Forschungszentrum Jülich

Institut für Biotechnologie

Reaktionstechnische Untersuchungen zur extrazellulären Produktion humaner Calcitonin-Precursor mit Staphylococcus carnosus

Susanne Dilsen

Jül-3765

Reaktionstechnische Untersuchungen zur extrazellulären Produktion humaner Calcitonin-Precursor mit Staphylococcus carnosus

Susanne Dilsen

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3765
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3765
D82 (Diss. RWTH Aachen, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Reaction engineering studies for the production of extracellular human calcitonin-precursors with *Staphylococcus carnosus*

Abstract

This study presents the development of a fedbatch process for the production of secreted heterologous proteins using the Gram-positive bacterium *Staphylococcus carnosus* up to a semi-technical scale. The model protein was human calcitonin which was expressed and secreted by *S. carnosus* as a fusion protein consisting of a propeptide from a lipase of *Staphylococcus hyicus* and a calcitonin dimer. Based on investigations on the influences of different carbon-, nitrogen- and energy-sources on growth and product formation a process applying yeast extract limiting conditions (closed-loop substrate control) was established using the pH as a supporting value. Means of this process 2 g l^{-1} of the fusion protein were produced in a semi-technical scale (150 l) comprising a space-time-yield of 142 mg l^{-1} h^{-1}. The yeast extract specific protein-yield amounted to 40 mg g^{-1} for a technical yeast extract.

Zusammenfassung:

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Fedbatch Verfahrens für die Produktion heterologer sekretorischer Proteine mit dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus carnosus* bis in den halbtechnischen Maßstab. Modellprotein war humanes Calcitonin, das von *S. carnosus* als Fusionsprotein aus einem Propeptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* und einem Calcitonin-Dimer exprimiert und sekretiert wurde. Basierend auf Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen auf Wachstum und Produktbildung wurde ein Verfahren für hefeextraktlimitierende Bedingungen im geschlossenen Regelkreis mit dem pH-Wert als Regelgröße (´pH-Auxostat´) etabliert. Dabei wurden im halbtechnischen Maßstab (150 l) 2 g l^{-1} des Fusionsproteins mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 142 mg l^{-1} h^{-1} produziert. Die hefeextraktspezifische Proteinausbeute betrug für einen technischen Extrakt 40 mg g^{-1}.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Problemstellung und Zielsetzung 3

3 Theoretische Grundlagen 7

3.1 Biologische Grundlagen 7
3.1.1 Calcitonin 7
3.1.2 *Staphylococcus carnosus* 12

3.2 Verfahrenstechnische Grundlagen 21
3.2.1 Prozeßführung 21
3.2.2 Prozeßleittechnik 24
3.2.3 Ermittlung von Zustandsgrößen 26

4 Material und Methoden 31

4.1 Chemikalien 31

4.2 Stämme und Stammhaltung 31

4.3 Medien 32
4.3.1 Chloramphenicol 32
4.3.2 Xylose 33
4.3.3 LB-Medium 33
4.3.4 Synthetische Medien 33
4.3.5 Medium für die Parameterstudie 34
4.3.6 Medien zur Untersuchung der phänotypischen Stabilität 35
4.3.7 Medien mit Hefeextrakt als Hauptmedienbestandteil 35
4.3.8 Medien mit Hefeextrakt als Cosubstrat 35
4.3.9 Fedbatch Medium 36
4.3.10 Ultrafiltrationsfraktionen 36
4.3.11 pH-Korrekturmittel 36
4.3.12 Antischaum 37

4.4 Schüttelkolbenkultivierung 37

4.5 Fermentationen in parallelen Kleinstreaktionsgefäßen 37
4.5.1 Anlage zum Betrieb von 16 parallelen Blasensäulenreaktoren 38
4.5.2 Anlage zum Betrieb von sechs parallelen Blasensäulenreaktoren 39

4.6 Fermentationen im Laborfermenter 42

4.7 Fedbatch Verfahren im 150 l Maßstab 43

4.8 *On-line* Analytik und Datenerfassung 45
4.8.1 pH-Wert 45
4.8.2 Sauerstoffpartialdruck 45
4.8.3 CO_2 und O_2 im Abgas 45
4.8.4 Datenerfassung 45

4.9 Produktanalytik ... 46
4.9.1 Gesamtproteinbestimmungen ... 46
4.9.2 Spaltung der Fusionsproteine ... 46
4.9.3 SDS-Gelelektrophorese ... 48
4.9.4 Coomassie-Färbung ... 49
4.9.5 Western-Blot ... 49
4.9.6 ELISA ... 50

4.10 *Off-line* Analytik ... 51
4.10.1 Optische Dichte und Biotrockenmassekonzentration ... 52
4.10.2 Proteinfällung ... 52
4.10.3 Ammoniumkonzentration ... 52
4.10.4 Extrazelluläre Nebenprodukte ... 52
4.10.5 Freie Aminosäuren ... 53
4.10.6 Glycerinkonzentration ... 53
4.10.7 Elementanalyse ... 54

4.11 Kostenabschätzung ... 54

5 Ergebnisse 55

5.1 Quantifizierung der Fusionsproteine ... 55
5.1.1 Clostripain-Verdau ... 55
5.1.2 Quantifizierung der Fusionsproteine ... 57

5.2 Charakterisierung der produzierenden Stämme ... 61
5.2.1 Promotorauswahl ... 61
5.2.2 Einfluß der Anzahl an Calcitonin-Repeats auf die Sekretion ... 63

5.3 Phänotypische Stabilität ... 64

5.4 Synthetische Medien und Kohlenstoffquellen ... 66

5.5 Komplexmedien als Hauptmedienbestandteil ... 70
5.5.1 Auswahl eines geeigneten Komplexmediums ... 70
5.5.2 Parameterstudie für die Produktion des Fusionsproteins ... 73
5.5.3 Einfluß der Hefeextraktmenge ... 74

5.6 Hefeextrakt als Cosubstrat ... 76
5.6.1 Glycerin als Kohlenstoffquelle ... 76
5.6.2 Makro- und Mikroelemente ... 80
5.6.3 Der eingesetzte Hefeextrakt ... 83
5.6.4 Hefeextraktlimitierte Fedbatch Fermentationen ... 84
5.6.5 Vergleich zwischen Batch und Fedbatch Fermentationen ... 87

5.7 Übertragung des Fedbatch Verfahrens in den 150 l Maßstab ... 88

6 Diskussion 93

6.1 Verfahrenstechnische Methoden 93

6.2 Der Xylose-Promotor 100

6.3 Metabolismus von *S. carnosus* 104
6.3.1 Abschätzung der Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse 104
6.3.2 Rolle der Spurenelemente 109
6.3.3 Katabolismus und Anabolismus 110

6.4 Das Expressionssystem *S. carnosus* 113
6.4.1 *S. carnosus* als Expressionssystem für Calcitonin 113
6.4.2 *S. carnosus* als alternatives Expressionssystem 115

7 Zusammenfassung 121

8 Ausblick 123

9 Literatur 125

10 Anhang 131

10.1 Abkürzungen 131

10.2 Symbolverzeichnis 132

10.3 Medizinische Fachausdrücke und Krankheitsbilder 133

10.4 Element- und Aminosäurezusammensetzung des Hefeextraktes 134

10.5 Elementzusammensetzung der Biomasse 135

10.6 Berechnung der Bilanzen für die Elemente Kohlenstoff und Stickstoff 136

10.7 Monte Carlo Simulation 139
10.7.1 Theorie der Monte Carlo Simulation 139
10.7.2 Monte Carlo Simulation in Matlab 141

1 Einleitung

Die Biotechnologie ist ein Arbeitsgebiet, auf dem der Mensch schon mindestens fünf- bis sechstausend Jahre tätig ist. Zunächst wurden die Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen zur Produktion von Nahrungsmitteln wie Bier, Wein, Essig, Joghurt und Käse genutzt. Anfang des 20. Jahrhunderts begann die gezielte Produktion von Metaboliten (z.B. Citronensäure) und Enzymen. Mit der Entdeckung und großtechnischen Herstellung von Penicillin gelang um 1940 auch der Durchbruch der Biotechnologie bei der Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die biotechnische Herstellung von Pharmazeutika wurde vorangetrieben, Beispiele sind Steroid-Umwandlungen oder Impfstoffherstellungen mit tierischen Zellkulturen. Durch die Nutzung von Hybridoma-Zellinien gelang dabei 1975 die Produktion von monoklonalen Antikörpern, die vor allem in der Diagnostik zum Einsatz kommen. Die Nutzung bakterieller Systeme zur Produktion von humanen Proteinen wurde erschlossen, als 1982 erstmalig humanes Insulin mit rekombinanten *Escherichia coli* produziert wurde. Diese Anwendung der Gentechnik ermöglichte nun, eine Vielzahl von pharmazeutischen Proteinen (z.B. Faktor VIII, menschliches Wachstumshormon, Interferone etc.) mit rekombinanten Mikroorganismen herzustellen (Chmiel 1991, Crueger et al. 1989).

Im Laufe der letzten Jahre wurde das Spektrum der Mikroorganismen, die durch genetische Veränderungen in der Lage sind, heterologe Proteine zu exprimieren, ständig erweitert. Die Entwicklung wurde mit verschiedenen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha* aber auch mit Bakterien vorangetrieben. Hier werden Organismen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oder *Streptomyces*-Arten eingesetzt. Ein weiteres Beispiel für ein bakterielles System ist *Staphylococcus carnosus*. Dieses sekretiert heterologe Proteine in das Kulturmedium. So kann das Produkt einfach gewonnen und aufgearbeitet werden. Weiterhin sind die Proteine außerhalb der Zelle sehr stabil, da *S. carnosus* keine Exoproteasen bildet (Pschorr et al. 1994). Da es als Starterkultur in der Wurstherstellung dient, kann es als unbedenklich klassifiziert werden (Schleifer et al. 1982) und ist deshalb prädestiniert für die biotechnologische Produktion eines Pharmazeutikums.

Die Entwicklung eines mikrobiellen Produktionsverfahren erfolgt heutzutage meist sequentiell. Zunächst wird der Produktionsstamm mit molekular- und mikrobiologischen Methoden hergestellt und optimiert, anschließend werden die Reaktionsbedingungen optimiert und das Verfahren in den Technikumsmaßstab übertragen. Abschließend wird ein Verfahren zur Produktreinigung entwickelt. Dadurch ergeben sich für den Gesamtprozeß lange Entwicklungszeiten und oftmals nicht-optimale Produktionsprozesse. Durch die integrierte Entwicklung von Produktionsstamm und Produktionsverfahren kann zum einen die Entwicklungszeit deutlich verkürzt werden, zum anderen können durch die zeitliche Parallelisierung die Schnittstellen der drei Entwicklungsstufen gefüllt werden. Dies ermöglicht eine effektivere Entwicklung von Fermentationsprozessen[1].

Die Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens „Integrierte Prozeßentwicklung zur Produktion heterologer sekretorischer Proteine mit *S. carnosus*" angefertigt. Ziel ist die effektive Entwicklung eines Produktionsprozesses durch Integration der drei Teilbereiche der Verfahrensentwicklung. Modellprotein ist das humane Calcitonin. Dieses Peptidhormon gewinnt zunehmend an Bedeutung als Therapeutikum bei einer Reihe von Knochendeformationen und wird zur Zeit großtechnisch in einer Festphasensynthese nach Merrifield (Merrifield 1985) hergestellt. Die synthetische Produktion ist sehr zeit- und kostenintensiv (Gigova et al. 1989). Bei einem weltweiten Jahresbedarf von etwa 30 kg und einem derzeitigen Preis von 580 DM mg^{-1} Calcitonin (Sigma) könnte die biotechnologische Herstellung von humanem Calcitonin eine kostengünstige Alternative zu den bisherigen Produktionsverfahren darstellen.

[1] Der Ausdruck Fermentation bezeichnet im eigentlichen Sinn das mikrobielle Wachstum unter strikt anaeroben Bedingungen. Heutzutage wird er allerdings auch häufig, wie auch in der vorliegenden Arbeit, als Begriff für aerobe mikrobielle Umsetzungen verwendet.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus carnosus* (DSMZ 20501) wird in den letzten Jahren immer häufiger in molekularbiologischen Untersuchungen für die Expression heterologer Proteine eingesetzt. Die reaktionstechnischen Untersuchungen zur sekretorischen Gewinnung von Proteinen mit *S. carnosus* beschränken sich bisher auf die Herstellung einer rekombinanten Lipase. Dabei wurden Wachstum und Produktbildung in verschiedenen Reaktorsystemen, wie Rührkessel- (Falk et al. 1991), Blasensäulen- (Voit et al. 1991), und Zentrifugalfeld-Reaktoren (Voit et al. 1989) in Batch und Fedbatch Verfahren untersucht. Die reaktionstechnischen Arbeiten beschränken sich auf die phänomenologische Beschreibung von Wachstum und Produktbildung. Einflüsse durch Substratlimitierungen oder Inhibierungen durch toxische Metabolite oder einen Überschuß an Substraten wurden nicht ausreichend charakterisiert. Dabei wurden Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 8 g l^{-1} erreicht und bis zu 20 mg l^{-1} der rekombinanten Lipase produziert. Mit einem speziellen Dialyse-Reaktor mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 l konnte gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, auch mit diesem Organismus hohe Biotrockenmasse- (60 g l^{-1}) und Produktkonzentrationen (230 mg l^{-1}) zu erreichen (Lechner et al. 1988, Märkl et al. 1990). Das Problem dieses verfahrenstechnischen Ansatzes liegt darin, daß aufgrund der Reaktorkonstruktion[2] das entwickelte Verfahren nur sehr bedingt in den technischen Maßstab übertragbar ist.

In der Literatur sind sehr wenige Untersuchungen zum Metabolismus von *S. carnosus* beschrieben. Sie wurden im Reaktorsystem Schüttelkolben unter nicht-geregelten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden vor allem in Abhängigkeit von der eingesetzten Kohlenstoff- und/oder Energiequelle sehr unterschiedliche Verläufe für den pH-Wert beobachtet (Arkoudelos et al. 1995). Schon bei geringen Biotrockenmassekonzentrationen von < 1 g l^{-1} werden inhibierende pH-Werte (pH < 5 bzw. pH > 8) erreicht. Das Problem dieser Untersuchungen liegt darin, daß extreme

[2] Der Reaktor besteht aus zwei Reaktionsräumen, die durch eine einschichtige Dialysemembran voneinander getrennt sind. Die Membran erlaubt den Austausch niedermolekularer Substanzen zwischen beiden Reaktionsräumen. Bei der geometrisch ähnlichen Maßstabsübertragung ändert sich das Verhältnis der Membranfläche zum Volumen. Außerdem ist die Membran aufgrund ihrer Beschaffenheit thermisch und mechanisch nur bedingt belastbar.

Änderungen der Wasserstoffionenkonzentrationen das Wachstum und damit wahrscheinlich auch die Produktbildung stark beeinflussen.

Alle von *S. carnosus* sekretierten heterologen Proteine liegen extrazellulär als Fusionsproteine aus einem Propeptid und dem Zielprotein im Überstand vor. Das Propeptid ist essentiell für den effizienten Transport durch den Zellwandbereich und bedingt die Stabilität des Produktes gegenüber zellwandassoziierten Proteasen (Demleitner et al. 1994, Meens et al. 1997). Vor allem für Zielproteine, die keine enzymatische Aktivität aufweisen und sich deshalb meist nicht mit photometrischen Methoden quantifizieren lassen, ergeben sich Probleme bei der Analytik. Methoden für die Quantifizierung des Zielproteins sind nicht direkt auf das Fusionsprotein übertragbar. Außerdem können die Fusionsproteine als Standard für die Analytik nicht kommerziell bezogen werden.

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich dadurch folgende **Ziele** und Aufgabenstellungen:

- **Quantifizierung der Fusionsproteine**

Das Zielprotein der vorliegenden Arbeit ist humanes Calcitonin (hCT). Dieses wird von *S. carnosus* als Fusionsprotein aus dem Propeptid und verschiedener hCT-Repeats produziert. Für diese Fusionsproteine soll eine Methode für die quantitative Messung entwickelt werden. Dabei sollen zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze verfolgt werden: Zum einen sollen verschiedene Methoden für die Messung des kompletten Fusionsproteins untersucht werden. Da andererseits ein Protokoll für die Quantifizierung des Zielproteins zur Verfügung steht, soll untersucht werden, ob in den Fermentationsüberständen eine quantitative Spaltung der Fusionsproteine möglich ist.

- **Auswahl eines geeigneten Reaktorsystems**

Aufgrund extremer Änderungen des pH-Wertes beim Wachstum von *S. carnosus* soll ein geeignetes Reaktorsystem ausgewählt werden, das die reaktionstechnische Charakterisierung der Stämme unter pH-geregelten Bedingungen erlaubt.

- **Auswahl eines geeigneten Produktionsstammes**

In enger Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen (Stammentwicklung und Aufarbeitung) soll ein geeigneter Produktionsstamm ausgewählt und auf Proteinebene hinsichtlich seiner Stabilität charakterisiert werden. Als Bewertungsgröße soll die biomassespezifische Produktselektivität $Y_{P/X}$ (gebildetes Produkt pro gebildete Zellmenge) im Vordergrund stehen.

- **Identifizierung geeigneter Reaktionsbedingungen**

Mit dem ausgewählten Reaktorsystem sollen geeignete Reaktionsbedingungen in Bezug auf pH-Wert, Temperatur, Osmolalität, Begasungsrate und Sauerstoffpartialdruck für den Wildtyp und den hCT-produzierenden Stamm identifiziert werden. Für den Wildtyp sollen die substratspezifische Biomasseausbeute $A_{X/S}$ (gebildete Zellmenge pro eingesetztes Substrat) und die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} als Bewertungsgrößen der reaktionstechnischen Untersuchungen betrachtet werden. Die Reaktionsbedingungen des Produktionsstammes sollen hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute RZA (volumenbezogene gebildete Produktmenge pro Zeit) bewertet werden.

- **Identifizierung von Limitierungen und/oder Inhibierungen**

Die Einflüsse verschiedener Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen und deren Konzentrationen auf Wachstum und Produktbildung sollen im Hinblick auf die substratspezifischen Produktausbeuten $A_{P/S}$ (gebildetes Produkt pro eingesetztes Substrat) reaktionstechnisch untersucht werden.

- **Verfahrensentwicklung im Labormaßstab (3 l)**

Auf der Basis der identifizierten Reaktionsbedingungen soll im Labormaßstab ein Verfahren für die Produktion heterologer sekretorischer Proteine mit *S. carnosus* im Rührkesselreaktor entwickelt werden. Zielgrößen sind die Maximierung der substratspezifischen Produktausbeute $A_{P/S}$ und die Minimierung an Nebenprodukten.

- **Übertragung in den halbtechnischen Maßstab (150 l)**

Die Übertragbarkeit des entwickelten Verfahrens zur Herstellung heterologer sekretorischer Proteine mit *S. carnosus* in den halbtechnischen Maßstab soll untersucht werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 Calcitonin[3]

Calcitonin im Stoffwechsel

Calcitonin spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Calciumhaushaltes im Körper. Calciumphosphat ist der wichtigste Baustein der Knochen und Zähne. Die Konzentration von Calciumionen ist für viele Lebensprozesse von sehr großer Bedeutung. Sie beträgt beim Menschen extrazellulär etwa 1,3 mmol l^{-1}, intrazellulär liegt sie hingegen bei etwa 0,1 µmol l^{-1} (Deetjen et al. 1992, Schmidt et al. 1985). Da schon geringe Änderungen der Calciumionenkonzentration große Signalwirkungen zeigen, ist eine schnelle und präzise Regelung des Calcium- und Phosphathaushaltes im Blut wichtig (Schmidt et al. 1985). Dabei regeln hauptsächlich drei Hormone die Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Blut (König 1993):

- Parathyrin,
- Calcitonin,
- Calcitriol (Vitamin D_3-Hormon).

Calcitriol ist ein Steroidhormon, das sich über verschiedene Reaktionsschritte von Vitamin D_3 herleitet und dessen aktive Form in der Niere durch Parathyrin stimuliert wird. Biologisch wirksam ist das Hormon durch eine verstärkte Calcium- und Phosphatresorption in Darm und Niere. Es begünstigt langfristig eine Mineralisation des Knochens.

Parathyrin und Calcitonin sind hingegen Peptidhormone (Harris 1971). **Parathyrin**, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, wird bei sinkender Plasmacalciumkonzentration (Hypocalcämie) von Zellen der Nebenschilddrüse ins Blut sekretiert. Parathyrin bewirkt eine Steigerung der Calciumresorption bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphatresorption in der Niere. Dies führt zu einer schnellen Steigerung der

[3] Nähere Erläuterungen zu den in diesem Kapitel verwendeten medizinischen Fachausdrücken und Krankheitsbildern sind im Anhang beschrieben.

Plasmacalciumkonzentration. Durch Stimulierung der Osteoclasten wird die Demineralisierung des Knochens gefördert.

Das dritte Hormon ist das **Calcitonin**. Es wird in den C-Zellen der Schilddrüse, den sogenannten parafollikulären Zellen, gebildet. Das Calcitonin ist ein Peptid aus 32 Aminosäuren (M = 3,7 kD). Wichtige Bestandteile für die biologische Aktivität sind eine Ringstruktur am N-Terminus (Position 1 und 7) über eine Disulfidbrücke, eine α-helicale Struktur im mittleren Bereich und die carboxyterminale Amidierung der Aminosäure Prolin (Berne et al. 1993, König 1993). Letzteres hat auf die biologische Wirkung einen bedeutenden Einfluß. Ein Verlust oder Ersetzen dieser Aminosäure läßt die Aktivität unter 1 % sinken. Calcitonin aus verschiedenen Organismen (zum Beispiel Fische, niedere Vertebraten oder Säugetiere) zeigt im Menschen Aktivität. Allerdings unterscheidet sich die Wirkung in erheblichem Maße. Beispielsweise hat Calcitonin aus dem Lachs (sCT) eine 10-30 mal stärkere Wirkung als das Calcitonin der Säugetiere. Dies liegt in den stark differierenden Primärstrukturen begründet (Abbildung 3.1) (Kleeman et al. 1997, König 1993).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
hCT	C	G	N	L	S	T	C	M	L	G	T	Y	T	Q	D	F	N	K	F	H	T	F	P	Q	T	A	I	G	V	G	A	P[a]
sCT 1	C	**S**	N	L	S	T	C	**V**	L	G	**K**	**L**	**S**	Q	**E**	**L**	**H**	K	**L**	**Q**	T	**Y**	P	**R**	T	**N**	**T**	G	**S**	G	**T**	P[a]
sCT 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**D**	-	-	-	-	-	-	**F**	-	-	-	-	-	-	**A**	-	**V**	-
sCT 3	-	-	-	-	-	-	-	**M**	-	-	-	-	-	-	**D**	-	-	-	-	-	-	**F**	-	-	-	-	-	-	**A**	-	**V**	-

Abbildung 3.1: Primärstruktur von humanem Calcitonin (hCT) und sCT mit unterschiedlichen Primärstrukturen für sCT (Berne et al. 1993).

Unter physiologischen Bedingungen wirkt Calcitonin vielfach als Antagonist des Parathyrins. Calcitonin wird bei einem Anstieg der Plasmacalciumkonzentration ins Blut sekretiert (Hypercalcämie). Seine biologischen Wirkungen zeigen sich in der Hemmung der enteralen und renalen Resorption von Calcium und der Steigerung der Phosphatausscheidung in der Niere.

Besondere Bedeutung hat Calcitonin bei der Mineralisierung des Knochens. Es reduziert einerseits durch die Hemmung der Osteoclasten die Freisetzung von Calcium- und Phosphationen aus dem Knochen. Andererseits fördert es den Einbau von Calcium und Phosphat in den Knochen durch Stimulierung der Umwandlung von Osteoclasten in Osteoblasten (Silbernagel et al. 1991, König 1993). Der rasche Einbau der mit der

Nahrung aufgenommenen Calciumionen in den Knochen verhindert einen Calciumanstieg im Blut. Calcitonin hat somit eine calciumkonservierende Wirkung (Abbildung 3.2).

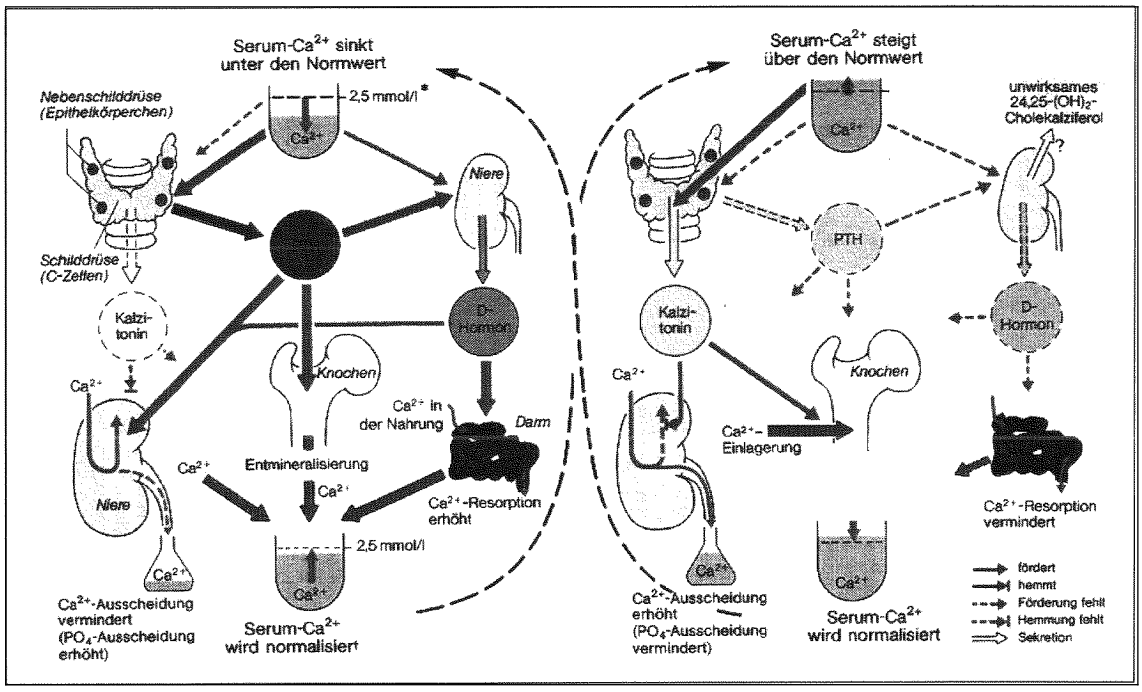

Abbildung 3.2: Regelung des Calcium- und Phosphathaushaltes beim Menschen (Silbernagel et al. 1991).

Calcitonin als Therapeutikum

Calcitonin findet als Pharmazeutikum vielfach Anwendung. SCT (Calcitonin L, Calcitonin-Sandoz), Calcitonin aus dem Schwein (pCT, Calcitonin S) und humanes Calcitonin (hCT, Cibacalcin) werden bei unterschiedlichen Knochenerkrankungen eingesetzt, beispielsweise bei Morbus Paget, akuter Behandlung von Hypercalcämie, Hyperparathyroidismus, Osteoporose, Sudeck-Syndrom und akuter Pankreatitis (Kleeman et al. 1997), weiterhin bei Osteolyse und chronischer Polyarthritis (König 1993).

Weiterhin findet Calcitonin als zentral angreifendes Analgetikum (Schmerzmittel) zunehmend Anwendung (Kleeman et al. 1997), zum Beispiel bei Schmerzen infolge von Frakturen durch Osteoporose und Tumormetastasen (Silverman 1997). Das

Wirkspektrum scheint sich neben der endokrinen auch auf parakrine und Neurotransmitter-Funktionen zu erstrecken[4].

Neben der intramuskulären Injektion findet Calcitonin in jüngerer Zeit als nasale Applikation (als Nasenspray) eine breitere Anwendung. Einerseits ist diese einfacher zu handhaben, andererseits sind die Nebenwirkungen reduziert. Das Anwendungsspektrum erweitert sich so auf die Prävention von postmenopausaler Osteoporose, Behandlung von glucocorticoid-induzierter Osteoporose und dem Einsatz zur Minimierung des Frakturrisikos (Silverman 1997, Reginster 1993).

Aufgrund der stark differierenden Primärstrukturen ist tierisches Calcitonin im menschlichen Körper ein potentielles Antigen. Beim Langzeiteinsatz von sCT wird bei bis zu 70 % der Patienten eine Immunreaktion beobachtet. Allerdings kann die Antikörperbildung nicht zwangsläufig an eine sinkende Wirksamkeit des sCT gekoppelt werden. Es wurden auch Resistenzen beobachtet, die nicht mit einer Bildung von Antikörpern einher gehen (Azria 1995). Mit dem Einsatz des authentischen hCT tritt diese komplexe Problematik der Resistenz wahrscheinlich seltener auf (Hosking et al. 1979), so können zum Beispiel sCT-resistente Fälle noch behandelt werden (Kleeman et al. 1997).

Herstellung von Calcitonin

Calcitonin wurde erstmalig 1969 synthetisiert (Azria 1995). Die vollständige Peptidsynthese ist jedoch auch nach Entwicklung der Festphasen-Peptidsynthese nach MERRIFIELD (Bayer 1991, Merrifield 1985) sehr aufwendig und kostenintensiv (Gigova et al. 1989). Eine Extraktion und Reinigung kann nur aus tierischen Zellen erfolgen. Mit den Möglichkeiten der Gentechnik zur Darstellung rekombinanter Proteine könnte humanes Calcitonin kostengünstiger produziert werden.

[4] Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Mögliche Erklärungsansätze beinhalten einen steigenden β–Endorphin-Kreislauf, eine Hemmung der Prostaglandin E2-Synthese, einen Eingriff in den Calciumflux, das Cholin- oder Serotonin-System oder einen Effekt als Neuromodulator (Silverman 1997).

Rekombinantes Calcitonin

Die rekombinante Herstellung von Calcitonin ist mit verschiedenen Expressionssystemen beschrieben. Aufgrund des carboxyterminal amidierten Prolins müssen dabei zwei Varianten unterschieden werden:

- biologisch aktives Calcitonin,
- Vorstufen (Precursor), die *in vitro* aktiviert werden.

Biologisch aktives rekombinantes Calcitonin kann nur mit höheren eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Dabei handelt es sich um besondere Zellinien, die eine *in vivo* Amidierung der carboxyterminalen Aminosäure Prolin erlauben. So ist es möglich, in Zellkulturen mit transfizierten Maushypophysenzellen die vollständig aktive, amidierte Form zu produzieren. Dabei werden Produktkonzentrationen von 20-30 $\mu g\ l^{-1}$ hCT erreicht (Merli et al. 1996).

Die beiden weiterhin untersuchten Expressionssysteme produzieren Calcitoninprecursor. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß die Organismen genetisch, physiologisch und reaktionstechnisch gut charakterisiert sind und bereits industriell für die Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden:

- *Escherichia coli,*
- *Saccharomyces cerevisiae.*

Mit *Saccharomyces cerevisiae* werden durch Fusion an den Hefe prepro-α-Faktor extrazellulär bis zu 20 $mg\ l^{-1}$ Oligomerprecursor produziert (Mironova et al. 1991).

Für die intrazelluläre Produktion in *E. coli* bietet sich zur Vermeidung eines meist raschen proteolytischen Abbaus des Precursormonomers die Konstruktion verschiedener Multimere (Gigova et al. 1989) oder eines Fusionsproteins bestehend aus dem heterologen Peptid und einem anderen Protein an. Bei den Fusionsproteinen ergeben sich Varianten durch das zusätzliche Protein (β-Galactosidase (Yabuta et al. 1995), humanes γ-Interferon (Alexciev et al. 1989)). Diese Proteine bestimmen außerdem die Lokalisation des Produktes (intrazellulär gelöst oder als

inclusion body, periplasmatisch). Weiterhin wurden verschiedene Schnittstellen in den Fusionsproteinen untersucht (chemisch: Cyanbromid (Kato et al. 1989), enzymatisch: Clostripain (Ishikawa et al. 1996)). Reaktionstechnische Untersuchungen wurden zur Produktion von hCT als inclusion bodies (Yabuta et al. 1995, Ishikawa et al. 1999) durchgeführt. Yabuta et al. (1995) beschreiben ein Fedbatch Verfahren im Rührkesselreaktor. Hier werden 500 mg l^{-1} eines glycinerweiterten hCT-Precursors hergestellt. Die Expression eines hCT-Hexamers im 500 l Maßstab (Ishikawa et al. 1999) resultiert in 420 g des hCT-Hexamers.

Mit *E. coli* kann sCT auch extrazellulär hergestellt werden. Reaktionstechnische Untersuchungen resultierten in einem Fedbatch Verfahren, bei dem in 30-35 h bei einer Biotrockenmassekonzentration von 30-40 g l^{-1} extrazellulär 200 mg l^{-1} eines glycinerweiterten Precursors produziert wurden (Meenan et al. 1997).

3.1.2 *Staphylococcus carnosus*

Gattung *Staphylococcus* (Rosenbach, 1884)

Staphylococcen sind Gram-positive, nicht sporulierende Bakterien, die sphärische (Durchmesser 0,5-1,5 µm), unbewegliche Zellen bilden. Sie liegen einzeln, paarweise, in Tetraden oder größeren Aggregaten vor. Die Zellwand der Staphylococcen besteht aus einem Peptidoglycangerüst und enthält Teichonsäuren. Charakteristisch für das Peptidoglycan sind glycinreiche Interpeptidbrücken (meist Penta- und Hexaglycine). Die Diaminosäure im Peptidoglycan ist das L-Lysin (Kloos et al. 1991).

Staphylococcen sind fakultativ anaerob und chemoorganotroph. Die Energiegewinnung erfolgt durch Reduktions-Oxidations-Reaktionen, und es werden organische Verbindungen als Wasserstoff-Donatoren verwendet. In der Elektronentransportkette sind die Cytochrome a und b vorhanden. Die meisten Staphylococcen sind Katalase-positiv. Neben Zuckern können auch Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden (Kloos et al. 1986).

Einige *Staphylococcus*-Arten sind pathogen gegenüber dem Menschen und/oder Tieren, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* (Eitererreger, Lebensmittelvergiftung durch Enterotoxinbildung).

Staphylococcus carnosus (DSMZ 20501) dient als Starterkultur bei der Wurstherstellung und kann aus Rohwurst isoliert werden (Schleifer et al. 1982). Das natürliche Habitat von *S. carnosus* ist nicht bekannt (Kloos et al. 1986). Rinder- oder Schafblut wird weder hämolysiert und noch koaglutiniert. *S. carnosus* besitzt keinerlei infektiöses Potential gegenüber Mensch oder Tier. Das Bakterium kann deshalb als unbedenklich klassifiziert werden (Schleifer et al. 1982).

Translokationssystem

Bei Prokaryonten erfüllt die Cytoplasmamembran wegen der fehlenden Kompartimentierung wie bei Eukaryonten sehr vielfältige Aufgaben, zum Beispiel Reaktionen des Zellstoffwechsels, ATP-Synthese, Reizaufnahme und -weiterleitung und nicht zuletzt Kontrolle der Stoffaufnahme und -abgabe. Die Sekretion von exkretorischen Proteinen wird durch Proteine vermittelt, die in die Cytoplasmamembran eingelagert oder mit ihr assoziiert sind. Das an der Translokation beteiligte Sekretionssystem zeigt bei den verschiedenen Organismen zwar strukturelle Parallelen, jedoch im einzelnen deutliche Unterschiede. Sehr gut untersucht ist das Sekretionssystem bei Gram-negativen Bakterien, insbesondere das von *E. coli* (Pugsley 1993). Untersuchungen an Gram-positiven Bakterien zeigen Entsprechungen zu dem Proteinexportapparat von *E. coli* (Freudl 1991, Klein et al. 1995, Freudl 1998).

Die Zellwand bei Gram-negativen Bakterien besteht aus einer äußeren Membran, die den periplasmatischen Raum außerhalb der Cytoplasmamembran abschließt. Sie besteht aus einem ein- bis zweischichtigen Mureinnetz mit vielen Proteineinlagerungen. Exportproteine werden im periplasmatischen Raum häufig prozessiert und modifiziert. Heterologe Proteine verbleiben oft im Periplasma, so daß zur Gewinnung dieser Proteine ein Zellaufschluß notwendig ist. Bei Gram-positiven Bakterien hingegen ist die Zellwand im wesentlichen aus einem vielschichtigen Mureinnetz (ca. 40 Schichten) aufgebaut, das relativ wenig Proteine enthält. Substanzen, die über die Zellmembran transportiert werden, können dann meist in das umgebende Medium diffundieren. Dies stellt einen Vorteil dar für rekombinante Proteine, die so nach der Sekretion extrazellulär vorliegen.

Die Synthese sekretorischer Proteine findet an den Ribosomen im Cytoplasma statt. Charakteristisch für Exportproteine ist ein aminoterminales Signalpeptid (positiv geladene n-Region, hydrophobe h-Region und polare c-Region), das für die Bindung an die Membraninnenseite und den Transfer durch die Membran notwendig ist. Im Cytosol assoziiert das Vorläuferprotein mit exportspezifischen Chaperonen (b-SRP). Diese erhalten das neusynthetisierte Protein in einer gestreckten, für den Export stabilen Konformation und führen andererseits das Vorläuferprotein an das Sekretionssystem in der Cytoplasmamembran (FtsY). Der Translokations-Holoenzymkomplex in der Zellmembran besteht aus sieben Proteinen (Abbildung 3.3):

- Sec A ist die energiekoppelnde Komponente („Exportmotor"),
- SecY und SecE bilden wahrscheinlich einen hydrophilen Kanal,
- SecG und SecD/SecF/YajC stimulieren die Proteintranslokation.

Eine zentrale Aufgabe kommt dem SecA-Protein zu, welches funktionelle Wechselwirkungen zwischen dem Signalpeptid, dem b-SRP-Chaperon und integralen Membranbestandteilen des Translokasesystems herstellt. Diese Bindungen aktivieren die SecA-Translokations-ATPase-Aktivität, die hauptsächlich die Energie für die Translokation des Exportproteins bereitstellt (Freudl 1998, Klein et al. 1995).

Während bzw. direkt nach dem Transport durch die Zellmembran wird das Signalpeptid durch eine spezifische Signalpeptidase I (Spase) abgespalten. Weitere Modifikationen nach dem eigentlichen Proteinexport können folgen, zum Beispiel durch Proteine, die eine Funktion bei der Faltung (PrsA) haben. Das sekretierte Protein diffundiert in Gram-positiven Bakterien durch die Zellwand und liegt anschließend im Überstand vor.

Zahlreiche Exoproteine (vor allem Proteasen) bei Gram-positiven Bakterien enthalten zwischen Signalpeptid und reifem Protein eine Propeptidsequenz. Das Propeptid kann einen beschleunigten Transfer bewirken, das Protein vor zellwandassoziierten Proteasen schützen oder als intramolekulares Chaperon an der Faltung des reifen Proteins beteiligt sein (Freudl 1998).

Die genaue Kenntnis der Transportvorgänge des Proteinexportes schafft die Grundlage für eine gezielte Verbesserung von Produktionsstämmen für die heterologe Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien.

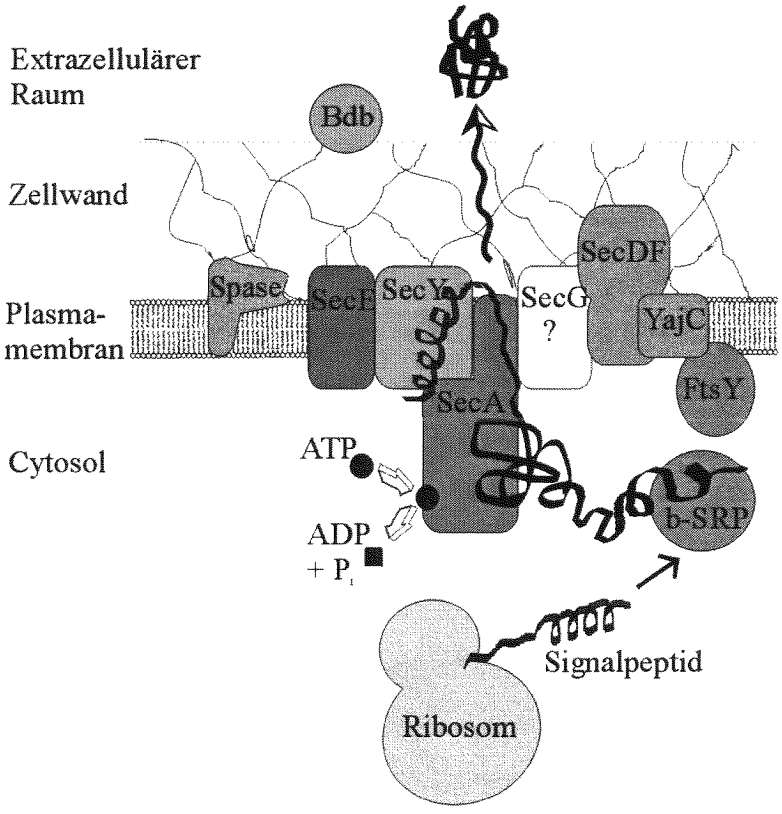

Abbildung 3.3: Proteinexport bei Gram-positiven Bakterien nach Freudl 1998 (Erläuterungen im Text).

S. carnosus als Expressionssystem

Gram-positive Bakterien eignen sich besonders gut zur Herstellung heterologer Proteine, da sie die Zielproteine direkt ins Medium sekretieren. Dies führt zu geringeren Verunreinigungen mit homologen Proteinen und ermöglicht eine einfache Produktgewinnung und Aufarbeitung. Andere Gram-positive Bakterien, vor allem *Bacillus*-Arten, werden bereits großtechnisch zur extrazellulären Produktion von Enzymen eingesetzt (Ferrari et al. 1993). Diese zeigen allerdings den wesentlichen Nachteil, daß sie große Mengen extrazellulärer Proteasen bilden (Wu et al. 1991). Dadurch werden vor allem heterologe Proteine abgebaut. *S. carnosus* besitzt keine Exoproteasen, so daß auch heterologe Proteine im Kulturüberstand stabil bleiben.

Die Expression und Sekretion von heterologen Proteinen mit *S. carnosus* wurde schon für verschiedene Produkte untersucht. Die meisten Untersuchungen wurden mit einer Lipase aus *S. hyicus* durchgeführt. Das Enzym ist als Pre-Pro-Lipase organisiert. Das Prepeptid ist die Signalsequenz und wird während des Transportes über die Zellmembran abgespalten. Bei der rekombinanten Expression mit *S. carnosus* verbleibt das Propeptid an der Lipase, die Enzymaktivität wird allerdings nicht beeinflußt (Wenzig et al. 1990). Es konnte gezeigt werden, daß das Propeptid essentiell für den effizienten Transport durch den Zellwandbereich und die Stabilität gegenüber zellwandassoziierten Proteasen ist (Demleitner et al. 1994, Meens et al. 1997). Aus diesem Grunde wurden alle weiteren heterologen Proteine als Fusionsproteine aus dem Pre-Pro-Anteil der Lipase und dem Zielprotein exprimiert. Neben weiteren Enzymen (α-Amylase, Cellulase (Götz 1990)) konnten mit *S. carnosus* auch humane Proteine exprimiert und sekretiert werden, wie ein REI Antikörperfragment (Pschorr et al. 1995), Fragmente des anti-Lysozym Antikörpers D1.3 (Schnappinger et al. 1995) oder das humane Cardodilatin, ein Arzneimittel gegen Bluthochdruck (Hesch et al. 1987).

Für die Expression rekombinanter Proteine mit *S. carnosus* können unterschiedliche Klonierungsvektoren eingesetzt werden (Meens et al. 1997, Abbildung 3.4). Für die Produktbildung ist dabei der eingesetzte Promotor von entscheidender Bedeutung. Für *S. carnosus* stehen dabei zwei grundsätzlich verschiedene Promotorsysteme zur Verfügung:

- ein konstitutiver Lipase-Promotor aus *Staphylococcus hyicus* (pPS2),
- ein xyloseinduzierbarer Promotor aus *Staphylococcus xylosus* (pXR100).

Bei dem konstitutiven Promotor wird das Produkt wachstumsgekoppelt gebildet (Voit et al. 1989), das heißt, es besteht eine Abhängigkeit zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der spezifischen Produktbildungsrate.

