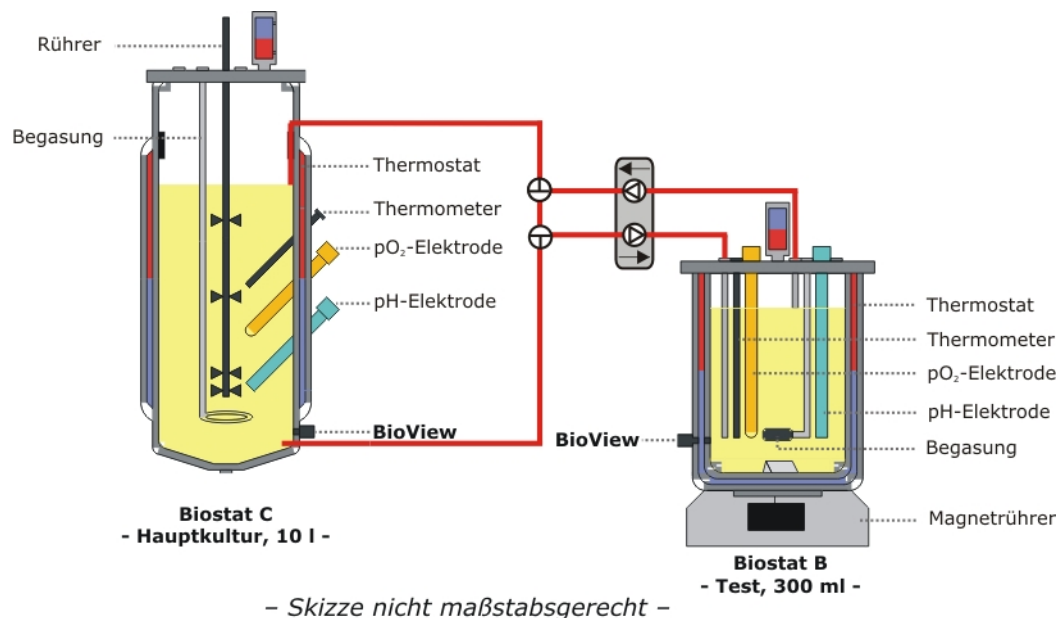


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Fermenterkombination; Kultivierungs- und Testreaktor sind über ein Schlauchsystem mit Tandempumpe verbunden, mit dessen Hilfe die Zellsuspension in unterschiedlichen Wachstumsphasen transferiert und anschließend gesondert aufgearbeitet werden kann. (Ein Foto des Versuchsaufbaus ist im Anhang, Kapitel A.3 auf Seite 108 dargestellt.)

Eine Peristaltikpumpe mit Tandemkopf ermöglicht eine Zirkulation der Zellsuspension zwischen beiden Fermentern, bis die Verbindung mittels zweier Dreivehähne unterbrochen wird.

Nun kann im Versuchsfermenter der irreversible Schritt (wie z.B. eine thermische oder chemische Induktion oder eine Permeabilisierung der Zellwände) durchgeführt werden, ohne die Hauptkultur (im Folgenden mit HK abgekürzt) zu beeinflussen. Hierzu wird der Versuchsfermenter zu jedem Einzelexperiment einmalig befüllt und nach Beendigung des Experiments entleert, gereinigt und desinfiziert (vgl. Abschnitt A.1.3). Auf diese Art ist es möglich, mehrere Zeitpunkte innerhalb einer einzigen Kultur auf

deren Produktionsverhalten im jeweiligen Moment zu untersuchen. Zudem ist diese Methode aufgrund der Dimensionierung des Versuchsfermenters deutlich kostensparender, was sich insbesondere bei der Verwendung von chemischen Induktoren bemerkbar macht.

Nach Bestimmung der Zellzahl oder Zellmasse können somit Rückschlüsse auf die Biomassen-bezogene Enzymproduktion gezogen werden (im Folgenden als spezifische Enzymproduktion bezeichnet). Die verschiedenen Erntezeitpunkte können schließlich hinsichtlich der aktuellen Produktionsrate miteinander verglichen werden.

Im Vergleich mit der von Rode et al. benutzten Fermenterkombination [32] ergeben sich geringe Unterschiede im Aufbau: Der dort verwendete Biostat Q zur Ansteuerung des Versuchsfermenters wurde durch eine Biostat B Steuereinheit mit separatem Magnetrührer ersetzt. Der im Versuchsfermenter verwendete prismenförmige Rührfisch wurde etwas kleiner dimensioniert. Dies erfolgte zugunsten höherer Drehzahlen und damit verbesserten Werten für den Sauerstoffeintrag. Zudem wurde das Pumpen-System überarbeitet. Bei Rode ergaben sich Probleme mit der Synchronisierung der beiden Peristaltikpumpen, was zu kritischen Druckunterschieden beim Zellentransfer vom Kultivierungs- in den Versuchsfermenter führte. Diesem Problem wurde vor Beginn der hier wiedergegebenen Arbeiten begegnet, indem die zwei Pumpen durch eine Peristaltikpumpe mit Tandempumpkopf ersetzt wurden. In Kombination mit der Verwendung von Schläuchen größeren Durchmessers konnten somit ohne prozesstechnische Komplikationen bis zu 72 % höhere Pumpraten erzielt werden.

2.2 Medien zur Kultivierung

Bei der Submerskultivierung von Mikroorganismen – insbesondere von Prokaryonten – werden sowohl im Forschungs- als auch im Produktionsbereich unterschiedliche Komplexmedien verwendet. Diese Medien beruhen in ihrer Zusammensetzung auf dem Einsatz organischer Verbindungen, welche als wasserlösliche Zellautolysate bzw. enzymatische Abbauprodukte von Proteinen sowohl tierischen als auch pflanzlichen Ursprungs vorliegen.

Weit verbreitete Inhaltsstoffe darin sind Hefe-Extrakt, Malz-Extrakt, corn steep liquor und peptisch bzw. tryptisch abgebautes Casein. Diesen Inhaltsstoffen gemein ist die Zusammensetzung aus Peptiden, freien Aminosäuren, Purinen und Pyrimidinen sowie Vitaminen der B-Gruppe. Innerhalb von Kultivierungen stellen diese Stoffe prokaryontischen Systemen eine ausreichende Nahrungsgrundlage zur Verfügung und versorgen somit den gesamten Stoffwechselhaushalt dieser Organismen. Die Konzentrationen der Inhaltsstoffe wirken sich dabei vornehmlich auf die Wachstumsrate und die maximal erreichbare Biomasse aus.

Unter Umständen können Komplexmedien noch zusätzlich mit Reinsubstanzen wie Vitaminen und Aminosäuren versetzt werden, um den jeweiligen zellspezifischen An-

forderungen zur Produktion eines bestimmten rekombinanten Proteins entgegen zu kommen. Bei den in dieser Arbeit kultivierten Stämmen *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702 sind dies Thiamin und Glycin [1].

Alle im Zuge dieser Arbeit benutzten Vorkulturen basieren auf der Verwendung von Komplexmedien. Hinsichtlich der Hauptfermentationen im größeren Maßstab (bis 10 l) soll nach Möglichkeit mit synthetischen Medien gearbeitet werden. Dies beruht darauf, dass das Wachstumsverhalten der Organismen online mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie beobachtet werden soll. Zudem soll im Einzelfall der Frage nachgegangen werden, ob sich auf diese Weise auch Rückschlüsse auf das Produktionsverhalten der Zellen ziehen lassen. Dies ist leicht im Falle eines fluorogenen Produkts wie beispielsweise GFP (Green Fluorescent Protein) nachweisbar [12]. Aber auch Enzyme, welche über keine Eigenfluoreszenz verfügen, können mitunter 2D-fluorometrisch online verfolgt werden. Hierzu werden chemometrische Modelle verwendet, bei denen aus den offline ermittelten Daten des nicht fluorogenen Produkts im zeitlichen Verlauf eine Korrelation zu den Signalen der gesamten 2D-Fluoreszenzmatrix hergestellt wird [42].

Hierzu ist die Verwendung von Komplexmedien problematisch, da diese aufgrund des hohen Gesamtproteingehalts eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen, welche dazu beiträgt, dass die Fluoreszenz biogenen Ursprungs überdeckt wird. Das daraus resultierende Signal/Rauschverhältnis ist im Hinblick auf die Detektion Wachstums-bezogener Daten nicht auswertbar.

Der linke Teil der Abbildung 2.3 zeigt den Verlauf der gemessenen Kulturfluoreszenz einer Kultur von *E. coli* 5K pHM12 im synthetischen CgXII-Medium anhand zweier ausgewählter Fluorophore (FAD, NADH) bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase (bis 60 h; finale OD: 13,1). Der Wachstumsverlauf ist gut zu erkennen; das Signal für FAD hat die stärkste Intensität ¹.

Im rechten Teil der Abbildung 2.3 ist das gesamte Spektrum aller gemessenen Wellenlängenpaare zum Kultivierungszeitpunkt von 60 h dargestellt ². Auch hier ist erkennbar, dass FAD die größte Signalintensität hervorbringt; das Signal ragt als Peak heraus. Zudem verdeutlicht der Blick auf das Spektrum, dass die Gesamtmenge der Fluorophore im Vergleich zu einer Messung im Komplexmedium sehr gering ist. Auswertbare Signale (oberhalb einer Intensität von 1000) sind innerhalb eines Bereiches zwischen ex350/em450 und ex490/em 550 zu finden. In diesem Beispiel sind das 31 von 120 gemessenen Wellenlängenpaaren (entsprechend ca. 25 % der Gesamtfläche).

Abgesehen von der Möglichkeit, durch die Verwendung synthetischer Medien den Einsatz von 2D-Fluoreszenzmessungen zu ermöglichen, ergeben sich im Bereich der

1 bei gleichem Verstärkungskoeffizienten aller gemessenen Wellenlängenpaare.

2 Die Probe wird in Wellenlängen-Abständen von 20 nm angeregt und detektiert; das Diagramm stellt eine graphische Interpolation der aufgezeichneten Werte als Gitternetz dar.

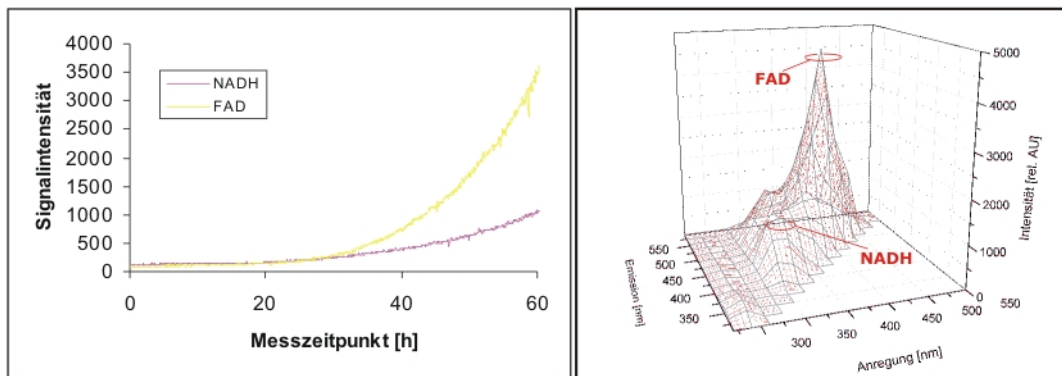


Abb. 2.3: Verlauf ausgewählter Fluorophore (linkes Diagramm; bis 60 h) und 3D-Fluoreszenzspektrum (rechts; bei 60 h) der Kulturfluoreszenz in der exponentiellen Wachstumsphase von *E. coli* 5K pHM12 in CgXII. Die Intensität des Signals von FAD (Vitamin B2) bildet den Wachstumsverlauf sehr gut ab und dominiert in der graphisch interpolierten 3D-Darstellung der Fluoreszenz-Matrix (Abstände: 20 nm).

Forschung weitere Vorteile. Synthetische Medien verfügen über eine definierte Zusammensetzung an Hauptnährstoffen wie Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorquellen. Die hier zum Einsatz kommenden Grundsubstanzen sind im Gegensatz zu den Inhaltsstoffen komplexer Medien deutlich chargenunabhängiger. Des Weiteren ergeben sich keine Diauxie-Erscheinungen, da ausschließlich eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (häufig Glucose oder Glycerin).

Nachteilig ist, dass diese Medien nicht immer den Gesamtstoffwechselhaushalt der Zellen abdecken können. Dies wirkt sich in erster Linie auf die Produktivität der Zellen aus. Insofern muss eine Eignung grundsätzlich aus dem jeweiligen Forschungskontext heraus beurteilt werden. Sind hohe Proteinausbeuten das Ziel, ist es daher sinnvoller, auf Komplexmedien zurückzugreifen. Besteht die Aufgabe darin, relative Bezüge innerhalb von einzelnen oder mehreren Kultivierungen herzustellen, so fällt dieser Nachteil nicht ins Gewicht, soweit sich grundsätzliche Produktionsunterschiede – seien sie auch noch so marginal – feststellen lassen.

Ein damit einhergehender Unterschied zu Komplexmedien ist der, dass nicht nur die Zellproduktivität eingeschränkt, sondern auch die Wachstumsrate herabgesetzt ist; die Zellen durchlaufen aufgrund der Anpassung an die veränderten Nährstoffbedingungen eine längere lag-Phase, und auch in der exponentiellen Wachstumsphase sind häufig deutlich verlängerte Verdopplungszeiten zu erwarten. Dieser Umstand kommt im Falle dieser Arbeit dem Forschungsaspekt entgegen: Sollen unterschiedliche Wachstumsphasen miteinander verglichen werden, so bleibt mehr zeitlicher Raum für die Einzelexperimente, je mehr jede Phase zeitlich in die Länge gezogen ist.

Bei dem Medium, welches im Bereich der Fermenterkultivierungen dieser Arbeit Verwendung findet, handelt es sich um eine Variante des synthetischen Cg-XII-Mediums [21], welches im Forschungszentrum Jülich in der Kultivierung von re-

kombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt wird, um unterschiedliche Aminosäuren (Isoleucin, Valin, Glutamin, Serin) zu gewinnen [9].

Synthetische Medien decken nicht grundsätzlich den Nährstoffbedarf sämtlicher Mikroorganismen ab. CgXII – die Abkürzung deutet darauf hin – wird im Forschungszentrum Jülich selektiv für *C. glutamicum* verwendet. Trotz dieser selektiven Art der Medienkomposition können hier Unterschiede im Wachstumsverhalten von Organismen selbst mit geringen genetischen Variationen ins Gewicht fallen. Ein Literaturbeispiel dafür ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Hier wurden zwei Wildtypen (A und B bzw. C und D (WT in eisenreduziertem Medium)) sowie verschiedene Klone (E bis G) in CgXII kultiviert.

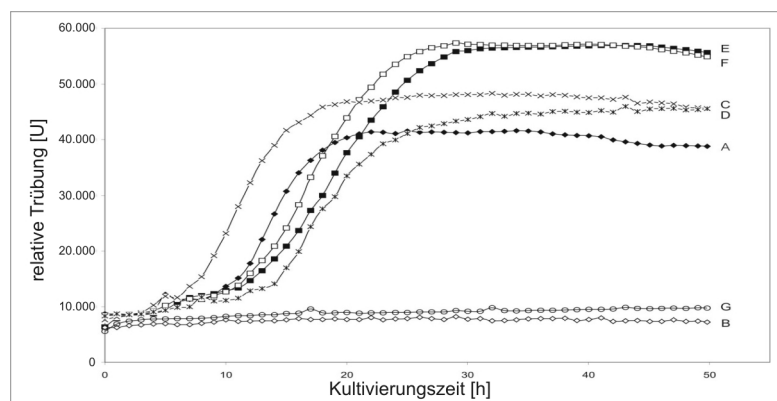


Abb. 2.4: Wachstumscharakteristika unterschiedlicher (teilweise rekombinanter) Stämme von *Corynebacterium glutamicum* in CgXII [5].

Es ist erkennbar, dass selbst geringe Unterschiede – wie beispielsweise eine Reduzierung des Eisengehalts im Medium – einen starken Einfluss auf das Wachstum haben: Bei den in der Abbildung gezeigten Wachstumskurven B und D wurde der selbe Wildtyp (*C. glutamicum* IB2103) kultiviert. Kurve B wurde in unverändertem Medium aufgenommen, Kurve D resultiert aus der eben erwähnten Eisenreduzierung.

Da die Wachstumsergebnisse bzw. die Kompatibilität des Organismus mit dem Medium nicht prognostizierbar ist, ist es notwendig, zu Beginn der Kultivierungsversuche festzustellen, ob die unterschiedlichen Bakterienstämme mit dem Medium kompatibel sind. Hierauf wird im Abschnitt 3.1.1 des experimentellen Teils eingegangen.

Die wesentlichen Unterschiede des in dieser Arbeit verwendeten Mediums (im Vergleich zur Originalrezeptur von CgXII) beziehen sich auf den Austausch des Puffers, prozentual herabgesetzte Anteile von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und dem Hinzufügen einer Vitamin-Komponente:

- **Puffer:** Die zugrunde gelegte Medienzusammensetzung [21] schreibt die Verwendung eines 100 mM MOPS-Puffers (3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure) vor. In Anbetracht der besseren Pufferkapazität von MOPS im Vergleich zu konventionellen Phosphatpuffern ist

der Gebrauch dieser Substanz für Kultivierungen im Schüttelkolben sinnvoll. Dieser Vorteil fällt insbesondere bei der Verwendung von großen Mengen an Kohlenstoffquellen ins Gewicht, welche zu hohen Zelldichten und damit starken pH-Driften führen. Vorangegangene Experimente im Fermenterbetrieb (mit der Möglichkeit einer pH-Regelung) zeigten, dass der Puffer durch ein Natrium-Kaliumphosphatpuffersystem mit geringerer Molarität (50 mM) ausgetauscht werden kann. Dies hat den positiven Nebeneffekt, dass die Gesamtmenge an verwertbaren Phosphorquellen im Medium erhöht ist. Zudem bewirkt die geringe Pufferkonzentration von 50 statt 100 mM gleichzeitig eine Erniedrigung des osmotischen Drucks auf die Zellwände.

- **C-/N-Quellen-Anteil:** In CgXII wird Glucose als einzige Kohlenstoffquelle mit hoher Konzentration (4 %) eingesetzt, um große Mengen an Biomasse zu erzeugen (bis zu OD 45, vgl. [9]). Da eine Maximierung der Zellmasse bzw. Produktausbeute innerhalb dieser Arbeit nicht im Vordergrund steht, kann der Glucoseanteil auf die Hälfte reduziert werden. Damit einhergehend kann der Einsatz der Hauptstickstoffquelle Ammoniumsulfat ebenfalls gesenkt werden, ohne die maximal erreichbare Zellausbeute zu beeinflussen.
- **Vitamin-Zusätze:** Um das CgXII-Medium für ein breiteres Spektrum an Mikroorganismen zugänglich zu machen, werden zudem noch 10 mg/l Vitamin B1 zugegeben.

Auf den Einsatz von Protokatechuat (3,4-Dihydroxybenzoesäure) als Siderophor darf hier nicht verzichtet werden, insbesondere bei der Verwendung von rekombinanten Organismen, welche auf genetischen Sicherheitsstämmen (5K, K12) beruhen, da hier eine von außen gesteuerte Eisenkomplexierung essenziell ist.

2.3 Photo- und Fluoreszenzspektrometrie

2.3.1 BioView-Sensor

2.3.1.1 Allgemeines

Beim BioView-Sensor (Delta Light and Optics, Dänemark) handelt es sich um ein Gerät, das speziell für den Einsatz in Industrie- und Technikumsanlagen entwickelt wurde und auf dem Messprinzip der Fluoreszenz beruht.

Bei der Kultivierung in der Fermenterkombination ergibt sich die Möglichkeit, mithilfe des BioView die Konzentration von ausgewählten Biomolekülen online zu verfolgen. Unter Ausschluss störender Faktoren (vgl. Abschnitt 2.3.1.3) kann dieses nicht invasive Verfahren zur Quantifizierung unterschiedlicher fluorogener Substrate benutzt werden [25].

2.3.1.2 Funktionsprinzip des BioView

Die Steuerung der Fluoreszenzmessung und die Datenaufnahme erfolgen mit einem PC. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Die Monochromatisierung des Anregungs- und Emissionslichts erfolgt mit Hilfe von Schmalband-Interferenzfiltern. Die Filter

mit jeweils 20 nm Bandbreite sind auf Filterrädern montiert und können so nacheinander in den Strahlengang geführt werden. Sie decken einen Anregungsbereich von 260 nm bis 560 nm und einen Emissionsbereich von 300 nm bis 600 nm ab. Erstmals wurde dieses System von Marose und Lindemann an Kultivierungen von *Claviceps purpurea*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Sphingomonas yanoikuyae* erprobt [26].

2.3.1.3 Störfaktoren bei Fluoreszenzmessungen

Als erwähnenswerte Störfaktoren kommen hier geräte- und prozessbedingte Einflüsse zum Tragen: Temperaturschwankungen beeinflussen beispielsweise die Wahrscheinlichkeit von deaktivierenden Stößen auf molekularer Ebene, weshalb die Fluoreszenzintensität bei höherer Temperatur abnimmt. Zudem wirkt sich der pH-Wert des Mediums auf die Fluoreszenz biogener Stoffe aus; eine Protonierung verändert häufig deren Fluoreszenzcharakteristika (Beispiel: NAD/NADH; s. u.). Gasblasen, welche das Resultat aus Rührerdrehzahl, Begasungsrate und technischer Auslegung (vornehmlich aerober) Fermenter darstellen, führen zu optischen Veränderungen im System. Streulicht ist nicht nur ein Faktor, welcher die Anregungsintensität verringert, sondern kann zudem zur verringerten Anregung weiterer Fluorophore innerhalb der Kultur dienen (quenching); zudem geht die Lichtstreuung innerhalb eines biologischen Systems, welches sich im Wachstum befindet, als eine nicht-lineare Größe in die Rechnung ein. Die Absorption des eingestrahlt Lichts kann aber auch zu Fluoreszenzlöschung führen; dies tritt insbesondere bei der Verwendung gefärbter Medien auf.

Zum Fluoreszenz-Quenching können sowohl Medien- als auch Kultur-Komponenten beitragen; neutrale Moleküle (Sauerstoff), Anionen (Nitrate) oder Metall-Kationen (Eisen³⁺) beeinträchtigen das Signal dabei ebenso wie z.B. Zellmembranen. Sie wirken sich sowohl auf die Eindringtiefe des Anregungslichts als auch auf die mittlere freie Weglänge des Emissionslichts aus. Beim Kaskadeneffekt verhält es sich ähnlich: Hier bei kommt es dazu, dass die Emissionsstrahlung von Fluorophor *A* zur Anregung des benachbarten Fluorophors *B* dient. So ergeben sich im Falle von Stoff *A* erniedrigte Signalintensitäten zugunsten derer von Stoff *B*. Des Weiteren können stärkere Fluoreszenz-Signale innerhalb des Spektrums benachbarte Signale überlagern, wodurch sich eine Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlängen ergibt.

In der Tabelle 2.1 auf der folgenden Seite sind sowohl die Einflussgrößen als auch eventuell notwendige Kompensationsmaßnahmen dargestellt. Zur Online-Analyse von Bioprozessdaten wurde die 2D-Fluoreszenzspektroskopie erstmals von Seidel [41] verwendet und später von Stärk [43] weiterentwickelt. Hierzu ist der Einsatz von synthetischen Medien den natürlichen Medien vorzuziehen, da Letztere über eine zu große Eigengrundstrahlung verfügen. Dadurch erhöht sich ebenfalls die Reproduzierbarkeit

der Kultivierungen, da synthetische Medien keinen natürlichen Produktionsschwankungen unterworfen sind.

Tab. 2.1: Störfaktoren bei Fluoreszenzmessungen und Möglichkeiten zur Kompensation

Einflussgröße	Kompensation bei Kultivierungen
Temperatur	Regelung (Thermostat)
pH-Wert	Regelung
Rührerdrehzahl, Begasung	zeitlicher Mittelwert
Dichte, Polarität, Viskosität des Mediums	Niedrigzelldichte-Kultivierung
Lösungsmittel	gleichbleibend
Streulicht	erhöhte Gesamtanregungs-Intensität
Fluoreszenzlöschung	farbstofffreie Medienkomposition
Kaskadeneffekt	monochromatische Anregung
Überlagerungen von Fluoreszenzsignalen	ausgewählte Fluorophore in unterschiedlichen Spektralbereichen
Photobleaching	zeitliche Restriktion des Gesamtprozesses

2.3.1.4 Charakteristische biogene Fluorophore

Mithilfe des BioView können innerhalb kurzer Zeit (Einzelmessung des Spektrums in ca. 90 s) stoffwechselbezogene Substanzen detektiert werden. Aus der Vielzahl physiologischer Moleküle können diejenigen ausgewählt werden, welche eine intrinsische Fluoreszenz (Fluoreszenz direkt biologischen Ursprungs) erzeugen. Die Fluoreszenz eines Fluorophors ist nicht lokal auf ein Anregungs-Emissions-Wellenlängenpaar festgelegt, sondern erstreckt sich über einen Spektralbereich, welcher ein charakteristisches Maximum der relativen Fluoreszenz-Intensität (RFI) aufweist.

In Abhängigkeit vom spektralen Abstand sind die charakteristischen Fluorophore innerhalb einer Gesamt-Kulturfluoreszenz als Peak-Schultern identifizierbar und können so unterschieden werden (vgl. rechter Teil der Abb. 2.3 im Abschnitt 2.2). Aufgrund von Überlagerungen ist die Lage der Fluoreszenzmaxima der charakteristischen Wellenlängenpaare im Vergleich zu denen der reinen Substanzen leicht verschoben (Beispiele: NADH und Pyridoxin).

Bei den drei in dieser Arbeit grundsätzlich detektierten Fluorophoren handelt es sich um Substanzen, welche intrazelluläre Stoffwechselforgänge charakterisieren (vgl. auch Tabelle 1):

NAD(P) (Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)) ist als ein Hydridionen übertragendes Coenzym ein wichtiger biogener Baustein für zahlreiche Redoxreaktionen. Zudem dient NADH der Erzeugung von Adenosintriphosphat (ATP). Somit können über die Detektion von NAD Aussagen hinsichtlich des Energiehaushalts der Zellen getroffen werden. Innerhalb der Kulturfluoreszenz wird NAD bei dem Wellenlänge-paar ex340nm/em450nm detektiert.

FMN (Flavinmononucleotid) und **FAD** (Flavinadenindinucleotid) – Derivate des Riboflavins (Vitamin B2) – sind essenzielle Coenzyme innerhalb der Atmungskette. Sie liefern im Fluoreszenzspektrum einer Kultur die stärksten RFI. Hierbei sind zwei Maxima zu erkennen, welche bei ex365nm/em520nm und ex450nm/em530nm liegen.

Zudem werden bei ex290nm/em350nm eine Vielzahl der **Proteine** detektiert, welche als Indikator für die Gesamtmenge der Biomasse einer Kultur gelten. Hier dominiert die Tryptophan-Fluoreszenz, welche im Vergleich zur reinen Aminosäure zu geringeren Emissionswellenlängen verschoben ist.

Tabelle 2.2 fasst die Eigenschaften der gemessenen biogenen Fluorophore zusammen ³.

Tab. 2.2: Gemessene biogene Fluorophore und deren charakteristische Wellenlängen

Fluorophor	Kennzeichnend für:	ex/em [nm] (Literatur)	ex/em [nm] (Kultur)	ex/em [nm] (BioView)
NADH	Energiehaushalt	340/460 [16]	340/450	350/450
FAD / FMN	Atmungskette	365/520 [48] 450/530	370/520 450/520	– 450/510
Proteine	Gesamtbiomasse	290/380 [48]	287/348	290/350

Innerhalb der pH-Bereiche der Kultivierungen von Mikroorganismen fluoreszieren die Flavine (FMN, FAD) grundsätzlich in der oxidierten Form, die Nicotinamid-Coenzyme dagegen nur in der reduzierten Form (NAD(P)H). Während NADH zur Erzeugung von ATP dient, wird NADPH fast ausschließlich für reduktive Biosynthesen (z. B. für die Fettsäurebiosynthese) verwendet. Die Phosphatgruppe hat dabei keinen Einfluss auf die Fluoreszenz; NADH und NADPH lassen sich fluorimetrisch nicht unterscheiden.

2.3.2 Enzym-Analytik

Zur Bestimmung der Enzymmengen werden photometrische Verfahren verwendet. Hierbei kommen sowohl im offline- als auch im online-Verfahren unterschiedliche, enzymespezifische Substrate zum Einsatz, welche nach Umsetzung durch das betreffende Enzym eine höhere photometrische Intensität als die Grundsubstanz aufweisen. Die Wellenlängen, bei denen detektiert wird, sind stoffspezifisch für das enzymatisch gebildete Abbauprodukt. Die Konzentration des vorliegenden Enzyms kann durch eine kinetische Messung über die Volumenaktivität des Enzyms ermittelt werden.

³ Die Literaturwerte in der dritten Spalte beziehen sich auf die Reinsubstanzen. In den Werten der vierten Spalte sind Kultur-bezogene Überlagerungen berücksichtigt. Die Werte in der letzten Spalte resultieren aus der technischen Beschränkung durch die Vorgabe der Filter-Einsätze im BioView; hier können bauartbedingt minimal 20 nm-Abstände gewählt werden. Die genannten Wellenlängen liegen somit bis zu 19 nm ober- bzw. unterhalb des Wertes für die Kulturfluoreszenz.

Die Volumenaktivität kann unter Umständen direkt im Zellrohextrakt gemessen werden. Hierzu sind mögliche Inhibierungen zu beachten. Durch die Wahl einer geeigneten Substrat-Verdünnung oder einer angepassten Medienkomposition im Hinblick auf die Abwesenheit störender Medienbestandteile können diese Inhibierungen oftmals nahezu ausgeschlossen werden. Unter dem Gesichtspunkt der Enzym-Analytik vereinfacht dies das downstream-processing. Auf weitere Aufreinigungsschritte wie HPLC bzw. FPLC oder die Nutzung gegebenenfalls vorhandener Affinitäts-tags kann in diesem Fall verzichtet werden, da hier auswertbare Messsignale und nicht Produktmaximierungen im Vordergrund stehen.

Zur quantitativen Bestimmung der Volumenaktivität A_V (in U/ml) werden die photometrischen bzw. fluoreszenzspektrometrischen Signale ausgewertet. Dies geschieht auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes über die Schwächung der Strahlungsintensität mit der Weglänge beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz. Das Gesetz von Lambert-Beer stellt einen Zusammenhang der Intensitätsschwächung mit der Konzentration der absorbierenden Substanz her. Unter Einbeziehung der Einflussgrößen I (Intensität des Lichts nach dem Durchgang durch die Probe), I_0 (Intensität des Lichts der Referenz), c (Konzentration der Probe), der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers d und dem stoff- und wellenlängenspezifischen Extinktionsfaktor ϵ_λ kann die Extinktion ΔE_λ wie folgt berechnet werden:

$$\Delta E_\lambda = -\lg \frac{I}{I_0} = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Unter Einbeziehung volumen- und zeitabhängiger Größen kann über den Umsatz des Enzyms mit einem enzymspezifischen Substrat die Volumenaktivität pro Zeiteinheit verfolgt werden. Das gebildete Produkt wird photometrisch detektiert; im zeitlichen Verlauf resultiert einer Gerade. Mathematisch kann auf die Menge des vorhandenen Enzyms über die Steigung der Gerade nach folgender Gleichung geschlossen werden:

$$A_V \left[\frac{U}{ml} \right] = \frac{\frac{\Delta E}{t} V_K}{\epsilon_\lambda \cdot d \cdot V_{Probe}}$$

Darin entsprechen V_K dem Volumen der Küvette (Standard: 1 ml) und V_{Probe} das Volumen des Anteils der gemessenen Probe bzw. des Zellrohextraktes (in ml) im gesamten Küvettenvolumen. Unter Beachtung des stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten der hier zu verwendenden Substanzen wie NIPAB, PMC, pNPA und DNS, der charakteristischen Wellenlängen und der gegebenenfalls unterschiedlichen Schichtdicke (insbesondere bei online-Fluoreszenz-Messungen im Versuchsfermenter) kann die Volumenaktivität berechnet werden.

2.3.2.1 NIPAB und PMC (Penicillin G-Amidase-Aktivität von *E. coli* 5K pHM12-Rohextrakten)

Zur Ermittlung der Volumenaktivität der Penicillin G-Amidase können zwei unterschiedliche photometrische Verfahren herangezogen werden. Für die offline-Bestimmung eignet sich das Substrat NIPAB (6-Nitro-3-phenylacetamidbenzoesäure), welches strukturelle Verwandtschaft zu Penicillin G aufweist und von dem Enzym an der Amidbindung gespalten werden kann. Ein vergleichbares Phenylacetyl-Derivat ist das PMC (7-Phenylacetyl-4-methylcoumarinylamid), welches für die online-Bestimmung genutzt werden kann [34] (vgl. Abb. 2.5).

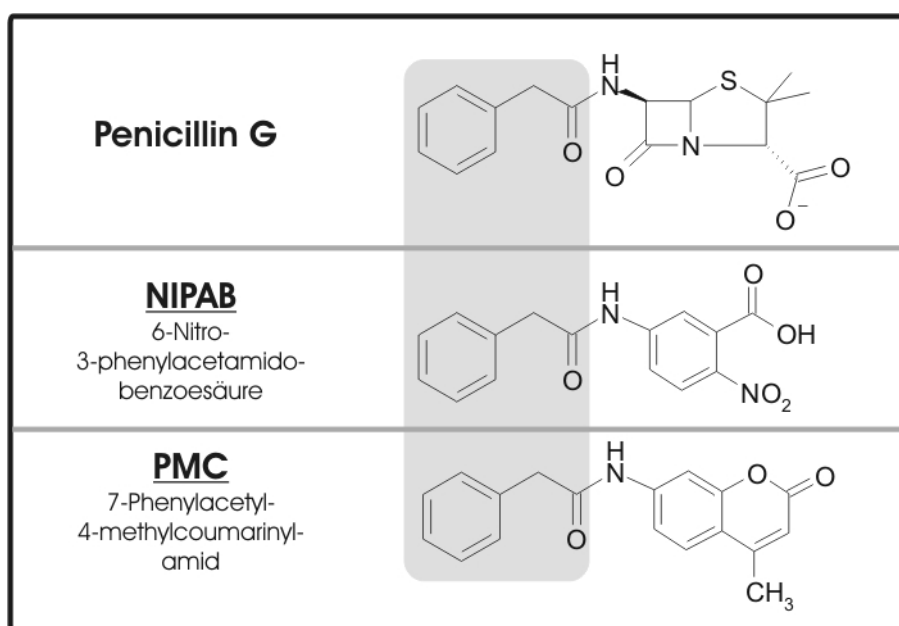


Abb. 2.5: Strukturelle Verwandtschaft der Substrate für die Bestimmung der Enzymaktivität von Penicillin G-Amidase. Das Enzym spaltet selektiv den Phenylacetyl-Rest an der Amidbindung.

Abbildung 2.6 veranschaulicht die Amidspaltung durch Penicillin G-Amidase in Anwesenheit von Wasser. Da die Reaktion im basischen pH-Bereich stattfindet, ergeben sich Ladungsverschiebungen der resultierenden (und hier dargestellten) Reaktionsprodukte 6-Nitro-3-aminobenzoic acid (im Falle von NIPAB als Substrat) und 7-Amino-4-methylcoumarin (im Falle von PMC), welche photometrisch detektiert werden können. Das Reaktionsprodukt von NIPAB absorbiert im blauen Bereich bei einer Wellenlänge von 405 nm (NIPAB). Das Abbauprodukt von PMC ist fluorogen und emittiert bei 430 nm, wobei das Anregungsmaximum bei 365 nm liegt [30].

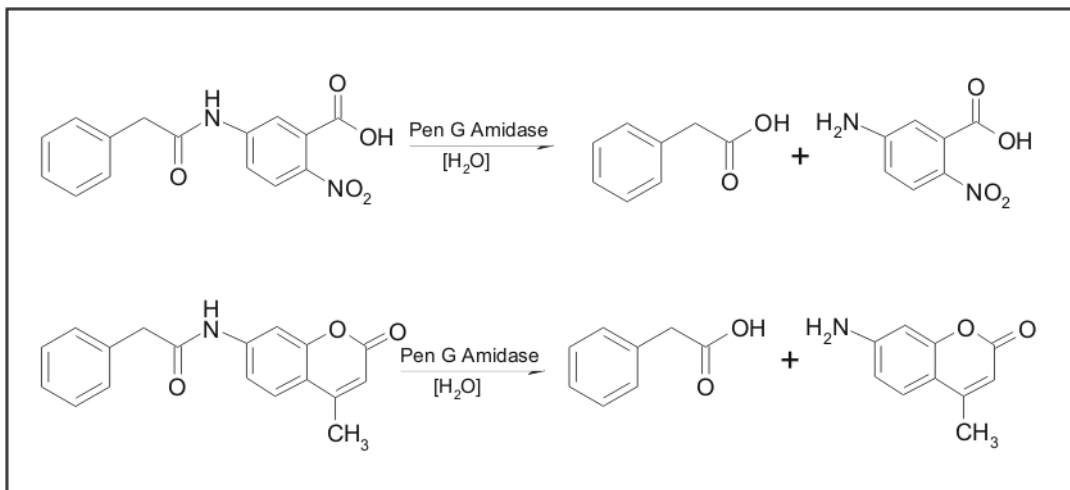


Abb. 2.6: Enzymatische Amidspaltung von NIPAB (obere Reaktionsgleichung) und PMC durch Penicillin G-Amidase

2.3.2.2 pNPA (*para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität von *E. coli* K12 pJOE 2702-Rohextrakten)

Das Verfahren zur Messung der Aktivität von *para*-Nitrobenzyl-Esterase ist analog zu dem im vorangegangenen Unterabschnitt erläuterten NIPAB-Assay. Unter Verwendung eines UV/VIS-Spektralphotometers werden die potenziell enzymhaltigen Zellrohextrakte mit einem Substrat zur Reaktion gebracht, dessen Abbauprodukt ein photometrisch auswertbares Signal im sichtbaren Bereich erzeugt.

Bei der zu Grunde liegenden Reaktion handelt es sich um eine Esterspaltung, die Verseifung eines *para*-Nitrophenylesters, da dieser ein spezifisches Substrat für die produzierte *para*-Nitrobenzyl-Esterase darstellt. Basierend auf dem in [17] genannten Assay katalysiert die *para*-Nitrobenzyl-Esterase die Verseifung des Esters *para*-Nitrophenylacetat unter Bildung von *para*-Nitrophenol (vgl. Abb. 2.7), welches im basischen Bereich (pH 7,5) als *para*-Nitrophenolat-Ion vorliegt.

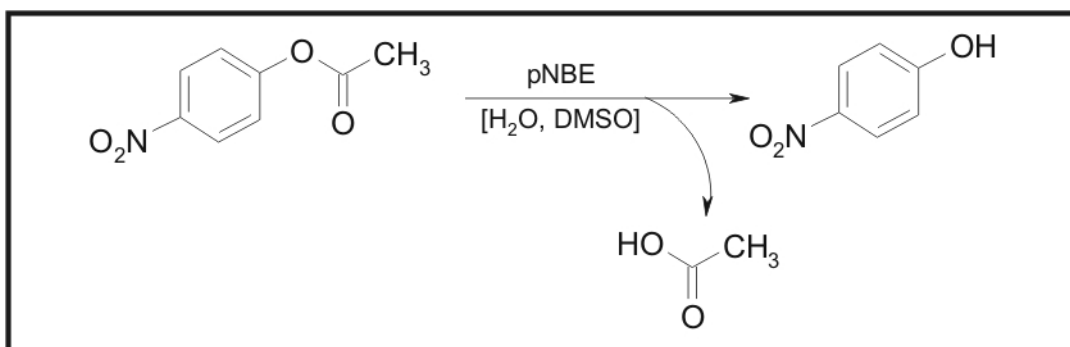


Abb. 2.7: Enzymatische Esterspaltung von *para*-Nitrophenylacetat (pNPA) durch *para*-Nitrobenzyl-Esterase

Das gebildete *para*-Nitrophenolat-Ion (in der obigen Abbildung ungeladen dargestellt) kann unter den in der Einleitung dieses Unterabschnitts genannten Bedingungen bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch detektiert werden. Unter der Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten und der Wahl einer geeigneten Ausgangskonzentration kann hier über die photometrisch gemessene Absorption linear auf die Volumenaktivität geschlossen werden.

2.3.2.3 DNS (Levansucrase-Aktivität von *B. megaterium* pMM 1525-Zellkultur-Überständen)

Im Vergleich zu den zwei oben genannten photometrischen Verfahren zur off-line-Bestimmung von Penicillin G-Amidase und *para*-Nitrobenzyl-Esterase ergeben sich für die Messung der Levansucrase-Aktivität von *B. megaterium* pMM 1525 zwei wesentliche Unterschiede:

Zum einen werden hier keine Zellrohextrakte, sondern die Medienüberstände gemessen, da das mikrobiell produzierte Enzym, die Levansucrase, ins Medium abgegeben wird. Zum anderen erfolgt der photometrische Schritt zur Bestimmung der Volumenaktivität nicht direkt mit dem Enzym. Der enzymhaltige Kulturüberstand wird zunächst mit einer acetatgepufferten Reaktionslösung inkubiert. Der Hauptbestandteil der Reaktionslösung ist Saccharose, welche der Levansucrase als Substrat dient. In Abhängigkeit von der Konzentration der Levansucrase und der Reaktionszeit wird neben *D*-Fructose auch *D*-Glucose gebildet (vgl. dazu auch Abb. 2.13 auf Seite 25).

Die *D*-Glucose kann im folgenden Schritt mit dem photometrisch nachweisbaren 3,5-Dinitrosalicylsäure-Reagenz umgesetzt werden. Hierbei handelt es sich um eine Redoxreaktion; DNS fungiert als Oxidationsmittel, welches für einen definierten Zeitraum mit der *D*-Glucose umgesetzt wird. Nach der Reaktion liegt 3,5-Dinitrosalicylsäure als 3-Amino-5-nitro-Verbindung vor, deren photometrische Eigenschaft sich nachweislich von der Ursprungsverbindung unterscheidet und die somit bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert werden kann (vgl. Abb. 2.8).

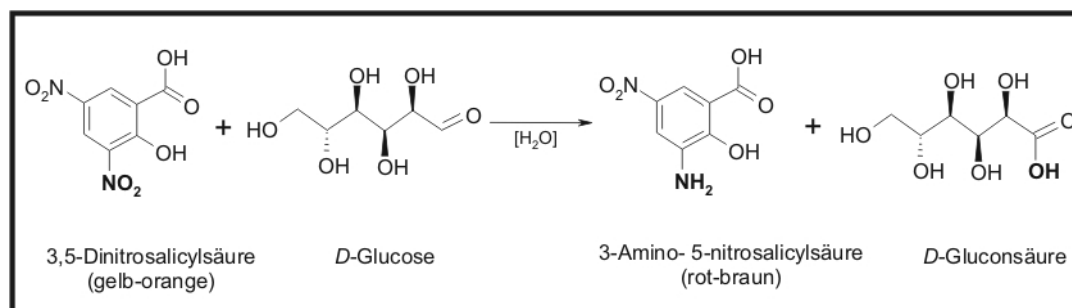


Abb. 2.8: Indirekter Nachweis der Levansucrase-Aktivität über die Redoxreaktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure mit *D*-Glucose. Die Konzentration der *D*-Glucose ist in diesem photometrischen Verfahren abhängig von der enzymatischen Spaltung von Saccharose in einem vorangehenden Reaktionsschritt (vgl. dazu auch Abb. 2.13 auf Seite 25).

Unter Verwendung einer Kalibrationsgeraden (Messsignalintensitäten unterschiedlicher *D*-Glucose-Ausgangskonzentrationen nach der Reaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure) kann die Konzentration der eingesetzten *D*-Glucose bestimmt werden. Da diese im ersten Reaktionsschritt enzymatisch aus Saccharose generiert wurde, kann somit mittelbar auf die Levansucrase-Aktivität geschlossen werden [22].

2.3.3 Ermittlung der Verweilzeit

Die folgende Skizze (Abb. 2.9) veranschaulicht die experimentelle Bestimmung des Verweilzeitverhaltens der Fermenterkombination (vgl. Abschnitt 3.1.2).

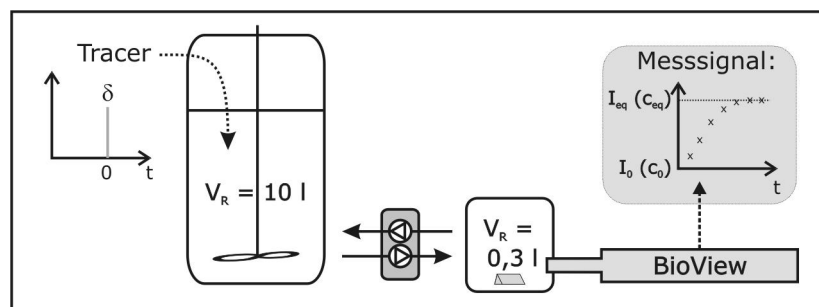


Abb. 2.9: Skizze zum Versuchsablauf der Verweilzeitbestimmung. Der Tracer wird in Form einer Dirac- δ -Funktion (in der Skizze mit δ gekennzeichnet) in den Hauptfermenter gegeben. Im Versuchsfermenter resultiert eine Sättigungsfunktion.

Bei laufender Tandempumpe wird ein Fluoreszenz-Tracer (hier: Riboflavin) zum Zeitpunkt t_0 des Versuchs in Form eines Dirac-Stoßes in den Hauptfermenter eingespritzt. Der verdünnte Tracer gelangt in den Versuchsfermenter, das Fluoreszenz-Signal wird dort mittels BioViews aufgezeichnet.