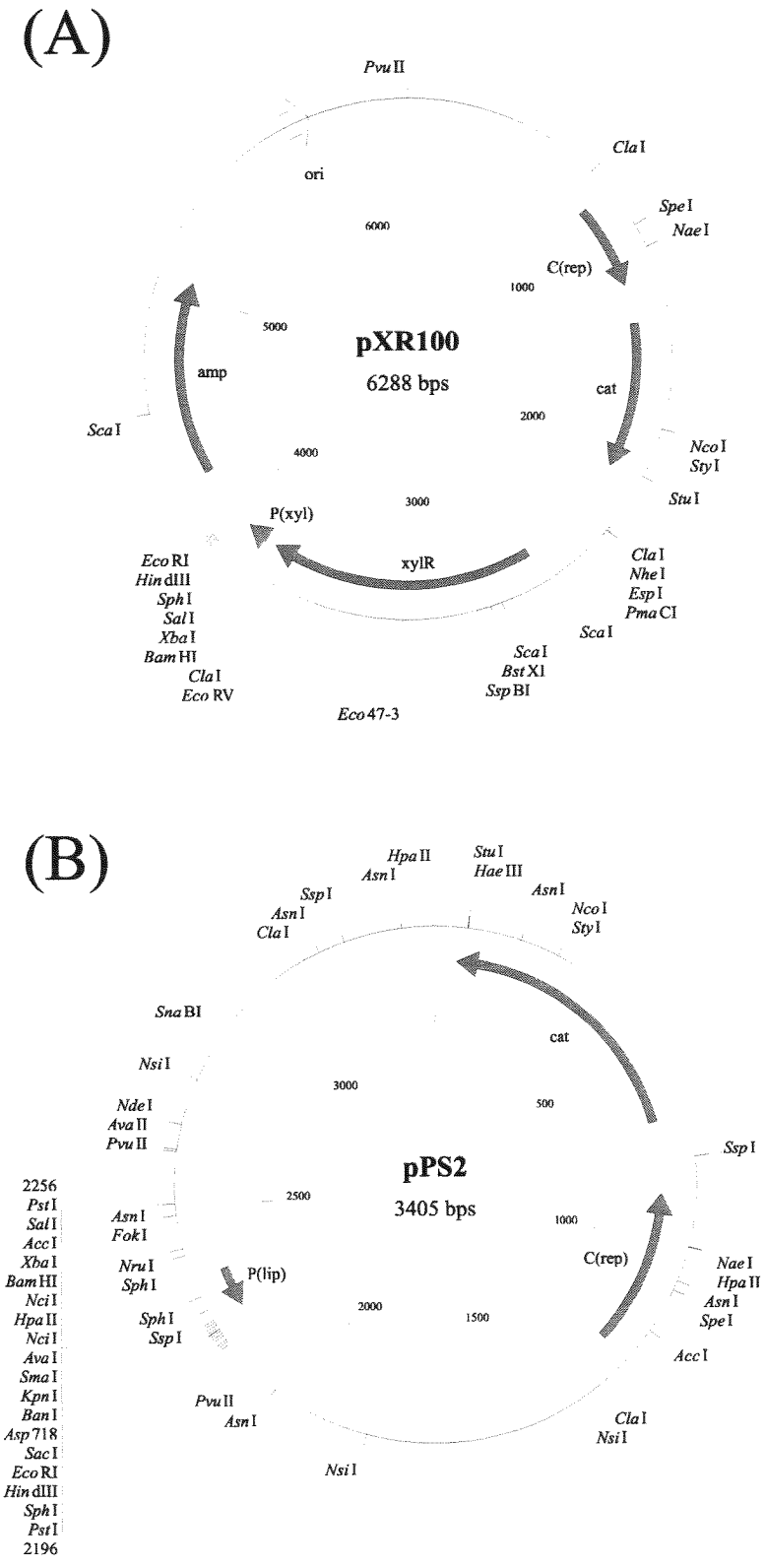

Abbildung 3.4: Klonierungsvektoren für die Produktion rekombinanter Proteine mit *S. carnosus*. pXR100 (A) ein Shuttle-Vektor, bei dem die Expression durch einen xyloseinduzierbaren, glucosereprimierbaren Promotor (PxylA) aus *S. xylosus* kontrolliert wird. pPS2 (B), ein Vektor mit einem konstitutiven Lipase-Promotor aus *S. hyicus*. amp = Ampicillinresistenz für die Klonierung in *E. coli*, C(rep) = Replikationsprotein, cat = Chloramphenicolacetyltransferase (Resistenz in *S. carnosus*), ori = origin of replication, xylR = Xyloserepressor (Meens et al. 1997).

Bei dem xyloseinduzierbaren Promotor (Sizemore et al. 1991, Wieland et al. 1995) erfolgt die Produktbildung erst nach Zusatz eines geeigneten Induktors. Die Expression eines Luciferasesystems unter Kontrolle dieses Promotors zeigt unter induzierten Bedingungen einen linearen Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktbildung (Sizemore et al. 1993). Der Induktor Xylose kann von *S. carnosus* nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Der Promotor wird reprimiert durch Glucose. Die Regulation des Operons erfolgt über eine Repressor/Operator-Bindung für die Induktion (Sizemore et al. 1992) und wahrscheinlich über eine CcpA (catabolite control protein) vermittelte Repression (Egeter et al. 1996).

Beide Vektoren enthalten das Gen, welches für die Chloramphenicolacetyltransferase kodiert (cat). Dieses Enzym bewirkt die Chloramphenicol-Resistenz bei Transformation des Vektors in *S. carnosus*. Durch die Antibiotika-Restistenz wird die Selektion der transformierten Zellen bei der Stammentwicklung erreicht und ein permanenter Selektionsdruck bei der Kultivierung ausgeübt. Der Vektor pXR100 ist ein Shuttle-Vektor. Damit kann er sowohl in *S. carnosus* als auch in *E. coli* genutzt werden.

Reaktionstechnische Untersuchungen mit *S. carnosus*[5]

Reaktionstechnische Arbeiten mit *S. carnosus* beschränken sich auf die Produktion der heterologen Lipase aus *S. hyicus*. Die Expression steht unter der Kontrolle des konstitutiven Lipase-Promotors aus *S. hyicus*. Voit et al. (1989) untersuchten Wachstum und Produktbildung mit einem Komplexmedium aus Pepton und Hefeextrakt in einem Zentrifugalfeldreaktor. Dabei wurde eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} von $\mu_{max} = 0{,}6\ h^{-1}$ und eine substratspezifische Biotrockenmasseausbeute $A_{X/S}$ von $A_{X/S} = 0{,}34\ g\ g^{-1}$ beobachtet. Die Untersuchungen zeigen, daß unter diesen Bedingungen die Produktion der Lipase sowohl an das Wachstum als auch an den Sauerstoffverbrauch gekoppelt ist. Die sauerstoffspezifische Biomasseselektivität $Y_{X/O}$ liegt mit $Y_{X/O} = 1{,}1\ g\ g^{-1}$ in dem Bereich für aerob wachsende bakterielle Systeme.

[5] Die Definitionen der in diesem Kapitel verwendeten Zustandsgrößen sind in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Die Kopplung von Wachstum und Produktbildung wird durch Voit et al. (1991) bestätigt. In einer Parameterstudie wurden weiterhin im Reaktorsystem Schüttelkolben die Reaktionsbedingungen in Bezug auf die Medienzusammensetzung und den pH-Wert variiert und die relative Lipaseausbeute bewertet. Zunächst wurde das Pepton/Hefeextrakt-Verhältnis c(Pepton)/c(Hefeextrakt) mit den Startbedingungen c(Pepton)/c(Hefeextrakt) = 2 und c(Pepton) + c(Hefeextrakt) = konstant = 15 g l^{-1} variiert. Dabei hat sich gezeigt, daß durch die Verschiebung in Richtung des Hefeextraktes die Ausbeute um mehr als den Faktor 2 gesteigert werden kann. Sie ist unter diesen Bedingungen bei einem Verhältnis von c(Pepton)/c(Hefeextrakt) = 0,2 maximal. Mit diesem Verhältnis wurde die Abhängigkeit der relativen Lipaseausbeute von der Gesamtmenge an Komplexmedienbestandteilen in der Vorlage in Batch Verfahren untersucht. Eine Startmenge von 90 g l^{-1} zeigte unter diesen Bedingungen eine maximale Ausbeute. Weiterhin wurde die Vorlagekonzentration der zusätzlichen Kohlenstoff- und/oder Energiequelle Glucose untersucht und eine Ausgangskonzentration von 5 g l^{-1} eingestellt. Untersuchungen über den Einfluß von Phosphat zeigten keinen Einfluß. Auch die Variation des pH-Wertes im Bereich pH 6,5-7,7 zeigt keinen signifikanten Einfluß auf die relative Lipaseausbeute. Mit diesen geeigneten Reaktionsbedingungen wurden in Blasensäulenreaktoren in Batch Verfahren in 20 h eine Biotrockenmassekonzentration von 6 g l^{-1} und eine Lipasekonzentration[6] von 1,2 mg l^{-1} erreicht. Die Lipaseausbeute konnte dabei weder durch Einführung einer Glucosezudosierung noch durch die Regelung des pH-Wertes verbessert werden.

Die Verwertung der Substrate der Komplexmedien wurde von Märkl et al. (1990) untersucht. In vergleichbaren Batch Verfahren im Rührkesselreaktor und Dialysereaktor (Abbildung 3.5) wurden in beiden Ansätzen substratspezifische Biotrockenmasseausbeuten $A_{X/S}$ von $A_{X/S} = 0{,}04$ g g^{-1} erreicht. Im Dialysereaktor können dabei nur Bestandteile des Komplexmediums verwertet werden, die durch die Membran diffundieren. Daher kann über den Permeationskoeffizienten der Dialysemembran das maximale Molekulargewicht M der nutzbaren Substrate abgeschätzt werden. Dieses liegt bei $M < 400$ D.

---

[6] Die Lipasekonzentration in der Einheit [mg l^{-1}] wurde nach Falk et al. (1991) über die spezifische Aktivität der Lipase (150 U mg^{-1}) berechnet.

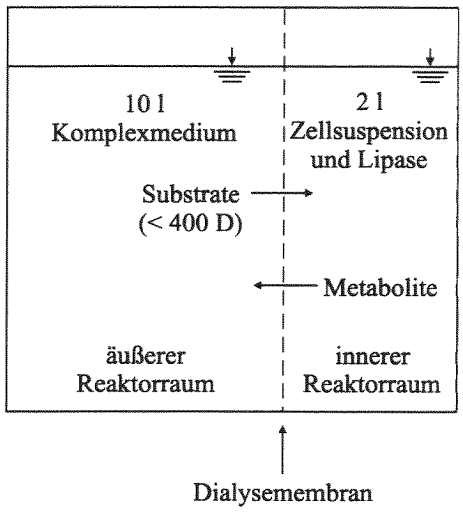

Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Dialysereaktors nach Märkl et al. (1990).

Durch den kontinuierlichen Austausch der Medienbestandteile im äußeren Reaktionsraum ist es mit diesem Reaktorsystem möglich, Biotrockenmassekonzentrationen bis zu 60 g l^{-1} und Lipasekonzentrationen von 230 mg l^{-1} zu erreichen. Hier wird durch den äußeren Reaktorraum ständig hochkonzentriertes Komplexmedium zugeführt. Durch den kontinuierlichen Austausch stehen den Organismen im inneren Reaktorraum somit dauernd frische Substrate zur Verfügung. Weiterhin werden toxische Metabolite ständig mit dem verbrauchten Medium abgeführt. Obwohl keine Daten über Inhibierungen oder Limitierungen verfügbar sind, zeigt dieses System, daß es grundsätzlich möglich ist, mit *S. carnosus* sowohl hohe Biotrockenmassekonzentrationen als auch große Mengen rekombinantes Protein zu produzieren.

3.2 Verfahrenstechnische Grundlagen

3.2.1 Prozeßführung

Bei der Prozeßführung werden drei verschiedene Verfahren unterschieden:

- Batch (ansatzweise, diskontinuierlich),
- Fedbatch (Zulaufverfahren, semikontinuierlich),
- Kontinuierlich.

Das **Batch Verfahren** stellt ein geschlossenes System dar. Zu Beginn der Fermentation liegen alle notwendigen Nährstoffbestandteile im Reaktionsgefäß vor. Während des gesamten Prozesses wird mit Ausnahme von Sauerstoff in Form von Luft, Antischaummittel und Säure bzw. Lauge zur pH-Regelung nichts hinzugefügt oder entnommen (bis auf die Probenahmen, Kohlendioxid und Verdunstung). Bedingt durch den Stoffwechsel der Zellen verändern sich ständig die Medienzusammensetzung, Zellmasse und die Metabolitkonzentrationen.

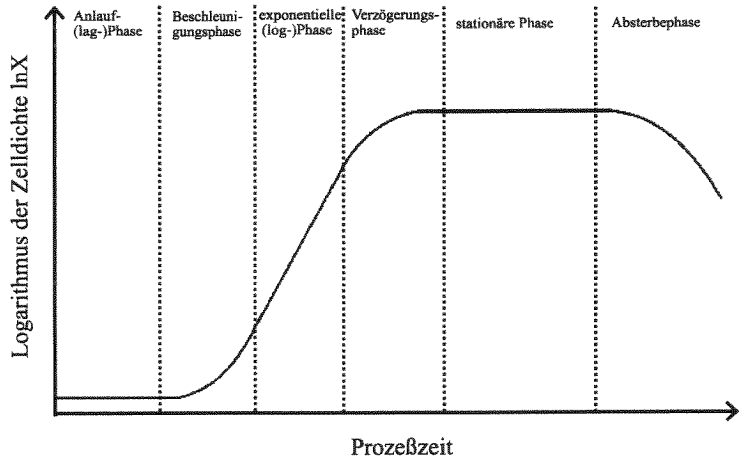

Abbildung 3.6: Wachstumsphasen einer Batch Kultur (Schlegel 1992)

Dabei lassen sich die einzelnen Phasen des Wachstums gut identifizieren (Abbildung 3.6). In der lag-Phase adaptieren die Zellen zunächst an die Änderung der Umweltbedingungen. Sie geht nach einer Beschleunigungsphase in die exponentielle Phase (log-Phase) über. Die Organismen erreichen die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit. Diese ist von äußeren Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Substrat, etc. und zellinternen Faktoren wie intrazelluläre Enzymaktivitäten abhängig.

Diese Phase endet entweder mit dem vollständigen Verbrauch eines Substrates oder mit der Akkumulation eines toxischen Produktes. Nach einer Übergangsphase folgt die stationäre Phase, in der die Biotrockenmassekonzentration konstant bleibt. In der Absterbephase kommt das Wachstum vollkommen zum Erliegen, die Zellen sterben ab (Schlegel 1992).

Bei **Fedbatch Verfahren** werden neben Luftzufuhr und Korrekturmittel zur pH-Regelung weitere wesentliche Nährstoffe hinzugegeben, hauptsächlich die Kohlenstoff- und/oder Energiequelle. Es werden jedoch keine Produkte oder Kulturlösung entnommen. Meist wird dieses Verfahren bei stark substratinhibierenden Prozessen angewandt. Zu Beginn des Prozesses wird die Substratkonzentration sehr niedrig gehalten (nicht inhibierend) und während der Produktionsphase oder der exponentiellen Wachstumsphase entsprechend hinzugegeben. Dabei kann das Substrat gesteuert über ein fest vorgegebenes Profil oder geregelt über eine oder mehrere Zustandsgrößen (s. 3.2.2) dosiert werden.

Die **kontinuierliche Prozeßführung** kommt einem offenen System gleich. Dem Reaktorsystem wird permanent sterile Substratlösung zugeführt und zugleich die entsprechende Menge Kulturlösung entnommen. Dabei wird das Volumen im Reaktor konstant gehalten. Die Durchflußrate D [h^{-1}] ist so einzustellen, daß nur so viele Mikroorganismen ausgetragen werden, wie im Reaktionsgefäß nachwachsen können. Steuert die Durchflußrate die spezifische Wachstumsrate, so spricht man von einem Chemostaten.

Im Chemostaten wird die Wachstumsrate im Fließgleichgewicht durch eine definierte Durchflußrate D [h^{-1}] konstant gehalten. Die Durchflußrate ist definiert als:

$$D = \frac{F_R}{V_R} \qquad \text{Gleichung 1}$$

mit der Fließrate F_R [l h^{-1}] und dem konstanten Reaktorarbeitsvolumen V_R [l]. Die

Massenbilanz der Biomasse im ´idealen´ Reaktionsgefäß[7] berechnet sich aus der Differenz der mikrobiell gebildeten und der abgeführten Biomasse.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \qquad \text{Gleichung 2}$$

Im Fließgleichgewicht „steady state" (dX/dt = 0) wird aus Gleichung 2:

$$D = \mu . \qquad \text{Gleichung 3}$$

Bei Überschreiten der kritischen Durchflußrate ($D > \mu_{max}$) kommt es zum Auswaschen und somit zum Absinken der Zellmasse im Bioreaktor. μ_{max} gibt den maximal möglichen Zellzuwachs pro Zeiteinheit bezogen auf die im Reaktor befindliche Biomasse an.

Bei einer konstanten Durchflußrate D ist für das ´idealen´ Reaktionsgefäß die mittlere Verweilzeit τ [h] definiert als die reziproke Verdünnungsrate (Meiners 1990):

$$\tau = \frac{1}{D} \qquad \text{Gleichung 4}$$

Wird die Durchflußrate D nicht gesteuert, sondern durch die *on-line* zugängliche Zustandsgröße Trübung geregelt, so bezeichnet man diese kontinuierliche Verfahrensweise als Turbidostat. Weitere gut zugängliche Zustandsgrößen, die als Regelgröße für die Durchflußrate D eingesetzt werden können, sind der pH-Wert (pH-Auxostat), der Sauerstoffpartialdruck pO_2 (DO-stat) oder die CO_2-Bildungsrate CER (CER-stat). Ist die Regelgröße die Substratkonzentration, die mit *on-line* Analysengeräten und Kontrollsystemen erfaßt und mit geeigneten Reglern eingestellt werden kann, spricht man von Nutristat.

---

[7] In der Regel werden diese Experimente in ´idealen´ Rührkesselreaktoren (mit vollständiger Rückvermischung) durchgeführt. ´Ideal´ bedeutet, daß angenommen wird, daß die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung und damit auch die Reaktionsgeschwindigkeit im gesamten Reaktionsvolumen räumlich konstant sind (Weuster-Botz 1999).

3.2.2 Prozeßleittechnik (Menkel 1992)

Prozeßgrößen

In der Prozeßleittechnik lassen sich die Prozeßgrößen einteilen in:

- Prozeßvariable,
- Zustandsgrößen,
- Regelgrößen,
- Zielgrößen,
- Bewertungsgrößen.

Bei den Prozeßvariablen handelt es sich um Größen in einem Regelkreis (Abbildung 3.7), die eine beabsichtigte Veränderung der Regelgröße im Zuge des Wirkungsablaufes der Regelung bewirken. Die Sollwerte der Prozeßvariablen lassen sich direkt, jederzeit und prozeßzeitunabhängig verändern. Der aktuelle Zustand eines Prozesses wird mit den Zustandsgrößen beschrieben. Diese werden unterteilt in Meßgrößen und berechenbare Zustandsgrößen. Beide können in einem Prozeß als Regelgröße, die auf einem konstanten Wert gehalten werden soll, genutzt werden (Tabelle 3.1).

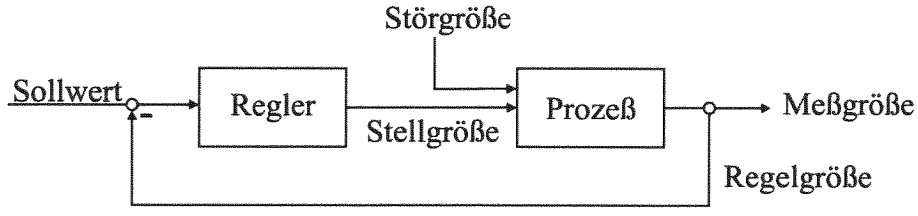

Abbildung 3.7: Vereinfachtes Schema des Regelkreises

Zielgrößen biotechnologischer Prozesse sind im allgemeinen Produkt- und/oder Biotrockenmassekonzentration. Bewertungsgrößen dienen zur Beurteilung und können sowohl Meßgrößen als auch berechenbare Zustandsgrößen wie Produktbildungsrate oder Selektivitäten sein.

Tabelle 3.1: Übersicht der Prozeßgrößen

Prozeßgröße	Meßgröße	Regelgröße	Prozeß-variable	Berechnete Zustandsgröße
Rührerdrehzahl	$x^{(1)}$	x	x	
Temperatur	$x^{(1)}$	x	x	
Kopfraumdruck	$x^{(1)}$	x	x	
Luftmengenstrom	$x^{(1)}$	x	x	
pH-Wert	$x^{(1)}$	x	x	
Füllstand	$x^{(1)}$	x	x	
Schaum	$x^{(1)}$	x		
pO_2 in der flüssigen Phase	$x^{(1)}$	x		
pCO_2 in der flüssigen Phase	$x^{(1)}$	x		
O_2 in der Abluft	$x^{(1)}$	x		
CO_2 in der Abluft	$x^{(1)}$	x		
Biomassekonzentration	$x^{(1)}$	x		(x)
Substratkonzentration	$x^{(1)}$	x		(x)
Produktkonzentration	$x^{(1)}$	x		(x)
CER (CO_2-Bildung)		x		$x^{(2)}$
OUR (O_2-Verbrauch)		x		$x^{(2)}$
RQ (Respirationsquotient)		x		$x^{(2)}$
Umsatzrate		x		$x^{(2)}$
Wachstumsrate		x		$x^{(2)}$
Produktbildungsrate		x		$x^{(2)}$
Aktivität der Biomasse		x		$x^{(2)}$
Wärmeentwicklung				$x^{(2)}$
Stoffübergangskoeffizient				$x^{(2)}$
Substratkonzentration (kontinuierliche Verfahren)			x	
Verdünnungsrate (kontinuierliche Verfahren)			x	

$x^{(1)}$: direkt erfaßbare Zustandsgrößen
$x^{(2)}$: Zustandsgrößen sind nur durch Berechnung zu bestimmen

Regelkreise

In biotechnologischen Verfahren wird in primäre und sekundäre Regelkreise unterschieden (Abbildung 3.8). Die primären Regelkreise zeichnen sich durch eine eindeutige Zuordnung der Regelgröße zu nur einer Stellgröße aus. Meist entsprechen die Prozeßvariablen (Temperatur, pH-Wert, Rührerdrehzahl, etc.) den primären Regelgrößen, deren Sollwerte sich unabhängig voneinander verändern lassen.

Sekundäre Regelkreise sind meist erheblich komplexer aufgebaut. Regelgrößen können sowohl Meßgrößen als auch berechnete Zustandsvariablen sein. Beispiele sind die Gelöstsauerstoffkonzentration oder der Respirationskoeffizient.

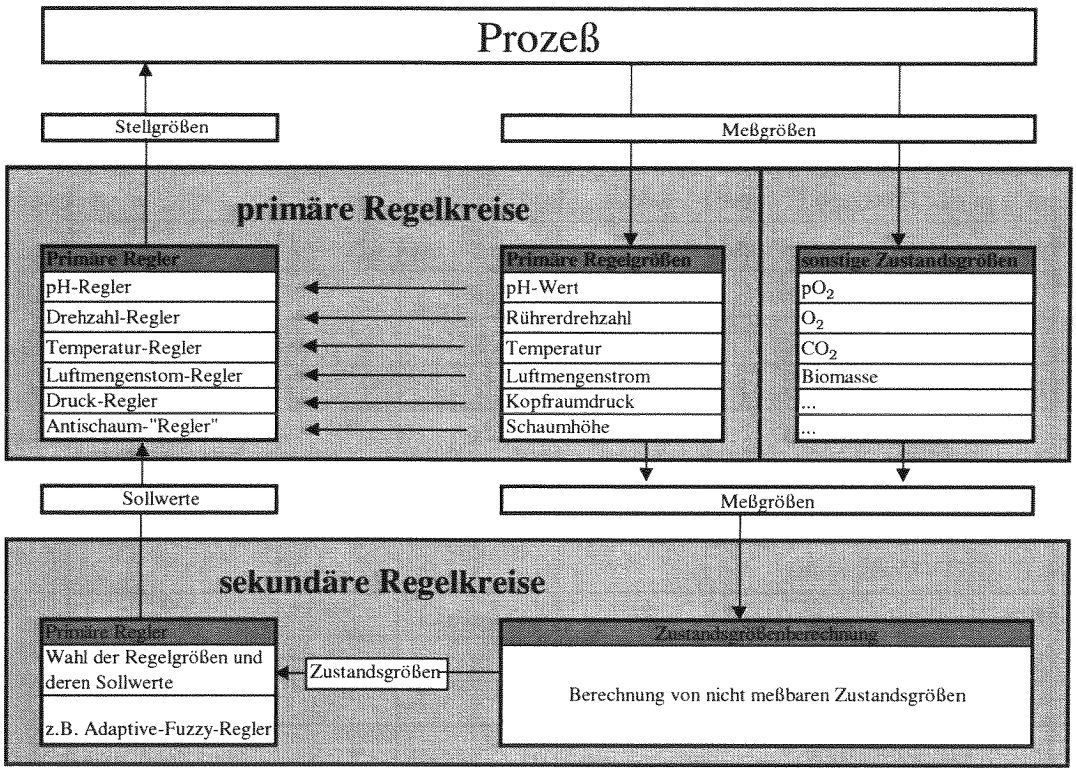

Abbildung 3.8: Systematik der Regelkreise

3.2.3 Ermittlung von Zustandsgrößen

Die Zustandsgrößen werden in dieser Arbeit unter der Annahme eines 'idealen' Rührkesselreaktors mit isothermer Reaktionsführung und volumenbeständigen Reaktionen ermittelt. Bei instationärer Prozeßführung lassen sich die Stoffbilanzen bei veränderlichem Reaktionsvolumen V_R mit dem Volumenstrom F_R und der Reaktionsrate r_i allgemein wie folgt darstellen:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_R \cdot c_i^E + V_R \cdot r_i . \qquad \text{Gleichung 5}$$

Wachstum

Ein Maß für das Wachstum mikrobieller Systeme ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ [h^{-1}]. Sie ist definiert als differentielle Änderung der Biotrockenmassekonzentration X im Reaktor als Funktion der Prozeßzeit t.

$$\mu \equiv \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \qquad \text{Gleichung 6}$$

Mit Hilfe der Stoffbilanz kann die aktuelle Wachstumsrate im Reaktor wie folgt ermittelt werden:

$$\mu = \frac{1}{V_R \cdot X} \cdot \frac{d(V_R \cdot X)}{dt} . \qquad \text{Gleichung 7}$$

Produktbildung

Die volumenbezogene Produktbildungsgeschwindigkeit π_V [mg l^{-1} h^{-1}] ist definiert als die differentielle Änderung der Produktkonzentration P im Reaktor als Funktion der Prozeßzeit t.

$$\pi_V \equiv \frac{dP}{dt} \qquad \text{Gleichung 8}$$

Mit Hilfe der Stoffbilanz kann die aktuelle volumenbezogene Produktbildungsgeschwindigkeit im Reaktor wie folgt ermittelt werden:

$$\pi_V = \frac{1}{V_R} \cdot \frac{d(V_R \cdot P)}{dt} . \qquad \text{Gleichung 9}$$

Die integrale volumenbezogene Produktbildungsgeschwindigkeit wird als Raum-Zeit-Ausbeute RZA [mg l^{-1} h^{-1}] bezeichnet.

$$RZA = \frac{\int \pi_V \cdot dt}{t_E - t_0} \qquad \text{Gleichung 10}$$

Die biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit π_X [mg g^{-1} h^{-1}] ist definiert als die differentielle Änderung der Produktkonzentration P im Reaktor als Funktion der Änderung der Prozeßzeit dt bezogen auf die aktuelle Biotrockenmassekonzentration X.

$$\pi_X \equiv \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \qquad \text{Gleichung 11}$$

Mit Hilfe der Stoffbilanz kann die aktuelle biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit im Reaktor wie folgt ermittelt werden:

$$\pi_X = \frac{1}{V_R \cdot X} \cdot \frac{d(V_R \cdot P)}{dt}. \qquad \text{Gleichung 12}$$

Die biomassespezifische Produktselektivität $Y_{P/X}$ [mg g^{-1}] ist definiert als

$$Y_{P/X} \equiv \frac{dP/dt}{dX/dt} = \frac{\pi_X}{\mu}. \qquad \text{Gleichung 13}$$

Substratverbrauch

Die biomassespezifische Substratverbrauchsgeschwindigkeit σ_X [g g^{-1} h^{-1}] ist definiert als die differentielle Änderung der Substratkonzentration S im Reaktor als Funktion der Änderung der Prozeßzeit dt bezogen auf die aktuelle Biotrockenmassekonzentration X.

$$\sigma_X \equiv \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \qquad \text{Gleichung 14}$$

Mit Hilfe der Stoffbilanz kann die aktuelle biomassespezifische Substratverbrauchsgeschwindigkeit im Reaktor wie folgt ermittelt werden:

$$\sigma_X = \frac{1}{V_R \cdot X} \cdot \left(\frac{d(V_R \cdot S)}{dt} + F_R \cdot S^{ein} \right). \qquad \text{Gleichung 15}$$

Die biomassespezifische Produktselektivität $Y_{P/S}$ [mg g^{-1}] ist definiert als

$$Y_{P/S} \equiv \frac{dP/dt}{dS/dt} = \frac{\pi_X}{\sigma_X}. \qquad \text{Gleichung 16}$$

Die substratspezifische Biomasseausbeute $A_{X/S}$ [g g^{-1}] ist definiert als die im Reaktor gebildete Biotrockenmassemenge M_X bezogen auf die insgesamt eingesetzte Substratmenge $\sum S$.

$$A_{X/S} \equiv \frac{M_X}{\sum S} \qquad \text{Gleichung 17}$$

Die insgesamt eingesetzte Substratmenge $\sum S$ setzt sich zusammen aus der vorgelegten Substratmenge und der bis zum betrachteten Zeitpunkt zudosierten Substratmenge.

Analog dazu ist die substratspezifische Produktausbeute $A_{P/S}$ [mg g^{-1}] definiert als die im Reaktor gebildete Produktmenge M_P bezogen auf die insgesamt eingesetzte Substratmenge $\sum S$.

$$A_{P/S} \equiv \frac{M_P}{\sum S} \qquad \text{Gleichung 18}$$

Die insgesamt eingesetzte Substratmenge $\sum S$ setzt sich zusammen aus der vorgelegten Substratmenge und der bis zum betrachteten Zeitpunkt zudosierten Substratmenge.

Respirationskoeffizient (RQ)

Unter der Annahme des ´idealen´ Rührkesselreaktors können der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidbildung über eine Massenbilanz der Gasphase berechnet werden. Dabei ergibt sich die Sauerstoffaufnahmerate OUR (Oxygen Uptake Rate) [mol l^{-1} h^{-1}] aus:

$$OUR = \frac{\dot{V}_G^E}{V_R} \cdot (c_{O_2}^E - c_{O_2}^A) \qquad \text{Gleichung 19}$$

mit dem Volumenstrom des eintretenden Gases $\dot{V}_G^E$ [l h^{-1}], dem Arbeitsvolumen V_R [l] und der Differenz der O_2-Konzentration des Gaseintrittes $c_{O_2}^E$ [mol l^{-1}] und der O_2-Konzentration des Gasaustrittes $c_{O_2}^A$ [mol l^{-1}].

Entsprechend gilt für die Kohlendioxidbildungsrate CER (Carbondioxide Evolution Rate) [mol l^{-1} h^{-1}]:

$$CER = \frac{\dot{V}_G^E}{V_R} \cdot (c_{CO_2}^A - c_{CO_2}^E) \qquad \text{Gleichung 20}$$

Bei dieser Berechnung geht die Differenz der CO_2-Konzentration des Gasaustrittes $c_{CO_2}^A$ [mol l^{-1}] und der CO_2-Konzentration des Gaseintrittes $c_{CO_2}^E$ [mol l^{-1}] ein.

Aus diesen Größen läßt sich der Respirationskoeffizient RQ berechnen:

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \qquad \text{Gleichung 21}$$

Der RQ ist substrat- und organismusspezifisch. Bei genauer Kenntnis der Stoffwechselwege bei einem Mikroorganismus kann mittels des RQ eine Aussage über das verstoffwechselte Substrat getroffen werden. Unter aeroben Bedingungen und bei vollständigem Abbau werden beispielsweise pro Mol Glucose sechs Mol Sauerstoff verbraucht und sechs Mol Kohlendioxid freigesetzt, so daß sich ein RQ von eins ergibt. Bei der Umsetzung von Fetten und Proteinen beträgt der RQ 0,71 bzw. 0,8. Der RQ gibt bei einem eingesetzten Substrat, das sowohl aerob als auch anaerob verstoffwechselt werden kann, Auskunft über den Metabolismusweg. Dies setzt allerdings eine gute Kenntnis des Stoffwechsels bei dem untersuchten Mikroorganismus voraus.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Die nicht in Tabelle 4.1 angeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt in analysenreiner Qualität bezogen.

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien

Firma	Chemikalien
Biomol, Hamburg	BSA Fraktion V
Boehringer, Mannheim	BCIP, NBT
Deutsche Hefe Werke, Hamburg	Hefeextrakt
ICN Biomedicals, Inc., Ohio	DTT, Kaninchen-hCT-Antikörper (polyklonal)
NOVEX™, San Diego	NuPAGE-Puffersysteme (außer MES-Laufpuffer)
Riedel-de-Haén, Seelze	SDS
Sigma, Deisenhofen	Anti-hCT-Antikörper (Alkalische Phosphatase), Antischaummittel: Antifoam 289

4.2 Stämme und Stammhaltung

Die eingesetzten Stämme (Tabelle 4.2) leiten sich von dem Wildstamm *Staphylococcus carnosus* TM300 (DSMZ 20501) ab. Die molekularbiologischen Arbeiten wurden im Institut für Biotechnologie I der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Freudl durchgeführt (Sandgathe (2000), Tippe (2000)).

Tabelle 4.2: Charakteristika der eingesetzten Stämme

Stamm	Beschreibung
S. carnosus TM 300	Wildtyp
S. carnosus pLPhCT2	Sekretion des rec hCT-Dimers (**hCT2**) mit Lipase **P**ropeptid unter der Kontrolle des konstitutiven **L**ipase-Promotors aus *S. hyicus*. Die Gene für das Pre-Propeptid und die hCT-Multimere sind in die Schnittstellen SacI und HindIII des Vektors pPS2 kloniert (Abbildung 3.4).
S. carnosus pXPhCT2 (hCT4 bzw. hCT8)	Sekretion des hCT-Dimers (Tetra- bzw. Octamers) mit Lipase **P**ropeptid unter der Kontrolle des induzierbaren **X**ylose-Promotors aus *S. xylosus*. Die Gene für das Pre-Propeptid und die hCT-Multimere sind in die Schnittstellen XbaI und HindIII des Vektors pXR100 kloniert (Abbildung 3.4).
S. carnosus pXR100	Transformant mit dem Plasmid pXR100 mit xyloseinduzierbarem Promotor ohne Insert (Abbildung 3.4).

In den Fusionsproteinen sind die hCT-Monomere untereinander und mit dem Propeptid über Linkersequenzen miteinander verbunden (Abbildung 4.1, exemplarisch dargestellt für das Dimer-Fusionsprotein PhCT2). Die Primärsequenz des Linkers aus fünf Aminosäuren lautet AAKKR. Dieser erlaubt enzymatisch die Freisetzung der hCT-Monomere aus dem Fusionsprotein. Die abgespaltenen Monomere können anschließend in zwei weiteren enzymatischen Schritten und einer chemischen Amidierung in das biologisch aktive hCT überführt werden. Bezogen auf das gesamte Fusionsprotein beträgt die theoretische Ausbeute an hCT bei dem Dimer PhCT2 21 %, bei dem Tetramer PhCT4 32 % und bei dem Octamer PhCT8 49 %.

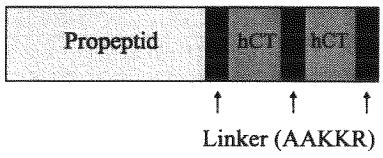

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der extrazellulären Form des Fusionsproteins PhCT2 mit dem Propeptid (hellgrau), den hCT-Monomeren (dunkelgrau) und den Linkersequenzen (schwarz).

Die Stammhaltung erfolgt in Glycerincryokulturen. Dazu werden die Stämme in 100 ml LB-Medium (s. 4.3.3) mit 10 g l^{-1} Glucose über Nacht bei 37°C und 150 rpm in 1 l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen kultiviert. Nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle wird die Kultur mit 100 ml sterilisiertem Glycerin (87 %) gemischt. Aliquots von 1,8 ml werden in sterile Nalgene-Cryoröhrchen überführt und bei –80°C gelagert.

4.3 Medien

Die Zusammensetzungen für alle Medien sind bezogen auf 1l Arbeitsvolumen. Beim Ansetzen der Komponenten werden Volumina der Vorkulturen und zugesetzten Stammlösungen berücksichtigt. Im Anhang befinden sich Angaben über die Element- und Aminosäurezusammensetzung des technischen Hefeextraktes OHLY KAT, Chargennummer 272-8 (Deutsche Hefewerke GmbH, Hamburg).

4.3.1 Chloramphenicol

Chloramphenicol wird als Stammlösung (50 mg ml^{-1}) in absolutem Ethanol angesetzt und bei –20°C gelagert. **Die autosterile Lösung wird allen Medien zur Kultivierung genetisch veränderter Stämme unter sterilen Bedingungen zugegeben** (Endkonzentration: 10 mg l^{-1}).

4.3.2 Xylose

Alle Medien zur Kultivierung von *S. carnosus* Stämmen mit dem xyloseinduzierbaren Promotor enthalten 5 g l^{-1} Xylose (Endkonzentration). Diese wird als 10fach Konzentrat angesetzt und separat für 20 min bei 121°C sterilisiert und ins Medium gegeben.

4.3.3 LB-Medium

Als Standardmedium für die Kultivierung von *S. carnosus* im Bereich der Stammentwicklung wird LB-Medium eingesetzt:

Hefeextrakt (Merck)	5 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Na_2HPO_4	1 g
H_2O bidest.	ad 1 l

Die Medienbestandteile werden in H_2O bidest. gelöst und 15 min bei 121°C sterilisiert.

4.3.4 Synthetische Medien

Kohlenstoffquelle	10-100 g
200 mM K-Phosphatpuffer pH 7,0	100 ml
$(NH_4)_2SO_4$	1,321 g
$MgCl_2$*6 H_2O	0,4066 g
$CaCl_2$*2 H_2O	0,1029 g
$MnCl_2$*4 H_2O	0,01 g
$FeCl_3$*6 H_2O	1,35 mg
$ZnCl_2$	0,14 mg
Aminosäuren	je 1 mg
Vitaminlösung	5 ml
Spurenlösung	1 ml
H_2O bidest	ad 1 l

Die Medienbestandteile werden in H_2O bidest. gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm).

Vitaminlösung (5 ml l^{-1})

Riboflavin	10 mg
Thiamin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Pyridoxin-HCl	50 mg
Ca-Panthothenat	50 mg
Biotin	0,1 mg
Folsäure	0,2 mg
Vitamin B_{12}	1 mg
H_2O bidest.	ad 100 ml

Spurenlösung (1 ml l^{-1})

$ZnSO_4 * 7 H_2O$	0,1 g
$MnCl_2 * 4 H_2O$	0,03 g
H_3BO_3	0,3 g
$CoCl_2 * 6H_2O$	0,2 g
$CuCl_2 * 2 H_2O$	0,01 g
$NiCl_2 * 6 H_2O$	0,02 g
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	0,03 g
H_2O bidest.	ad 1 l

4.3.5 Medium für die Parameterstudie

Für die Parameterstudie der Produktionsphase wird nach einer qualitativen Optimierung folgendes Medium eingesetzt:

Hefeextrakt (Merck)	15 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,321 g
200 mM K-Phosphatpuffer pH 7,0	100 ml
Salzlösung (10fach)	100 ml
$FeCl_3*6 H_2O$	1,35 mg
H_2O bidest.	ad 1 l

Alle Bestandteile werden getrennt gelöst und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Lösungen werden dann unter sterilen Bedingungen gemischt.

Salzlösung (10fach)

$MgCl_2*6 H_2O$	4,066 g
$CaCl_2*2 H_2O$	1,029 g
$MnCl_2*4 H_2O$	0,1 g
$ZnCl_2$	1,36 mg
H_2O bidest.	ad 1 l

4.3.6 Medien zur Untersuchung der phänotypischen Stabilität

Chemostat Medium

Glycerin	20 g
Hefeextrakt (OHLY KAT)	25 g
H_2O bidest.	ad 1 l

Der Hefeextrakt wird in H_2O bidest. gelöst, mit 11,25 M NaOH auf pH 7 titriert und für 20 min bei 121°C sterilisiert. Glycerin wird separat sterilisiert (20 min bei 121°C) und unter sterilen Bedingungen mit dem Hefeextrakt gemischt.

Batch Medium

Hefeextrakt (OHLY KAT)	25 g
H_2O bidest.	ad 1 l

Der Hefeextrakt wird in H_2O bidest. gelöst, mit 11,25 M NaOH auf pH 7 titriert und für 20 min bei 121°C sterilisiert.

4.3.7 Medien mit Hefeextrakt als Hauptmedienbestandteil

Für diese Untersuchungen werden 30-200 g l^{-1} Hefeextrakt (OHLY KAT) gelöst und der pH-Wert mit 11,25 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Das Medium wird 20 min bei 121°C sterilisiert. Glucose- und Xylosestammlösungen (100 bzw. 50 g l^{-1}) werden separat autoklaviert und steril ins Medium gegeben.

4.3.8 Medien mit Hefeextrakt als Cosubstrat

Glycerin	20-50 g
Hefeextrakt (OHLY KAT)	50 g
H_2O bidest	ad 1l

Der Hefeextrakt wird gelöst, der pH-Wert mit 11,25 M NaOH auf pH 7 eingestellt und für 20 min bei 121°C sterilisiert. Glycerin wird separat sterilisiert (20 min bei 121°C) und unter sterilen Bedingungen mit dem Hefeextrakt gemischt.

Salzlösung (10fach)

$(NH_4)_2SO_4$	13,21 g
$MgCl_2$*6 H_2O	4,066 g
$CaCl_2$*2 H_2O	1,029 g
$MnCl_2$*4 H_2O	0,1 g
$FeCl_3$*6 H_2O	13,5 mg
$ZnCl_2$	1,4 mg
Spurenelementelösung (s. 4.3.4)	10 ml
H_2O bidest	ad 1l

Die Salzlösung wird sterilfiltriert und unter sterilen Bedingungen in das Medium gegeben.

4.3.9 Fedbatch Medium

Vorlagemedium

Glycerin	50 g
Hefeextrakt (OHLY KAT)	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,642 g
$MgCl_2$*6 H_2O	0,813 g
$CaCl_2$*2 H_2O	0,205 g
$MnCl_2$*4 H_2O	0,02 g
$FeCl_3$*6 H_2O	2,7 mg
$ZnCl_2$	0,28 mg
Spurenelementelösung (s. 4.3.4)	2 ml
H_2O bidest	ad 1l

Das Vorlagemedium wird in den Reaktor filtriert (0,2 µm).

Feed Medium

Hefeextrakt (OHLY)	100 g
H_2O bidest.	ad 1l

Der pH-Wert wird mit 11,25 M NaOH auf pH 10 eingestellt und das Medium bei 121°C für 20 min sterilisiert.

4.3.10 Ultrafiltrationsfraktionen

Zur Identifizierung von wachstumsfördernden Substanzen wird der Hefeextrakt (OHLY KAT) mittels Ultrafiltration (Module Amicon Y10 und Y3 mit je 0,93 m^2 Filtrationsfläche) in 3 Fraktionen separiert. Von dem Extrakt werden 200 g l^{-1} in H_2O bidest. gelöst und der pH-Wert mit 11,25 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wird filtriert (0,2 µm), um ein Verblocken der Ultrafiltrationsmodule zu vermeiden. Die drei erhaltenen Fraktionen (>10 kD, 3-10 kD und <3 kD) werden lyophilisiert und bei Gebrauch eingewogen.

4.3.11 pH-Korrekturmittel

Die Regelung des pH-Wertes erfolgt mit autoklavierten Lösungen von 4 N NaOH oder 1 N H_2SO_4. In der Parameterstudie wird der pH-Wert mit steriler 1N HCl korrigiert.

4.3.12 Antischaum

Zur Verhinderung der Schaumbildung wird das Antischaummittel Antifoam 289 (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Es besteht aus silizium- und nicht siliziumhaltigen (organischen) Dispergenzien. Das Antischaummittel wird für 20 min bei 121°C sterilisiert.

4.4 Schüttelkolbenkultivierung

Alle Vorkulturen enthalten 10 g l^{-1} Glucose als Kohlenstoffquelle. Grundsätzlich werden zwei Vorkulturstufen durchlaufen. In der ersten Stufe werden 100 ml LB-Medium mit einer Glycerinkultur angeimpft und in 1l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen für 12 h bei 37°C und 150 rpm kultiviert. Die zweite Stufe (Volumen entspricht 10 % der Hauptkultur) wird mit 10 % der ersten Vorkultur angeimpft und in 1 l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen, die mit je 100 ml Medium befüllt sind, bei 37°C und 150 rpm für 12 h kultiviert. Das Medium entspricht dem der Hauptkultur. Bei Komplexmedien enthalten die Vorkulturen immer 15 g l^{-1} der entsprechenden Komplexbestandteile. Bei allen Fermentationen beträgt das Animpfvolumen 10 % der Hauptkultur.

4.5 Fermentationen in parallelen Kleinstreaktionsgefäßen[8]

Zur Untersuchung von Reaktionsbedingungen werden Kleinstreaktionsgefäße mit pH-Regelung und Begasungseinheit im Parallelbetrieb eingesetzt. Aufgrund der geringeren Sauerstofftransportrate als im Rührkesselreaktor werden alle Medien so angesetzt, daß sie 15 g l^{-1} Komplexbestandteile enthalten. Diese Konzentration wird nach Voruntersuchungen über Wachstum und Sauerstoffverbrauch von *S. carnosus* TM 300 festgelegt. Für die Untersuchungen stehen folgende zwei Anlagen zur Verfügung:

[8] Die Konstruktion und verfahrenstechnische Charakterisierung der Kleinreaktoren ist in Altenbach-Rehm (2000) beschrieben.

4.5.1 Anlage zum Betrieb von 16 parallelen Blasensäulenreaktoren

Für die Untersuchungen in parallelen Kleinstreaktionsgefäßen wird eine Anlage vom Typ Profors (INFORS AG, CH, Abbildung 4.2) eingesetzt. Diese besteht aus einem temperierbaren Inkubator (IHT, INFORS AG, CH), der den Parallelbetrieb von 16 Blasensäulenreaktoren (INFORS AG, CH) erlaubt. Als Verteilerorgan für die Begasung werden Edelstahllochplatten mit 60 µm Bohrungsdurchmesser benutzt. Aufbau und Betrieb der Anlage entsprechen den Herstellerangaben. Alle Fermentationen werden als Batch Verfahren unter Einsatz einer parallelen Dosiertechnik vom Typ Fedbatch pro (DASGIP mbH) zur Regelung des pH-Wertes durchgeführt. Die Begasungsrate wird manuell eingestellt und liegt im Bereich 0,8-5 vvm. Als Referenz wird in einem Kleinreaktor der Sauerstoffpartialdruck gemessen.