Um die Zeit zu ermitteln, welche vergeht, bis sich ein Konzentrations-Gleichgewicht (c_{eq}) zwischen beiden Fermentern eingestellt hat, wird das gemessene Signal ausgewertet. Der ursprüngliche Dirac-Stoß wird im Hauptfermenter in idealer Form direkt in eine abgeschwächte Sprungfunktion (Heaviside-Funktion) umgewandelt und gelangt in dieser Form in den Versuchsfermenter. Das resultierende Signal stellt im zeitlichen Verlauf eine Sättigungsfunktion dar, deren Ursprung bei einem Wert von 0 liegt und deren Endwert aus der Gleichgewichts-Konzentration (c_{eq}) resultiert.

Um die Messdaten in ein vergleichbares Raster einzubinden, wird die mittlere Verweilzeit berechnet, welche auf einer exponentiellen Modellfunktion beruht (s.u.). Die mittlere Verweilzeit \bar{t} kann mithilfe des Messsignals unter Verwendung der hydrodynamischen Verweilzeit τ (dem Quotienten aus Reaktorvolumen V_R und dem Volumenstrom \dot{V}) bestimmt werden.

Diese Bestimmung basiert auf der Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$, welche direkt aus dem Messsignal resultiert. Aus der $F(t)$ -Funktion wird zunächst die Verweilzeitverteilung $E(t)$ und darüber die mittlere Verweilzeit berechnet.

Unter Anwendung der Momenten-Methode ist die mittlere Verweilzeit gegeben als $\bar{t} = \int_0^{\infty} t E(t) dt$.

Die Verweilzeitverteilung $E(t)$ kann – ausgehend von der vorliegenden Verweilzeitsummenfunktion – über die Gleichung

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt}$$

bestimmt werden. Die Verweilzeitsummenfunktion liegt als Messwert vor. Parallel dazu wird für jeden Messzeitpunkt ein Intensitätswert über die Modellfunktion über die Formel

$$F(t) = (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \cdot \delta_{Sig}$$

berechnet. Die Werte für τ ergeben sich aus den technischen Grundgegebenheiten (Pumprate und Reaktorvolumen); für t werden die Messzeitpunkte des BioViews herangezogen.

Das Modell wird an die Messwerte angepasst, indem der empirische Korrekturfaktor δ_{Sig} variiert wird. Hierbei darf der Faktor innerhalb eines Verweilzeitexperiments zwischen den einzelnen Messwerten nicht geändert werden. Eine Anpassung darf lediglich von einem Verweilzeit-Experiment zum nächsten vorgenommen werden.

Die rechnerische Anpassung des Korrekturfaktors wird iterativ durchgeführt. Ziel dieser Iteration ist die Minimierung der Fehlerquadratsumme zwischen den Modellwerten und den Messsignalen $(I_{berechnet} - I_{gemessen})^2$.

Ein Beispiel der Messwerte im Vergleich zu den Daten der Modellfunktion zeigt Abbildung 2.10.

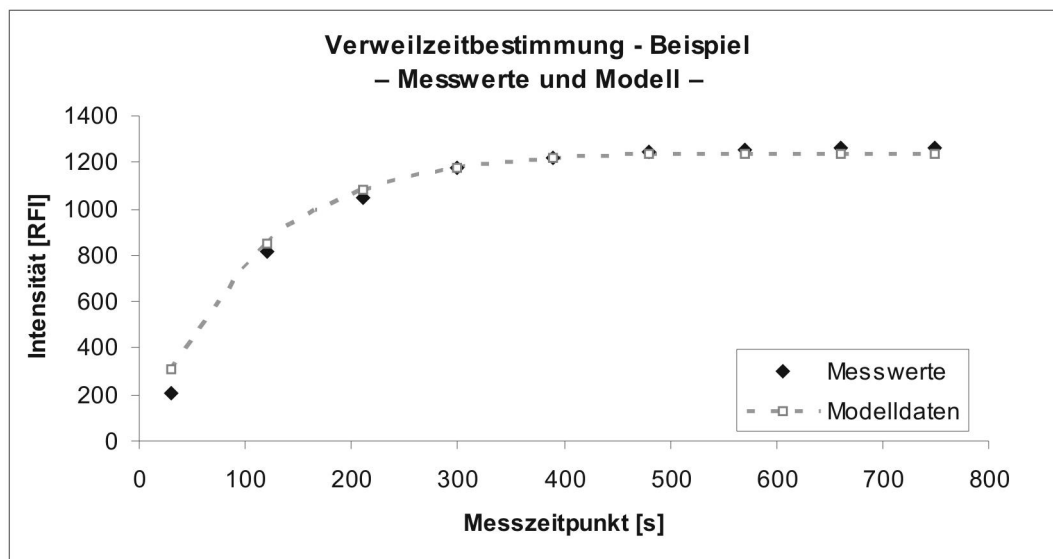


Abb. 2.10: Vergleich von Modelldaten und Messwerten bei der Bestimmung der mittleren Verweilzeit. Nach der iterativen Näherung des zeitlichen Faktors t weichen die Modelldaten im Mittel um 5 % von den Messdaten ab.

Die hier erkennbare Abweichung zwischen den Daten beträgt im Mittel 5 %. Diese Abweichung ist hinreichend genau, um das Modell auf alle Messungen anzuwenden. Im Abschnitt 3.1.2 wird die mittlere Verweilzeit anhand des hier beschriebenen iterativen Verfahrens ermittelt.

2.4 Spezifikationen der verwendeten Stämme

2.4.1 *E. coli* 5K pHM12

Allgemeines

Der Stamm *E. coli* 5K pHM12 zählt zu den ältesten, im Institut für Technische Chemie verwendeten Modellorganismen.

Die Gene des Plasmids pHM12 kodieren für die intrazelluläre Bildung des Enzyms Penicillin G-Amidase (EC-Nr. 3.5.1.11) [20]. Das Enzym wird großtechnisch im Pharma-Bereich verwendet, da es die Bildung der 6-APA-Einheit (6-Aminopenicillansäure) aus unterschiedlichen Penicillinen katalysiert (vgl. Abb. 2.11), welche als Vorläufer verschiedener halbsynthetischer β -Lactam-Antibiotika wie beispielsweise Penicillin V und Ampicillin dient.

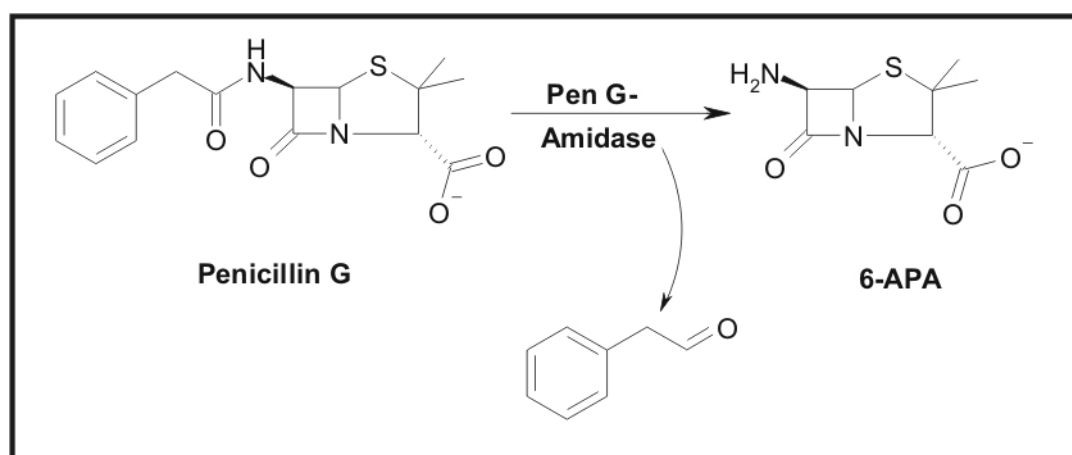


Abb. 2.11: Mechanismus der enzymatischen Amidspaltung von Penicillin G (Benzylpenicillin) in 6-Aminopenicillansäure (6-APA) unter Freisetzung von Phenylethanal

Penicillin G als Substrat bildet bei dieser Reaktion den Schwerpunkt, da die Phenylacetyl-Seitenkette bevorzugt angegriffen wird. Die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante (K_m) beträgt für *E. coli* 5K pHM12 22 mM; für die Penicillin G-Amidase aus dem Wildtyp ATCC 11105 (s.u.) wurde 10 mM ermittelt [27]. Zudem ist Penicillin G in wirtschaftlicher Hinsicht als Ausgangssubstanz von 6-APA bevorzugt, da es in großer Menge zur Verfügung steht und somit zu den meistproduzierten Antibiotika zählt, welche auf dem 6-APA-Grundgerüst aufbauen.

Genetik

Der vorliegende Stamm wurde im Jahr 1980 zuerst beschrieben [27]. Das für die erhöhte Bildung von Penicillin G-Amidase verantwortliche Plasmid pHM12 ist das Resultat mehrerer gentechnischer Grundoperationen der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts.

Ausgehend vom Stamm *E. coli* ATCC 11105, welcher das Zielprotein sowohl induziert als auch uninduziert exprimiert (Induktor: Phenylacetat), wurde eine Genbibliothek erstellt. Hierzu wurden *Hind*III-Fragmente des gesamten Chromosomensatzes zusammen mit dem *Hind*III-geschnittenen Cosmidvektorsystem pJC720 nach Ligation und in vitro-Verpackung auf Minimalmedium ausplattiert. Als Wirt zur DNA-Amplifikation diente *E. coli* HB101, die Transfektion erfolgte mithilfe von λ -Phagen. Die verwendeten Platten wurden zur Überprüfung der *pro+* und *leu+*-Eigenschaften herangezogen. Positive Klone wurden anschließend mithilfe der *S. marcescens*-overlay-Methode [28] erhalten. Der einzige daraus resultierende Organismus erhielt die Bezeichnung *E. coli* pHM5 und produzierte das Zielprotein ausschließlich nach chemischer Induktion.

E. coli pHM5 diente als Vorläufer für die Subklonierung auf das damals etablierte Vektorsystem pBR322, einem der ersten high copy Plasmide. Nachdem die Ampicillin-Resistenz innerhalb der Plasmid-DNA von pBR322 durch Einsatz der Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Pst*I entfernt wurde, wurde an dieser Stelle ein entsprechend aufbereitetes Fragment von pHM5 inseriert.

Nach Transformation auf einen *E. coli* Sicherheitsstamm wurden die Klone mithilfe der verbliebenen Tetracyclin-Resistenz selektiert und auf deren Penicillin G-Amidase-Aktivität gescreent. Es wurde ein Amidase-positiver Klon identifiziert, der das gesuchte 4900 kDa große *Eco*RI-*Pst*I-Fragment von pHM5 trug. Dieser wurde als *E. coli* pHM6 bezeichnet. Dieser Organismus war bereits nicht von der Anwesenheit des Induktors abhängig.

Als letzter Schritt erfolgte eine unspezifische UV-Mutagenese des pHM6 Klons. Der hieraus resultierende Organismus (*E. coli* 5K pHM12) wies eine 45-fach höhere Penicillin G-Amidase-Aktivität als der nicht induzierte Wildtyp auf; im Vergleich zum induzierten Wildtyp beträgt dies eine Steigerung um einen Faktor von 7,5.

2.4.2 *E. coli* K12 pJOE 2702

Zur Kultivierung werden Zellen eines rekombinanten *E. coli* K 12 Stammes verwendet, welcher defizient ist in Bezug auf eine *L*-Rhamnose-Isomerase. Diese Zellen tragen Derivate des *L*-Rhamnose-induzierbaren mid copy Plasmids pJOE2702 [44] als Expressionssystem (vgl. Restriktionskarte des Plasmids pJOE2702 im Abschnitt A.4). Die Gene für die Produktion der *para*-Nitrobenzyl-Esterase liegen auf diesem Plasmid unter

transkriptioneller Kontrolle des *L*-Rhamnose-induzierbaren Promotors *rhaP* vor [40]. Das bei der Produktion entstehende Protein trägt einen C-terminalen His-Tag.

Entdeckt wurde die pNBE von Brannon *et al.* bei Untersuchungen an *B. subtilis*. Es wurde festgestellt, dass der untersuchte Bakterienstamm in der Lage war, eine Esterase zu produzieren, welche eine *p*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe von Vorläufern des Antibiotikums Cephalexin abspalten kann [4]. Die pNBE aus *B. subtilis* ist aus 489 Aminosäuren aufgebaut und das für sie kodierende Gen *pnbA* besteht aus 1470 Nucleotiden (NCBI-Datenbank).

Eine systematische Einordnung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase ist noch nicht erfolgt; grundsätzlich zählt das Enzym zu den Carboxylester-Hydrolasen (EC 3.1.1.1). Enzyme, die eine Substratspaltung unter Beteiligung von Wasser katalysieren, aber dabei auch reversibel wirken können, werden als Hydrolasen bezeichnet und stellen die 3. Hauptgruppe (EC 3) gemäß der International Union of Biochemistry dar. In *B. subtilis* ist dieses Enzym insbesondere für katabole Stoffwechselprozesse bedeutsam.

2.4.3 *B. megaterium* pMM 1525

2.4.3.1 Herkunft, Verwendung und Genetik

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm von *Bacillus megaterium* wird zur Lev-His-Produktion (MS 941, pRBBm15, P_{*xylA*}-SP_{*lipA*}-*lev*773His) eingesetzt. Er wurde von Prof. Dr. D. Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt [24]. Da es sich bei diesem Stamm um eine Neuheit am Institut handelt, soll im Folgenden ausführlicher auf die genetischen Modifikationen eingegangen werden.

Beim MS 941 handelt es sich um die definierte Mutante DSM319Δ*nprM*, bei der eine extrazelluläre Protease deletiert wurde. In diesem Stamm wurde der Promotor *xylA* modifiziert. Die *cre*-Sequenz wurde beseitigt und eine MCS eingefügt [24]. Des Weiteren wurde das Derivat WH323 des Plasmids *B. megaterium* DSM319 insertiert. Zudem wurde die Xylose-Isomerase (*xylA*) im genomischen DNA-Teil deletiert, wodurch der Konsum von Xylose als C-Quelle vermieden wird.

Die Produktsekretion wird durch das Signalpeptid *lipA* vermittelt. Das Signalpeptid wird über den Sec-Transportweg in das vorliegende Medium sekretiert. Das Plasmid pMM1525 erlaubt die durch Xylose induzierbare Produktion und Sekretion von Proteinen. Als Protein wurde das extrazelluläre Levansucrasegen *lev* des *Lactobacillus reuteri* Stamms 121 in *B. megaterium* exportiert. Zusätzlich erhielt der Stamm als Selektionsmarker eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin.

Die Abbildung 2.12 zeigt die Genkarte des Plasmids pMM1525. Der Vektor pMM1525 basiert auf dem Träger pMM1522. Die MCS befindet sich unterhalb des SP_{*lipA*} (hellblau markiert). Die Elemente für die Xylose induzierbare Genexpression in *B. megaterium* sind der induzierbare Promotor (P_{*xylA*}) und das Gen für die

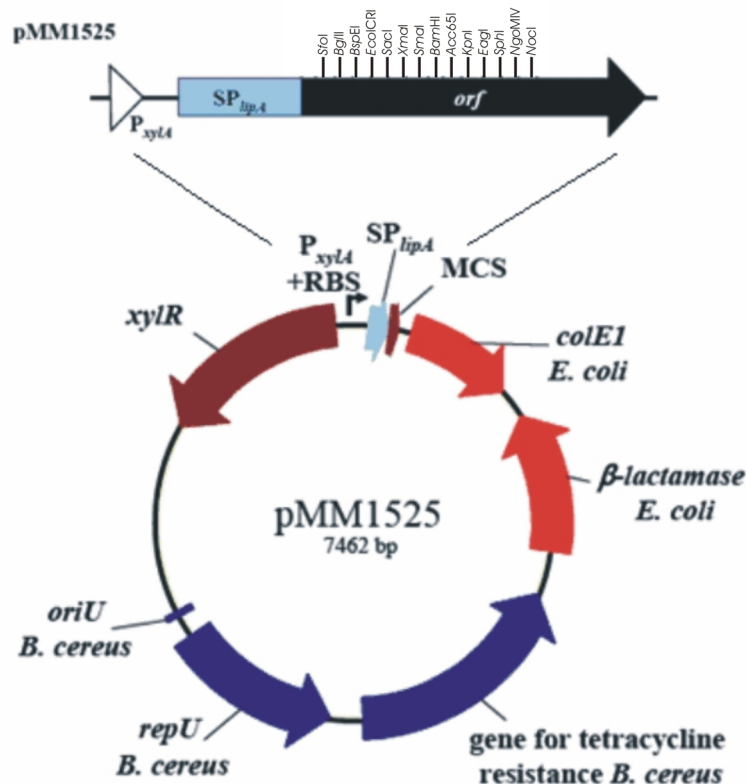


Abb. 2.12: Die Struktur des *B. megaterium* Vektors pMM1525.

Xylose-Repression (*xylR*, braun markiert). Elemente für die Plasmid-Replikation im *Bacillus sp.* *oriU* sind die Vertreter der ursprünglichen Plasmid-Replikation und des Tetracyclinresistenz-Gens (blau markiert).

Elemente für die Plasmid-Replikation in *E. coli* sind die ursprünglichen Replikationen *colE1* und das Ampicillinresistenz-Gen, welches für die Bildung der β -Lactamase kodiert [7].

2.4.3.2 Levansucrase

Sowohl die Levan- als auch die Oligosaccharidsynthese werden durch das Enzym Levansucrase (2,6 β -D-Fructan 6 β -D-Fructosyltransferase, EC 2.4.1.10) katalysiert. Das Enzym bewirkt den Transfer von β -D-Fructosylresten vom Donator Saccharose auf unterschiedliche Akzeptoren mit freier Hydroxylgruppe. Levansucrase besitzt prinzipiell drei Enzymaktivitäten. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen können, falls Saccharose auch als Akzeptormolekül dient, Oligosaccharide (oligosaccharidbildende Aktivität, Abb. 2.13 C) oder langkettiges Levan (levanbildende Aktivität, Abb. 2.13 A) entstehen, die als Endgruppe eine nicht-reduzierende Fructose-Einheit mit freier C-6-Alkoholgruppe aufweisen. Dient Wasser als Akzeptor beim Fructosyl-

transfer, wird der Donator Saccharose zu Glucose und Fructose gespalten (hydrolytische Aktivität, Abb. 2.13 B). Ein Mitglied dieser Enzymfamilie ist die CaCl_2 abhängige Levansucrase des *Lactobacillus reuteri*-Stamms 121 (110kD).

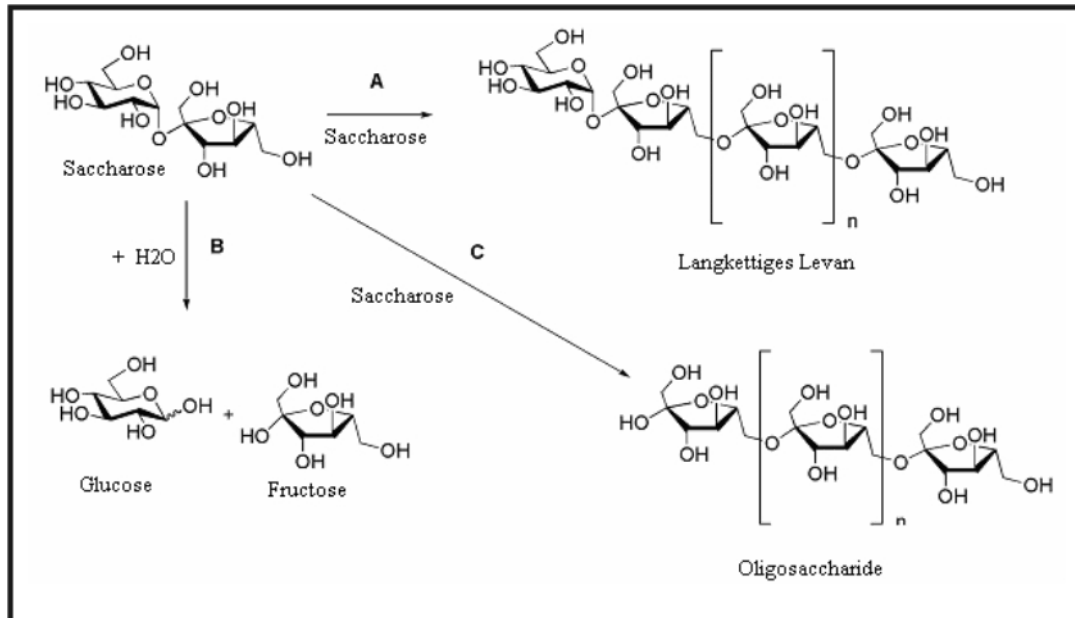


Abb. 2.13: Reaktionen, die durch Levansucrase aus *L. reuteri* 121 katalysiert werden [7].

Das katalysiert hergestellte Levan hat vielfältige Eigenschaften, z. B. kann das Polysaccharid als Verdickungsmittel in Lebensmitteln eingesetzt werden [47] und somit als Ersatz für Hydrokolloide tierischen Ursprungs (Gelatine) dienen. Im medizinischen Bereich wird die Anti-Tumor-Wirkung der Substanz [10], [11] sowie deren Verdaubarkeit und Wirkung auf den Lipidstoffwechsel (Magen-Darm-Trakt) [49] diskutiert.

2.4.3.3 Xylose-Katabolismus

Katabolit-Repression - allgemein

Nach Saier *et al.* [37] können mehrere Formen der HPr (heat stable/histidine protein) abhängigen Katabolitrepression in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt unterschieden werden:

- Die direkte Repression kataboler Gene bzw. Operons unter Beteiligung des trans-aktiven Faktors CcpA (catabolite control protein A) und des cis-aktiven Sequenzelements *cre* (catabolite responsive element).
- Die Modulation der Aktivität von Enzymen oder positiven Regulatoren des Kohlenhydrat-Katabolismus durch Phosphorylierung und
- die Kontrolle der Induktorkonzentration durch Inhibierung von PTS- und nicht PTS-Permeasen (inducer exclusion) oder durch Stimulierung der Dephosphorylie-

rung intrazellulärer Zucker-Phosphate und / oder Ausschleusung der freien Zucker (inducer expulsion).

Regulation des Xylose-Katabolismus in *Bacillus megaterium*

Über Regulation des Kohlenhydrat-Katabolismus bei *Bacillus megaterium* ist im Vergleich zu *Bacillus subtilis* wenig bekannt. Lediglich die Kontrolle des Xylose-Operons (*xyl*-Operon) wurde hinreichend untersucht (vgl. Abb. 2.14).

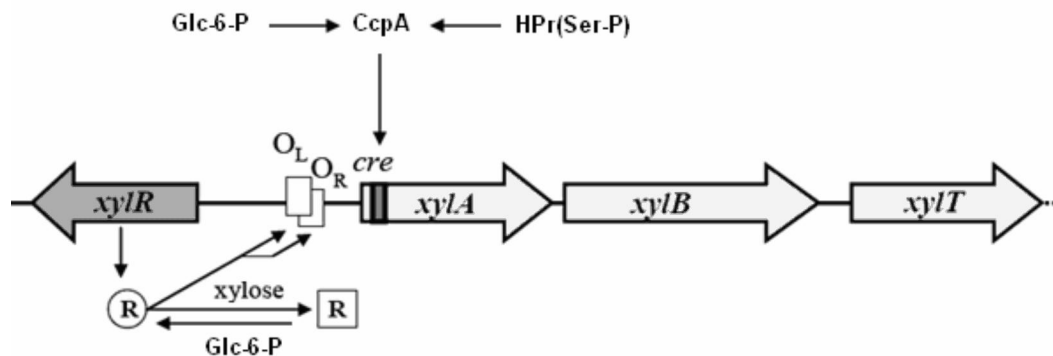


Abb. 2.14: Genetische Organisation und Regulation des Xylose-Operons in *Bacillus megaterium* [modifiziert nach Schmiedel und Hillen [39]]. Abkürzungen: *xylR*/ *XylR* = Repressorgen/-protein; *xylA* = Xylose-Isomerase-Gen; *xylB* = Xylosekinase-Gen; *xylT* = Xylose-Permease-Gen; *cre* = catabolite responsive element; O_L/O_R = Operatoren; CcpA = catabolite control protein A; HPr = heat stable/histidine protein; Glc-6-P = Glucose-6-phosphat

Das *xyl*-Operon von *Bacillus megaterium* besteht aus drei Genen (*xylA*, *xylB* und *xylT*), deren Produkte an der Aufnahme und dem Abbau von *D*-Xylose beteiligt sind [36], [38]. Der Xylose-Transport wird durch das *xylT*-Genprodukt katalysiert, das für einen Xylose-H⁺-Symporter kodiert.

Die aufgenommene Xylose wird zunächst durch die Xylose-Isomerase (*XylA*) zu Xylulose isomerisiert und anschließend durch die Xylulokinase (*XylB*) zu Xylulose-5-phosphat umgesetzt. Die Expression des *xyl*-Operons unterliegt der Substrat-induktion durch Xylose und der Katabolit-Repression durch Glucose [35]. Dementsprechend zeigt *Bacillus megaterium* bei Vorliegen beider C-Quellen im Medium ein diauxisches Wachstumsverhalten [39].

Die Substrat-Induktion beruht auf dem Xylose-Repressor *xylR*, dessen korrespondierendes Gen stromaufwärts des *xyl*-Operons lokalisiert ist. In Abwesenheit von Xylose bindet der Repressor an zwei tandemartig angeordnete, überlappende Operatorsequenzen (O_L und O_R) im intergenetischen *xylR*/*xylA*-Bereich und verhindert die Expression des Operons [13]. Durch Untersuchungen von Dahl *et al.* (1995) konnte nachgewiesen werden, dass Glucose-6-phosphat als Anti-Induktor wirkt, der die Xylose-Induktion kompetitiv hemmt und so partiell zur Katabolit-Repression beiträgt.

Der überwiegende Teil der Katabolit-Repression wird jedoch durch einen CcpA-abhängigen Mechanismus bestimmt. Das *ccpA*-Gen aus *Bacillus megateri-*

um wurde von Hueck *et al.* [18], [19] charakterisiert und die Beteiligung an der Katabolit-Repression des *xyl*-Operons nachgewiesen. Innerhalb des *CcpA*-Gens konnte ein *cre*-Element identifiziert werden, das als Bindungsstelle für das *CcpA*-Protein dient. Mithilfe der Bindungsstudien wurde herausgefunden, dass die *cre/CcpA*-Interaktion durch HPr(Ser-P) stimuliert wird. Auch eine Glucose-6-phosphat abhängige *cre/CcpA*-Interaktion wird von Grösseriger *et al.* beschrieben [15]. Diese Interaktion folgt einem kooperativen Mechanismus und schließt zwei stark degenerierte *cre*-Elemente mit ein. Dadurch kann die glykolytische Aktivität der Zelle die Repression des *xyl*-Operons auf verschiedene Arten kontrollieren:

- (a) durch Akkumulation von Fructose-1,6-bisphosphat und die damit verbundene regulatorische Phosphorylierung des HPr-Proteins,
- (b) durch direkte Interaktion des Glucose-6-phosphats mit dem *CcpA*-Protein.

2.5 Experimentelle Schwerpunkte

Die in den vorangegangenen Unterabschnitten beschriebenen Stämme stellen eine Auswahl von Organismen dar, welche zur Überprüfung der technischen Möglichkeiten der Fermenterkombination herangezogen wurden. Im Folgenden werden die Schwerpunkte der Stämme unter der Berücksichtigung der Aufgabenstellung kurz beschrieben. Tabelle 2.3 auf der folgenden Seite fasst die Schwerpunkte stichpunktartig zusammen.

◦ *E. coli* 5K pHM12

Zu Beginn der Arbeiten wurde *E. coli* 5K pHM12 ausgewählt, weil es sich hierbei um einen seit vielen Jahren etablierten rekombinanten Bakterienstamm handelt, dessen Kultivierungsparameter genau beschrieben sind. Zudem ist der Stamm aus bioprozesstechnischer Sicht einfach zu handhaben aufgrund der Tatsache, dass die Produktbildung – ohne die Notwendigkeit einer Induktion – direkt mit der Entwicklung der Biomasse korreliert.

In Bezug auf die Fermenterkombination dient der Stamm zur Überprüfung der Rahmenbedingungen kurzzeitiger Kultivierungen im Versuchsfermenter. Somit soll ein erster Eindruck entstehen, ob die erhaltenen Resultate Aufschluss über das Produktionsverhalten geben können, welches von der Wachstumsphase der batch-Kultur abhängig ist. Zudem soll überprüft werden, ob offline und online gemessene Enzymaktivitäten quantitativ korrelieren. Hierbei dienen die offline (mittels NIPAB) gemessenen Werte als Grundlage derer, welche fluoreszenzspektrometrisch (mittels PMC direkt im Versuchsfermenter) ermittelt wurden.

◦ *E. coli* K12 pJOE 2702

Die Kultivierungen des Stamms *E. coli* K12 pJOE 2702 dienen dazu, die erhaltenen Ergebnisse aus den Experimenten mit *E. coli* 5K pHM12 auszuweiten. Dies geschieht im Hinblick auf die hier notwendige chemische Induktion mit *L*-Rhamnose, welche

die Produktion des Zielproteins initiiert. Schwerpunkt hierbei ist die Fragestellung, zu welchem Zeitpunkt die chemische Induktion innerhalb der batch-Kultur den stärksten Einfluss hat.

◦ ***B. megaterium* pMM 1525**

Nach Abschluss der oben genannten Versuchsreihen mit den Modellorganismen *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702 soll zuletzt *B. megaterium* pMM 1525 als ein produktionsrelevanter Stamm auf die wachstumsphasenabhängige Enzymproduktion überprüft werden. Hierbei gilt es, unterschiedliche Parameter wie Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt und Selektionsdruck zu variieren, um eine wirtschaftlich optimale Produktion gewährleisten zu können.

In Tabelle 2.3 sind die Schwerpunkte der Kultivierungen im Hinblick auf die prozesstechnische Entwicklung der Fermenterkombination stichwortartig zusammengefasst:

Tab. 2.3: Kultivierungs-Schwerpunkte der einzelnen Stämme innerhalb der Fermenterkombination

Organismus	Aufgabenschwerpunkt
<i>E. coli</i> 5K pHM12	i) Überprüfung der Rahmenbedingungen kurzzeitiger Kultivierungen im Versuchs-Reaktor ii) Korrelation von offline und online gemessenen Daten
<i>E. coli</i> K12 pJOE 2702	i) Induktionsmöglichkeit (zeitliche Abstände) ii) Induktionszeitpunkt
<i>B. megaterium</i> pMM 1525	Variation von Kultivierungsparametern zur Verbesserung der Ausbeute (Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt, Selektionsdruck)

3 Experimentelles

In diesem Kapitel werden die experimentell ermittelten Ergebnisse präsentiert und kritisch betrachtet.

Bevor die eigentlichen Kultivierungen in der Fermenterkombination durchgeführt werden konnten, mussten drei unterschiedliche, grundlegende Aspekte vorab geklärt werden. Diese Vorversuche bezogen sich auf bioprozesstechnische Aspekte sowohl im Fermentations- als auch im Downstream-Bereich.

Zunächst musste sichergestellt werden, dass die verwendeten Organismen mit dem synthetischen Medium CgXII kompatibel waren (vgl. Unterabschnitt „Medienkompatibilität“, Kapitel 3.1.1), um die Möglichkeit der online-Prozessdatenerfassung mittels 2D-Fluoreszenz (BioView) sicherzustellen.

Des Weiteren war es aus technischer Hinsicht notwendig, die Verweilzeitverteilung des verwendeten Aufbaus zu charakterisieren, um einen groben Überblick zu bekommen, mit welcher Vorlaufzeit für die Peristaltikpumpe gerechnet werden muss, um die Versuchsfermenter-Einheit an den Fermenter für die Hauptkultivierung anzukoppeln. Auf diesen Aspekt wird im Kapitel 3.1.2 („Verweilzeitverhalten“) eingegangen.

Im Kapitel 3.1.3 („Zellaufschluss“) wird der Bereich des Downstreamings näher betrachtet. Diejenigen Organismen wie *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702, bei welchen das Produkt nicht ins Medium sekretiert wird, müssen zunächst mechanisch oder enzymatisch aufgeschlossen werden. Um unter den gegebenen technischen Einrichtungen des Instituts eine einheitliche Zellaufschlussmethode für diese Arbeit zu etablieren, wurde überprüft, unter welchen Bedingungen der Aufschluss mittels des Labor-Homogenisators (Ultraturrax) zu auswertbaren Ergebnissen führt. Hierbei stand neben verfahrenstechnischen Parametern die Frage im Vordergrund, inwieweit interpretierbare Ergebnisse direkt aus dem Zellrohextrakt erhalten werden können, ohne weitere, aufwändige chromatographische Aufreinigungsverfahren durchführen zu müssen.

3.1 Vorversuche

3.1.1 Medienkompatibilität

Die ersten Arbeiten mit jedem der verwendeten Bakterienstämme betrafen die Überprüfung auf dessen Adaptionsvermögen in Bezug auf das neue Medium, welches in der Fermenterkombination zum Einsatz kommen sollte. Daher wurden zu Beginn der Arbeiten Experimente in 500 ml-Schüttelkolben (Arbeitsvolumen: 100 ml) durchgeführt. Hierzu wurden die Kolben direkt mit 500 μ l einer Gefrierkultur angeimpft und für mehrere Stunden bei 30 °C inkubiert. (Animpfverhältnis: 1 : 200 (v/v); GK in Komplexmedium, vgl. Abschnitt A.1.1.)

In der Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst.

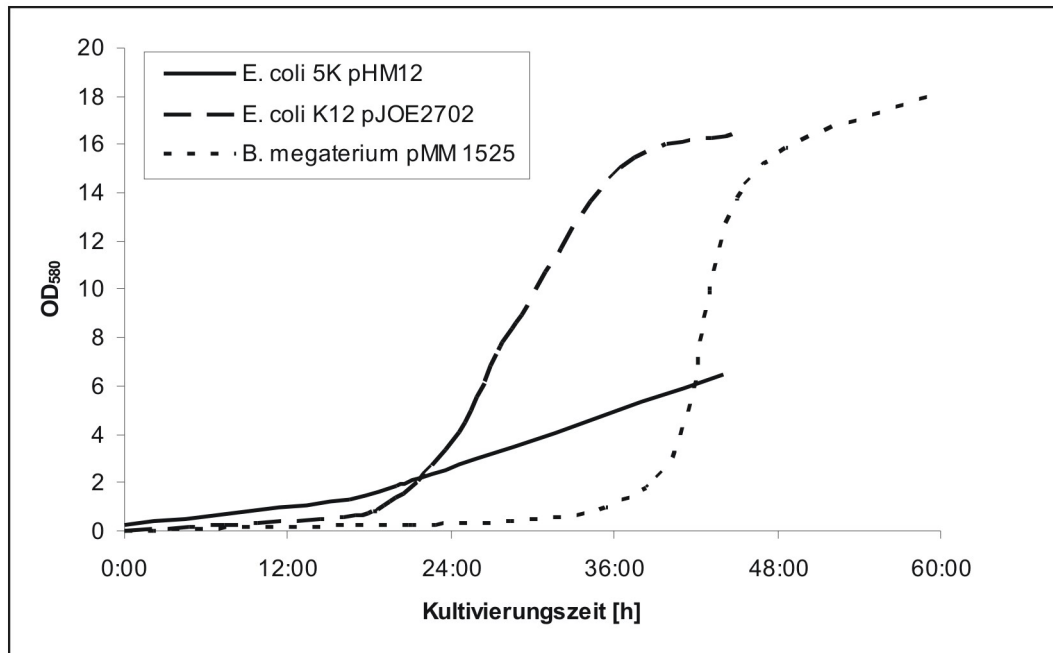


Abb. 3.1: Experimentelle Bestimmung der Medienkompatibilität. Anhand des Verlaufs der Optischen Dichte ist erkennbar, dass sich die drei verwendeten Bakterienstämme im synthetischen Medium CgXII vermehren. Der Wachstumsverlauf ist im Vergleich zu Standard-Komplexmedien verzögert (60 h statt ca. 24 h). Bei *E. coli* 5K pHM12 ist keine exponentielle Phase erkennbar; die zwei anderen Stämme weisen eine lange lag-Phase auf.

Alle drei Stämme zeigten bereits im Schüttelkolben – also unter schlechteren Kultivierungsbedingungen als im Fermenter – erkennbares Wachstum. Deutlich wird zudem, dass im Falle von *E. coli* 5K pHM12 keine distinkte exponentielle Phase auszumachen ist; die OD am Ende der Kultivierung deutet jedoch auf eine moderate Adaption der Organismen an das Medium hin.

Der Ursache für dieses Verhalten wurde im Folgenden nicht weiter Beachtung geschenkt, da es im Hinblick auf das weitere Vorgehen ausreichte, rein qualitativ festzustellen, ob die Zellen das Medium annehmen oder nicht. Ein Grund für das beobachtete Wachstumsverhalten könnte sein, dass die Kultivierungen direkt aus der Gefrierkultur angeimpft wurden, was einen Anpassungsprozess deutlich erschwert.

Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der beiden anderen Bakterienstämme innerhalb dieser Versuchsreihe. *E. coli* K12 pJOE 2702 und *B. megaterium* pMM 1525 zeigen einen normalen Wachstumsverlauf, der etwas verlangsamt und zu Beginn von einer langen lag-Phase gekennzeichnet ist. Auch hier wurden die Schüttelkulturen direkt aus Gefrierkulturen angeimpft. Analog zu *E. coli* 5K pHM12 kann auch hier festgehalten werden, dass die qualitative Aussage hinsichtlich des Wachstumsverhaltens als Grundlage für weitere Experimente innerhalb der Fermenterkombination absolut aus-

reichend sind. Der Wachstumsverlauf von *E. coli* 5K pHM12 deutet unter Umständen auf die Notwendigkeit einer Optimierung der Medienzusammensetzung hin.

Bei diesen Experimenten wurde zunächst vorausgesetzt, dass die Bildung der jeweiligen Zielproteine in gewisser Weise mit dem Wachstum korreliert. Die Quantifizierung dieser Korrelation stand nicht im Fokus dieser Versuchsreihe sondern war Bestandteil anschließender Fermenter-Kultivierungen.

Fazit

Für die weiteren Untersuchungen waren die Ergebnisse aller drei Bakterienstämme ausreichend. Die verringerte Wachstumsrate kam dabei den Anforderungen einer wachstumsbezogenen Differenzierung der Enzymproduktion sogar entgegen, da somit ausreichend Zeit für Einzelexperimente innerhalb des gesamten Verlaufs der Hauptkultur zur Verfügung stand (vgl. Abschnitt 2.2 auf Seite 9).

Es muss betont werden, dass es sich bei den hier verwendeten Stämmen nicht um eine Auswahl in Bezug auf deren Medienkompatibilität handelt. Ausschließlich jeder – im Hinblick auf dessen Medienaffinität willkürlich ausgewählte – Stamm wies grundsätzliches Wachstum auf. Dies lässt darauf schließen, dass sich CgXII in der hier abgeänderten Form grundsätzlich gut als synthetische Alternative zu den üblichen Komplexmedien für Kultivierungen von vielen Prokaryonten eignet.

3.1.2 Verweilzeitverhalten der Fermenterkombination

Da es sich bei der Kombination der beiden Fermenter um einen neuen, in prozesstechnischer Hinsicht noch nicht charakterisierten Aufbau handelt, wurden einmalig Experimente durchgeführt, die das Verweilzeitverhalten beschreiben. In dieser Phase des Gesamtprojekts wurden keine lebenden Organismen, sondern eine definierte Konzentration eines Fluoreszenz-Tracers (hier: Riboflavin) eingesetzt. Nach Verbindung der beiden Reaktoren und Aktivierung der Umwälzpumpe wurde der Tracer in konzentrierter wässriger Lösung (500 μ l, 500 mg/l) manuell in den Kultivierungs-Reaktor (Arbeitsvolumen: 8 l) eingespritzt. Ab diesem Zeitpunkt wurde eine Fluoreszenzmessung mittels BioViews im Versuchsfermenter (Arbeitsvolumen: 300 ml) gestartet.

Zunächst wurde eine Kalibration des Verhältnisses von gemessener Signalintensität zu eingesetzter Tracer-Konzentration durchgeführt. Hierbei wurden Konzentrationen der Tracer-Stammlösung von 0 – 1000 μ g/ml gewählt.

In Abhängigkeit von der Pumpleistung (20 – 90 %, entsprechend 80 – 380 ml/min) ergaben sich die in Abb. 3.3 dargestellten Emissionssignale bei dem für Riboflavin charakteristischen Wellenlängenpaar ex450/em510 (vgl. Tab. 2.2 auf Seite 14).

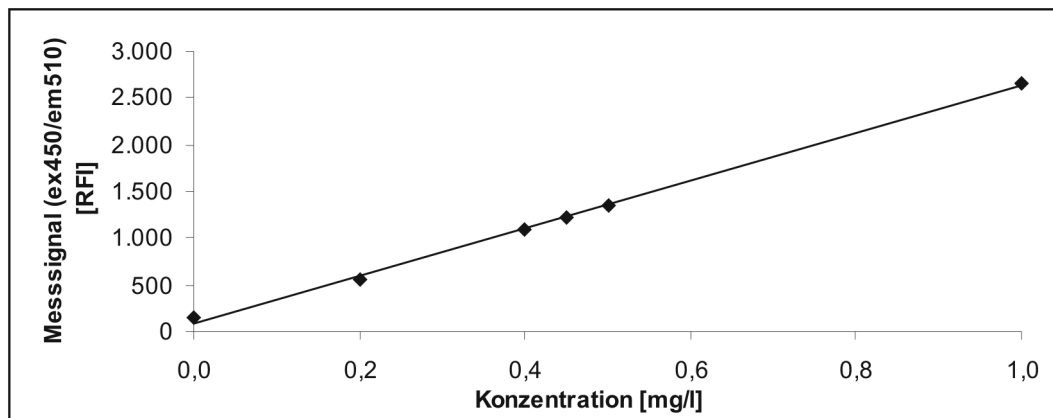


Abb. 3.2: Kalibration des Messsignals: In Abhängigkeit der eingesetzten Tracer-Konzentration im Verweilzeit-Experiment ergeben die fluorometrisch bei ex450/em510 ermittelten Messsignale einen linearen Zusammenhang.

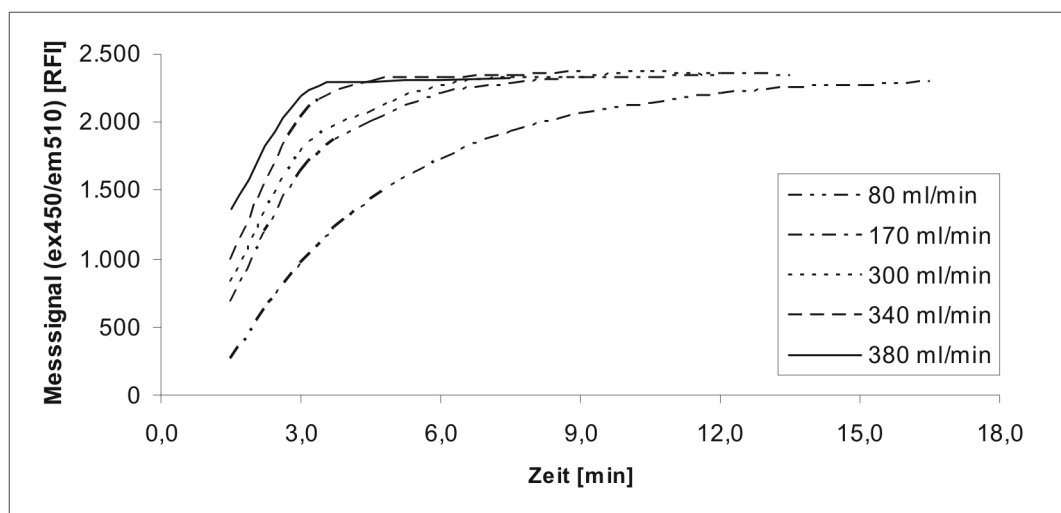


Abb. 3.3: Experimentelle Bestimmung der Verweilzeit innerhalb der Fermenterkombination. In Abhängigkeit von der Pumprate werden die maximalen Intensitäten der photometrisch detektierten Riboflavinlösung im Versuchsfermenter nach unterschiedlichen Zeiten erreicht.

Die maximalen Intensitäten wurden in Abhängigkeit von der Pumprate zwischen ca. 4 (Pumpleistung: 90 %) und 15 min (Pumpleistung: 20 %) erreicht. Nach diesem Zeitraum bleibt die Konzentration gleich, da sich hier ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen beiden Fermentern eingestellt hat. Der Maximalwert von $2.330 (\pm 45)$ entspricht einer vorhandenen Konzentration von ca. $0,8 \text{ mg/l}$ (vgl. Kalibrationsgerade, Abb. 3.2), da hier im Kultivierungsfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 10 l statt 8 l gearbeitet wurde.

Ziel des Experiments war, eine minimale Pumpen-Vorlaufzeit zu ermitteln, damit das Volumen des Versuchsfermenters bei zukünftigen Einzelexperimenten mindestens einmal komplett ausgetauscht wird, um gleiche Konzentrationen (respektive Zelldich-

ten) in beiden Fermentern sicherzustellen. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass bei einer minimalen Pumprate von 20 % mit einer Vorlaufzeit von mindestens 15 min gerechnet werden muss.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass dieser Versuchsteil bei ausgeschalteter Begasung durchgeführt wurde. Da diese Vorversuche reale Kultivierungsbedingungen repräsentieren sollen, wurde zuletzt noch ein Vergleich der hier ermittelten Werte mit Experimenten bei einer Begasung des Hauptfermenters von (10 l/min, entsprechend 1 vvm) durchgeführt.

Wie sich zeigte, hatte die Begasung des Hauptfermenters keinen negativen Einfluss auf das Ausgangssignal. Eine Begasung des Versuchsfermenters hingegen wirkte sich negativ auf das Signal-Rausch-Verhältnis der Messungen des BioView aus (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund musste im Versuchsfermenter auf realitätsnahe Bedingungen verzichtet werden. Da die Messungen in einem Zeitraum von minimal 4 min durchgeführt werden mussten (z.B. bei einer Pumprate von 80 %), war es bei einem gerätebedingten Abtastintervall des BioViews von 90 s sinnvoller, die Begasung im Versuchsfermenter zu deaktivieren, um ein verlässlich interpretierbares Messsignal zu erhalten.