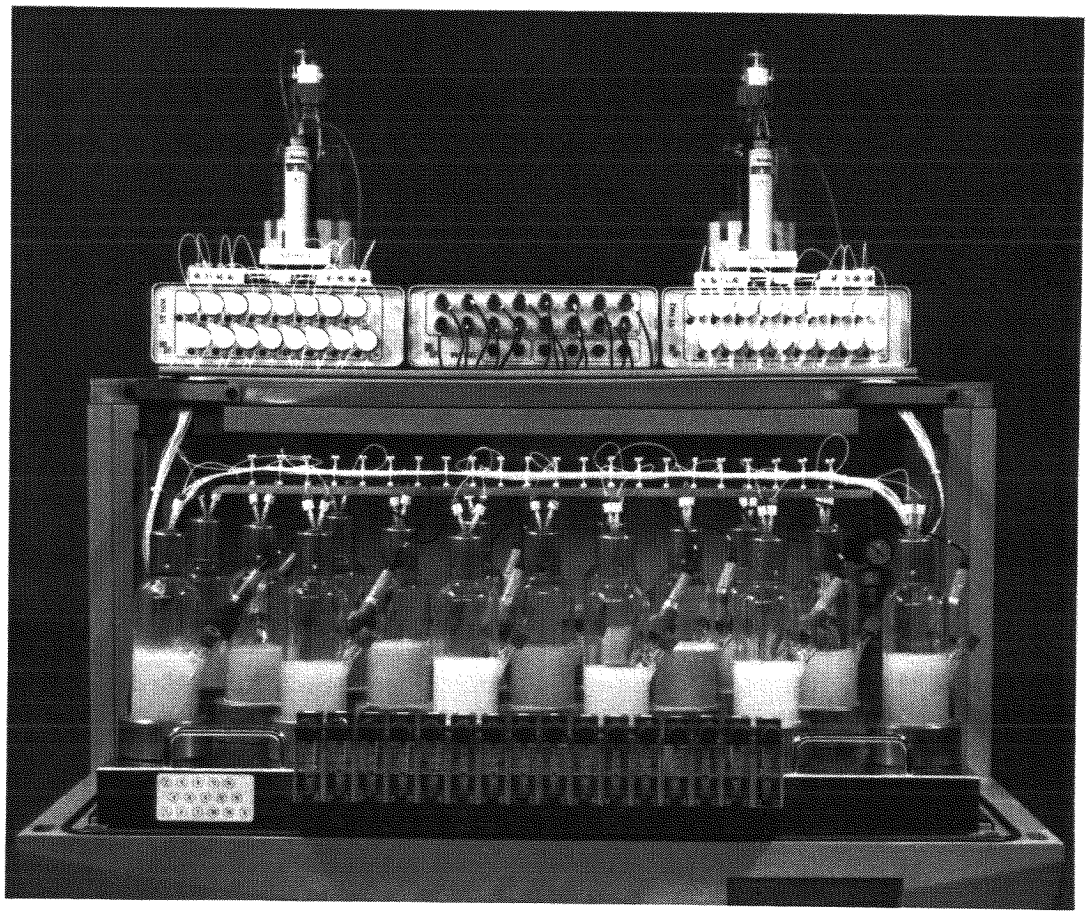

Abbildung 4.2: Aufnahme der Profors-Anlage

4.5.2 Anlage zum Betrieb von sechs parallelen Blasensäulenreaktoren

Für die Parameterstudie wird eine Anlage zum Betrieb von sechs parallelen Blasensäulenreaktoren eingesetzt. Diese erlaubt durch eine Erweiterung der Anlage die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration in drei Kleinreaktoren und der O_2- und CO_2-Anteile in der Abluft in zwei Kleinreaktoren.

Die Anlage ist aus sechs Blasensäulenreaktoren aufgebaut (Abbildungen 4.3-4.5), die von unten über einen Membransterilfilter durch eine Sinterglasfritte mit Druckluft begast werden. Der Volumenstrom ist mit einem Rotameter für jede Säule separat steuerbar. Die Zuluft wird in einem Konditioniergefäß mit Wasser gesättigt und gelangt durch ein Rücklaufgefäß zu den Rotametern. Der Doppelmantel dient der Temperierung des Reaktorraums. Dabei sind je zwei Säulen in Reihe geschaltet und mit einem Wasserbad verbunden. Durch den seitlichen Schrägstutzen reicht die pH-Elektrode, über den Horizontalstutzen kann eine amperometrische pO_2-Elektrode in den Reaktorraum eingebracht werden. Oberhalb der Glasfritte befindet sich ein Horizontalstutzen, der mit einem Silikonseptum abgedichtet ist. Hier werden mit sterilen Injektionsspritzen Proben gezogen und der Reaktor angeimpft. Die Flaschen sind mit Kaspenberg-Kappen verschlossen. In der Mitte dieser Kappen befindet sich eine Bohrung, die mit einem autoklavierbaren Gummistopfen verschlossen ist. Durch diesen können Injektionsnadeln eingebracht werden, die als Anschlüsse für Dosierleitungen (Lauge, Säure, Antischaum, Substrat) genutzt werden können. Der pH-Wert kann in jeder Säule über einen pH-Regler (Endress und Hauser, Weil) getrennt geregelt werden. Die Korrekturmittel werden über Schlauchpumpen (Watson-Marlow, Falmouth Cornwell, GB) zudosiert.

Die pH-Elektroden werden vor dem Autoklavieren mit Eichlösungen kalibriert. Die Säulen werden mit H_2O bidest. gefüllt, so daß die Elektroden in die Flüssigkeit eintauchen. Die Schläuche, die zu Sterilfiltern führen, werden mit Schlauchklemmen abgeklemmt und alle offenen Anschlüsse mit Alufolie verschlossen. Die Säulen werden 20 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend wird unter sterilen Bedingungen das Wasser durch das Hauptkulturmedium ersetzt. Die Säulen werden mit allen Anschlüssen verbunden und ein sehr geringer Luftstrom in die Reaktoren geleitet, so daß ein Zurücklaufen des Mediums durch die Glasfritten und Sterilfilter verhindert wird. Einige Tropfen (2-3) steriles Antischaummittel werden manuell über eine Injektionsspritze ins

Medium gegeben. Vor Fermentationsbeginn werden die pO_2-Elektroden mit Stickstoff und Luft bei einem Volumenstrom von 2,5 vvm bei der Fermentationstemperatur kalibriert.

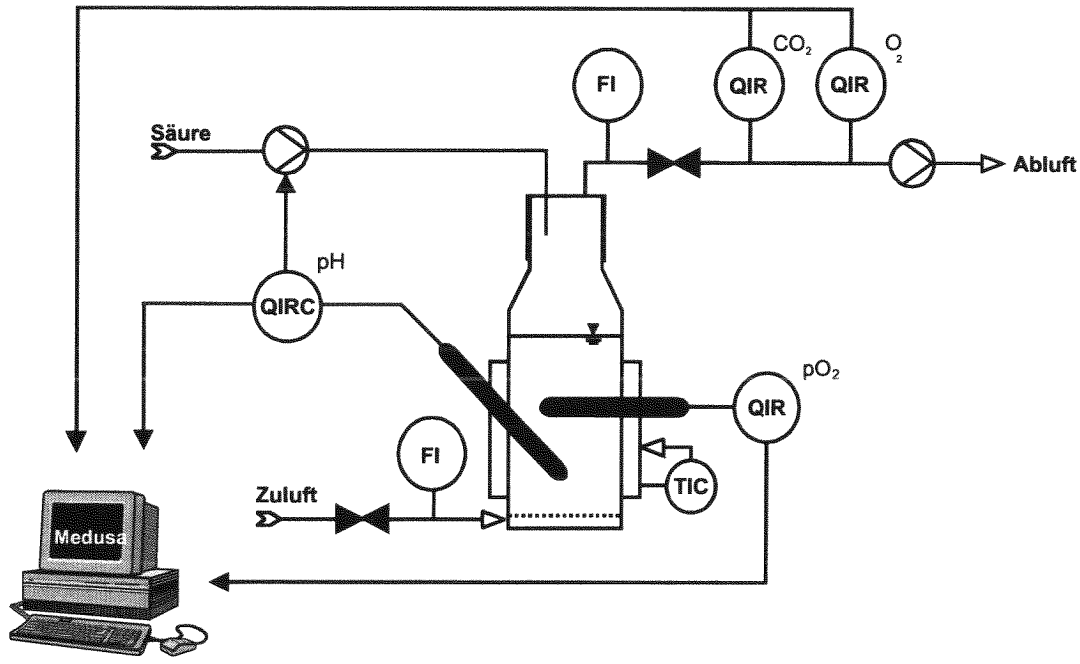

Abbildung 4.3: Schematische Anordnung der Anlage exemplarisch für eine Blasensäule. Die Beschriftung der MSR-Einheiten (Messen, Steuern, Regeln) erfolgt nach DIN 19227: T (Temperatur), F (Durchfluß), Q (zu definierende Qualitätsgröße), I (Anzeige), R (Registrierung), C (selbsttätige Regelung). In einem Zeittakt von 5 min werden alle Daten von dem Programm „Medusa" erfaßt und gespeichert.

Zur Reinigung werden die Glasfritten mit konzentrierter H_2SO_4 bedeckt und über Nacht inkubiert. Die Schwefelsäure wird durch reines H_2O_2 ersetzt und wiederum über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit Wasser sind die nun einheitlich weißen Glasfritten wieder einsetzbar.

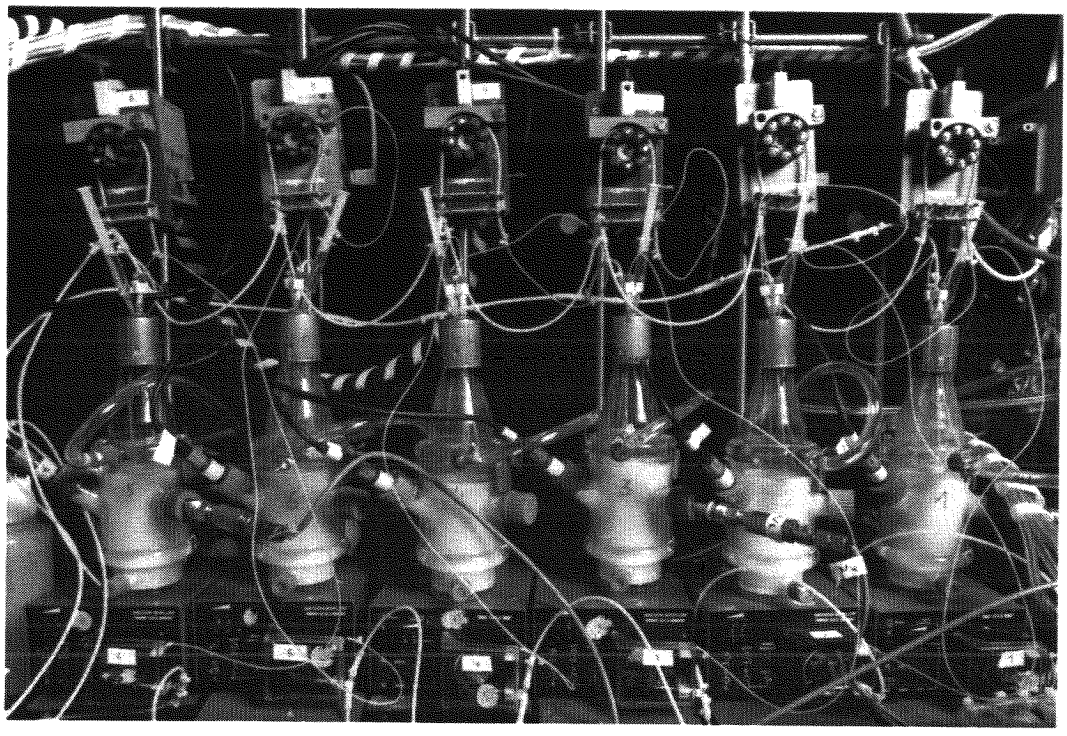

Abbildung 4.4: Blasensäulenreaktoren. Die begasten Säulen in Bildmitte sind mit den Säure- bzw. Laugedosierpumpen (oberhalb und unterhalb der Säulen) und der *on-line* Analytik verbunden.

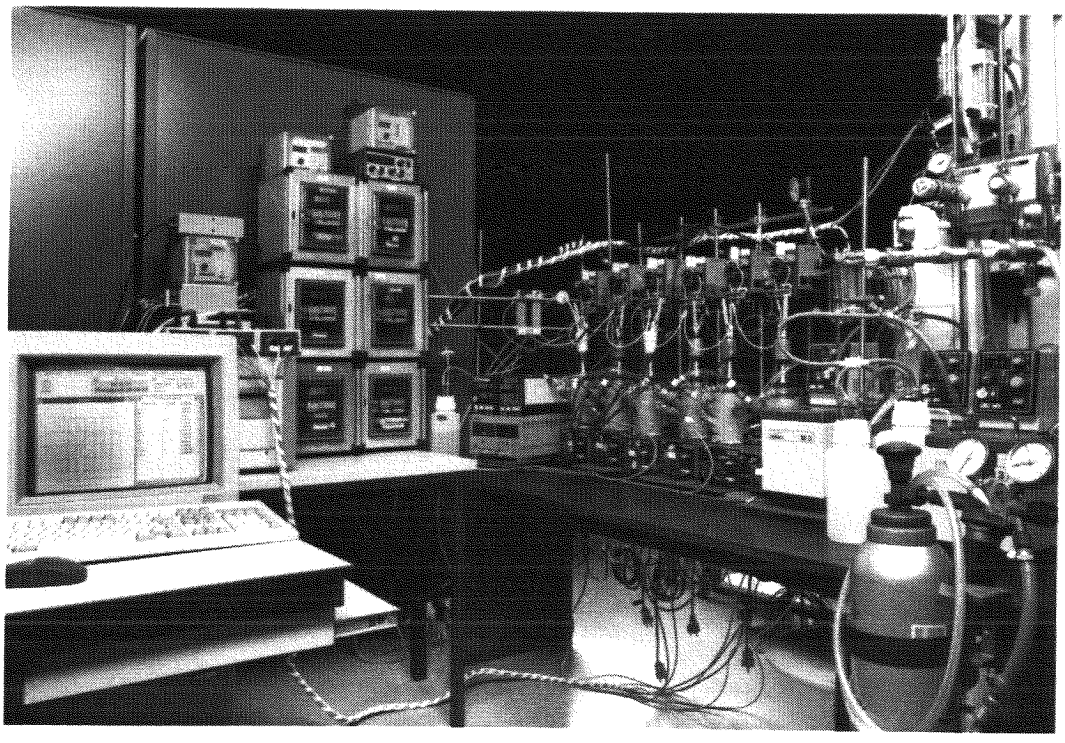

Abbildung 4.5: Aufnahme der Blasensäulenfermentationsanlage. Rechts neben den Reaktoren befinden sich die Temperierwasserbäder und die Zuluftleitung. In der Bildmitte sind Abgasanalytik und Säurereservoir, links davon die Meßwandler für pH- und pO_2-Elektroden zu sehen. Vorne links auf dem Tisch stehen das SMP-Interface (Siemens Microprocessor Peripherie) mit dem Prozeßrechner im Vordergrund.

4.6 Fermentationen im Laborfermenter

Diese Untersuchungen erfolgen in Rührkesselreaktoren vom Typ LABFORS (INFORS AG, Bottmingen, CH, Abbildung 4.6) mit einem Nennvolumen von 3,7 l. Das Arbeitsvolumen beträgt 2 l. Die Steuereinheit übernimmt die Regelung von Temperatur und pH-Wert. Die Prozeßdaten (Temperatur, pH, pO_2, Begasungsrate) werden digital an die serielle Schnittstelle des Rechners übertragen. In Batch und Fedbatch Verfahren wird der Korrekturmittelverbrauch bzw. der Massestrom des Zulaufmediums über eine Dosierstrecke (YCF01Z, Sartorius, Göttingen) aufgezeichnet. Im kontinuierlichen Betrieb steuert diese den konstanten Volumenstrom in den Reaktor. Das Arbeitsvolumen wird über eine permanent laufende Peristaltikpumpe und ein Saugrohr eingestellt. Die Meßdaten werden über ein SMP-Interface an den Prozeßrechner übertragen.

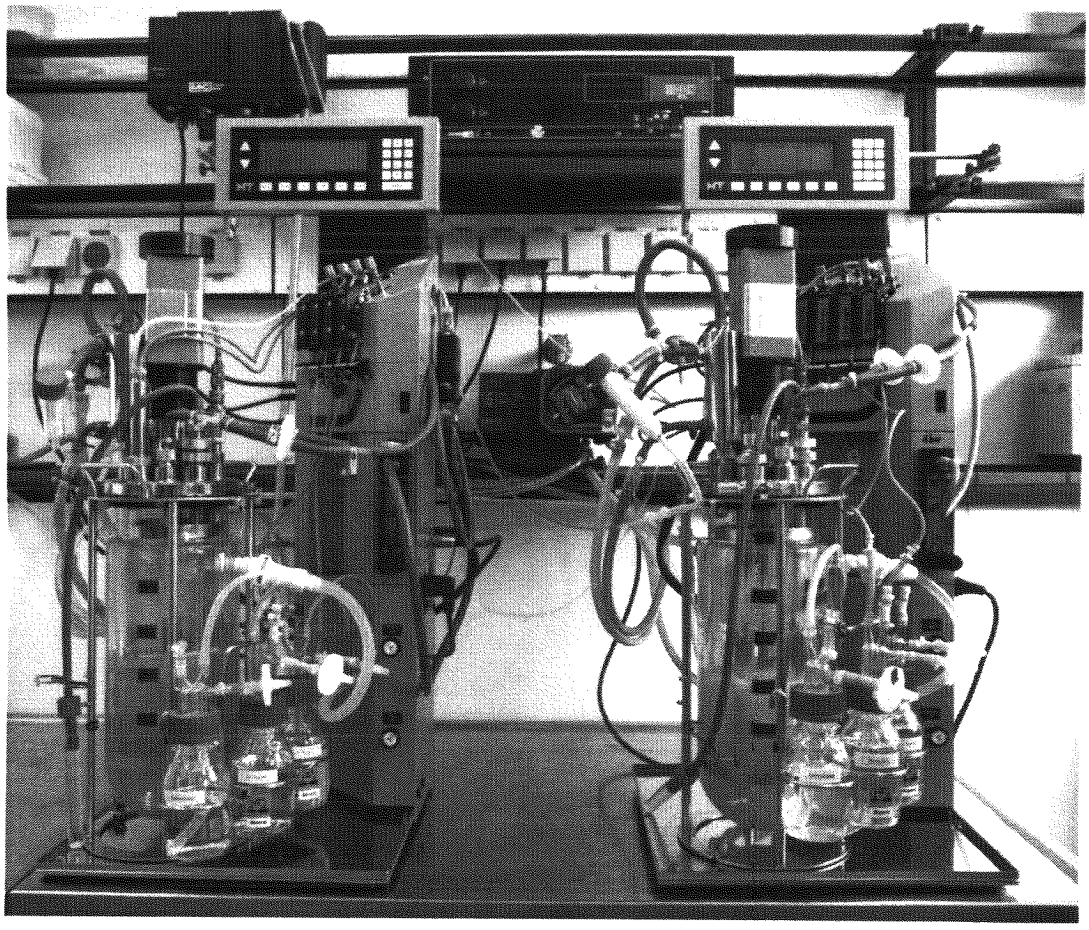

Abbildung 4.6: Aufnahme der Rührkesselreaktoren mit 2 l Arbeitsvolumen

Die Sterilisation der Rührkessel erfolgt mit Wasser im Standautoklaven bei 121°C für 20 min. Das Wasser wird unter sterilen Bedingungen abgelassen und die Reaktoren anschließend mit sterilem Medium befüllt. Die pH-Elektrode wird vor dem Autoklavieren mit Pufferlösungen geeicht. Die Sauerstoffelektrode wird nach dem Befüllen mit Medium mit Stickstoff und Druckluft (1 vvm, 500 rpm) bei der Fermentationstemperatur kalibriert. Die Zuluft wird über Membranfilter (Bacterial Airvent, Gelman Science, Ann Arbor, USA) sterilisiert. Der Sauerstoffpartialdruck wird während der Fermentation durch manuelle Variation der Sollwerte für Drehzahl und Zuluft geregelt. Antischaum wird manuell zudosiert.

4.7 Fedbatch Verfahren im 150 l Maßstab

Die Fermentationen erfolgen im 150 l Rührkessel der Firma Chemap (Volketswil, CH, Abbildung 4.8). Der angeschlossene Steuerschrank ist für den Ablauf des automatischen Sterilisationsprogramms sowie für die Regelung von pO_2, Antischaumzugabe, Temperatur, Druck, Zuluft, Drehzahl und Gewicht mittels analogen Reglereinschüben zuständig. Die Meßdaten werden von dem Steuerschrank an ein SMP-Interface übermittelt und von dort an den Prozeßrechner zur Datenerfassung weitergeleitet. Die Regelung des Feeds erfolgt über eine externe pH-Regelung (Endress und Hauser, Weil). Der Massestrom des Zulaufmediums wird durch Anschluß einer Dosierstrecke aufgezeichnet. Nach der Sterilisation mit Wasser wird der Rührkesselreaktor mit 50 l filtriertem Vorlagemedium befüllt. Die Sauerstoffelektrode wird während der Sterilisation und nach Befüllen mit Vorlagemedium bei 37°C, 1 vvm, 500 rpm und 1,1 bar geeicht. Die Temperatur wird auf 37°C geregelt. Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wird durch manuelle Änderung der Sollwerte für Drehzahl, Temperatur und Druck auf $pO_2 > 30$ % eingestellt. Die Antischaumzugabe erfolgt manuell. Abbildung 4.7 zeigt schematisch die Vorkulturführung der Fermentationen im 150 l Maßstab.

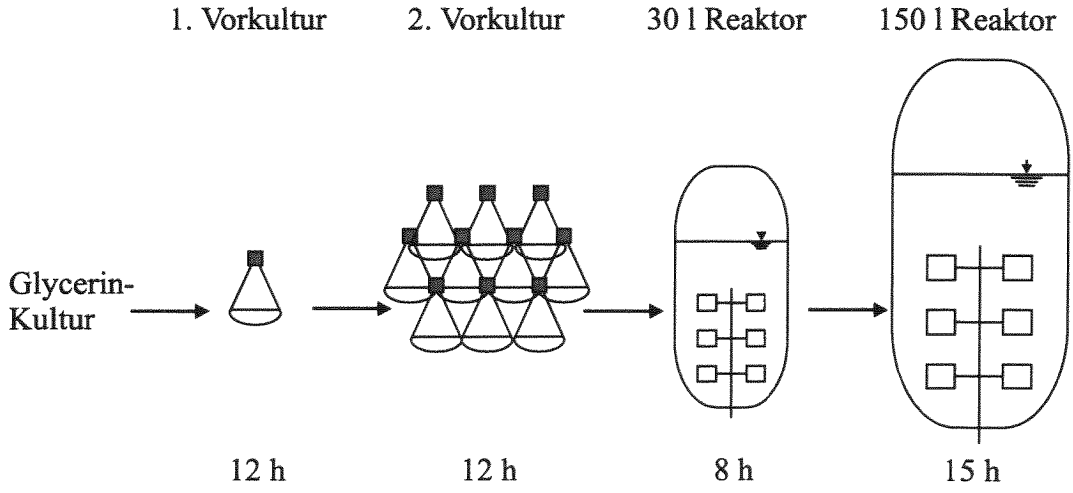

Abbildung 4.7: Schematischer Verlauf der Vorkulturstufen zur Produktion von PhCT2 im 150 l Fedbatch Verfahren

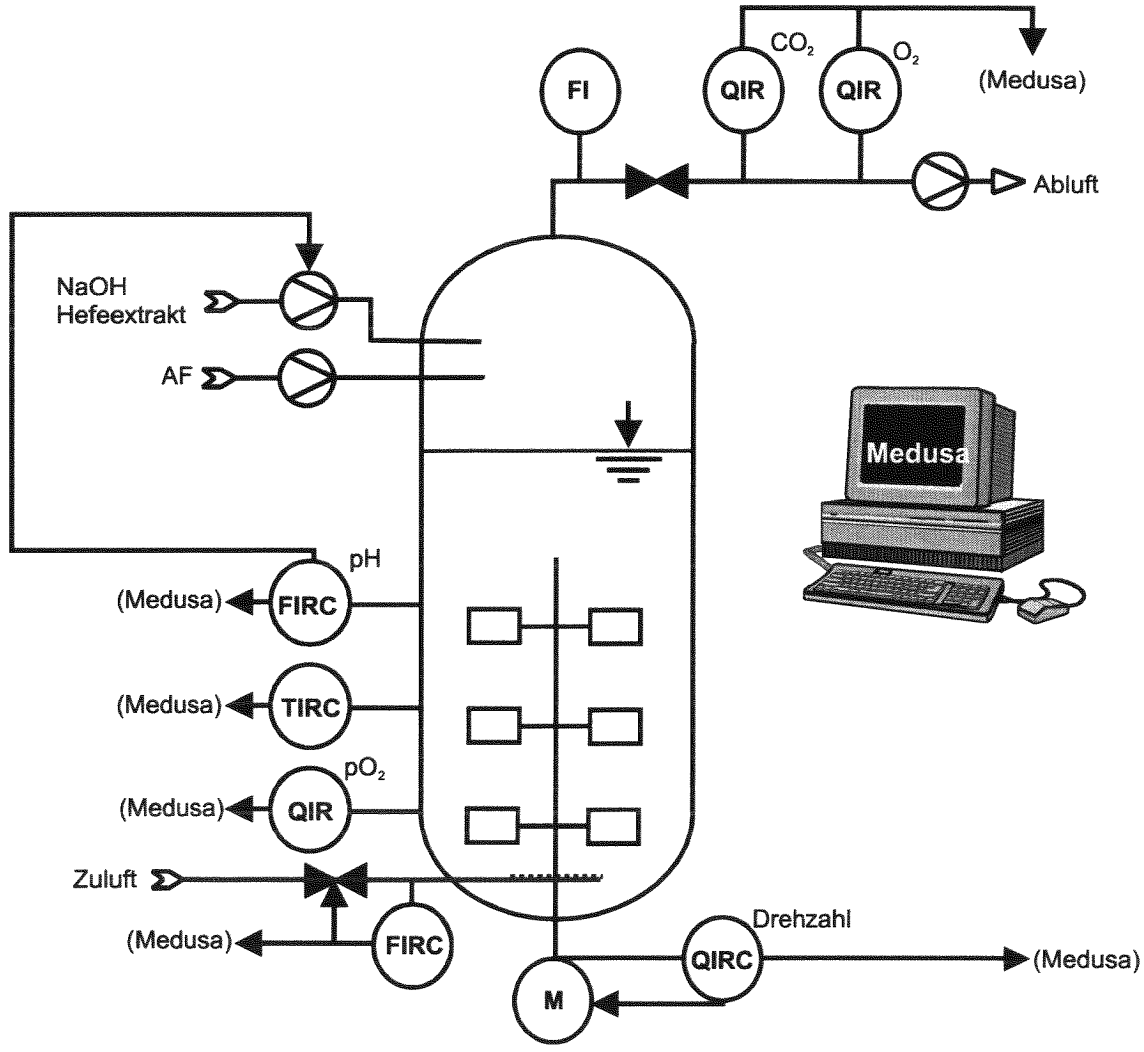

Abbildung 4.8: Anlagenschema mit MSR-Einheiten: Fedbatch Fermentationen zur Produktion im 150 l Rührkesselreaktor. Die Beschriftung der MSR (Messen, Steuern, Regeln) erfolgt nach DIN 19227: T (Temperatur), W (Masse), F (Durchfluß), Q (zu definierende Qualitätsgröße), I (Anzeige), R (Registrierung), C (selbständige Regelung). Alle Daten werden mit 5 min Abtastzeit von dem Datenerfassungsprogramm „MEDUSA“ aufgenommen.

4.8 *On-line* Analytik und Datenerfassung

4.8.1 pH-Wert

Der pH-Wert der Kultur wird mit einer Einstabmeßzelle mit zwei Elektrolytkammern (Fermprobe, Broadley James, Irvine, USA) gemessen. Die *on-line* Werte werden bei jeder Probenahme durch *off-line* Messungen überprüft. Bei zu großen Abweichungen (> 0,2 pH-Einheiten) wird der Sollwert oder der Nullpunkt nachkorrigiert.

4.8.2 Sauerstoffpartialdruck

Die Messung des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 erfolgt amperometrisch (Oxyprobe, Broadley James, Irvine, USA). Die Kalibrierung wurde bereits bei den einzelnen Reaktorsystemen beschrieben.

4.8.3 CO_2 und O_2 im Abgas

Für die Abgasanalytik wird ein Teil des Abluftstromes nach einem Sterilfilter und einer Waschflasche durch einen Abgaskühler mit integriertem Kondensatabscheider geleitet. Der CO_2-Gehalt in Volumenprozent wird durch Infrarotabsorption (Binos, Leybold-Heraeus, Hanau) und der O_2-Gehalt in Volumenprozent paramagnetisch (Oxynos, Rosemount, Weßling) bestimmt. Zur Einstellung eines konstanten Volumenstroms wird nach den Analysengeräten eine Gasmembranpumpe angebracht. Die Abgasanalytik wird vor jeder Fermentation mit definierten Gasgemischen kalibriert.

4.8.4 Datenerfassung

Die Datenerfassung aller Fermentationsprozesse erfolgt mit dem Programm MEDUSA 2.0 (Forschungszentum Jülich GmbH, IBT2). Für die Erfassung der analogen Signale wird am SMP-Interface ein Analogeingang konfiguriert. Alle Daten werden mit einer Abtastzeit von 5 min aufgenommen. Diese werden mit den *off-line* Daten der Probenahmen verglichen und bei Bedarf an diese angepaßt.

4.9 Produktanalytik

4.9.1 Gesamtproteinbestimmungen

Bradford

Die Proteinbestimmung in den Fermentationsproben wird nach dem Standardassay der Firma BIORAD (München) mit BSA als Standard durchgeführt.

BCA

Für die BCA-Proteinbestimmung werden Fertiglösungen der Firma Pierce mit BSA als Standard eingesetzt.

Gravimetrische Messung

Zur gravimetrischen Proteinbestimmung werden TCA-gefällte Proteinpellets (s. 4.10.2) als Dreifachbestimmung bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

4.9.2 Spaltung der Fusionsproteine

Saurer Hydrolyseaufschluß und Argininbestimmung im Kulturüberstand

Die Größenordnung der Clostripainmenge, die für die Spaltung von Proteinen in Fermentationsüberständen notwendig ist, wird über den Anteil von Arginin am Gesamtproteingehalt ermittelt. Die Kulturüberstände von *S. carnosus* pXPhCT2 und pXR100 werden einer sauren Hydrolyse unterzogen und nach einer Proteinfällung mittels HPLC der Gehalt an Arginin bestimmt.

Bei der sauren Hydrolyse werden jeweils 2 ml Probe mit 3 ml konz. HCl (Endkonzentration 6,1 mol l^{-1}) versetzt. Die Proben werden 10-15 min mit Stickstoff begast und gut verschlossen in Hydrolysegläsern 19 Stunden bei 110°C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen werden die Gläser geöffnet und die Säure im Rotationsverdampfer eingedampft. Der trockene Rückstand wird in etwa 1 ml H_2O bidest. gelöst und erneut eingedampft. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis der pH-Wert der wäßrigen Lösung über pH 4 liegt. Der letzte Rückstand wird in genau 1 ml H_2O bidest. aufgenommen. Die Lösung wird zentrifugiert und der Überstand separiert.

Je 0,5 ml des Überstandes werden mit 0,1 ml Trichloressigsäure (360 g l^{-1}) versetzt und 30 s geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min, 4°C) werden 300 µl des

Überstandes entnommen und 15 µl NaOH (4,5 mol l^{-1}) hinzugefügt. Der Arginingehalt wird mittels HPLC gemessen (s. 4.10.5).

Clostripain-Verdau

Die im Folgenden beschriebenen Bedingungen wurden aus der Literatur zusammengestellt (Dumuis-Kervabon et al. 1986, Encontre et al. 1988, Manalan et al. 1985, Nishimura et al. 1993, Yamagushi et al. 1995).

Das Enzym Clostripain (Clostridiopeptidase B, M = 50 kD, EC 3.4.22.8) ist eine Cystein-Protease und muß zunächst unter reduzierenden Bedingungen aktiviert werden. Dazu wird es in Aktivierungspuffer gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Verdau erfolgt ebenfalls in Gegenwart des Cofaktors Calcium unter reduzierenden Bedingungen. Die Proben werden mit Probenpuffer, der in 10facher Konzentration angesetzt ist, verdünnt. Nach Zugabe der entsprechenden aktivierten Enzymmenge wird die Proteolyse bei 37°C in einem Wasserbad durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge und die Verdauzeit werden variiert. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Proben entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer 0,67 M EDTA-Lösung (Endkonzentration: 0,02 mol l^{-1}) gestoppt. Diese wird durch Lösen in 5 M NaOH und durch weitere Zugabe von 11,25 M NaOH hergestellt.

Aktivierungspuffer

Calciumacetat	1 mmol l^{-1}
DTT	2,5 mmol l^{-1}

Die Calciumacetatlösung wird durch Lösen von Calciumhydroxid (1 mmol l^{-1}) in essigsaurer Lösung (2 mmol l^{-1}) hergestellt. Das Reduktionsmittel (Stammlösung 1 mol l^{-1}) wird jeweils bei Gebrauch zu dem Aktivierungspuffer gegeben.

Probenpuffer (Endkonzentrationen im Verdauansatz)

Tris	20 mmol l^{-1}
$CaCl_2$	1 mmol l^{-1}
NaCl	20 mmol l^{-1}
DTT	2,5 mmol l^{-1}

Der pH-Wert wird mit HCl (32 %) auf pH 7,5 titriert. Der Probenpuffer wird als 10fach Konzentrat angesetzt. Die Zugabe von DTT erfolgt direkt in den Verdauansatz.

HPLC-Analytik

Es steht ein Protokoll des Industriepartners für die analytische Trennung zur Verfügung, das auf die vorhandene präparative Anlage mit folgenden Spezifikationen übertragen wird:

HLPC:	Beckman, München	
Detektion:	Diodenarray-Detektor (DAD)	
Meßwellenlängen:	215 nm und 280 nm	
Flow:	8 ml min^{-1}	
Injektionsvolumen:	max. 5 ml	
Temperatur:	25°C	
Säule:	Kromasil 10 C18, 250 mm x 10 mm Innendurchmesser (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)	
Laufmittel (Lösung A):	0,1 % TFA in H_2O	
Elutionsmittel (Lösung B):	80 % ACN, 0,1 % TFA in H_2O	
Elutionsprofil:	0 min	30 % Lösung B
	15 min	30 % Lösung B
	45 min	62,5 % Lösung B
	55 min	62,5 % Lösung B
	60 min	30 % Lösung B
	70 min	30 % Lösung B
Fraktionsvolumen:	8 ml	

4.9.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Probenvorbereitung und Gelelektrophorese wird nach der Anleitung der Firma NOVEX™, Frankfurt (12/97) durchgeführt. Änderungen werden besonders genannt.

Es werden NuPAGE™-Gradientengele (4-12% Bis-Tris Gel, 1 mm dick) der Firma NOVEX verwendet. Die Proben werden vor der Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen denaturiert. Das Proteinpellet gefällter Proben (s. 4.10.2) wird in 65 µl H_2O bidest. aufgenommen bzw. 65 µl Probenvolumen mit 25 µl Probenpuffer (NOVEX) und 10 µl einer DTT-Stammlösung (1 mol l^{-1}) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert.

Der MES-Laufpuffer wird als 20faches Konzentrat angesetzt.

MES	1 mol l^{-1}
Tris Base	1 mol l^{-1}
SDS	$69{,}3*10^{-3}$ mol l^{-1}
EDTA	$20{,}5*10^{-3}$ mol l^{-1}

Der Puffer wird über Nacht auf einem Magnetrührer gelöst und nicht gelöste Partikel durch einen Faltenfilter abgetrennt. Bei der Gelelektrophorese wird der Puffer in einfacher Konzentration eingesetzt.

MOPS-Laufpuffer wird als 20fach Konzentrat von der Firma NOVEX bezogen.

Bei der Auftrennung wird die angelegte Spannung bei 150 V gehalten. Die Auftrennung ist beendet, wenn die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hat. Als Molekulargewichtsmarker wird ein vorgefärbter Marker (SeeBlue^{TM}) der Firma NOVEX eingesetzt.

4.9.4 Coomassie-Färbung

Die Gele werden 1 h in Färbelösung gefärbt und in Entfärbelösung bis zum Sichtbar werden der Banden entfärbt.

Färbelösung

Coomassie Brillant Blue R250	2,5 g l^{-1}
Ethanol (96%)	454 ml l^{-1}
Eisessig	92 ml l^{-1}

Die Lösung wird über einen Faltenfilter filtriert und dunkel gelagert.

Entfärbelösung

Ethanol (96%)	300 ml l^{-1}
Eisessig	100 ml l^{-1}

4.9.5 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese werden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Bei der Durchführung wird sich an die Instruktionen der Firma NOVEX gehalten (12/97). Die Membran wird dann 1 h in 50 ml Lösung I bei 37°C gerüttelt. Nach Ersetzen der Blockierlösung durch 25 ml Lösung II, die 25 µl hCT-Antikörperlösung enthält, werden die Membranen 1 h bei 37°C inkubiert. Zweimaligem Waschen mit 50 ml Lösung II je 15 min bei 37°C folgt eine einstündige Inkubation in 25 ml Lösung II mit 4 µl einer anti-IgG-Alkalische-Phosphatase-Antikörperlösung. Nach zwei weiteren Waschschritten, wie zuvor beschrieben, werden die Membranen 10 min in 25 ml Detektionspuffer bei 37°C geschüttelt und in 5 ml Detektionspuffer mit 16,5 µl BCIP und 16,5 µl NBT entwickelt. Die Reaktion wird mit H_2O bidest. gestoppt.

Lösung I

BSA	30 g l^{-1}
NaCl	9 g l^{-1}
1 M Tris/HCl pH 7,5	10 ml l^{-1}

Lösung II

Lösung I	100 ml l^{-1}
1 M Tris/HCl pH 7,5	90 ml l^{-1}
NaCl	9 g l^{-1}
Tween 20	1 ml l^{-1}

BCIP- und NBT-Lösung

BCIP	50 mg ml^{-1} DMF (100 %)
NBT	75 mg ml^{-1} DMF (70 %)

Detektionspuffer

Tris	12,1 g l^{-1}
NaCl	5,85 g l^{-1}
$MgCl_2 * 6 H_2O$	4,76 g l^{-1}

4.9.6 ELISA

Die Menge an Fusionsprotein in Fermentationsproben wird mittels indirektem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) in Maxisorb-Mikrotiterplatten (NUNC) bestimmt. Zunächst werden 100 µl Catchingpuffer pro Well vorgelegt. In die erste Zeile der Platte werden je 100 µl Probe gegeben und mit einer 12-Kanal-Pipette (Eppendorff, Hamburg) gemischt. Mit jeweils 100 µl Catchingpuffer werden die Proben in jeder Spalte jeweils 1:2 verdünnt. Die letzte Zeile enthält nur Puffer. Die Platte wird 1h bei Raumtemperatur geschüttelt (Titramax 100, Heidolph). Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl Waschpuffer werden unspezifische Bindungsstellen durch Zusatz von 200 µl Blockierungspuffer abgesättigt (1 h schütteln). Nach einem weiteren Waschschritt wie oben beschrieben werden 100 µl hCT-Antikörperlösung (20 µl pro 10 ml Waschpuffer) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. 100 µl Anti-IgG-Alkalische-Phosphatase-Antikörperlösung wird nach dreimaligem Waschen zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation und einem letzten Waschschritt werden 100 µl Substratpuffer in die Wells gefüllt und die Extinktion bei λ = 405 nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices, USA) gemessen, wenn die Extinktion A_{405} des Standards (2 µg ml^{-1}) einen Wert von

A_{405} = 0,5 überschritten hat. Die Konzentration wird mit mindestens zwei Werten aus dem linearen Bereich (0-0,5 µg ml^{-1}) berechnet. Standard und Probe werden in einer Doppelbestimmung gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich somit für eine Probe auf mindestens vier Meßwerte.

10fach Puffer

Tris	0,1 M
NaCl	2,5 M

Der pH-Wert wird mit konzentrierter HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Catchingpuffer

10fach Puffer	10 ml
H_2O bidest.	ad 100 ml

Waschpuffer

10fach Puffer	100 ml
Tween 20	0,5 ml
BSA	1 g
H_2O bidest.	ad 1 l

Blockierungspuffer

10fach Puffer	10 ml
BSA	1 g
H_2O bidest.	ad 100 ml

Substratpuffer

Diethanolamin	1 M
$MgCl_2 * 6 H_2O$	0,5 mM
NaCl	225 mM
H_2O bidest.	ad 100 ml
p-Nitrophenylphosphat	10 mM

Der pH-Wert wird mit konzentrierter HCl auf pH 10,0 eingestellt. Das p-Nitrophenylphosphat wird jeweils frisch zugegeben.

4.10 *Off-line* Analytik

Während der Fermentationen werden in regelmäßigen Abständen Proben gezogen und neben der Produktkonzentration, die mittels ELISA gemessen wird, folgende weitere Parameter analysiert.

4.10.1 Optische Dichte und Biotrockenmassekonzentration

Die Zellsuspension wird geeignet verdünnt und bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm im Zweistrahlphotometer (Shimadzu, UV-160, Kyoto, Japan) gegen H_2O bidest. gemessen. Der lineare Meßbereich erstreckt sich von 0,05 bis 0,5.

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration werden 2 ml Zellsuspension zentrifugiert, das Pellet einmal mit 2 ml 0,9 %iger NaCl gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank getrocknet. Für die Korrelation von Optischer Dichte OD_{600} zur Biotrockenmassekonzentration ergibt sich ein Faktor von 0,27 g OD_{600}^{-1} mit einem mittleren Fehler von 3 %.

4.10.2 Proteinfällung

Für die Gelelektrophorese, GC- und HPLC-Messungen werden Proteinfällungen in den zellfreien Überständen durchgeführt. Dazu werden 1,8 ml Überstand mit 0,2 ml 100 % TCA (w/v) versetzt und die Proteine 24 h bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation werden die Überstände für GC- und HPLC-Messungen vorbereitet (s. 4.10.4, 4.10.5). Die Pellets werden mit 2 ml eiskaltem Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und für die Gelelektrophorese vorbereitet (s. 4.9.3).

4.10.3 Ammoniumkonzentration

Die Ammoniumkonzentration in den Überständen wird mit dem Enzym Glutamatdehydrogenase bestimmt. Diese setzt in Anwesenheit von 2-Oxoglutarat und NADH freies Ammonium zu Glutamat um. Der Verbrauch an NADH ist proportional zur Ammoniumkonzentration und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von λ = 340 nm verfolgt werden.

4.10.4 Extrazelluläre Nebenprodukte

Die Messung von Acetat, iso-Butyrat, iso-Valerat, 3-Methylbutyrat und Acetoin erfolgt gaschromatographisch. Dazu wurden 0,4 ml TCA-gefällter Überstand (s. 4.10.2) mit 0,4 ml internem Standard (20 mM n-Butanol, 0,2 N HCl) versetzt und mit folgender Methode analysiert.

Gaschromatograph:	Chrompack 438A
Säule:	FS-FFAP-CB-0,5; 50 m x 0,25 mm Innendurchmesser, Filmdicke 0,48 µm (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)
Trägergas:	N_2 mit Split 1:50
Detektor:	FID 250°C
Temperaturprofil:	5 min 70°C mit 18°C pro min auf 200°C 8 min 200°C

Die Kalibrierung erfolgt mit einem Standard aus 10 mM Acetat, 10 mM Acetoin, 10 mM iso-Butyrat, 10 mM iso-Valerat und 10 mM n-Butanol. Iso-Valerat und 3-Methylbutyrat können mit dieser Methode nur als Summenparameter quantifiziert werden.

4.10.5 Freie Aminosäuren

Freie Aminosäuren in TCA-gefällten Überständen (s. 4.10.2) werden mittels RP-HPLC mit Vorsäulenderivatisierung (AminoQuant 1090 AX, Hewlett-Packard, Waldbronn) quantifiziert. 0,4 ml Probe wird mit 70 µl 4 N NaOH neutralisiert. Im Alkalischen werden primäre Amine mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in Gegenwart eines Thiols (z.B. Mercaptoethonol) zu iso-Indolderivaten umgesetzt. Diese können durch Fluoreszenzemssion detektiert werden. Dabei werden folgende Bedingungen eingehalten:

Detektion:	Fluoreszenz
Meßwellenlängen:	455 nm (Excitation), 233 nm (Emission)
Säule:	Hypersil RP-18, 120 × 4 mm Innendurchmesser (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)
Injektionsvolumen:	1 µl
Flow:	0,5 ml/min
Temperatur:	40°C
Laufmittel:	0,1 M Na-Acetatpuffer pH 7,2
Elutionsmittel:	Methanol
Elutionsprofil:	Stufengradient

4.10.6 Glycerinkonzentration

Die Glycerinkonzentration wird enzymatisch bestimmt. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird Glycerin zunächst zu Glycerin-3-Phosphat umgesetzt. Das entstandene ADP wird mittels Pyruvatkinase in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat unter Pyruvat-Bildung wieder in ATP überführt. Unter Oxidation von NADH zu NAD wird

abschließend in Gegenwart des Enzyms Lactat-Dehydrogenase Pyruvat zu Lactat reduziert. Die verbrauchte NADH-Menge ist proportional zur Glycerinkonzentration und wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm gemessen.

4.10.7 Elementanalyse

50 ml Fermentationsbrühe werden zentrifugiert, das Pellet zweimal mit H_2O bidest. gewaschen und bei 80°C getrocknet. Die Analysen wurden vom „Zentralinstitut für Chemische Analysen" der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt. Für die Hauptelemente C,H,N,S werden 2 mg Probenmaterial in einem CHNS-Analysator gemessen. Über Infrarot-Absorption für die Verbrennungsgase CO_2, H_2O und SO_2 und die Wärmeleitfähigkeit für N_2 werden über interne Eichkurven, die mit Standardsubstanzen erstellt werden, die Elementkonzentrationen berechnet.

Für die Messung der Mikroelemente werden 200 mg Biomasse mit einem Gemisch aus 3 ml konzentrierter HNO_3 und 1 ml H_2O_2 im Mikrowellenofen mineralisiert und die erhaltene Lösung mit H_2O bidest. auf 10 ml aufgefüllt. Spurenelemente werden mit ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionisation), hochkonzentrierte Nebenelemente mit ICP-OES (Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionisation) bestimmt. Die Analysenergebnisse der Biomasse unter verschiedenen Reaktionsbedingungen sind im Anhang dargestellt.

4.11 Kostenabschätzung

Preise für Medienkomponenten wurden aus dem Sigma Katalog (1998) entnommen. Dabei wurde für Bulkware mit 10 % diesen Preises gerechnet. Der Hefeextrakt geht mit dem Kaufpreis ein, da es sich um einen technischen Extrakt handelt.

Der Medienpreis pro g aktives humanes Calcitonin berechnet sich aus der Summe der eingesetzten Chemikalien. Dabei wird für die Aufreinigung des Fusionsproteins eine Ausbeute von 60 % angenommen (Sandgathe, persönliche Mitteilung). Die Ausbeute für die Spaltung und Aktivierung des hCT-Precursors wurde aus den Firmenunterlagen für die Aktivierung von Hexameren aus *E. coli* mit 5 % berechnet und geht mit diesem Wert in die Kostenrechnung ein.

5 Ergebnisse

5.1 Quantifizierung der Fusionsproteine

Für diese Untersuchungen wurden ausschließlich Fermentationsüberstände eingesetzt, so daß Einflüsse homologer Proteine und des Mediums direkt berücksichtigt wurden. Es wurden Fermentationsüberstände der produzierenden Stämme jeweils direkt mit denen des Leertransformanten *S. carnosus* pXR100 verglichen[9].

Es wurden zwei prinzipiell verschiedene Ansätze verfolgt:

- Einerseits existierte für die abgespaltenen Monomere hCT-AAKKR bereits ein Protokoll für die Quantifizierung mittels RP-HPLC[10]. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine quantitative Spaltung der Fusionsproteine in den Fermentationsüberständen gewährleistet werden kann.
- Andererseits sollte eine Methode für die Messung der Fusionsproteine etabliert werden.

5.1.1 Clostripain-Verdau

In den Fusionsproteinen sind die hCT-Monomere untereinander und mit dem Propeptid über Linkersequenzen verbunden. Diese erlauben für die biologische Aktivierung in einem ersten Schritt die enzymatische Spaltung mit Arginyl-Endopeptidasen. Eine solche Peptidase, das Clostripain, wurde bereits für die Spaltung von hCT-Multimeren aus *E. coli* eingesetzt, die auch über eine Arginyl-Schnittstelle verbunden sind (Ishikawa et al. 1996).

Es konnte zunächst gezeigt werden, daß mit Clostripain grundsätzlich eine Spaltung aller Fusionsproteine aus Fermentationsüberständen möglich ist. Dies ist exemplarisch

---

[9] Dieser Ansatz wurde verfolgt, da die Fusionsproteine zunächst aus Fermentationsüberständen gereinigt werden mußten (Sandgathe 2000), um als Standard für die Quantifizierung zur Verfügung zu stehen. Dies war erst etwa in der Mitte der Arbeit der Fall.

[10] Das Protokoll wurde von dem Industriepartner des Forschungsvorhabens (Novartis AG) zur Verfügung gestellt und ist nicht veröffentlicht. Eine Trennung der um fünf Aminosäuren erweiterten hCT-Monomere hCT-AAKKR ist beispielsweise mit den von Heinitz (1988) beschriebenen Methoden möglich.

für das Fusionsprotein PhCT8 in Abbildung 5.1 dokumentiert. Die einzusetzende Enzymmenge wurde über eine Arginin-Messung in den Fermentationsüberständen nach saurer Hydrolyse ermittelt[11] und die Überstände entsprechend den aus der Literatur ermittelten Bedingungen verdaut. Allerdings nahm die Intensität der Monomer-Bande mit zunehmender Verdauzeit deutlich ab (Abbildung 5.1). Dieser Abbau ist nicht auf Exoproteasen oder zellwandgebundene Proteasen von noch im Verdauansatz vorhandenen Zellen oder Zellfragmenten zurückzuführen. Wahrscheinlich beruht er auf einer Nebenaktivität des Clostripains. Für das Enzym ist in der Literatur eine Nebenaktivität für die Hydrolyse von Lysin mit einer 300-500fach geringeren Geschwindigkeit beschrieben (Mitchell et al. 1968). Im hCT-Monomer befindet sich an Position 18 die Aminosäure Lysin, so daß hier ein weiterer Angriffspunkt für das Clostripain zu finden ist, der den Abbau erklären könnte.

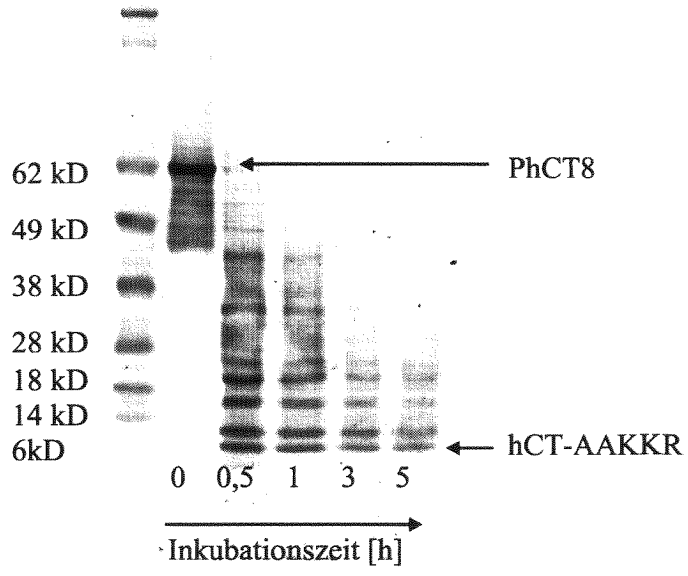

Abbildung 5.1: Western-Blot (mit hCT-Antikörpern) der Clostripain-Proteolyse eines Kulturüberstandes mit dem Fusionsprotein PhCT8 im zeitlichen Verlauf und ein Molekulargewichtsmarker.

[11] 1 Unit [U] entspricht laut Definition der Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt. Die Arginin-Messungen ergaben für *S. carnosus* pXR100 0,602 mmol l^{-1}, für *S. carnosus* pXPhCT2 1,72 mmol l^{-1}. Damit wäre mit 1 U Clostripain pro ml nach etwa 1 bzw. 2 min die Umsetzung theoretisch vollständig. Unter der Berücksichtigung, daß die Hydrolyse eventuell nicht vollständig war und der prinzipielle Einsatz des Enzyms getestet werden sollte, wurde für die ersten Verdauversuche eine Clostripainmenge von 0,5 U ml^{-1} eingesetzt.

Die stark differierenden Fusionsproteinkonzentrationen in Fermentationsproben würden für eine Routineanalytik die schnelle Ermittlung eines Parameters erfordern, an den die Clostripainmenge gekoppelt werden kann. Die Messung der Gesamtproteinmenge liefert allerdings sehr unzuverlässige Werte (Störungen durch Medienkomponenten). Eine Variation des Protein/Clostripain-Verhältnis hat gezeigt, daß in den Fermentationsüberständen keine vollständige Abspaltung der Monomere ohne weiteren Abbau gewährleistet werden kann. Da dies eine Voraussetzung für einen Einsatz als Routineanalytik von Fermentationsproben ist, ist diese Methode für die Quantifizierung ungeeignet.

Die Untersuchungen haben allerdings gezeigt, daß der erste Schritt auf dem Wege zum biologisch aktiven hCT auch bei den Fusionsproteinen aus *S. carnosus* möglich ist. Die Spaltung des teilgereinigten PhCT2 hat weiterhin gezeigt, daß die Monomere mittels präparativer HPLC gereinigt werden können, wie es das Protokoll für die Spaltung und Aktivierung von hCT-Multimeren aus *E. coli* vorsieht.

5.1.2 Quantifizierung der Fusionsproteine

Chromatographische Methoden

Der Einsatz chromatographischer Methoden bietet den Vorteil der Automatisierbarkeit der Messung. Die Probenvorbereitung ist davon allerdings ausgenommen. Da für diese Untersuchungen kein geeigneter Standard zur Verfügung stand, sollte anhand von theoretischen Überlegungen und einigen Vorversuchen mit Positiv- und Negativkontrollen untersucht werden, welche Methoden prinzipiell in Frage kommen. Die Untersuchungen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Gelpermeationschromatographie

Mit dieser Methode können Proteine nach ihrer Molekülgröße (Raumerfüllung) getrennt werden. Ein wichtiger Parameter ist das Probenvolumen. Es sollte für eine optimale Trennung möglichst gering sein. Da zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über die zu erwartenden Produktkonzentrationen möglich war, wurde diese Methode nicht getestet.

Reversed Phase HPLC

Bei dieser Methode adsorbieren Proteine in polaren wäßrigen Lösungsmitteln an eine unpolare stationäre Phase und eluieren im zunehmenden unpolaren Lösungsmittelgradienten entsprechend ihrer Hydrophobizität.

In der Literatur sind zahlreiche Methoden für die Trennung von Proteinen mit Acetonitril als Lösungsmittel und TFA als Ionenpaarreagenz beschrieben (Aguilar et al. 1991). Vorversuche mit den Fermentationsüberständen haben gezeigt, daß diese Methode für die Trennung der Fusionsproteine nicht in Frage kommt. Die Proteine fallen bereits bei Acetonitrilkonzentrationen von 30 % aus, so daß sie von der Säule nicht eluiert werden, sondern dort ausfallen und nicht mehr detektiert werden können. Bei niedrigeren Konzentrationen an Acetonitril kann in UV-Spektren nach Auftrennungen über C18- und C4-Säulen von Fermentationsproben im Vergleich zur Negativkontrolle kein zusätzlicher Peak gefunden werden, der eventuell dem Fusionsprotein zugeordnet werden könnte.

Ionenaustauschchromatographie

Mit dieser Methode können Proteine aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften abhängig vom pH-Wert über die Bindung an ionisch geladene Austauschermaterialien getrennt werden. Bei der Reproduzierbarkeit der Ionenaustauschchromatographie spielt die Leitfähigkeit der Probe eine entscheidende Rolle. Aufgrund der stark differierenden Medienzusammensetzungen müssen Fermentationsproben zunächst entsalzt werden. Weiterhin erfordert diese Methode eine aufwendige Equilibrierung und Reinigung der Säule. Für eine Routineanalytik wurde diese daher nicht in Betracht gezogen.

ELISA

Eine Quantifizierung von Proteinen ist prinzipiell mittels **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** möglich. Zunächst wurde der Einsatz der indirekten Methode untersucht (Abbildung 5.2).

Auf einem festen Untergrund binden die Proteine der Proben. Der Primärantikörper geht eine antigenspezifische Bindung mit dem Zielprotein (Antigen) ein. Der

Sekundärantikörper besitzt eine anti-Primärantikörper spezifische Bindedomäne. An den Sekundärantikörper ist kovalent das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt. Dieses katalysiert den Umsatz des farblosen Substrates p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol, das ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 405$ nm hat. Da zwischen dem an der Oberfläche gebundenen Zielprotein und dem freigesetzten p-Nitrophenol ein Zusammenhang, der photometrisch quantifizierbar ist, besteht, kann mit Hilfe einer Standardeichkurve der Proteingehalt spezifisch detektiert werden. Dieses System zeigt eine sehr hohe Sensitivität, da der zweite Antikörper mit dem Enzym als Amplifikator wirkt.

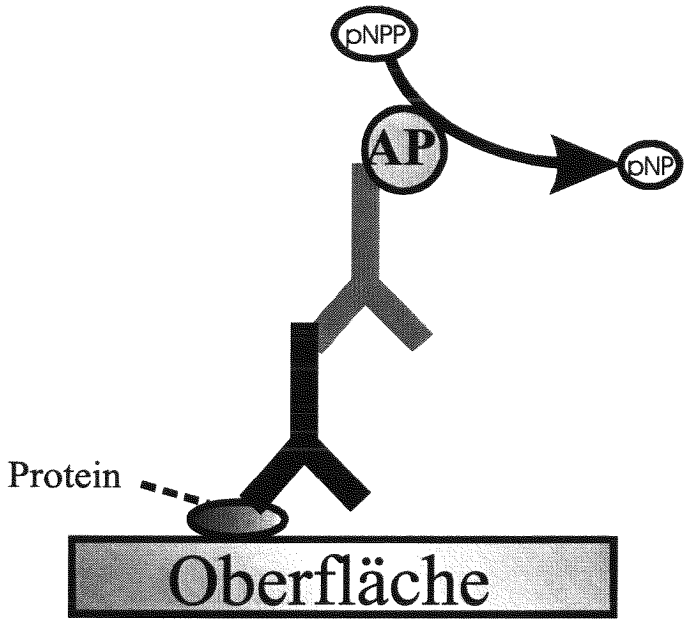

Abbildung 5.2: Indirekte ELISA-Methode (Primärantikörper = schwarz; Sekundärantikörper = grau; AP = Alkalische Phosphatase, kovalent an den Sekundärantikörper gebunden; pNPP = p-Nitrophenylphosphat; pNP = p-Nitrophenol).

Da die Fermentationsproben aus einem heterogenen Proteingemisch bestehen, spielt die Auswahl eines geeigneten Primärantikörpers eine wesentliche Rolle. Es muß gewährleistet werden, daß homologe Staphylococcen-Proteine nicht als Antigene wirken. Wünschenswert wäre dabei der Einsatz eines monoklonalen Antikörpers, da dieser spezifisch mit einer bestimmten Sequenz des Antigens, die aus acht Aminosäuren besteht, reagiert. Ein solcher konnte allerdings nicht bezogen werden. Polyklonale Antikörper gegen hCT sind hingegen weit verbreitet. Da diese Lösungen sehr teuer sind, wurde nach einer Recherche eine polyklonale Antikörperlösung der Firma ICN (Eschwege, D) getestet. Diese war die kostengünstigste.

Nachdem mit dem ausgewählten Protokoll in den Fermentationsüberständen der Produktionsstämme Signale detektiert werden konnten, mußte im Folgenden die Bindung an homologe Proteine in den Proben ausgeschlossen werden. Die Analyse von Überstanden des Leertransformanten *S. carnosus* pXR100 ergaben keine Signale im ELISA. Somit kann der polyklonale Antikörper eingesetzt werden. Anschließende Untersuchungen mit den verschiedenen Fusionsproteinen (aus Fermentationsproben) und dem aktiven hCT ergaben, daß aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften eine Kalibrierung nur mit den Fusionsproteinen als Referenz möglich ist. Damit war zunächst gezeigt, daß diese Methode prinzipiell als quantitative Meßmethode in Frage kommt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit stand das Fusionsprotein PhCT2 in gereinigter Form zur Verfügung. Für dieses wurde zunächst untersucht, in welchem Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Extinktion bei λ = 405 nm existiert (Abbildung 5.3). Dieser liegt bei 0-0,5 µg ml^{-1}. Für die Standardisierung der Messung wurde eine Stammlösung des Fusionsproteins von 100 µg ml^{-1} hergestellt, die aliquotiert und bei -20°C gelagert wurde. Diese wurde vor jeder Messung aufgetaut und 1:50 verdünnt. Damit ergibt sich für den Standard ein Konzentrationsbereich von 0-2 µg ml^{-1}. Dies ist notwendig, da gezeigt werden konnte, daß das Protein bei einer Lagerung in geringeren Konzentrationen instabil ist. Für die Messung der Fermentationsproben ergibt sich damit, daß diese unmittelbar vor dem Ansetzen des ELISAs verdünnt werden.

Somit steht eine Methode für die Quantifizierung des Fusionsproteins PhCT2 in Fermentationsüberständen zur Verfügung. Diese zeichnet sich durch eine geringe Nachweisgrenze aus. Weiterhin kann sie auf die weiteren hCT-Fusionsproteine übertragen werden, wenn diese in gereinigter Form vorliegen. Aufgrund der geringen Nachweisgrenze und der Bindungseigenschaften der Proteine in Abhängigkeit von dem Solvens ist ein Fehler von 5-15 % mit in Betracht zu ziehen.

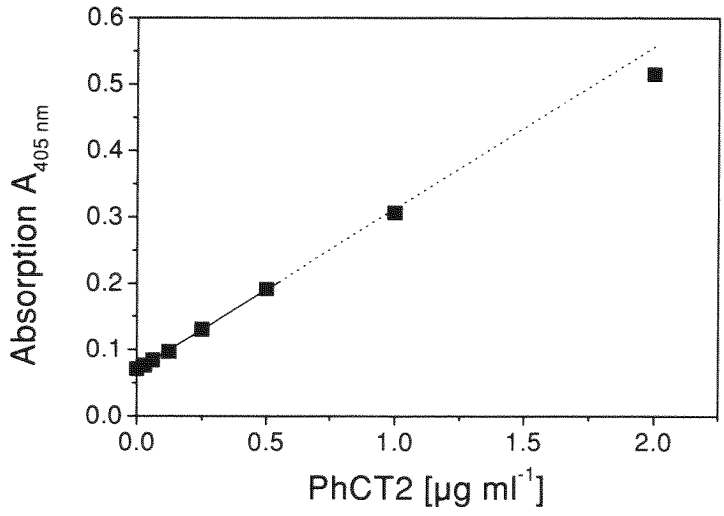

Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Absorption bei λ = 405 nm von der PhCT2-Konzentration im ELISA mit polyklonalen hCT-Primärantikörpern.

Redundanzmessungen über den Gesamtproteingehalt von Fermentationsproben ergaben mit allen Proteinbestimmungsmethoden (Bradford, BCA, gravimetrische Messung), daß der Gesamtproteingehalt etwa 40 % oberhalb der gemessenen Fusionsproteinkonzentration liegt. Dies entspricht auch den Ergebnissen aus SDS-Gelen mit Coomassie-Färbung (s. auch Abbildung 5.6). Bei den anderen Proteinen handelt es sich ausschließlich um Staphylococcen-Proteine. Diese werden entweder von dem Organismus sekretiert oder stammen von lysierten Zellen.

5.2 Charakterisierung der produzierenden Stämme

5.2.1 Promotorauswahl

Bei der Expression von heterologen Proteinen mit *S. carnosus* stehen zwei grundsätzlich verschiedene Promotoren zur Verfügung: Ein konstitutiver Lipase-Promotor aus *S. hyicus* und ein xyloseinduzierbarer Promotor aus *S. xylosus*. Da die Stärke des Promotors einen entscheidenden Einfluß auf die extrazelluläre Produktmenge hat, wurden zunächst die Stämme *S. carnosus* pLPhCT2 (konstitutiver Promotor) und *S. carnosus* pXPhCT2 (induzierbarer Promotor) im Rührkesselreaktor auf LB-Medium unter Produktionsbedingungen kultiviert. Bei gleichem Wachstumsverlauf beträgt die Produktkonzentration bei dem xyloseinduzierbaren System 200 mg l^{-1} im Vergleich

zum konstitutiven mit 13 mg l^{-1} (Abbildung 5.4). Mit dem induzierbaren System steht ein sehr starker Promotor zur Verfügung. Die integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ beträgt $Y_{P/X}$ = 66 mg g^{-1} und ist im Vergleich zum konstitutiven Promotor mit $Y_{P/X}$ = 4 mg g^{-1} um Faktor 16 höher.

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse wurden für alle folgenden Untersuchungen Stämme eingesetzt, die das Fusionsprotein unter der Kontrolle des xyloseinduzierbaren Promotors exprimieren.

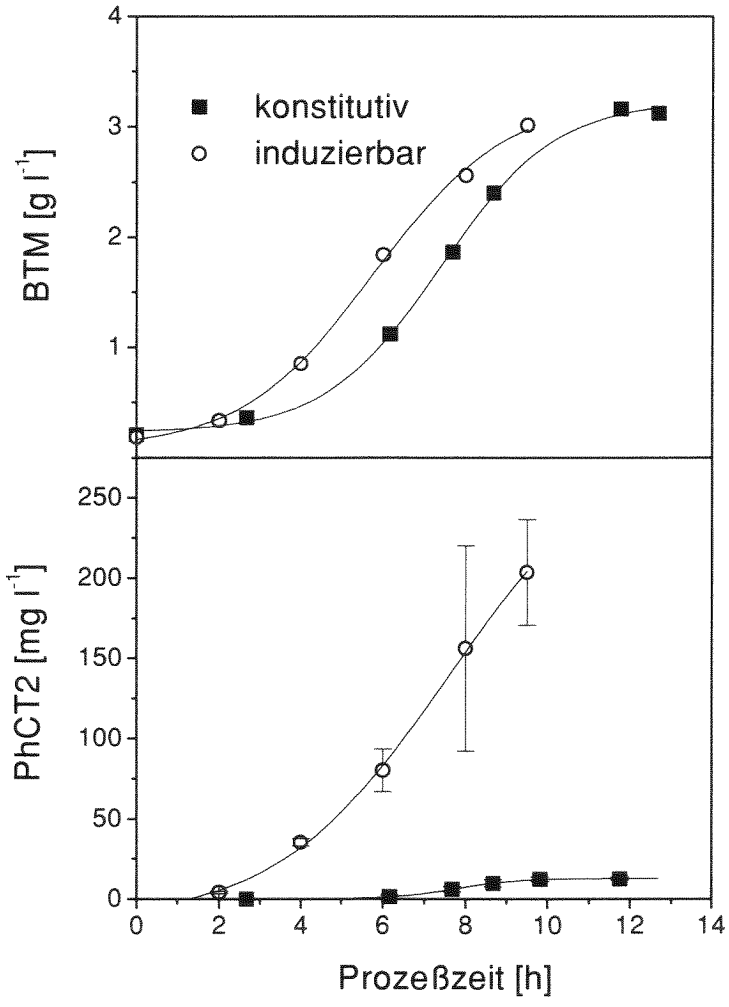

Abbildung 5.4: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM und der PhCT2-Konzentration in Batch Verfahren der Stämme *S. carnosus* pLPhCT2 und *S. carnosus* pXPhCT2 auf LB-Medium unter Produktionsbedingungen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 5 %).

5.2.2 Einfluß der Anzahl an hCT-Repeats auf die Sekretion

Aus dem Bereich der Stammentwicklung wurden drei genetisch stabile Produktionsstämme zur Verfügung gestellt. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der hCT-Repeats im Fusionsprotein (Abbildung 5.5). Die Stämme wurden auf LB-Medium im Rührkesselreaktor im Batch Verfahren kultiviert und die Menge an Fusionsprotein in einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 5.6). Dabei sinkt die Endkonzentration der Fusionsproteine mit steigender Anzahl an Repeats. Die hCT-Konzentration wurde mittels ELISA mit dem Fusionsprotein PhCT2 als Standard[12] quantifiziert (Tabelle 5.1). Dabei werden unabhängig vom Fusionsprotein annähernd gleiche Konzentrationen an hCT erreicht. Die Abschätzung der hCT-Konzentrationen aus SDS-Gelen mit Coomassie-Färbung (Abbildung 5.6) und Western-Blots mit hCT-Antikörpern (Daten nicht gezeigt) unter denaturierenden Bedingungen zeigen die gleichen Ergebnisse.

Da die Anzahl der hCT-Repeats wahrscheinlich keinen Einfluß auf die produzierte hCT-Menge hat, wurden exemplarisch alle weiteren Untersuchungen mit dem Stamm *S. carnosus* pXPhCT2 durchgeführt.

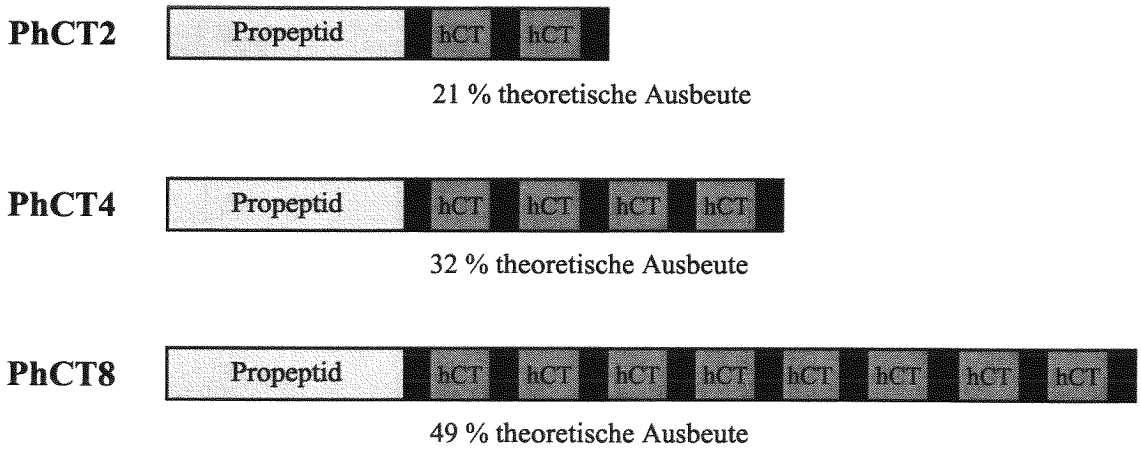

Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der extrazellulären Formen der Fusionsproteine PhCT2, PhCT4 und PhCT8. Die theoretischen Ausbeuten beziehen sich auf den Prozentanteil von hCT (dunkelgrau) am gesamten Fusionsprotein (Propeptid = hellgrau, Linker = schwarz).

[12] In der vorliegenden Arbeit standen die Fusionsproteine PhCT4 und PhCT8 nicht als Standards für eine Quantifizierung zur Verfügung. Bei der Auswertung des ELISAs mit dem Fusionsprotein PhCT2 als Standard wurde angenommen, daß die Fusionsproteine die gleichen Bindungseigenschaften besitzen und alle Bindungsstellen für die hCT-Antikörper in den Fusionsproteinen frei zugänglich sind.

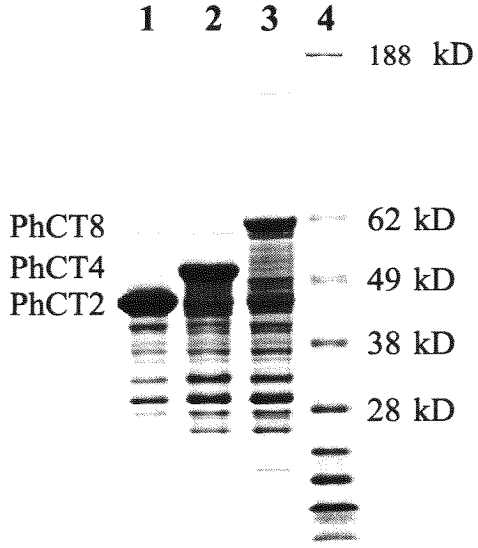

Abbildung 5.6: SDS-PAGE (NuPAGE 4-12 %, MES-Laufpuffer, Coomassie-Färbung) von Überständen aus Batch Fermentationen der Stämme *S. carnosus* pXPhCT2 (Spur 1), *S. carnosus* pXPhCT4 (Spur 2), *S. carnosus* pXPhCT8 (Spur 3) auf LB-Medium (pH 7, 37°C, $pO_2 > 5$ %) nach 9 h und einem Marker (Spur 4). Die Proben wurden biomassespezifisch aufgetragen.

Tabelle 5.1: Molekulargewichte, Endkonzentrationen der Fusionsproteine in Batch Verfahren auf LB-Medium (pH 7, 37°C, $pO_2 > 5$ %) und hCT-Konzentration der Fusionsproteine PhCT2, PhCT4 und PhCT8.

Protein	Molekulargewicht [kD]	Fusionsprotein [mg l^{-1}]	hCT-Konzentration [mg l^{-1}]
PhCT2	32	219 ± 28	46 ± 6
PhCT4	40	150 ± 20	48 ± 6
PhCT8	56	107 ± 14	49 ± 7

5.3 Phänotypische Stabilität

Bei der Prozeßentwicklung spielt die Stabilität des Produktionsstammes eine wesentliche Rolle. Unter phänotypischer Stabilität[13] soll in diesem Zusammenhang die Abhängigkeit der biomassespezifischen Produktselektivität $Y_{P/X}$ auf Proteinebene von der Anzahl der Generationen verstanden werden. Dazu wurde *S. carnosus* pXPhCT2 im Chemostaten unter induzierten Bedingungen kultiviert. Im steady-state (D_1 = 0,42 h^{-1},

[13] Eine Veränderung des Phänotyps geht wahrscheinlich mit einer Veränderung auf genetischer Ebene einher. Da Untersuchungen auf genetischer Ebene in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, wird der Begriff phänotypische Stabilität verwendet.

D_2 = 0,55 h^{-1}, D_3 = 0,63 h^{-1}) wurden Zellen entnommen, mit Medium gewaschen und Batch Fermentationen (induziert) inokuliert. Die integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ sinkt deutlich mit steigender Anzahl an Generationen und beträgt nach 45 Generationen nur noch 30 % der Ausgangsselektivität (Abbildung 5.7).

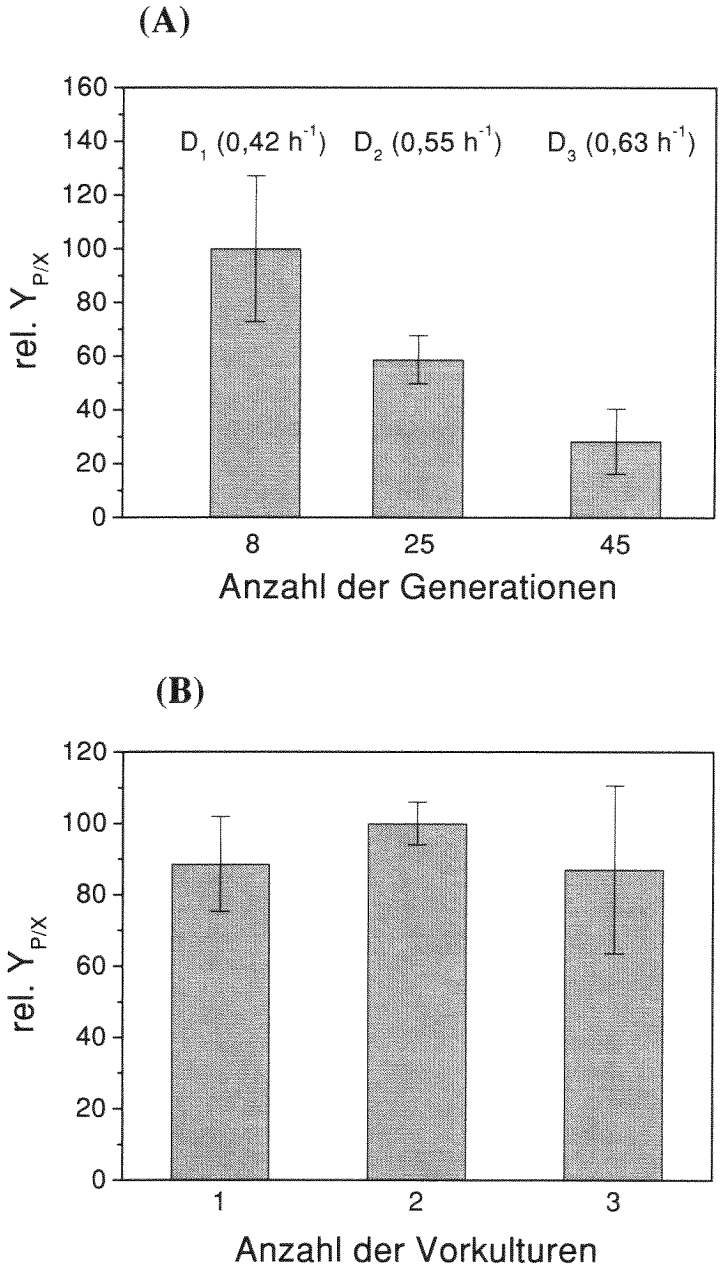

Abbildung 5.7: Abhängigkeit der relativen biomassespezifischen PhCT2-Selektivität rel. $Y_{P/X}$ von der Anzahl der Generationen (A) und von der Anzahl der Vorkulturstufen (B), die Vorkulturen wurden zur Repression des Promotors mit 10 g l^{-1} Glucose versetzt (37°C, pH 7, pO_2 > 5 %).

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, daß der Stamm für eine kontinuierliche Prozeßführung nicht geeignet ist. Andererseits ergeben sich Probleme für die Reproduzierbarkeit vor allem in Hinblick auf die Übertragung in den technischen Maßstab. Diese erfordert eine höhere Anzahl an Generationen durch mehr Vorkulturstufen. Deshalb wurde untersucht, ob durch Repression des Promotors (Zusatz von 10 g l^{-1} Glucose) in den Vorkulturen die biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ über eine höhere Anzahl von Generationen aufrecht gehalten werden kann (Abbildung 5.7). In Abhängigkeit von der Anzahl der Vorkulturen wird in diesem Fall keine signifikante Abnahme der Selektivität $Y_{P/X}$ beobachtet. Drei Vorkulturstufen entsprechen etwa 25 Generationen und sind für Fermentationen bis in den m^3-Maßstab ausreichend.

5.4 Synthetische Medien und Kohlenstoffquellen

Zunächst wurde im Schüttelkolben ein definiertes Medium für das Wachstum von *S. carnosus* entwickelt. Basis dieser Untersuchungen war ein Minimalmedium für das Wachstum von *Bacillus subtilis* (van Dijl et al. 1991), das zusätzlich mit Spurenelementen, Vitaminen und Aminosäuren versetzt wurde. Ausgehend von auf LB-Medium gewachsenen Kulturen wurde das Wachstum von *S. carnosus* im Schüttelkolben mit der Kohlenstoffquelle Glucose über mehrere Kulturstufen bewertet (Abbildung 5.8).

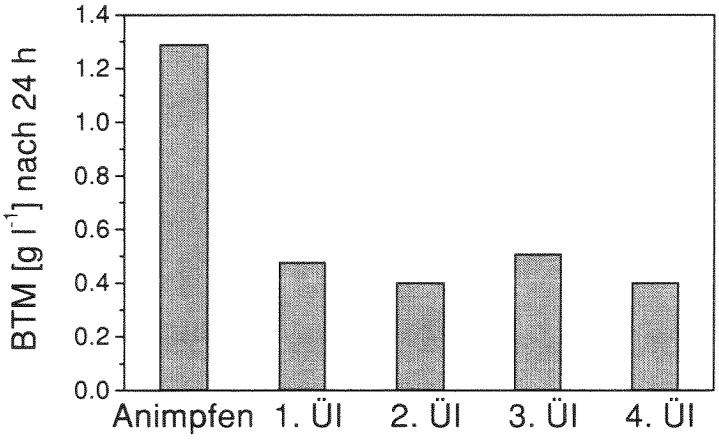

Abbildung 5.8: Biotrockenmassekonzentration BTM von *S. carnosus* nach 24 h beim Wachstum auf einem synthetischen Medium nach mehrmaligem Überimpfen ÜI im Schüttelkolben (Batch Verfahren, V = 0,1 l; 37°C).

In der ersten Stufe wurden Biotrockenmassekonzentrationen von 1,3 g l^{-1} erreicht. Nach dem ersten bis zum vierten Überimpfen beträgt sie nach 24 h etwa 0,5 g l^{-1}. Der pH-Wert aller Kulturen lag nach 24 h im Bereich pH 4-4,5, so daß das Wachstum wahrscheinlich aufgrund einer Inhibierung durch den pH-Wert zum Erliegen kommt. Die Ergebnisse zeigen, daß dieses Medium als geeignet für das Wachstum von *S. carnosus* bewertet werden kann.

Mit der nicht reprimierenden Kohlenstoffquelle Glycerin wurde mit diesem Medium in Blasensäulenreaktoren unter pH-geregelten Bedingungen mit dem Stamm *S. carnosus* pXPhCT2 auch Produktbildung beobachtet. Die PhCT2-Konzentration nach 24 h beträgt 9 mg l^{-1} bei einer Biotrockenmassekonzentration von 1,5 g l^{-1}.

Anschließend wurde das Wachstum des Wildtyps *S. carnosus* TM300 auf fünf wirtschaftlich interessanten Kohlenstoffquellen untersucht. Für Glucose, Fructose, Mannit und Lactose ergeben sich maximale spezifische Wachstumsraten μ_{max} von μ_{max} = 0,3-0,4 h^{-1} und integrale Biomasseselektivitäten $Y_{X/S}$ von $Y_{X/S}$ = 0,3 g g^{-1}. Mit Glycerin ist die Selektivität um 50 % reduziert ($Y_{X/S}$ = 0,15 g g^{-1}). Aus der Literatur ist bekannt, daß Glucose eine den xyloseinduzierbaren Promotor reprimierende und Glycerin eine nicht-reprimierende Kohlenstoffquelle ist. In weiteren Untersuchungen mit *S. carnosus* pXPhCT2 konnte gezeigt werden, daß nur mit den Kohlenstoffquellen Glycerin und Lactose extrazellulär Produkt nachgewiesen werden. Bei Lactose zeigte sich das Phänomen, daß die substratspezifische Biomasseselektivität $Y_{X/S}$ des rekombinanten Stammes im Vergleich zum Wildtyp um Faktor 2 geringer ist ($Y_{X/S}$ = 0,15 g g^{-1}). Im Vergleich zur Kohlenstoffquelle Glycerin ist auch die Produktkonzentration geringer (ca. 5 mg l^{-1} zu 9 mg l^{-1}). Die weiteren getesteten Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose und Mannit reprimieren den Promotor.

In weiteren parallelen Schüttelkolbenexperimenten wurden für *S. carnosus* TM300 die Aminosäureauxotrophien identifiziert: Der Wildtyp ist auxotroph für L-Alanin, L-Arginin, L-Asparaginsäure und L-Cystein. Im Gegensatz zu den Untersuchungen im Schüttelkolben konnte mit diesem Minimalmedium im Rührkessel kein Wachstum beobachtet werden. Durch Zusatz minimaler Mengen an Hefeextrakt (0,5 g l^{-1}) kann allerdings das Wachstum induziert werden.

Aufgrund der geringen substratspezifischen Biomasseselektivität $Y_{X/S}$ für Glycerin wurde folgende Strategie untersucht: Zunächst soll in einer Wachstumsphase mit der gut verwertbaren Kohlenstoffquelle Glucose Biomasse, in einer zweiten Phase mit Glycerin das Fusionsprotein produziert werden. Das Medium enthält die vier Aminosäuren, für die der Stamm auxotroph ist und Hefeextrakt zur Induktion des Wachstums (Abbildung 5.9). Obwohl während des Glycerinverbrauchs die extrazelluläre Proteinkonzentration ansteigt, konnte im Fermentationsüberstand kein Fusionsprotein nachgewiesen werden.

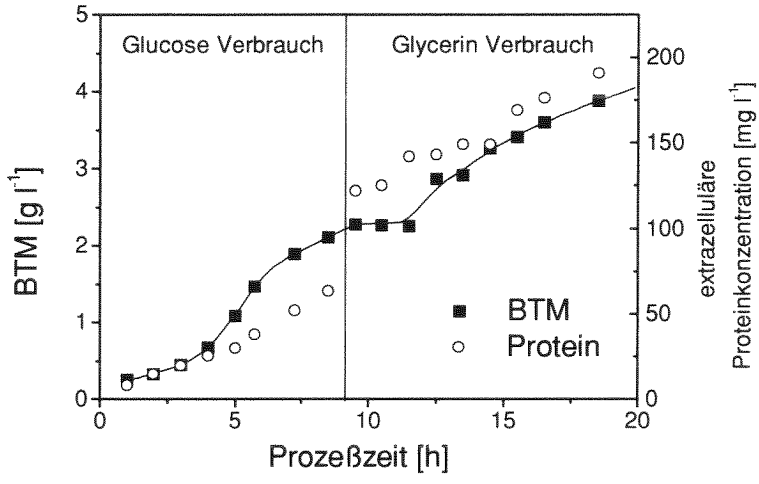

Abbildung 5.9: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM und der extrazellulären Proteinkonzentration in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, $pO_2 > 5$ %) mit Minimalmedium mit Glucose (5 g l^{-1}), Glycerin (40 g l^{-1}) und Hefeextrakt (0,5 g l^{-1}).

Die Ursache könnte in einer irreversiblen Repression des Promotors bedingt durch die Wachstumsphase mit Glucose liegen. Weiterhin wurde das Minimalmedium für das Wachstum von *S. carnosus* entwickelt, so daß Aminosäuren, die für die Expression oder Translokation essentiell sind, fehlen könnten. Außerdem kann der Induktor Xylose von *S. carnosus* nicht als Kohlenstoffquelle verwertet werden. Zur Induktion muß er allerdings in die Zelle aufgenommen werden. Der Aufnahmemechanismus ist nicht bekannt, im Minimalmedium könnte durch das Fehlen bestimmter Komponenten dieses Aufnahmesystem nicht exprimiert sein.

Identifizierung von wachstumsfördernden Substanzen im Hefeextrakt

In den Untersuchungen mit definierten Medien konnte gezeigt werden, daß das Wachstum im Rührkessel durch minimale Hefeextraktmengen induziert werden kann. Zur Identifizierung von wachstumsfördernden Substanzen im Hefeextrakt wurde dieser zunächst mittels Ultrafiltration in 3 Fraktionen (>10 kD, 3-10 kD, <3 kD) unterteilt. Diese wurden dem synthetischen Medium zugesetzt.

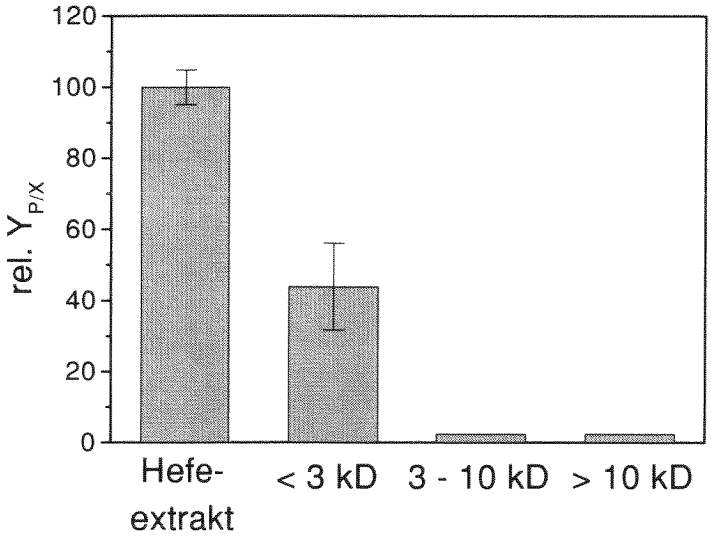

Abbildung 5.10: Relative integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivitäten rel. $Y_{P/X}$ in Abhängigkeit von den zu einem Minimalmedium supplementierten Hefeextraktfraktionen (OHLY KAT) in Batch Fermentationen (V = 0,4 l, 37°C, pH 7; pO_2 > 30 %).

In Batch Fermentationen wurde der Einfluß auf Wachstum und Produktbildung untersucht. Dabei konnte der Fraktion <3 kD im Vergleich zu den beiden anderen ein wachstumsfördernder Effekt zugeordnet werden. Auch die Produktbildung wurde positiv beeinflußt (Abbildung 5.10). Im Vergleich zum gesamten Hefeextrakt wird allerdings deutlich, daß diese Fraktion nicht alle Substanzen enthält, die die Produktbildung positiv beeinflussen. Die biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ ist um den Faktor 2,3 erniedrigt. Für die Fraktion <3 kD beträgt die substratspezifische PhCT2-Ausbeute $A_{P/S}$ bezogen auf die für die Ultrafiltration eingesetzte Hefeextraktmenge $A_{P/S} = 7{,}5 \pm 2$ mg g^{-1}. Dabei sind sowohl die biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ als auch die substratspezifische PhCT2-Ausbeute $A_{P/S}$ unabhängig von der eingesetzten Menge der Fraktion.

5.5 Komplexmedien als Hauptmedienbestandteil

5.5.1 Auswahl eines geeigneten Komplexmediums

Zunächst wurden im Schüttelkolben verschiedene Komplexmedienbestandteile (jeweils 15 g l^{-1}) getestet und die spezifische Produktivität gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 5.11). Die höchsten Produktivitäten werden mit Hefeextrakt und Fleischextrakt erzielt. Aufgrund der Problematik zum Einsatz von tierischen Medienbestandteilen bei der Produktion pharmazeutischer Produkte wurde für die folgende Untersuchungen Hefeextrakt als Medienbestandteil eingesetzt.