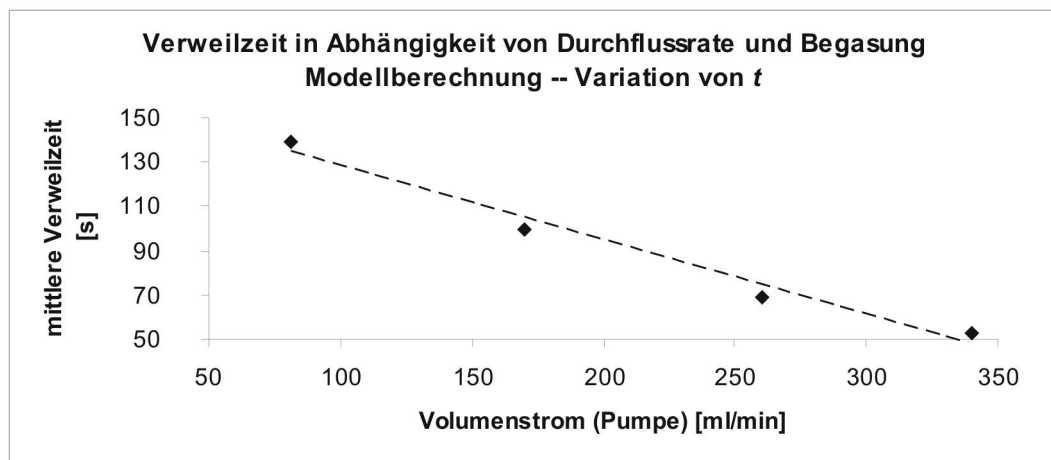


Abb. 3.4: Mittlere Verweilzeiten bei unterschiedlichen Pumpraten sowohl mit als auch ohne Begasung des Hauptfermenters. Beide Versuchsreihen führten zu einem gleichen Ergebnis. Zur gestrichelt eingezeichneten Regressionsgerade ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 97 %.

Abbildung 3.4 zeigt die errechneten mittleren Verweilzeiten bei unterschiedlichen Pumpraten sowohl mit als auch ohne Begasung des Hauptfermenters. Bei Vorgabe von τ in der Modellrechnung sind die Werte für die Versuchsreihen *mit* eingeschalteter Begasung identisch mit den Werten der Versuchsreihe *ohne* Begasung. Wie erwartet erbringen höhere Pumpraten kürzere Verweilzeiten – und dies unabhängig davon, ob der Hauptfermenter begast wurde.

Bemerkenswert ist, dass der Verlauf nicht linear ist. Das Bestimmtheitsmaß der gezeigten Regressionsgerade liegt bei 97 %. Dies deutet darauf hin, dass hierbei noch andere Einflüsse zum Tragen gekommen sind. Die Ursache hierfür könnte sein, dass es sich bei der Pumpe im Versuchsaufbau um eine Peristaltikpumpe handelt, bei welcher minimale Differenzen des Schlauchdurchmessers einen Einfluss auf den Faktor von angezeigter Pumpleistung (in %) zu gefördertem Volumen (in ml/min) ausübt. Um dies auszuschließen, hätte das geförderte Volumen zu jeder einzelnen Messung bestimmt werden müssen.

Ein wesentlicher Aspekt ist jedoch der, dass die hier aufgetragenen Werte für die mittlere Verweilzeit auf einem vereinfachten theoretischen Modell beruhen. Wie im Abschnitt 2.3.3 dargelegt wurde, stimmt das Modell mit der Realität nicht exakt überein. Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass sich der Hauptfermenter wie ein ideal durchmischerter Rührkessel verhält, in welchem das Tracer-Signal zum Zeitpunkt t_0 direkt in eine Sprungfunktion umgesetzt wird.

Zudem trägt die teilweise geringe Anzahl an Messwerten dazu bei, dass das Ausgangs-Signal nicht hundertprozentig erfasst werden konnte. Diesem Aspekt hätte man begegnen können, indem nicht das gesamte BioView-Spektrum sondern lediglich der für Riboflavin relevante Teil erfasst worden wäre. Hierdurch hätte eine Einzelmessung weniger als 90 s gedauert. Insbesondere die Messwerte zu Beginn eines jeden Experiments hätten eventuell zeitlich besser aufgelöst werden müssen, da die Differenz der aufeinander folgenden Signalintensitäten gegen Ende der Messungen (im Sättigungsbereich) immer geringer wird.

Letzten Endes stellen die resultierenden Werte für die mittlere Verweilzeit einen Versuch dar, die Messergebnisse aus den Verweilzeitexperimenten anschaulich zu quantifizieren. Für die folgende Praxis werden diese Ergebnisse mit einem Sicherheitsfaktor in zeitlicher Hinsicht beaufschlagt (s. Fazit).

Fazit

Den gerade angesprochenen Differenzen wurde in experimenteller Hinsicht nicht weiter nachgegangen. Um – im Hinblick auf die benötigte Pumpenvorlaufzeit und die einzustellende Pumpleistung – gleiche Bedingungen zwischen beiden Fermentern zu etablieren, kann folgendes festgehalten werden:

Unter der Annahme, dass die Peristaltikpumpe einen erhöhten Scherstress auf die Zellen ausübt, ist es sinnvoll, den Zeitraum zum Befüllen des Versuchsfermenters so kurz wie möglich zu halten. Bei einem Zeitraum von 10 min sind bei allen Pumpleistungen oberhalb von 40 % (sowohl mit als auch ohne Begasung) die Bedingungen für einen vollständigen Austausch des Versuchsfermentervolumens gegeben. Um völlig sicher zu gehen, wurden daher alle Kultivierungs-Versuche bei Pumpleistungen von 80 % und einer Vorlaufzeit von minimal 10 und maximal 20 min durchgeführt.

Nach dem Zellentransfer nimmt ein Einzelexperiment mindestens 30 Minuten in Anspruch, um die Kultivierungsbedingungen im Versuchsfermenter nach dem Transfer der Zellen zu stabilisieren (Voraussetzung: keine notwendige Induktion). In diesem Zeitraum können pH- und pO_2 -Werte noch schwanken. Sowohl für den Zellentransfer als auch für das anschließende Desinfizieren und Waschen des Fermenters mit Isopropanol wird somit ein Zeitraum von mindestens 20 min benötigt. Diese Zeitspanne steht somit in einem vertretbaren Verhältnis zum zeitlichen Rahmen der Einzelexperimente und bietet den Vorteil einer zellenschonenden Durchführung.

3.1.3 Zellaufschluss

3.1.3.1 Umgebungsvariablen beim Aufschluss

Im Downstream-Bereich konzentrierten sich die Vorversuche auf die Methode des Zellaufschlusses. Hier war es essenziell, eine – mittels Dreifachbestimmung – hohe Aussageverlässlichkeit der Ergebnisse des Enzymtests anzustreben. Obwohl die Aufschlussmethode mittels Ultraturrax als etabliert gilt, war es nötig, einige Parameter nachträglich anzupassen. Im Folgenden soll in Kürze auf potenzielle Fehlerquellen eingegangen werden.

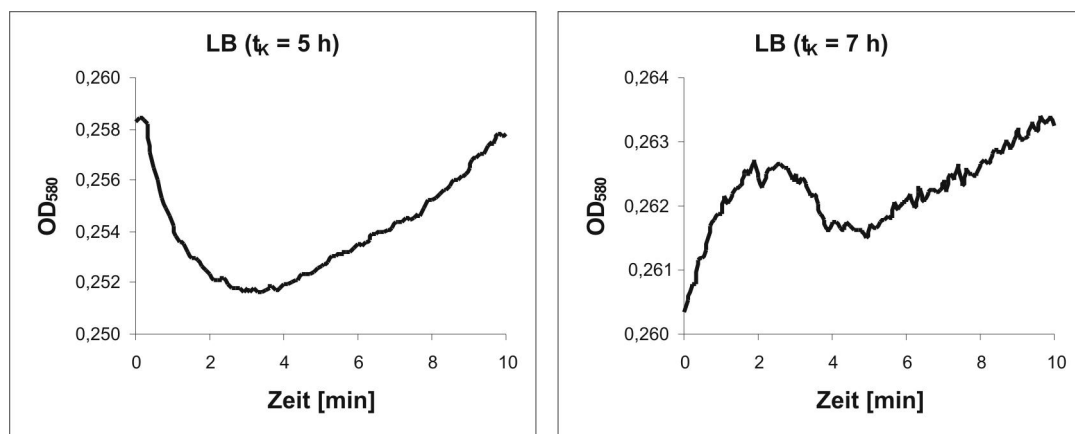


Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf des Messsignals bei der Bestimmung der OD zweier unterschiedlicher Proben einer Schüttelkultur (links bei Kultivierungszeitpunkt (t_K) 5 h, rechts 2 h später). In Abhängigkeit von der Wachstumsphase ergibt sich ein unterschiedlicher Verlauf mit einer mittleren Schwankung der Messwerte um 3 % vom Mittelwert.

- **OD-Messung** (notwendig für Bestimmung der zellbezogenen Enzymaktivität)

Die Messung der Optischen Dichte im Zweikanal-Spektralphotometer ist Schwankungen unterworfen, die abhängig von der Wachstumsphase sind. Wie in Abb. 3.5 erkennbar ist, schwankt die Messung innerhalb der ersten 10 min (hier: gesamter Zeitraum der Messung) um 1,2 – 2,7 %. Der Zeitpunkt, an dem die Messung einen Mittelwert erreicht, ist grundsätzlich nicht vorhersagbar bzw. nicht zu ermitteln, da die Intensität teilweise kontinuierlich steigt. Dies kann auf die Tatsache zurück-

geführt werden, dass hier lebende Organismen gemessen werden, die ihrerseits zur Dispersion innerhalb des Küvettenvolumens beitragen. Im Extremfall zeigen sich hier bei Raumtemperatur auch noch Aspekte von Zellwachstum.

Da die Messung der OD im Wesentlichen dazu dient, einen schnell erfassbaren Wert für den Anteil der Zellzahl zu erhalten, wurde hier eine Einzelpunkt-Messung als zeitlich standardisiertes Verfahren bevorzugt. Ein schwankungsbedingter mittlerer Messfehler von 3 % ergibt sich somit für den Bereich der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität.

o **Pipettier- und Volumenfehler**

Bei sämtlichen Transfers von Volumina – entweder von Medium oder resuspendierten Zellen – tritt ein gerätebezogener Fehler auf. Aufkonzentrierungen beim Resuspendieren abzentrifugierter Zellen im Zentrifugenrohr sowie Pipettiervorgänge wurden daher weitestmöglich mit Eppendorfpipetten unter der Berücksichtigung derer Volumenkapazität und der damit zusammenhängenden Fehlergrenzen durchgeführt.

Des Weiteren wurden diese Vorgänge auf die Gesamtheit der zu messenden Proben angewendet. Jede Probe wurde mit den gleichen Gerätschaften bearbeitet, so dass sich systembedingte, absolute Fehler auf alle Proben gleichermaßen auswirkten. Somit sollte sichergestellt sein, dass diese Proben *relativ* zueinander alle denselben Fehler aufweisen.

Ein nicht quantifizierbarer Fehler bleibt beim Aliquotieren der aufgetauten resuspendierten Zellen kurz vor dem Schritt des Aufschließens. Aufkonzentrierte Proben haben je nach Zelldichte eine deutlich unterschiedliche Viskosität, was sich beim Aufziehen des Probevolumens in die Pipettenspitze bemerkbar macht. Pipettiervorgänge mit höherviskosen Proben wurden daher deutlich langsamer durchgeführt, um Volumenverluste zu minimieren.

o **Photometrie; Lambert Beer / „Extinktionsfehler“**

Das Lambert-Beersche Gesetz, welches einen Zusammenhang zwischen photometrisch gemessener Signalintensität und Konzentration der Probe herstellt, basiert auf einem logarithmischen Ansatz. Demzufolge muss dafür Sorge getragen werden, dass die Proben im Photometer derart verdünnt werden, um Extinktionswerte zwischen 0 und 0,8 zu erhalten. Höhere Werte führen zu Abweichungen, wenn von einem linearen Zusammenhang in diesem Wertebereich ausgegangen werden soll.

Abbildung 3.6 verdeutlicht die Lambert-Beer'sche Gesetzmäßigkeit anhand der Dreifachbestimmung eines *para*-Nitrobenzyl-Esterase-haltigen Zellrohextrakts.

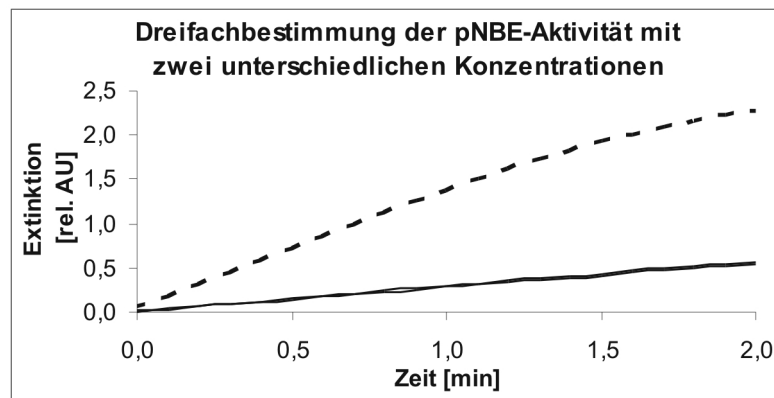


Abb. 3.6: Auswirkung von Konzentrationsunterschieden bei der Dreifachbestimmung des Enzymgehalts: Die gestrichelt gezeichnete Gerade resultiert aus einer fünffach höher konzentrierten Enzymlösung als die beiden anderen Geraden. Wenn der gesamte, hier dargestellte Messbereich mit einbezogen wird, weicht der nach einem linearen Ansatz errechnete Enzymgehalt um 11,5 % vom Mittel der beiden Vergleichsproben ab. Bei einer Beschränkung auf ein Intensitätsmaximum von 1,4 rel. AU (hier: bei 1,0 min) fällt der Fehler nicht ins Gewicht.

○ Temperaturabhängigkeit der Enzymkinetik

Die Methode der Bestimmung des Enzymgehalts beruht auf der Reaktion des Zielproteins im Rohextrakt mit einem Substrat, welches zu einem photometrisch detektierbaren Produkt führt. Da bei dieser Reaktion mit stark verdünnten Lösungen gearbeitet wird, können Enzym-spezifische Inhibierungs-Problematiken nahezu ausgeschlossen werden. Ins Gewicht fällt jedoch deutlich die Temperatur, bei welcher die Reaktion stattfindet. Auch wenn auf die Verwendung eines Thermostaten verzichtet wurde, wurde ein temperaturabhängiger Fehler dadurch minimiert, indem grundsätzlich mit raumtemperierten Lösungen gearbeitet wurde. Die aufgeschlossenen Zellrohextrakte wurden nach der Abzentrifugation von Zellschrott (bei 4 °C) zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Bei Probenvolumina von 20 – 100 µl geschah dies binnen 10 min. Puffer zur Verdünnung waren dementsprechend ebenfalls raumtemperiert.

○ Parameter beim eigentlichen Zellaufschluss

Das Einfrieren und Auftauen wurde in Gefäßen durchgeführt, welche in Form und Volumen vergleichbar waren. Durch das Einfrieren ohne Gefrierzusätze wie DMSO oder Glycerin wird ein nicht unerheblicher Teil von Zellen bereits aufgeschlossen, weil viele Zellwände einer Volumenvergrößerung des Wassers beim Unterschreiten von 0 °C nicht standhalten. Somit ergibt sich grundsätzlich ein geringe Menge des Enzyms in der gepufferten Lösung nach dem Auftauen, ohne die Zellwände mechanisch bearbeitet zu haben (vgl. dazu auch Abb. 3.8 auf Seite 39).

Es ist denkbar, dass eine Korrelation der Effizienz des Zellaufschlusses mit der vorgelegten Zelldichte besteht. Einer Überprüfung dieses Aspekts wurde jedoch kein Gewicht verliehen, da die resultierenden Abweichungen der Dreifachbestimmungen

nach Berücksichtigung sämtlicher hier genannter Faktoren im Bereich von ca. 3 % lagen und ein zunehmender Trend der Enzymausbeute mit steigender Zellzahl nicht grundsätzlich beobachtet werden konnte.

Die Kühlung der Proben während des Aufschlusses ist ein zentraler Punkt, der unter den vorgegebenen technischen Einrichtungen stark ins Gewicht fällt. Durch die bisherige Methode des Kühlens von einzelnen Mikro-Reaktionsgefäßen in einer großen Styroporbox, welche mit kleinen Eisstückchen gefüllt ist, konnte die Außenfläche der Proben nicht gleichmäßig gekühlt werden. Eine Verbesserung ergab sich durch die Verwendung eines kühlbaren Mikro-Reaktionsgefäßhalters mit einer gesättigten Kochsalzlösung als Kryovermittler zwischen den Wänden der Vertiefungen des Mikro-Reaktionsgefäßhalters und der Probe.

Einer möglichen Produktverschleppung beim Aufschluss durch beispielsweise eine nicht ausreichend gespülte Spitze des Ultraturrax wurde dadurch begegnet, dass Proben gleichen Enzymgehalts (für die Dreifachbestimmung) nicht direkt hintereinander bearbeitet wurden. Es wurde somit darauf geachtet, dass immer Proben mit unterschiedlichem Enzymgehalt nacheinander ¹ aufgeschlossen wurden.

Die Gesamtheit der oben erwähnten Modifikationen zur Verminderung potenzieller Aufarbeitungs- und Messfehler lässt sich anhand der Standardabweichung der Dreifachbestimmungen veranschaulichen. In Abbildung 3.7 sind zwei beispielhafte Messreihen dargestellt. Der linke Teil beinhaltet repräsentativ eine mittlere Abweichung vom Mittelwert der Steigung von 21 %. Nach Modifizierung der genannten Einzelverfahren konnte die Standardabweichung auf 3 % (rechtes Diagramm) reduziert werden.

3.1.3.2 Variation zeitlicher Aspekte beim Zellaufschluss

Da die Aufarbeitung der Kultivierungen der Stämme *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702 eine Vielzahl von einzelnen zu bearbeitenden Proben nach sich zieht, wurde – nach der Verbesserung der Umgebungsvariablen (vgl. vorheriger Unterabschnitt) – die Zeitabhängigkeit der Qualität des Aufschlusses untersucht.

Der eigentliche Zellaufschluss mittels Ultraturrax verläuft nach dem bisher etablierten Protokoll in drei, sich wiederholenden Phasen ab, welche sich jeweils durch eine Pause voneinander absetzen. Das Gerät wird mit der Probe in Kontakt gebracht und schließt die darin enthaltenen Zellen für 30 s bei Maximaldrehzahl (22.600 rpm) auf. Diesem Aufschluss folgt eine Abkühlungsphase von 60 s, nach welcher sich der Vorgang noch zweimal wiederholt (siehe dazu auch Kapitel A.1.7 auf Seite 102).

Es wurde untersucht, inwieweit sich Änderungen der Parameter von Aufschlussdauer und Pausenlänge auf die zu messende Enzymmenge auswirkt. Die Aufschlusszeiten

¹ Reihenfolge: statt [1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c...] wurde die Aufarbeitung nach dem Muster [1a, 2a, ..., 1b, 2b, ..., 1c, 2c, ...] durchgeführt.

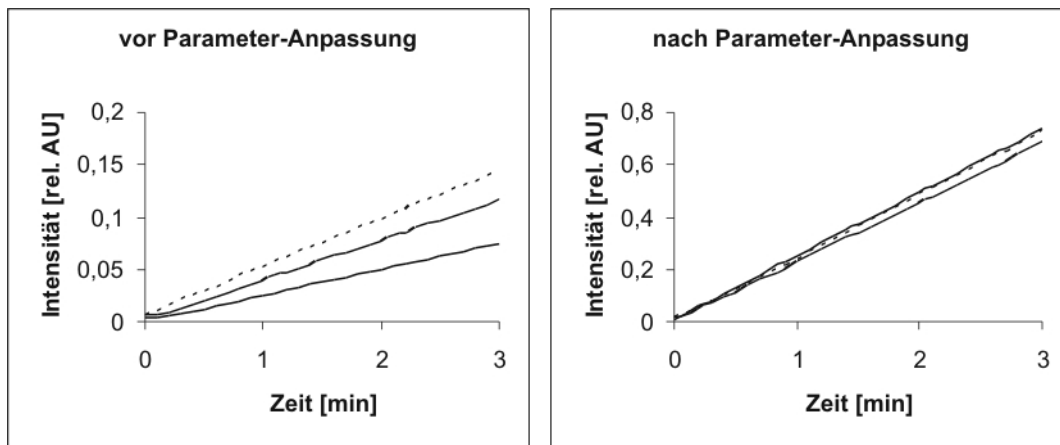


Abb. 3.7: Nachweis von Penicillin G-Amidase mittels NIPAB-Tests in einer Dreifachbestimmung: Vor Änderung der Parameter (linker Graph) ist der relative Fehler mit 21 % deutlich größer als danach (rechtes Diagramm; 3 %). Zudem wird der maximale Detektionsbereich des Photometers (unter Berücksichtigung eines linearen Zusammenhangs: 0,0 – 0,8 rel. AU) voll ausgenutzt, was zu einem besser interpretierbaren Signal-/Rausch-Verhältnis führt.

wurden von 30 s (Standard) auf 10, 20 bzw. 60 s variiert. Zudem wurde die Länge der Pausen zum Abkühlen der Proben von 60 s auf 20, 30 bzw. 120 s verändert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt; als Einheit wurde dabei die spezifische Enzymmenge (bezogen auf die OD der Ernte) gewählt, um die Ergebnisse zu normieren. Dies geschah aus dem Grund, dass die Versuchsreihe mit Proben aus mehreren Kultivierungen durchgeführt wurden, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden.

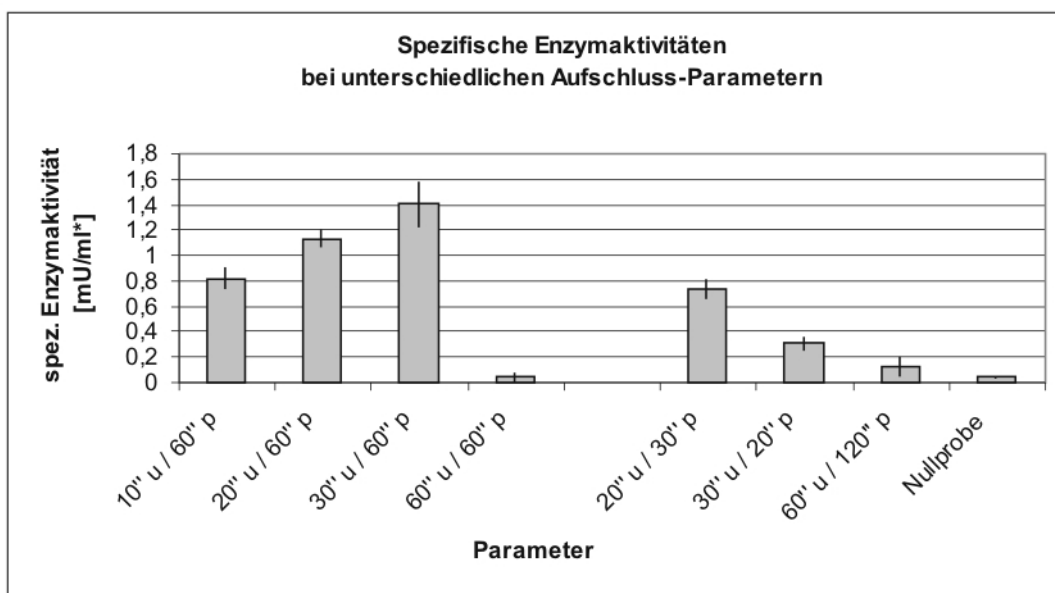


Abb. 3.8: Variation der Aufschluss-Parameter: Der linke Teil stellt die Ergebnisse aus veränderten Aufschlusszeiten dar. Im rechten Teil sind die Variationen der Pausenlängen dargestellt.
Legende: u = Aufschluss-Zeit, p = Pausenlänge

Es zeigte sich, dass zeitliche Veränderung einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis des sich anschließenden Enzymtests hat. Die Dauer des eigentlichen Aufschlusses führt bei einheitlicher Pausenlänge im Bereich bis 30 s zu einem Maximum; eine Verdoppelung der Standard-Aufschlusszeit auf 60 s hat wiederum einen deutlich gegenläufigen Effekt; die Zahlenwerte dieser Aufarbeitung sind mit denen der Nullprobe vergleichbar, welche nicht per Ultraturrax behandelt wurde. Die gemessenen Werte bei der Nullprobe stammen vermutlich von Zellen, welche durch das Einfrieren und wieder Auftauen bereits aufgeschlossen wurden.

Der Bereich der Pausenlänge (vgl. rechter Teil der Abbildung) muss im Vergleich mit den korrelierenden Aufschlusslängen (linke Seite) interpretiert werden. Hier zeigt sich sowohl bei 20, 30 als auch bei 60 s Aufschlusszeit der generelle Trend, dass längere Pausenzeiten bessere Ergebnisse mit sich bringen.

Tabelle 3.1 stellt die Zahlenwerte der Ergebnisse in Prozent (bezogen auf den Standard) dar:

Tab. 3.1: Prozentuale Anteile der Ausbeute nach dem Zellaufschluss nach Variation unterschiedlicher Parameter

Parameter	spez. Enzymaktivität [mU/ml*]	prozentualer Anteil
10“ u / 60“ p	0,82	58 %
20“ u / 60“ p	1,13	81 %
30“ u / 60“ p	1,40	100 %
60“ u / 60“ p	0,04	3 %
20“ u / 30“ p	0,74	53 %
30“ u / 20“ p	0,31	22 %
60“ u / 120“ p	0,12	9 %
Nullprobe	0,04	3 %

Als Fazit dieser Versuchsreihe wurde ein neuer Standard für die Aufarbeitung etabliert. Die Pausenlänge von 60 Sekunden wurde dabei nicht verändert, wohl aber die Dauer des eigentlichen Zellaufschlusses. Da die 20-sekündige Aufschluss-Variante ca. 80 % - also einen durchaus interpretierbaren Wert - Ausbeute liefert und da die Variante 30/60 eine größere Standardabweichung erbrachte, wurde für alle folgenden Proben die Variante 20“ Ultraturrax / 60“ Pause gewählt. Dies hat den weiteren Vorteil, dass jeder Einzelaufschluss ca. 15 % weniger Zeit in Anspruch nimmt, so dass alle Proben einer Kultivierung in der Fermenterkombination an einem Tag aufgearbeitet und gemessen werden können.

3.2 *E. coli* 5K pHM12 in der Fermenterkombination

Die ersten Experimente, das Wachstum und die damit in Korrelation stehende Produktbildung zu beobachten, wurden innerhalb der Fermenterkombination mit dem

Stamm *E. coli* 5K pHM12 durchgeführt. Somit sollte grundsätzlich festgestellt werden, ob der Aufbau sowohl funktionsfähig als auch zweckdienlich ist (vgl. auch Unterabschnitt 2.5 im theoretischen Teil).

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit wurde es für ausreichend befunden, kontinuierliches Wachstum der batch-Kultur im Hauptfermenter zu erreichen und dieses kurzfristig im Versuchsfermenter fortzuführen. Die Zweckdienlichkeit des Aufbaus sollte sich darin zeigen, dass sich die Enzymkonzentrationen der offline mit den online gemessenen Proben decken. Die offline-Proben wurden dem Versuchsfermenter entnommen, separat aufgeschlossen und photometrisch gemessen. Online-Bestimmungen wurden im Versuchsfermenter direkt nach Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol und Zugabe einer wässrigen PMC-Lösung durchgeführt; die photometrischen Daten wurden mit dem BioView aufgezeichnet, welcher über einen Ingold-Stutzen mit dem Inhalt des Versuchsfermenters in Kontakt war.

Ein Flussdiagramm des Versuchsablaufs eines Einzelexperiments einer Kultivierung von *E. coli* 5K pHM12 in der Fermenterkombination ergibt sich in Abbildung 3.9. Hierbei sind die zeitlichen Rahmenbedingungen (Pumpenvorlaufzeit, Stabilisierung der Kultivierungsbedingungen) sowie die Probenaufbereitung (sowohl online als auch offline) dargestellt. Nicht berücksichtigt wurde die Aufteilung der offline-Proben zur statistischen Dreifachbestimmung. Dieser Schritt erfolgte noch vor dem Aufschluss der Zellen im Mikroreaktionsgefäß.

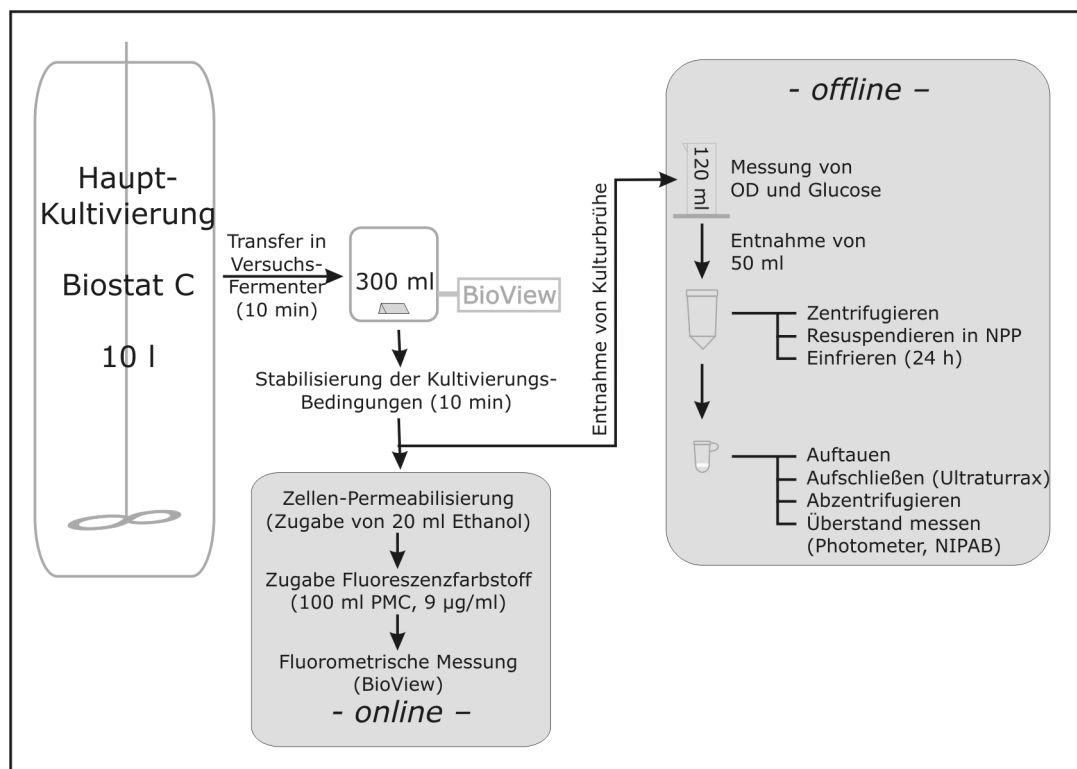


Abb. 3.9: Flussdiagramm eines Einzelexperiments in der Fermenterkombination.

3.2.1 Wachstum von *E. coli* 5K pHM12 in CgXII im 10 l-Maßstab

Nachdem vorab geklärt wurde, dass grundsätzliches Wachstum von *E. coli* 5K pHM12 im modifizierten CgXII-Medium möglich ist (vgl. Abschnitt 3.1.1), war es notwendig herauszufinden, wie sich das Wachstum unter günstigeren Kultivierungsbedingungen im 10 l-Fermenter verhält. Abbildung 3.10 zeigt einen repräsentativen Wachstumsverlauf einer derartigen Kultivierung.

Hierzu ist anzumerken, dass die Hauptkultur aus einer Vorkultur angeimpft wurde, welche zuvor in Komplexmedium (THE) wuchs. Als Besonderheit zu dem in Abschnitt A.1.3 beschriebenen Verfahren wurde der Fermenter direkt mit 90 ml aus der Vorkultur angeimpft (ohne vorheriges Abzentrifugieren und Resuspendieren). Dies macht sich insbesondere bei den CO₂-Werten im Abgas bemerkbar. Hier sind mehrere Zwischenphasen auszumachen (erkennbar an den einzelnen Scheitelpunkten). Bei einer Kultivierung, welche mit resuspendierten Zellen aus einer Vorkultur aus Komplexmedium angeimpft wurde, sind diese nicht zu erkennen (vgl. Abb. 3.20 auf Seite 52).

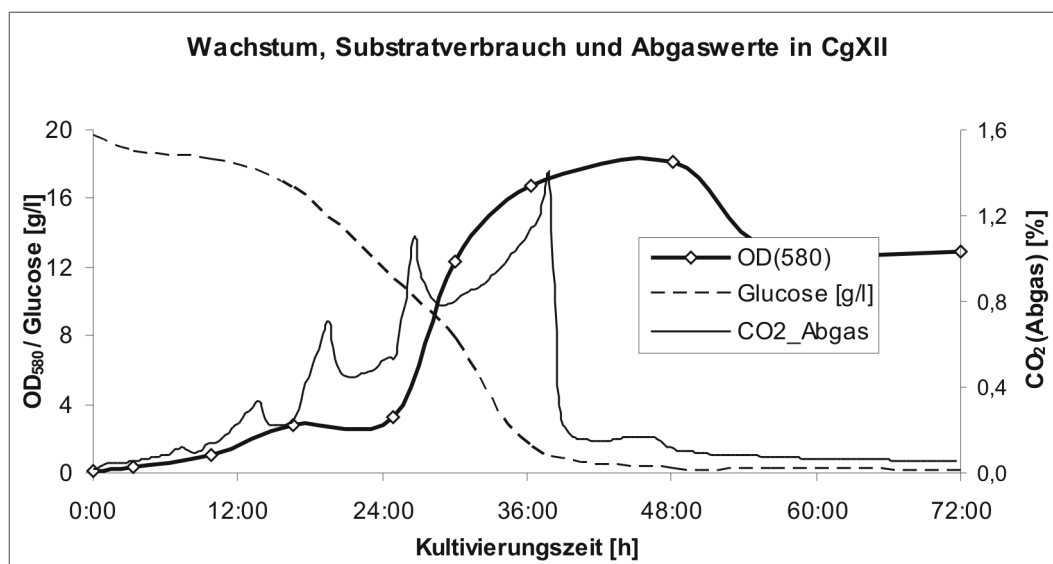


Abb. 3.10: Typischer Wachstumsverlauf von *E. coli* 5K pHM12 im 10 l-Fermenter in CgXII. Die vorgelegte Glucose ist nach ca. 40 h verbraucht. In der Wachstumskurve ist vor dem Beginn einer kurzen exponentiellen Wachstumsphase (bei $t < 24$ h) ein Knick zu erkennen, welcher auf Medienanpassung der Zellen zurückzuführen ist.

Es ist zu erkennen, dass die Zellen keine lag-Phase zu Beginn der Hauptkultivierung aufweisen. Ein erster Übergang in eine exponentielle Phase findet bei ca. 12 h statt. In den anschließenden 12 h fallen Diauxie-Vorgänge ins Gewicht. Die Restbestandteile des Komplexmediums aus den 90 ml der Vorkultur sind verbraucht; die Zellen adaptieren das neue Medium unter geringer Einbuße von Zellzahl (bzw. OD).

Gefolgt wird diese Diauxie-Phase von einer zweiten exponentiellen Phase ab ca. 24 h, welche weitere 12 h dauert und mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,27 \text{ h}^{-1}$

verläuft. Nachdem die Glucose zwischen 36 und 42 h vollständig aufgebraucht ist, sinkt die Wachstumsrate deutlich, bis schließlich eine maximale OD von 18 beim Übergang in eine erkennbare Absterbephase bei ca. 54 h erreicht ist.

Der Wert für die maximale OD muss dabei kritisch hinterfragt werden. Es fällt auf, dass hier keine länger anhaltende stationäre Phase erkennbar ist. Da das in der Abbildung dargestellte Zellwachstum im Zeitraum zwischen 42 und 54 h ohne Glucose verläuft, kann davon ausgegangen werden, dass hier bereits die stationäre Phase eingetreten ist; die dennoch steigenden Werte für die OD sind vermutlich das Resultat aus der Akkumulation von lebenden und bereits abgestorbenen Zellen. Dem entsprechend müssten die realen Werte für die maximale OD der lebenden Zellen im Bereich zwischen 14 und 16 liegen.

Aus dem Versuch im Fermenter folgt, dass das Medium CgXII für die Kultivierung von *E. coli* 5K pHM12 kompatibel ist im Hinblick auf das Wachstumsverhalten des Stammes. Reell werden maximale Optische Dichten von ca. 16 erreicht, was offensichtlich auf einer Limitierung der Kohlenstoffquelle Glucose beruht. Die maximale Wachstumsrate von $0,27 \text{ h}^{-1}$ übertrifft die im Schüttelkolbenexperiment ermittelte um ca. 140 % (vgl. Abb. 3.1 auf Seite 30). Zudem verläuft das Wachstum im Fermenterversuch mitunter exponentiell; im Schüttelkolbenexperiment konnte für *E. coli* 5K pHM12 nur lineares Wachstum ausgemacht werden.

Somit ist eine weitere Grundbedingung gegeben, um die wachstumsbezogene Produktentwicklung anhand dieses Stamms innerhalb des gegebenen Aufbaus zu beobachten.

3.2.2 Entwicklung der Penicillin G-Amidase-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur in Komplexmedium

In diesem Abschnitt werden die ersten Ergebnisse im Hinblick auf die eigentliche Aufgabe der Fermenterkombination vorgestellt.

Nachdem die Kultivierung des Stammes *E. coli* 5K pHM12 sowohl im Schüttelkolben als auch im 10 l-Maßstab erfolgreich verlief (vgl. Abschnitte 3.1.1 und 3.2.1) und die Parameter für den Betrieb der Tandempumpe in der Verbindung beider Fermenter festgelegt worden waren (Abschnitt 3.1.2), sollte nun die Wachstums-abhängige Produktentwicklung verfolgt werden.

Die erste Kultivierung in der Fermenterkombination wurde zunächst nicht im synthetischen Medium CgXII sondern in Komplexmedium durchgeführt. Entgegen der von Mayer *et al.* vorgeschlagenen Verwendung von THE-Medium [27] wurde das kostengünstigere LB-Medium benutzt (mit Zusätzen von Glucose, Glycin und Thiamin, vgl. Abschnitt A.2.2). Die Kompatibilität dieses Mediums im Hinblick auf Wachstum und die Bildung des Zielproteins konnte als Seitenergebnis in den Versuchen zur Op-

timierung des Zellaufschlusses festgehalten werden (vgl. Abschnitt 3.1.3; Daten im Vergleich zu THE nicht gezeigt).

Ein weiterer Vorteil des LB-Mediums gegenüber der Verwendung von THE-Medium ist dessen eingeschränkter Nährstoffvorrat. Eine batch-Kultivierung dauert im THE Medium durchschnittlich 15 h, bis die Zellenkultur in die stationäre Phase übergeht. Bei dem verwendeten LB-Medium wird dieses Stadium bereits nach 10 h erreicht. Dies gibt immer noch ausreichend zeitlichen Spielraum für die experimentelle Unterteilung der Wachstumskurve in sechs aufeinander folgende Abschnitte bei einer Dauer von 45 min pro Einzelexperiment.

Nachteilig bei der Verwendung von LB-Medium ist dessen Inkompatibilität in Bezug auf die Überwachung mittels Fluoreszenzspektroskopie aufgrund des hohen Gehalts an komplexen Proteinen. Diesem Nachteil wurde in diesem Abschnitt der Versuchsreihe kein Gewicht verliehen; fluoreszenzspektrometrische Messungen sollten sich im CgXII-Medium anschließen.

Im ersten Kultivierungsexperiment der Fermenterkombination wurde der Versuchsfermenter ab dem Kultivierungszeitpunkt 4 h (nach Animpfen der Hauptkultur) befüllt. Eine halbe Stunde später wurden sowohl aus der Hauptkultur im Biostat C als auch aus dem Versuchsfermenter eine Probe entnommen, welche nach Bestimmung der Optischen Dichte abzentrifugiert, in NPP resuspendiert und anschließend zur späteren Bestimmung der Penicillin G-Amidase-Aktivität eingefroren wurde. Dieser Messzyklus wurde im Verlauf des Wachstums der Zellkultur mehrmals wiederholt. Hierdurch sollten die Kultivierungsbedingungen im Parallelbetrieb untersucht werden, welche sich auf die Entwicklung der OD und des Zielproteins niederschlagen.

Abbildung 3.11 stellt den zeitlichen Verlauf der OD der gesamten Kultivierung innerhalb der Hauptkultur dem Verlauf innerhalb des Versuchsfermenters gegenüber.

Es ist zu erkennen, dass die graphisch interpolierten Messergebnisse nur gering voneinander abweichen. Eine lag-Phase ist nicht zu erkennen. Dies ist nicht verwunderlich, da das in der Fermenterkombination verwendete Medium dem der Vorkultur im Schüttelkolben entsprach; eine Anpassung an das Medium sowie an veränderte Umgebungsbedingungen war damit erleichtert. Die Kultur wuchs stetig exponentiell bis zu einer OD von ca. 7 (bei $t_K = 10$ h). Der Beginn der stationären Phase ist in beiden dargestellten Graphen zu erkennen.

Abbildung 3.12 stellt das Verhältnis der gemessenen Optischen Dichte von Versuchsfermenter zu Hauptkultur in einem Säulendiagramm dar.

Es ist zu erkennen, dass der Quotient der Optischen Dichten (HK zu Versuchsfermenter) nahe 1 ist. Zu Beginn der Kultivierung (bei niedrigen OD-Werten; bis $t_K = 6:26$ h) ist die gemessene OD des Versuchsfermenters grundsätzlich etwas geringer als die der Hauptkultur. Hier beträgt die Abweichung bis zu 7 %. Die Schwankungen danach liegen unterhalb von 2,2 %.

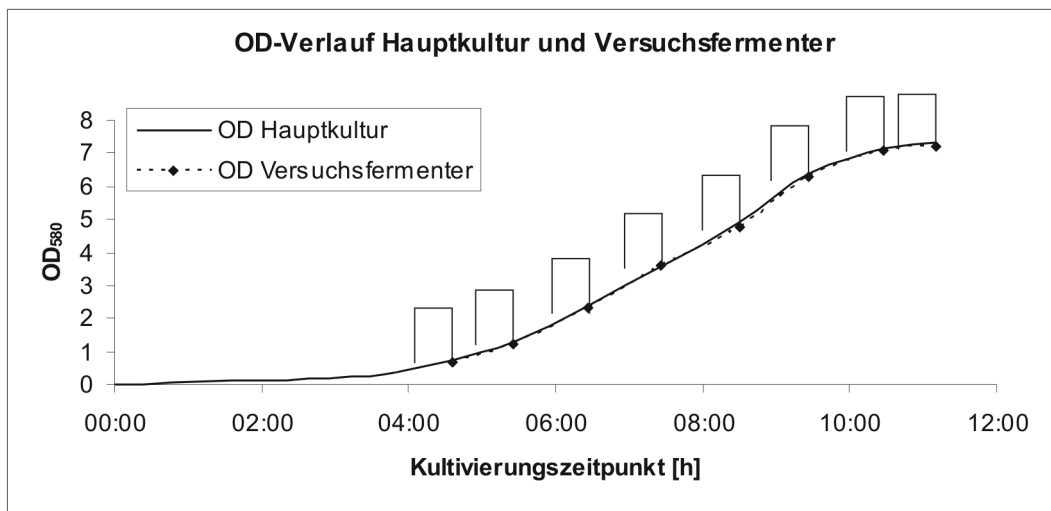


Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der OD innerhalb einer Kultivierung mit LB-Medium in der Fermenterkombination. Die Werte im Versuchsfermenter unterscheiden sich nur marginal von denen der Hauptkultur. Die eingezeichneten Klammern markieren den zeitlichen Rahmen eines jeden Experiments im Versuchsfermenter.

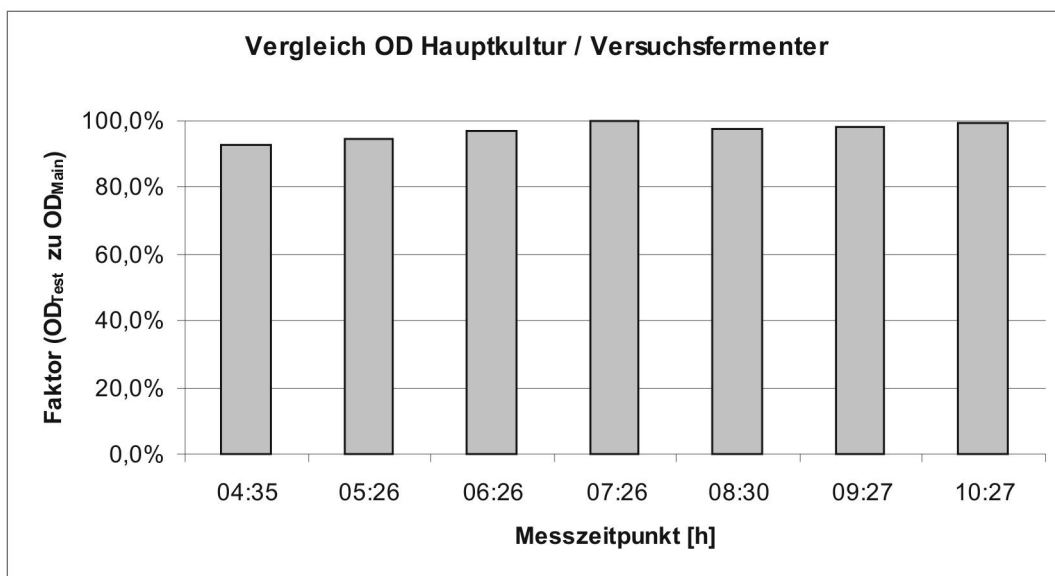


Abb. 3.12: Verhältnis der gemessenen Optischen Dichte von Versuchsfermenter zu Hauptkultur. 100 % entsprechen einem Faktor von 1 beim Quotienten $OD_{\text{Versuchsfermenter}}$ zu $OD_{\text{Hauptkultur}}$ und stellen damit einen identischen Wert dar.

Die errechneten Abweichungen sind im Hinblick auf die Kultivierungsverhältnisse tolerabel. Im Bereich der exponentiellen Phase ($t_K > 5$ h) herrschen hohe Wachstumsraten von Abschnitt zu Abschnitt. Aus diesem Grund hätte sich der Transfer der Zellen in den anderen Fermenter und die anschließende 30 minütige Kultivierung gerade hier in geringeren ODs bemerkbar machen müssen. Dass dies nicht der Fall

ist, spricht für eine gute Übereinstimmung der Kultivierungsbedingungen zwischen Hauptkultur und Versuchsfermenter.

Es muss angemerkt werden, dass bei der prozentualen Darstellung ein geringer Unterschied bei niedrigen ODs mehr ins Gewicht fällt. Da allerdings die Werte im Versuchsfermenter zu Beginn der Kultivierung grundsätzlich unterhalb derer der Hauptkultur liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase sensibler auf den Scherstress beim Pumpvorgang reagieren.

Hauptsächliches Interesse gilt der Entwicklung der Enzymkonzentration. Der Verlauf der Penicillin G-Amidase-Aktivität innerhalb der gesamten batch-Kultur ist in der Abbildung 3.13 dargestellt. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten der Messung der OD genommen (vgl. Abb. 3.12) und zu einem späteren Zeitpunkt aufgearbeitet. In der Darstellung zu finden ist sowohl die Entwicklung der Absolutwerte (in U/ml) als auch die Entwicklung der spezifischen Enzym-Aktivität. Die Scheibweise U/ml^* deutet an, dass die Werte durch Division der Absolutwerte durch die aktuell gegebene OD – als zellbezogenen Wert – errechnet wurden (also $U/(ml \cdot OD)$).

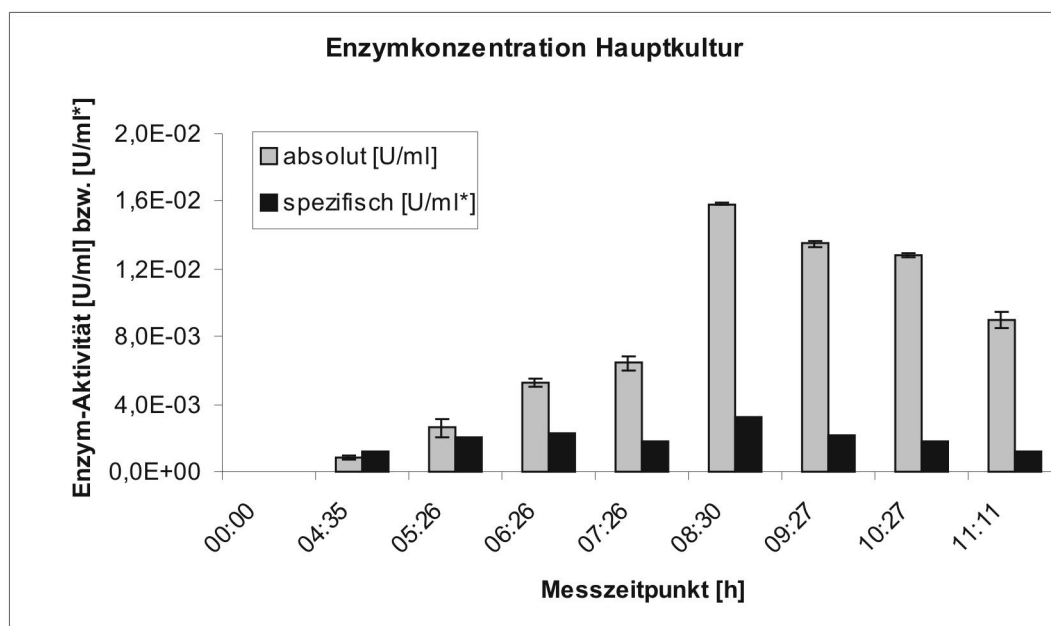


Abb. 3.13: Verlauf der Enzymkonzentrationen der Hauptkultur in der Fermenterkombination mit LB-Medium innerhalb einer batch-Phase. Bei $t_K = 8:30$ h ist ein Maximum sowohl in der absoluten als auch der spezifischen Penicillin G-Amidase-Aktivität zu erkennen.

Das Maximum der Enzym-Aktivität bei $t_K = 8:30$ h ist sowohl bei der absoluten als auch bei der spezifischen Penicillin G-Amidase-Konzentration auszumachen. Dies ist im Falle der Verwendung von Komplexmedien keine Besonderheit; wie sich später im Bereich der Kultivierungen mit dem synthetischen Medium zeigen wird, ist es allerdings nicht selbstverständlich, dass diese Maxima auf den selben Zeitpunkt fallen.

Bemerkenswert innerhalb dieses Diagramms ist der Sprung der Enzym-Aktivität zwischen den Messzeitpunkten 7:26 h und 8:30 h. Dieser ist bezogen auf die Entwicklung der OD (vgl. Abb. 3.11) ungewöhnlich, da die interpolierten Werte für die OD eine kontinuierliche Steigerung erwarten lassen. Legt man jedoch den Verlauf des CO₂ im Abgas zugrunde (s. Abb. 3.14), so ist hier eine Korrelation zu der Entwicklung der Enzymkonzentration erkennbar.

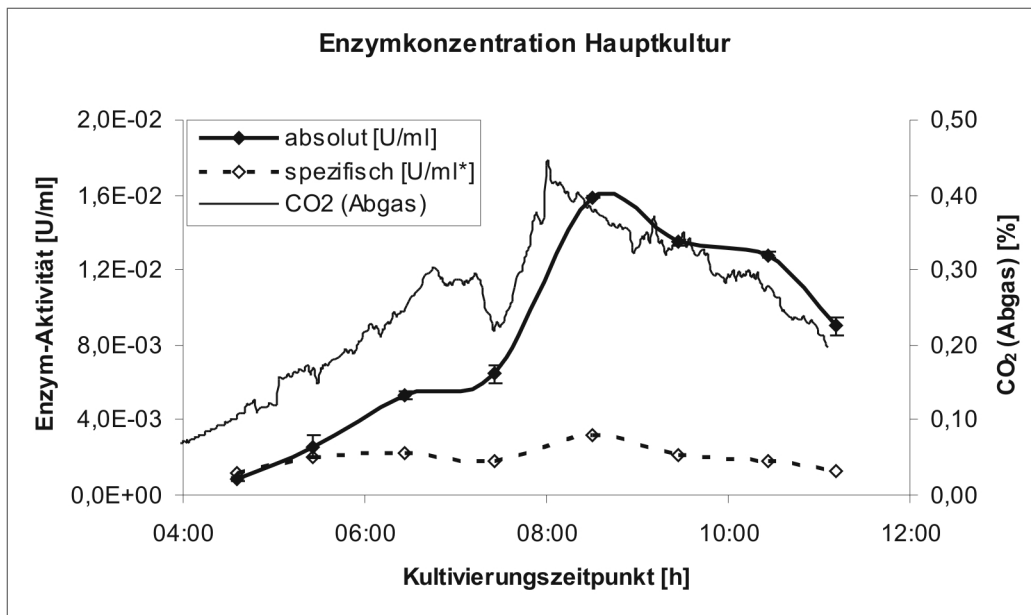


Abb. 3.14: Verlauf der Enzymkonzentration im Vergleich zum Verlauf der Abgaswerte bei der Kultivierung von *E. coli* 5K pHM12 in LB-Medium. CO₂-Werte entwickeln sich annähernd parallel zu der gemessenen Enzymkonzentration.

Als Nächstes stellt sich die Frage nach der Vergleichbarkeit der gemessenen Enzymkonzentrationen innerhalb der Hauptkultur und des Versuchsfermenters. Abbildung 3.15 auf der folgenden Seite stellt die Entwicklung der Absolutwerte der Hauptkultur denjenigen des Versuchsfermenters in einem Säulendiagramm gegenüber.

Hier ist – wie im Vergleich der gemessenen OD beider Fermenter (Abb. 3.12) – erkennbar, dass die Werte gegen Ende der Kultivierung (ab $t_K = 8:30$ h) gering voneinander differieren. Deutliche Unterschiede sind in den ersten vier Messungen auszumachen. Diese Unterschiede gleichen auch nicht denen der gemessenen OD. Zudem liegen die Werte des Versuchsfermenters in diesem Teil der Kultivierung teilweise ober- und teilweise unterhalb der Referenz-Werte aus der Hauptkultur. Dieser Umstand könnte damit auf etwas schlechtere Kultivierungsbedingungen hindeuten.

Allerdings muss angemerkt werden, dass die gemessenen Enzym-Aktivitäten aufgrund des geringen Messsignals beim photometrischen NIPAB-Test etwas mehr fehlerbehaftet sind als die Werte höherer Konzentrationen zu späteren Kultivierungszeitpunkten. Ein Blick auf die im Bild dargestellten Fehlerindikatoren der Standard-

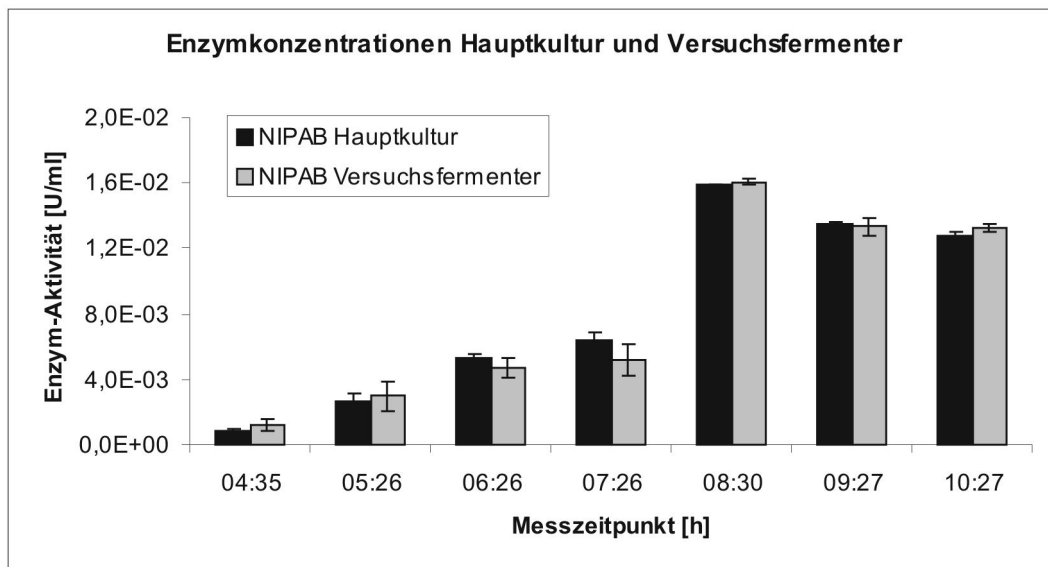


Abb. 3.15: Vergleich der gemessenen Penicillin G-Amidase-Aktivitäten von Hauptkultur und Versuchsfermenter. Ähnlich wie bei den Werten für die OD weichen die Daten ab $t_K = 8:30$ h nur gering voneinander ab.

abweichung lässt die Vermutung zu, dass die Werte in der Realität nicht unbedingt voneinander abweichen müssen.

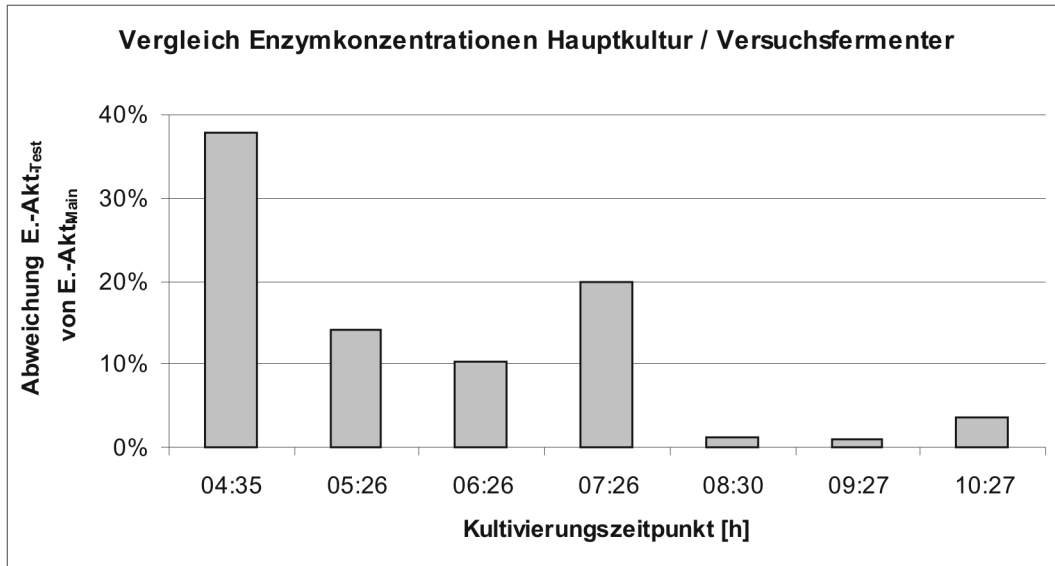


Abb. 3.16: Prozentuale Abweichungen der gemessenen Enzym-Aktivitäten aus dem Versuchsfermenter zu denen der Hauptkultur. Die Ergebnisse weichen im Anfangsstadium der Kultivierung stärker voneinander ab als beim Vergleich der OD (Abb. 3.12).

Vergleicht man die Faktoren von gemessener Enzym-Aktivität im Versuchsfermenter zur Enzym-Aktivität in der Hauptkultur, fällt dieser Unterschied noch deutlicher auf. Wie Abbildung 3.16 auf der vorigen Seite deutlich macht, liegt die Abweichung des

Faktors bei den ersten vier Messungen (also bis zu einer OD von 3,6) zwischen 10,4 und 37,8 %.

Hier hätten die Proben erneut aufgearbeitet und gemessen werden müssen. Problematisch dabei ist der Umstand, dass die aufgeschlossenen Proben aufgrund ihres Volumens und der darin enthaltenen Enzymkonzentration lediglich einmal zur photometrischen Bestimmung mittels NIPAB-Tests herangezogen werden können. Proben vor dem Aufschluss werden einmalig aufgetaut, Aliquote (500 μ l) werden für den Aufschluss entnommen und der Rest wird bereits vor dem Aufschluss wieder eingefroren. Erneut aufgetaute Proben liefern im Bereich des Zellaufschlusses jedoch keine reproduzierbaren Werte, da der Prozess des Einfrierens und wieder Auftauens bereits eine partielle Zelllyse verursacht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fermenterkombination innerhalb der Fehlertoleranz vergleichbare Ergebnisse zwischen der Hauptkultivierung im 10 l-Maßstab und der Kultivierung im Versuchsfermenter zeigt.

Die Überlegung, ob die Differenzen zwischen den Messergebnissen der Enzym-Aktivität von Versuchsfermenter und Hauptkultur innerhalb der ersten vier Messzeitpunkte auf schlechtere Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein könnten, können entkräftet werden:

Wie die einfach durchzuführende Messung der OD zeigt, schwanken die Ergebnisse zu Beginn der Kultivierung um maximal 7 %. Deutliche Unterschiede hätten sich in den Kultivierungsbedingungen gerade am Ende der batch-Kultur manifestieren müssen, da die Organismen aufgrund der dann vorherrschenden hohen Zelldichte hier eher limitierenden Bedingungen begegnen können als im Anfangsstadium der Kultivierung.

3.2.3 Entwicklung der Penicillin G-Amidase-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur in CgXII

Die in diesem Abschnitt beschriebene Beobachtung der Entwicklung der Penicillin G-Amidase-Aktivität in CgXII stellt das Ziel der ersten der drei Haupt-Versuchsreihen mit unterschiedlichen Bakterienstämmen dar. Nachdem im letzten Unterabschnitt festgestellt werden konnte, dass die Kultivierungsbedingungen in beiden, zeitweise parallel betriebenen Fermentern den prozesstechnischen Ansprüchen genügen, konnte nun die Eignung der Fermenterkombination zur Beobachtung der Produktentwicklung von *E. coli* 5KpHM12 überprüft werden.

Schwerpunkt dieser Experimente war die Fragestellung, ob online gemessene Werte den als Referenz herangezogenen offline-Daten in quantitativer Hinsicht entsprechen. Dazu wurden die Enzymtests sowohl mit NIPAB – wie in den bisherigen Unterabschnitten – als auch mit PMC (mittels BioViews im Versuchsfermenter) durchgeführt.

Die online-Messung von Penicillin G-Amidase wurde dabei wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde der Versuchsfermenter befüllt. Nach Trennung der Verbindung zur

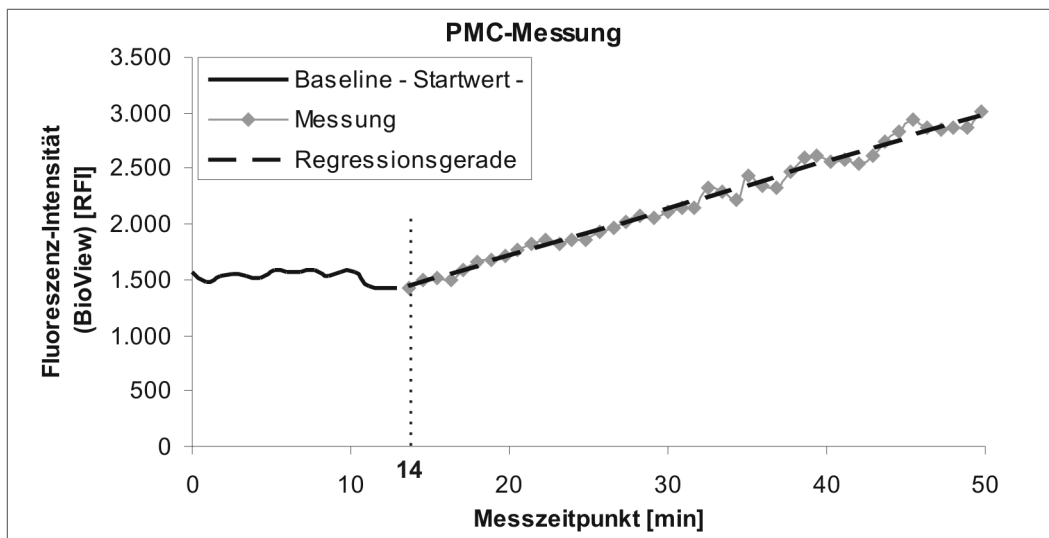


Abb. 3.17: Beispiel für eine online-Messung des Penicillin G-Amidase-Gehalts. Aufnahme der Grundlinie nach Ethanol-Dosierung und Messung nach Zugabe von PMC (ab 14 min).

Hauptkultur wurde der BioView gestartet (vgl. Abb. 3.17 $t = 0$; kontinuierliche Messung / 90 s pro Messung). Direkt im Anschluss wurden die Zellen mittels Ethanolzugabe (10 Vol.-% im Medium) permeabilisiert. Nach Aufnahme der Grundlinie wurde die PMC-Lösung zugegeben. Die Messung wurde dann nach weiteren 20 – 40 min beendet; in den meisten Fällen – vor allem bei höheren Optischen Dichten – war hier bereits eine interpretierbare Steigung in dem BioView-Signal zu erkennen.

Im dargestellten Messverlauf ist die Grundlinie bis $t = 13$ min zu erkennen. Hier ist über die gemittelten Werte keine Steigung zu erkennen. Dies war nach der Zugabe von 10 % Ethanol im Medium grundsätzlich gegeben. Obwohl die Kulturbrühe in diesem Wellenlängenbereich bereits ein hohes Maß an Fluoreszenz zeigt, stiegen die Werte nach Ethanolzugabe nicht weiter an; die Zellen waren fixiert.

Die Dauer der Messung beruhte in erster Linie auf der zu erkennenden Steigung. Somit war es unter Umständen notwendig, die Messung bis zu 50 min lang nach der Ethanolzugabe weiterzuführen, um aus der Streuung der Messwerte eine Regressionsgerade mit verlässlichem Aussagewert (bzw. geringer Abweichung) zu errechnen. Dies war vor allem zu Beginn der Kultivierung bei niedrigen Optischen Dichten der Fall. In dem hier dargestellten Beispiel hätte die Messung allerdings bereits nach ca. 10 min abgebrochen werden können.

Abbildung 3.18 zeigt den Verlauf der OD der Hauptkultur über den gesamten Zeitraum der batch. Auf der Sekundärachse sind die Messwerte der jeweiligen Enzym-Aktivitäten abzulesen, welche sowohl online als auch offline ermittelt wurden.

Die Darstellung suggeriert einen stetigen Verlauf der sechs Einzelmessungen, welche zwischen $t_K = 3:55$ h und $t_K = 71:40$ h durchgeführt wurden. Bereits in diesem Diagramm ist erkennbar, dass sich der Verlauf der offline (mittels NIPAB) und online

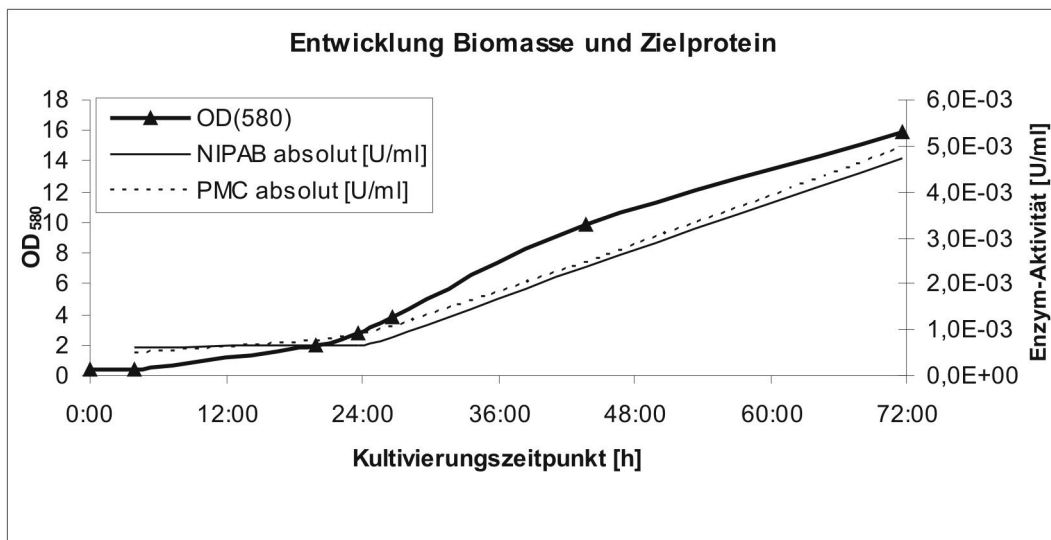


Abb. 3.18: Entwicklung der Biomasse und des Zielproteins innerhalb der gesamten batch-Kultur in der Fermenterkombination mit CgXII. Messzeitpunkte der Enzym-Aktivitäten entsprechen den im Verlauf der OD markierten Zeitpunkten.

(mittles PMC) gemessenen Daten sehr ähnelt. Eine genauere Darstellung ist weiter unten zu finden (Abb. 3.21 auf Seite 53).

Die Bildung von Penicillin G-Amidase korreliert mit der Bildung der Biomasse, erkennbar an dem Verlauf der OD. Einen Blick auf die Abgas-Daten (nur CO₂ gezeigt) sowie die mit dem BioView in der Hauptkultur gemessenen Fluoreszenzsignale vermittelt Abbildung 3.19.

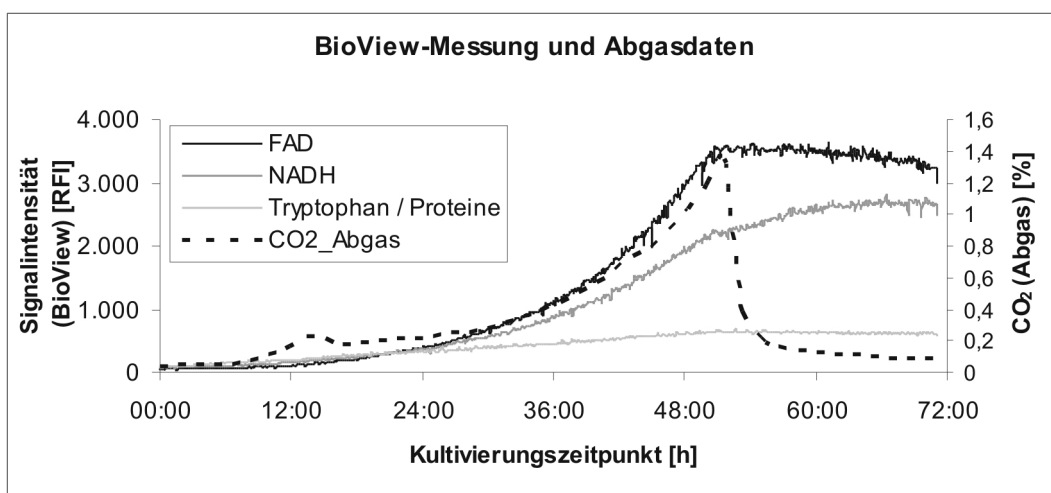


Abb. 3.19: Fluoreszenzsignale von FAD, NADH und Proteinen der Hauptkultur sowie CO₂ im Abgas. Abgesehen vom Signal für Proteine (geringste Intensität) ist ein exponentieller Verlauf zu erkennen.

Sowohl FAD, NADH als auch das im Abgas gemessene CO₂ entwickelt sich exponentiell bis $t_K = 51$ h. Hier ist die Hauptnährstoffquelle (Glucose) verbraucht. Dennoch

ist nach diesem Zeitpunkt weiteres Zellwachstum zu erkennen (Optische Dichte, vgl. Abb. 3.18).

Dies lässt darauf schließen, dass die in der Abbildung 3.18 dargestellte Interpolation der letzten drei Messpunkte (ab $t_K = 27$ h) die tatsächliche Entwicklung der Biomasse nicht realitätsgetreu wiedergibt. In der genannten Abbildung ist keine stationäre Phase zu erkennen, obwohl sowohl die BioView-Daten als auch die gemessene Glucose (Daten hier nicht gezeigt) das Ende der exponentiellen Wachstumsphase deutlich machen.

Der tatsächlichen Verlauf der OD hätte dem entsprechend vermutlich so ausgesehen, wie es die folgende Abbildung (Abb. 3.20) darstellt:

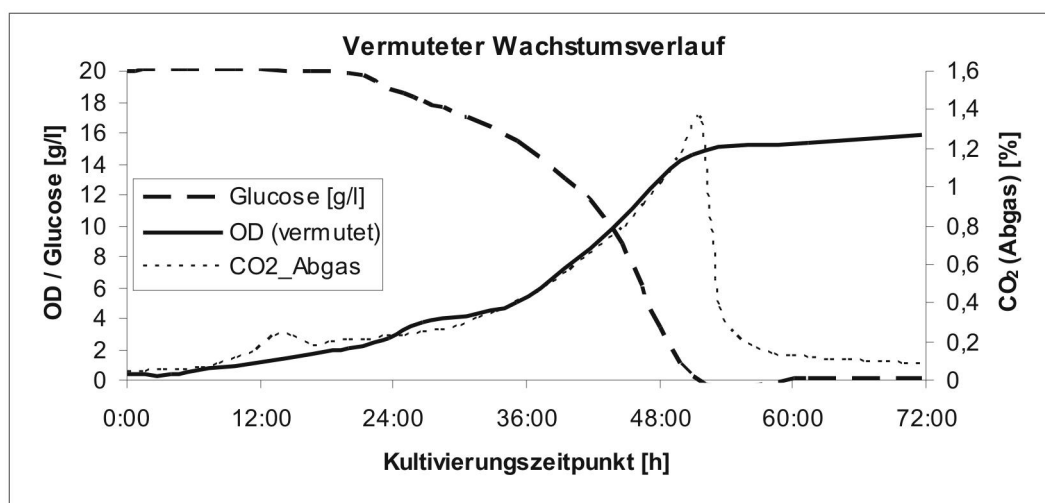


Abb. 3.20: Vermutlich realer Wachstumsverlauf (vgl. Abb. 3.18). Anhand der Abgas-Daten sowie der offline gemessenen Glucosekonzentration wird deutlich, dass der stationäre Bereich ab $t_K = 51$ h beginnt.

Hier ist deutlich eine Abgrenzung des exponentiellen vom stationären Bereich zu erkennen; beim CO₂-Maximum ($t_K = 51$ h) hat die OD ebenfalls ungefähr ihren Maximalwert erreicht. Hierzu wären drei weitere Messungen (z.B. bei $t_K = 35$, 51 und 61 h) sinnvoll gewesen.

Einen direkten Vergleich der offline und online ermittelten Enzym-Aktivitäten zeigt das folgende Säulendiagramm (Abb. 3.21).

Aus der Grafik wird deutlich, dass die ermittelten Absolut-Werte der Enzym-Aktivität sehr gut korrelieren. Bis auf die erste Messung liegen die Werte für die online ermittelte Enzym-Aktivität leicht oberhalb der entsprechenden offline-Werte. Die online-Messung innerhalb des Versuchsfermenters zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Referenzdaten.

Einen Vergleich der zellbezogenen, spezifischen Enzym-Aktivität stellt Abbildung 3.22 dar:

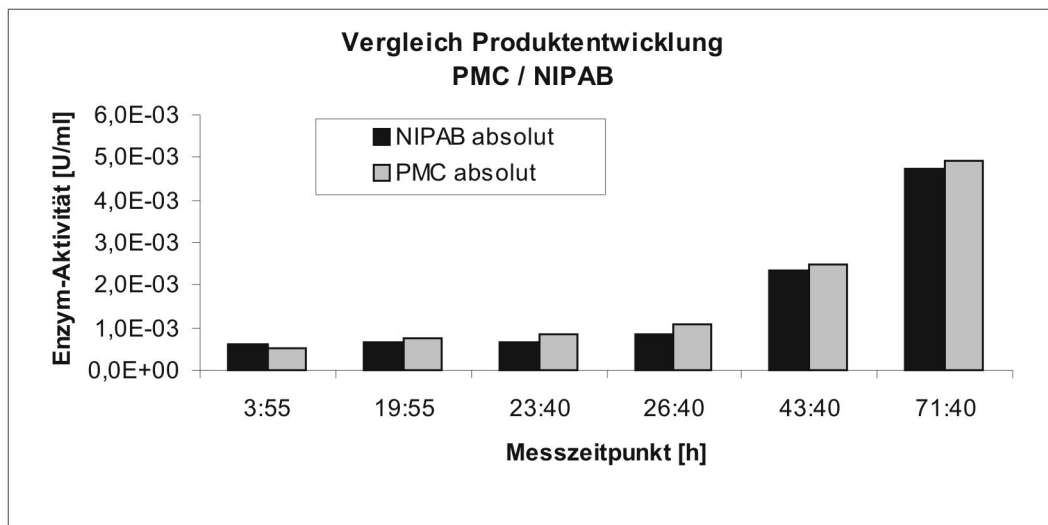


Abb. 3.21: Direkter Vergleich von offline gemessenen Enzym-Aktivitäten der batch-Kultur mit den korrespondierenden online-Daten

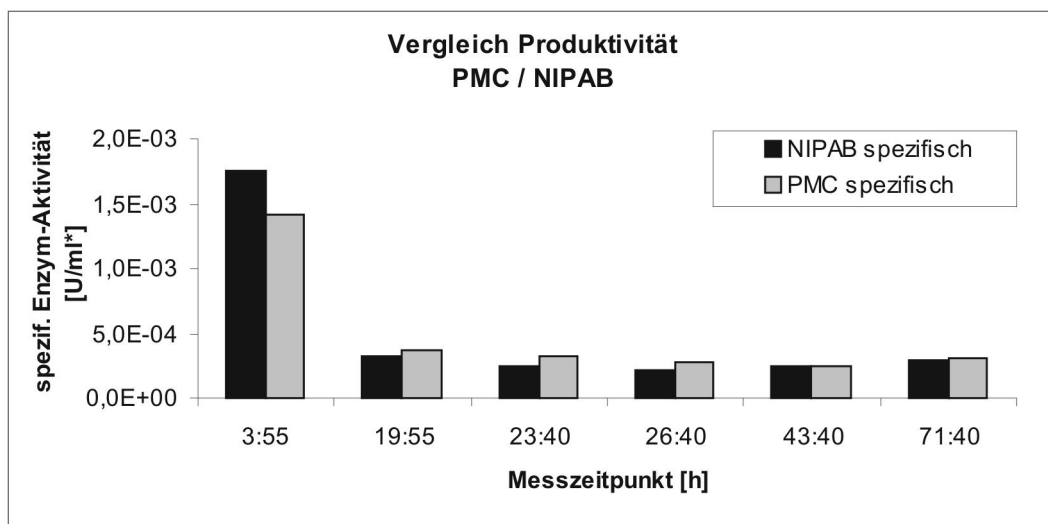


Abb. 3.22: Direkter Vergleich der offline gemessenen *spezifischen* Enzym-Aktivitäten der batch-Kultur mit den korrespondierenden online-Daten

Da die einzelnen Werte auf den Absolutwerten von offline und online-Messungen beruhen (Abb. 3.21), welche durch die zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelte OD dividiert wurden, ist es nicht verwunderlich, dass hier eine vergleichbar gute Übereinstimmung zu erkennen ist. Ein Unterschied liegt im Verlauf der Werte innerhalb des Zeitraums der batch-Kultur. Es ist deutlich zu erkennen, dass die spezifische Enzym-Aktivität im Laufe der Kultivierung sinkt. Genauer gesagt überragt der Wert für die bei $t_K = 3:55$ h gemessene Aktivität den Mittelwert der nachfolgenden Messungen um einen Faktor von ca. 5. Ab $t_K = 19:55$ h rangiert die spezifische Enzym-Aktivität im Bereich zwischen 2,5 und 3,6 U/ml*.

Einen direkten Vergleich der spezifischen mit der absoluten Enzym-Aktivität zeigt Abbildung 3.23.

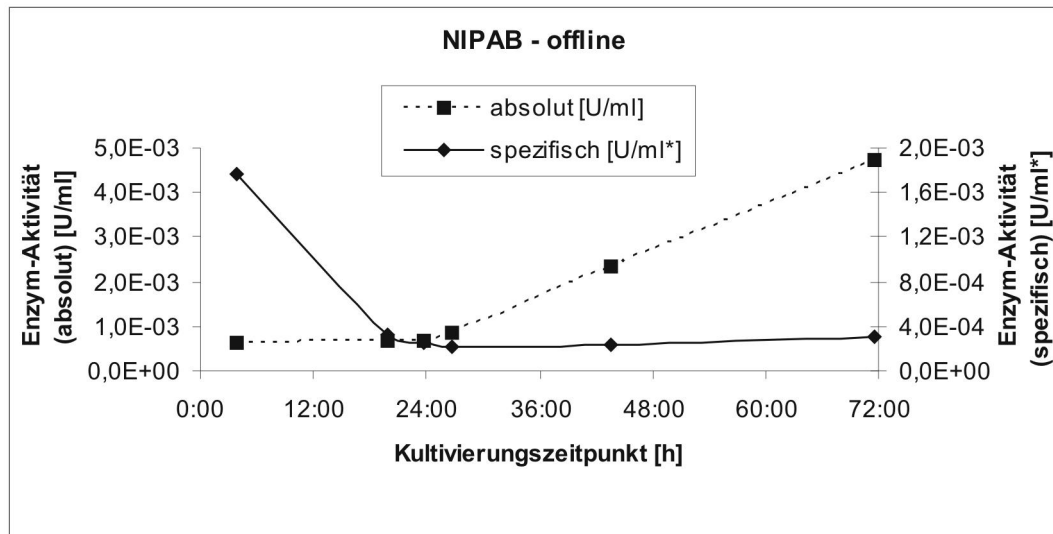


Abb. 3.23: Direkter Vergleich von absoluter mit spezifischer Volumenaktivität. Die Zeitpunkte der Maxima der jeweiligen Kurven unterscheiden sich deutlich.

Hier wird deutlich, dass die Maxima der absoluten und der spezifischen Enzym-Aktivität zeitlich nicht deckungsgleich sind. Der Maximalwert der absoluten Enzym-Aktivität liegt – nach einem kontinuierlichen Anstieg – am Ende der Kultivierung (beim Beginn der stationären Phase). Das Maximum der spezifischen Enzym-Aktivität hingegen ist gleich zu Beginn der Kultivierung zu finden. Die anschließenden Werte weichen nicht nennenswert voneinander ab; die spezifische Aktivität stagniert.

Als Ursache für dieses Verhalten kann vermutet werden, dass die spezifische Enzym-Aktivität bei *E. coli* 5K pHM12 in erster Linie durch das Medium vorgegeben wird. Da die Hauptkultur mit Zellen angeimpft wurde, welche aus einer Vorkultur mit Komplexmedium stammten, ist es nicht verwunderlich, dass deren Vitalität höher ist, als bei dem synthetischen Medium der Hauptkultur. In CgXII können die zellinternen biochemischen Prozesse nicht ausreichend abgedeckt werden. Ein Komplexmedium ist nährstoffreicher und trägt somit zu einer deutlich verbesserten Versorgung der Zellen bei.

Dieser Aspekt konnte im Grunde bereits bei den ersten Versuchen zur Medienkompatibilität (Abschnitt 3.1.1) festgehalten werden. Eine unzureichende Versorgung der Zellen hat eben nicht nur verlangsamte Wachstumsraten sondern ebenfalls eine geringere Zellproduktivität zur Folge. Wachstum und Produktion sind jedoch möglich – wenn auch in eingeschränktem Maße.

Abschließend soll nun dargestellt werden, wie stark die online gemessenen Daten von den offline ermittelten Referenzwerten abweichen. Abbildung 3.24 veranschau-

licht diese Differenz in Form des Faktors von online- zu offline-Daten in prozentualer Abweichung.

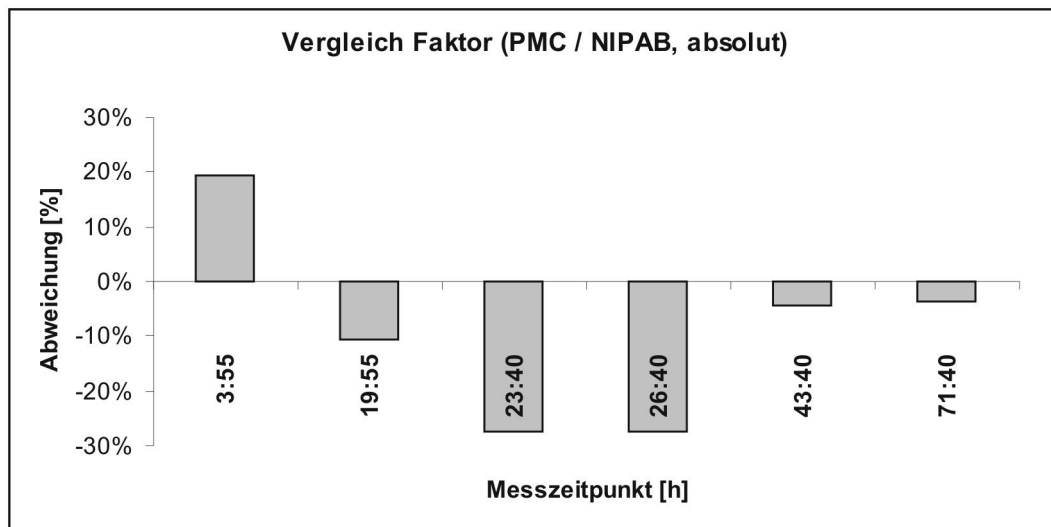


Abb. 3.24: Abweichung zwischen online und offline ermittelten Enzym-Aktivitäten.

Die hier erkennbaren Abweichungen sind uneinheitlich, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier weder um einen mathematischen noch um einen systematischen Fehler handelt. Alle online-Werte liegen bis auf den ersten unterhalb der Referenz-Werte und weichen zwischen 4 und 28 % ab. Diese Abweichung erscheint sehr groß.

Interessant ist, dass der Differenz-Faktor am Ende der Kultivierung (bei $t_K = 43:40$ und $71:40$ h) die geringsten Abweichungen zeigt. Zudem fällt auf, dass die Abweichung bei Messungen, welche zeitlich nahe beieinander liegen, nahezu identisch ist (bei $t_K = 23:40$ und $26:40$ h). Die zweite Messung (bei $t_K = 19:55$ h) kann hingegen als Übergangsphase zwischen der Abweichung im positiven Bereich der ersten Messung und der dritten interpretiert werden, also dort, wo der Einfluss des Vorkultur-Mediums auf die Zellen in der Hauptkultur (bzw. auf die fluoreszenzspektrometrische Messung) nachlässt. Dieser Einfluss hätte gegebenenfalls überprüft werden können, indem die Vorkultur bereits in CgXII durchgeführt worden wäre. Da die Zellen im Schüttelkolben bereits schlechte Wachstumsraten an den Tag gelegt hatten (vgl. Abschnitt 3.1.1), wurde von einer Vorkultur in synthetischem Medium abgesehen.

Bei dieser Betrachtung muss angemerkt werden, dass eine Abweichung von ca. 30 % relativ groß erscheint. Betrachtet man allerdings die geringen Absolutwerte der gemessenen Aktivitäten, so ist diese Abweichung nicht sonderlich hoch. Bei derart empfindlichen Messmethoden wie photometrischen bzw. fluoreszenzspektrometrischen Verfahren kann diese Abweichung toleriert werden.

Zum Vergleich: Alternative Messverfahren, welche ebenfalls zu quantitativen Aussagen führen können (wie beispielsweise eine Kapillar-Elektrophorese), haben deutlich höhere Detektionsgrenzen. Im Falle von Penicillin G-Amidase liegen diese bei 20 μg Protein/ml (entsprechend 0,8 U/ml). Der Maximalwert der hier gemessenen Enzym-Aktivitäten liegt bei 4,8 mU/ml. Dieser Wert liegt um einen Faktor von 168 unterhalb der Detektionsgrenze. Hierzu hätte das Produkt zunächst flüssigkeitschromatographisch aufgereinigt werden müssen, was nicht nur das Downstreaming verlängert, sondern die online-Messung direkt im Medium gänzlich vereitelt hätte.

Als Vermutung kann zusammenfassend festgehalten werden, dass der Aussagewert der online-Messung mit sinkendem Komplexmedien-Anteil steigt. Sehr wahrscheinlich haben restliche Medienbestandteile der Vorkultur einen negativen Einfluss auf eine Messung direkt im System.

3.2.4 Fazit der Versuchsreihe mit *E. coli* 5K pHM12

1. Die Kultivierungsbedingungen beider Einheiten der Fermenterkombination sind zumindest in einem zeitlichen Rahmen von 60 min pro Einzelmessung vergleichbar. Der Versuchsfermenter kann dazu benutzt werden, einzelne Segmente der Hauptkultur zu entnehmen und unter vergleichbaren Bedingungen weiter zu kultivieren (vgl. Abb. 3.15 auf Seite 48).
2. Der Verlauf der Bildung von Penicillin G-Amidase in Komplexmedium korreliert mit dem CO_2 -Anteil im Abgas; hier kann der beste Erntezeitpunkt aus den Abgasdaten ermittelt werden. Maximalwerte sind direkt zu Beginn der stationären Phase zu erwarten (vgl. Abb. 3.14 auf Seite 47).
3. Die Maxima der gemessenen absoluten und spezifischen Enzym-Aktivitäten können zeitlich differieren. Im Falle der Verwendung von Komplexmedien liegen diese zeitlich übereinander (vgl. Abb. 3.13 auf Seite 46). Bei der Verwendung von synthetischem Medium im Anschluss an eine Vorkultur aus Komplexmedium liegen die spezifischen Maxima am Anfang der Kultivierung, da hier der Einfluss des Vorkultur-Mediums dominiert, welches ungefähr 5fach höhere Aktivitäten hervorbringt. Dieser Einfluss sinkt im Verlauf der Kultivierung nach ca. 20 h (vgl. Abb 3.23 auf Seite 54).
4. Der Verlauf der Penicillin G-Amidase-Aktivität in synthetischem Medium korreliert mit der Bildung von Biomasse. Um diesen Verlauf realitätsnah abbilden zu können, ist es notwendig, insbesondere um die Wendepunkte herum (Übergang lag-Phase / exponentielle Phase und Übergang exponentielle Phase / stationäre Phase) mehrere Messungen durchzuführen (vgl. Abbildungen 3.18 auf Seite 51 und 3.20 auf Seite 52).