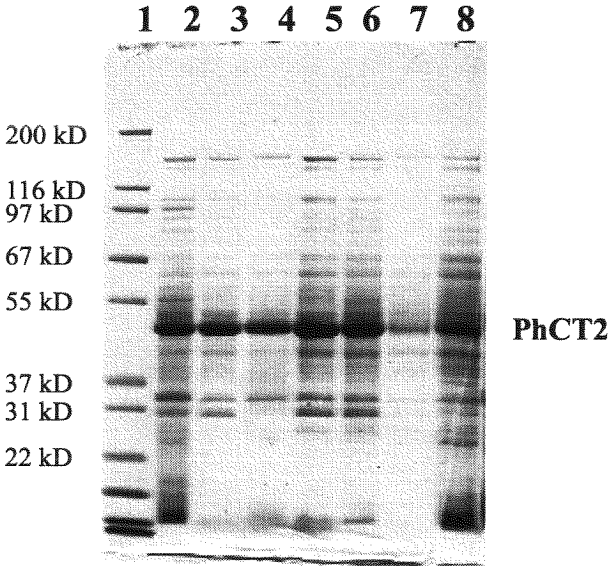

Abbildung 5.11: SDS-PAGE (NuPAGE 4-12 %, MOPS-Laufpuffer, Coomassie-Färbung) von Fermentationsüberständen mit verschiedenen Komplexmedienbestandteilen. Die Proben wurden biomassespezifisch aufgetragen. Marker (Spur 1), Brain-Heart-Infusion (Spur 2), LB-Medium (Spur 3), Sojapepton (Spur 4), Hefeextrakt (Spur 5), Fleischextrakt (Spur 6), Trypton (Spur 7), Bactopepton (Spur 8).

Bei der Prozeßentwicklung mit Komplexmedien stellen diese zumeist einen sehr kostenintensiven Bestandteil dar. Deshalb wurden Wachstum und Produktbildung mit einem technischen Hefeextrakt (OHLY KAT, Deutsche Hefewerke GmbH, Hamburg) und einem Standard-Laborhefeextrakt (Merck) verglichen (Tabelle 5.2). Der technische Extrakt wird als Komplexbestandteil bei der Antibiotika-Produktion mit Staphylococcen eingesetzt (Theobald 1998). In Anlehnung an diese Fermentation wurde der Extrakt mit einer Kohlenstoffquelle für das Wachstum von *S. carnosus* versetzt (6 g l^{-1} Glucose). Sowohl in Bezug auf das Wachstum als auch auf die Produktbildung werden dabei mit

dem technischen Extrakt höhere Konzentrationen erreicht. Aus diesen Gründen wurde dieser für die Entwicklung der Fermentation eingesetzt.

Tabelle 5.2: Biotrockenmasse- (BTM), PhCT2-Endkonzentrationen und maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}) von *S. carnosus* pXPhCT2 in Batch Fermentationen mit zwei verschiedenen Hefeextrakten (V = 2 l, 30°C, pH 6, $pO_2 > 5$ %).

Hefeextrakt	BTM [g l^{-1}]	PhCT2 [mg l^{-1}]	μ_{max} [h^{-1}]	Kosten [DM/kg]
Merck	6,2	48 ± 8	0,3	200
OHLY KAT	10,3	255 ± 55	0,36	13,5

Abbildung 5.12 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse- und der PhCT2-Konzentration in Batch Fermentationen mit dem technischen Extrakt. Die Fermentation gliedert sich in zwei Phasen. Während der Wachstumsphase mit Glucose als Kohlenstoffquelle ist der xyloseinduzierbare Promotor reprimiert. Nach 7,4 Stunden kommt die Kultur in die Glucose-Limitierung, der Promotor wird dereprimiert. Innerhalb von ca. 20 min wird der Stoffwechsel umgestellt, so daß die Zellen anschließend auf den Bestandteilen des Hefeextraktes (vor allem Aminosäuren und/oder Peptide) weiter wachsen und das Fusionsprotein PhCT2 exprimieren. Diese Umstellung wird vor allem am Verlauf des pH-Wertes deutlich. Während in der Wachstumsphase Lauge als Korrekturmittel verbraucht wird, ist in der Produktionsphase der Zusatz von Säure notwendig. In der Wachstumsphase wird Glucose hauptsächlich zu Acetat verstoffwechselt. In der Produktionsphase wird dieses verwertet. Weiterhin werden Aminosäuren als Kohlenstoff- und/oder Energiequelle genutzt. Diese werden zunächst desaminiert, freies Ammonium akkumuliert im Medium. Dies führt zu einem Anstieg des pH-Wertes.

In Abbildung 5.13 ist die Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate π_X von der spezifischen Wachstumsrate μ der Batch Fermentationen mit dem technischen Hefeextrakt dargestellt. In der Wachstumsphase steigt die spezifische Wachstumsrate bis zu einem Maximalwert von $\mu_{max} = 0{,}36\ h^{-1}$ an. Es wird kein Produkt gebildet. Nach Derepression (Glucose-Limitierung) wird innerhalb von ca. 20 min die maximale spezifische Produktbildungsrate erreicht. Diese sinkt gekoppelt an die abnehmende Wachstumsrate. Dies verdeutlicht, daß unter induzierten Bedingungen die Produktbildung wachstumsgekoppelt erfolgt.

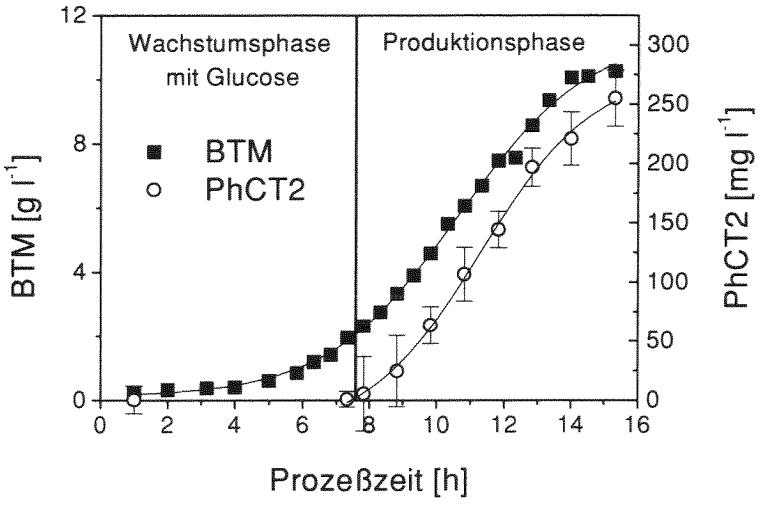

Abbildung 5.12: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM und der PhCT2-Konzentration in Batch Fermentationen (V = 2 l, 30°C, pH 6, pO_2 > 5 %) mit einem technischen Hefeextrakt (30 g l^{-1}) und Glucose (6 g l^{-1}) als Kohlenstoffquelle für das Wachstum von *S. carnosus* pXPhCT2.

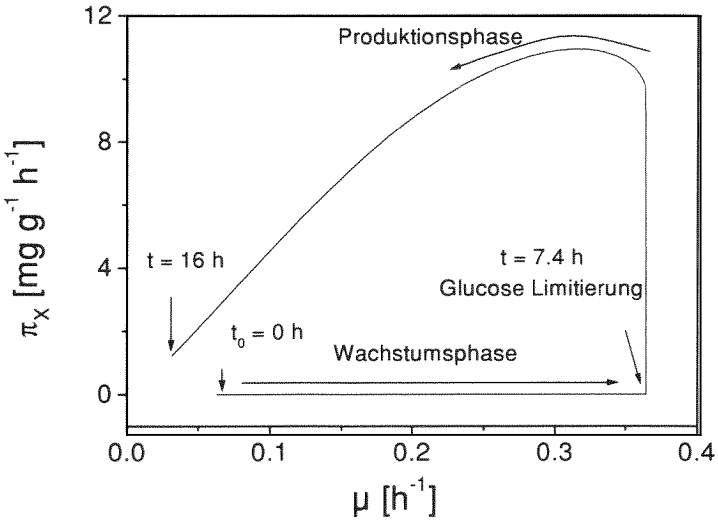

Abbildung 5.13: Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate π_X von der spezifischen Wachstumsrate μ in Batch Fermentationen mit einem technischen Hefeextrakt (30 g l^{-1}) und Glucose (6 g l^{-1}) als Kohlenstoffquelle für das Wachstum von *S. carnosus* pXPhCT2.

Einfluß der Wachstumsphase mit Glucose

Es konnte gezeigt werden, daß PhCT2 in der Produktionsphase wachstumsgekoppelt gebildet wird. Daher stellt sich die Frage, ob die Wachstumsphase die Produktbildung beeinflußt. In parallelen Batch Fermentationen konnte gezeigt werden, daß durch den Zusatz von Glucose die Endproduktkonzentration nicht beeinflußt wird. Die Wachstumsphase bedingt ausschließlich eine um Faktor 2 höhere Biotrockenmassekonzentration. Aus diesem Grund wurde die zusätzliche Kohlenstoffquelle Glucose aus dem Medium eliminiert.

5.5.2 Parameterstudie für die Produktion von PhCT2

Die bisherigen Fermentationsbedingungen entsprachen Bedingungen zur Produktion von Antibiotika mit Staphylococcen. Zur genaueren Charakterisierung wurde eine Parameterstudie durchgeführt. Variiert wurden Induktionszeitpunkt, Begasungsrate, Osmolalität, pH-Wert, Temperatur und die Gelöstsauerstoffkonzentration.

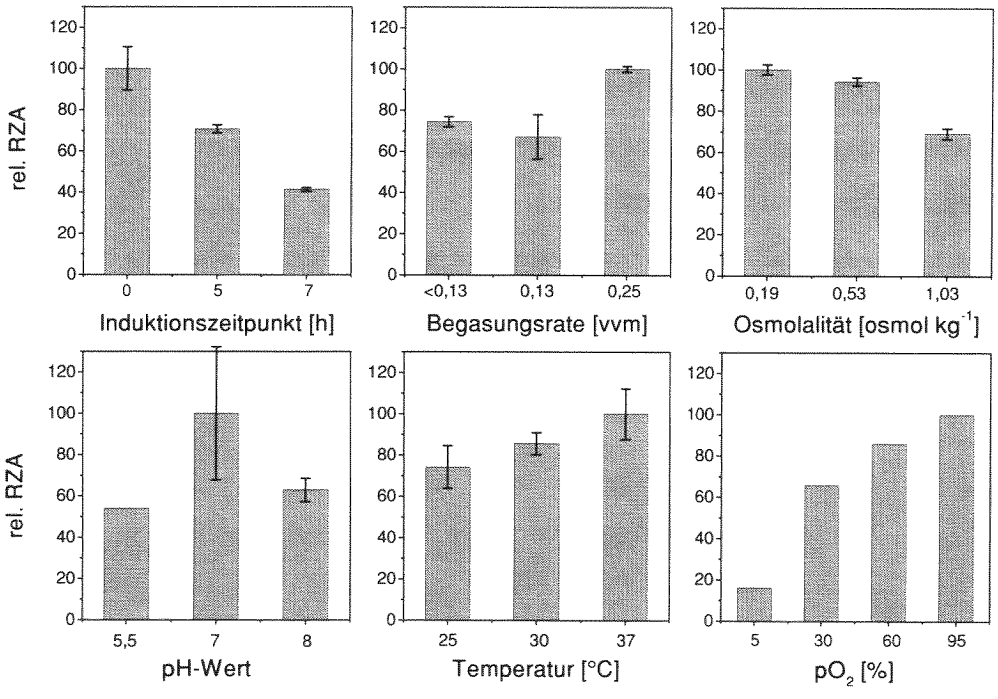

Abbildung 5.14: Relative Raum-Zeit-Ausbeuten rel. RZA der Parameterstudie in Batch Verfahren für Induktionszeitpunkt (Beginn, frühe und späte exponentielle Wachstumsphase), Begasungsrate, Osmolalität, pH-Wert, Temperatur und Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2. Die Fermentationen wurden im miniaturisierten Blasensäulenreaktoren (V = 0,4 l) in Parallelansätzen durchgeführt, die Fermentationen zur Gelöstsauerstoffkonzentration im Laborfermenter (Regelung über die Drehzahl, V = 2 l), Standardbedingungen: 37°C, pH 7, pO_2 > 5 %.

Abbildung 5.14 zeigt die Abhängigkeit der Raum-Zeit-Ausbeute RZA von den variierten Parametern. Der Parameterraum wurde nach einer Studie über das Wachstum des Wildtyps *S. carnosus* TM300 festgelegt. In den ausgewählten Bereichen zeigte sich weder für die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} noch für die substratspezifische Biomasseausbeute $A_{X/S}$ ein signifikanter Einfluß.

In dieser Studie wurden eine Temperatur von 37°C, ein pH-Wert von 7 und eine Sauerstoffpartialdruck von größer 30 % als geeignete Parameter identifiziert und auf die Fermentation im Rührkessel übertragen. Die Kenngrößen vor und nach der Parameterstudie sind in Tabelle 5.3 zusammengefaßt.

Tabelle 5.3: Kenngrößen der Fermentationen vor und nach der Parameterstudie, maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}), maximale spezifische Produktbildungsrate ($\pi_{X(max)}$) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA).

Parameter	Start	37°C/pH7/pO_2>30 %	Verhältnis: optimiert/Start
μ_{max} [h^{-1}]	0,38	0,66	1,7
$\pi_{X(max)}$ [mg g^{-1} h^{-1}]	11	20	1,8
RZA [mg l^{-1} h^{-1}]	17	41	2,4

5.5.3 Einfluß der Hefeextraktmenge

Die bisherigen Fermentationen im Laborreaktor wurden mit bis zu 50 g l^{-1} Hefeextrakt durchgeführt. Die Menge an Hefeextrakt in der Vorlage wurde auf bis zu 200 g l^{-1} erhöht, um den Einfluß der Hefeextraktmenge auf Wachstum und Produktbildung zu untersuchen. *S. carnosus* pXPhCT2 produziert mit 200 g l^{-1} Hefeextrakt innerhalb von 24 h 2050 ± 205 mg l^{-1} PhCT2 (Abbildung 5.15).

Die Batch Fermentationen zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge an Hefeextrakt und der Endkonzentration an PhCT2 ($A_{P/S}$ = 10 mg g^{-1}). Vergleicht man allerdings die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{max} und Produktbildungsraten $\pi_{X(max)}$, wird ein inhibierender Effekt der großen Hefeextraktmengen beobachtet (Tabelle 5.4). Die mikroskopische Kontrolle dieser Fermentationsproben zeigt eine starke Aggregation der Zellen und weist auf eine Inhibierung während der Zellteilung hin. Dabei ist nicht klar, ob es sich um eine Substratinhibierung handelt oder ob nicht verwertbare Bestandteile des Extraktes diese

verursachen. Durch die Verlängerung der Produktionsphase erhöht sich allerdings die Raum-Zeit-Ausbeute um 90 %.

Tabelle 5.4: Kenngrößen der Batch Fermentationen mit 50 g l^{-1}und 200 g l^{-1} Hefeextrakt in der Vorlage, PhCT2-Endkonzentration, maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}), maximale spezifische Produktbildungsrate ($\pi_{X(max)}$) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA).

Parameter	50 g l^{-1}	200 g l^{-1}	Verhältnis „200 g/50 g“
PhCT2 Konzentration [mg l^{-1}]	457 ± 42	2050 ± 205	4,5
μ_{max} [h^{-1}]	0,56	0,4	0,7
$\pi_{X(max)}$ [mg g^{-1} h^{-1}]	65	11	0,2
RZA [mg l^{-1} h^{-1}]	44	83	1,9

Mit Hefeextrakt als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle resultiert die Nutzung von Aminosäuren in einer Nettoproduktion von Ammonium. Diese ist an die Sekretion des Fusionsproteins gekoppelt (Abbildung 5.15). Unter den gewählten Bedingungen ist *S. carnosus* nicht in der Lage, anorganischen Stickstoff als Stickstoffquelle zu nutzen und Ammonium akkumuliert im Medium (bis 300 mM). In der Literatur sind keine Daten über die Ammonium-Toleranz von *S. carnosus* beschrieben.

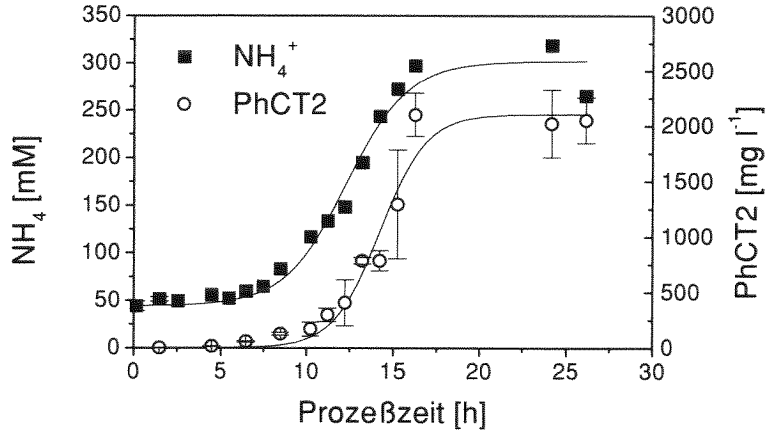

Abbildung 5.15: Zeitlicher Verlauf der Ammoniumkonzentration NH_4^+ und der PhCT2-Konzentration in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit 200 g l^{-1} Hefeextrakt in der Vorlage.

Durch den Hefeextrakt und die Akkumulation von Ammonium wird die Leitfähigkeit χ der Fermentationsbrühe wesentlich beeinflußt. Diese ist der wichtigste Parameter für die Aufarbeitung, da das Fusionsprotein in einem ersten Reinigungsschritt mit einer

Kationenaustauschchromatographie gereinigt wird. Die Salzfracht der gewachsenen Kultur hat einen wesentlichen Einfluß auf die Kapazität des Austauschers[14].

Die Ammoniumakkumulation ist auf ein ungünstiges Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis im Medium zurückzuführen. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob mit einer kohlenstoffreichen nicht-reprimierenden Kohlenstoffquelle das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis optimiert werden kann. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß dies nur möglich ist, wenn der Anteil an Hefeextrakt bezogen auf die Produktmenge deutlich reduziert werden kann. Deshalb sollte untersucht werden, in wie weit ein Verfahren mit Hefeextrakt als „Cosubstrat" entwickelt werden kann[15]. Für die Versorgung der Organismen muß das Medium eine Hauptkohlenstoffquelle enthalten. Als zusätzliche Größe sollte dabei neben der hefeextraktspezifischen PhCT2-Ausbeute $A_{P/S}$ die Endleitfähigkeit χ als wichtigster Parameter für die Aufarbeitung betrachtet werden.

5.6 Hefeextrakt als Cosubstrat

5.6.1 Glycerin als Kohlenstoffquelle

In den Untersuchungen mit definierten Medien konnte bereits gezeigt werden, daß Glycerin den xyloseinduzierbaren Promotor nicht reprimiert. In Batch Fermentationen wurden zunächst Wachstum und Produktbildung mit Glycerin als Hauptkohlenstoffquelle und Hefeextrakt als Cosubstrat untersucht (Abbildung 5.16).

Der Verlauf der Ammoniumkonzentration zeigt, daß während der Fermentation maximal 40 mM Ammonium detektiert werden. Auch die Leitfähigkeit χ mit $\chi = 14$ mS cm^{-1} ist deutlich verringert, so daß die Fermentationsbrühen für die Aufarbeitung nur um den Faktor 2-3 verdünnt werden müssen. Unter diesen

---

[14] Die Leitfähigkeit ist ein Maß für die Salzfracht und sollte für die Bindung von PhCT2 an einen Kationentauscher auf keinen Fall oberhalb von $\chi = 7$ mS cm^{-1} liegen. Die Grundleitfähigkeit des Mediums ist $\chi = 22$ mS cm^{-1} bereits relativ hoch. Die Leitfähigkeit beträgt unter diesen Bedingungen nach 24 h $\chi = 50$ mS cm^{-1} Damit mußte die geerntete Kultur für die Aufarbeitung um den Faktor 10 verdünnt werden (Sandgathe 2000).

[15] Es konnte gezeigt werden, daß Hefeextraktmengen bis 50 g l^{-1} keinen negativen Einfluß auf das Aufarbeitungsverfahren haben (Sandgathe 2000), so daß diese als Maximalwert festgelegt wurde.

Bedingungen werden in 11 h 23 g l^{-1} Biotrockenmasse und 532 ± 33 mg l^{-1} PhCT2 produziert. Die Fermentation ist zu diesem Zeitpunkt durch Glycerin limitiert. In den Fermentationen wird eine strikte Kopplung von Wachstum, Produktbildung und Glycerinverbrauch beobachtet.

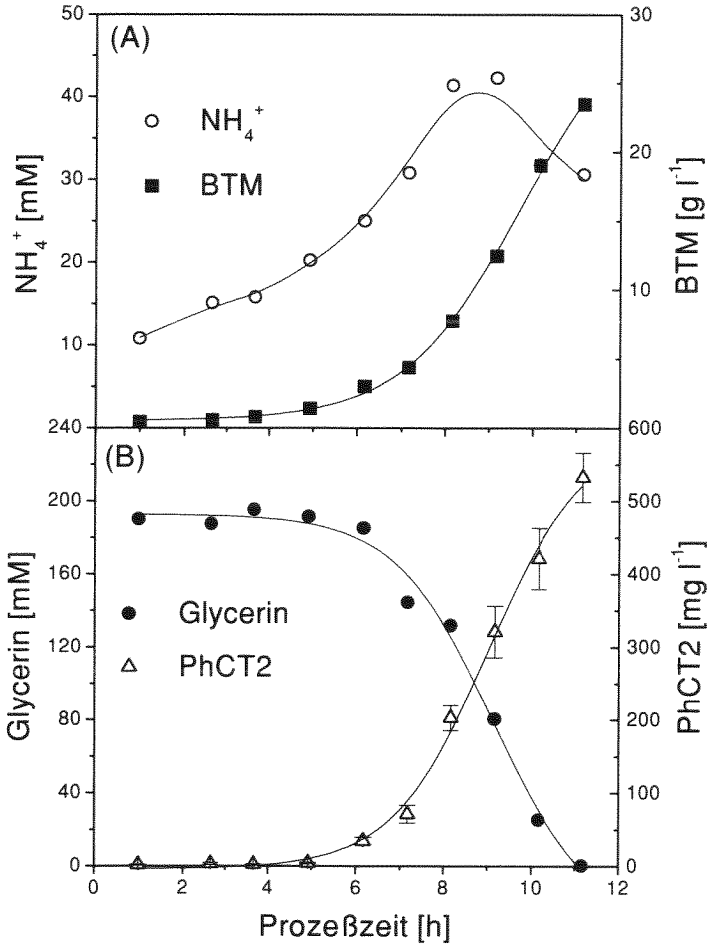

Abbildung 5.16: Zeitlicher Verlauf der Ammoniumkonzentration NH_4^+, der Biotrockenmassekonzentration BTM (A), der PhCT2- und der Glycerinkonzentration (B) in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit Hefeextrakt (50 g l^{-1}) als Cosubstrat.

Glycerin beeinflußt die Viskosität und Osmolalität des Mediums stark. Aus der Literatur und Untersuchungen mit dem Wildtyp ist bekannt, daß das Wachstum von *S. carnosus* durch hohe Osmolalitäten nicht beeinflußt wird. Bei der Produktbildung wurde eine leichte Abnahme der Raum-Zeit-Ausbeute RZA mit steigender Osmolalität (mit NaCl eingestellt) beobachtet (s. 5.5.2).

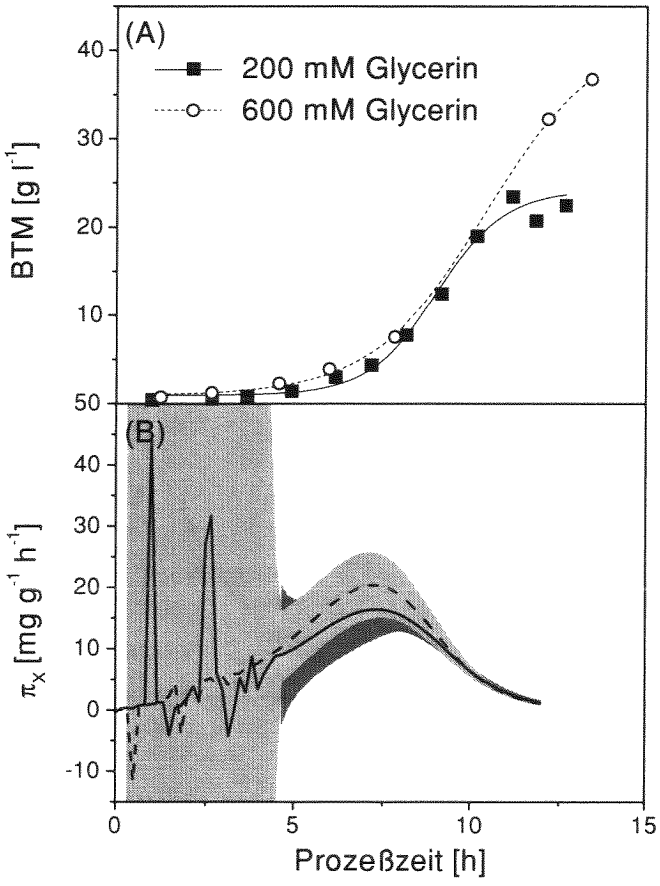

Abbildung 5.17: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM (A) und der spezifischen Produktbildungsrate π_X (B) in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit Hefeextrakt (50 g l^{-1}) als Cosubstrat und unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen in der Vorlage. Die schraffierten Flächen kennzeichnen den 95 %-Vertrauensbereich (dunkelgrau = 200 mM Glycerin, hellgrau = 600 mM Glycerin) der Monte Carlo Simulation. Für t < 4,5 h ist aufgrund des großen Fehlers keine Aussage möglich. Theorie und Durchführung der Monte Carlo Simulation sind im Anhang beschrieben.

Deshalb wurde anschließend der Einfluß der Glycerinkonzentration (200 mM und 600 mM) in der Vorlage in Batch Fermentationen untersucht. Dabei zeigt sich weder auf das Wachstum noch auf die Produktbildung ein inhibierender Einfluß der zunehmenden Glycerinkonzentration in der Vorlage (Abbildung 5.17).

Auch für die Fermentationen mit 600 mM Glycerin in der Vorlage wird die wachstumsgekoppelte Sekretion des Fusionsproteins bestätigt. Betrachtet man allerdings die Abhängigkeit der spezifischen Glycerinverbrauchsrate $\sigma_{X(Glycerin)}$ von der spezifischen Produktbildungsrate π_X (Abbildung 5.18), erkennt man zunächst auch die Kopplung von Glycerinverbrauch und Produktbildung. Wird die maximale spezifische

Produktbildungsrate (t = 7 h) erreicht, bricht die Produktbildungsgeschwindigkeit ein bei leicht steigender Glycerinverbrauchsrate. Mit diesem Einbruch wird ein starker Anstieg der Acetatkonzentration im Medium beobachtet.

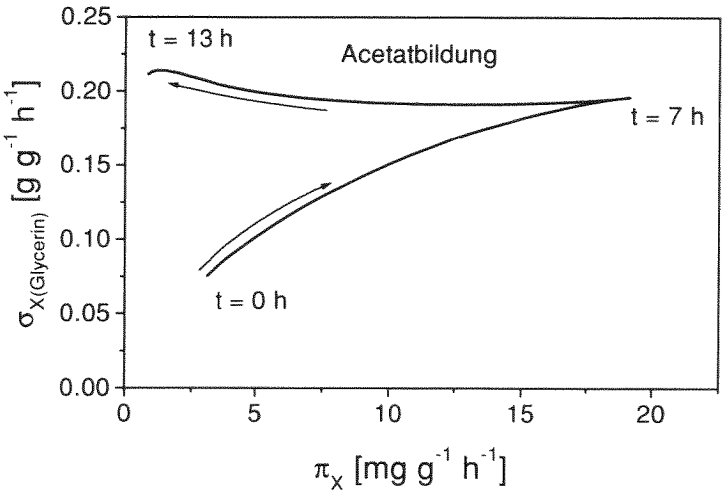

Abbildung 5.18: Abhängigkeit der spezifischen Glycerinverbrauchsrate $\sigma_{X(Glycerin)}$ von der spezifischen Produktbildungsrate π_X in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit 600 mM Glycerin und 50 g l^{-1} Hefeextrakt in der Vorlage.

Die Acetatbildung ist als eine Überlaufreaktion im Glycerin-Metabolimus zu bewerten. Das während der oxidativen Decarboxylierung des Pyruvates entstandene Acetyl-CoA kann nicht vollständig in den Citratzyklus eingeschleust werden und akkumuliert als Acetat im Medium. Dies könnte auf eine Limitierung im Bereich des Citratzyklus und/oder der daran anschließenden Atmungskette hinweisen. Diese könnte im Bereich der Synthese der beteiligten Enzyme oder in der Aktivität vorhandener Enzyme liegen. Bei der Synthese könnte die Limitierung bei den Aminosäuren als Bausteine für Proteine oder den Cofaktoren der Syntheseenzyme zu finden sein. Die Aktivität vorhandener Enzyme könnte durch fehlende Cofaktoren limitiert sein.

Da zu diesem Zeitpunkt alle quantifizierbaren Aminosäuren als Enzymbausteine noch im Medium vorhanden sind (Abbildung 5.19), könnte es sich um eine Limitierung der Cofaktoren der Enzyme handeln. Diese Hypothese wird durch die Elementanalyse des Hefeextraktes und der Biomasse bestätigt. Der Bedarf an Makro- und Mikroelementen für die Biomassebildung von *S. carnosus* kann durch den Hefeextrakt nicht gedeckt werden. Die Ergebnisse der Elementanalyse zeigen weiterhin, daß die Limitierung

wahrscheinlich nicht nur auf ein Element zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde wurden die Salz- und Spurenelementelösung des synthetischen Mediums für die folgenden Untersuchungen eingesetzt. Diese decken den Bedarf, wenn in der Berechnung der Elementanalyse ein Überschußfaktor F von F = 1 berücksichtigt wird. Dieser Ansatz wurde gewählt, da keine Daten über den Bedarf an Makro- und Mikroelementen für *S. carnosus* vorlagen und Inhibierungen durch überhöhte Konzentrationen zunächst ausgeschlossen werden sollten.

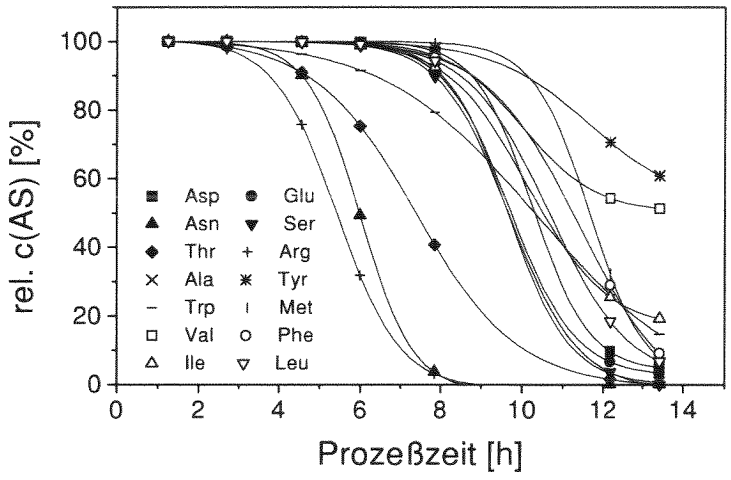

Abbildung 5.19: Zeitlicher Verlauf der relativen Konzentrationen der freien Aminosäuren AS des Hefeextraktes in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit 600 mM Glycerin und 50 g l^{-1} Hefeextrakt in der Vorlage.

5.6.2 Makro- und Mikroelemente

Der Einfluß der Salzlösung auf Wachstum und Produktbildung wurde in vergleichenden Batch Fermentationen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt als Cosubstrat untersucht (Abbildung 5.20).

Dabei wird kein Einfluß auf das Biomassewachstum festgestellt. Der Einfluß auf die Produktbildung dagegen ist sehr deutlich, so daß die biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ um den Faktor 2 verbessert werden konnte. Die Hypothese, daß die Acetatbildung auf eine Cofaktorlimitierung im Bereich des Citratzyklus und/oder der Atmungskette zurückzuführen ist, wird durch den Verlauf der volumenspezifischen Acetatbildungsrate $\pi_{v(Acetat)}$ bestätigt (Abbildung 5.20). Durch

Zusatz der Cofaktoren wird sie deutlich verringert, so daß sich integral eine um den Faktor 2 verringerte Acetatkonzentration ergibt (57 mM im Vergleich zu 111 mM). Auch die maximalen biomassespezifischen CO_2-Bildungsraten $\pi_{S(CO_2)max}$ der Fermentationen unterstützen die Hypothese. Durch den Zusatz von Salzen sinkt sie um den Faktor 1,3 von $\pi_{S(CO_2)max} = 0{,}6\ g\ g^{-1}\ h^{-1}$ auf $\pi_{S(CO_2)max} = 0{,}47\ g\ g^{-1}\ h^{-1}$.

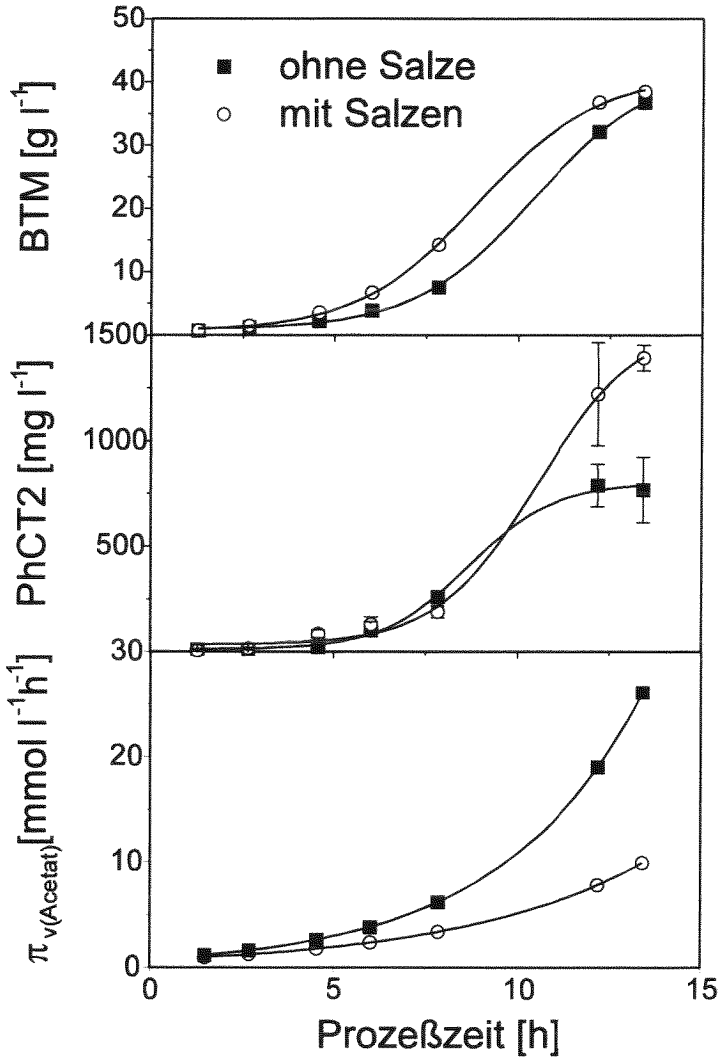

Abbildung 5.20: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM, der PhCT2-Konzentration und der volumetrischen Acetatbildungsrate $\pi_{v(Acetat)}$ in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, $pO_2 > 30$ %) mit Glycerin (600 mM) und Hefeextrakt (50 g l^{-1}) mit Salzen und ohne Salze.

Aufgrund des signifikanten Einflusses der Salzlösung auf die biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ wurde der Einfluß der einzelnen Elemente genauer untersucht. In parallelen Batch Fermentationen (V = 0,2 l) wurde zunächst durch Zusatz der einzelnen Elemente der Einfluß auf die biomassespezifische Selektivität untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, daß dieser nicht einem einzelnen Element zugeordnet werden kann (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden parallele Batch Fermentationen durchgeführt, in denen jeweils ein Element der Salzlösung fehlte.

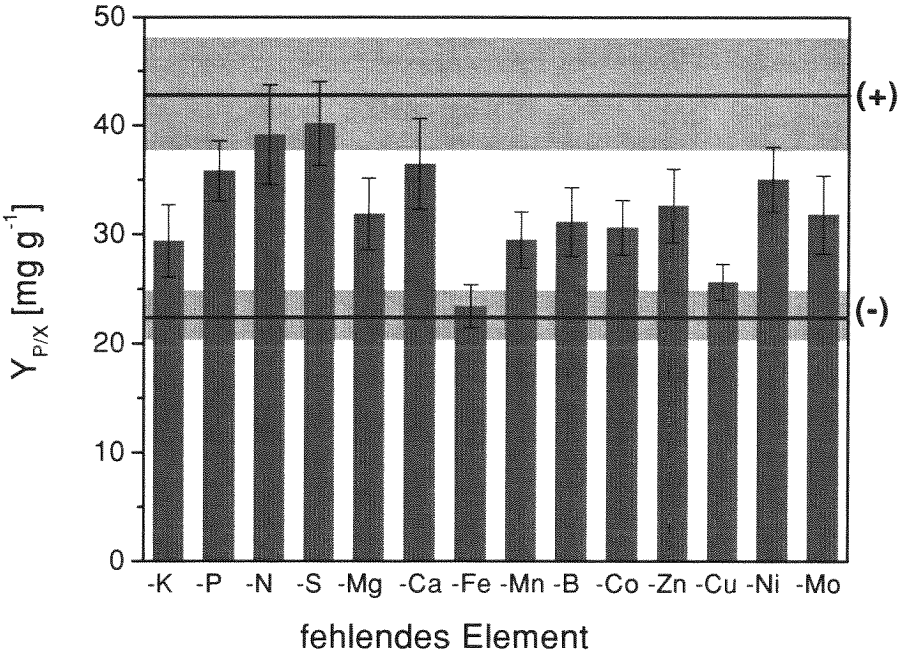

Abbildung 5.21: Integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ in Abhängigkeit von dem in der Salzlösung fehlenden Element in Batch Verfahren (V = 0,2 l, 37°C, pH 7, $pO_2 > 30$ %) mit Glycerin (600 mM) und Hefeextrakt (15 g l^{-1}). Die Werte für die Positiv- (+) und Negativkontrolle (-) sind als schwarze Linien eingezeichnet, die hellgrauen Flächen kennzeichnen die Standardabweichung der jeweiligen Kontrolle.

Abbildung 5.21 zeigt die integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ in Abhängigkeit von dem jeweils fehlenden Element. Den größten Einfluß haben Eisen und Kupfer. Die Selektivitäten liegen im Bereich der Negativkontrolle. Beide Elemente sind wichtige Cofaktoren für die Enzyme der Atmungskette. Weitere Elemente, die einen signifikanten Einfluß ausüben, sind Kalium, Magnesium, Mangan, Bor, Kobalt, Zink und Molybdän. Für die Elemente Phosphor, Stickstoff, Schwefel, Calcium und Nickel wird kein signifikanter Einfluß auf die Selektivität beobachtet. Da allerdings die Absolutwerte alle unter der Positivkontrolle liegen, wurde für die folgenden Untersuchungen die komplette Salzlösung zugesetzt.

5.6.3 Der eingesetzte Hefeextrakt

Die Hauptkomponenten des Hefeextraktes, die von *S. carnosus* genutzt werden, sind freie Aminosäuren. Betrachtet man den Verlauf der relativen Aminosäurekonzentrationen der Batch Fermentationen mit Hefeextrakt als Cosubstrat (mit Salzen, Abbildung 5.22), erkennt man unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Aminosäuren. Sie werden sequentiell von *S. carnosus* aufgenommen, so daß die Produktbildung gegen Ende der Batch Fermentationen wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit einzelner Aminosäuren limitiert ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde folgende Hypothese entwickelt:

- Durch die kontinuierliche limitierte Bereitstellung aller Aminosäuren im Hefeextrakt könnte dieser besser für die Produktbildung genutzt werden.

Deshalb wurde untersucht, ob durch eine Limitierung (von einzelnen Komponenten) des Hefeextraktes die hefeextraktspezifische PhCT2-Ausbeute $A_{P/S}$ gesteigert werden kann. Dazu sollte eine Regelstrategie im geschlossenen Regelkreis entwickelt werden, die eine Dosierung des Hefeextraktes unter `limitierten Bedingungen` erlaubt.

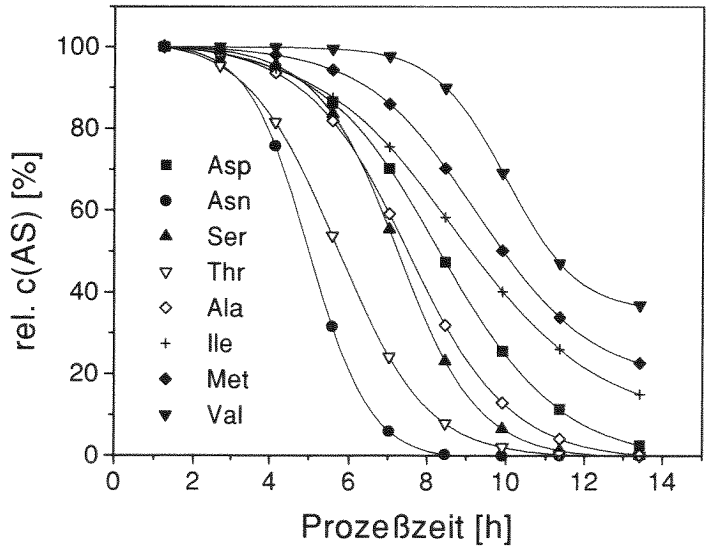

Abbildung 5.22: Zeitlicher Verlauf der relativen Konzentrationen der freien Aminosäuren (AS) des Hefeextraktes in Batch Fermentationen (V = 2 l, 37°C, pH 7, $pO_2 > 30$ %) mit Glycerin (600 mM), Hefeextrakt als Cosubstrat (50 g l^{-1}) und Salzsupplementierung.

5.6.4 Hefeextraktlimitierte Fedbatch Fermentationen

Die Regelstrategie für dieses Verfahren wurde aus dem Verlauf des pH-Wertes in ungeregelten Batch Fermentationen entwickelt (Abbildung 5.23).

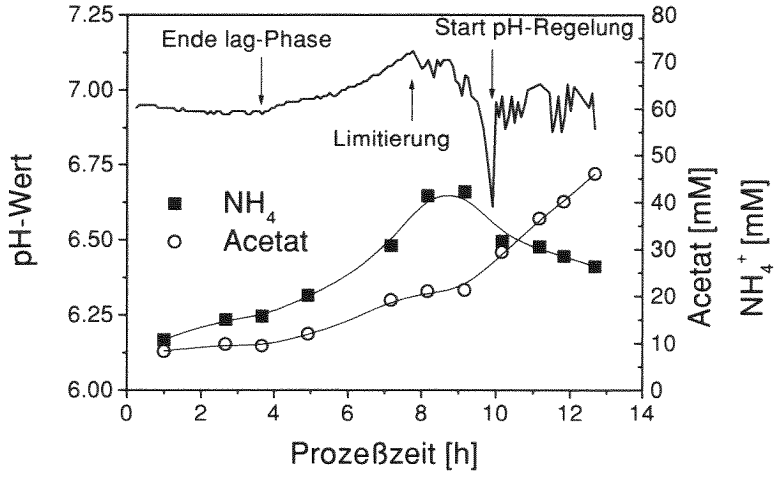

Abbildung 5.23: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes, der Ammoniumkonzentration NH_4^+ und der Acetatkonzentration in Batch Fermentationen mit 200 mM Glycerin und 50 g l^{-1} Hefeextrakt in der Vorlage (V = 2 l, 37°C, pO_2 > 30 %). Bei t = 10 h wurde die pH-Regelung (pH 7) eingeschaltet.

Zu Beginn der Produktionsphase sind alle Komponenten des Hefeextraktes in ausreichender Menge vorhanden, es tritt keine Limitierung auf. Aufgrund der Ammoniumproduktion wird ein leichter Anstieg des pH-Wertes beobachtet. Im Verlauf der Batch Fermentation werden Bestandteile des Hefeextraktes verbraucht, einzelne Komponenten werden limitierend. Unter diesen Bedingungen wird Glycerin zu Acetat verstoffwechselt, der pH-Wert sinkt.

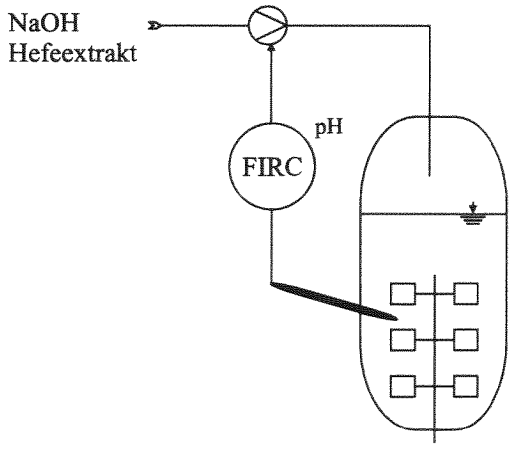

Abbildung 5.24: Schematische Darstellung des geschlossenen Regelkreises für hefeextraktlimitierende Bedingungen (´pH-Auxostat´).

Dadurch ergibt sich folgende Regelstrategie (´pH-Auxostat´, Abbildung 5.24): Der pH-Wert des Hefeextrakt-Zulaufmediums soll oberhalb des Sollwertes der Fermentation liegen. Nach Verbrauch von bestimmten Komponenten der Hefeextrakt-Vorlage mit einer Konzentration von 5 g l^{-1} sinkt der pH-Wert durch die Acetatbildung unter den Sollwert. Mit der Base zur Korrektur des pH-Wertes wird der Hefeextrakt zudosiert. Damit unterbleibt die Acetatbildung bis zu einer erneuten Hefeextraktlimitierung.