5. Da die BioView-Messung online durchgeführt wird, ergibt sich der Vorteil einer direkten Prozessüberwachung hinsichtlich Zellaktivität und der Bildung von Biomasse. Somit können Zeitpunkte von Limitierungen genau abgelesen werden. Damit ist es möglich, offline gemessene Werte (beispielsweise für die OD) zu hinterfragen und Übergänge in den Wachstumsphasen gegebenenfalls besser einzuordnen (vgl. Abbildungen 3.18 auf Seite 51 und 3.20 auf Seite 52).
6. Die online-Messung der Penicillin G-Amidase-Aktivität mittels PMC zeigt im Vergleich mit den offline durchgeführten Referenz-Werten (NIPAB) ein hohes Maß an Vergleichbarkeit. Offline- und online-Tests sind annähernd kongruent; der Verlauf der Produktbildung kann mit beiden Methoden gut abgebildet werden (vgl. Abb. 3.21 auf Seite 53).
7. Das Medium bestimmt sehr stark die spezifische Enzym-Aktivität. Komplexmedien ergeben bessere Wachstumsraten und höhere Absolutwerte der Enzym-Aktivität. Die spezifische Enzym-Aktivität von Zellen, welche in LB-Medium gewachsen sind, ist ungefähr fünfmal höher als in CgXII. Dies wird insbesondere dann deutlich, wenn eine Kultur in synthetischem Medium aus einer Vorkultur angeimpft wird, welche in Komplexmedium gewachsen ist. Hier sind die höchsten Werte für die spezifische Enzym-Aktivität zu Kultivierungsbeginn festzustellen. Der Einfluss des Vorkulturmediums nimmt anschließend deutlich ab; die spezifische Enzym-Aktivität ändert sich anschließend bis zum Erreichen der stationären Phase kaum (vgl. Abbildung 3.22 auf Seite 53).
8. Das Medium der Vorkultur beeinflusst die BioView-Messung. Abweichungen zwischen offline und online gemessenen Enzym-Aktivitäten von bis zu 30 % sind in der Anfangsphase der Hauptkultur zu finden, in der noch viele Medienbestandteile der Vorkultur vorhanden sind. Gegen Ende der Kultivierung sind die Abweichungen minimal; hier sind die störenden Elemente verstoffwechselt worden (vgl. Abb. 3.24 auf Seite 55).
9. Im Hinblick auf die Einfachheit des Messverfahrens im Rohextrakt (bzw. im Medium direkt) sind die Abweichungen zwischen online- und offline-Werten tolerabel. Photometrische bzw. fluoreszenzspektrometrische Messverfahren sind hier gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. der Kapillar-Elektrophorese deutlich im Vorteil, da das Zielprotein aufgrund der besonders niedrigen Detektionsgrenzen nicht erst aufgereinigt werden muss.
10. Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass mit der Fermenterkombination gute Ergebnisse erzielt werden im Hinblick auf systemische Bestandteile des Ver-

suchsaufbaus zur Charakterisierung der zellbezogenen Enzymproduktion innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen. Die Fermenterkombination ist geeignet, wachstumsphasenabhängige Produktionsunterschiede aufzuzeigen.

3.3 *E. coli* K12 pJOE 2702 in der Fermenterkombination

3.3.1 Vorabüberlegungen

Experimente mit dem Stamm *E. coli* K12 pJOE 2702 stellen den zweiten von drei wesentlichen Teilen der Versuche dieser Arbeit dar. Der Schwerpunkt des voran gegangenen Abschnitts lag darin, die Rahmenbedingungen kurzzeitiger Kultivierungen im Versuchsfermenter zu überprüfen und die quantitative Korrelation von offline und online gemessenen Daten zu ermitteln (vgl. Übersicht der experimentellen Schwerpunkte, Abschnitt 2.5).

In diesem zweiten Teil soll eine wachstumsphasenabhängige Produktentwicklung verfolgt werden, zu welcher eine chemische Induktion erforderlich ist. Dies soll anhand eines rekombinanten Organismus begutachtet werden, dessen Produktbildung an eine Promotor-abhängige Gensequenz gekoppelt ist. Genauer soll auf die Frage eingegangen werden, ob sich die Induktionszeitpunkte wesentlich voneinander unterscheiden sowohl im Hinblick auf die absolute als auch auf die Zellzahl-bezogene (spezifische) Enzym-Aktivität.

Als Modell-Organismus für diese Versuchsreihe wurde *E. coli* K12 pJOE 2702 gewählt. Diese Wahl beruhte im Wesentlichen auf vier Gründen:

1. Wie im Abschnitt 2.4.2 erläutert wurde, ist dieser Stamm chemisch induzierbar, da er über den *rhaP*-Promotor verfügt. Hinter dem Promotor stromabwärts kodieren Anteile der Plasmid-DNA unter anderem für die Bildung von *para*-Nitrobenzyl-Esterase.
2. Der Induktor sollte selektiv und kostengünstig sein im Vergleich zu Induktoren, welche repressiv z.B. im Bereich des *lac*-Operons wirken: Hier gebräuchliche Induktoren sind beispielsweise IPTG und Lactose. IPTG ist selektiv und wird damit nicht metabolisiert, ist aber im Vergleich mit Rhamnose ungefähr fünffach kostenintensiver. Lactose als gebräuchlicher Induktor ist zwar kostengünstig, wird aber in den meisten Mikroorganismen im Stoffwechsel benötigt. Somit kann Lactose nicht gezielt als Induktor eingesetzt werden.

Die Deletion der *L*-Rhamnose-Isomerase bei *E. coli* K12 pJOE 2702 verhindert den Abbau des Induktors. Dadurch können gezielt vergleichsweise hohe Produktausbeuten erreicht werden. Dieser Vorteil sollte sowohl im Kultivierungsabschnitt - als auch im Downstream-Bereich der Experimente in kompensierender Art zum Tragen kommen. Auf der Kultivierungs-Seite zahlte sich dieser Vorteil

bei der Verwendung des synthetischen CgXII-Mediums aus, da hier aufgrund einer eingeschränkten Nährstoffversorgung (im Vergleich mit Komplexmedien) grundsätzlich mit Produkteinbußen gerechnet werden musste.

3. Zudem erleichtert eine hohe Produktausbeute das Downstream-Verfahren. Wie bei den Experimenten im Abschnitt 3.2 (mit NIPAB als Substrat) sollte die Produktquantifizierung möglichst photometrisch mit dem unaufgereinigten Zellrohextrakt durchgeführt werden können. Hohe Produktkonzentrationen im Zellrohextrakt sollten dabei starke Signale im Enzym-Assay begünstigen. Dies ist insbesondere beim Bestimmen der Enzym-Aktivitäten von Proben aus der Fermenterkombination von Vorteil, welche in der Anfangsphase der batch-Kultur genommen wurden, da hier mit vergleichsweise geringen Aktivitäten gerechnet werden musste. Bei Proben mit höheren Enzymkonzentrationen, welche im späteren Verlauf der Kultivierung erhalten wurden, sollte sich dieser Vorteil in einem geringeren Fehler der Standardabweichung niederschlagen.
4. Zuletzt war es wichtig, dass der infrage kommende Stamm auch mit dem Medium CgXII kompatibel ist. Dies konnte in den Vorversuchen (vgl. Abschnitt 3.1.1) im Hinblick auf dessen Wachstumsverhalten bereits festgestellt werden.

Das Resultat der genannten Vorversuche übertraf dabei die Erwartungen, da der Stamm in CgXII höhere Wachstumsraten an den Tag legte, als sie den Experimenten in der Fermenterkombination dienlich wären: Die Dauer einer gesamten batch-Phase (bis zum stationären Bereich) lag bei ca. 40 h. Dies schränkte die Möglichkeit der Segmentierung in zeitlich voneinander getrennte Induktions-Phasen ein, da für jede Induktion ein Zeitraum von bis zu 4 h veranschlagt wurde, um den Einfluss des Induktors nachweisbar zu machen.

3.3.2 Schüttelkolbenversuche zur Inhibierung der Wachstumsrate

Aus diesem Grund wurde versucht, die Kultivierungen in der Fermenterkombination bei geringeren Temperaturen (zunächst 30 °C; Daten nicht gezeigt, anschließend 28 °C), um das Wachstum zu inhibieren. Des Weiteren wurden Versuche im Schüttelkolben durchgeführt, die darauf abzielten, das Wachstum durch höhere Antibiotikakonzentrationen zu verlangsamen. Abbildung 3.25 auf der folgenden Seite zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe.

In Relation zur Standardkonzentration von 75 mg/l wurde sowohl mit der doppelten als auch mit der vierfachen Menge an Ampicillin (150 bzw. 300 mg/l) kultiviert. Hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede in der Wachstumskinetik; lag-Phase und exponentielles Wachstum verlaufen annähernd parallel, lediglich im stationären Bereich (ab $t_K = 28$ h) zeigte sich bei 300 mg/l eine nennenswerte Abweichung zu einer geringeren maximalen OD. Die in der Abbildung erkennbaren Differenzen sind

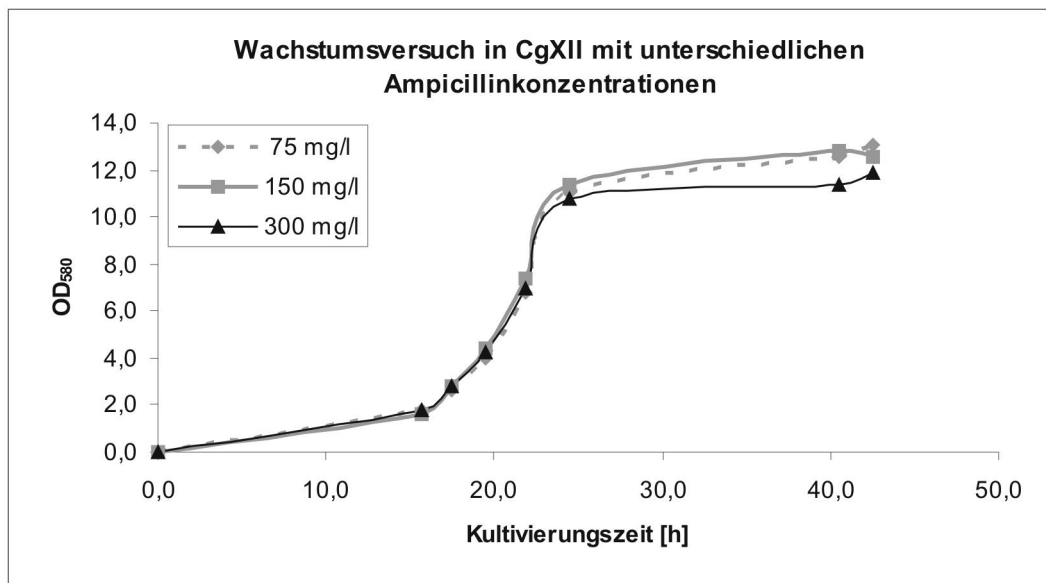


Abb. 3.25: Wachstumsversuch *E. coli* K12 pJOE 2702 in CgXII mit unterschiedlichen Antibiotika-Konzentrationen. Höhere Dosierungen als 75 mg/l (Standard) bewirken keine Wachstumsverzögerung.

vermutlich nicht auf die unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums zurückzuführen. Vielmehr ist der Grund in diesem Falle in dem Aspekt der biologischen Vielfalt zu suchen.

Nachteilig an der Ampicillin-Resistenz als genetischem Selektionsmarker von *E. coli* K12 pJOE 2702 ist die Problematik, dass Antibiotika wie die Penicilline und das hier verwendete Ampicillin auf einem β -Lactam-Grundgerüst aufbauen. Die zur Resistenz gegen diese Antibiotika notwendige β -Lactamase wird während der Kultivierung von den resistenten Organismen gebildet und ins Medium freigesetzt. Hier sorgt diese für einen enzymatischen Abbau des Antibiotikums. Das Ergebnis der gezeigten Versuchsreihe wird in erster Linie auf diesem Aspekt beruhen, da sich die *effektiven* Ampicillinkonzentrationen nicht spürbar unterscheiden.

Die Verzögerung des Wachstums von *E. coli* K12 pJOE 2702 muss somit hauptsächlich durch das Herabsetzen der Kultivierungstemperatur bewerkstelligt werden; höhere Antibiotikakonzentrationen hatten darauf keinen Einfluss.

3.3.3 Entwicklung der pNBE-Aktivität innerhalb einer batch-Kultur

Um die Entwicklung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase innerhalb einer gesamten batch-Kultur zu verfolgen, wurde zunächst eine Kultivierung bei 30 °C ausschließlich im 10 l Fermenter durchgeführt, um die Wachstumskinetik im Fermenter zu begutachten. Anhand der offline ermittelten Glucose-Werte und dem online protokollierten Verlauf des CO₂ im Abgas zeigte sich, dass die Zellen bereits nach 19 h die stationäre Phase erreicht hatten (ohne Abbildung).

Da dieser Zeitraum für unterschiedliche Induktions-Experimente nicht als ausreichend befunden wurde, wurde die Temperatur um weitere 2 °C gesenkt. Dies führte schließlich zu einem akzeptablen Zeitfenster. Abbildung 3.26 zeigt die Zellzahlentwicklung (anhand der OD), des Freisetzens von CO₂ in der Abluft sowie die (zeitlich interpolierten) Messergebnisse der offline bestimmten absoluten *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität, welche nach einer zweistündigen Induktion im Versuchsfermenter erhalten wurden.

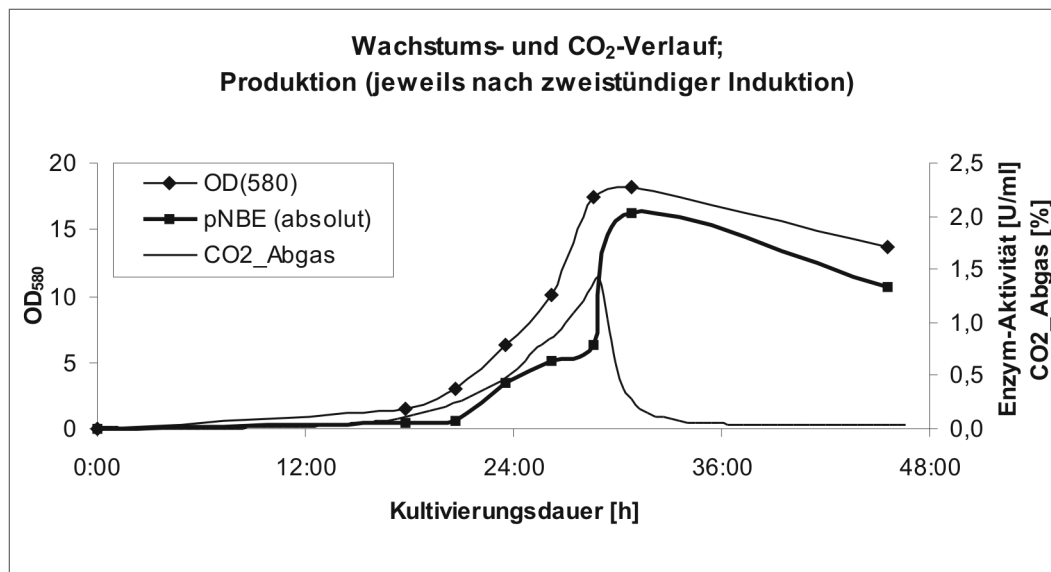


Abb. 3.26: Verlauf von OD, CO₂ und Enzym-Aktivität in der Fermenterkombination mit *E. coli* K12 pJOE 2702 bei 28 °C. Der zeitliche Rahmen von 29 h bis zum Erreichen der stationären Phase ist akzeptabel. Zum Ende der exponentiellen Phase (= Maximum CO₂) zeigt die Enzym-Aktivität einen sprunghaften Anstieg und entwickelt sich danach annähernd parallel zur Biomasse (OD).

Verglichen mit dem im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Wachstum von *E. coli* 5K pHM12 in CgXII in der Hauptkultur (vgl. Abb. 3.18 auf Seite 51) ist hier ein Wachstumsverlauf zu erkennen, welcher charakteristisch für eine Kultivierung unter limitierenden Nährstoffbedingungen ist. Die einzelnen Wachstums-Phasen sind deutlich voneinander abgegrenzt. Dies mag einerseits daran liegen, dass die offline-Messungen zur Bestimmung der OD im Gegensatz zu dem genannten Experiment zu günstigeren Zeitpunkten durchgeführt wurden. Andererseits kann auch davon ausgegangen werden, dass *E. coli* K12 pJOE 2702 mit dem verwendeten Medium besser kompatibel ist. Dies bestätigt die ersten Ergebnisse der Vorversuche im Abschnitt zur Bestimmung der Medienkompatibilität im Schüttelkolben (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wurde der Zeitraum der batch-Kultur ab dem Beginn der exponentiellen Phase in sieben unterschiedliche Segmente unterteilt, in denen die Induktionen im Versuchsfermenter stattfanden. Die hier dargestellten

Daten wurden offline ermittelt, da kein fluorogenes Substrat für einen online-Test (wie PMC in der Versuchsreihe um *E. coli* 5K pHM12) zur Verfügung stand.

Aus den offline-Daten geht hervor, dass die Bildung des Zielproteins vornehmlich zu Beginn der stationären Phase begünstigt ist, welche in der Abbildung zeitlich hinter dem Maximalwert des CO₂ im Abgas liegt. Im Bereich zwischen $t_K = 28$ und 30 h erfahren die Werte der *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität einen sprunghaften Anstieg. Der Verlauf der gemessenen absoluten Enzym-Aktivität gliedert sich an den Verlauf der Bildung von Biomasse an.

Einen Blick auf die zellbezogene (spezifische) Enzym-Aktivität vermittelt die Abbildung 3.27:

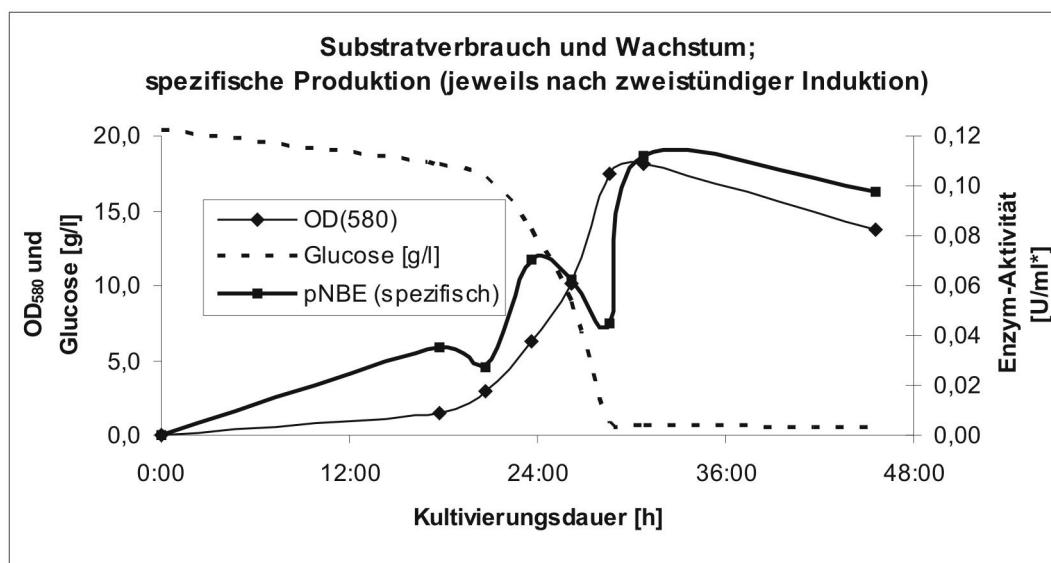


Abb. 3.27: Wachstum und Substratverbrauch verlaufen typisch für eine batch-Kultur. Die spezifischen Enzym-Aktivitäten deuten auf Diauxien bzw. Stoffwechselveränderungen hin.

Hier ist der Eintritt in die stationäre Phase anhand der offline gemessenen Glucose-Konzentrationen abzulesen. Es ist erkennbar, dass die in Abbildung 3.26 anhand der CO₂-Daten gezeigte Limitierung auf dem Mangel der Hauptnährstoffquelle Glucose beruht. Dies ist ein erwartetes Resultat aus dem Experiment; im Medium scheinen abgesehen von Glucose noch ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stehen.

Interessant ist der Verlauf der spezifischen Enzym-Aktivität. Hier sind (bei $t_K = 20$ h und $t_K = 28,5$ h) lokale Minima zu erkennen. Diese deuten auf Stoffwechselveränderungen der Zellen hin, welche gegebenenfalls durch Medienbestandteile – wie beispielsweise Reste des Vorkulturmediums – hervorgerufen werden.

Insgesamt steigen die Werte der spezifischen Enzym-Aktivität bis zum Eintritt in die stationäre Phase an. Der Wert bei $t_K = 30:45$ h unterscheidet sich vom Minimum (bei $t_K = 20:40$ h) um mehr als 400 %. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Ergebnissen mit *E. coli* 5K pHM12. Dort blieb die spezifische Enzym-Aktivität nahezu

auf einem konstanten Level (vgl. Abb 3.23 auf Seite 54). Wahrscheinlich wäre im Falle von *E. coli* K12 pJOE 2702 bei einer Erhöhung der vorgelegten Hauptnährstoffquelle auch eine weitere Steigerung sowohl der absoluten als auch der spezifischen Aktivität möglich.

Die Enzym-Aktivitäten wurden im zeitlich maßstabsgetreuen Verlauf in den Abbildungen 3.26 und 3.27 im Zusammenhang mit anderen Prozessparametern dargestellt. Abbildung 3.28 stellt die gemessenen absoluten den korrespondierenden spezifischen Enzym-Aktivitäten in einem Säulendiagramm gegenüber:

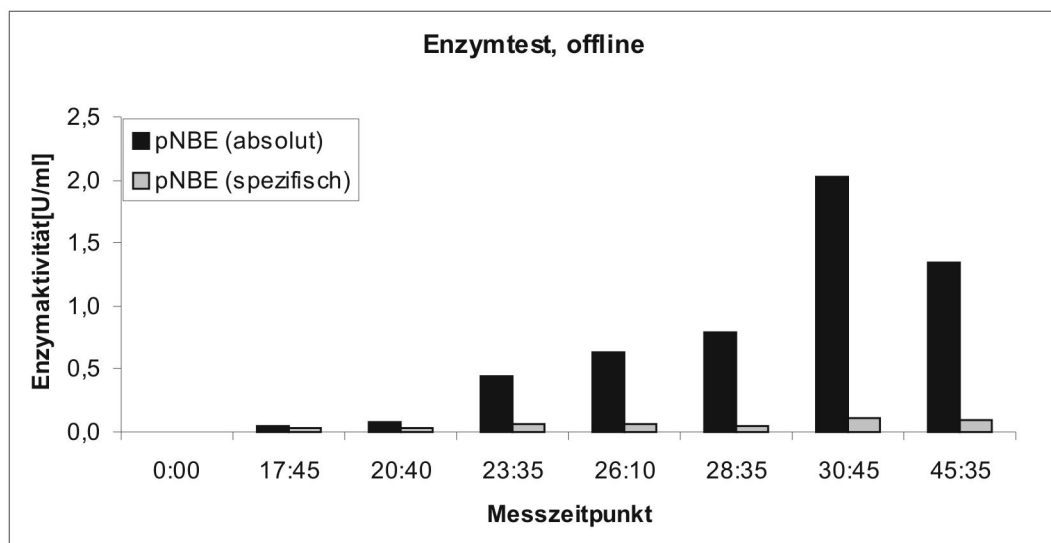


Abb. 3.28: pNBE-Aktivitäten im Versuchsfermenter nach zweistündiger Induktion. Spezifische *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten ändern sich nicht merklich. Die Absolut-Werte des Zellrohextraktes sind mit max. 2 U/ml sehr hoch (verglichen mit Penicillin G-Amidase).

Da die Differenz zwischen den Absolutwerten und denen für die spezifische Enzym-Aktivität auf der gemessenen OD beruhen, liegt der Unterschied bei einem Faktor von bis zu 18. Bemerkenswert ist die hohe Enzymkonzentration im Zellrohextrakt, welche zu Absolutwerten von bis zu 2 U/ml führt. (Zum Vergleich: Maximale Penicillin G-Amidase-Konzentration lag im Bereich von $1,7 \cdot 10^{-2}$ U/ml.) Dieser hohe Maximalwert und die Tatsache, dass minimale Konzentrationen Aktivitäten im Bereich von 0,3 U/ml hervorbrachten, erleichtert die Messungen im Hinblick auf die Auswertung der Messwerte; hier konnten starke Messsignale erzielt werden ohne die Notwendigkeit diverser Aufkonzentrations-Schritte.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine chemische Induktion innerhalb des Versuchsfermenters zu interpretierbaren Ergebnissen führt. Die Fermenterkombination ist somit auch in diesem Bereich dienlich. Die Schwankungen der spezifischen Enzym-Aktivität gaben Anlass für weitere Experimente, da die hier dargestellten Ergebnisse auf Einzelmessungen beruhen, welche 2 h nach erfolgter Induktion ermittelt wurden.

3.3.4 Enzym-Aktivitäten während der Induktion in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Im Folgenden wurde der Verlauf innerhalb der Induktionsphase (zwischen i_0 und i_{120} und ggf. darüber hinaus) beobachtet. Hierdurch konnten Schwankungen in der spezifischen *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität kritischer hinterfragt werden. Zudem sollten die Einzelproben im Dreifachtest aufgeschlossen und vermessen werden, um über die Standardabweichung zu verlässlicheren Ergebnissen zu kommen.

Abbildung 3.29 zeigt zunächst den Verlauf der OD sowohl im Versuchsfermenter als auch in der HK ohne auf die resultierenden Enzym-Aktivitäten einzugehen. Der maximale CO_2 -Wert markiert den Übergang zur stationären Phase.

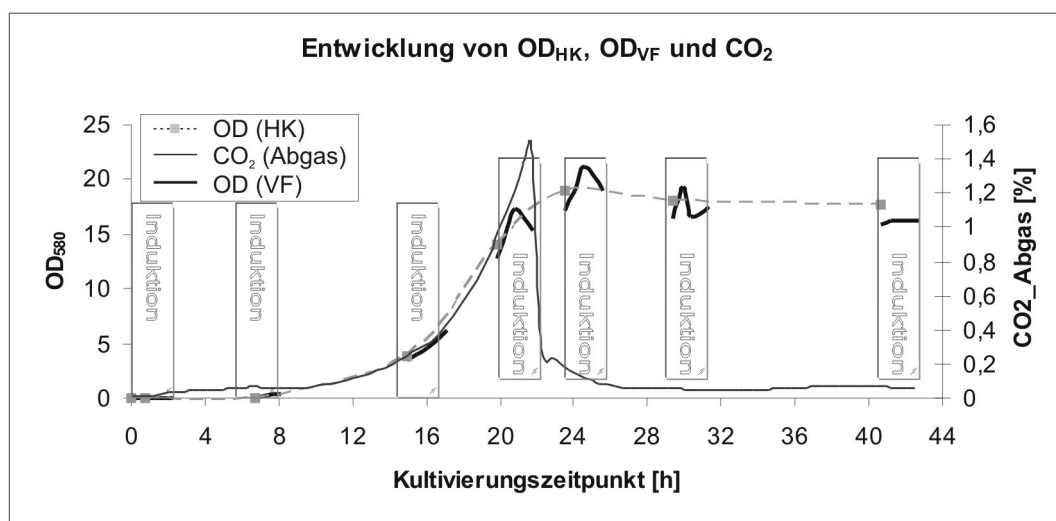


Abb. 3.29: Der Verlauf der sieben unterschiedlichen Induktionsphasen zeigt Induktionsbedingte Differenzen zwischen dem Wachstumsverlauf des Versuchsfermenters (VF) und der Hauptkultur (HK) nach dem Ende der exponentiellen Phase.

Die Anfangswerte der OD liegen in diesem Zeitraum erkennbar unter den Vergleichswerten der Hauptkultur. Dies liegt daran, dass die dargestellten Werte zum Zeitpunkt i_0 aus den Werten der OD der Hauptkultur stammen, welche rechnerisch auf die resultierende OD (nach Verdünnung durch die Stammlösung des Induktors) normiert wurden.

Hier ist erkennbar, dass sich die OD des Versuchsfermenters innerhalb der sieben voneinander abgesetzten Induktionsphasen von dem Verlauf der OD im Kultivierungsfermenter unterscheidet. Diese Unterschiede in den resultierenden Wachstumsraten fallen insbesondere in der exponentiellen Phase stark ins Gewicht.

Abbildung 3.30 zeigt den Verlauf von OD, Substratkonzentration und den gemessenen *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten. Aus der sehr geringen Standardabweichung von $\pm 5\%$ (Mittelwert über alle Messungen) folgt eine hohe

Verlässlichkeit der Werte. Bemerkenswert ist der uneinheitliche Verlauf der *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten innerhalb der einzelnen Induktions-Sequenzen.

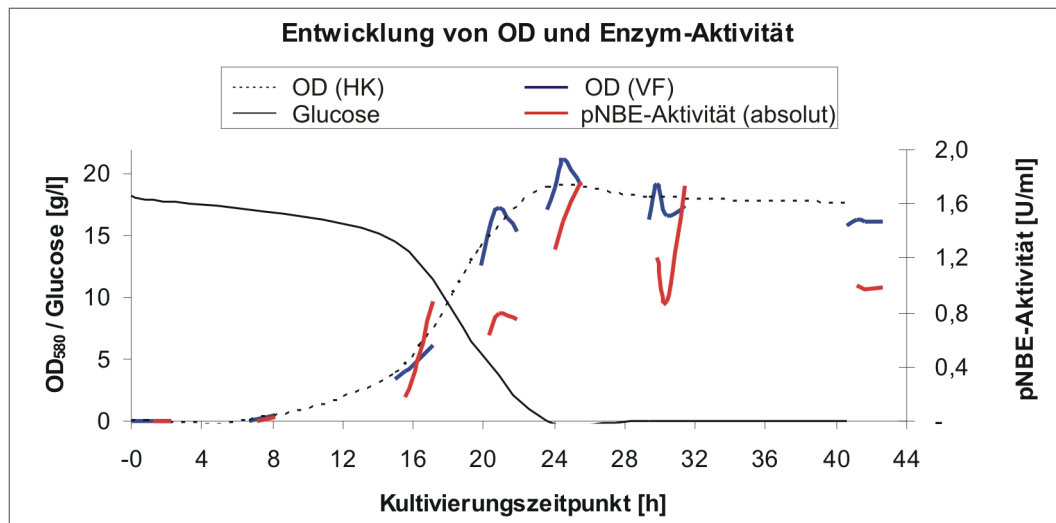


Abb. 3.30: Der Verlauf von OD_{HK} , OD_{VF} , Substratkonzentration und *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten ist nicht einheitlich; Diauxie-Vorgänge fallen merklich ins Gewicht.

Zur Interpretation des dargestellten Diagramms kann vereinfachend Folgendes gesagt werden:

Die Entwicklung der Enzym-Aktivität verläuft nicht einheitlich, aber tendenziell steigend bis zum Erreichen der stationären Phase. Betrachtet man zunächst ausschließlich die End-Werte (2 h nach Induktion), so ist bis auf den vierten Induktionszeitraum (zwischen $t_K = 20$ und 22 h) eine kontinuierliche Steigerung zu erkennen. Bezieht man den genannten vierten Induktionszeitraum mit ein, dann ist hier ein lokales Minimum zu erkennen. Ein vergleichbares Minimum war bereits in der Abbildung 3.26 auf Seite 61 kurz vor dem Ende der exponentiellen Phase bei 28,5 h zu erkennen.

Nimmt man den dort gezeigten Verlauf als Schablone für den Verlauf der gemessenen Enzym-Aktivitäten und kompensiert den zeitlichen Rahmen (von 28 h auf 24 h, bis die vorgelegte Glucose verbraucht ist), so verwundert es weniger, im Bereich der vierten Induktion ein lokales Minimum zu finden. Noch deutlicher war dieses Minimum in der spezifischen Enzym-Aktivität (Abb. 3.27 auf Seite 62) erkennbar. Hier scheinen sich medienbedingte Stoffwechselveränderungen in der Produktausbeute niederzuschlagen.

Interessant ist, dass die Wachstumsraten nach erfolgter Induktion im Vergleich zur Hauptkultur steigen. Dies ist vor allem bei den Zeitpunkten $t_K = 20$ h, 24 h und 30 h zu erkennen. Insbesondere der Verlauf bei 30 h – also schon relativ weit in der stationären Phase – lässt die Vermutung zu, dass die zur Induktion herangezogene Rhamnose als Substrat in den Gesamtstoffwechsel der Zelle integriert wurde.

Zu den genannten Zeitpunkten ist zudem zu erkennen, dass die Bildung des Zielproteins der Entwicklung der Biomasse entgegen wirkt: Ungefähr 60 min nach erfolgter

Induktion sinken die Werte der OD im Versuchsfermenter (OD_{VF}) wieder ab, zugunsten einer verstärkten Enzymproduktion. In diesem Bereich desintegrieren viele Zellen. Unter Umständen ist der hier gemessene Wert für die Enzym-Aktivität die Summe aus den Enzymmengen, welche im Anschluss offline durch den manuellen Zellaufschluss gewonnen werden konnten und den Enzymmengen, welche aus bereits lysierten Zellen im Medium resultieren.

Zuletzt fällt auf, dass der Endwert der Enzym-Aktivität im sechsten Induktions-Experiment (bei 31,5 h) gleich hoch ist, wie der entsprechende Wert im fünften Experiment. Dies lässt die Frage zu, ob dieser Wert in erster Linie darauf beruht, dass hier zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses bereits viele lysierte Zellen vorlagen, oder ob durch eine Minimal-Versorgung der Zellen – beispielsweise durch einen Glucose-Feed – im stationären Bereich die eigentlichen höheren Enzym-Aktivitäten erzielt werden können. (Dieser Frage wurde im Folgenden experimentell nachgegangen; zu finden ab Seite 68.)

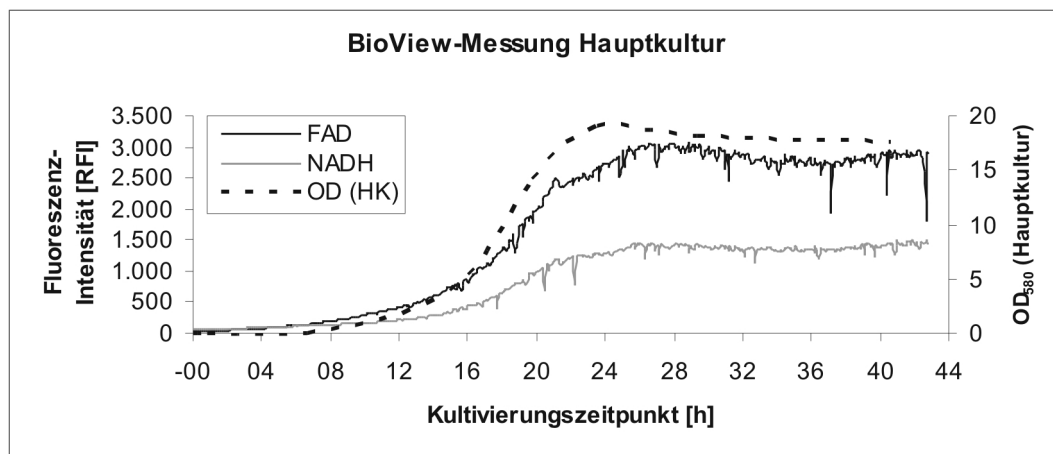


Abb. 3.31: Die BioView-Daten der batch-Kultur von *E. coli* K12 pJOE 2702 (vgl. auch Abb. 3.29 und 3.30) zeigen einen weichen Übergang zur stationären Phase (ab $t_K = 24$ h) und spiegeln die Entwicklung der Biomasse der Hauptkultur wider.

Einen Blick auf die BioView-Aufzeichnung der Hauptkultur gewährt die Abbildung 3.31. Das Signal für Tryptophan war hier sehr schwach ausgeprägt und ist aus diesem Grund nicht mit in die Abbildung hinein genommen worden. Im BioView-Spektrum ist die Entwicklung der Biomasse anhand der Daten von FAD und NADH gut nachvollziehbar. Da die produktionsrelevante Messung im Versuchsfermenter durchgeführt wurde, kann anhand der BioView-Daten hier lediglich eine Aussage über das Zellwachstum, nicht aber über die Produktion des Zielproteins getroffen werden.

Eine Überprüfung des Einflusses der Induktion auf intrazelluläre Stoffwechselläufe sollte anhand der Daten des zweiten BioViews erfolgen, mit welchem die Einzelexperimente im Versuchsfermenter beobachtet wurden. Abbildung 3.32 zeigt das

BioView-Diagramm des sechsten Segments (vgl. Abb. 3.30), welches während der stationären Phase aufgenommen wurde.

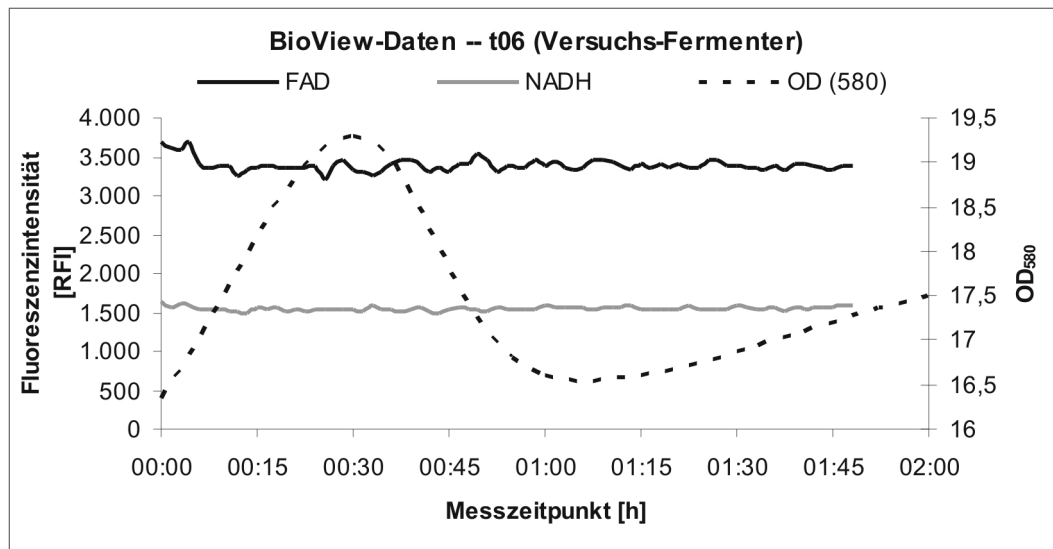


Abb. 3.32: Induktions-Sequenz im Versuchsfermenter in der stationären Phase (ab $t_K = 29,5$ h; Zeitpunkt der Induktion hier bei $t = 0$). Die BioView-Daten lassen nicht auf eine Stoffwechselveränderung schließen. Die Werte stagnieren.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Entwicklung der Biomasse in diesem Bereich durch den BioView nicht dargestellt wird. Zudem ergeben sich keine Signalveränderungen, welche auf erhöhte Zellaktivität schließen lassen. Die Bildung des Zielproteins und die damit verbundene mikrobiologische Aktivität der Zellen kann in diesem Fall anhand der Signale für FAD und NADH mittels BioViews nicht aufgeschlüsselt werden.

Abbildung 3.33 vermittelt schließlich eine Übersicht über die Entwicklung der absoluten und spezifischen Enzym-Aktivität. Hier wird deutlich, dass die Produktentwicklung bis in den Bereich der stationären Phase ($t_K = 32$ h) kontinuierlich erfolgt.

Die maximale spezifische Enzym-Aktivität ist zu Beginn der exponentiellen Phase zu finden ($t_K = 17$ h). Alle weiteren Enzym-Aktivitäten rangieren zwischen 60 und 70 % unterhalb dieses Wertes. Sollte die spezifische Enzym-Aktivität die Vitalität (und damit die Produktivität) der Zellen in dem Medium repräsentieren, so kann festgestellt werden, dass die Zellen in CgXII eine ähnlich hohe Produktivität wie im Komplexmedium zeigen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu den Experimenten mit *E. coli* 5KpHM12. Hier zeigten sich nur zu Beginn der Hauptkultur hohe spezifische Aktivitäten, die dahin gehend interpretiert wurden, dass sie auf der Vitalität der Zellen im Vorkulturmedium beruhen. Der hier beobachtete Maximalwert deutet an, dass die Zellen das Medium sehr gut annehmen, dieses – oder zumindest essenzielle Bestandteile daraus – jedoch relativ schnell verbrauchen. Es ist wahrscheinlich, dass die genannten essenziellen Bestandteile auch hier aus Resten des Vorkulturmediums

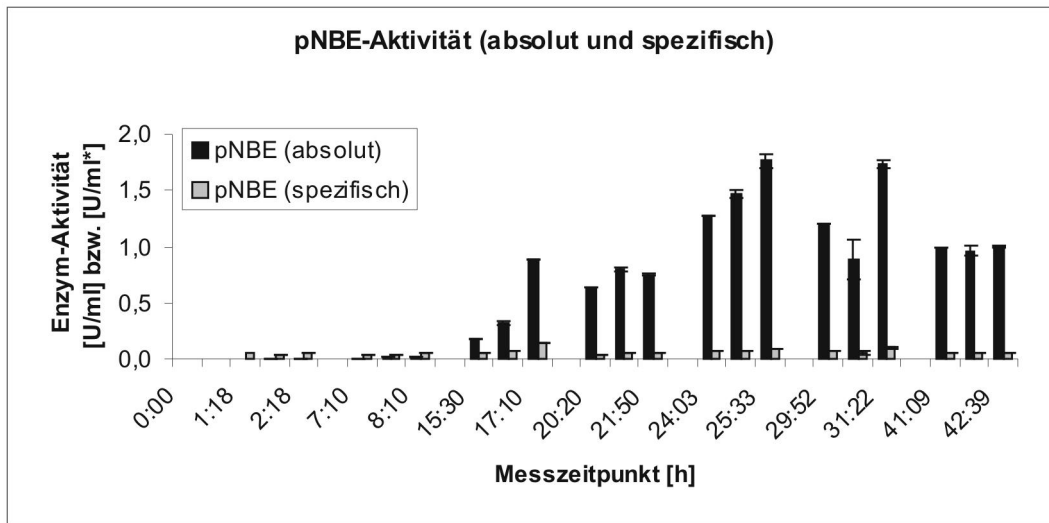


Abb. 3.33: In den einzelnen Induktionsphasen ist eine kontinuierliche Produktentwicklung erkennbar, soweit die Zellen nicht unter Substratlimitierung leiden. Die Standard-Abweichung ist im Vergleich mit den Messungen der Penicillin G-Amidase (vgl. Abschnitt 3.2.3) mit durchschnittlich 5 % gering.

stammen. Grundsätzlich kann aber festgehalten werden, dass das synthetische Medium für die hier verwendeten Organismen gut geeignet ist.

3.3.5 Einfluss des Zufütterungsbetriebs in der stationären Phase auf den Verlauf der Enzym-Aktivität

Bei den Untersuchungen im Bereich der spezifischen Enzym-Aktivität war es interessant herauszufinden, ob diese im Fall der Kultivierung von *E. coli* K12 pJOE 2702 in CgXII medienbedingt ist, oder ob die maximale spezifische Enzym-Aktivität vom Organismus selbst vorgegeben ist.

Aus diesem Grund wurde das Experiment in der Fermenterkombination dahingehend erweitert, dass die Zellen nach dem Erreichen der stationären Phase künstlich in einem stationären Bereich gehalten wurden. Dies geschah während der letzten Induktions-Sequenz durch eine kontinuierliche Zufütterung von Substrat (ausschließlich Glucose). Um nicht zu hohe Zelldichten in diesem Bereich zu generieren, wurde die Anfangsmenge an Glucose in der HK von 20 g/l auf 15 g/l reduziert. Zudem wurden hier die Proben zum Zeitpunkt t_0 ebenfalls auf ihren Enzymgehalt überprüft.

Für den Zufütterungsbetrieb wurde zunächst die Glucose-Verbrauchsrate berechnet. Grundlage dieser Berechnung waren die offline gemessenen Substratkonzentrationen des oben dargestellten Experiments (vgl. Abb. 3.30) bei einer OD zwischen 4 und 14. In diesem Bereich wurden durchschnittlich 1,89 g/(l·h) berechnet. Unter Berücksichtigung des Fermentervolumens von 300 ml, der Substratpumpen-bedingten minimalen Zufütterungsrate von 250 μ l/min und der Substratkonzentration des Vorratsbehälters von 30 g/l Glucose konnte ein kontinuierlicher Feed von 1,5 g/(l·h) etabliert werden.

Dies entspricht einer Verbrauchsrate bei einer stationären OD von 7. Somit sollte die Menge dahingehend dosiert werden, dass die Zellen minimales Wachstum aufweisen.

Abbildung 3.34 zeigt das Zeitfenster (ab $t_K = 12$ h), in dem die vier Induktionen stattfanden.

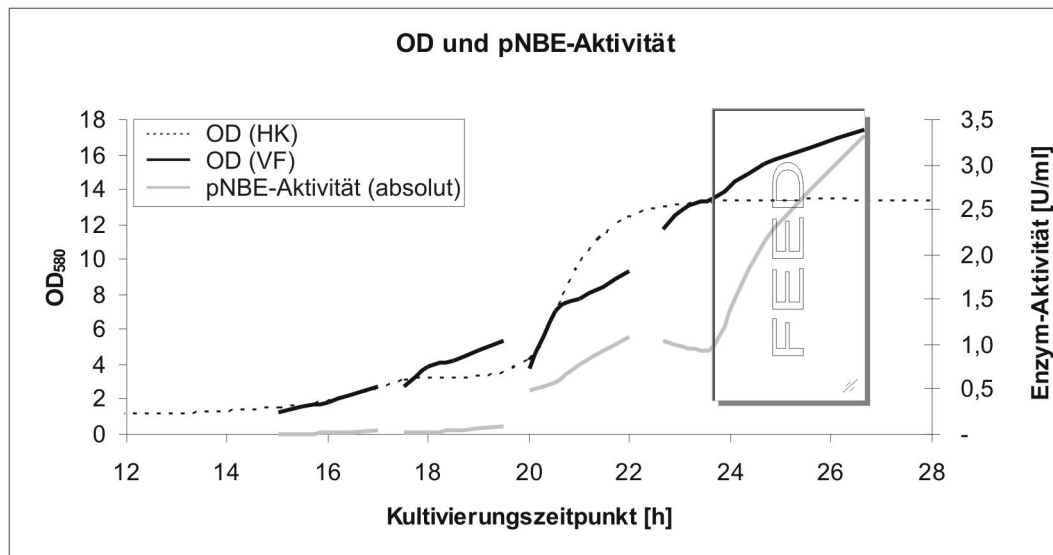


Abb. 3.34: OD_{HK} , OD_{VF} und Enzymaktivitäten von vier Induktions-Experimenten einer fed-batch-Kultur von *E. coli* K12 pJOE 2702 deuten auf einen veränderten Stoffwechsel hin. Die Bildung von *para*-Nitrobenzyl-Esterase ist ab Beginn der exponentiellen Wachstumsphase deutlich zu erkennen. Die letzte Induktions-Phase wurde mit einem Glucose-Feed unterstützt.

Auch hier ist in jedem der vier Induktions-Segmente erkennbar, dass der Verlauf der OD im Versuchsfermenter nicht parallel zu dem der Hauptkultur ist. Zudem sind die Wachstumsraten innerhalb der Zweistunden-Intervalle nicht einheitlich und deuten auf eine medienbedingte oder Substrat-/Induktor-bedingte Stoffwechselveränderung hin (vgl. Erklärung zu Abb. 3.30).

In diesem Diagramm wird die Effizienz des Zufütterungsbetriebs bereits deutlich. Die vierte Induktionsphase wurde derart gestaltet, dass die Induktion zunächst 60 min ohne Substrat-Unterstützung verläuft. Anschließend wurde der oben beschriebene kontinuierliche Feed gestartet und für 3 h weitergeführt. Anhand der gemessenen OD im Versuchsfermenter in diesem Bereich ist erkennbar, dass sich lineares Wachstum eingestellt hat. Gleichzeitig erhöhen sich die gemessenen Enzymaktivitäten sichtbar.

Abbildung 3.35 zeigt die Entwicklung der absoluten und spezifischen *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten sowohl insgesamt als auch innerhalb der zwei-stündigen Induktions-Sequenzen ².

Hier ist zu erkennen, dass der maximale Absolutwert der gemessenen Enzym-Aktivität ohne Feed-Unterstützung am Ende der exponentiellen Phase

² Dauer der Sequenz IV: 4 h incl. Substratzufütterung ab i_{60} ; Induktionen fanden einmalig zu Beginn der jeweiligen Sequenz statt (vgl. A.1.3)

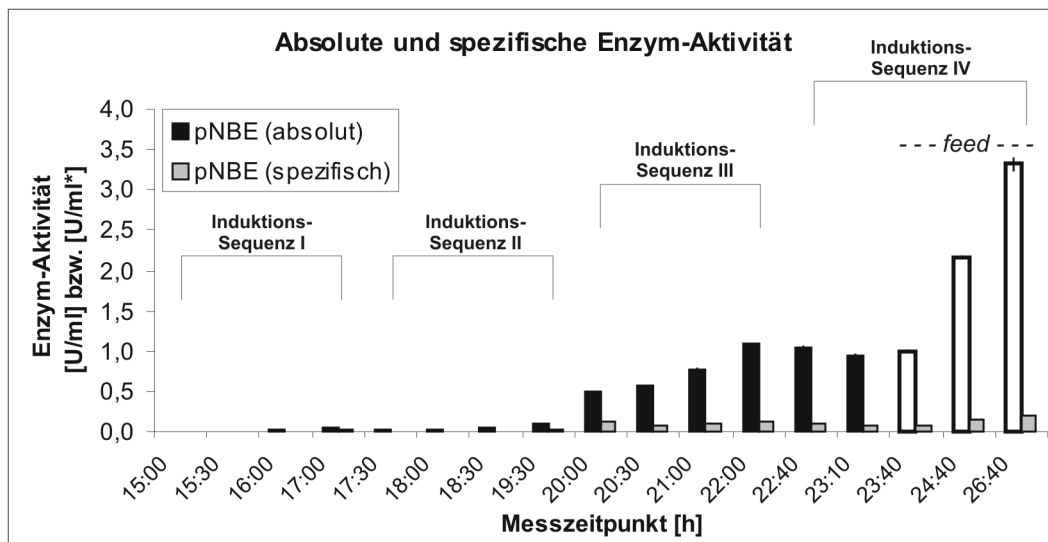


Abb. 3.35: Das Säulendiagramm der Entwicklung von *para*-Nitrobenzyl-Esterase zeigt wachstumsphasenabhängige Produktbildung. Phasen III und IV heben sich von den vorherigen Phasen mit deutlich erhöhten Enzym-Aktivitäten hervor. Der Glucose-Feed in Phase IV führt zu Maximalwerten in der absoluten Aktivität.

($t_K = 22$ h) zu finden ist. Mit 1,1 U/ml liegt dieser Wert – normiert auf die vorgelegte Glucose-Menge – bei 82 % vom Maximalwert der weiter oben beschriebenen Kultivierung. Durch die Aktivierung des Glucose-Feeds in der stationären Phase kann dieser Wert um ein Dreifaches gesteigert werden.

Besonders interessant ist, dass bereits vor Beginn der eigentlichen Induktion (bei i_0) bereits nennenswerte Mengen des Zielproteins zu finden sind. Insbesondere zu Beginn der Induktions-Phasen III und IV sind unerwartet hohe Werte zu beobachten.

Da die Bildung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase nicht auf Anteilen der chromosomalen DNA, sondern ausschließlich auf einer Genexpression innerhalb der Plasmid-DNA beruht, deutet dieser Punkt darauf hin, dass der *rhaP*-Promotor auch ohne das Vorhandensein des Induktors aktiv ist. In Phase IV ist zu erkennen, dass der Induktor das Wachstum fördert, nicht aber die Enzymproduktion (vgl. Abb. 3.34).

Eine andere Überlegung ist, ob eine gewisse Menge Rhamnose bereits vom Versuchsfermenter in die Hauptkultur verschleppt und dort für eine Induktion gesorgt haben konnte. Da aber das zell- und induktorhaltige Medium nach dem Induktions-Experiment im Versuchsfermenter direkt entsorgt wurde und alle Bestandteile wie Schlauchverbindungen und Dreiwegehähne intensiv mit Isopropanol gespült wurden, kann diese Überlegung ausgeschlossen werden.

Unter Umständen ist der Promotor nicht selektiv genug, so dass andere Medienbestandteile an Stelle der Rhamnose an den Repressor binden und so die Expression der stromabwärts liegenden Gene einleiten konnten. Das Auftreten höherer i_0 -Werte, insbesondere in den Phasen III und IV, kann unter Umständen auch das Resultat einer

Stressreaktion gewesen sein. Diese Begebenheit wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Abschließend sei der Verlauf der errechneten spezifischen Enzym-Aktivitäten dargestellt. Abbildung 3.36 verdeutlicht insbesondere die Produktivität der Zellen sowie den Einfluss des Zufütterungsbetriebs auf die Produktivität.

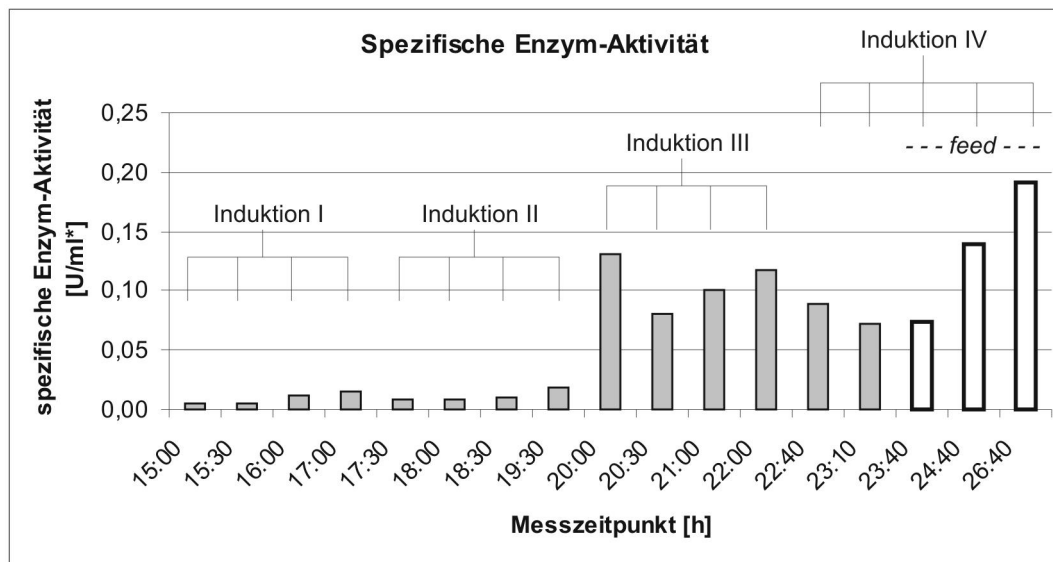


Abb. 3.36: Die zellbezogenen *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten ähneln qualitativ den Absolutwerten (vgl. Abb. 3.35). Grundsätzliche Steigerungen sind ab i_{60} zu erkennen. Der Glucose-Feed in Phase IV wirkt sich auch auf die spezifische Enzym-Aktivität positiv aus.

Es ist erkennbar, dass auch die spezifischen Enzym-Aktivitäten nach ca. 60 min Umstellung nach Induktion kontinuierlich steigen. Dies spricht für die bessere Kompatibilität von Zellen und Medium im Vergleich zu *E. coli* 5K pHM12. Offensichtlich ist im Bereich bis 0,2 U/ml* noch keine molekularbiologische bzw. zellphysiologische Produktionsgrenze erreicht.

Damit ist die Frage beantwortet, ob die spezifische Enzym-Aktivität vom Organismus oder vom Medium abhängig ist. Wie sich hier zeigt, konnte die Produktivität deutlich gesteigert werden und dies ausschließlich durch eine medienbedingte, verlängerte Grundversorgung der Zellen.

Zudem wurden die ursprünglichen Erwartungen an das Feed-Experiment noch übertroffen: Es ist nicht nur möglich, die Absolutmenge des Enzyms zu steigern, sondern zudem auch noch die Effizienz im Hinblick auf den Faktor von Produkt zu Biomasse.

3.3.6 Fazit der Versuchsreihe mit *E. coli* K12 pJOE 2702

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Versuche in der Fermenterkombination zeigen sehr gute Kompatibilität des Organismus mit dem synthetischen Medium. Dies betrifft sowohl den Wachs-

tumsverlauf, welcher charakteristisch für eine batch-Kultur ist, als auch die Werte für die absoluten und spezifischen Enzym-Aktivitäten. Die spezifischen Enzymaktivitäten sind vergleichbar mit denen im Komplexmedium, Maximalwerte werden unter batch-Bedingungen zu Beginn der exponentiellen Phase erreicht.

2. Eine Erniedrigung der Wachstumsrate ist in der Fermenterkombination durch Absenkung der Kultivierungstemperatur zu erreichen. Eine höhere Antibiotika-Konzentration im Medium hat keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und damit auf die Dauer der gesamten batch-Kultur. Diese liegt bei einer Kultivierungstemperatur von 28 °C bei ca. 44 h; die stationäre Phase wird dabei nach 29 h erreicht. Dies gibt ausreichend Spielraum für mehrere Induktions-Experimente im Versuchsfermenter.
3. 2D-fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen können die Entwicklung der Biomasse gut darstellen. Eine Möglichkeit zur Überwachung der produktionsbedingten Zellaktivität nach erfolgter Induktion ergibt sich nicht.
4. Die Induktion im Versuchsfermenter liefert reproduzierbare Ergebnisse, die in Abhängigkeit von der Wachstumsphase miteinander verglichen werden können. Die gemessenen Enzym-Aktivitätswerte sind auch im Zellrohextrakt sehr hoch und führen aufgrund der daraus resultierenden Messergebnisse im photometrischen offline-Test zu verlässlichen Aussagen und einer geringen Standardabweichung durch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis.
5. Insbesondere anhand der spezifischen Enzym-Aktivität können lokale Maxima und lokale Minima bei der Frage nach dem geeigneten Induktionszeitpunkt Aufschluss geben. Der beste Induktions- bzw. Erntezeitpunkt liegt am Anfang der stationären Phase. Enzym-Aktivitäten am Ende der exponentiellen Phase liegen noch deutlich unterhalb des Maximums.
6. Eine genauere Auflösung des Verlaufs der Enzym-Aktivitäten innerhalb der jeweiligen Induktionsphasen führt zu teilweise uneinheitlichen Ergebnissen. Als Ursache müssen Stoffwechseleränderungen in Betracht gezogen werden, welche ggf. medienbedingt sind. Auch der Induktor Rhamnose scheint in den katabolen Stoffwechsel der Zellen mit einbezogen zu werden. Insbesondere die Steigerung der Biomasse im stationären Bereich direkt nach der Zugabe des Induktors legt diese Vermutung nahe. Hier scheint die Rhamnose sowohl als Induktor als auch als Substrat zu dienen.
7. Die Entwicklung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (spätestens 60 min nach Induktion) vollzieht sich auf Kosten der Zellintegrität; die anhand der OD gemessene Biomasse stagniert nicht, sondern sinkt sogar wieder.

8. Ein Anteil der *para*-Nitrobenzyl-Esterase ist bereits vor dem Induktionszeitpunkt nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass der *rhaP*-Promotor auch in Abwesenheit des eigentlichen Induktors aktiv ist. Gegebenenfalls binden noch andere Medienbestandteile an den Repressor des *rha*-Operons. Unter Umständen ist die beobachtete hohe i_0 -Aktivität auch auf zellbiologische Stressreaktionen zurückzuführen.
9. Der Versuchsaufbau ermöglicht es, eine Aussage über die Ursachen für hohe spezifische Enzym-Aktivitäten zu treffen. Die Vermutung, dass die spezifische Enzym-Aktivität medienbedingten Grenzen unterliegt, kann bestätigt werden. Durch eine Modifikation des Versuchs konnten sowohl absolute als auch spezifische *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivitäten um ein Mehrfaches gesteigert werden. Bis zu der hier beobachteten Grenze von 0,2 U/ml* basieren Beschränkungen der spezifischen Enzym-Aktivität in erster Linie auf der Medienkomposition und nicht auf zellphysiologischen Gegebenheiten.
10. Abschließend kann festgehalten werden, dass auch wachstumsphasenabhängige Produktbildungen gut abgebildet werden können, welche auf chemischer Induktion beruhen. Im hier vorliegenden Fall zeigte sich, dass ein idealer Erntezeitpunkt zu Beginn der stationären Phase zu finden ist. Nach Erreichen dieses Zeitpunkts sollte die Kultur minimal weiterversorgt werden, bis der Induktor verbraucht ist.

3.4 *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination

Zuletzt sollten die Möglichkeiten der Fermenterkombination zielgerichtet für die Optimierung der Kultivierungsbedingungen eines prozessrelevanten Organismus genutzt werden. Hierbei sollte die wachstumsphasenabhängige Produktion eines rekombinanten Proteins untersucht werden – und dies in Abhängigkeit von unterschiedlichen Parametern wie Selektionsdruck, Induktorkonzentration, Induktionsdauer und Kultivierungstemperatur. Als Organismus wurde der Stamm *B. megaterium* pMM 1525 gewählt, welcher das Enzym Levansucrase nach chemischer Induktion mit Xylose ins Medium sekretiert.

Auch für diesen letzten Hauptteil der Versuchsreihen im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, welche darauf abzielten, die Medienkompatibilität mit CgXII hinsichtlich Wachstum und Produktion des Zielenzym zu charakterisieren.

3.4.1 Vorversuche im Schüttelkolben

Auf die Wachstumskinetik von *B. megaterium* pMM 1525 wurde bereits gesondert im Abschnitt Medienkompatibilität (Kapitel 3.1.1) eingegangen. Der dort gezeigte Wachstumsverlauf (Abb. 3.1 auf Seite 30) deutete auf eine gute Kompatibilität von Organismus mit dem Medium hin. Im Vergleich mit *E. coli* K12 pJOE 2702 zeigte sich nach dem Animpfen eine längere lag-Phase, welche nach 36 h in eine ca. zwölfstündige exponentielle Phase mündete. Innerhalb dieses Zeitraums wurden ca. 90 % der Biomasse produziert. Nach ca. 60 h war eine OD von 18 erreicht.

3.4.1.1 Wachstum und Produktion von *B. megaterium* pMM 1525 in LB und CgXII

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Levansucrase-Ausbeute nach erfolgter Induktion qualitativ mit der Entwicklung der Biomasse einher geht. Hierzu wurden Kultivierungen im Schüttelkolben (Arbeitsvolumen: 100 ml) sowohl mit LB- (Standard) als auch mit dem synthetischen, modifizierten CgXII-Medium durchgeführt.

Die Versuche wurden im Hinblick auf zukünftige Kultivierungen in der Fermenterkombination bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Dadurch sollte der Einfluss der Temperatur auf die Wachstumsrate, die maximale OD und nicht zuletzt auf die Menge des Zielenzym grob bestimmt werden. Bezüglich des Temperatureinflusses auf die Wachstumsrate kam es schwerpunktmäßig darauf an, den Zeitpunkt des Eintretens in die stationäre Phase unter den gegebenen Substratverhältnissen festzustellen.

Zur Bestimmung der Volumenaktivität der Levansucrase wurden 4 h nach der Induktion Proben genommen. Nach Abzentrifugieren der Biomasse und Dekantieren

der Probe wurde der Kulturüberstand mittels DNS-Tests (vgl. Abschnitt A.1.8.3) auf dessen Enzymgehalt untersucht.

Abbildung 3.37 veranschaulicht zunächst das Wachstum der genannten Kultivierungen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Wachstumskurven nach der Art des Mediums in unterschiedlichen Diagrammen dargestellt.

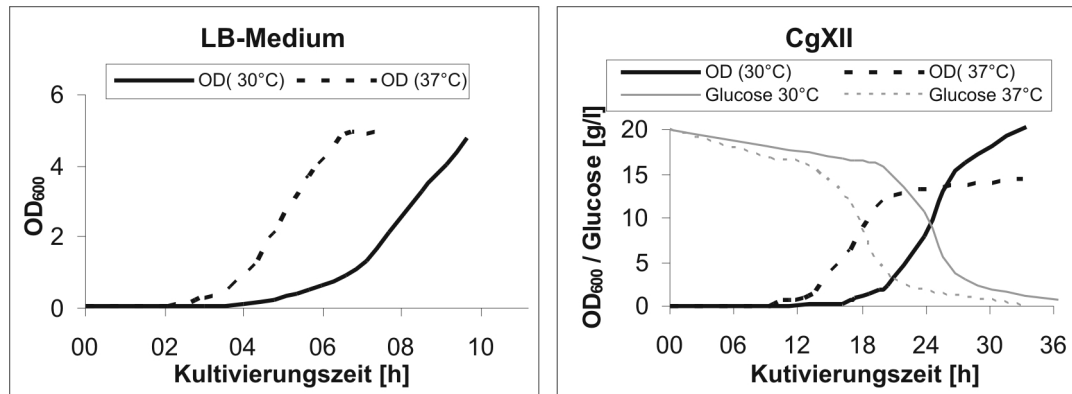


Abb. 3.37: Wachstum und Substratverbrauch von *B. megaterium* pMM 1525 im Schüttelkolben: Sowohl LB-Medium als Referenz (linkes Diagramm) als auch CgXII zeigen den erwarteten Einfluss der Temperatur auf den Wachstumsverlauf.

Die maximalen Wachstumsraten der Referenzkultur rangieren bei 30 °C im Bereich zwischen 0,8 und 1,1 h⁻¹ und bei 37 °C zwischen 1,1 und 1,6 h⁻¹. Im CgXII konnte hier eine kürzere lag-Phase erzielt werden als in den vorangegangenen Experimenten im Abschnitt 3.1.1. Die maximalen Wachstumsraten lagen bei 30 °C zwischen 0,3 und 1,0 h⁻¹ und bei 37 °C zwischen 0,7 und 1,6 h⁻¹.

Im Vergleich mit der Referenz liegen die Werte der Wachstumskinetik für CgXII damit im selben Bereich. Die maximalen Optischen Dichten unterscheiden sich stark von denen im LB-Medium, was auf den höheren C-Quellen-Anteil im CgXII zurückzuführen ist.

Die lag-Phase ist bei CgXII deutlicher ausgeprägt. Dies ist nicht verwunderlich, da die Zellen zum Animpfen aus einer Gefrierkultur stammen, welche mit Komplexmedium durchgeführt worden war; die Zellen zeigen aufgrund der Medienanpassung zunächst ein inhibiertes Wachstum. Die im Vergleich mit den Vorversuchen deutlich verkürzte lag-Phase – zu erkennen insbesondere bei 37 °C – scheint neben der höheren Animpfdichte und Temperatur auf der Medienkomposition des CgXII zu beruhen. Über die genaue Ursache kann lediglich spekuliert werden, da eine Medienoptimierung nicht der Schwerpunkt dieser Arbeiten darstellte.

Abbildung 3.38 stellt die in diesem Experiment erreichten Werte der Volumenaktivität der Levansucrase in zwei – nach Medium getrennten – Säulendiagrammen dar.

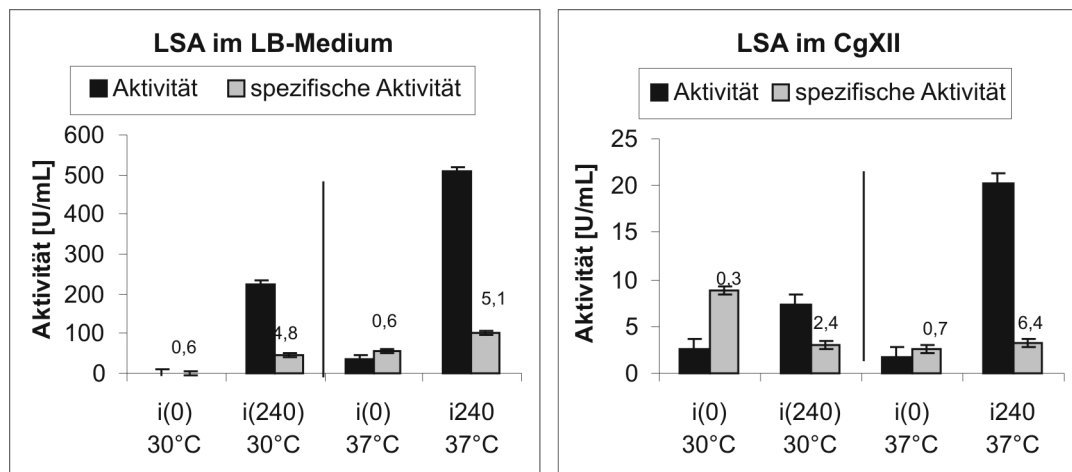


Abb. 3.38: Vergleich der Levansucrase-Aktivität-Werte im Schüttelkolben-Experiment mit LB- und CgXII-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen. Zahlenwerte im Diagramm kennzeichnen die OD zum Messzeitpunkt. Die Werte der Referenz im LB-Medium sind deutlich höher als in CgXII (Faktor 25 – 30). Der Temperatur-Unterschied macht sich im Vergleich untereinander bei jedem Medium bemerkbar.

Hier ist die Unterteilung der Diagramme unbedingt sinnvoll, da die CgXII-Werte bei gleicher Skalierung der Ordinate fast nicht zu erkennen wären. Im Vergleich der Werte der Levansucrase-Aktivität fällt auf, dass sich diese im Komplexmedium um ein Faktor von 25 – 30 von denen im CgXII-Medium absetzen. Eine Temperaturabhängigkeit ist grundsätzlich erkennbar; die Werte bei 37 °C liegen jedes Mal um ca. 40 % höher als die vergleichbaren Werte bei 30 °C.

Auch der Einfluss der Induktion ist erkennbar. Zum Zeitpunkt i_0 liegen die Werte der absoluten Levansucrase-Aktivität deutlich unterhalb der Werte bei i_{240} . Es fallen zwei Unregelmäßigkeiten auf:

1. Die spezifische Levansucrase-Aktivität liegt bei i_0 im Experiment mit CgXII bei 30 °C zunächst höher als zum späteren Zeitpunkt. Dies mag daran liegen, dass der Absolut-Wert bei i_0 ohnehin sehr gering ist und Messfehler bei der Bestimmung der Levansucrase-Aktivität und der OD stärker ins Gewicht fallen. Andererseits könnte sich hier auch ein Einfluss des Mediums der Gefrierkultur abgezeichnet haben. Dieser Effekt konnte bereits in den Experimenten mit *E. coli* 5K pHM12 (Abschnitt 3.2.3, Abb. 3.23) gezeigt werden.
2. Der Absolutwert der Levansucrase-Aktivität bei i_0 im Experiment mit LB-Medium bei 37 °C ist deutlich von Null verschieden, obwohl hier noch kein Induktoreinfluss wirksam war. Im Vergleich mit den Maximalwerten bei CgXII liegt dieser Wert sogar noch oberhalb der erzielten Aktivitäten nach 4 h Induktion. Auch wenn der Wert mit 4 % im Vergleich zu dem Wert bei i_{240} relativ gering ist, kann spekuliert werden, ob der Promotor bei dieser Temperatur bereits in Abwesenheit des Induktors aktiv ist.

Ergebnis dieser Experiment-Reihe im Schüttelkolben war, dass das CgXII in eingeschränkter Form für Versuche innerhalb der Fermenterkombination geeignet ist. Im Hinblick auf die maximal erreichbaren Enzym-Aktivitäten stellt CgXII in dieser Form keine wirkliche Alternative dar. Ein Vergleich der in CgXII erreichten Aktivitäten untereinander ist jedoch möglich.

3.4.1.2 Modifikation von CgXII zur Verbesserung der LSA-Stabilisierung

Aufgrund des Faktors zwischen den Werten der Levansucrase-Aktivität im LB- und CgXII-Medium wurde zunächst nach Ursachen und Alternativen gesucht. Eine mögliche Ursache, auf die im Folgenden experimentell eingegangen wurde, war die vergleichsweise schlechte Möglichkeit der Stabilisierung der produzierten Levansucrase im Medium durch Zugabe von Calciumchlorid.

Die Überlegung stützte sich auf die Beobachtung, dass im CgXII-Medium bei Zugabe von CaCl_2 ein weißer Niederschlag ausfiel. Aufgrund des hohen Gehalts an Sulfaten im Medium (vgl. Rezeptur von CgXII, Abschnitt A.2.2) wurde vermutet, dass es sich dabei um Calciumsulfat handeln müsse.

Darauf aufbauend wurde die Rezeptur des CgXII versuchsweise geändert; die Sulfate (Ammonium- und Magnesiumsulfat), welche in nennenswertem Anteil im Medium vorhanden waren, wurden gegen die korrespondierenden Phosphate, bzw. die entsprechenden Chloride ersetzt. In der Abbildung 3.39 sind die Wachstumsverläufe der Kultivierungen dargestellt, die bei 37 °C im entsprechend modifizierten Medium durchgeführt worden waren.

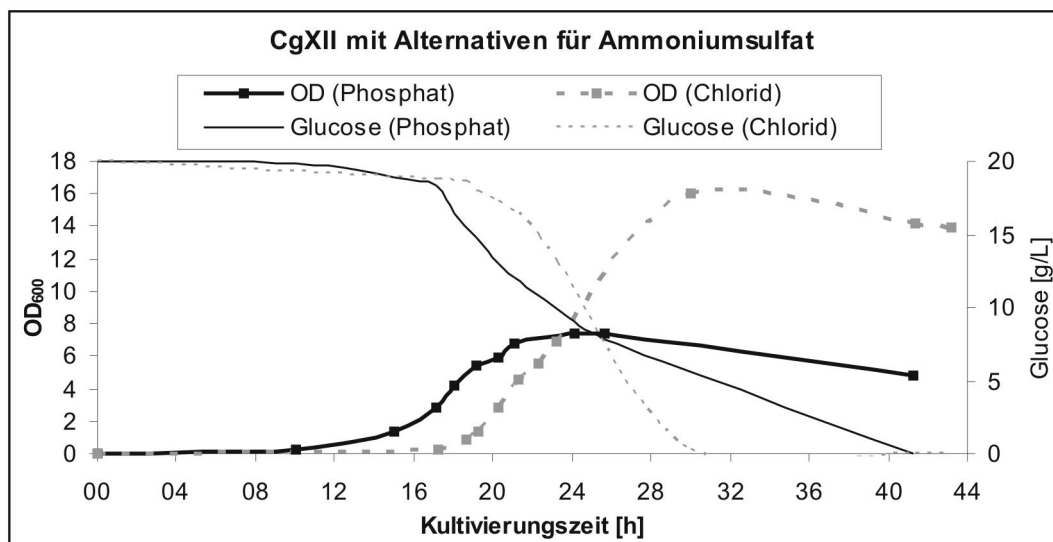


Abb. 3.39: Wachstum und Substratverbrauch von *B. megaterium* pMM 1525 in CgXII mit alternativer Medienkomposition. Sulfate der Originalrezeptur wurden hier zum einen durch Phosphate und zum anderen durch Chloride ersetzt. Die Chlorid-Variante behindert das Wachstum deutlich weniger als die Alternative mit Phosphatsalzen.

Es zeigte sich, dass die Phosphat-Variante dabei deutlich schlechteres Wachstum mit sich brachte. Die Kultur hatte bereits vor dem Verbrauch der Glucose die stationäre Phase erreicht. Ein Grund dafür war vermutlich der hohe Gesamtanteil an Phosphat, da der Puffer ebenfalls auf Natrium- und Kaliumphosphaten beruht. Es kann vermutet werden, dass der daraus resultierende erhöhte osmotische Druck einen bemerkbaren Einfluss auf die Wachstumskinetik ausgeübt hat.

Gemessen an der Originalrezeptur brachte die CgXII-Alternative mit Ammonium- und Magnesiumchloriden hingegen vergleichbares Wachstum mit sich: Der Gesamtverlauf zeigt klassisches Verhalten einer batch-Kultur, maximale Wachstumsraten lagen dabei im Bereich von 0,7 bis 0,8 h⁻¹ bei $t_K = 20$ h und die maximal erreichte OD rangierte um 14.

Die aus diesen Versuchen resultierenden Enzym-Aktivitäten wurden im Bereich bis 4 h nach Einleitung der Induktion stündlich ermittelt; nennenswerte Verbesserungen durch die Wahl alternativer Medienbestandteile konnten jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es wurden maximale Werte von 25 U/ml (Phosphat) bzw. 30 U/ml (Chlorid) gemessen. Im zeitlichen Verlauf war lediglich bei der Phosphat-Alternative eine stetige Steigerung der Produktausbeute erkennbar; im Falle des Chlorids war der Maximalwert bereits bei i_{120} erreicht. In den nachfolgenden 2 h sank der Wert wieder unterhalb von 10 U/ml.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob der hohe Anteil an Glucose im Medium die Messung beim DNS-Test beeinflusst, da dieser Test auf dem Nachweis reduzierender Zucker basiert (vgl. Abschnitt 2.3.2.3 im theoretischen Teil). Dies hätte vor allem die Induktions-Zeitfenster zu Beginn der Wachstumsphase betroffen, während derer noch ein großer Teil an Substrat im Medium vorlag. Da die hier durchgeführten Induktionen bei einer OD beendet waren, die noch weit unterhalb des Maximalwertes lagen, lag dieser Schluss nahe.

Entsprechend wurde alternativ zum DNS-Test ein Versuch gestartet, den photometrischen Teil des Tests durch die biosensorische Alternative mit dem Glucoseanalysator *YSI 2700* (YSI Incorporated Life Sciences, Yellow Springs, Ohio, USA) zu ersetzen, mit welchem die gesamten offline Bestimmungen für Glucose durchgeführt wurden. Hierbei wurde der erste Teil des DNS-Tests modifiziert. Dieser Teil beruht auf dem enzymatischen Abbau von Saccharose in einer Reaktionslösung. Beim DNS-Test wird die enzymatische Spaltung von Saccharose durch Zugabe der Lösung des DNS-Reagenzes gestoppt, welche stark alkalisch ist. Anstelle dieser Lösung wurde eine vergleichbar starke Natronlauge (ohne Farbreagenz) eingesetzt, bevor die Lösung verdünnt und im Glucose-Analysator gemessen wurde. Es stellte sich heraus, dass auch diese Alternative auf analytischer Seite keine wesentlichen Verbesserungen in der nachgewiesenen Enzymaktivität ergab.

Da die vergleichsweise geringe Ausbeute weder auf die mangelnde Stabilisierung des Zielproteins im Medium, noch auf eine Fehlerquelle auf analytischer Seite zurückzuführen war, lag die Überlegung nahe, die Ursache im genetischen Bereich zu suchen. Es wurde vermutet, dass die eingesetzte Glucose einen stärkeren Einfluss auf die Unterdrückung der Produktbildung hat, als zunächst angenommen wurde. Wie im Abschnitt 2.4.3.3 bereits qualitativ dargelegt wurde, trägt der Glucose-Metabolit Glucose-6-phosphat dazu bei, die Xylose-Induktion kompetitiv zu hemmen.

Daraufhin musste entschieden werden, ob eine alternative C-Quelle – wie beispielsweise Glycerin – als Ersatz für die Glucose verwendet werden sollte. Es stellte sich die Frage, ob die Interpretation der Ergebnisse aus den Experimenten unter Verwendung von Glucose lediglich erschwert sein würde oder ob die Ergebnisse grundsätzlich keine interpretierbaren Enzymwerte zuließen.

Abbildung 3.40 zeigt das Wachstum und die Ausbeute an Levansucrase einer induzierten Kultur von *B. megaterium* pMM 1525 im Schüttelkolben. Hier wurden statt 20 g/l Glucose 30 ml/l Glycerin als C-Quelle verwendet; die Kultivierung wurde bei 37 °C durchgeführt.

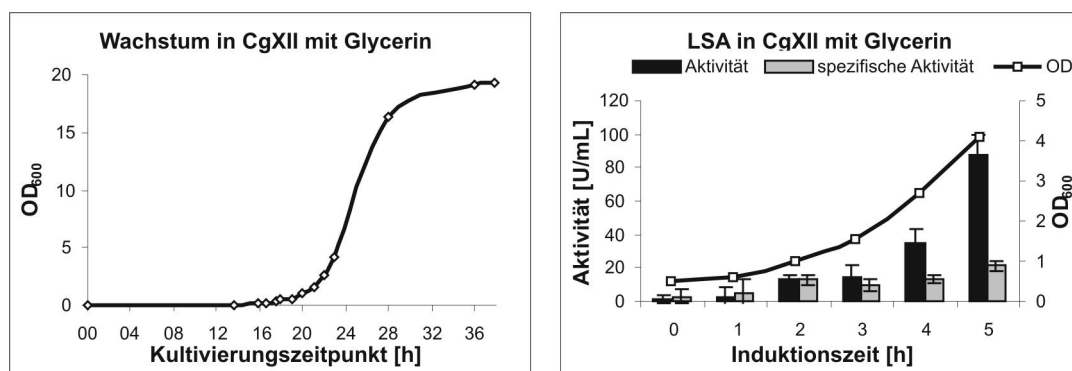


Abb. 3.40: Schüttelkultur mit CgXII und Glycerin als C-Quelle: Wachstum und Levansucrase-Ausbeute rangieren im vergleichbaren Rahmen der erzielten Werte für CgXII unter Verwendung von Glucose.

Das Wachstum der Kultur ähnelt dem im glucosehaltigen CgXII; auch hier ist in den ersten 16 h eine lag-Phase zu erkennen. Der Eintritt in die stationäre Phase liegt bei ca. 28 h.

Anhand der Werte für die Levansucrase-Aktivität zum Vergleichszeitpunkt t_{240} ist zu erkennen, dass diese mit 35 U/ml im Vergleich zum glucosehaltigen CgXII um 41 % höher ausfallen (vgl. Abb. 3.38 auf Seite 76). Insbesondere der Wert 5 h nach Induktionsbeginn liegt mit 81 U/ml auf einem relativ hohen Niveau. Bezieht man diese Daten jedoch auf die Grundwerte im LB-Medium, so beträgt die hier erreichte Ausbeute lediglich 7 %.

Aus diesem Grund wurde weiterhin mit Glucose gearbeitet; die vorgelegte Menge wurde allerdings halbiert. Dies geschah auf Kosten der maximal erreichbaren Biomass-

se. Da es nicht das Ziel dieser Arbeit war, hohe Zelldichten zu generieren, stellte sich die Option der weiteren Verwendung von Glucose als Substrat attraktiver dar, als der Austausch von Glucose durch eine äquivalente Menge Glycerin. Unter dem Gesichtspunkt schnell zugänglicher offline-Daten hinsichtlich des Substratverbrauchs hat Glucose einen deutlichen Vorteil gegenüber Glycerin, da die Glucose-Messung mit dem Gerät *YSI 2700* als Methode sowohl etabliert als auch zeitsparend ist.

3.4.1.3 Grenzen der Induktorkonzentration

Bevor die ersten Versuche in der Fermenterkombination durchgeführt werden sollten, wurde zunächst der Einfluss der Induktorkonzentration auf die Produktausbeute festgestellt. Diese Experimente wurden in Schüttelkolben-Kultivierungen unter Verwendung von Komplexmedium durchgeführt. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Menge des zu verwendenden Induktors auch im Reaktormaßstab ausreichend ist.

Abbildung 3.41 zeigt die Ergebnisse der resultierenden Levansucrase-Aktivitätswerte im Zusammenhang mit den Daten für die OD aus den genannten Experimenten unter Verwendung von LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C. Die Induktorkonzentrationen betragen dabei 0,2 %, 0,5 % (Standard) und 1,0 %. Die Ergebnisse zeigen den Verlauf der Produktentwicklung im Zeitfenster bis 6 h nach Beginn der Induktion.

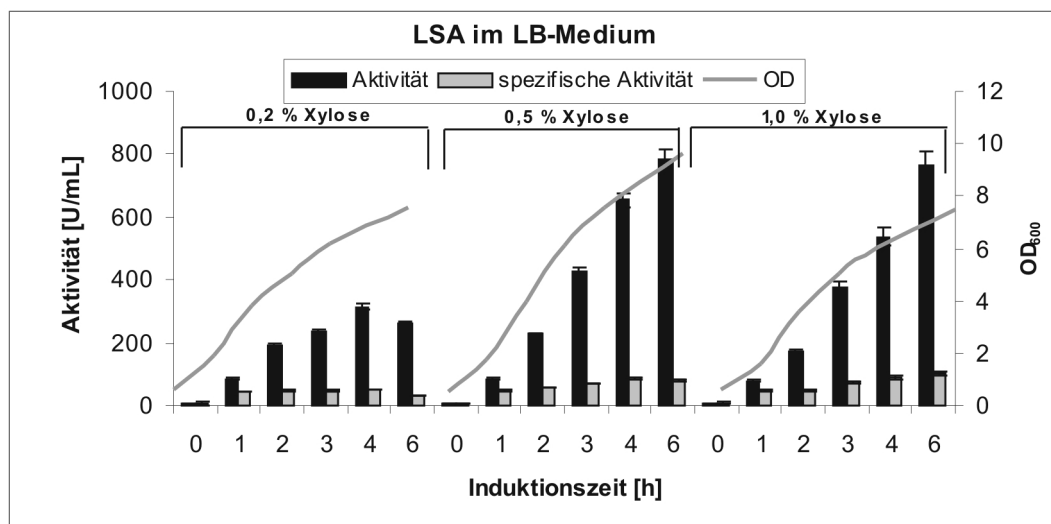


Abb. 3.41: Ergebnisse der Experimente mit *B. megaterium* pMM 1525 im Schüttelkolben-Maßstab. Die effiziente Konzentration hinsichtlich der Produktausbeute liegt bei 0,5 % Xylose.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wurden alle drei Kulturen bei einer OD von 0,6 induziert. Zu diesem Zeitpunkt enthält das Medium noch eine ausreichende Menge an Nährstoffen, so dass die Zellen im Laufe von 6 h nach Beginn der Induktion nicht in eine Limitierung geraten.

Deutlich tritt die Konzentration von 0,2 % in den Hintergrund der alternativen Konzentrationen. Die Produktausbeute fällt zu jedem Zeitpunkt geringer aus. Zudem ist erkennbar, dass der Induktor bei 6 h nach Induktion verbraucht ist; hier sinkt der Wert wieder. Im Vergleich mit der Standardkonzentration von 0,5 % hat eine Verdopplung der Konzentration auf 1,0 % sogar einen negativen Einfluss; zum Zeitpunkt i_{240} wird bei 0,5 % ein höherer Wert erzielt. Lediglich in der spezifischen Levansucrase-Aktivität können bei 1,0 % Werte erzielt werden, welche um 20 % höher liegen als beim Standard.

Dieselbe Versuchsreihe wurde bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C statt 37 °C durchgeführt (Daten nicht dargestellt). Hier ergab sich ein vergleichbares Ergebnis. Die Unterschiede zwischen den verwendeten Konzentrationen sind jedoch bei 37 °C deutlicher ausgeprägt.

Aus diesen Experimenten folgte, dass die zukünftigen Versuche in der Fermenterkombination mit der Standard-Konzentration von 0,5 % Xylose induziert wurden.

3.4.2 *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination mit CgXII-Medium

Auf den Vorversuchen aufbauend wurde *B. megaterium* pMM 1525 nun in der Fermenterkombination kultiviert. Da in den bisherigen Versuchen Aussagen über die Wachstumskinetik im Schüttelkolbenmaßstab getroffen werden konnten, stand zunächst die Frage nach der geeigneten Kultivierungstemperatur im Vordergrund, damit sich ein ausreichendes Zeitfenster für Einzelexperimente innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsphasen ergab.

3.4.2.1 Wachstum von *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination mit CgXII

Die erste Kultivierung fand bei einer Temperatur von 30 °C statt (Daten nicht gezeigt). Wie sich herausstellte, dauerte es 16 h, bis die Hauptkultur die stationäre Phase erreicht hatte. Dieser Zeitraum reichte für lediglich eine vierstündige Induktion ab Beginn der exponentiellen Phase. Da mehrere Induktionszeiträume das Ziel waren, wurde die Kultivierungstemperatur auf 28 °C gesenkt bei gleichzeitiger Erhöhung des Selektionsdrucks durch Verwendung von 40 statt 10 mg/l Tetracyclin. Der Versuchsfermenter wurde weiterhin bei 30 °C betrieben.

Abbildung 3.42 zeigt den Verlauf der OD und die BioView-Daten der Hauptkultur in Verbindung mit den offline ermittelten Substratkonzentrationen.

Das FAD-Signal des BioViews spiegelt den Verlauf des Zellwachstums gut wider. Die Werte für Proteine hingegen sind aufgrund ihrer geringen Intensität nicht aussagekräftig.

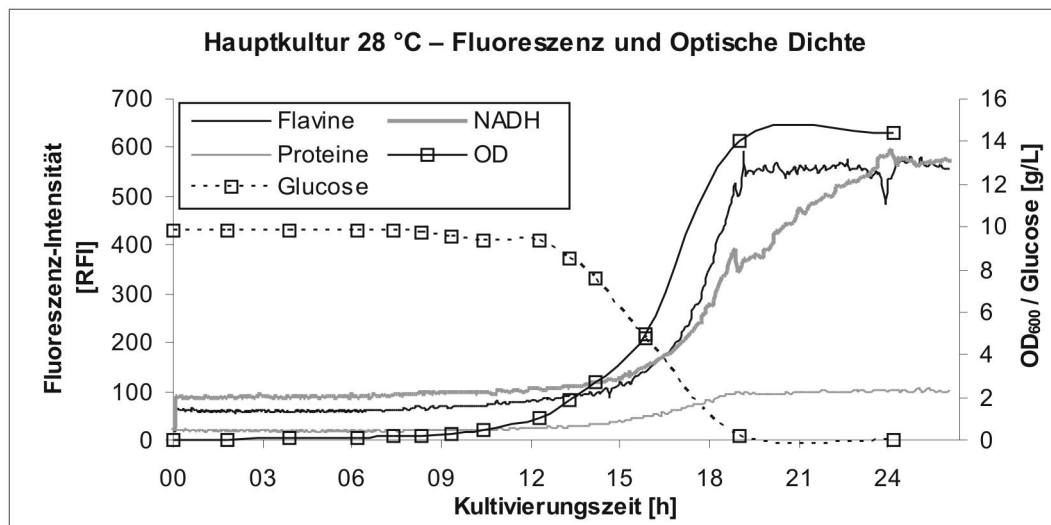


Abb. 3.42: Die Kultivierung von *B. megaterium* pMM 1525 bei 28 °C ergab einen zeitlichen Rahmen von 19 h bis zum Eintritt in die stationäre Phase. Der Zeitpunkt wird sowohl anhand der offline als auch anhand der online ermittelten Werte (FAD-Signal) deutlich.

Der Beginn der stationären Phase liegt bei 19 h. Dieser Zeitraum war für zwei sukzessive Induktions-Experimente ausreichend, in denen Maximalwerte der Levansucrase-Aktivität von 64 bzw. 77 U/ml erzielt werden konnten. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Enzym-Aktivitäten konnte aufgrund der Daten noch keine verlässliche Aussage getroffen werden.

Aus diesem Grund und um mindestens drei Induktions-Sequenzen im Verlauf der gesamten batch durchführen zu können, wurde die Temperatur der Hauptkultur um weitere 3 °C gesenkt; der Versuchsfermenter wurde weiterhin bei 30 °C betrieben.

3.4.2.2 Einfluss der Antibiotika-Konzentration

Abbildung 3.43 zeigt den Verlauf von Wachstum und Substratabbau zweier unterschiedlicher Kultivierungen bei 25 °C. Hier sollte der Einfluss der Antibiotikakonzentration auf die Produktbildung ermittelt werden. Dazu wurde eine Kultivierung bei 10 mg/l (Standard) und eine weitere bei 40 mg/l Tetracyclin durchgeführt.

Mit diesem Experiment konnten mehrere Fragen gleichzeitig beantwortet werden. Wie in Abbildung 3.43 zu erkennen ist, ist eine Konzentration von 40 mg/l Tetracyclin notwendig, um genügend Zeit für drei aufeinander folgende Induktions-Versuche zur Verfügung zu stellen.