Das Verhältnis von Natronlaugeverbrauch zur Hefeextraktmenge wurde aus dem Laugeverbrauch von geregelten Batch Fermentationen abgeschätzt. Es beträgt 1,8 mmol OH^- g^{-1} Hefeextrakt. Um eine Hefeextraktlimitierung gewährleisten zu können, wurde für die Fedbatch Fermentationen zunächst ein Verhältnis von 3 mmol OH^- g^{-1} Hefeextrakt eingestellt. Die Vorlage enthält alle weiteren Medienbestandteile (bis auf Hefeextrakt, Xylose und Chloramphenicol) bezogen auf das Endvolumen.

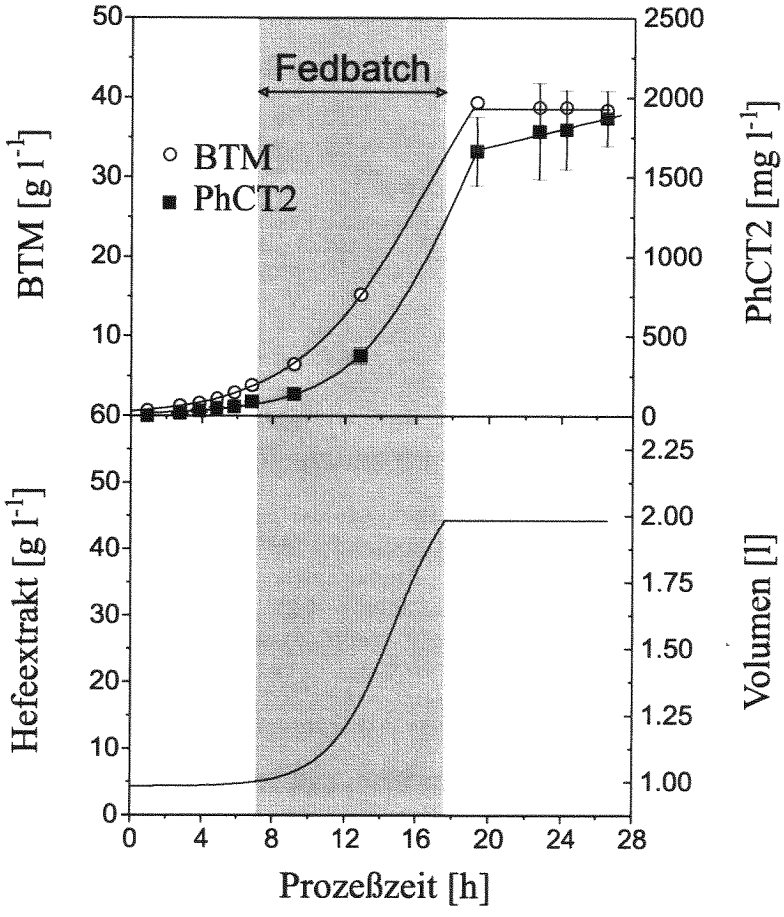

Abbildung 5.25: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM, der PhCT2-Konzentration, der berechneten Hefeextraktmenge (bezogen auf das jeweils aktuelle Arbeitsvolumen) und des Arbeitsvolumens in hefeextraktlimitierten Fedbatch Fermentationen im geschlossenen Regelkreis (´pH-Auxostat´, 37°C, pH 7, pO_2 > 30 %). Die grauen Flächen kennzeichnen die Feedphase.

Abbildung 5.25 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse- und der PhCT2-Konzentration. Das Ende der Fermentation ist dadurch gekennzeichnet, daß die vorgelegte Dosiermenge verbraucht ist. Die Biotrockenmassekonzentration nimmt nicht mehr zu und die PhCT2-Konzentration steigt im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht mehr signifikant an. Unter diesen Bedingungen ist eine Weiterführung des Prozesses nicht möglich, da mit dem gewählten Verhältnis von Lauge zu Hefeextrakt die maximale Sauerstofftransportrate des eingesetzten Rührkesselreaktors (OTR = 350 mmol l^{-1} h^{-1}) erreicht wurde.

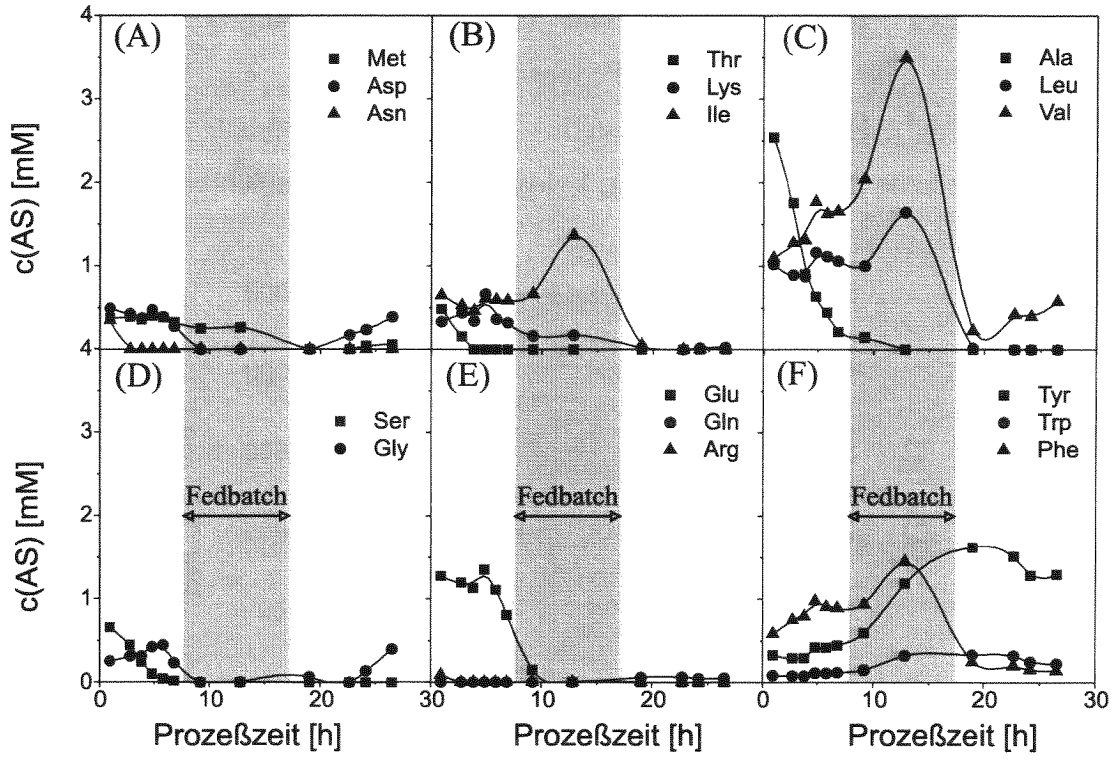

Abbildung 5.26: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der freien Aminosäuren AS des Hefeextraktes in Fedbatch Fermentationen unter hefeextraktlimitierten Bedingungen (´pH-Auxostat´). Die grauen Flächen kennzeichnen die Feedphase. Die Aminosäuren sind nach Schlegel (1992) in ihren Aminosäurefamilien dargestellt (s. auch Abbildung 6.4): (A) und (B) Aspartat-Familie, (C) Pyruvat-Familie, (D) Serin-Familie, (E) Glutamat-Familie, (F) Familie der aromatischen Aminosäuren.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen der freien Aminosäuren des Hefeextraktes (Abbildung 5.26), erkennt man, daß schon zu Beginn der Feedphase die Aminosäuren Asparagin, Threonin, Glutamin und Arginin im Medium nicht mehr detektiert werden können. Diese Aminosäuren sind über den gesamten Verlauf der Fedbatch Fermentationen limitierend. Andere Aminosäuren, wie Alanin oder Glutamat, werden erst im Verlauf der Feedphase limitierend. Die Konzentrationen der

aliphatischen (Isoleucin, Leucin und Valin) und der aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin) steigen während der Feedphase an. Bis auf Tyrosin und Tryptophan werden diese Aminosäuren gegen Ende der Feedphase auch aufgenommen. Dabei können sie alle bis auf Leucin am Ende der Fermentation allerdings noch detektiert werden.

5.6.5 Vergleich zwischen Batch und Fedbatch Fermentationen

Vergleicht man die biomassespezifischen PhCT2-Selektivitäten $Y_{P/X}$ und hefeextraktspezifischen PhCT2-Ausbeuten $A_{P/S}$ der Batch und Fedbatch Fermentationen (Tabelle 5.5), erkennt man einen deutlichen Einfluß der Hefeextraktlimitierung. Die Selektivität $Y_{P/X}$ im Fedbatch konnte um 24 %, die hefeextraktspezifische Ausbeute $A_{P/S}$ sogar um 50 % gesteigert werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute RZA wird nicht signifikant beeinflußt. Bei beiden Prozeßführungen ist die verbrauchte Menge Glycerin über den Gesamtprozeß konstant (400 mM). Betrachtet man allerdings die Verläufe der Nebenprodukte Acetat (aus Glycerin) und Ammonium (Desaminierung von Aminosäuren), erkennt man deutliche Unterschiede (Abbildung 5.27).

Tabelle 5.5: Kenngrößen der Batch und Fedbatch Fermentationen mit Glycerin und Salzen, biomassespezifische PhCT2-Selektivität ($Y_{P/X}$), hefeextraktspezifische PhCT2-Ausbeute ($A_{P/S}$), Raum-Zeit-Ausbeute (RZA, für die Fedbatch Fermentation berechnet bei dem Zeitpunkt, an dem der Feed aufgebraucht war) und die Endleitfähigkeit (χ).

Parameter	Batch	Fedbatch	Verhältnis „Fedbatch/Batch“
$Y_{P/X}$ [mg g^{-1}]	41 ± 2	51 ± 5	1,24
$A_{P/S}$ [mg g^{-1}]	28 ± 1	42 ± 4	1,5
RZA [mg l^{-1} h^{-1}]	104 ± 5	98 ± 9	0,94
χ [mS cm^{-1}]	16	13,6	0,85

Durch die Hefeextraktlimitierung können die Konzentrationen beider Nebenprodukte in sehr niedrigen Bereichen gehalten werden. Die Regelstrategie führt zu einer optimalen Nutzung sowohl der Hauptkohlenstoffquelle Glycerin (Nebenprodukt Acetat) als auch der Aminosäuren aus dem Hefeextrakt (Nebenprodukt Ammonium). Dies bedingt wahrscheinlich auch die geringere Leitfähigkeit in den Fedbatch Fermentationen (Tabelle 5.5). Unter diesen Bedingungen wird über die gesamte Fermentation ein Nettoverbrauch von Ammonium beobachtet.

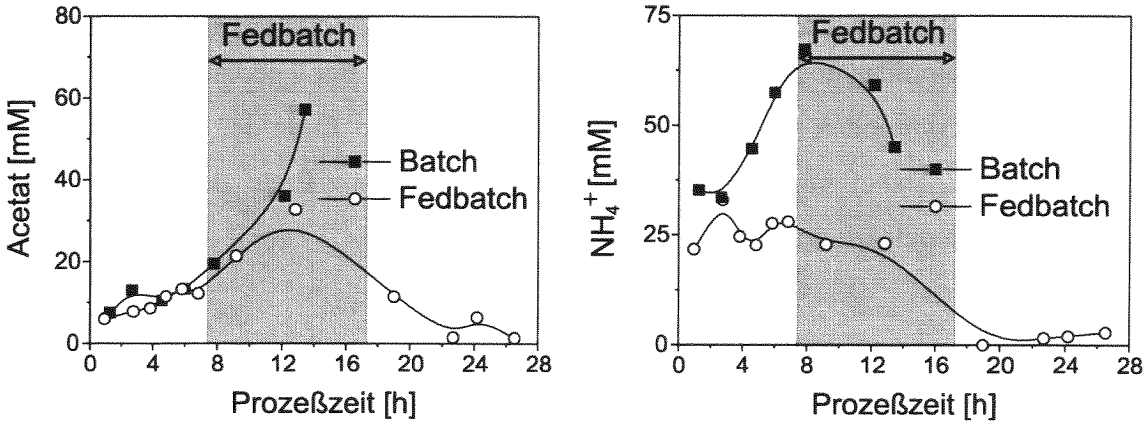

Abbildung 5.27: Zeitlicher Verlauf der Acetat- und Ammoniumkonzentrationen der Batch und Fedbatch Fermentationen (37°C, pH 7, pO_2 > 30 %) mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und Zusatz von Salzen. Die grauen Flächen kennzeichnen die Feedphase der Fedbatch Fermentationen.

5.7 Übertragung des Fedbatch Verfahrens in den 150 l Maßstab

Der ´pH-auxostatische´ Fedbatch Prozeß wurde anschließend ohne Änderung der Reaktionsbedingungen in den 150 l Rührkesselreaktor übertragen (Faktor 50). Abbildung 5.28 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der PhCT2-Konzentration der Fedbatch Fermentationen im 3 l und 150 l Maßstab. Im 150 l Maßstab ist die Prozeßzeit um 4 h verkürzt. Dies ist auf die Vorkulturführung zurückzuführen, die unter pH-geregelten Bedingungen im 30 l Rührkesselreaktor erfolgte (Tabelle 5.6). Bei etwa gleicher Biotrockenmassekonzentration sind die Vorkulturen im 3 l Maßstab (pH-ungeregelte Schüttelkolben) durch Akkumulation von 30 mM Acetat aufgrund des pH-Wertes mit pH 4,5 inhibiert. Im 3 l Maßstab wird der Reaktor mit diesen Zellen angeimpft, die sich dann zunächst an den pH-Wert des Kulturmediums (pH 7) adaptieren müssen. Dadurch entsteht in diesem Fall die lag-Phase. Durch die Regelung des pH-Wertes für die Vorkulturen im 150 l Maßstab entfällt die Adaption. Dies bedingt eine Verkürzung der lag-Phase um 4 h und wird exemplarisch durch den Verlauf der spezifischen Wachstumsrate μ dokumentiert.

Tabelle 5.6: Biotrockenmassekonzentration (BTM), pH-Wert und Acetatkonzentration der Vorkulturen für die Fedbatch Fermentationen im 3 l und 150 l Maßstab

Parameter	3 l Maßstab	150 l Maßstab
BTM [g l^{-1}]	2,7	3,2
pH-Wert	4,5	7
Acetat [mM]	30	n.d.

Die Fermentation im 150 l Maßstab erreicht dabei am Ende sowohl in der Biotrockenmassekonzentration als auch in der PhCT2-Konzentration höhere Werte. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der *in situ* Sterilisation des Zulaufmediums im 150 l Maßstab mehr Wasser verloren geht als im 3l Maßstab, bei dem das Zulaufmedium im Standautoklaven sterilisiert wurde. Dies wird aus der *on-line* Datenerfassung für das Gewicht des Zulaufmediums deutlich. Die integrale Masse des Zulaufmediums im 150 l Maßstab beträgt absolut 87 % der eingewogenen Arbeitsmasse, im 3 l Maßstab 95 %. Dadurch ist die zugesetzte Menge an Hefeextrakt pro Arbeitsvolumen größer, dies bedingt die höhere Biotrockenmassekonzentration und PhCT2-Konzentration.

Die Fedbatch Fermentation wurde reproduziert. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurde keine Abweichung von der beschriebenen Fermentation beobachtet (Daten nicht gezeigt).

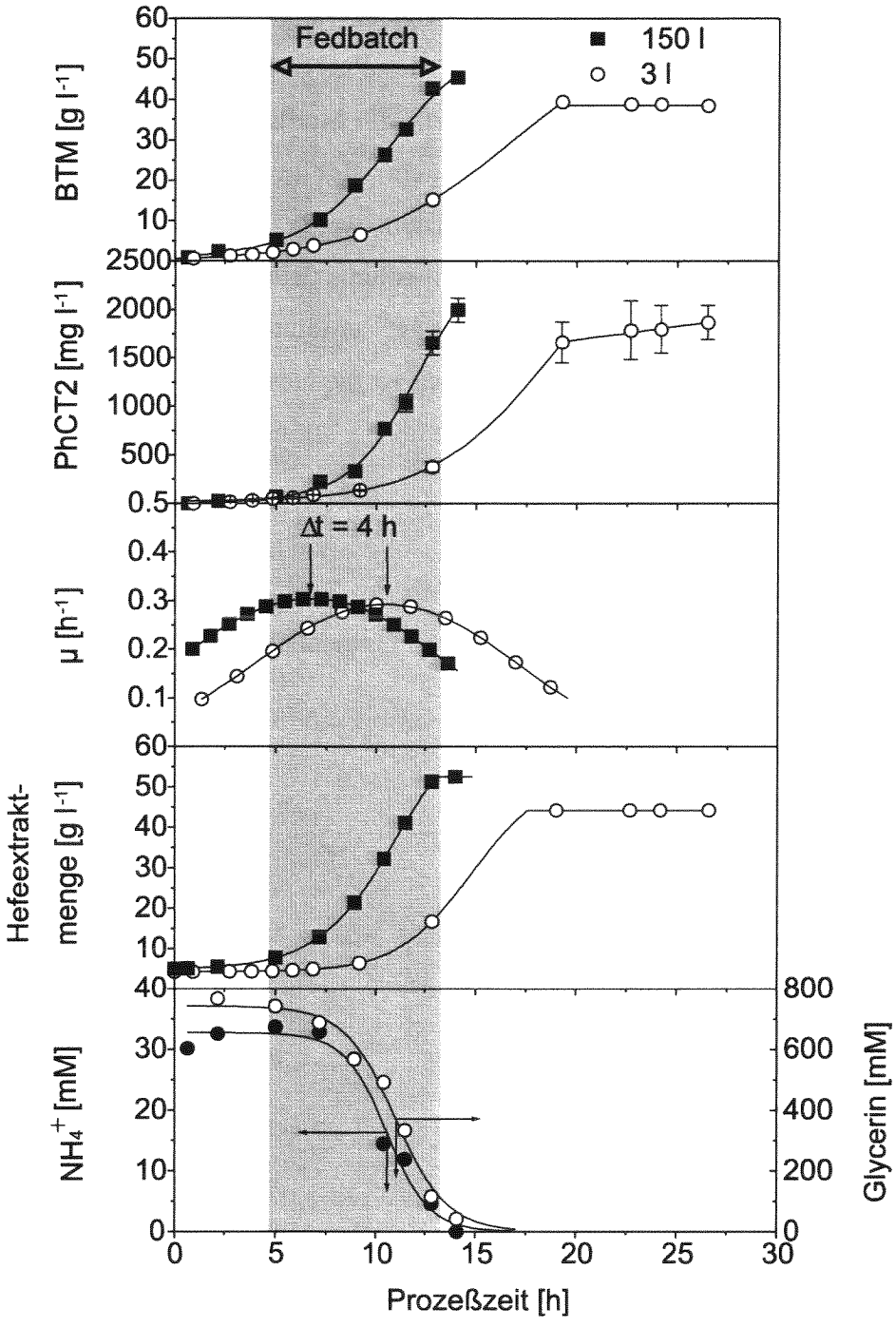

Abbildung 5.28: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration BTM, der PhCT2-Konzentration, der spezifischen Wachstumsrate μ, der berechneten Hefeextraktmenge (bezogen auf das jeweils aktuelle Arbeitsvolumen) und der Glycerin- und der Ammoniumkonzentration NH_4^+ (nur 150 l) in pH-auxostatischen Fedbatch Fermentationen im 3 l und 150 l Maßstab, die Reaktionsbedingungen entsprechen denen in Abbildung 5.25. Die grauen Flächen kennzeichnen die Feedphase im 150 l Maßstab.

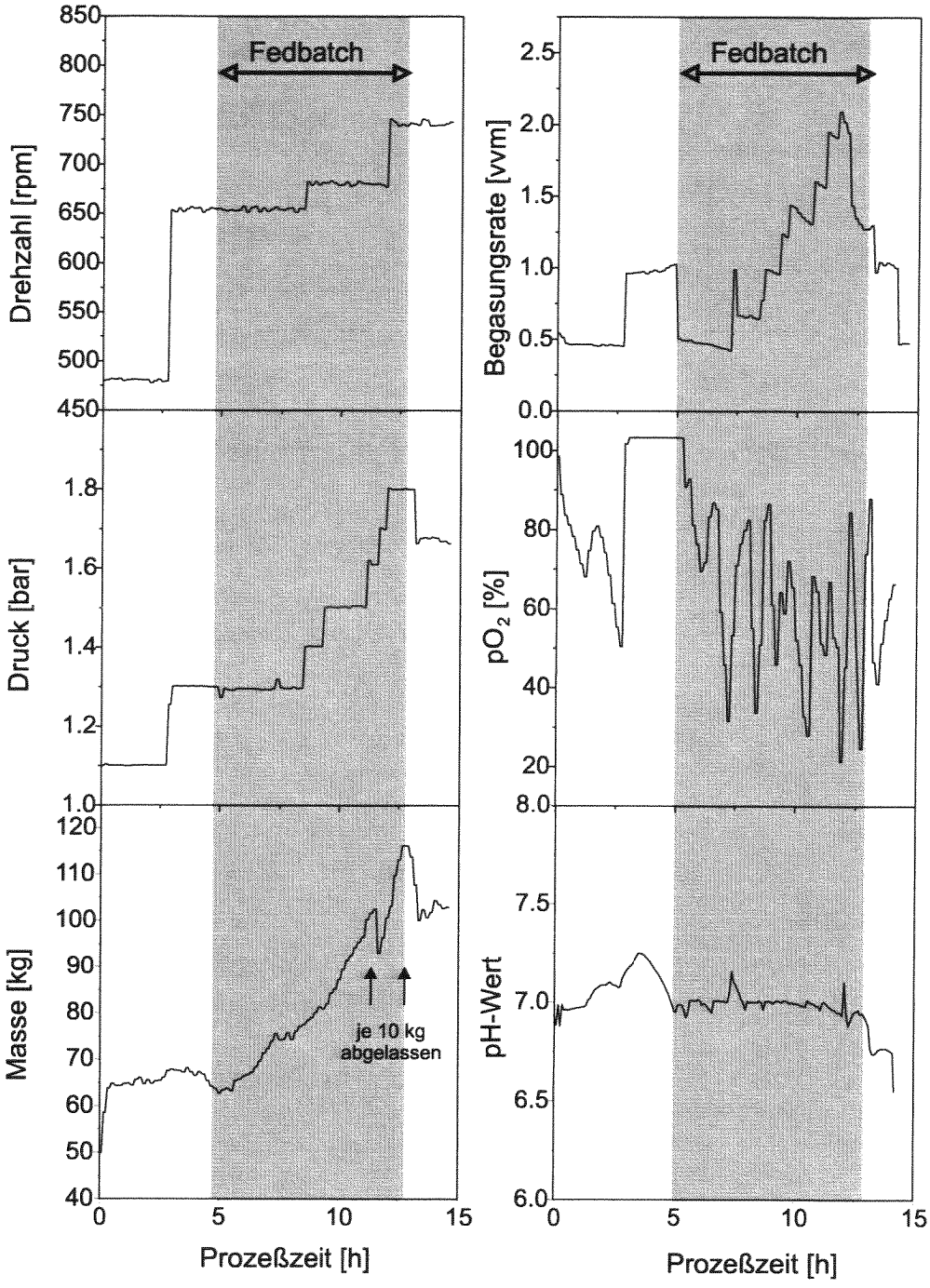

Abbildung 5.29: Zeitlicher Verlauf der Drehzahl, der Begasungsrate, des Druckes, der Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2, der Masse und des pH-Wertes der pH-auxostatischen Fedbatch Fermentation im 150 l Maßstab. Die grauen Flächen kennzeichnen die Feedphase.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens „Integrierte Prozeßentwicklung zur Produktion heterologer sekretorischer Proteine mit *S. carnosus*" durchgeführt. In dem Teilbereich Verfahrensentwicklung wurde ein Fedbatch Verfahren im geschlossenen Regelkreis (´pH-Auxostat´) für hefeextraktlimitierende Bedingungen entwickelt. Ausgehend von verschiedenen verfahrenstechnischen Ansätzen in der Literatur zur Fermentation von *S. carnosus* und den allgemeinen Kenntnissen über die Stoffwechselwege von Staphylococcen wurde für *S. carnosus* Wachstum, Produktbildung und die Verwertung verschiedener Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen reaktionstechnisch charakterisiert. Das entwickelte Verfahren ist als das Ergebnis dieser Charakterisierung unter Prozeßbedingungen zu sehen und zeigt, wie durch die Kombination von verfahrenstechnischen Methoden und dem Verständnis für die Physiologie von Mikroorganismen ein geeignetes Produktionsverfahren für hCT-Precursor mit *S. carnosus* bis in den halbtechnischen Maßstab entwickelt werden konnte.

6.1 Verfahrenstechnische Methoden

Ausgehend von klassischen Schüttelkolbenexperimenten wurde gezeigt, daß eine Charakterisierung von *S. carnosus* mit diesem Reaktorsystem, das in der Mikrobiologie häufig zu Untersuchungen von Anfangsreaktionsbedingungen eingesetzt wird, nur bedingt möglich ist. Von besonders kritischer Bedeutung sind dabei der nicht-kontrollierte pH-Wert und der ungenügende Sauerstoffeintrag.

pH-Wert

In parallelen Schüttelkolbenexperimenten konnte ein Minimalmedium für das Wachstum von *S. carnosus* entwickelt werden (s. 5.4). Die Reaktionsbedingungen im Schüttelkolben (pH-ungeregelt, keine Begasung) führen bereits bei sehr geringen Biotrockenmassekonzentrationen (BTM = 0,2-0,5 g l^{-1}) zu einer Inhibierung aufgrund des pH-Wertes, da durch den Kohlenhydratmetabolismus von *S. carnosus* und/oder eine Sauerstofflimitierung biomassespezifisch große Mengen organischer Säuren ausgeschieden werden (Kloos et al. 1986, Arkoudelos et al. 1995). Aufgrund der geringen Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen ist diese Methode für

Untersuchungen mit *S. carnosus* nicht geeignet. Für die Charakterisierung der Verwertung von Kohlenhydraten und Polyalkoholen durch *S. carnosus* ist die Einführung einer pH-Regelung essentiell. Dabei spielt die eingesetzte Stickstoffquelle (definierte Aminosäuregemische oder Komplexbestandteile) keine Rolle.

Auch bei der Arbeit mit reinen Komplexmedien ist der pH-Wert eine signifikante Einflußgröße. *S. carnosus* nutzt dann Aminosäuren und/oder Peptide als Kohlenstoffquelle. Diese werden zunächst desaminiert und das freigesetzte Ammonium führt zu einem starken Anstieg des pH-Wertes.

Sauerstoffeintrag

Im Allgemeinen spielt in aeroben Bioprozessen mit Bakterien und Hefen die Sauerstoffversorgung der Zellen eine zentrale Rolle. Für *S. carnosus* ist in der Literatur eine sauerstoffspezifische Biomasseselektivität $Y_{X/O}$ von $Y_{X/O}$ = 1,1 g g^{-1} beschrieben (Voit et al. 1989). Dieser Wert liegt nach Bailey et al. (1986) im typischen Bereich für das Wachstum von Bakterien unter aeroben Bedingungen. Die Selektivität wird in den Chemostat-Experimenten (s. 5.3) bestätigt. In Abhängigkeit von der Durchflußrate D liegen im steady-state die Selektivitäten $Y_{X/O}$ bei $Y_{X/O}$ = 1,0-1,2 g g^{-1}. Weuster-Botz (1999) beschreibt für optimal betriebene Schüttelkolben eine maximale Sauerstofftransportrate OTR von OTR = 2 g_{O_2} l^{-1} h^{-1}. Somit können für *S. carnosus* Biotrockenmassekonzentrationen von BTM = 4-5 g l^{-1} mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden. Damit wird sich auch bei Einführung einer pH-Regelung aufgrund der geringen Sauerstofftransportrate OTR des Reaktors Schüttelkolben eine Charakterisierung unter Prozeßbedingungen nur bedingt realisieren lassen.

Reaktorsystem miniaturisierte Blasensäule

Die fehlende Datenbasis zu Wachstum und Metabolismus von *S. carnosus* bedingt allerdings auch, daß Daten möglichst in Parallelansätzen generiert werden. Unter Berücksichtigung der Einflüsse des pH-Wertes und des Sauerstoffeintrags wurden aus diesem Grund die Untersuchungen zur Charakterisierung von *S. carnosus* in einer im Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich entwickelten Anlage

durchgeführt, die im Parallelansatz den Betrieb von bis zu 16 Blasensäulenreaktoren mit pH-Regelung ermöglicht (Profors-Anlage, Altenbach-Rehm 1999)[16].

Bei einer maximalen Sauerstofftransportrate OTR von OTR = 4,5 g_{O_2} l^{-1} h^{-1} bei Begasung mit Luft können in diesem Reaktorsystem Biotrockenmassekonzentrationen bis zu 11 g l^{-1} mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden. Dabei wurden die Medien auf die maximal mit Sauerstoff aus der Luft versorgbare Biotrockenmassekonzentration (s. 4.5) angepaßt. Referenzmessungen des Sauerstoffpartialdruckes gewährleisten die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff. In Vorversuchen mit dem Wildtyp *S. carnosus* TM300 wurde gezeigt, daß diese in der Anlage generierten Daten in den Rührkesselreaktor (V = 2 l) übertragbar sind. Die Übertragbarkeit für den Produktionsstamm zeigen exemplarisch die biomassespezifischen PhCT2-Selektivitäten $Y_{P/X}$ in den Versuchen mit Hefeextrakt als Cosubstrat (s. 5.6.2, Abbildung 6.1).

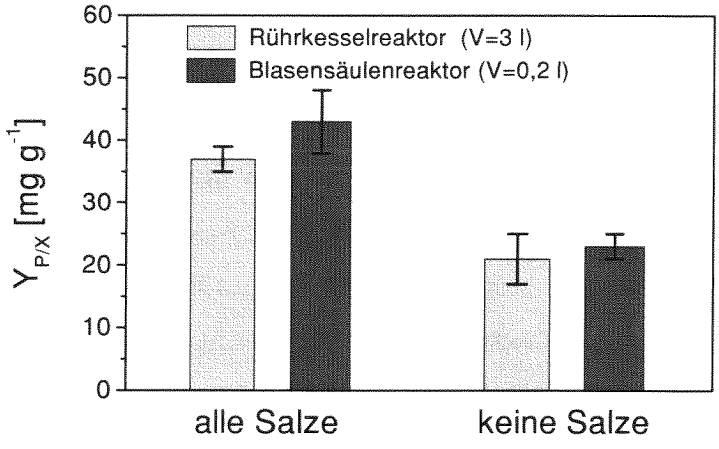

Abbildung 6.1: Übertragbarkeit der in miniaturisierten Blasensäulenreaktoren generierten Daten auf Rührkesselreaktoren. Exemplarisch dargestellt sind die biomassespezifischen PhCT2-Selektivitäten $Y_{P/X}$ der Fermentationen mit Hefeextrakt als Cosubstrat mit und ohne Salzzugabe (s. 5.6.2).

Grenzen der Verfahrenstechnik

In der Literatur ist ein verfahrenstechnischer Ansatz zur Produktion von hohen Biotrockenmassekonzentrationen (60 g l^{-1}) und Lipasekonzentrationen (230 mg l^{-1}) mit *S. carnosus* beschrieben (Lechner et al. 1988, Märkl et al. 1990). Ein spezielles

[16] Eine verfahrenstechnische Beschreibung und der Vergleich der verschiedenen Reaktorsysteme ist in Weuster-Botz (1999) zu finden.

Dialysereaktorsystem erlaubt in einem äußeren Reaktionsraum die kontinuierliche Bereitstellung von Substraten und die Abreicherung von toxischen Metaboliten. Im inneren Reaktionsraum wachsen die Organismen und werden ständig über eine Dialysemembran, die die beiden Kompartimente trennt, mit Substraten versorgt. Dieses System verdeutlicht, daß es prinzipiell möglich ist, auch mit *S. carnosus* hohe Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen zu erreichen. Allerdings zeigt dieser verfahrenstechnische Ansatz im Labormaßstab einige wesentliche Nachteile. Eine Übertragung in den halbtechnischen oder technischen Maßstab ist nur in einem sehr eingeschränkten Maß möglich. Weiterhin ergibt sich ein immens hoher Bedarf an Komplexmedienmengen, die für die Produktion eingesetzt werden müssen. Die integrale substratspezifische Lipaseausbeute $A_{P/S}$ liegt bei $A_{P/S} = 0{,}1\text{-}0{,}85$ mg g^{-1}. Über Limitierungen oder Inhibierungen des Mediums oder durch toxische Produkte werden keine Aussagen gemacht. Im Besonderen zeigt die sehr niedrige substratspezifische Biomasseausbeute $A_{X/S}$ von $A_{X/S} = 0{,}04$ g g^{-1}, daß die Substrate des Komplexmediums nur unzureichend genutzt werden.

Wahrscheinlich werden unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen große Mengen Ammonium gebildet. Dieses wird über die Dialyse abgereichert. Daten über die Toxizität von Ammonium für *S. carnosus* sind in der Literatur nicht verfügbar. Weiterhin sind die substratspezifischen Ausbeuten $A_{X/S}$ und $A_{P/S}$ so gering, da das Medium zu 67 % aus Trypton besteht. Untersuchungen haben gezeigt, daß mit Trypton als alleinigem Komplexbestandteil nur sehr geringes Wachstum und niedrige Produktbildung beobachtet werden kann (s. 5.5.1). Trypton besteht hauptsächlich aus Peptiden. Die Verwertung von freien Aminosäuren und Oligopeptiden wird später diskutiert (s. 6.3.1). Berechnet man die biomassespezifische Ausbeute $A_{X/S}$ des in der Literatur beschriebenen Verfahrens für den Hefeextraktanteil im Medium, werden in etwa die Ausbeuten bei Fermentationen mit Komplexmedien als alleinigem Medienbestandteil der vorliegenden Arbeit erreicht ($A_{X/S} = 0{,}09$ g g^{-1} zu 0,15 g g^{-1}, s. 5.5.3). Dabei ist zu beachten, daß die Ausbeute stark von dem ausgewählten Hefeextrakt abhängt (s. 5.5.1).

pH-Auxostat

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Regelung im geschlossenen Regelkreis für die kontinuierliche limitierende Hefeextraktzugabe etabliert. Damit konnte die Hypothese bestätigt werden, daß unter diesen Bedingungen Hefeextrakt in Bezug auf Wachstum und Produktbildung besser genutzt werden kann. Als Regelgröße wurde der pH-Wert (´pH-Auxostat´) ausgewählt. Alternative Regelgrößen, die einen direkten Zusammenhang zur ´Hefeextraktlimitierung´ zeigen, sind die biomassespezifischen CO_2-Bildungs- und O_2-Verbrauchsraten. Die Nutzung einer dieser berechenbaren Zustandsgrößen hätte für den Einsatz als Regelgröße die Einbindung einer Trübungsmessung bedurft. Diese sekundären Regelkreise wurden nicht eingesetzt, da sie prinzipiell störanfälliger sind als eine Regelung über den pH-Wert. Die Funktionalität des primären Regelkreises mit der Regelgröße pH-Wert konnte in Fedbatch Fermentationen nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu dem in der Literatur beschriebenen Verfahren im Dialyse-Reaktor (Lechner et al. 1988, Märkl et al. 1990) kann das in dieser Arbeit entwickelte Fedbatch Verfahren in den 150 l Maßstab übertragen werden. Durch die automatisierte Optimierung des Kohlenstoff/Stickstoffverhältnisses akkumulieren keine Metabolite, so daß der Einsatz eines Dialysemoduls mit der neu entwickelten Fermentationsstrategie nicht mehr notwendig ist. Außerdem ist eine Abtrennung von hochmolekularen Bestandteilen des Komplexmediums nicht mehr erforderlich, da die Bestandteile des Hefeextraktes nahezu quantitativ genutzt werden (s. 6.3.1). Durch den Einsatz des xyloseinduzierbaren Promotors, das Verständnis für den Glycerin-Metabolismus und den Bedarf an Makro- und Mikroelementen und durch die pH-auxostatische Prozeßführung im geschlossenen Regelkreis für hefeextraktlimitierende Bedingungen als Kombination molekularbiologischer, mikrobiologischer und verfahrenstechnischer Methoden konnte die substratspezifische Proteinausbeute $A_{P/S}$ bezogen auf den Anteil an Komplexbestandteilen um den Faktor 50 und die Raum-Zeit-Ausbeute RZA um den Faktor 28 auf RZA = 142 mg l^{-1} h^{-1} gesteigert werden.

Ein weiterer entscheidender Vorteil der Fedbatch Fermentation liegt in der Aufarbeitung. Pschorr (1992) beschreibt mit reinen Komplexmedien bei der Aufarbeitung Probleme durch Medienbestandteile. Diese werden durch Sandgathe (2000) für das Fusionsprotein PhCT2 bestätigt. Mit der Leitfähigkeit χ als Maß für die

Salzfracht von Fermentationsbrühen müssen diese für die effektive Reinigung um den Faktor 10 verdünnt werden (s. 5.5.3). Für das in dieser Arbeit entwickelte Fedbatch Verfahren konnte Sandgathe (2000) zeigen, daß durch die Verringerung der Leitfähigkeit χ von χ = 50 mS cm^{-1} auf χ = 13,1 mS cm^{-1} (Faktor 3,8 bei gleicher Produktkonzentration) das Fusionsprotein PhCT2 aus den Fermentationsbrühen in einem einzigen Schritt mittels Expanded Bed Adsorption an einem Kationentauscher sowohl von der Biomasse als auch von homologen Staphylococcen-Proteinen weitgehend abgetrennt (Reinheit > 90 %) und außerdem aufkonzentriert werden kann. Dabei mußte die Zellsuspension um den Faktor 2-3 verdünnt werden. Dies kann wahrscheinlich auf die optimale Nutzung der Bestandteile des Hefeextraktes zurückzuführen sein (s. 6.3.1).

Ein wesentlicher Vorteil der Regelung im geschlossenen Regelkreis wird bei der Übertragung in den halbtechnischen Maßstab deutlich (s. 5.3). Die Vorkulturbedingungen im 150 l Maßstab führen zu einer um 4 h verkürzten lag-Phase. Dadurch werden im Vergleich zum 3 l Maßstab Komponenten des Hefeextraktes zu einem früheren Zeitpunkt limitierend. Durch die Regelung im geschlossenen Regelkreis ist die Dosiergeschwindigkeit für das Zulaufmedium direkt an die Stoffwechselaktivität der Organismen gekoppelt und reagiert auf die verkürzte lag-Phase, indem die Dosierung des Zulaufmediums zu einem früheren Zeitpunkt beginnt. Die automatische Anpassung der Dosiergeschwindigkeit hat bei der Übertragung in den 150 l Maßstab eine Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute RZA um den Faktor 1,4 zur Folge. Bei einer Steuerung der Hefeextraktdosierung über ein fest vorgegebenes Dosierprofil ist dagegen keine direkte Reaktion auf den Zustand der Zellen möglich. Einerseits könnten bei einer verkürzten lag-Phase die Zellen beim Start der Dosierung bereits soweit limitiert sein, daß aufgrund des unterschiedlichen physiologischen Zustands der Zellen die Produktbildung verändert sein könnte. Bei einer verlängerten lag-Phase andererseits wären die Organismen beim Start der Dosierung noch nicht limitiert, damit würde wahrscheinlich die hefeextraktspezifische PhCT2-Ausbeute $A_{P/S}$ sinken.

Abschätzung der Medienkosten

Es wurde der Anteil der Kosten für das Medium des pH-auxostatischen Fedbatch Verfahren abgeschätzt. In Tabelle 6.1 sind die prozentualen Anteile der Kosten für die

einzelnen Medienkomponenten[17] dargestellt. Diese ergeben Kosten für ein Liter Medium von 1,26 DM bezogen auf alle Inhaltsstoffe am Ende des Verfahrens. Dabei wird deutlich, daß der Hefeextrakt mit 53,5 % den Hauptanteil an den Medienkosten hat.

Tabelle 6.1: Prozentuale Anteile der Kosten für die einzelnen Medienkomponenten für das pH-auxostatische Fedbatch Verfahren.

Bestandteil	Anteil an den Medienkosten [%]
Hefeextrakt	53,5
Glycerin	19,2
Xylose	13,2
Chloramphenicol	0,1
Salze	1,4
Antischaum	2,2
NaOH	2,6
H_2O bidest.	7,9

Bei einer Produktkonzentration von 2000 mg l^{-1} PhCT2 (entspricht 420 mg l^{-1} hCT) betragen die Medienkosten für hCT als Fusionsprotein in der Zellsuspension 3 DM g^{-1} hCT. Aufgrund der großen Verluste bei dem Reinigungsverfahren für das Fusionsprotein PhCT2 (Ausbeute: 60 %, Sandgathe persönliche Mitteilung) und der Derivatisierung zum biologisch aktiven hCT (Ausbeute: 5 %, s. 4.11) wurden diese in die Berechnung mit einbezogen (Abbildung 6.2).

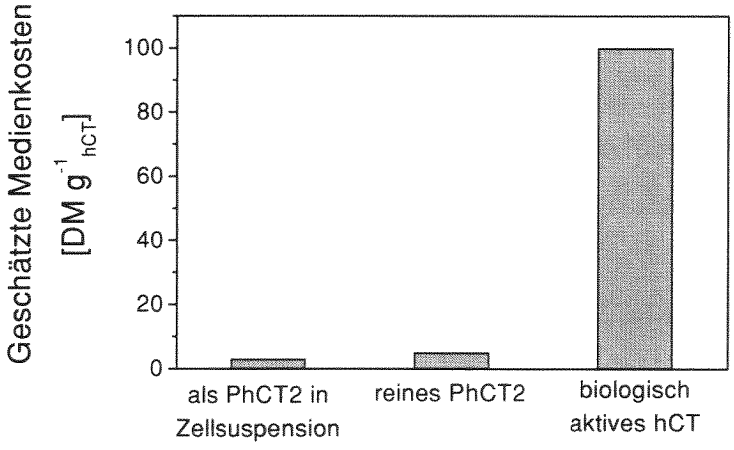

Abbildung 6.2: Geschätzte Medienkosten pro g hCT für hCT als PhCT2-Fusionsprotein in der Zellsuspension, als gereinigtes PhCT2-Fusionsprotein und für das biologisch aktive hCT.

[17] Die Kosten für Bulkware wurden mit 10 % des Katalogpreises von Sigma angenommen. Der Hefeextrakt geht mit dem tatsächlichen Preis ein, da es sich um einen technischen Extrakt handelt.

Für 1 g biologisch aktives hCT ergeben sich dadurch Medienkosten von 100 DM. Dies entspricht 0,2 % des Verkaufspreises für die Bulkware (58.000 DM g^{-1}, 10 % des Katalogpreises, Sigma) und verdeutlicht, daß die Medienkosten auch bei den geringen Ausbeuten bei der Reinigung des Fusionsproteins und der Derivatisierung zum biologisch aktiven hCT keine Rolle spielen.

6.2 Der Xylose-Promotor

Der ausgewählte Produktionsstamm exprimiert das Fusionsprotein PhCT2 unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors aus *S. xylosus*. Die Stärke des xyloseinduzierbaren Promotors wird im direkten Vergleich mit dem konstitutiven Lipase-Promotor deutlich (s. 5.2.1). Die integrale biomassespezifische PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ als Maß für die Promotorstärke ist bei dem induzierbaren System mit $Y_{P/X}$ = 66 mg g^{-1} um den Faktor 16 größer. Mit dem konstitutiven Promotor werden dabei Selektivitäten erreicht, die in der Literatur für die Expression der Lipase in *S. carnosus* beschrieben sind. Für die Lipase beträgt sie $Y_{P/X}$ = 0,7-3,7 mg g^{-1} (Lechner et al. 1988, Märkl et al. 1990, Rosenstein et al. 1992), für PhCT2 $Y_{P/X}$ = 4 mg g^{-1}. Sandgathe (2000) konnte für den xyloseinduzierbaren Promotor zeigen, daß die Sekretionskapazität erschöpft ist, intrazellulär wurde das Pre-PhCT2 nachgewiesen. Da die Grenzen der Sekretion für *S. carnosus* erreicht werden, ist die Stärke des Promotors ausreichend. Damit ist bei dem bisherigen Stand der Forschung ein Optimum zwischen maximaler Expression und Translokation verwirklicht. Weitere Arbeiten von Tippe (2000) konzentrieren sich darauf, die Komponenten des Translokators zu identifizieren und die Kapazität durch Überexpression einzelner oder mehrerer Komponenten zu erhöhen.

Zur Verbesserung der hCT-Ausbeute bezogen auf das Fusionsprotein wurde die Anzahl der hCT-Repeats in den Fusionsproteinen von zwei (PhCT2) auf vier (PhCT4) und acht (PhCT8) erhöht. Dabei sinkt die Fusionsproteinkonzentration mit steigender Anzahl an hCT-Repeats (s. 5.5.2). Die in den Fusionsproteinen produzierte hCT-Konzentration ist dabei unabhängig von Anzahl der hCT-Repeats. Unter der Annahme, daß Transkription und Translation nicht von der Größe des Proteins abhängen, könnte die Translokation von der absoluten Menge des rekombinanten Proteins abhängen. Diese Einflüsse wurden bisher für *S. carnosus* nicht untersucht. Für die reaktionstechnischen Untersuchungen wurde der Stamm ausgewählt, der das Fusionsprotein PhCT2

exprimiert. Sandgathe (2000) hat gezeigt, daß nur dieses Fusionsprotein effektiv aus Kulturüberständen gereinigt werden kann.