Auffällig hierbei ist der unterschiedliche Substratverbrauch zwischen Hauptkultur und Versuchsfermenter. Auch wenn die Experimente (unter Berücksichtigung einer kurzen Pause zum Spülen und Desinfizieren des Versuchsfermenters) in zeitlicher Abfolge direkt hintereinander liegen, so weichen die Werte im Versuchsfermenter teilweise deutlich von denen der Hauptkultur ab. Gut zu erkennen ist dieser Effekt beim Über-

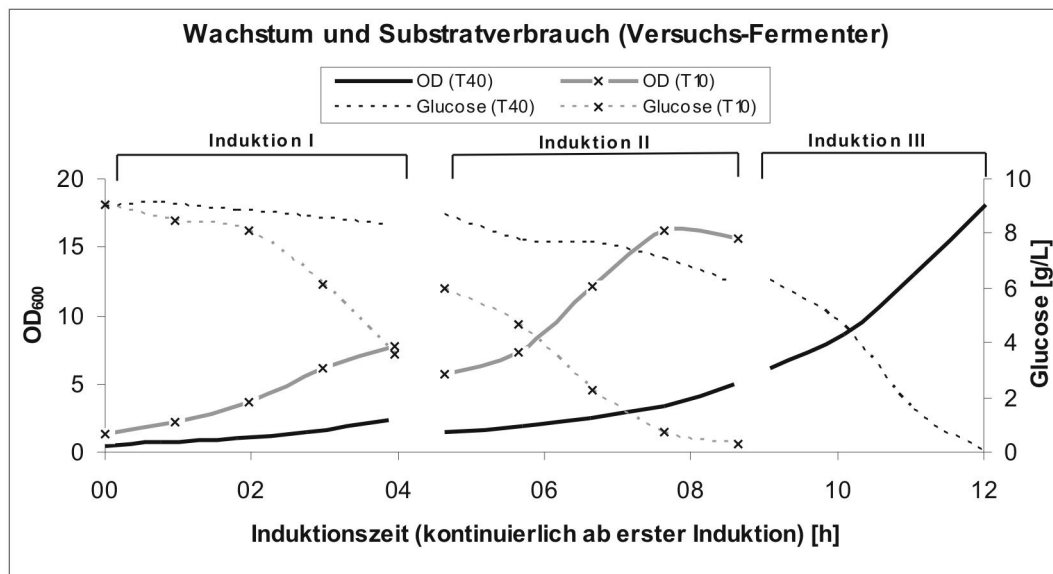


Abb. 3.43: Einfluss des Selektionsdrucks auf Wachstum und Substratverbrauch bei 25 °C. Bei 40 mg/l Tetracyclin bleibt ausreichend zeitlicher Raum für drei Induktions-Sequenzen.

gang von der ersten in die zweite Induktions-Sequenz. Der Endwert der ersten Sequenz bei 10 mg/l (T10) liegt bei 3,6 g/l Glucose. Der Startwert der nächsten Sequenz ist 6 g/l. Dies ist durch die unterschiedlichen Kultivierungs-Temperaturen bedingt (25 bzw. 30 °C). Somit ist es möglich, die Prozessabläufe im Versuchsfermenter im Vergleich zur Hauptkultur zu beschleunigen. Zudem scheint der Temperatursprung von 5 °C zwischen den Fermentern keinen negativen Einfluss auf die Organismen auszuüben.

Offensichtlich hemmt eine hohe Tetracyclin-Konzentration auch den Substrat-Abbau. Die End- und Startwerte zwischen den Sequenzen II und III unterscheiden sich nicht in nennenswertem Maße (im Vergleich mit den Werten von T10). Dieses Ergebnis widerspricht der Grundannahme, dass bei erhöhtem Selektionsdruck lediglich mehr Energie auf die Produktion von Plasmid-DNA verwendet wird. Somit hätte sich der Substratverbrauch nicht unterscheiden müssen; lediglich die Biomasse hätte geringer ausfallen müssen.

Abbildung 3.44 macht die Stärke der Katatabolitrepression deutlich. Bei höheren Substratkonzentrationen werden sowohl bei 10 mg/l als auch bei 40 mg/l Tetracyclin nur moderate Enzym-Aktivitäten erhalten. Ein deutlicher Sprung dieser Werte ist direkt beim Eintritt in die stationäre Phase (bei Glucose = 0 g/l) zu erkennen.

Wie sich bei den Werten für T40 zeigt (Sequenz III, i_{240}), wird das gebildete Produkt allerdings direkt im Anschluss wieder abgebaut. Zudem wird in der Auswertung deutlich, dass keine höheren Absolutwerte als bei der Standardkonzentration erreicht werden können.

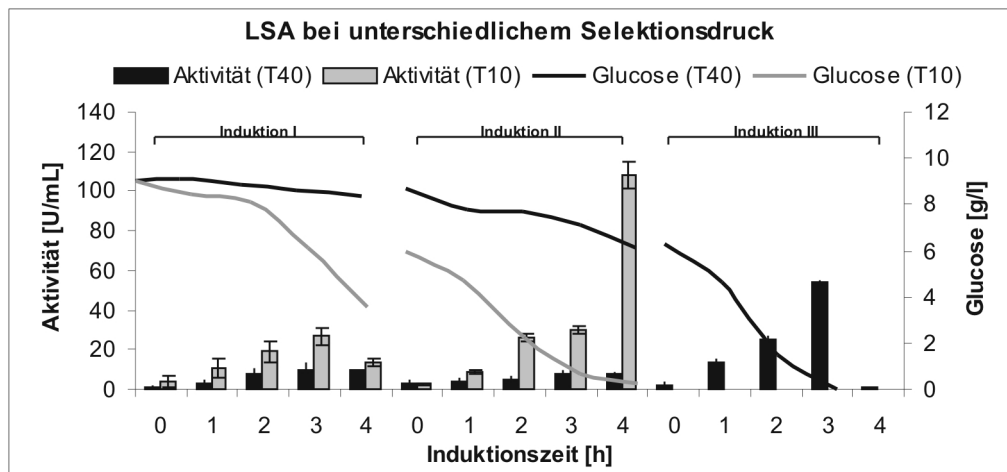


Abb. 3.44: Messwerte der Levansucrase-Konzentrationen in der Fermenterkombination bei unterschiedlichem Selektionsdruck: Auch bei höheren Substratkonzentrationen ist ein Verlauf erkennbar. Der Eintritt in die stationäre Phase resultiert in Extremwerten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass drei unterschiedliche Faktoren die Produktion unterschiedlich stark beeinflussen: Oberste Priorität hat die Katabolitrepression. Fällt diese weg, bestimmt der Zeitpunkt der Induktion – und damit der Zeitpunkt der Ernte – die Ausbeute an Levansucrase. Unterste Priorität hat die Antibiotikakonzentration; höhere Konzentrationen führen nicht unmittelbar zu höheren Produkt-Ausbeuten.

Abbildung 3.45 vermittelt einen Eindruck des Potenzials der BioView-Messung mittels anhand der Kultivierung mit 40 mg/l Tetracyclin (T40) im Versuchsfermenter.

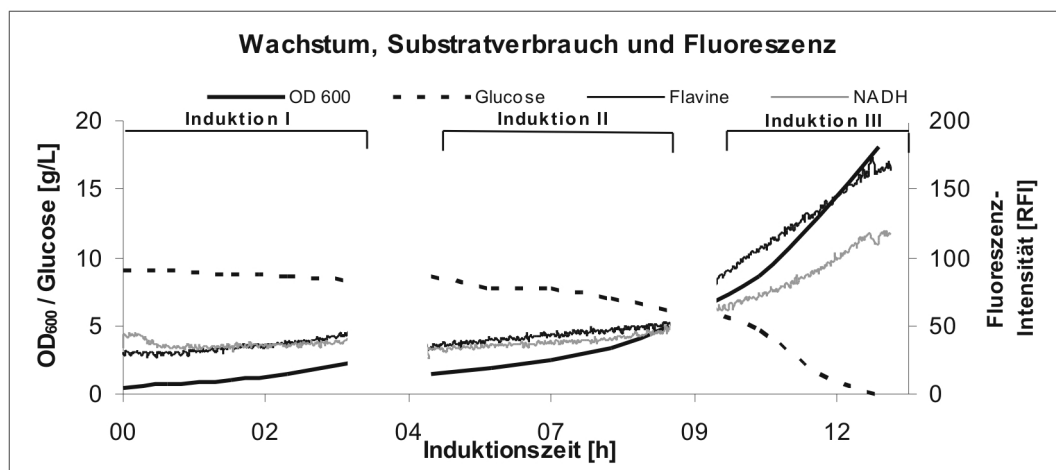


Abb. 3.45: BioView-Daten der Kultivierung mit 40 mg/l Tetracyclin. Das Wachstum kann anhand der Werte für Flavine und NADH online verfolgt werden. Eine genaue Abbildung des Verlaufs ist hier nicht möglich.

Hier kann der Wachstumsverlauf anhand der BioView-Messungen online verfolgt werden. Insgesamt ist die Kulturfluoreszenz allerdings mit maximal 170 RFI selbst bei einer OD von 18 relativ gering im Vergleich zu Kultivierungen mit *E. coli* (vgl. den Grundwert der PMC-Messung zur online-Bestimmung von Penicillin G-Amidase–Abbildung 3.17 auf Seite 50). Hier könnte mit einer höheren Signalverstärkung gearbeitet werden, wodurch allerdings auch das begasungsbedingte Rauschen mehr ins Gewicht fallen und der Verlauf dadurch nicht deutlicher würde.

Es muss erwähnt werden, dass der Verlauf nicht deckungsgleich mit den offline-Daten ist; die Werte der OD in der dritten Induktions-Sequenz lassen einen exponentiellen Verlauf erkennen bis zum Zeitpunkt, an dem die Glucose vollständig verbraucht ist. Sowohl die FAD- als auch die NADH-Werte zeigen einen eher linearen Verlauf. Induktions-bedingte Unterschiede im Stoffwechsel der Zellen werden anhand dieser Daten nicht deutlich.

Dies soll anhand der Induktionen der Kultur unter Standard-Bedingungen (T10) überprüft werden. Wie in Abbildung 3.44 bereits gezeigt wurde, erfährt die Entwicklung der LSA in der zweiten Induktions-Sequenz zwischen i_{180} und i_{240} einen sprunghaften Anstieg. Abbildung 3.46 zeigt den online gemessenen Verlauf der BioView-Daten in Bezug auf die offline ermittelten Levansucrase-Aktivitäten.

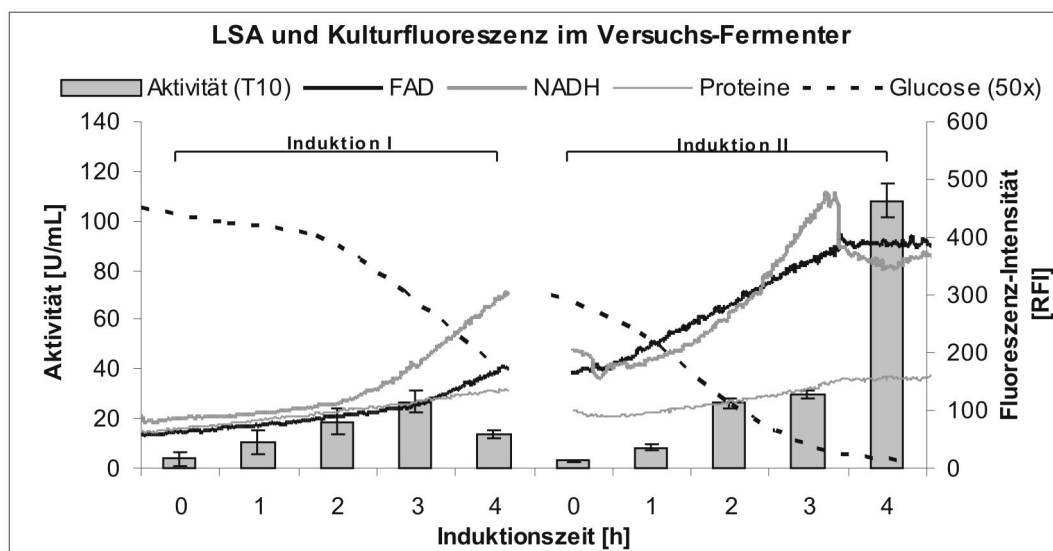


Abb. 3.46: Entwicklung der Kulturfluoreszenz während der Induktionen im Vergleich zur Levansucrase-Aktivität. Ein eindeutiger Bezug zu den gemessenen Enzym-Aktivitäten ist nicht erkennbar.

Der hier dargestellte Verlauf unterscheidet sich von der in Abbildung 3.45 dargestellten Entwicklung. Dort verlaufen die Werte für FAD und NADH grundsätzlich in dieselbe Richtung, lediglich mit unterschiedlicher Steigung. Hier ist insbesondere im Verlauf der Werte für NADH ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Dieser könnte auf stoffwechselphysiologischen Prozessen während der Induktion beruhen. Kurze

Zeit nach Beginn der zweiten Induktion sinken die Werte: Hier ist der Zeitpunkt der Zugabe des Induktors erkennbar, da die Zellsuspension verdünnt wird. Anschließend nehmen die Werte für NADH bis ca. t_{180} einen exponentiellen Verlauf an. Nun sinkt die NADH-Fluoreszenz abrup. Hier ist die Glucose verbraucht – ebenfalls erkennbar an der darauf folgenden Stagnation der Werte für FAD- und die Proteine. Dies ist der Zeitpunkt, an dem die kompetitive Hemmung des Induktors durch Glucose nicht mehr vorliegt.

Wie an den LSA-Daten erkennbar ist, wird zu dem Zeitpunkt messbar viel LSA produziert, an dem die Werte für FAD und NADH gegenläufig sind. Dies könnte ein einfach auswertbares Indiz für die Produktion der LSA sein. Andererseits wird dies eine Sekundärerrscheinung sein, da die Produktentwicklung stark von der Katabolitrepression abhängig ist. Das abrupte Absinken der NADH-Werte ist primär lediglich darauf zurückzuführen, dass die Glucose verbraucht ist und die Zellen die stationäre Phase erreicht haben.

Um dies besser einschätzen zu können, ist es sinnvoll, weitere Prozessdaten mit einzubeziehen. Abbildung 3.47 gibt Aufschluss über die pO_2 -Verläufe der beiden betrachteten Induktions-Sequenzen.

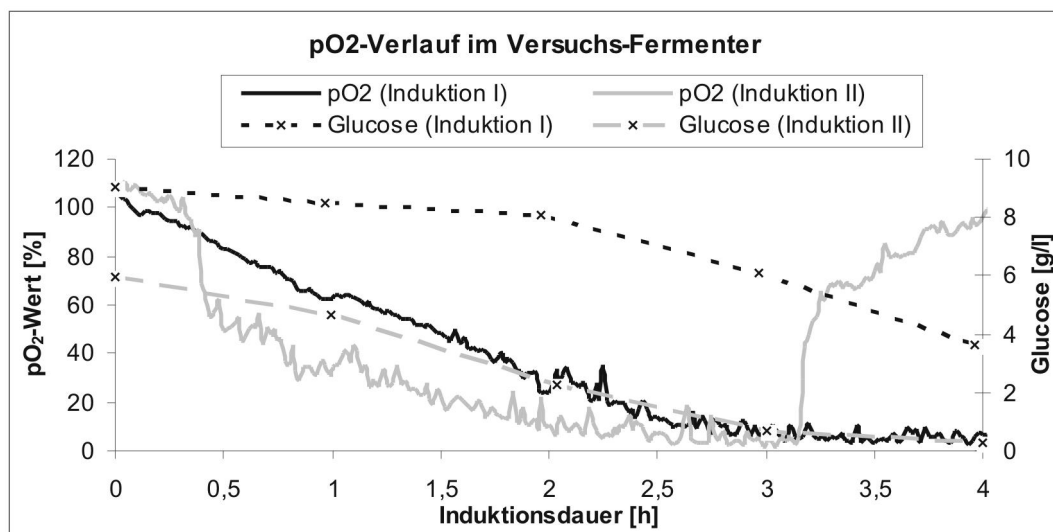


Abb. 3.47: Darstellung des Verlaufs des gelösten Sauerstoffs während der beiden Induktion im Versuchsfermenter. In der zweiten Sequenz ist nach 3:10 h die C-Quelle verbraucht; die Werte steigen wieder auf 100 %. Offensichtlich liegt hier keine alternative Nährstoffquelle vor.

Der Verlauf der pO_2 -Daten zeigt in der zweiten Sequenz (in der Abbildung grau dargestellt) ebenfalls einen abrupten Übergang bei t_{180} . Synchron mit dem Glucosemangel wird hier das Ende der katabolen Vorgänge deutlich. Insofern erhärtet sich die vorangegangene Vermutung, dass das gezeigte Absinken der NADH-Werte in diesem Bereich lediglich auf den Glucosemangel zurückzuführen ist. Der damit verbundene überpro-

portionale Anstieg der LSA ist eine Sekundärererscheinung, die anhand der gezeigten drei Wellenlängenpaare für NADH, FAD und Proteine nur indirekt nachweisbar ist.

Eine Untersuchung der Daten des gesamten BioView-Spektrums führte hinsichtlich der Produktentwicklung zu keinem Ergebnis; es konnten keine Fluoreszenzwellenlängen bzw. Kombinationen von Fluoreszenzwellenlängen mit der LSA korreliert werden.

Anhand der Abbildung 3.47 soll noch auf einen weiteren Gesichtspunkt der Kultivierung von *B. megaterium* pMM 1525 im Versuchsfermenter hingewiesen werden: Wie in beiden Induktions-Sequenzen erkennbar ist, ist die Sauerstoff-Versorgung der Zellen sehr bald an einer technischen Kapazitätsgrenze. In der ersten Sequenz zum Zeitpunkt t_{180} liegt der Gelöstsauerstoff bereits bei ca. 0 %. Hier wird aufgrund der Sauerstoff-Limitierung eine künstliche stationäre Phase erzwungen; dennoch ist weiteres Wachstum erkennbar. Die damit verbundenen Kultivierungsbedingungen sind nicht als optimal zu bezeichnen. Am genannten Punkt wurde eine OD von 6 gemessen. Bei Zelldichten oberhalb dieses Bereiches muss aus technischen Gegebenheiten mit Sauerstofflimitierungen gerechnet werden. Diesbezüglich besteht ein prozesstechnischer Optimierungsbedarf: Die Sauerstoffeintragsrate muss verbessert werden, wenn beabsichtigt wird, mit diesem Organismus jenseits einer OD von 6 zu arbeiten.

3.4.2.3 Einfluss der Induktorkonzentration

Ein Aspekt, welcher bereits im Schüttelkolbenmaßstab unter Verwendung von Komplexmedium untersucht wurde, ist der Einfluss der Induktorkonzentration auf die Produktausbeute (vgl. Abschnitt 3.4.1.3). Dort konnte der zeitliche Rahmen der Induktion noch nicht eingehend untersucht werden, da die entsprechenden Experimente grundsätzlich bei einer OD von 0,5 begonnen wurden.

In der Fermenterkombination sollten nun mehrere zeitliche Abschnitte untersucht werden, in denen Induktorkonzentrationen von 0,2 und 1,0 % gewählt wurden. Die Versuche wurden in CgXII durchgeführt. Sie hatten den Zweck, die Ergebnisse anhand der daraus resultierenden Aussage mit denen im Komplexmedium zu vergleichen.

Abbildung 3.48 stellt die Ergebnisse der Messungen mit 0,2 % Xylose in Form des Verlaufs von Wachstum, Substratverbrauch und ermittelten LSA-Werten in einen wachstumsbezogenen Zusammenhang.

Die hier erzielten Ausbeuten liegen mit durchschnittlich 14 U/ml noch unterhalb derer, welche unter Standardbedingungen gemessen wurden (vgl. Werte für „T10“ in Abbildung 3.44). Die höchsten Werte werden dabei zu Beginn der exponentiellen Phase (Sequenz II) 3 h nach Induktionsbeginn erreicht. Eine Steigerung der Ausbeute im Laufe der ersten 4 h ist in der zweiten und dritten Sequenz zu beobachten. Aufgrund der geringen Absolutwerte und zudem aus dem Grund, dass bereits im nicht induzierten Zustand bei i_0 eine messbare Menge des Zielproteins nachweisbar ist, kann nicht

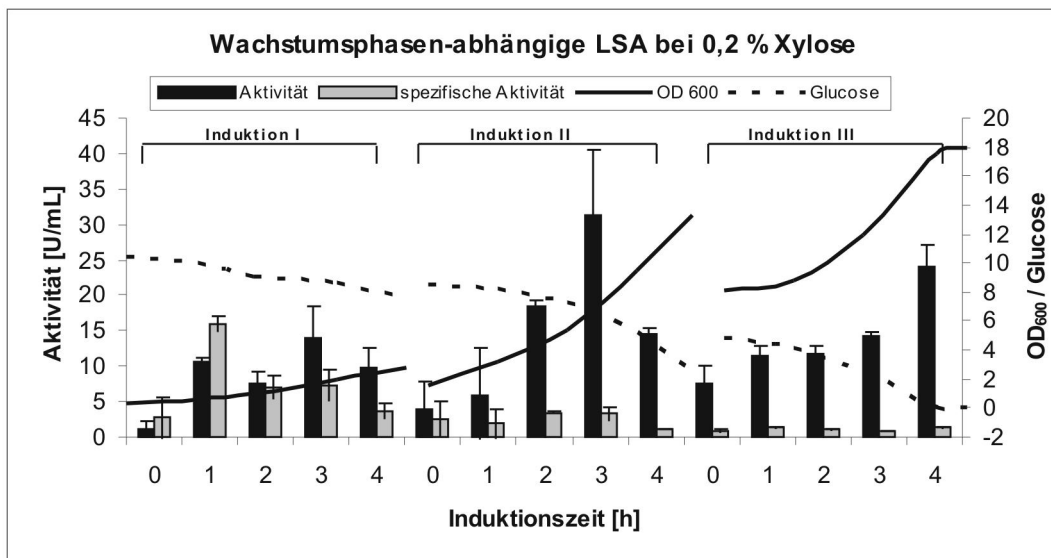


Abb. 3.48: Wachstumphasen-bezogene Messung der LSA-Ausbeute bei einer Induktorkonzentration von 0,2 %. In den Phasen II und III ist eine zeitlich bezogene Entwicklung zu erkennen. Da die Werte sehr gering und bei i_0 bereits größer als Null ausfallen, kann jedoch kein eindeutiger Bezug zur Anwesenheit des Induktors hergestellt werden.

zwangsläufig darauf geschlossen werden, dass der Verlauf auf die Induktion zurückzuführen ist. Vielmehr könnten auch medienbedingte Einflüsse dazu geführt haben.

Abbildung 3.49 zeigt die Ergebnisse desselben Experiments mit einer Induktorkonzentration von 1,0 statt 0,2 % Xylose.

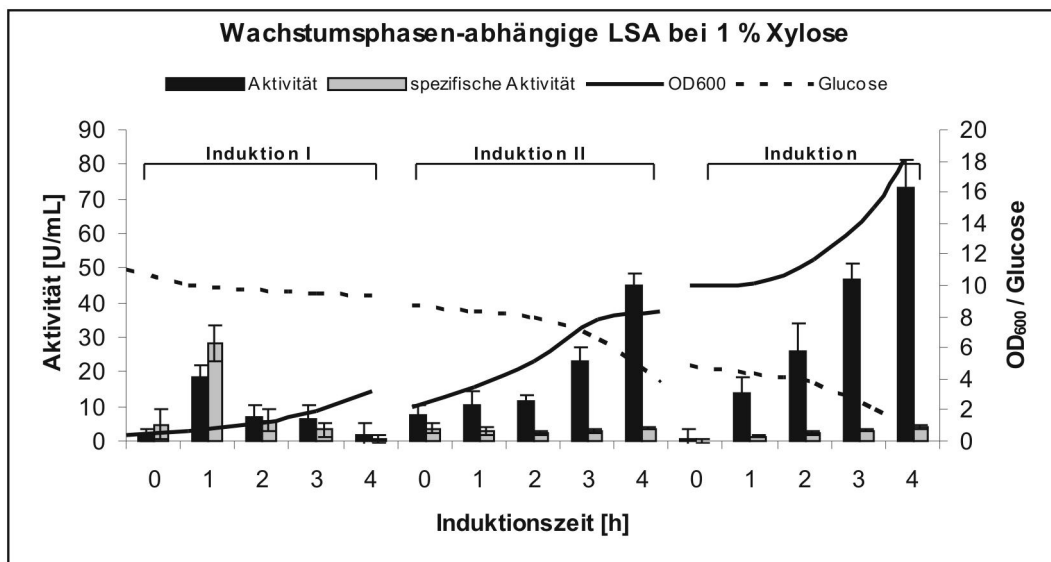


Abb. 3.49: Wachstumphasen-bezogene Messung der LSA-Ausbeute bei einer Induktorkonzentration von 1,0 %. Die hier erkennbaren Verläufe können deutlicher auf die Anwesenheit des Induktors zurückgeführt werden als bei Verwendung von 0,2 % Xylose.

Der hier dargestellte Verlauf ist besser zu interpretieren als derjenige bei Verwendung von 0,2 % Xylose, auch wenn die Werte in der ersten Sequenz einen inkonsistenten Eindruck machen. Hier kann aufgrund der Entwicklung der Werte auf die Anwesenheit des Induktors geschlossen werden. Die maximale Levansucrase-Aktivität liegt bei 73 U/ml und ist am Ende der exponentiellen Wachstumsphase zu finden.

Auch wenn die hier ermittelten Enzym-Aktivitäten deutlich unterhalb derer liegen, welche im Schüttelkolben unter Verwendung von LB Medium gemessen wurden, so bleibt die Kernaussage gleich: Das Optimum liegt bei einer Induktorkonzentration von 0,5 % Xylose. Hier werden Werte von 108 U/ml erreicht (vgl. Abb. 3.44). Im Vergleich dazu liegen die Werte bei doppelter Induktorkonzentration maximal bei 68 %. Eine Induktorkonzentration von 0,2 % führte nicht zu eindeutigen Aussagen. Maximalwerte finden sich am Ende der exponentiellen Phase – wobei hier nicht eindeutig feststeht, dass dies nicht auch auf der fehlenden Katabolitrepression aufgrund von Glucosemangel beruhen könnte. Die Ergebnisse bei Verwendung von 1,0 %iger Induktorkonzentration zeigen allerdings auch in Anwesenheit von Glucose einen nachvollziehbaren Verlauf.

Zuletzt sei noch auf etwas anderes hingewiesen: In beiden Diagrammen (0,2 und 1,0 %) fällt auf, dass die spezifische Levansucrase-Aktivität in der ersten Induktions-Sequenz höher ausfällt als in den anderen. Dieses Phänomen konnte bereits bei *E. coli* 5K pHM12 in CgXII beobachtet werden (vgl. Abb. 3.23 auf Seite 54). Auch hier scheint sich der Einfluss des Vorkultur-Mediums auf die Vitalität der Zellen und die damit einhergehende spezifische Enzymausbeute bemerkbar zu machen.

3.4.3 *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination mit LB-Medium

Da die Versuche unter Verwendung von CgXII weder hinsichtlich der Enzymausbeute noch in Anbetracht des Vorteils der Verwendung von fluoreszenzspektrometrischer Methoden befriedigende Ergebnisse mit sich brachten, wurden abschließende Experimente in Komplexmedium durchgeführt. Hierdurch sollten eindeutigere Messwerte mit geringerer Standardabweichung und daraus folgend verlässlichere Aussagen hinsichtlich der Ergebnisse erhalten werden.

Ein Aspekt, welcher bislang noch nicht untersucht worden war, war der Einfluss der Kultivierungs-Temperatur auf die Enzym-Ausbeute. Hierbei konnte der modulare Aufbau der Fermenterkombination sehr gut genutzt werden. Eine batch-Kultur in LB-Medium verläuft sehr kurz und hat nach eigenen Experimenten nach ca. 12 h den stationären Bereich erreicht. Insofern kam es der Untersuchung in mehreren aufeinander folgenden Wachstumsphasen entgegen, in der Hauptkultur mit einer niedrigeren Temperatur arbeiten zu können als im Versuchsfermenter.

Hierzu wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, in denen die Hauptkultur bei 25 °C betrieben wurde. In der einen Versuchsreihe wurde der Versuchsfermenter bei 30 °C betrieben, in der zweiten Reihe wurden 37 °C für die Induktions-Sequenzen in mehreren Wachstumsphasen gewählt.

Abbildung 3.50 stellt den Wachstumsverlauf anhand der OD sowie die CO₂-Werte im Abgas beider Hauptkulturen dar. Die beiden batches zeigen einen nicht identischen, aber vergleichbaren Wachstumsverlauf. Der maximale CO₂-Wert ist zwischen $t_K = 10$ und 11 h erreicht. Anschließend gerät das Wachstum in beiden Fällen langsam in einen stationären Bereich, der bei ca. 28 h in eine Optische Dichte von 13 mündet.

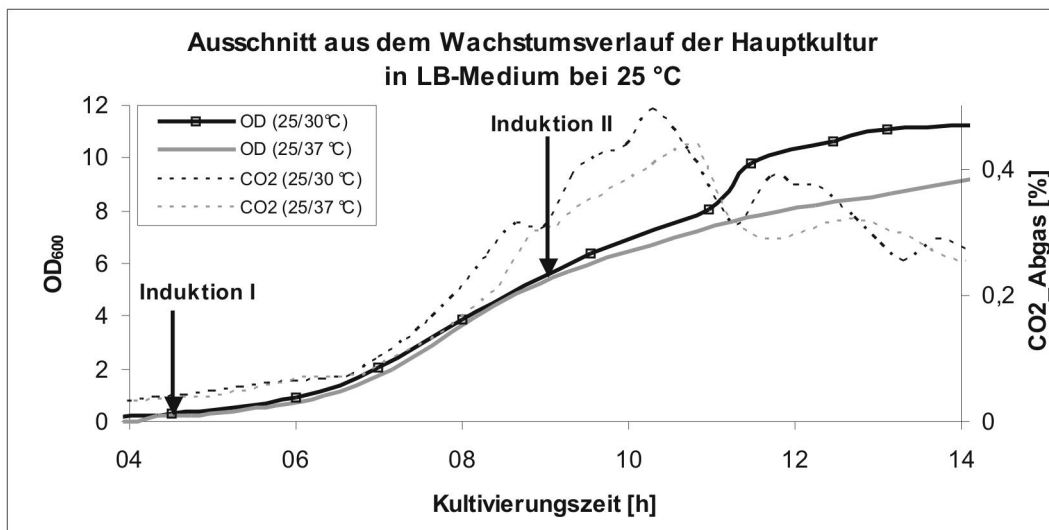


Abb. 3.50: Wachstumsverläufe der Hauptkultur der Fermenterkombination unter Verwendung von LB-Medium. Die batches konnten in beiden Versuchsreihen an zwei Punkten induziert werden.

Wie zu erkennen ist, wurden zwei Induktionen jeweils bei einer OD von ca. 0,4 und 5,5 gestartet. Am Ende der zweiten Induktionssequenz hatten die Zellen die stationäre Phase erreicht. Die resultierenden LSA-Werte der ersten Versuchsreihe bei einer Versuchsfermenter-Temperatur von 30 °C stellt Abbildung 3.51 dar.

Die Werte der LSA rangieren insgesamt mit bis zu 846 U/ml auf dem erwarteten hohen Niveau. Beide Induktions-Sequenzen zeigen eine kontinuierliche Akkumulation des Zielzyms nach einem exponentiellen Muster. Am Ende der zweiten Sequenz fällt die OD im Versuchsfermenter von 14 bei i_{180} auf 8 bei i_{240} ab. Hier ist im Versuchsfermenter bei 30 °C bereits die stationäre Phase erreicht, die in der Hauptkultur bei 25 °C erst ungefähr 15 h später (bei einer OD von 13) eintritt.

Im Bereich der spezifischen LSA ist ein vergleichbarer Trend zu erkennen. Hier steigen die Werte innerhalb der Sequenzen kontinuierlich an. Insbesondere in der zweiten Sequenz nimmt der Anstieg bis zum letzten Messzeitpunkt einen exponentiellen Verlauf.

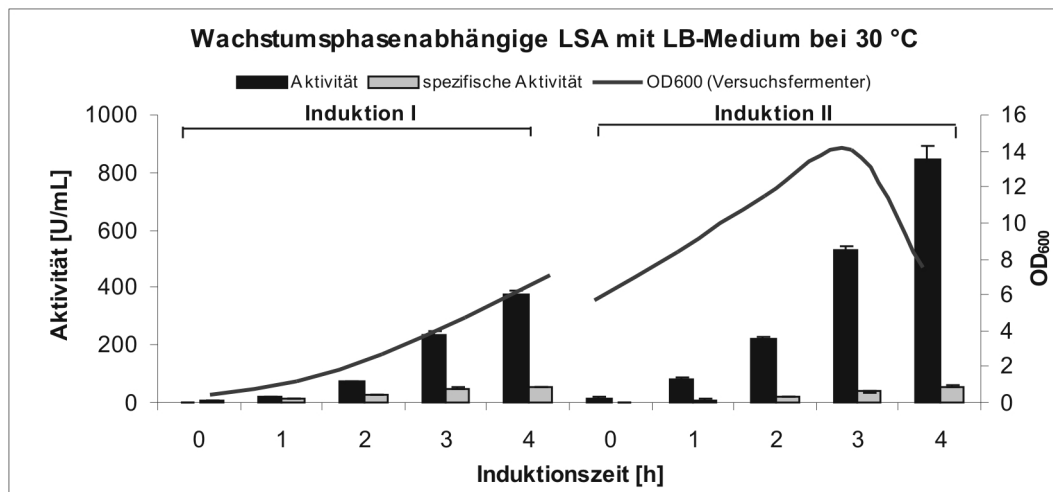


Abb. 3.51: LSA-Werte von *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination in zwei aufeinander folgenden Induktions-Sequenzen bei 30 °C. Die Werte bewegen sich auf einem hohen Niveau. Die Produktbildung verläuft nach einem exponentiellen Muster.

Abbildung 3.52 stellt die korrespondierenden Werte der Versuchsreihe dar, welche in der Fermenterkombination bei einer Temperatur des Versuchsfermenters von 37 °C gemessen wurden.

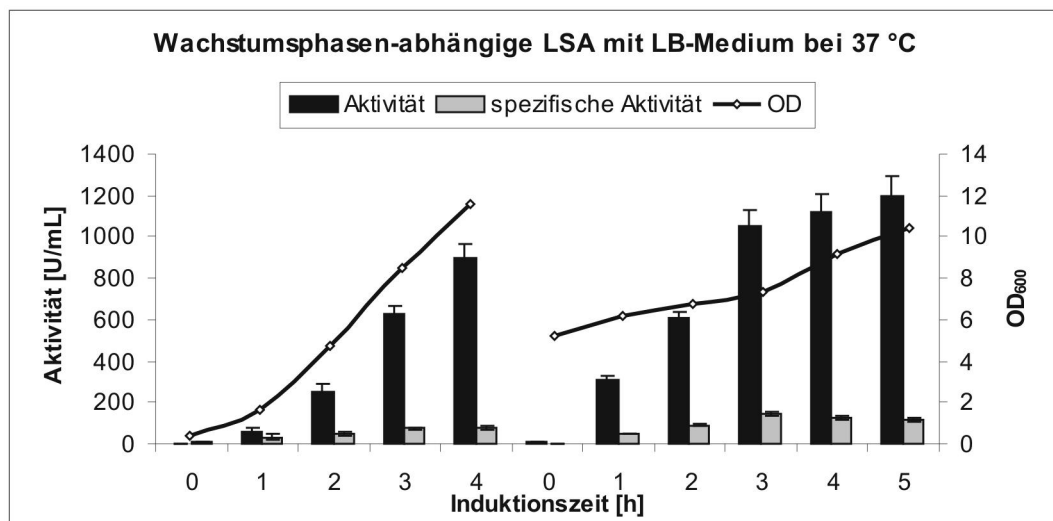


Abb. 3.52: LSA-Werte von *B. megaterium* pMM 1525 in der Fermenterkombination in zwei aufeinander folgenden Induktions-Sequenzen bei 37 °C. Der Vergleich zur Kultivierung bei 30 °C lässt veritable Kernaussagen zu hinsichtlich der Optimierung von Induktionszeitpunkt, Induktorkonzentration und Induktionstemperatur.

Die in dieser Versuchsreihe erzielten Ergebnisse übertreffen die Daten aus den Induktionen bei 30 °C noch um bis zu 33 % (Datengrundlage: vergleichbarer Zeitpunkt in Sequenz II bei i_{240}). In der zweiten Sequenz ist ein besonderes Verhalten zu beobachten:

Anhand der Werte für die OD kann vermutet werden, dass die Zellen in der zweiten Sequenz bereits stationäres Verhalten zeigen, obwohl in dieser Phase noch ausreichend Nährstoffe im Medium vorliegen müssten (vgl. Sequenz II bei 30 °C). Hier liegt eine Wachstums-Inhibierung vor. Gleichzeitig werden maximale Produktausbeuten registriert, was zu einer spezifischen Aktivität von 144 U/ml* führt. Dieser Wert übertrifft die Maximalwerte bei 30 °C um mehr als 150 %, was auf eine hohe Vitalität und eine damit einher gehende Produktbildung schließen lässt. Ganz offensichtlich hat die Induktion mit 0,5 % Xylose bei der Temperatur von 37 °C die höchste Effizienz.

Eine weitere Aussage ist damit zulässig: Vergleicht man die Induktions-Sequenzen I und II, so fällt auf, dass das Wachstum in der ersten Sequenz mit bis zu 77 U/ml* nicht die maximalen spezifischen Aktivitäten mit sich bringt, wie in der zweiten Sequenz. Damit kann der Grund in der Wachstumsphase gesucht werden, in welcher induziert wurde. Zu Beginn der exponentiellen Phase können weder in absoluter noch in spezifischer Hinsicht maximale Enzymsausbeuten erwartet werden.

Zuletzt lässt sich noch eine dritte Kernaussage aus dem gezeigten Wachstums- und Produktionsverlauf ziehen. Betrachtet man die Sequenz II, so lässt sich diese anhand der OD und der spezifischen Enzymaktivität wiederum in zwei Teile gliedern: Das Wachstumsverhalten bis zum Zeitpunkt i_{180} unterscheidet sich von dem danach. Hier ist auch im Bereich der spezifischen Levansucrase-Aktivität ein Wendepunkt auszumachen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Induktormenge ab i_{180} nicht mehr ausgereicht hat. Der Faktor Enzymproduktion zu Zellproduktion verkleinert sich wieder. Offenbar wäre zur weiteren Steigerung der spezifischen Enzymaktivität eine Induktormenge notwendig gewesen, die oberhalb der Standardkonzentration von 0,5 % rangiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit den letzten Versuchen bei 37 °C (im Vergleich mit den korrespondierenden Versuchen bei 30 °C) gleich drei wesentliche Aussagen getroffen werden können: Um eine maximale Produktionsrate zu erreichen, fördern Temperaturen von 37 °C bei *B. megaterium* pMM 1525 einen wesentlich effizienteren Einfluss des Induktors als niedrigere Temperaturen. Zudem sollte die Induktion kurz vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase stattfinden. Gegebenenfalls liegt das Maximum sogar im Bereich der stationären Phase; hier müsste die Produktbildung durch einen Substrat-Feed mit einer Kohlenstoffquelle unterstützt werden, welche nicht zur Katabolitrepression und damit zur kompetitiven Inhibierung des Induktors beiträgt. Zuletzt kann festgehalten werden, dass maximale Produktausbeuten eine höhere Konzentration als standardmäßige 0,5 % Xylose erfordern. Hierzu könnte eventuell die Grundmenge des Induktors gleich zu Beginn der Induktion erhöht werden. Alternativ könnte auch ein Induktor-Feed die Produktbildung wesentlich unterstützen.

3.4.4 Fazit der Versuchsreihe mit *B. megaterium* pMM 1525

Die in der Versuchsreihe mit *B. megaterium* pMM 1525 dargestellten Ergebnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst:

1. Im Schüttelkolben ließ sich *B. megaterium* pMM 1525 hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit gut im synthetischen CgXII kultivieren. Darin gemessene Werte der Levansucrase-Aktivität fielen sehr niedrig aus im Vergleich zu Kultivierungs-Ergebnissen mit Komplexmedium. Neben einer grundsätzlichen, vergleichsweise schlechten Nährstoffversorgung wurde die Ursache in der medienbedingten Behinderung des Enzymstabilisators (Ca^{2+}), in einer Inkompatibilität mit der analytischen Methode (dem DNS-Test) und im genetischen Bereich (Katabolitrepression) gesucht.
2. Änderungen der Medienzusammensetzung durch Austausch von Sulfat-Verbindungen durch korrespondierende Phosphate bzw. Chloride führte zu schlechterem Wachstum (Phosphat) bzw. ebenso niedrigen LSA-Werten (Chlorid).
3. Auch eine Änderung im analytischen Bereich – das Ersetzen des photometrischen Teils im DNS-Test durch eine biosensorische Alternative – brachte keine Steigerung der Messwerte aus CgXII-Kultivierungen.
4. Durch den Einsatz von Glycerin als Alternative zu der C-Quelle Glucose konnten leicht verbesserte Werte erzielt werden. Im Vergleich zu Kultivierungsergebnissen in Komplexmedium brachten die Veränderungen jedoch nur Produktsteigerungen im prozentualen Bereich mit sich. Somit wurde weiterhin mit Glucose gearbeitet, da die Messung von Glucose aufgrund technischer Gegebenheiten in kurzer Zeit verlässliche Ergebnisse mit sich bringt. Hierdurch war es möglich, den Substratverbrauch besser in die Kultivierungsergebnisse einbinden zu können. Durch den Einsatz von 10 statt 20 g/l wurde versucht, dem Problem der Katabolitrepression hinreichend zu begegnen.
5. Eine grobe Vorabbestimmung der zu verwendenden Induktorkonzentration konnte erfolgreich im Schüttelkolben unter Verwendung von LB-Medium durchgeführt werden. Hier zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,5 % Xylose die besten Ergebnisse mit sich bringt. Konzentrationen von 0,2 und 1,0 % führten – teilweise nur im Verlauf der Induktion – zu niedrigeren Werten.
6. Als Kultivierungstemperatur der Hauptkultur wurden 25 °C gewählt. Dies diente dazu, einen ausreichend langen Zeitraum bei CgXII für mehrere vier- bis fünf-stündige Induktions-Experimente im Versuchsfermenter zu etablieren. Experi-

mente bei 30 bzw. 28 °C ließen aus zeitlichen Gründen nur ein einmaliges Verfolgen des vierstündigen Induktionsverlaufs zu.

7. Durch die Wahl unterschiedlicher Temperaturen in Hauptkultur und Versuchsfermenter ergibt sich der Vorteil von Zeitzonen: So ist es möglich, Wachstums- bzw. Produktionsprozesse im Versuchsfermenter beschleunigt bzw. verzögert ablaufen zu lassen.
8. Der Versuchsfermenter stellt für Kultivierungen von *B. megaterium* pMM 1525 oberhalb einer OD von 6 keine ausreichende Begasungskapazität zur Verfügung. Hier wird unabsichtlich durch Sauerstofflimitierung ein quasi-stationärer Bereich erzwungen.
9. Erste Experimente zur Wachstumsphasen-abhängigen Enzymproduktion in CgXII unter variablem Selektionsdruck zeigten in erster Linie einen Einfluss auf die Wachstumsrate der Kultur. Nennenswerte Auswirkungen auf die Produktausbeute konnten in CgXII nicht festgestellt werden.
10. Im Experiment zur Bestimmung der LSA in CgXII bei variabler Induktorkonzentration konnten die Aussagen des Schüttelkolbenexperiments unter Verwendung von Komplexmedium trotz sehr geringer Enzymwerte bestätigt werden.
11. Abschließend zu den Experimenten mit CgXII konnten Prioritäten hinsichtlich der Produktbildung festgehalten werden: Stärksten Einfluss besitzt die Katabolitrepression. Induktionszeitpunkt und Induktorkonzentration besitzen niedrigere Priorität. Der Selektionsdruck im CgXII zeigt die geringsten Auswirkungen.
12. BioView-Informationen können als online-Komponente zu Aussagen hinsichtlich des Wachstums der Kultur verhelfen. Zur Produktbildung konnten im gesamten Spektrum keine Monitordaten gefunden werden. Zudem ist die Grundfluoreszenz bei *B. megaterium* pMM 1525 in CgXII vergleichsweise gering.
13. Die Verwendung von LB-Medium in der Fermenterkombination hat den Nachteil der schwer zu inhibierenden Wachstumsgeschwindigkeit zu Ungunsten mehrerer Einzelexperimente. Die in LB-Medium resultierenden Enzymkonzentrationen führen jedoch zu sehr verlässlichen Interpretationen.
14. In der Fermenterkombination unter Verwendung von LB-Medium konnten bei unterschiedlicher Temperatur des Versuchsfermenters gleichzeitig mehrere Erkenntnisse hinsichtlich der Optimierung der Ausbeute gewonnen werden. Bei einer Temperatur von 37 °C ist der Effekt des Induktors viel stärker ausgeprägt als bei 30 °C. Dieser Effekt hat kurz vor Erreichen der stationären Phase sein Maximum – ggf. können unter Substrat-Zufütterung im Bereich der stationären

Phase noch bessere Ergebnisse erzielt werden. Eine Induktorkonzentration von 0,5 % ist bei Enzymausbeuten von ca. 1100 U/ml und einer OD von ca. 7 nicht mehr ausreichend, um nährstofflich aufgenommene Energie verstärkt in die Produktion des Zielproteins zu investieren.

15. Im Hinblick auf die Optimierung des Kultivierungsbedingungen kann auf der Basis der gezeigten Experimente Folgendes gesagt werden: Die Kultivierung sollte bei einer Temperatur von 37 °C in Komplexmedium mit einer Tetracyclinkonzentration von 10 mg/l durchgeführt werden. Die Induktion sollte beim Eintritt in die stationäre Phase erfolgen. Die Ernte sollte bei einer Induktorkonzentration von 0,5 % zwischen drei und vier Stunden nach erfolgter Induktion stattfinden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Fermenterkombination ist im Hinblick auf die Beobachtung der wachstumsphasenabhängigen Produktion sehr gut geeignet. Vorteile ergeben sich dabei in mehreren prozesstechnischen Aspekten. Wie anhand der maximalen Wachstumsraten im Vergleich zu Kultivierungen im Schüttelkolben gezeigt werden konnte, sind die Wachstumsbedingungen hier deutlich verbessert. Dabei hat sich gezeigt, dass die Kultivierungsbedingungen im Versuchsfermenter mit denen in der Hauptkultur vergleichbar sind. Unterschiede ergaben sich – wenn überhaupt – im Bereich der lag-Phase der Kultivierungen. Hier hatten systembedingte Gegebenheiten einen negativen Einfluss auf das Produktionsverhalten.