Der Induktor Xylose kann von *S. carnosus* nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Damit wird er während der Fermentation nicht verbraucht. Anderson et al. (1989) beschreiben das zellinterne Volumen V_i für *Staphylococcus aureus*[18] mit $V_i = 1{,}55 \text{ ml } g^{-1}_{BTM}$. Daraus läßt sich abschätzen, ob die eingesetzte Induktorkonzentration (5 g l^{-1}) für die vollständige Induktion ausreicht. Bei einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von BTM = 45 g l^{-1} ergibt sich für einen Liter Zellsuspension ein zellinternes Volumen V_i von V_i = 70 ml l^{-1}. Unter der Annahme, daß der Induktor Xylose aktiv aufgenommen und in den Zellen in zehnfacher Konzentration akkumuliert, befänden sich 3,5 g Xylose in den Zellen, die extrazelluläre Xylosekonzentration betrüge 1,5 g l^{-1}. Sizemore et al. (1992) konnten zeigen, daß Xylosekonzentrationen von 0,5 g l^{-1} eine vollständige Induktion des Promotors gewährleisten. Daher kann für das entwickelte Fedbatch Verfahren postuliert werden, daß die eingesetzte Konzentration von 5 g l^{-1} Xylose eine vollständige Induktion gewährleistet.

Es muß allerdings auch beachtet werden, daß der Induktor Xylose für die Induktion in die Zelle aufgenommen werden muß. Der Aufnahmemechanismus ist nicht bekannt. Ähnliche Zucker wie Ribose oder Arabinose können von *S. carnosus* auch nicht verwertet werden. Sizemore et al. (1992) haben in Gelshiftexperimenten gezeigt, daß Xylose selber und nicht ein Stoffwechselprodukt induziert. Sie unterbindet *in vitro* die Bildung des Repressor/Operator-Komplexes. Hier könnte auch eine Erklärung dafür zu finden sein, daß mit dem Minimalmedium extrazellulär kein Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte (s. 5.4). Wenn der unspezifische Aufnahmetransporter unter definierten Bedingungen nicht exprimiert wäre, könnte die Xylose nicht in die Zelle aufgenommen werden. Der Promotor könnte somit nicht induziert werden.

Der Promotor ist in Anwesenheit von Glucose, Fructose oder Mannit reprimiert (s. 5.4). Für die Prozeßentwicklung bietet dieses System damit den Vorteil, daß durch Zusatz einer reprimierenden Kohlenstoffquelle (hier: Glucose) in den Vorkulturstufen eine

[18] Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten von *S. carnosus* und *S. aureus* wurde dieses zellinterne Volumen auch für *S. carnosus* angenommen.

Produktion der Fusionsproteine unterbunden werden kann (s. 5.3). Die Kultivierung der Organismen im Schüttelkolben unter sauerstofflimitierten und pH-ungeregelten Bedingungen stellt eine Streßsituation dar. Die Repression des Promotors führt damit zu einer Entlastung. Diese Strategie gewährleistet außerdem die Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Stammhaltung und die Übertragung in den technischen Maßstab. Über drei Vorkulturstufen wird keine Änderung der biomassespezifischen Proteinselektivität beobachtet. Für den konstitutiven Lipase-Promotor hingegen beschreiben Voit et al. (1991) eine starke Abhängigkeit der Lipaseausbeute von der Anzahl der Vorkulturstufen. Bis zur vierten Stufe steigt der Yield von 20 % auf 100 % nahezu linear an und bleibt bis zur zwölften Stufe konstant, bevor er wieder stark abnimmt (40 % nach 15 Generationen).

Im Vergleich zu konstitutiven Promotoren haben induzierbare Systeme prinzipiell den Vorteil, die Produktbildung vom Wachstum entkoppeln zu können. Für den xyloseinduzierbaren Promotor wurde von Sizemore et al. (1993) ein linearer Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktbildung bei der Expression eines Luciferasesystems in *S. carnosus* beschrieben. Dieser wird durch die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt (s. 5.5.1, 5.6.1). Der Promotor ist ursprünglich an der Regulation der Expression für die Verwertung der Kohlenstoffquelle Xylose beteiligt. In der Regel besteht ein Zusammenhang zwischen der Verwertung der Kohlenstoffquelle und dem Wachstum der Organismen, so daß auch die Expression der entsprechenden Enzyme strikt an das Wachstum gekoppelt ist. Daß sich solche Systeme allerdings auch vom Wachstum entkoppeln lassen, zeigt das Lactose-Operon von *E. coli*. So konnte beispielsweise Nakada bereits 1962 mit einem *E. coli*-Stamm, der für Thymin auxotroph ist, zeigen, daß unter thyminlimitierten Bedingungen die Expression der β-Galactosidase vom Wachstum der Zellen entkoppelt ist. Dieses Beispiel verdeutlicht allerdings auch, daß eine Entkopplung nur durch die Limitierung des Wachstums realisiert werden kann. Dies setzt weiterhin eine genaue Kenntnis der Stoffwechselvorgänge und den Einsatz definierter Medien voraus. Die bisherigen Erkenntnisse über *S. carnosus* sind nicht ausreichend, um eine solche Strategie für den xyloseinduzierbaren Promotor entwickeln zu können, da die Bedürfnisse des Organismus noch weitgehend unbekannt sind.

Für den Produktionsstamm wurde unter induzierten Bedingungen eine phänotypische Instabilität auch in Anwesenheit von Chloramphenicol beobachtet (s. 5.3). Sandgathe (2000) konnte im Bereich der Stammentwicklung zeigen, daß die genetische Stabilität über 40 Generationen gewährleistet werden kann. Genetisch stabil bedeutet, daß sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene über diesen Zeitraum keine Banden identifiziert werden konnten, die auf Rekombinationsereignisse in dem Gen für das Fusionsprotein zurückzuführen sind. Dazu wurden die Stämme in repetetiv Batch Versuchen in Inkubationsröhrchen über 40 Generationen kultiviert und die genetische Stabilität der Konstrukte auf Protein- und DNA-Ebene untersucht. Die Analyse erfolgte qualitativ mittels Western-Blot bzw. Agarose-Gelelektrophorese (Sandgathe 2000). Diese Ergebnisse decken sich nicht mit der in dieser Arbeit beobachteten phänotypischen Instabilität. Bei dem Klonierungsvektor pXR100 handelt es sich um ein multicopy Plasmid, dessen Kopienzahl unter allen Bedingungen bei 40-50 pro Zelle liegen sollte und theoretisch bei Anlegen eines Selektionsdrucks nicht variiert wird. Wenn Rekombinationsereignisse auf genetischer Ebene ausgeschlossen werden, könnte eine Veränderung in der Promotorregion oder eine Abnahme der Kopienzahl pro Zelle die phänotypische Instabilität erklären. Allerdings sollte dabei beachtet werden, daß in beiden Fällen die Kultivierungsbedingungen in Bezug auf die Prozeßführung (Batch versus kontinuierliche Kultur), den pH-Wert und die Sauerstoffversorgung stark differieren.

Ein Phänomen des Lactose-Metabolismus des Produktionsstammes soll nicht unerwähnt bleiben (s. 5.4). Während mit dem Wildtyp *S. carnosus* TM300 mit Lactose integrale Biomasseselektivitäten $Y_{X/S}$ von $Y_{X/S}$ = 0,3 g g^{-1} erreicht werden, sind sie bei dem rekombinanten Stamm um den Faktor 2 geringer ($Y_{X/S}$ = 0,15 g g^{-1}). Dies könnte dadurch erklärt werden, daß durch Einführung des Xylose-Operons der rekombinante Stamm nicht in der Lage ist, die aus der Lactose freigesetzte Galactose zu verwerten. Galactose wird in Staphylococcen über einen induzierbaren Stoffwechselweg verwertet (Kloos et al. 1991). Eine trans-Regulation der regulatorischen Komponenten des Xylose-Operons könnte dieses Phänomen erklären. Es ist allerdings wahrscheinlicher, daß Xylose als Repressor des Galactose-Operons wirken könnte. Dieses Phänomen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben und bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen über die Katabolitrepression in Staphylococcen.

6.3 Metabolismus von *S. carnosus*

6.3.1 Abschätzung der Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse

Über die Massenbilanzen der Elemente lassen sich die Stoffflüsse der Edukte in die Produkte (Biomasse, Protein, CO_2, NH_4, Acetat etc.) abschätzen. Dabei ist die Bilanzierung von Fermentationen mit Komplexmedien sehr problematisch, da durch die undefinierte Medienzusammensetzung häufig große Bilanzlücken auftreten. Diese sind auf nicht verwertete Substanzen in dem komplexen Substrat zurückzuführen. Allerdings kann die Bilanzlücke auch als ein Maß für die Verwertung der Bestandteile des Komplexmediums bewertet werden, wenn Fermentationen in denselben Reaktoren unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden[19]. Aufgrund der Komplexität des Mediums können Edukt- und Produktflüsse nur als Integrale über die Prozeßzeit betrachtet werden. Weiterhin ist ein Fehler von 10 % einzubeziehen, da alle betrachteten Fermentationen in Laborreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 2 l durchgeführt wurden. Der Fehler bezieht sich dabei vor allem auf die Probenahme und die nicht exakt definierte Zusammensetzung des komplexen Substrates Hefeextrakt[20].

In Fermentationen mit Hefeextrakt als alleinigem Medienbestandteil (s. 5.5.3) werden wahrscheinlich nur freie Aminosäuren für Wachstum und Produktbildung genutzt. Die Aminosäureanalytik zeigt, daß in der stationären Phase die Summe aller gemessenen Aminosäuren 2 % der Ausgangskonzentration beträgt. Aus der Aminosäurezusammensetzung[21] und einer mittleren aminosäurespezifischen Biomasseausbeute $A_{X/S}$ von $A_{X/S} = 0{,}4\ g\ g^{-1}$ (Keller et al. 1977) ergäbe sich für den eingesetzten Hefeextrakt unter der Annahme, daß *S. carnosus* nur freie Aminosäuren für das Wachstum nutzen kann, theoretisch eine Ausbeute von $A_{X/S} = 0{,}16\ g\ g^{-1}$. Diese wird in den Fermentationen bestätigt (s. 5.5.3). Für die Bilanzierung des Kohlenstoffs ergibt

---

[19] Als Redundanzmessung wäre eine Kohlenstoffbestimmung im Restmedium erstrebenswert. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

[20] Für den Hefeextrakt müssen auf der Grundlage eigener analytischer Untersuchungen und den allgemeinen Herstellerangaben bei der Berechnung der Kohlenstoff- und Stickstoffflußverteilungen einige Annahmen getroffen werden. Die detaillierte Berechnung der Flußverteilungen und die entsprechenden Annahmen sind im Anhang dargestellt. Deshalb sollte der Hauptaugenmerk der Betrachtung auch nicht nur auf den absoluten Zahlenwerten der Flußverteilungen sondern vielmehr auf den Verhältnissen der betrachteten Flußverteilungen liegen.

[21] Im Anhang sind Angaben über die Aminosäurezusammensetzung des eingesetzten Hefeextraktes zu finden. Die Summe der freien Aminosäuren ergibt 37 %. Da nur 16 der 20 Aminosäuren quantifiziert wurden, wurde mit einem Anteil an freien Aminosäuren von 40 % gerechnet.

sich eine Lücke von 62 %. Eine Bilanz über den Kohlenstoff der freien Aminosäuren hingegen kann bis auf 20 % geschlossen werden. Bei den nicht-verwerteten Substanzen handelt es sich wahrscheinlich hauptsächlich um Oligopeptide. Die Stickstoffbilanzen[22] dieser Fermentationen bestätigen, daß nur die freien Aminosäuren verwertet werden. Für den gesamten Hefeextrakt ergibt sich eine Bilanzlücke von 65 %. Betrachtet man nur die freien Aminosäuren kann die Stickstoffbilanz zu 73 % geschlossen werden. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Märkl et al. (1990) gestützt. In vergleichenden Batch Verfahren im Rührkesselreaktor und Dialyse-Reaktor wurde über den Permeationskoeffizienten der Dialysemembran das maximale Molekulargewicht M der von *S. carnosus* bei Wachstum auf reinen Komplexmedien verwerteten Substrate berechnet. Dieses liegt bei M < 400 D. Bei den Substanzen in den komplexen Substraten mit M < 400 D handelt es sich hauptsächlich um freie Aminosäuren und Di-, Tri- oder Tetrapeptide.

Betrachtet man die Batch Fermentationen mit Hefeextrakt als Cosubstrat und Glycerin als Kohlenstoffquelle (mit Salzen, s. 5.6.2) beträgt die Bilanzlücke für Kohlenstoff 14 %. In den Fedbatch Fermentationen (s. 5.6.4) kann die Bilanz sogar zu 99 % geschlossen werden (Abbildung 6.3).

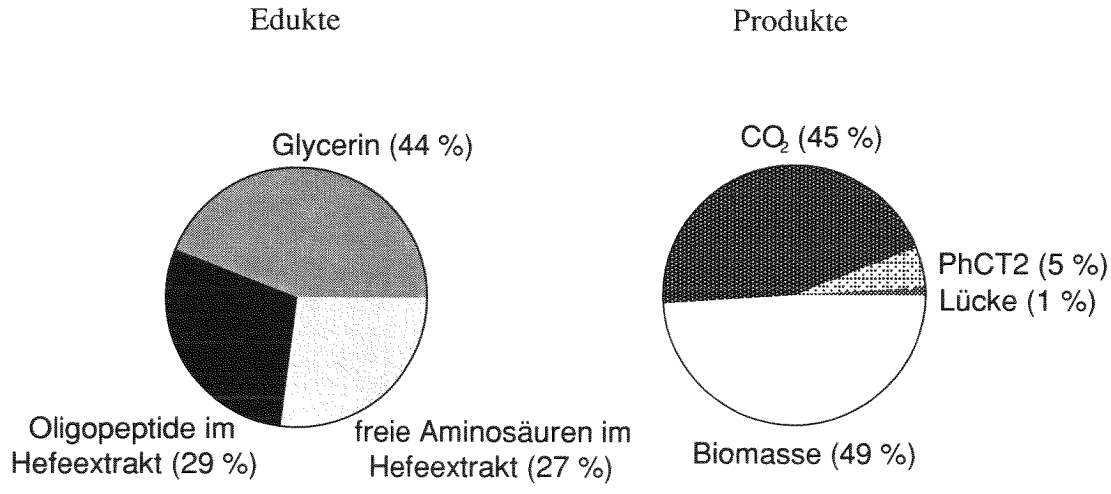

Abbildung 6.3: Kohlenstoffverteilung der Edukte und der Produkte in Fedbatch Fermentationen unter hefeextraktlimitierenden Bedingungen im geschlossenen Regelkreis (s. 5.6.4).

[22] Die Stickstoffbilanzen können nur als Tendenz gewertet werden. Es handelt sich um ein offenes System, da die Ammoniumkonzentration in der Abluft nicht quantifiziert werden konnte.

Aus der Betrachtung der Kohlenstoffverteilung und der allgemeinen Stoffwechselwege wurden die beiden folgenden Hypothesen entwickelt, die im weiteren Verlauf gestützt werden sollen:

- Glycerin wird wahrscheinlich fast ausschließlich als Energiequelle genutzt.
- *S. carnosus* verwertet wahrscheinlich neben freien Aminosäuren auch Oligopeptide des Hefeextraktes nahezu quantitativ.

Glycerin als Energiequelle

Glycerin als Kohlenstoff- und/oder Energiequelle geht auf der Stufe des Dihydroxyacetons in die Glycolyse ein und wird über die oxidative Decarboxylierung des Pyruvates als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingebracht (Abbildung 6.4).

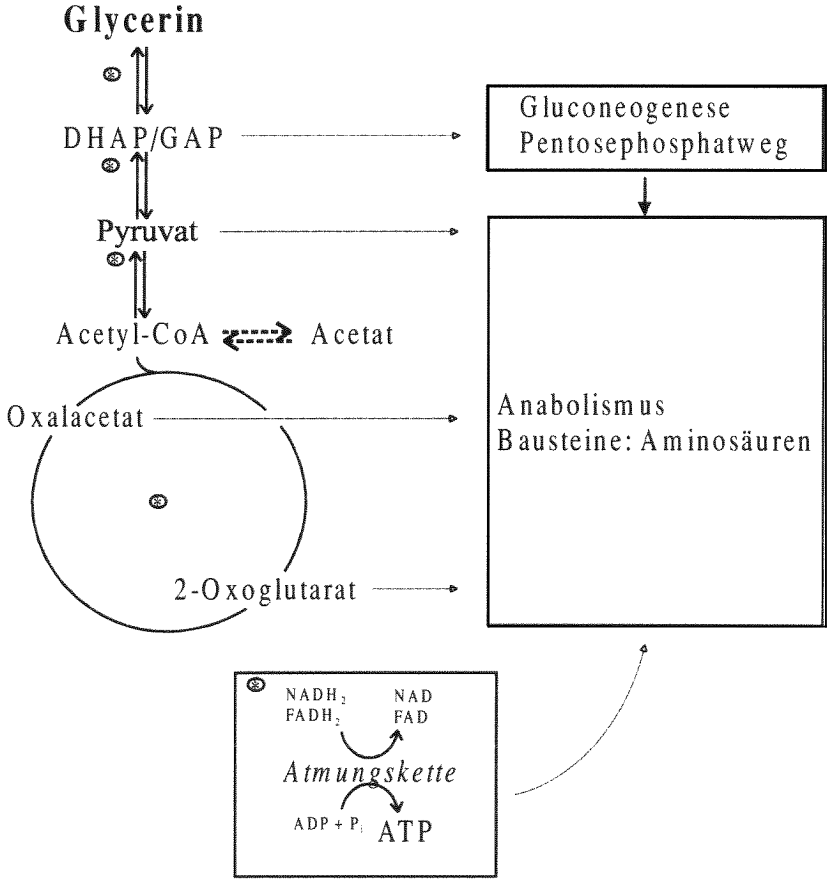

Abbildung 6.4: Schema für den Glycerin-Metabolismus

Viele Metabolite dieses Stoffwechselweges können in den Anabolismus eingehen. Da aber alle Produkte dieser anabolen Reaktionen (vor allem Aminosäuren) bereits im Hefeextrakt enthalten sind, werden die Metabolite wahrscheinlich nicht dem

Stoffwechsel entzogen, sondern vollständig zu CO_2 unter Gewinnung von Reduktionsäquivalenten reduziert. So werden nach dem allgemeinen Schema des Grundstoffwechsels aus einem Molekül Glycerin 6 $NAD(P)H_2$, 1 $FADH_2$ und 2 ATP gewonnen, die für anabole Reaktionen genutzt werden können (Schlegel 1992). Die Hypothese wird durch die Kohlenstoffverteilung der Edukte und Produkte gestützt. Wenn Glycerin fast ausschließlich als Energiequelle von *S. carnosus* genutzt wird, müßte der Kohlenstoff des Glycerins im CO_2 wiederzufinden sein. Die Anteile des Kohlenstoffs des Edukts Glycerin (44 %) und des Produkts CO_2 (45 %) entsprechen sich im Rahmen der Meßgenauigkeit, so daß unter diesen Bedingungen Glycerin wahrscheinlich ausschließlich als Energiequelle genutzt wird.

Verwertung von Oligopeptiden

Mit Hefeextrakt als alleinigem Medienbestandteil konnte dargelegt werden, daß *S. carnosus* für Wachstum und Produktbildung wahrscheinlich ausschließlich freie Aminosäuren als Kohlenstoff-, Energie- und Stickstoffquelle verwertet. Oligopeptide werden wahrscheinlich nicht genutzt. Die Kohlenstoffverteilung der Fedbatch Fermentationen unter hefeextraktlimitierenden Bedingungen zeigt, daß der Bedarf an Kohlenstoff für die Biomasse nicht durch die freien Aminosäuren im Hefeextrakt gedeckt werden kann. Unter der Annahme, daß Glycerin wahrscheinlich fast ausschließlich als Energiequelle genutzt wird, müßte der Kohlenstoff, der sich in der Biomasse und dem Produkt wiederfindet, aus den Oligopeptiden des Hefeextraktes stammen. Da *S. carnosus* keine Exoproteasen besitzt, müßten die Oligopeptide als Ganze aufgenommen und intrazellulär hydrolysiert werden. Der hohe Energiebedarf für diese Vorgänge könnte durch die Energiequelle Glycerin gedeckt werden.

Die Rolle der Oligopeptide (vor allem höhermolekulare) wird auch deutlich bei der Betrachtung der biomassespezifischen PhCT2-Selektivitäten bei Supplementierung des Minimalmediums mit Ultrafiltrationsfraktionen des Hefeextraktes (s. 5.4). Durch die Eliminierung der Oligopeptide >3 kD sinkt die Selektivität im Vergleich zum gesamten Hefeextrakt um den Faktor 2,3. Dabei handelt es sich um einen synergistischen Effekt der verschiedenen Fraktionen. Die einzelnen Fraktionen >3 kD alleine zeigen weder einen wachstums- noch einen produktbildungsfördernden Effekt.

Ammonium als Stickstoffquelle

Während der Fedbatch Fermentationen (s. 5.6.5) wird integral über die Prozeßzeit ein Nettoverbrauch an Ammonium beobachtet. In der Literatur ist bisher nicht beschrieben, daß *S. carnosus* anorganisches Ammonium als Stickstoffquelle nutzen kann. Dies ist damit zu erklären, daß in der Literatur für *S. carnosus* meistens reine Komplexmedien eingesetzt werden. Dort führt die Nutzung der freien Aminosäuren als Kohlenstoffquelle zu einem Überschuß an Stickstoff, so daß Ammonium im Überstand akkumuliert. Unter den Bedingungen der Fedbatch Fermentationen (Bereitstellung großer Mengen an Energie und limitierende Bedingungen für Komponenten des Hefeextraktes) könnte sich der Ammoniumverbrauch wie folgt erklären lassen:

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren im Hefeextrakt, die zusätzlich Stickstoff enthalten, sind vergleichsweise gering, beispielsweise ist Glutamin nicht detektierbar, und die Konzentration an freiem Arginin[23] ist auch gering. Dies gilt wahrscheinlich auch für die Aminosäurezusammensetzung der Oligopeptide. Ausgehend von allgemeinen Stoffwechselwegen ist es möglich, diese Aminosäuren aus Glutamat zu synthetisieren (Gottschalk 1978). Durch die limitierenden Bedingungen für diese Aminosäuren sollte aufgrund der Gleichgewichtsverschiebung die Reaktion in Richtung Synthese der Aminosäuren laufen. Diese Synthese wäre mit einem Verbrauch an Ammonium und Energie in Form von Reduktionsäquivalenten und ATP verbunden. Wenn aus dem Glycerinkatabolismus große Mengen Energie zur Verfügung ständen, könnte *S. carnosus* unter diesen Bedingungen wahrscheinlich Ammonium als Stickstoffquelle nutzen.

Diese Hypothese kann nicht durch die Bilanzierung des Stickstoffs der Fedbatch Fermentationen gestützt werden. Theoretisch müßte sich der Bedarf an Stickstoff in einer Bilanzlücke in der Bilanz für die Aminosäuren und Oligopeptide und der Biomasse und des Fusionsproteins PhCT2 widerspiegeln.

Es sollte festgehalten werden, daß die Ergebnisse der Chemostat-Experimente (s. 5.3) die bisher beschriebenen neuen Erkenntnisse über den Metabolismus von *S. carnosus*

[23] Arginin ist die Aminosäure, die als erste nicht mehr im Medium nachzuweisen ist (s. Abbildung 5.26). Bezogen auf die freien Aminosäuren im Hefeextrakt beträgt die Argininkonzentration etwa 2 % aller Aminosäuren.

bestätigen. Diese wurden hier allerdings nicht explizit berücksichtigt, da die Aussagekräftigkeit aufgrund der phänotypischen Instabilität in Frage gestellt werden müßte.

6.3.2 Rolle der Spurenelemente

Durch den Zusammenhang zwischen Glycerinverbrauch (Acetatbildung) und Produktbildung in Batch Fermentationen mit Hefeextrakt und Glycerin und die Elementanalyse des Hefeextraktes und der Biomasse wurde eine Limitierung durch Makro- und Mikroelemente identifiziert (s. 5.6.1). Eine herausragende Rolle spielen dabei die Elemente Eisen und Kupfer.

Beide Elemente spielen eine wichtige Rolle in der Atmungskette, Eisen als Bestandteil der Cytochrome, Kupfer als Cofaktor für die Cytochrom-Oxidase (Schlegel 1992). In der Atmungskette wird aus den Reduktionsäquivalenten $NADH_2$ und $FADH_2$ ATP regeneriert. Da sowohl bei der Proteinbiosynthese als auch bei der Translokation ATP verbraucht wird, könnte *S. carnosus* ohne Zusatz dieser Elemente energetisch auf der ATP-Ebene limitiert sein. Auf der Ebene der Proteinbiosynthese kann allerdings die Verdopplung der biomassespezifischen PhCT2-Selektivität $Y_{P/X}$ nicht erklärt werden, da bei erhöhter ATP-Bereitstellung auch die Biomassesynthese ansteigen sollte. Daher könnte die Selektivität $Y_{P/X}$ aufgrund einer erhöhten Translokaseaktivität steigen. Dies wurde von Hirooka et al. (1988) auch für die extrazelluläre Proteinproduktion bei *Staphylococcus aureus* S-6 beobachtet. Dabei wird die biomassespezifische Selektivität $Y_{P/X}$ für sowohl Coagulase als auch Enterotoxin B von der Eisenkonzentration des Mediums stark beeinflußt. Da allerdings die Steigerung der Selektivität keinem einzelnen Element zugeordnet werden kann, dürfen synergistische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise könnte sich durch die anderen zugesetzten Elemente die Affinität der RNA-Polymerase für Promotorregionen verändern. Dies würde eine Verschiebung der RNA-Zusammensetzung und damit auch Proteinsyntheserate der Zellen verursachen.

Der Bedarf von *S. carnosus* an Mikro- und Makroelementen ist in der Literatur nicht beschrieben. Die in dieser Arbeit generierten Daten sind für eine genaue Beschreibung der Zusammenhänge nicht ausreichend. Allerdings zeigen die Ergebnisse deutlich die Abhängigkeiten des Metabolismus und der biomassespezifischen PhCT2-Selektivität

$Y_{P/X}$ von den Spurenelementen. Für eine Beschreibung der Zusammenhänge wären weitere intensive Versuchsreihen notwendig. Es muß allerdings an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß hier ein enormes Optimierungspotential für die Produktion von heterologen Proteinen mit *S. carnosus* zu finden sein könnte.

6.3.3 Katabolismus und Anabolismus

Die Ausführungen über die Verwertung der verschiedenen Substrate weisen auf die Besonderheiten im Metabolismus von *S. carnosus* unter den beschriebenen Bedingungen hin:

- Es könnte eine strikte Trennung von katabolen Reaktionen der Glycolyse und des Citratzyklus und anabolen Reaktionen vorliegen.
- Die Verknüpfung der beiden Komplexe könnte über die Verfügbarkeit von ATP und/oder Reduktionsäquivalenten erfolgen.

Die Trennung wird besonders deutlich, wenn man die Aminosäureauxotrophien von *S. carnosus* betrachtet (s. 5.4). Mit Ausnahme der aromatischen Aminosäuren und Histidin, auf die gesondert im Verlauf dieses Kapitels eingegangen werden soll, enthält das Minimalmedium aus jeder Aminosäure-Familie eine Aminosäure[24] (s. Abbildung 6.5). Innerhalb einer Familie können sie zum Teil gegeneinander ausgetauscht werden (Daten nicht gezeigt), allerdings wurde in dieser Arbeit kein Wachstum beobachtet, wenn eine Familie nicht vertreten ist. Das heißt, im Vergleich zu anderen Organismen wie zum Beispiel *E. coli*, scheint *S. carnosus* nicht in der Lage zu sein, die Metabolite der Glycolyse und des Citratzyklus durch Aminierung als Aminosäuren in den Anabolismus einfließen zu lassen. Dies gilt sicherlich auch für das Wachstum auf Komplexmedien (mit zusätzlicher Energiequelle), da dann alle Aminosäuren als anabole Substrate vorhanden sind.

Innerhalb des Anabolismus sind anscheinend in Abhängigkeit von der vorhandenen Energie Umbaureaktionen der Aminosäuren und die Verwertung von Oligopeptiden möglich. Die notwendige Energie in Form von ATP und $NADPH_2$ könnte aus dem Katabolismus und der Atmungskette stammen. Für Staphylococcen ist eine

[24] Der Wildtyp ist auxotroph für Alanin, Asparaginsäure, Arginin und Cystein.

Transhydrogenase-Aktivität für die Umwandlung von $NADH_2$ in $NADPH_2$ beschrieben (Blumenthal 1972). Damit würden ausreichend Reduktionsäquivalente für die anabolen Reaktionen zur Verfügung stehen.

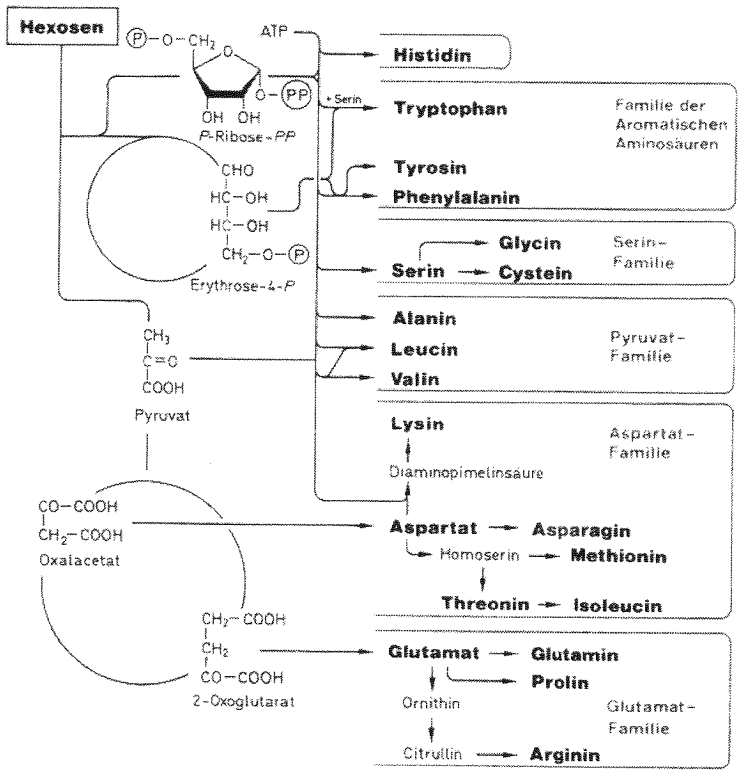

Abbildung 6.5: Allgemeines Schema der Synthese der 20 Aminosäuren aus den Intermediaten des Stoffwechsels (Schlegel 1992)

Pentosephosphatweg

Ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg als Schnittstelle zwischen Katabolismus und Anabolismus ist der Pentosephosphatweg, der in Staphylococcen vorhanden ist (Blumenthal 1972) und bisher nicht betrachtet wurde. Er dient hauptsächlich der Bereitstellung von Intermediaten für die Aromatenbiosynthese und Pentosen für die DNA- und RNA-Synthese. Die Untersuchungen zu synthetischen Medien zeigen, daß der Pentosephosphatweg wahrscheinlich auch in *S. carnosus* vorhanden ist. *S. carnosus* ist weder für Histidin noch für die aromatischen Aminosäuren auxotroph. Hier könnte eine Verknüpfung zwischen Katabolismus und Anabolismus vorliegen. Mit Glycerin als Energiequelle würde der Pentosephosphatweg in die reduktive Richtung unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten verlaufen. Die Verteilung der Kohlenstoffflüsse über die Glycolyse und den Pentosephosphatweg für *S. carnosus* ist in der Literatur nicht beschrieben. Es finden sich zahlreiche Angaben zu *S. aureus* (Blumenthal 1972).

Diese beziehen sich allerdings ausschließlich auf den oxidativen Pentosephosphatweg beim Wachstum auf Glucose. Mit den in dieser Arbeit generierten Daten ist keine Aussage über die Verteilung möglich. Bei der gesamten Betrachtung des Stoffwechsels von *S. carnosus* soll dieser Weg allerdings nicht unerwähnt bleiben. Es kann schließlich gezeigt werden, daß dieser Stoffwechselweg wahrscheinlich auch in *S. carnosus* existiert und unter den beschriebenen Bedingungen eventuell die einzige Möglichkeit für die Verknüpfung von Katabolismus und Anabolismus für den Kohlenstoffffluß darstellen könnte.

Die Ausführungen zum Metabolismus von *S. carnosus* deuten an, daß weitere Erkenntnisse über die Verteilungen und Flüsse der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff bei diesem Organismus für die Optimierung von Wachstum und Produktion heterologer Proteine eine wichtige Rolle spielen könnten. Die Stoffflußanalyse mit radioaktiv markierten Substraten gestaltet sich für *S. carnosus* als problematisch, da bis zu diesem Zeitpunkt die Bedürfnisse dieses Bakteriums noch nicht soweit charakterisiert sind, daß diese Untersuchungen unter definierten Bedingungen durchgeführt werden könnten. Allerdings könnte diese Methode auch mit den bisherigen Erkenntnissen (Einsatz von Komplexmedien) sinnvoll genutzt werden. Über die Analyse des Glycerinflusses könnte ermittelt werden, ob unter den beschriebenen Bedingungen Glycerin hauptsächlich als Energiequelle genutzt wird. Weiterhin könnten eventuell wichtige Erkenntnisse über die Verknüpfung von Katabolismus und Anabolismus und den Fluß durch den Pentosephosphatweg gewonnen werden.

In Bezug auf die Verwertung des Elementes Stickstoff müßte das System für die Bilanzierung zunächst durch Verwendung einer Abgasanalytik für NH_3 geschlossen werden. Mittels Stoffflußanalyse mit ^{15}N als Ammoniumsalz könnte die Nutzung von anorganischem Stickstoff durch *S. carnosus* untersucht werden.

Die Erläuterungen zeigen weiterhin, daß der energetische Zustand der Zellen wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluß sowohl auf Wachstum als auch Produktbildung und Translokation hat. Aus diesem Grunde könnten mit quantitativen Messungen des Membranpotentials und des Energiecharges als Maß für den Energiehaushalt weitere Erkenntnisse über limitierende Schritte in dem beschriebenen Fedbatch Verfahren gewonnen werden.

6.4 Das Expressionssystem *S. carnosus*

Im Rahmen des Forschungsvorhabens, in dem diese Arbeit abgefaßt wurde, konnte ein Verfahren für die Produktion von hCT-Precursorn mit *S. carnosus* entwickelt werden. Dieses soll zunächst mit Verfahren, die andere Expressionssysteme für die Herstellung von Calcitonin nutzen, verglichen werden. Weiterhin sollen die wesentlichen Aspekte für die Nutzung von *S. carnosus* als alternatives Expressionssystem aufgezeigt werden.

6.4.1 *S. carnosus* als Expressionssystem für Calcitonin

Bei dem Vergleich von *S. carnosus* mit anderen Expressionssystemen für hCT und sCT müssen verschiedene Punkte beachtet werden:

- Das mit *S. carnosus* sekretierte Fusionsprotein PhCT2 besteht zu 21 % aus hCT. Dadurch ergibt sich für das Fedbatch Verfahren eine hCT-Konzentration von 420 mg l^{-1} mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von RZA = 28 mg l^{-1} h^{-1}.
- Es muß zwischen der Herstellung von Precursorn und dem biologisch aktiven hCT unterschieden werden.
- Das rekombinante Produkt kann in verschiedenen Systemen an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein.

Precursor-Produktion

In der Literatur sind für das Expressionssystem *E. coli* reaktionstechnische Arbeiten über die Produktion von sowohl hCT als auch sCT beschrieben. Dabei liegen die Precursor intrazellulär als inclusion bodies oder extrazellulär im Medium gelöst vor (Yabuta et al. 1995, Ishikawa et al. 1999, Meenan et al. 1997). Die weiteren zahlreichen Untersuchungen in der Literatur beschränken sich hauptsächlich auf das Reaktorsystem Schüttelkolben.

Für die Produktion als inclusion bodies werden Precursorkonzentrationen von 500 mg l^{-1} (Yabuta et al. 1995) und 840 mg l^{-1} (Ishikawa et al. 1999) beschrieben. Das von Ishikawa et al. (1999) beschriebene Verfahren ist dem der vorliegenden Arbeit damit sowohl in der Produktkonzentration (Faktor 2) als auch in der Raum-Zeit-Ausbeute (Faktor 1,4) überlegen. Allerdings haben inclusion bodies prinzipiell den Nachteil, daß vor allem im technischen Maßstab die Aufarbeitung sehr problematisch

ist. Das denaturierte Protein muß zur weiteren Aktivierung unter reduzierenden Bedingungen renaturiert werden. So werden beispielsweise die hCT-inclusion bodies nach Zellernte, Zellaufschluß und Abtrennung der Zellbestandteile in 8 M Harnstoff und 2 mM Dithiothreitol gelöst (Yabuta et al. 1995). Mit *S. carnosus* sind die Precursor in der Zellsuspension gelöst. Sandgathe (2000) konnte zeigen, daß diese in einem Reinigungsschritt im Fließbett mit einer Reinheit >90% gereinigt werden können. Dabei wird das Protein in einem einzigen Schritt von der Biomasse, einem Großteil homologer Proteine und Medienbestandteilen abgetrennt und außerdem aufkonzentriert.

Reaktionstechnische Arbeiten zur extrazellulären Herstellung mit *E. coli* resultieren in 200 mg l^{-1} eines sCT-Precursors. In der optimierten Fedbatch Fermentation beträgt die Raum-Zeit-Ausbeute 7 mg l^{-1} h^{-1} (Meenan et al. 1997). Dies zeigt, daß *S. carnosus* auch im Vergleich mit diesem System sowohl in Bezug auf die Konzentration (Faktor 2,1) als auch die Raum-Zeit-Ausbeute (Faktor 4) deutlich überlegen ist. Weiterhin ist die Stabilität des sCT-Precursors mit *E. coli* stark abhängig von dem pH-Wert der Zellsuspension. Nur wenn diese unmittelbar nach dem Ende der Fermentation auf pH 3 titriert und auf Raumtemperatur[25] abgekühlt wird, ist der Precursor über 24 h stabil. Bei einem pH-Wert von 6,8, bei dem die Fermentation durchgeführt wird, können bereits 3 h nach dem Ende der Fermentation nur noch etwa 60 % des Precursors wiedergefunden werden. Mit *S. carnosus* hingegen konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein unter Prozeßbedingungen (37°C, pH 7) über mindestens 7 h nach Beenden der Fermentation stabil ist (s. 5.6.4).

Arbeiten zur Precursor-Produktion mit *S. cerevisiae* zeigen, daß mit diesem System der hCT-Precursor außerhalb der Zelle stabil ist (Mironova et al. 1991). Es wurden allerdings keine reaktionstechnischen Arbeiten durchgeführt. Die Produktkonzentration ist mit 20 mg l^{-1} vergleichsweise sehr gering.

Produktion von biologisch aktivem Calcitonin

Die Expression des biologisch aktiven hCT ist nur mit speziellen Zellinien, die eine *in vivo* Amidierung erlauben, möglich. Mit einer Maushypophysenzellinie werden extrazellulär 20-30 µg l^{-1} aktives hCT produziert (Merli et al. 1996).

---

[25] Die Fermentationstemperatur liegt bei 30°C.

Bei dem Vergleich der entwickelten Fedbatch Fermentation mit diesem System müssen die Ausbeuten der Reinigung des Fusionsproteins und der *in vitro* Aktivierung berücksichtigt werden. Dadurch ergibt sich mit *S. carnosus* eine Produktkonzentration von 13 mg l^{-1} (Faktor 430). Weiterhin zeichnet sich auch *S. carnosus* wie alle bakteriellen Systeme im Vergleich zu tierischen Zellinien durch eine einfachere Handhabung (vor allem bezogen auf die Steriltechnik und die molekularbiologischen Methoden), eine kürzere Prozeßdauer und geringere Medienkosten aus.

6.4.2 *S. carnosus* als alternatives Expressionssystem

Der Vergleich von *S. carnosus* als Expressionssystem für Calcitonin mit anderen Systemen zeigt, daß es für dieses Protein als Alternative genutzt werden könnte. Dabei stellt sich die Frage, in wie weit dieser Organismus generell eine Alternative darstellt und wo die Grenzen dieses Expressionssystems liegen.

Prinzipiell sollte es möglich sein, jedes Protein in *S. carnosus* zu exprimieren und durch Fusion an das Pre-Propeptid der Lipase aus *S. hyicus* in das Kulturmedium zu sekretieren. Mit Proteinen, die in ihrer Größe und Struktur dem Fusionsprotein PhCT2 entsprechen, sollten dabei auch ähnliche Ausbeuten zu erreichen sein. Dabei zeigen die Ergebnisse der Arbeit allerdings, daß mit dem bisherigen Wissen über die Expression und Sekretion von heterologen Proteinen mit *S. carnosus* keine allgemeine Aussage getroffen werden kann. Bei der Produktion von Fusionsproteinen mit verschiedener Anzahl an hCT-Multimeren sinkt mit steigender Anzahl an Monomeren die Fusionsproteinkonzentration im Überstand. Bei der Abschätzung der produzierten Precursorkonzentration, ergeben sich für alle Fusionsproteine in etwa äquimolare Mengen an hCT. Das heißt, die Produktion könnte durch das heterologe Protein limitiert sein. Diese Limitierung könnte in Bereichen Transkription, Translation oder Translokation liegen. Dabei ist bisher noch nicht untersucht, ob nur die Größe des Protein oder auch die Primärstruktur einen Einfluß ausübt.

Quantifizierung der heterologen Proteine

Bei der Produktion heterologer Proteine mit *S. carnosus* ist die Produktanalytik ein allgemein gültiges Problem, das gelöst werden muß: Der Pre-Pro-Anteil ist essentiell für die effiziente Translokation und Stabilität der Proteine. Das Prepeptid wird während

der Translokation durch eine membranständige Signalpeptidase abgespalten. Das Propeptid allerdings verbleibt am heterologen Protein, so daß im Überstand ein Fusionsprotein quantifiziert werden soll. Da diese nicht kommerziell erhältlich sind, müssen sie stets aus den Fermentationsüberständen isoliert werden, um als Standard für eine Messung zur Verfügung zu stehen[26].

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Quantifizierung des Fusionsproteins ein ELISA entwickelt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler hCT-Antikörper eingesetzt. Dieser Ansatz kann prinzipiell für jedes heterologe Protein gewählt werden. Allerdings muß dann jedesmal für den Primärantikörper gezeigt werden, daß er nicht mit homologen Staphylococcen-Proteinen reagiert. Da das Propeptid ein essentieller Bestandteil jedes Fusionsproteins ist, bietet sich für die Quantifizierung folgender Ansatz an: Stünde ein monoklonaler Antikörper gegen das Propeptid zur Verfügung, wäre es möglich, in erster Näherung die Konzentration jedes Fusionsproteins mit dem Propeptid als Standard zu bestimmen. Mit einem monoklonalen Antikörper sinkt zum einen die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion mit homologen Staphylococcen-Proteinen, zum anderen müßten solche Kreuzreaktionen nur ein einziges Mal ausgeschlossen werden. Dieser Ansatz würde einerseits ermöglichen, mit einer allgemein gültigen Meßmethode die Größenordnung jedes Produktes zu quantifizieren, zum anderen sollte für eine Prozeßoptimierung eine Quantifizierung mit dem Propeptid als Standard hinreichend sein. Da im Rahmen einer jeden integrierten Prozeßentwicklung ein Reinigungsverfahren für das Produkt entwickelt werden muß, steht dieses somit dann in reiner Form zur Verfügung und kann dann als Standard eingesetzt werden. Dieser Ansatz führt in einer integrierten Prozeßentwicklung zu einer erheblichen Zeitersparnis für die Bereiche Stamm- und Verfahrensentwicklung.

Reinigungsverfahren

Auch bei der Reinigung der Fusionsproteine sollte ein allgemeingültiger Ansatz verfolgt werden. Dies ist dann möglich, wenn die Methode auf die Eigenschaften des Propeptids abzielt. Sandgathe (2000) konnte zeigen, daß aufgrund histidinreicher Regionen im Propeptid eine effektive Reinigung des Fusionsproteins PhCT2 mittels

[26] Für die vorliegende Arbeit ergab sich das Problem, daß eine Messung der Fusionsproteinkonzentration erst etwa in der Mitte der Arbeit möglich war. Bis zu diesem Zeitpunkt stand nur eine qualitative Analytik mittels SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung oder Western-Blot zur Verfügung.

Metallaffinitätschromatograhie (IMAC, Zn^{2+}) möglich ist. Damit konnten die Eigenschaften des Propeptids genutzt werden. Allerdings wurde auch gezeigt, daß die Effektivität der Reinigung stark mit steigender Anzahl an Monomeren im Fusionsprotein sinkt. Für eine allgemeine Reinigungsmethode sollten durch gezielte Veränderung die Bindungseigenschaften des Propeptids optimiert werden. So konnte Pschorr (1992) zeigen, daß die Affinität an Metallaffinitätschromatographie-Materialien deutlich steigt, wenn in einem Fusionsprotein zwischen Propeptid und heterologem Protein ein Histidin-Tag bestehend aus sechs Histidinen eingebracht wird.

Auch für ein Aufarbeitungsverfahren wäre es von Vorteil, wenn ein monoklonaler Antikörper gegen das Propeptid zur Verfügung stände. Dann könnte jedes Fusionsprotein mit Affinitätschromatographie mit immobilisierten Antikörpern effektiv gereinigt werden. Weiterhin bestünde dann die Möglichkeit, direkt in der Reinigung das Fusionsprotein zu spalten und das Zielprotein zu isolieren.