Die Möglichkeit, Induktionszeitpunkte innerhalb einer Kultivierung zu variieren trug zu einer verlässlichen Aussage bei; die Ergebnisse konnten mithilfe der online-Daten untermauert werden. Die Fermenterkombination verbindet gute Kultivierungsbedingungen eines Systems im Technikums-Maßstab mit der Kosteneffizienz einer Laborkultivierung insbesondere im Bereich der Verwendung chemischer Induktoren. Zudem eröffnet der modulare Aufbau alternative Manipulationsmöglichkeiten der Kultur; ein Temperatursprung von mehreren Grad Celsius kann hierdurch im Minutenbereich ermöglicht werden.

Ein weiterer Vorteil ist die Beobachtung der Produktentwicklung mithilfe des Bio-Views, wie sie am Beispiel von *E. coli* 5K pHM12 vorgestellt wurde. Hier konnte die Produktbildung im Vergleich zur offline durchgeführten Referenz sehr gut abgebildet werden. Die Verwendung des synthetischen CgXII-Mediums war dazu notwendig. Problematisch waren in diesem Bereich lediglich Reste des Vorkulturmediums, welche zu Wertabweichungen führen konnten. Diese Abweichungen verloren im Zuge der Verstoffwechslung des Komplexmedienanteils an Gewicht.

Die schwerpunktmäßige Verwendung von CgXII war zur online Beobachtung der Entwicklung von Biomasse sehr gut geeignet. Eine Produkt-Detektion innerhalb einer lebenden Kultur konnte jedoch bei keinem der drei verwendeten Organismen durchgeführt werden. Hier wäre es interessant, diese Möglichkeit anhand eines fluorogenen Produkts – wie beispielsweise GFP – zu nutzen; allein die Entwicklung der Biomasse lässt sich online ebenso gut mit dem CO₂-Anteil im Abgas korrelieren.

Hinsichtlich des breiten Einsatzgebietes im Bereich von Kultivierungen von Prokaryonten konnte die hier verwendete, leicht veränderte Form von CgXII gute Dienste leisten; ausschließlich jeder Organismus zeigte gute Kompatibilität mit dem Medium. Einschränkungen ergaben sich auf der Wachstumsseite bei *E. coli* 5K pHM12 im Schüttelkolben, worin sich zunächst keine exponentielle Wachstumsphase etablieren ließ. Dieses Manko ließ sich jedoch im Fermenter durch bessere Kultivierungsbedingungen kompensieren.

Auf der Produktionsseite brachte die Verwendung von CgXII grundsätzlich geringe Einbußen. Trotz niedriger Produktausbeuten konnte festgestellt werden, dass die Menge intrazellulär gebildeter Produkte mit hinreichender Genauigkeit direkt aus dem Zellohextrakt bestimmt werden kann. Somit konnte die Notwendigkeit von zeitaufwändigen Aufreinigungsverfahren umgangen werden.

Im Falle von *E. coli* 5K pHM12 und *B. megaterium* pMM 1525 wäre eine Medienoptimierung hilfreich gewesen. Bei *B. megaterium* pMM 1525 konnte die Hauptproblematik in der Verwendung der C-Quelle gefunden werden. Wie sich im Nachhinein gezeigt hat, hätten hier die Kultivierungen unter Verwendung von Glycerin als Substitut für Glucose bessere Ergebnisse erbracht.

Die Ursache für die geringe Produktivität von *E. coli* 5K pHM12 konnte nicht ermittelt werden. Anhand der auf die Biomasse bezogenen, *spezifischen* Enzymaktivität konnten Medienkompatibilitäten leicht erkannt werden. Es konnte dargestellt werden, dass die spezifische Enzymproduktion eine medien- und keine organismusgebundene Größe ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die spezifische Enzym-Aktivität ein Maß für die Vitalität der Zellen und der daraus resultierenden Produktivität dieser darstellt. Auch innerhalb einer batch-Kultur auftretende Diauxie-Prozesse konnten anhand dieses rechnerischen Bezugs der gemessenen Enzym-Aktivitäten auf die Biomasse besser erkannt werden. Ungünstige Erntezeitpunkte im Verlauf der batch wurden damit verdeutlicht, teilweise traten diese sogar innerhalb der Induktionszeiträume zutage. Hier konnten die Möglichkeiten des Fermenterbetriebs – wie z.B. die Etablierung einer kontinuierlichen Substratzufütterung – erfolgreich genutzt werden. Die Kultivierung konnte durch eine prozesstechnische Kompensation der ermittelten Umstände in Richtung Produktmaximierung beeinflusst werden.

Zudem konnten im synthetischen Medium Hierarchien aufgestellt werden, welche die Gewichtung einzelner prozessrelevanter Parameter betraf. Am Beispiel von *B. megaterium* pMM 1525 konnte festgestellt werden, dass sich Änderungen in der Konzentration des Antibiotikums weniger in gesteigerten Produktausbeuten niederschlugen als Induktorkonzentrationen, Induktionszeitpunkte oder medienbedingte Einflüsse auf die Inhibierung chemischer Induktoren (Katabolitrepression).

Verlässlichste Ergebnisse wurden unter Verwendung von Komplexmedien erzielt. Hier ergaben sich lediglich Einschränkungen in zeitlicher Hinsicht, da die batch-Kulturen im Gesamtverlauf schneller abliefen. Durch die Nutzung der zeitlichen Dehnung mittels unterschiedlicher Prozessparameter zwischen dem Fermentermodul für die Hauptkultur und der Versuchs-Einheit konnten teilweise mehrere prozessoptimierende Einflüsse gleichzeitig aufgezeigt werden.

Letzterer Punkt der Verwendung von organismuskompatiblen Medien sollte im Falle zukünftiger Experimente unbedingt berücksichtigt werden. Dabei sind komplexe Vollmedien den synthetischen Alternativen hinsichtlich der zu erwartenden Ausbeute vorzuziehen. Abgesehen davon stellen Komplexmedien im Bereich der *Prozessentwicklung* einen besseren Praxisbezug dar. Im Bereich der *Forschung* sollte jedoch eine Möglichkeit zur vorherigen Optimierung synthetischer Medien genutzt werden. Unter dem Aspekt der definierten Medienkomposition stehen synthetische Medien weiterhin im Vordergrund – insbesondere dann, wenn fluorogene Produkte zur online-Überwachung mithilfe des BioViews zur Verfügung stehen.

Im Bereich der Einzelexperimente wäre es interessant, mithilfe der Fermenterkombination Versuchsreihen durchzuführen, die darauf abzielen, weitere Kultivierungs- bzw. Induktionsparameter in einen wachstumsphasenbezogenen Kontext zu bringen. Gerade im Bereich chemischer Induktionen ergeben sich hier gute Möglichkeiten. So blieb bislang die Frage offen, inwieweit die Menge des verwendeten Induktors mit der Biomasse korreliert. Des Weiteren wäre es insbesondere durch die Möglichkeit der Etablierung eines fed-batch-Betriebs interessant, Induktions-Strategien im Hinblick auf das Verhältnis von Substrat zu Induktor zu entwickeln.

Zu diesen Zwecken sollte die technische Auslegung der Fermenterkombination weiter optimiert werden, da der Versuchsfermenter für Organismen mit hohem Sauerstoffkonsum bislang wenig geeignet ist. Zudem wäre es wünschenswert, den Teil des Versuchsfermenters in mehrfacher Ausführung zur Verfügung zu haben (beispielsweise durch eine Ankopplung an eine Biostat Q-Einheit mit mehreren Kleinf fermentern). Hierdurch dürften sich die Einzelexperimente zeitlich überschneiden, Induktionen müssten zeitlich nicht derart begrenzt ablaufen, wie es hier der Fall war. Somit wäre auch das Problem hinfällig, das Wachstum der Zellen in der Hauptkultivierung inhibieren zu müssen. Soll die hier verwendete Anlage zum Zweck der Wachstumsphasen-differenzierten Produktaufschlüsselung weiter genutzt werden, dann empfiehlt sich der Einsatz von langsamer wachsenden Organismen wie beispielsweise Hefen oder Streptomycceten.

A Anhang

A.1 Methodisches

Die im Folgenden aufgeführten Methoden beziehen sich auf grundsätzliche Prozessvorgänge. Eventuelle Änderungen unterschiedlicher Parameter werden im experimentellen Teil explizit erwähnt.

A.1.1 Gefrierkulturen

Für die Langzeitlagerung der Stämme werden Gefrierkulturen angelegt. Dafür werden 100 mL LB-Medium mit doppelter Antibiotikakonzentration (Tetracyclin: 20 mg/l, Ampicillin: 150 mg/l) in einem 500 ml- Schüttelkolben mit 2 Schikanen mit 1000 μ l Zellkultur angeimpft und 6 h bei 37 °C und 130 rpm im Brutschrank bis zu einer OD₆₀₀ von 4 inkubiert. Anschließend werden jeweils 20 ml dieser Kultur mit 20 ml Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Alle Kultivierungsarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

A.1.2 Submersschüttelkulturen

Für die Schüttelkolbenversuche zur Bestimmung der Enzymaktivität wird ein steriler Schüttelkolben mit jeweils 100 mL LB- bzw. CgXII-Medium beschickt. Die Art und Dosierung der sterilfiltrierten Zusätze wie Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika wird in Abhängigkeit von dem zu kultivierenden Bakterienstamm durchgeführt (vgl. Abschnitt A.2.2). Jede Schüttelkultur wird mit 700 μ l Gefrierkultur angeimpft. Die Kulturen werden bei 30 °C sowie 37 °C im Brutschrank bei 130 rpm inkubiert. Eine gegebenenfalls erforderliche Induktion wird bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 initiiert. Die Induktionsdauer beträgt 4 h. Stündlich wird 1 ml Probe für die offline Analytik (optische Dichte, Glucose) und den Enzymaktivitätstest entnommen. Alle Kultivierungsarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

A.1.3 Fermenterkultivierungen

Für die Vorkultur wird ein steriler Schüttelkolben (500 ml, zwei Schikanen) mit 100 ml LB-Medium und einer Antibiotikakonzentration von 10 mg/l (im Falle von Tetracyclin) bzw. 75 mg/l (im Falle von Ampicillin) mit 1000 μ l Gefrierkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 3 bis 4 im Brutschrank bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Vor der Hauptkultivierung werden alle Systembestandteile des Fermenters durch Autoklavieren sterilisiert. In einem Biostat C Reaktor (Sartorius bbi) werden 8 l CgXII-Medium oder LB-Medium vorgelegt und zusätzlich mit 1,6 ml Desmophen 3900 (Bayer) als Antischaummittel versetzt. Vor dem Überimpfen werden 90 ml der Vorkultur abzentrifugiert (3300 xg; 15 min; RT) und in 20 ml des Komplexmediums resuspendiert. Die Hauptkultur wird bei folgenden Parametern kultiviert:

Temperatur:	30 °C, 28 °C oder 25 °C
pH-Wert:	6,9 (Regelung mit 10 % NH ₄ OH und 1 M HCl)
pO ₂ -Regelung	50 % (Kaskade Begasung und Rührerdrehzahl)
Rührgeschwindigkeit:	150 - 900 rpm (zur pO ₂ -Regelung)
Begasung:	0,6 - 8 l/min (zur pO ₂ -Regelung)

Der Prozessverlauf wird mit Hilfe der RISP-Software überwacht, in welcher Temperatur, Rührerdrehzahl, Abgaszusammensetzung, pH-Wert, pO₂-Wert und Begasungsrate im zeitlichen Verlauf online dargestellt werden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird der Testreaktor (Biostat B) mit zwei Schläuchen an den Kultivierungsreaktor (Biostat C) angeschlossen und das Kulturmedium zwischen beiden Reaktoren mithilfe einer externen Pumpe im Kreis gepumpt (vgl. Skizze zum Versuchsaufbau, Abb. 2.2 auf Seite 6). Durch die eingestellte Höhe der Abpumpröhre im Testreaktor (Biostat B) wird das Volumen an Kulturmedium in diesem auf 300 mL beschränkt. Nach 10 min Pumpen wird die Verbindung zwischen den Reaktoren unterbrochen und das Pumpen eingestellt. Die Kultivierung im Biostat C wird fortgesetzt.

Die anschließenden Experimente im Versuchsfermenter werden wie folgt durchgeführt:

○ ***E. coli* 5K pHM12 – „PMC-Test“**

Zunächst werden dem Versuchsfermenter 120 (von insgesamt 300) ml Medium entnommen, mit welchen die aktuellen Werte für die OD und Glucose-Konzentrationen bestimmt werden. Nach der anschließenden Zugabe von 20 ml Ethanol (vergällt, 99 %) zur Permeabilisierung der Zellen werden 100 ml einer PMC-Stammlösung (9 mg/l) zugegeben. Zeitgleich wird die 2D-Fluoreszenzmessung mittels BioViews gestartet. Die Fluoreszenzintensitäten werden in einem Zeitintervall von 1,5 min kontinuierlich für insgesamt 30 bis 45 min gemessen.

○ ***E. coli* K12 pJOE 2702**

Nach dem Abnehmen von 30 ml Medium aus dem Versuchsfermenter zur Glucose- und OD-Bestimmung wird die restliche Bakterienkultur mit 30 ml einer 5 %igen Stammlösung von *L*-Rhamnose induziert (Endkonzentration: 0,2 %) und 90 bis 120 min bei folgenden Parametern weiterkultiviert:

Temperatur:	28 °C
pH-Wert:	6,9 (Regelung mit 10 % NH ₄ OH und 1 M HCl)
Rührgeschwindigkeit:	1000 rpm mit Magnetrührer und Rührfisch
Begasung:	300 ml/min = 1 vvm (über Sparger)

Dem Versuchfermenter werden zu den Zeitpunkten von 30, 60, 90 und 120 min (nach erfolgter Induktion) jeweils 15 ml der Kultur entnommen, abzentrifugiert, in 3 ml NPP (50 mM, pH 7,5) resuspendiert und eingefroren.

◦ ***B. megaterium* pMM 1525**

Nach dem Ablassen von 45 ml Medium aus dem Versuchfermenter zur Glucose- und OD₆₀₀-Bestimmung wird die restliche Bakterienkultur (angefangen bei einer OD₆₀₀ von 0,4) mit Xylose induziert (Endkonzentration: 0,2 bis 1,0 %) und 4 h bei folgenden Parametern weiterkultiviert:

Temperatur:	30 °C bzw. 37 °C
pH-Wert:	6,9 (Regelung mit 10 % NH ₄ OH und 1 M HCl)
Rührgeschwindigkeit:	1000 rpm mit Magnetrührer und Rührfisch
Begasung:	300 ml/min = 1 vvm (über Sparger)

Während der Induktion werden stündlich 20 ml Probe entnommen und die OD₆₀₀ sowie die Glucosekonzentration bestimmt. 10 ml dieser Probe werden durch Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 4000 rpm) von den Zellen abgetrennt. Im Gegensatz zu *E. coli* 5K pHM12 und *E. coli* K12 pJOE 2702, bei denen die abzentrifugierten Zellen nach einem Zellaufschluss photometrisch auf deren Enzymgehalt untersucht werden, wird von *B. megaterium* pMM 1525 der erhaltende Kultur-Überstand untersucht und die Zellen verworfen.

A.1.4 Sterilisation

Alle Glas- und Kunststoffgefäße werden in einem Autoklaven V 150 (Systec) sterilisiert. Dafür werden die Gefäße für 20 min auf 121 °C erhitzt. Danach wird die Temperatur durch Wasserkühlung auf 80 °C abgesenkt und die Gefäße werden zum weiteren Abkühlen entnommen. Medien mit Agar werden auf 50 °C abgekühlt, bevor sie mit den steril filtrierte Zusätzen wie Antibiotika und Vitaminen vervollständigt und vergossen werden.

Der 0,5 l Versuchfermenter (Eigenbau, IFTC) wird mit VE-Wasser gefüllt und dann im Autoklaven V 150 (Systec) für 1 h auf 121 °C erhitzt. Die Reaktoren Biostat C und Biostat UD (Sartorius) werden *in place* sterilisiert. Dafür werden sie mit dem systemeigenen Thermostaten für 30 min auf 121 °C erhitzt. Zu Kultivierungszwecken verwendete Gase werden durch Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm geleitet.

A.1.5 Messung der Optischen Dichte

Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspension wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Zweikanal-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Kulturprobe wird vor der Messung um den Faktor 10 bis 50

mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt, so dass die Messung im Bereich zwischen 0,05 und 0,8 liegt, um gemäß dem Lambert-Beer'schen Strahlungsintensitätsgesetz einen linearen Zusammenhang zwischen gemessener Extinktion und vorliegender Zellkonzentration zu Grunde legen zu können.

In einer 1,5 ml Einwegküvette (Halbmikroküvetten, Nr. 1202, Fa. Ratiolab) mit 1 cm Schichtdicke wird dann bei Raumtemperatur gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung (aq.) die Extinktion gemessen. Die NaCl-Lösung kann hier als Referenz verwendet werden (Nullabgleich), da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt. Es werden jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt, um Verdünnungsfehler zu minimieren.

A.1.6 Bestimmung der Glucose-Konzentration

Die Bestimmung der *D*-Glucosekonzentration erfolgt mit dem Analysator Modell *YSI 2700 Select* der Firma Yellow Springs Instruments, Ohio, USA. Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses wird unter Freisetzung von Wasser an einer Platin-Elektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibration des Analysators erfolgt mithilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 4 g/l; das Gerät misst in einem Bereich zwischen 0 und 10 g/l hinreichend genau. Um Messfehler weiter zu minimieren, werden Proben mit höherer Glucosekonzentration entsprechend verdünnt, um ungefähr im Bereich von 4 (± 1) g/l zu messen.

A.1.7 Zellaufschluss

Zur Probenvorbereitung werden die 24 Vertiefungen eines auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Mikro-Reaktionsgefäßhalters zunächst mit jeweils 700 μl eines Kryovermittlers befüllt. Als Kryovermittler dient eine (zunächst) raumtemperierte konzentrierte Natriumchloridlösung (300 g/l). Anschließend werden 500 μl der frisch aufgetauten Proben der Kulturbrühe¹ in 2000 μl Mikro-Reaktionsgefäßen mit Rundboden (Fa. Sarstedt) gefüllt.

Nachdem der Gefäßhalter mit allen aufzuschließenden Proben bestückt worden ist, wird er in eine eisgefüllte Styroporbox gestellt. Nach frühestens 10 Minuten des Einkühlens der Proben kann mit dem Aufschluss begonnen werden.

Der Aufschluss erfolgt mit einem Dispergiergerät für Kleinstvolumina (Ultra-Turrax T10 Basic), welcher an einem Stativ befestigt ist. Nach komplettem Eintauchen der

¹ Üblicherweise werden 15 ml der Kulturbrühe vor dem Einfrieren in 3 ml NPP resuspendiert und somit um den Faktor 5 aufkonzentriert.

Dispergierspitze des Gerätes werden die Zellen bei 22000 rpm 20 Sekunden lang aufgeschlossen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt unter Berücksichtigung einer jeweils 60 sekündigen Pause zum Abkühlen der Probe. Anschließend wird das Gerät aus dem Probengefäß herausgezogen, mit 15 ml VE-Wasser gespült und abgetrocknet.

Die so erhaltenen Zellrohextrakte werden bei 4 °C abzentrifugiert (13000 rpm, 7 Minuten). Zuletzt werden jeweils 200 µl des Überstands in ein neues Probengefäß überführt und gegebenenfalls mit raumtemperiertem NPP verdünnt.

A.1.8 Photometrische Bestimmung des Enzymgehalts

A.1.8.1 Penicillin G-Amidase aus *E. coli* 5K pHM12 (-offline-); „NIPAB-Test“

Der nach dem Zellaufschluss verbliebene Überstand wird gegebenenfalls zunächst um den Faktor 2 bis 10 mit raumtemperiertem NPP² verdünnt. Der photometrische Test erfolgt in einem Zweikanal-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn). Als Referenz wird eine 1,5 ml Einwegküvette (Halbmikroküvetten, Nr. 1202, Fa. Ratiolab) mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Diese wird mit 500 µl NIPAB-SL (1,802 mg/ml in NPP) und 500 µl NPP befüllt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig durchmischt.

500 µl der zu vermessenden Probe werden in eine zweite Einwegküvette pipettiert, in welcher bereits 500 µl NIPAB-SL (1,802 mg/ml in NPP) vorgelegt wurden. Nach sorgfältiger Durchmischung der Lösungen wird die Küvette in den Halter gestellt und die Messung nach einem Nullpunkt-Abgleich gestartet. Die Messung verläuft kontinuierlich für insgesamt 3 Minuten in einem Zeitintervall von 6 Sekunden.

Aus der resultierenden Gerade kann über die Voraussetzung eines linearen Zusammenhangs zwischen gemessener Extinktion und Konzentration des gebildeten Farbstoffs auf die vorliegende Enzymaktivität geschlossen werden.

A.1.8.2 *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *E. coli* K12 pJOE 2702; „pNPA-Test“

Die Ermittlung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase-Aktivität verläuft analog zu dem Verfahren, welches im vorherigen Unterabschnitt für die Penicillin G-Amidase beschrieben ist. Der wesentliche Unterschied liegt in der Verwendung von *para*-Nitrophenylacetat an Stelle von NIPAB. Sowohl in der Referenz- als auch in der Probenküvette werden 100 µl einer Lösung von 1,81 g/l (entsprechend 10 mM) pNPA in DMSO vorgelegt. Die Küvetten werden anschließend mit 900 µl NPP (Referenz) bzw. phosphatgepuffertem Zellrohextrakt befüllt.

² Dies dient dazu, bei der anschließenden photometrischen Messung im Bereich zwischen 0,05 und 0,8 (rel. AU) zu bleiben.

Aufgrund der nicht idealen Löslichkeit von DMSO in NPP muss durch mehrmaliges Hin- und Herpipettieren eine ausreichende Homogenisierung stattgefunden haben, bevor die Messung gestartet wird. Als Parameter der kinetischen Messung gelten 2 Minuten in einem Zeitintervall von 6 Sekunden. Da pNPA in wässriger Lösung auch ohne Enzymbestandteile eine leichte Eigenhydrolyse an den Tag legt, wird die Referenzküvette nach 9 gemessenen Proben durch eine neue ausgetauscht.

A.1.8.3 Levansucrase aus *B. megaterium* pMM 1525; „DNS-Test“

Im ersten Schritt der Aktivitätsbestimmung werden zunächst 100 μl des zellfreien Kultur-Überstandes mit 900 μl Reaktionslösung³ vereinigt. Die Reaktion läuft in einem Thermoschüttler bei 1000 rpm und 37 °C ab. Beginnend mit einer Nullprobe, welche direkt nach Zusammenführung der Reagenzien genommen wird, werden in fünf definierten zeitlichen Abständen (jeweils mindestens 30, höchstens 60 Minuten) Proben von je 100 μl abgenommen und in ein Mikro-Reaktionsgefäß überführt.

Im nun folgenden Schritt wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 μl des DNS-Reagenzes³ gestoppt. Für die Färbereaktion werden die Ansätze jeweils bei 1000 rpm und 95 °C für 5 min inkubiert. Sofort darauf werden die Proben mithilfe von Eiswasser wieder auf Raumtemperatur gebracht und mit 800 μl raumtemperiertem Wasser vermischt. Abschließend wird die Absorption bei 540 nm gegen die Referenz gemessen, welche aus einer Mischung von 100 μl Reaktionslösung mit 100 μl DNS-Reagenz und 800 μl VE-Wasser besteht. (Für die Referenzprobe wird von einer Inkubation bei 95 °C abgesehen, da ohne Enzym keine *D*-Glucose gebildet worden sein dürfte.)

Um von den erhaltenen Daten auf die im ersten Schritt eingesetzte Enzym-Konzentration schließen zu können, wird eine Kalibrationsreihe herangezogen. Zur Erstellung dieser Kalibrationsreihe werden Glucoselösungen von 0 bis 4 g/l hergestellt. Hiervon werden jeweils 100 μl mit 100 μl des DNS-Reagenzes versetzt und analog zu der Färbereaktion der Proben im Thermoschüttler bei 1000 rpm und 95 °C für 5 min inkubiert.

Um einen Vergleich zu Literaturwerten zu ermöglichen, wird mit dem Faktor 0,56 multipliziert, um die Rate der freigesetzten Glucose zu erhalten [7]. (Da die Fructose in das wachsende Polymer eingebaut wird, ist das molare Verhältnis der gebildeten Glucose zur Fructose ist nicht 1:1.)

³ zur Zusammensetzung s. Kapitel A.2.2

A.2 Materielles

A.2.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Mikroskop	IX-50	Olympus
Mikroskop	BX-41	Olympus
Mikroskop-Digitalkamera	C-4040	Olympus
Zentrifuge	Megafuge 1.0RS	Heraeus instruments
Zentrifuge	5415C	Eppendorf
Vortex Mixer	VM300	Gemmy Industrial
Analysenwaage	Analytic AC 210 S	Sartorius
pH-Meter	605	Metrohm
pH-Meter	„pH-Checker“	Hanna instruments
Glucosemessgerät	YSI 2700	Yellow Springs Instruments
Dispergiergerät	Ultraturrax T10 basic	IKA
Chronometer	6250	Nokia
Spektrophotometer	Uvikon 922	Kontron instruments
Clean bench		Flow Laboratories
Inkubationshaube	Certomat HK	Sartorius bbi
Schüttler	Certomat SII	Sartorius bbi
Brutschrank	BE 200	Memmert

Fermenterkultivierung

Edelstahlreaktor (0,5 l)	Eigenbau	IFTC Hannover
Edelstahlreaktor (10 l)	Biostat C	Sartorius bbi
Steuereinheit	Biostat B	Sartorius bbi
Fluoreszenzspektrometer	BioView	Delta Light and Optics
pH-Elektrode	FemProbe T635	Broadley & James
Sauerstoffelektrode	Inpro 6800	Mettler-Toledo
Thermoelement	Pt-100	Sartorius bbi
Abgasanalytik	Uras 14 und Magnos	ABB

A.2.2 Reagenzien

Feinchemikalien

Material	Hersteller	Artikel-Nr.
Borsäure	Sigma	B7660
Methanol HPLC grade	Carl Roth	7342.1

MOPS	Omnilab	2.700 106
Tetracyclin-HCl	Merck	8189
Tetrahydrofuran HPLC grade	Carl Roth	7344.1

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Fluka bezogen.

verwendete Medien und Puffer

Reagenz	Menge
THE-Medium [14]	(pro Liter:)
Techn. Hefeextrakt	24 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	4,01 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	4,27 g
LB-Medium [3]	(pro Liter:)
Hefeextrakt	10 g
Trypton	5 g
NaCl	1 g
Zusätze für <i>E. coli</i> 5K pHM12 [14]	(pro Liter:)
Thiamin · HCl	10 mg
Glycin	100 mg
Glucose	1000 mg
Standard-Antibiotikakonzentrationen:	(pro Liter:)
Tetracyclin (<i>E. coli</i> 5K pHM12 und <i>B. megaterium</i> pMM 1525)	10 mg
Ampicillin (<i>E. coli</i> K12 pJOE 2702)	150 mg
Modifiziertes CgXII-Medium [21]	(pro Liter:)
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g
Harnstoff	5 g
K ₂ HPO ₄	3,92 g
NaH ₂ PO ₄	4,27 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ -Lösung 1 % (w/v)	1 ml
Spurensalz-Lösung (s. u.)	1 ml

(Nach dem Autoklavieren:)

Biotin-Lösung (wss.) (0,2 mg/ml)	1 ml
Thiamin-Lösung (wss.) (10 mg/ml)	1 ml
Protokatechuat-Lösung (wss.) (30 mg/ml)	1 ml
Glucose-Lösung (wss.) (500 g/l)	40 ml

Spurensalzlösung (pro 100 ml:)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1000 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1000 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
CuSO_4	20 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg

Natriumphosphatpuffer (50 mM)

	pro Liter
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,01 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,27 g
(mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt)	

Reaktionslösung (für DNS-Test)

Natriumacetat-Lösung (100 mM)	375 μl
Saccharoselösung 50 % (w/v)	102,7 μl
Calciumchlorid-Lösung (5 g/l)	44,1 μl
Natriumazid-Lösung (10 g/L)	4,5 μl
Wasser	823,7 μl
(Probe)	150 μl

DNS-Färbereagenz

3,5-Dinitrosalicylsäure	10 g/l
Kaliumnatriumtartrat	300 g/l
Natriumhydroxid	16 g/l

A.3 Foto des Versuchsaufbaus

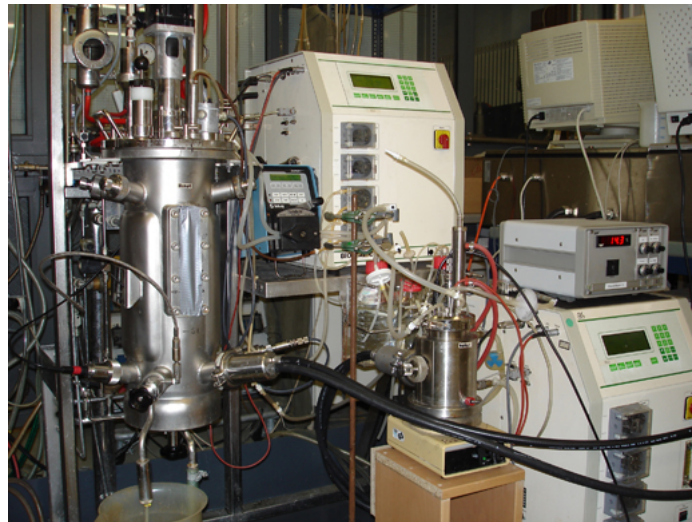


Abb. A.1: Foto des Versuchsaufbaus

A.4 Restriktionskarte von pJOE2702

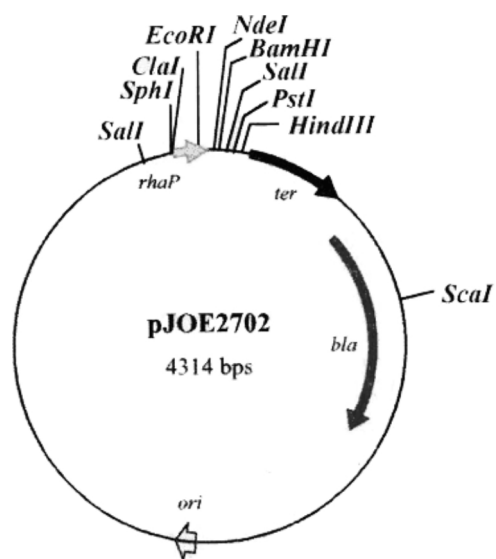


Abb. A.2: Restriktionskarte des Plasmids pJOE2702

Literaturverzeichnis

- [1] AHLMANN, N. : Entwicklung eines on-line Meßverfahrens für intracelluläre Penicillin-G-Acylase des *E.coli* 5K(pHM12)-Hybridstammes : Diplomarbeit : Universität Hannover : 1985
- [2] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D., JAENICKE, L. (Hrsg.) : *Molekularbiologie der Zelle* : 2. Aufl. : VCH : 1998
- [3] BERTANI, G. : Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* : **62** (3) : 293-300 : 1951
- [4] BRANNON, D. R., MABE, J. A., FUKUDA, D. S.: De-esterification of cephalosporin parantirobenzyl esters by microbial enzymes, 1976
- [5] BRUNE, I., WERNER, H., HÜSER, A. T., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A., TAUCH, A. : The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum* : *BMC Genomics* : **7**:21 : 2006
- [6] BICE, I. : Untersuchung der spezifischen Enzymproduktion von rekombinantem *Bacillus megaterium* innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen : Diplomarbeit : Leibniz Universität Hannover : 2008
- [7] BIEDENDIECK, R. : *Bacillus megaterium*: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins. : Dissertation : Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig : 2007
- [8] BORNSCHEUER, U. T., KAZLAUSKAS, R. J. : *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and stereoselective biotransformations* : Wiley-VCH, Weinheim : 1999
- [9] BÜRING, M.: Optimierung von Prozessparametern in der fermentativen *L*-Serin-Produktion mit rekombinantem *Corynebacterium glutamicum*: Diplomarbeit, Universität Hannover : 2004
- [10] CALAZANZ, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. M. O. C., DE FRANCA, F. P. : Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. : *Biotechnol. Lett.* **19** : 19-21 : 1997
- [11] CALAZANZ, G. M. T., LIMA, R. M. O. C., LOPES, C. E., DE FRANCA, : Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. : *Int. J. Biol. Macromol.* **27** : 245-247 : 2000
- [12] CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. : Green fluorescent protein as a marker for gene expression. : *Science* : **263**(5148) : 802-5 : 1994
- [13] DAHL, M. K., SCHMIEDEL, D., HILLEN, W. : Glucose and glucose-6-phosphate interaction whit Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. : *J. Bacteriol.* : **177**: 5467-5472 : 1995
- [14] FIRLEY, A. : Kultivierung von *E. coli* 5K pHM12 zur Bildung von Penicillin G-Acylase : Diplomarbeit, Universität Hannover : 1983
- [15] GRÖSSERINGER, R., KÜSTER, E., GALINIER, A., DEUTSCHER, J., HILLEN, W. : Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. : *J. Mol. Biol.* : **266**: 665-676 : 1997
- [16] GUILBAULT, G. G. : *Practical Fluorescence: Theory, Methods and Techniques* : Dekker, New York : 1973
- [17] HENKE, E. : Untersuchungen zur Erweiterung der Substratspezifität von Carboxylester-Hydrolasen : Dissertation : Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald : 2001

- [18] HUECK, C. J., KRAUS, A., HILLEN, W. : Sequences of CcpA and two downstream *Bacillus megaterium* genes with homology to the motAB operon from *Bacillus subtilis*. : *Gene* : **143**: 147-148 : 1994
- [19] HUECK, C. J., KRAUS, A., SCHMIEDEL, D., HILLEN, W. : Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein cepA from *Bacillus megaterium*. : *Mol. Microbiol.* : **16**: 855-864 : 1995
- [20] K.E.G.G. Datenbank:
http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?enzyme+3.5.1.11
- [21] KEILHAUER, C.; EGGELING, L.; SAHM, H. : Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* : Molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon. : *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603 : 1993
- [22] KROLL, S. : Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing : Dissertation : Leibniz Universität Hannover : 2008
- [23] KUTZBACH, C., RAUENBUSCH, E. : Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 : *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* : **354** : 45-53 : 1974
- [24] MALTEN, M., BIEDENDIECK, R. : A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, Export, and One-Step Purification of Affinity-Tagged Heterologous Levansucrase from Growth Medium : *Applied and Environm. Microbiology* : **72/2** : 1677-1679 : 2006
- [25] MAROSE, S. : Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie : Dissertation : Universität Hannover : 1999
- [26] MAROSE, S., LINDEMANN, C., SCHEPER, T. : Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring : *Biotechnology Progress* : **14(1)** : 63-74 : 1997
- [27] MAYER, H., COLLINS, J., WAGNER, F. : Cloning of the penicillin G-acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids : *Enzyme Engineering* : **Vol.5**: 61-69 : 1980
- [28] MEEVOOTISOM, V., SOMSUK, P., PRACHAKTAM, R., FLEGEL, T. W. : Simple screening method for isolation of penicillin acylase-producing bacteria. : *J. Appl. Environ. Microbiol.* : **46 (5)** : 1227-1229 : 1983
- [29] MEYER, L. : Aufbau eines modularen Hohlfaserreaktorsystems zum Screening von Verfahrensparametern im Bereich der mikrobiellen Produktion : Dissertation : Leibniz Universität Hannover : 2008
- [30] OVERWAY, K. S., LYTLE, F. E. : Fluorescent Enzymatic Probes Suitable for Two-Photon Excitation : *Applied Spectroscopy* : **52 (2)** : 298-302 : 1998
- [31] PREDIGER, A. : Charakterisierung der spezifischen Enzymproduktion von *E. coli* K 12 pJOE2702 innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen mithilfe eines Doppelbioreaktor-Systems : Bachelor-Arbeit : Leibniz Universität Hannover : 2007
- [32] RODE, B. : Kultivierung und Analyse oszillierender Hefen mit dem Schwerpunkt Durchflussszytometrie und Aufbau eines neuen Reaktorsystems : Diplomarbeit : Universität Hannover : 2004
- [33] RODE, B. : Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1 : Dissertation : Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover : 2008
- [34] SCHEPER, T., WEISS, M., SCHÜGERL, K. : Two new fluorogenic substrates for the detection of penicillin-G-acylase activity : *Anal. Chim. Act.* : **182** : 203-206 : 1986
- [35] RYGUS, T., HILLEN, W. : Catabolite repression of the xyl operon in *Bacillus megaterium*. : *J. Bacteriol.* : **174**: 3049-3055 1992

- [36] RYGUS, T., SCHELER, A., ALLMANASBERGER, R., HILLEN, W. : Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. : *Arch. Microbiol.* **155**: 535-542 : 1991
- [37] SAIER M.H. Jr., CHAUVAUX, S., DEUTSCHER, J., REIZER, J., YE, J.-J. : Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. : *Trends Biochem.Sci.* : **20**: 267-271 : 1995
- [38] SCHMIEDEL, D., KINTRUP, M., KÜSTER, E., HILLEN, W. : Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. : *Mol. Microbiol.* : **23** : 1053-1062 : 1997
- [39] SCHMIEDEL, D., HILLEN, W. : Contributions of XylR, CepA and cre to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. : *Mol.Gen.Genet.* : **250** : 259-266 : 1996
- [40] SCHMITT, J., HESS, H., STUNNENBERG, H. G. : Affinity purification of histidine tagged proteins : *Mol. Biol. Reports* : **18** : 1993
- [41] SEIDEL, G. : Kultivierungen mit einem Hochleistungsstamm von *Acremonium chrysogenum* in komplexen und synthetischen Medien - Strategien zur Produktivitätssteigerung unter Berücksichtigung der Enzymaktivitäten der Cephalosporin C Biosynthese : Dissertation : Universität Hannover : 1999
- [42] SOLLE, D : Analyse und Optimierung eines industriellen Biotransformationsprozesses zur Herstellung von Tryptophan : Dissertation : Universität Hannover : 2003
- [43] STÄRK, E. : Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivarianter Auswertemethoden : Dissertation : Universität Hannover : 2002
- [44] STUMPP, T., WILMS, B., ALTENBUCHNER, J.: Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli* : *Biospektrum* : **6** : 2000
- [45] STÜLKE, J., HILLEN, W. : Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers and signals. : *Naturwissenschaften* : **85** : 583-592 : 1998
- [46] STÜLKE, J., HILLEN, W. : Carbon catabolite repression in bacteria. : *Curr. Opin. Microbiol.* : **2** : 195-201 : 1999
- [47] VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H., FLESCHE, F., TEN BRINK, B., SMITH, M. R., DIJKHUTZEN, L. : Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopoly-saccharides. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50** : 697-703 : 1998
- [48] WOLFBEIS, O.S. : Fluorescence of organic natural products : *Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1* : 1985
- [49] YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, Y., KAWANO, M., IIZUKA, M., MATSUMOTO, T., SAEKI, S., YAMAGUCHI, H. : In vitro digestibility and fermentability of levan and hypocholesterolemic effects in rats. : *J. Natur. Biochem.* **10**: 13-18 : 1999

C V R R I C V L V M V I T Æ

Michael Büring

Albertstraße 17
30451 Hannover
michael.buring[at]gmx.de

Persönliche Daten

geboren am: 08. März 1974 in Meppen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Eltern

Vater * 29.04.1937
Haupt- und Realschullehrer i.R.
Mutter * 07.07.1939 † 09.12.1994
Grundschullehrerin

Studium

22.05.2009 Promotion
07/2005 – 05/2009 Promotionsstudium im Bereich Biotechnologie des
Instituts für Technische Chemie der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
25.10.2004 Diplom
07/1998 – 10/2004 Hauptstudium Chemie, Universität Hannover
26.06.1998 Vordiplom
10/1994 06/1998 Grundstudium Chemie, Universität Hannover

Wehrdienst

1993-1994 3. / Transportbataillon 120, 49744 Werlte

Schulabschluss

17.05.1993 Abitur

Schulbildung

1984 - 1993 Gymnasium Marianum Meppen
1980 - 1984 Grundschule Overbergschule Meppen

Fachlicher Schwerpunkt

Biotechnologie / Kultivierung von humanen Zelllinien
zum Pharmaka-Screening und von Mikroorganismen

Danksagung

Da ist er nun, der Zeitpunkt für den schönsten Abschnitt dieser Arbeit. Und so sitze ich vor dem Monitor wie in den vergangenen Monaten und darf den wichtigsten Seitenaspekt des vergangenen Lebensabschnitts zusammenfassen. Wie schön ist es, wenn man danken kann. Noch schöner, wenn man den Raum dazu frei wählen darf.

Allen Personen voran – und dies beileibe nicht nur aus formalen Gründen – geht mein Dank an meinen und unseren Doktorvater Prof. Dr. Scheper. Lieber Thomas, ich bin glücklich, ein Teil Deines Arbeitskreises gewesen sein zu dürfen, in dem Du es geschafft hast, die Formeln der Arbeit mit dem Siegel der Mitmenschlichkeit zu versehen. Ich freue mich, diese Kultur sowohl erlebt als auch gelebt haben zu dürfen. Diese Prägung werde ich mir bewahren.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann und Prof. Dr. Karl Friehs danke ich für die Übernahme der Korreferenz. Ich hoffe, dass sich noch viele nach mir von Eurer Kompetenz und Eurer menschlichen Bereitwilligkeit anstecken lassen.

Wie in meiner Diplomarbeit darf ich mich bei Dr. Beutel für die freundliche, offene und persönlich entgegenkommende Art der Betreuung bedanken. Sascha, ich möchte hiermit sicherstellen, dass Du Dir bewusst bist, wie sehr ich es schätze, dass Du mir unausgesprochen immer Dein Vertrauen in meine Tätigkeit am Institut geschenkt hast. Das war genau richtig für mich. Vielen Dank!

Ruhm und Ehre in großem Maße gebührt erneut dem Arbeitskreis Scheper, besonders all den Menschen, die mich in meinen Jahren begleitet haben. In diesem Bündnis konnte Arbeit wahrhaftig gelebt werden. Auch wenn ich nicht jede/n Einzelne/n hier konkret erwähne, so möchte ich Euch allen an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen. Das was unser Chef ideell und finanziell gefördert hat, konnte sowohl substanzuell als auch gesellschaftlich mit Euch umgesetzt werden. Die Chance, zum allgemeinen „Teamspirit“ einen Beitrag zu leisten hat hier jede/r nutzen können.

Meinem Vorgänger Olli danke ich für das reiche Erbe, welches er mir hinterlassen hat. Meinen Mitstreiter/innen aus den Zeiten des Studiums Fabienne, Yvonne und meinem Doktorbruder Michi danke ich für die freundschaftliche Begleitung und die Möglichkeit der „Reintegration“ in studentische Kreise. Kathrin danke ich für die engagierte Mitorganisation der Seitenveranstaltungen. In diesem Zuge danke ich insbesondere Pierre und Iliyana für das Leben dieser Veranstaltungen. Ein nicht minderer Dank gilt unserem „Sommelier“ Arne für den verantwortungsvollen Umgang mit seinem Posten und dafür, fast nie den Überblick verloren zu haben.

Ein gesammelter Dank geht an die Technikums-Crew Basti, Jinu, Garima, Christian B., Christian E. und selbstverständlich meinen Ex-Diplomanden und Nachfolger Ismet. Es freut mich, dass Euch der Raum nie zu klein war. In diesem Zuge danke ich

den Kollegen in meiner zweiten Heimat Wilhelm, Thorsten, Fiddi, Charlotte, Koray und Kilian. Irgendwie seid Ihr auch Familie für mich geworden.

Arbeitskreis-übergreifend bedanke ich mich bei Patrick für die Unterstützung im Hinblick auf sämtliche Verweilzeiten innerhalb und außerhalb der Area 53. Ein weiterer Dank gilt Dörthe für die tatkräftige Hilfe auf der Suche nach Nemo.

Zudem bedanke ich mich an dieser Stelle bei meinen Praktikanten Christian L., Sybille P., Thomas K., Vivien L., Alex B., Nina B., Karina O. und Sanketha K., meinem „Schweri“ Mehmet und Andi, dem Bachelor©. Ich hoffe, dass Ihr auch das Gefühl habt, dass wir das heutzutage so beliebte Prinzip der win-win-Situation auf den TCI-Boden bringen konnten.

Im privaten Bereich möchte ich mich einleitend bei den Kolleginnen und Kollegen vom APHD bedanken. Es war und ist eine Bereicherung für mich, auf welche Art und Weise Ihr mein Leben in vielerlei Hinsicht mitgetragen habt. In diesem Sinne danke ich auch der XJWG, welche für mich immer noch in der Tatort-Runde existiert.

Ein inniger Dank geht an Daleth für die vielen vitriolischen Gespräche und die Erlaubnis, zwischenmenschliche S1-Ebenen zu erleben. Für die vielen inspirierenden und verbindenden Momente im Freundeskreis danke ich vor allem Ulrike, Andrea und Harald. Auf meinem eigenen Weg zum Freundschaftsbegriff konntet Ihr wahre Brücken bauen – und dies nicht nur „auf Balkonien“.

Unter dem Aspekt der Freundschaft danke ich vor allem Olli. Du kennst mich und meine Anliegen und gerade in der letzten Zeit hast Du mich stärker unterstützt, als ich es zu hoffen gewagt hatte. Vielen Dank für das Refugium!

Bevor ich hier zu einem Ende komme, danke ich Marta für die liebevolle, warme und harmonische Begleitung in den letzten Jahren. Du hast mir den Rücken gestärkt und meine Seele beschützt. Ich hoffe unter anderem, dass Du bald erkennen kannst, wie Du die Sonnenseite der römischen Zwei leben kannst. Denn das bist Du.

Abschließend danke ich dem Heer der Menschen, welche „nur noch“ in meinem Kopf und meinem Herzen existieren können. Ich hoffe, dass Ihr mich weiterhin begleitet, denn Ihr seid eine wirkliche Kraftquelle für mich. Zuletzt danke ich der schwer ermüdlichen Vermittlerin Hilke und meinem Vater für die langjährige Unterstützung, den weltanschaulichen Unterbau und die Erlaubnis, diesen immer mehr nach meinen eigenen Wünschen gestalten zu dürfen. Ich bin stolz auf uns.

Grün ist [immer noch] des Lebens goldener Baum.