Spaltung der Fusionsproteine

Für die Gewinnung der Zielproteine müssen diese von dem Propeptid abgespalten werden. In dem Fusionsprotein PhCT2 befinden sich Linkersequenzen, die aus fünf Aminosäuren bestehen. Die carboxyterminale Aminosäure dieser Linkersequenz ist das Arginin. Somit besteht die Möglichkeit, die Monomere in einem ersten Schritt mit einer Arginyl-Endopeptidase freizusetzen. Es konnte gezeigt werden, daß mit Clostripain die Fusionsproteine gespalten und die erhaltenen Monomere mittels RP-HPLC gereinigt werden können. Diese Strategie der Spaltung ist nur möglich, da sich im hCT kein Arginin befindet (s. Abbildung 3.1). Für den Einsatz von *S. carnosus* als allgemeines Expressionssystem wäre es unbedingt notwendig, eine sehr spezifische Schnittstelle an den Carboxyterminus des Propeptids einzubringen. Nur so könnte die Freisetzung jedes heterologen Proteins aus dem Fusionsprotein ohne weiteren Abbau gewährleistet werden. Für das Expressionssystem *S. carnosus* konnten Pschorr (1992) und Schnappinger et al. (1995) bereits zeigen, daß durch die Einführung einer Erkennungssequenz für die IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* (Pro-Pro-Thr-Pro, Pohlner et al. 1987) eine effektive Spaltung der Fusionsproteine möglich ist. Allerdings spaltet die Protease innerhalb der Erkennungssequenz. Dadurch verbleiben am Aminoterminus des Zielproteins die beiden Aminosäuren Threonin und Prolin. Weitere Untersuchungen wurden von Nagai et al. (1984) mit der Erkennungssequenz für den

bovinen Gerinnungsfaktor Xa (Ile-Glu-Gly-Arg) durchgeführt. Dieser erlaubt die Spaltung am Carboxyterminus der Erkennungssequenz, so daß der Aminoterminus des heterologen Proteins erhalten bleibt. Pschorr (1992) konnte zeigen, daß diese Schnittstelle nicht als allgemein angesehen werden kann. Die Effektivität der Spaltung heterologer Proteine aus *S. carnosus* hängt stark von der Struktur des Proteins ab.

Produktionsverfahren

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Fedbatch Verfahren zur Produktion des Fusionsproteins PhCT2 sollte auf jedes andere Fusionsprotein übertragbar sein. Durch die Regelung im geschlossenen Regelkreis wäre es dabei möglich, auf Besonderheiten von unterschiedlichen produzierenden Stämmen zu reagieren. So könnte das System automatisch auf eine Veränderung der lag-Phase reagieren und sich an das Wachstum der Organismen anpassen. Bei einer Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von den genetischen Manipulationen der Organismen könnte durch den geschlossenen Regelkreis auch dann eine kontinuierlich limitierende Bereitstellung von Komponenten des Hefeextraktes gewährleistet werden. So könnte dieser in Bezug auf die Produktbildung optimal genutzt werden.

Dies bedingt weiterhin eine Optimierung der Zellsuspension in Bezug auf die Aufarbeitung. Durch die bessere Nutzung der Bestandteile werden auch Komponenten genutzt, die die Aufarbeitung stören. Für die Umsetzung in den großtechnischen Maßstab zeigt sich ein wesentlicher Nachteil. Aufgrund der Löslichkeitsgrenze des Hefeextraktes von ca. 100 g l^{-1} kommt es während der Fermentation zu einer Verdopplung des Reaktionsvolumens. Dies ist vor allem dadurch bedingt, daß es sich um einen technischen Extrakt handelt. Alternativ wäre die Zugabe des Hefeextraktes in fester Form denkbar.

Außerdem wäre eine weitere Steigerung der hefeextraktspezifischen Produktausbeute $A_{P/S}$ erstrebenswert. Die Messung der freien Aminosäuren des Hefeextraktes in dem Fedbatch Verfahren zeigt, daß einige Aminosäuren nicht quantitativ verwertet werden (s. 5.6.4). Durch eine Erhöhung des OH^-/Hefeextrakt-Verhältnisses könnten auch diese quantitativ genutzt werden. Diese Erhöhung könnte weiterhin zur Folge haben, daß durch die stärkere Limitierung die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate sinkt, so daß im Rührkesselreaktor höhere Biotrockenmassekonzentrationen bei gleicher maximaler

Sauerstofftransportrate OTR erzielt werden können. Dies könnte neben einer Steigerung der hefeextraktspezifischen Produktausbeute $A_{P/S}$ zu höheren Produktkonzentrationen führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß *S. carnosus* ein sehr gutes alternatives Expressionssystem darstellt. Die Ausführungen zeigen allerdings auch, daß es weiterer molekularbiologischer, mikrobiologischer, proteinchemischer und auch verfahrenstechnischer Untersuchungen bedarf, damit dieses System auch für die industrielle Produktion heterologer Proteine eingesetzt wird. Das Forschungsvorhaben hat das Potential des Organismus aufgezeigt.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren für die Produktion heterologer Proteine mit *Staphylococcus carnosus* zu entwickeln. Das Modellprotein war humanes Calcitonin (hCT), das durch Fusion an ein Pre-Propeptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* als Precursor-Multimer von *S. carnosus* exprimiert und sekretiert wird. Durch die Kombination von mikrobiologischen und verfahrenstechnischen Ansätzen wurde mit folgenden neuen Erkenntnissen ein Fedbatch Verfahren im geschlossenen Regelkreis für hefeextraktlimitierende Bedingungen entwickelt.

Für die Fusionsproteine wurde eine quantitative Analytik mittels ELISA entwickelt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler hCT-Antikörper eingesetzt, der keine Kreuzreaktionen mit homologen Staphylococcen-Proteinen zeigt. Der lineare Meßbereich für das Fusionsprotein PhCT2 (**P**ropeptid und **hCT**-Dimer) liegt bei 0-0,5 $\mu g\ ml^{-1}$.

Aufgrund starker Änderungen des pH-Wertes während des Wachstums von *S. carnosus* und der geringen Sauerstoffeintragsrate des Reaktorsystems Schüttelkolben wurde neben Rührkesselreaktoren für die reaktionstechnischen Untersuchungen im Parallelansatz eine im Forschungszentrum Jülich entwickelte Anlage ausgewählt, die den Parallelbetrieb von bis zu 16 Blasensäulenreaktoren mit pH-Regelung erlaubt. Die Übertragbarkeit der generierten Daten auf Rührkesselreaktoren konnte gezeigt werden.

In Zusammenarbeit mit der Stammentwicklung und der Aufarbeitung wurde ein Produktionsstamm ausgewählt, der das Fusionsprotein PhCT2 unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors aus *Staphylococcus xylosus* exprimiert. Der Stamm weist auf Proteinebene eine phänotypische Instabilität auf. Durch Zusatz von Glucose in den Vorkulturen und damit Repression des Promotors kann die Reproduzierbarkeit im Hinblick auf die Übertragbarkeit in den technischen Maßstab gewährleistet werden.

Mit der Zielsetzung Maximierung der Raum-Zeit-Ausbeute wurden folgende Reaktionsbedingungen als geeignet ausgewählt: 37°C, pH 7,0, $pO_2 > 30$ %, Induktion zu Beginn der Fermentation, Begasungsrate $> 0{,}13$ vvm und eine Osmolalität von $< 1{,}03\ osmol\ kg^{-1}$.

Bei diauxischem Wachstum auf einem Minimalmedium, das im Rührkesselreaktor zur Induktion des Wachstums mit 0,5 g l^{-1} Hefeextrakt versetzt wurde, konnte extrazellulär kein Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Ein technischer Hefeextrakt wurde als geeignetes komplexes Substrat für Wachstum und Produktbildung ausgewählt. Als alleiniger Medienbestandteil verwertet *S. carnosus* wahrscheinlich nur die freien Aminosäuren. Es werden PhCT2-Konzentrationen von 2 g l^{-1} mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 83 mg l^{-1} h^{-1} mit einer hefeextraktspezifischen PhCT2-Ausbeute von 10 mg g^{-1} erreicht. Aufgrund großer Mengen Hefeextrakt (200 g l^{-1}) und starker Ammoniumakkumulation (300 mM) müssen Überstände um den Faktor 10 für die Aufarbeitung verdünnt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß mit Hefeextrakt als Cosubstrat die nicht-reprimierende Kohlenstoffquelle Glycerin hauptsächlich als Energiequelle genutzt wird. Es wurden Limitierungen für Makro- und Mikroelemente identifiziert. Die wesentliche Rolle spielen dabei die Cofaktoren der Enzyme der Atmungskette (Eisen und Kupfer). Die freien Aminosäuren werden sequentiell von *S. carnosus* aufgenommen. Wahrscheinlich werden unter kontinuierlich limitierenden Bedingungen für den Hefeextrakt dessen Bestandteile nahezu quantitativ genutzt. Dadurch können die Fermentationsbrühen effektiv aufgearbeitet werden (2-3fache Verdünnung). Unter diesen Bedingungen kann anorganischer Stickstoff wahrscheinlich als Stickstoffquelle verwertet werden.

Aus diesen Erkenntnissen wurde eine Fedbatch Fermentation für hefeextraktlimitierende Bedingungen im geschlossenen Regelkreis (pH-Auxostat) entwickelt. Dabei werden 2 g l^{-1} Fusionsprotein mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 98 mg l^{-1} h^{-1} produziert. Die hefeextraktspezifische PhCT2-Ausbeute konnte um den Faktor 4 auf 40 mg g^{-1} gesteigert werden.

Die Übertragbarkeit des Verfahrens in den halbtechnischen Maßstab (150 l) konnte gezeigt werden. Durch den geschlossenen Regelkreis und Verkürzung der lag-Phase wurde die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 1,4 auf 142 mg l^{-1} h^{-1} gesteigert. Bezogen auf das Arbeitsvolumen wurden 42 g hCT-Precursor produziert. Es konnte gezeigt werden, daß die hCT-Monomere aus dem Fusionsprotein mit der Arginyl-Endopeptidase Clostripain freigesetzt und mit präparativer RP-HPLC gereinigt werden können.

8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie durch Kombination von Mikrobiologie und Verfahrenstechnik die bisherigen verfahrenstechnischen Grenzen bei Fermentationen mit *S. carnosus* überschritten werden konnten. Die neuen Erkenntnisse über den Stoffwechsel von *S. carnosus* haben den wesentlichen Anteil an der Entwicklung dieses neuen Ansatzes.

Das Ziel zukünftiger Arbeiten sollte vor allem darin liegen, ein quantitatives Verständnis der Stoffwechselleistungen dieses Organismus zu entwickeln. Die Ansätze dieser Arbeit zeigen das große Potential des gewählten Expressionssystems und legen auch folgende Zukunftsperspektiven offen:

Es konnte eine Limitierung durch Makro- und Mikroelemente vor allem für die Cofaktoren der Enzyme der Atmungskette identifiziert werden. Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes war es bisher nicht möglich, den Bedarf der einzelnen Elemente genau zu charakterisieren und quantitativ zu beschreiben. Aufgrund des großen Parameterraumes sollten zur Optimierung Algorithmen, wie der Genetische Algorithmus (Weuster-Botz 1999) zur Minimierung der Anzahl an Versuchen eingesetzt werden.

Die Parameterstudie wurde in dieser Arbeit zu einem sehr frühen Zeitpunkt durchgeführt, außerdem wurde der Parameterraum nur stichprobenartig durch Variation einzelner Parameter untersucht. Mit dieser eindimensionalen Suchstrategie wird häufig nicht das Optimum erreicht, da synergistische Effekte der Parameter nicht berücksichtigt werden. Methoden der statistischen Versuchsplanung und/oder stochastischer Suchstrategien berücksichtigen die Wechselwirkungen der einzelnen Parameter und sollten daher für die Optimierung der Reaktionsbedingungen genutzt werden (Weuster-Botz 1999).

Die Untersuchungen der Arbeit deuten darauf hin, daß die katabolen Reaktionen der Glycolyse, der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklus unabhängig von den anabolen Reaktionen ablaufen könnten. Eine Verknüpfung könnte über die Reduktionsäquivalente und ATP und wahrscheinlich den Pentosephosphatweg stattfinden. Damit würde sich *S. carnosus* wesentlich von gut charakterisierten

Systemen wie *E. coli* unterscheiden. Dies zeigt auch, daß für *S. carnosus* offensichtlich ein riesiger Nachholbedarf für das Verständnis des Metabolismus besteht. Untersuchungen über die Verteilung der Kohlenstoffflüsse würden sicherlich wesentlich zum Verständnis beitragen. Dazu ist es allerdings notwendig, definierte Medien für das Wachstum von *S. carnosus* zu entwickeln. Dies ist sehr problematisch, da in der Arbeit auch gezeigt werden konnte, daß aus dem komplexen Substrat Hefeextrakt nicht nur Aminosäuren sondern auch Oligopeptide verwertet werden können. Da gezeigt werden konnte, daß die Produktbildung auf definierten Medien mit 20 Aminosäuren erfolgt, sollte versucht werden, den Anteil an Hefeextrakt durch Zusatz von Aminosäuren deutlich zu reduzieren und damit zunächst ein quasi-synthetisches Medium zu entwickeln. Vielleicht ist es auf diesem Weg möglich, ein definiertes Medium für *S. carnosus* zu entwickeln, mit dem noch höhere Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen erzielt werden können.

Wenn die Besonderheiten des Stoffwechsels bekannt sind, sollte es auch möglich sein, eine Strategie zu entwickeln, die es erlaubt, die Expression unter der Kontrolle des xyloseinduzierbaren Promotors durch Limitierung einzelner Komponenten vom Wachstum zu entkoppeln. Mit einer solchen Strategie könnte vor allem die Raum-Zeit-Ausbeute durch eine verlängerte Produktionsphase verbessert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß dieses Expressionssystem für die Produktion von hCT allen bisher in der Literatur beschriebenen Systemen deutlich überlegen ist. Allerdings sind für den Einsatz von *S. carnosus* als Alternative zusätzliche Aspekte zu betrachten. Diese beinhalten die Quantifizierung der Fusionsproteine, Reinigungsverfahren, Spaltung der Fusionsproteine und weitere reaktionstechnische Arbeiten. Probleme und Lösungsansätze wurden in der Arbeit beschrieben (s. 6.4.2).

9 Literatur

Aguilar M.I., Hearn M.T.W. (1991): Reversed Phase and Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. In Hearn M.T.W. (eds.) HPLC of proteins and polynucleotides. VCH Weinheim: 247-276.

Alexciev K., Uscheva A., Ivanov I. (1989) Expression in *Escherichia coli* K12 strains of two synthetic human calcitonin genes differing in codon composition. Curr Microbio 18: 5-9.

Altenbach-Rehm J. (2000) Entwicklung und Einsatz einer miniaturisierten und parallelen Versuchstechnik für die Bioprozeßentwicklung. Dissertation Univerität Karlsruhe

Andersson E., Bailey J.E. (1989) The influence of the external pH on the production of modified protein A by *Staphylococcus aureus*. J Biotech 11:37-48.

Arkoudelos J.S., Nychas G.J.E. (1995) Comparative studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose. Lett Appl Microbiol 20: 19-24

Azria M. (1995) 25 years of Salmon calcitonin: from synthesis to therapeutic use. Calcif Tissue Int 57: 405-408.

Bailey J.E., Ollis D.F. (1986) Biochemical engineering fundamentals. Mc Graw-Hill New York, 2. Auflage

Bayer E. (1991) Auf dem Weg zur chemischen Synthese von Proteinen, Angewandte Chemie 103 (2): 117-133.

Berne R.M., Levy M.N. (1993) Physiology. Mosby Year Book Inc: 891-892.

Blumenthal H.J. (1972) Glucose catabolism in Staphylococci. in: Cohen J.O. (ed.): The Staphylococci (Chapter 6). Wiley Interscience, New York.

Chmiel H. (1991) Bioprozeßtechnik. UTB Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1. Auflage.

Crueger W., Crueger A. (1989) Biotechnologie: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Oldenbourg Verlag, München, 3.Auflage.

Deetjen P., Speckmann E.L. (1992) Physiologie. Urban & Schwarzenberg München Wien 1. Auflage.

Demleitner G., Götz F. (1994) Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* pro-peptide in lipase secretion, stability and activity. FEMS Microbiol Lett 121:189-198.

Dumuis-Kervabon A., Encontre I., Etienne G., Jauregui-Adell J., Mery J., Mesnier D., Parello J. (1986) A chromatin core particle obtained by selective cleavage of histones by clostripain. EMBO J 5 (7): 1735-1742.

Egeter O., Brückner R. (1996) Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. Mol Microbiol 21 (4): 739-749.

Encontre I., Parello J. (1988) Chromatin core particle obtained by selective cleavage of histones H3 and H4 by Clostripain. J Mol Biol 202 (3): 673-676.

Falk M.P.F., Sanders E.A., Deckwer W.D. (1991) Studies on the production of lipase from recombinant *Staphylococcus carnosus*. Appl Microbiol Biotechnol 35: 10-13.

Ferrari E., Jarnagin A.S., Schmidt B.F. (1993) Commercial production of extracellular enzymes. In Sonensheim A.L., Hoch J.A., Losick R. (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society of Microbiology, Washington D.C.: 917-937.

Freudl R. (1991) Proteinsecretion in gram-positive bacteria. J Biotech 23: 231-240.

Freudl R. (1998) Proteinsekretion bei Gram-positiven Bakterien: Molekulare Grundlagen und biotechnologische Aspekte. Biospektrum 4(1): 29-33.

Gigova L., Wishart P., Uscheva A., Ivanova M., Bardarov S., Jay E., Ivanov I. (1989) Expression of repetitive human calcitonin genes in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem 11: 401-412.

Gottschalk G. (1982): Bacterial Metabolism. Springer Verlag New York 2. Auflage

Götz F. (1990) Applied genetics in the gram positive bacterium *Staphylococcus carnosus*. Food Biotechnology 4 (1): 505-513.

Harris R.S. (1971) Vitamins and Hormones. Academic Press New York 29: 336-350.

Heinitz M.L., Flanigan E., Orlowski R.C., Regnier F.E. (1988) Correlation of calcitonin structure with chromatographic retention in high-performance liquid chromatography. J Chrom 443: 229-245.

Hesch R.D. et al. (1987) Arzneimittelenthaltend fermentationstechnisch hergestelltes Cardiodilatin und Verfahren zur Herstellung desselben. Europäisches Patentamt Patentnr: 02224676.

Hirooka E.Y., de Salzberg S.P.C., Bergdoll M.S. (1988) Effect of magnesium and iron on the growth of and production of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus* strain S-6. J Food Protec 51 (9): 731-733.

Hosking D.J., Denton L.B., Cadge B. Martin T.J. (1979) Functional significance of antibody formation after long-term salmon calcitonin therapy. Clinical Endocrinology 10: 243-252.

Ishikawa H., Tamaoki H. (1996) Production of human calcitonin in *Escherichia coli* from multimeric fusion protein. J Ferment Bioeng 82 (2): 140-144.

Ishikawa H., Kawaguchi J., Yao Y., Tamaoki H., Ono T., Fukui F., Yoshikawa H. (1999) Large-scale preparation of recombinant human calcitonin from a multimeric fusion protein produced in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng 87 (3): 296-301.

Kato H., Kato C., Yanagida T., Tanaka Y., Moriyama S., Sasaki K., Kudo T., Horikoshi K. (1989) Construction of a secretion vector production of peptide hormones in *Escherichia coli* (Extracellular production of calcitonin as fused protein). FEMS Microbiol Lett 57: 339-344.

Keller G.M., Hanson R.S., Bergdoll M.S. (1978) Molar growth yield and enterotoxin B production of *Staphylococcus aureus* S-6 with amino acids as energy sources. Infection and Immunity 20 (1): 151-157.

Kleeman A., Lindner E., Engel J. (1997) Arzneimittel. VCH Weinheim: 681-682.

Klein, Meens J., Freudl R. (1995) Functional characterization of the *Staphylococcus carnosus* SecA protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis secA* mutant strains. FEMS Microbiol Lett 131: 271-277.

Kloos W.E. and Schleifer K.H. (1986) Genus IV. *Staphylococcus* in Holt J.G., Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharps M.S. (eds.). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Wiliam and Wilkins Baltimore 2. Auflage: 1013-1035.

Kloos W.E., Schleifer K.H., Götz F. (1991) The Genus *Staphylococcus*. in Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder M., Schleifer K.H. (eds.). The Prokaryotes. Springer, New York 2. Auflage: 1369-1420.

König W. (1993) Peptide and Protein Hormones. VCH Weinheim: 37-46.

Lechner M.; Märkl H.; Götz F. (1988) Lipase production of *Staphylococcus carnosus* in a dialysis fermentor. Appl Microbiol Biotechnol 28: 345-349.

Manalan A.S., Newton D.L., Klee C.B. (1985) Purification and peptide mapping of calmodulin and its chemically modified derivates by reversed-phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr 326: 387-397.

Märkl H.; Lechner M.; Götz F. (1990) A new dialysis fermentor for the production of high concentrations of extracellular enzymes. J Ferm Bioeng 69 (4): 244-249.

Meenan C.P., Consalvo A.P., Albert C.A., Parton D.P., Mehta N.M., Ray M.V.L. (1997) Extracellular expression of glycine-extended salmon calcitonin in recombinant *Escherichia coli*. American Chemical Society National Meeting (Poster), San Francisco.

Meens J., Herbort M., Klein M., Freudl R. (1997) Use of the Pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated proteases in two different Gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 63 (7): 2814-2820.

Meiners M. (1990) Biotechnologie für Ingenieure. Vieweg Verlag Braunschweig 1. Auflage.

Menkel F. (1992) Einführung in die Technik von Bioreaktoren. R. Oldenburg Verlag München Wien.

Merli S., De Falco S., Verdoliva A., Tortora M., Villain M., Silvi P., Cassani G., Fassina G. (1996) An expression system for the single-step production of recombinant human amidated calcitonin. Protein Expresssion and Purification 7: 347-354.

Merrifield R.B. (1985) Festphasen-Synthese (Nobel-Vortrag). Angewandte Chemie 97 (10): 801-812.

Mironova R., Philipova D., Marekov L., Venkow P., Ivanov I. (1991) Secretion of oligomeric Val^{8}-human calcitonin by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 83: 23-28.

Mitchell W.M., Harrington W.F. (1968) Purification and properties of Clostridiopeptidase B (Clostripain). J Biol Chem 243 (18): 4683-4692.

Moser A., (1981) Bioprozeßtechnik-Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse. Springer Verlag Wien New York 1. Auflage.

Nakada D. (1962) Thymine starvation and β-galactosidase synthesis. Biochim Biophys Acta 55: 505-511.

Nishimura J.S. Ybarra J., Mann C.J., Mitchell T (1993) Sensitivity of *Escherichia coli* Succinyl-CoA Mutants at $Trp^{\beta 76}$ to Clostripain and to Trypsin. J Biol Chem 268 (18): 13717-13722.

Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature 325: 458-462.

Pschorr J. (1992) Konstruktion und Synthese gezielt veränderter Varianten des Bence-Jones Proteins REI unter Verwendung neuentwickelter molekularbiologischer Methoden. Disseration der Universität Göttingen.

Pschorr J., Bieseler B., Fritz H.J. (1994) Production of the immunoglobulin variable domain REI_V via a fusion protein synthesized and secreted by *Staphylococcus carnosus*. Biol Chem Hoppe-Seyler 375: 271-280.

Pugsley P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol Rev 57 (1): 50-108.

Reginster J.Y. (1993) Calcitonin for Prevention and Treatment of Osteoporosis. Am J Med 95 (suppl. 5A): 44S-47S.

Rosenbach F.J. (1884) Mikroorganismen bei Wundinfectionskrankheiten des Menschen. J.F. Bergmann. Wiesbaden.

Rosenstein R., Peschel A., Wieland B., Götz F. (1992) Expression and Regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* Plasmid pSX267. J Bact 174 (11): 3676-3683.

Sandgathe A. (2000) Biotechnologische Herstellung von humanem Calcitonin. Dissertation der Universität Düsseldorf, in Vorbereitung.

Schlegel H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Stuttgart 7. Auflage.

Schleifer K.H., Fischer U. (1982) Description of new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. Int J Syst Bacteriol 32 (2): 153-156.

Schmidt R.F., Thews G. (1985) Physiologie des Menschen. Springer Berlin: 815-816.

Schnappinger D., Geissdörfer W., Sizemore C., Hillen W. (1995) Extracellular expression of native human anti-lysozyme fragments in *Staphylococcus carnosus*. FEMS Microbiol Lett 129: 121-128.

Silbernagel S., Despopoulos A. (1991) Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Stuttgart 4. Auflage.

Silverman S. (1997) Calcitonin. Am J Med Sci 313 (1): 13-16.

Sizemore C., Buchner E., Rygus T., Witke C., Götz F., Hillen W. (1991) Organization, promotor analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. Mol Gen Genet 227: 377-384.

Sizemore C., Geißdörfer W., Hillen W. (1993) Using fusions with luxAB from *Vibrio harveyi* MAV to quantify induction and catabolite repression of the xyl operon in *Staphylococcus carnosus* TM300. FEMS Microbiol Lett 107: 303-306.

Sizemore C., Wieland B., Götz F., Hillen W. (1992) Regulation of *Staphylococcus xylosus* xylose utilization at the molecular level. J Bact 174 (9): 3042-3048.

Theobald U., Kempf M. (1998)A novel tool for medium optimization and characterization in the early stages of a metabolite production process. Biotechnol Tech 12 (12): 893-897.

Tippe D. (2000) Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, persönliche Mitteilung.

van Dijl J.M., de Jong A., Smith H., Bron S., Venema G. (1991) Non-functional expression of *Escherichia coli* signalpeptidase I in *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol 137 (9): 2073-2083.

Voit H., Wenzig E., Mersmann A. (1991) Production of a microbial lipase by *Staphylococcus carnosus* (pLipMut2) in a bubble column reactor and a centrifugal field bioreactor. Bioproc Eng 6:221-226.

Voit H.; Götz F.; Mersmann A. B. (1989) Overproduction of lipase with *Staphylococcus carnosus* (pLipPS1) under modified gravity in a centrifugal field bioreactor. J Ferm Bioeng 12: 364-373.

Wenzig E., Lottspeich F., Verheij B., De Haas G.H., Götz F. (1990) Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. Biochem 9: 47-56.

Weuster-Botz D. (1999) Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften/Life Science, Vol. 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich.

Wieland K.P., Wieland B., Götz F. (1995) A promotor-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. Gene 158: 91-96.

Wu X.C., Lee W., Tran L., Wong S.L. (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. J Bacteriol 173: 4952-4958.

Yabuta M., Suzuki Y., Ohsuye K. (1995) High expression of a recombinant human calcitonin precursor peptide in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 42: 703-708.

Yamagushi Y., Kim H.H., Kato K., Masud K., Shimada I., Arata Y. (1995) Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. J Immunol Meth 181: 259-26.

10 Anhang

10.1 Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphatdinatrium
Bis-Tris	bis(2-Hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
d	day – Tag
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
et al.	et alii – und andere
GC	Gaschromatograph
h	hour – Stunde
H_2O bidest.	bidestilliertes Wasser
hCT	humanes Calcitonin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ig	Immunoglobulin
kD	kilo Dalton (=1000 g mol^{-1})
konz.	konzentriert
max.	maximal
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
N	normal
NAD/H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert/reduziert)
NADP/H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NBT	Nitro-tetrazolium-chlorid (blue)
OD_{600}	Optische Dichte bei λ = 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pCT	Calcitonin aus dem Schwein (englisch: porcine)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
PhCT2, PhCT4, PhCT8	Dimer-, Tetramer- und Oktamerfusionsprotein
p-NP	para-Nitrophenol
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat
rel.	relativ
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
s.	siehe
sCT	Calcitonin aus dem Lachs (englisch: salmon)

SDS	Natrium-dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
vvm	Volume per Volume and Minute

10.2 Symbolverzeichnis

$A_{P/S}$	substratspezifische Produktausbeute	[mg g^{-1}]
$A_{X/S}$	substratspezifische Biomasseausbeute	[g g^{-1}]
BTM, X	Biotrockenmassekonzentration	[g l^{-1}]
c^A	Konzentration am Reaktorausgang	[mol l^{-1}]
c^E	Konzentration am Reaktoreingang	[mol l^{-1}]
CER	Carbondioxid evolution rate = Kohlendioxidbildungsrate	[mol l^{-1} h^{-1}]
D	Durchflußrate	[h^{-1}]
F_R	Volumenstrom	[l h^{-1}]
M_P	Produktmenge	[g]
M_X	Biotrockenmassemenge	[g]
OTR	Oxygen transfer rate = Sauerstoffeintragsrate	[mol l^{-1} h^{-1}]
OUR	Oxygen uptake rate = Sauerstoffaufnahmerate	[mol l^{-1} h^{-1}]
P	Produktkonzentration (Fusionsprotein)	[mg l^{-1}]
pO_2	Sauerstoffpartialdruck	[%]
r_i	Reaktionsrate	[mol l^{-1} h^{-1}]
RQ	Respirationskoeffizient	
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[mg l^{-1} h^{-1}]
S	Substratkonzentration	[g l^{-1}] [mM]
t	Zeit	[h]
V_R	Reaktorarbeitsvolumen	[l]
$\dot{V}^A$	Volumenströme der Gase am Ausgang (A) des Reaktors	[l h^{-1}]
$\dot{V}^E$	Volumenströme der Gase am Eingang (E) des Reaktors	[l h^{-1}]
V_i	zellinternes Volumen	[ml g^{-1}_{BTM}]
x	Molenbruch in der Gasphase	[mol mol^{-1}]
X	Zellmasse	[g l^{-1}]
$Y_{P/S}$	substratspezifische Produktselektivität	[mg g^{-1}]
$Y_{P/X}$	biomassespezifische Produktselektivität	[mg g_{BTM}^{-1}]
$Y_{X/O}$	sauerstoffspezifische Biomasseselektivität	[g_{BTM} g^{-1}]
$Y_{X/S}$	substratspezifische Biomasseselektivität	[g g^{-1}]
χ	Leitfähigkeit	[mS cm^{-1}]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h^{-1}]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h^{-1}]
π_X	biomassespezifische Produktbildungsrate	[mg g_{BTM}^{-1} h^{-1}]
π_v	volumetrische Produktbildungsrate	[mg l^{-1} h^{-1}]
σ_X	biomassespezifische Substratverbrauchsrate	[g g_{BTM}^{-1} h^{-1}]
τ	mittlere Verweilzeit	[h]

10.3 Medizinische Fachausdrücke und Krankheitsbilder

endokrin: in den Blutkreislauf Stoffe (im engeren Sinne Hormone) absondernd

enteral: den Darm betreffend

Hypercalcämie: vermehrter Gehalt des Blutes an Calcium

Hyperparatyroidismus: Überproduktion von Parathyrin durch die Nebenschilddrüse und deren Folgen

Morbus Paget: oft schmerzhafte Veränderung einzelner oder mehrerer Knochen (dann vor allem Becken und Schädel), die mit Verdickung und Verkrümmung einhergehen und im fortgeschrittenen Stadium oft zu Spontanfrakturen führen

Osteoblasten: Osteoblasten sind knochenaufbauende Zellen. Ihre Wirkung beruht auf dem hohen Gehalt an alkalischer Phosphatase. Dadurch wird die lokale Phosphatkonzentration erhöht. Bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes fällt Calciumphosphat aus.

Osteoclasten: Osteoclasten sind Knochenfreßzellen, die enzymatisch und phagozytisch Knochengewebe abbauen.

Osteolyse: Auflösung und Abbau von Knochensubstanz, vor allem bei Entzündungen, chronischer Traumatisierung oder Tumormetastasen

Osteoporose: Knochenerkrankung ungeklärter Ursache mit teilweise oder universeller Verminderung von Knochengewebe ohne Veränderung der Gesamtform; bedingt Minderung der mechanischen Belastbarkeit, Neigung zu Frakturen und Spontanverformung

Pankreatitis: Entzündung der Bauchspeicheldrüse

parakrin: unmittelbare Hormonwirkung auf Nachbarzellen ohne Zwischenschaltung der Blutbahn

Polyarthritis: gleichzeitig oder nacheinander in mehreren Gelenken auftretende Gelenkentzündung

renal: die Niere betreffend

Sudeck-Syndrom: Weichteil- und Knochenveränderungen rumpfferner Gliedmaßenabschnitte als Folge von Verletzungen (vor allem nach Knochenbrüchen), aber auch Entzündungen, Nervenschädigungen, Herzinfarkt oder Hirnverletzungen

10.4 Element- und Aminosäurezusammensetzung des Hefeextraktes OHLY KAT

Chargennummer 272-8 (Deutsche Hefewerke GmbH, Hamburg).

Element	%	ppm
C	41.9	
H	7.4	
N	10.3	
S	0.5	
Ca		2134
K	3.6	
Mg		1906
Na	0.11	
P	2.15	
B		7.4
V		0.02
Cr		2.59
Mn		22.2
Fe		45.8
Co		1.19
Ni		1.04
Cu		1.13
Zn		81.5
Sr		5.8
Sn		0.02
Ba		0.36

Aminosäure	Anteil [%]
Ala	5.61
Arg	0.93
Asn	1.06
Asp	2.23
Gln	0.00
Glu	4.24
Gly	0.89
His	0.00
Ile	2.41
Leu	3.46
Lys	2.96
Met	1.10
Phe	2.59
Ser	1.88
Thr	1.74
Trp	0.82
Tyr	1.56
Val	3.70

10.5 Elementzusammensetzung der Biomasse

Die analysierte Biomasse stammt aus Fedbatch Fermentationen (s. 5.6.4) nach 20 h.

Element	%	ppm
C	45.5	
H	7.6	
N	8.2	
S	0.3	
Ca		1271
K	3.4	
Mg		1504
Na	1.3	
P	2.15	
B		8.4
Al		3.57
V		0.088
Cr		21.7
Mn		57.3
Fe		84
Co		0.2
Ni		5.24
Cu		9.82
Zn		27.3
Sr		0.34
Mo		6.18
Sn		0.79
Ba		0.4
Pb		0.06

10.6 Berechnung der Bilanzen für die Elemente Kohlenstoff und Stickstoff

Aufgrund der Komplexität des Substrates Hefeextrakt müssen für die Berechnungen der Bilanzen der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff einige Annahmen getroffen werden. Diese sind in diesem Kapitel beschrieben und exemplarisch die Berechnung für das Fedbatch Verfahren dargestellt.

Laut Herstellerangaben (Deutsche Hefewerke GmbH) setzt sich der Hefeextrakt OHLY KAT wie folgt zusammen:

- freie Aminosäuren 26-30 % (w/w)
- Oligopeptide < 600 D 7,5-11 % (w/w)
- Oligopeptide 2-3 kD 30-34 % (w/w)
- Oligopeptide 3-10 kD 1,5-4 % (w/w)

Die Summe aller Oligopeptide wird mit 39-49 % angegeben. Für die Berechnungen wurde der Mittelwert mit 44 % angenommen.

Die freien Aminosäuren der eingesetzten Hefeextrakt-Charge wurden mittels RP-HPLC quantifiziert (s. 10.3). Im Gegensatz zu den Herstellerangaben beträgt der Anteil der quantifizierten Aminosäuren in der Charge 37 % (w/w). Da nur 16 der 20 Aminosäuren quantitativ erfaßt werden konnten, wurde für die Berechnung ein Anteil der freien Aminosäuren von 40 % (w/w) angenommen.

Anschließend wurden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff der freien Aminosäuren im Hefeextrakt berechnet. Dabei geht der Kohlenstoff mit einem mittleren prozentualen Anteil von 47 %, der Stickstoff mit 13 % ein. Es wurde angenommen, daß die Aminosäurezusammensetzung der Oligopeptide der Zusammensetzung der freien Aminosäuren entspricht, so daß diese Anteile auch für die Oligopeptide angesetzt wurden.

Die Redundanz dieser Annahmen und der Berechnungen wurde mit der Elementanalyse des Hefeextraktes untersucht. Für den Kohlenstoff sollte dabei gelten, daß der prozentuale Anteil des Kohlenstoffs (w/w) des gesamten Hefeextraktes größer ist als die

Summe der Anteile der freien Aminosäuren und der Oligopeptide, da der Hefeextrakt neben diesen Substanzen unter anderem auch Polysaccharide (Mannane und Glucane mit ca. 5 % (w/w)) enthält. Die Berechnung ergibt, daß 94 % des Kohlenstoffs des gesamten Hefeextraktes in den Aminosäuren und Oligopeptiden enthalten sind. Weiterhin sollte der im Hefeextrakt enthaltene Stickstoff fast ausschließlich aus den Aminosäuren und Oligopeptiden stammen. Die Berechnung zeigt, daß sich beide Anteile entsprechen.

Zur Bestimmung der Bilanzen wurden aus den Massen der eingesetzten Substrate und der erhaltenen Produkte mit den oben beschriebenen Annahmen die Stoffmengen der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff und deren prozentuale Anteile berechnet (Tabelle 10.1 und 10.2).

Tabelle 10.1: Dargestellt sind für das Fedbatch Verfahren die eingesetzten Massen der Edukte, die Stoffmengen der Elemente Kohlenstoff (C-mol) und Stickstoff (N-mol) und die Verteilung der Elemente. Die Berechnungen für den gesamten Hefeextrakt (grau) sind als Referenz angegeben.

Edukte	Masse [g]	C-mol [mol]	C-Verteilung [%]	N-mol [mol]	N-Verteilung [%]
Hefeextrakt	100	3.49		0.74	
Aminosäuren	40	1.56	27	0.37	45
Oligopeptide	44	1.71	29	0.41	50
Glycerin	80	2.60	44	0	0
$(NH_4)_2SO_4$	2.6	0	0	0.04	5
Summe		5.87	100	0.82	100

Tabelle 10.2: Dargestellt sind für das Fedbatch Verfahren die erhaltenen Massen der Produkte, die Stoffmengen der Elemente Kohlenstoff (C-mol) und Stickstoff (N-mol) und die Verteilung der Elemente. Für die Biomasse wurde mit den entsprechenden Werten der Elementanalyse gerechnet.

Produkte	Menge [g]	C-mol [mol]	C-Verteilung [%]	N-mol [mol]	N-Verteilung [%]
Biomasse	76	2.88	49	0.45	55
CO_2	116	2.64	45	0	0
PhCT2	3.8	0.29	5	0.03	3
Summe		5.81	99	0.48	58

Für das Fedbatch Verfahren kann die Stickstoffbilanz nur zu 57 % geschlossen werden. Hier handelt es sich um ein offenes System, da der Anteil an NH_3 in der Abluft nicht gemessen wurde.

10.7 Monte Carlo Simulation

10.7.1 Theorie der Monte Carlo Simulation

Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ (Definition Gleichung 6, Seite 27) kann auch wie folgt beschrieben werden:

$$\mu = f(\vec{\Theta}_X, t), \qquad \text{Gleichung A.1}$$

wobei t die Zeit [h] und der Vektor $\vec{\Theta}_X$ = (A1, A2, xo, dx) das Ergebnis der Anpassung der Boltzman-Funktion mit

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-xo)/dx}} + A_2 \qquad \text{Gleichung A.2}$$

an die Meßergebnisse der Biotrockenmassekonzentration ist. Für die Berechnung der zellspezifischen PhCT2-Produktbildungsgeschwindigkeit π_X (Definition Gleichung 8, Seite 27) gilt:

$$\pi_X = f(\vec{\Theta}_X, \vec{\Theta}_P, t), \qquad \text{Gleichung A.3}$$

wobei Vektor $\vec{\Theta}_P$ = (A1, A2, xo, dx) das Ergebnis der Anpassung der Boltzman-Funktion an die Meßergebnisse der PhCT2-Konzentration ist.

Für beide Prozeßgrößen gilt generell,

$$y = f(\vec{\Theta}_X, \vec{\Theta}_P) + \Sigma(\text{Rauschen}) \qquad \text{Gleichung A.4}$$

$$\hat{E}_y = f(\vec{\Theta}_X, \vec{\Theta}_P) \qquad \text{Gleichung A.5}$$

$$\sigma^2_{E_y} = f(\sigma^2_X, \sigma^2_P) \qquad \text{Gleichung A.6}$$

Das geschätzte Ergebnis $\hat{E}_y$ und die Varianz $\sigma^2_{E_y}$ werden aus einer Reihe von Beobachtungen von E bestimmt. Diese werden durch mehrere Ziehungen (n) für Vektor $\vec{\Theta}_X$ und $\vec{\Theta}_P$ aus einer bestimmten Verteilung, die als Basis die Varianz und

Covarianz von $\vec{\Theta}_X$ und $\vec{\Theta}_P$ hat, generiert. Die verschiedenen Beobachtungen (n) für E werden mit Gleichung A.4 berechnet. Die statistische Verteilung $\sigma^2_{E_y}$ wird aus den verschiedenen Beobachtungen (n) für E bestimmt.

Dazu wird eine Monte Carlo Simulation durchgeführt. Mit Hilfe eines Zufallsgenerators wird für $\vec{\Theta}_X$ und $\vec{\Theta}_P$ ein Satz von vier Werten (A1, A2, xo und dx) generiert (Vektor $\vec{x}$). Mit einer Transformation werden diese Sätze (n) in Beobachtungen (n) mit der statistischen Verteilung von $\vec{\Theta}_X$ und $\vec{\Theta}_P$ umgewandelt. Es gilt:

$$\vec{\Theta}_{X,P} = \overline{\vec{\Theta}}_{X,P} + A \cdot \vec{x}\,, \qquad \text{Gleichung A.7}$$

wobei Vektor $\vec{x}$ einer Standard-Normal-Verteilung unterliegt und Vektor $\overline{\vec{\Theta}}_{X,P}$ die Parameter der Anpassung der Boltzman-Funktion für Biotrockenmasse- und PhCT2-Konzentration an die Meßergebnisse darstellt.

Matrix A wird aus der Covarianz-Matrix von $\overline{\vec{\Theta}}_{X,P}$ bestimmt und ändert durch lineare Transformation die Verteilung von $\vec{x}$.

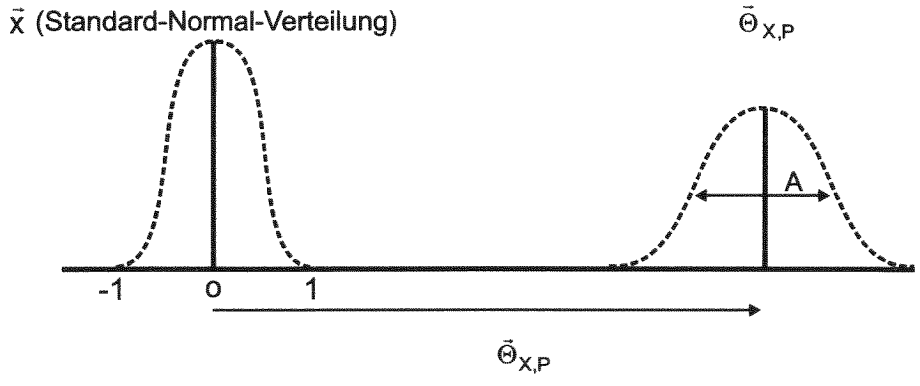

Abbildung 10.1: Die Transformation des Vektors $\vec{x}$ (Standard-Normal-Verteilung) in Vektor $\overline{\vec{\Theta}}_{X,P}$.

Gleichung A.5 wird benutzt, um eine Beobachtung für E zu bestimmen. Die Verteilung von E ist im Prinzip abhängig von der Verteilung des Zufallsgenerators und der Propagation durch die Transformation und Funktion f.

10.7.2 Monte Carlo Simulation in Matlab

Zur Fehlerberechnung der biomassespezifischen differentiellen Prozeßgrößen wurde ein Programm für das Software-Paket Matlab geschrieben. Dies berücksichtigt die zuvor beschriebene Monte Carlo Theorie. Der Programmcode sieht wie folgt aus:

```
% yest ist ein Vektor mit Parametern (A1, A2, X0 und dX) der Anpassung der off-line
Biotrockenmassekonzentration
% Daten an die Boltzman-Funktion durchgeführt mit dem Software-Programm Microcal Origin 5.0.
% Sy ist die entsprechende Covarianz-Matrix dieser Anpassung.
Sy=[
σ²A1     σA1,A2   σA1,x0   σA1, dx ;...
σA2,A1   σ²A2     σA2,xo   σA2,dx ;...
σxo,A1   σxo,A2   σ²xo     σxo,dx ;...
σdx,A1   σdx,A2   σdx,xo   σ²dx ;...
];

yest =[A1; A2; X0; dX];

% yyest ist ein Vektor mit Parametern (A1, A2, X0 und dX) der Anpassung der offline PhCT2-
Konzentration
% Daten an die Boltzman-Funktion durchgeführt mit dem Software-Programm Microcal Origin 5.0.
% Syy ist die entsprechende Covarianz-Matrix dieser Anpassung.
Syy=[
σ²A1     σA1,A2   σA1,x0   σA1, dx
σA2,A1   σ²A2     σA2,xo   σA2,dx
σxo,A1   σxo,A2   σ²xo     σxo,dx
σdx,A1   σdx,A2   σdx,xo   σ²dx
];

yyest =[ A1; A2; X0; dX];

% x ist ein Skalar von Zufallszahlen der Standard-Normal-Verteilung.
% y wird aus x (Zufallszahlen) bestimmt, wobei yest (Durchschnitt) und Sy (Covarianz-Matrix) als
% statistische Basis für y dienen:
%       y = yest + A*x
% so daß:       Sy= A*A'
% Genauso für yy:
%       yy = yyest + AA*xx
%       Syy= AA*AA'

% Bestimme Matrix A mit Hilfe einer Eigenwert Dekomposition: Sy = C·K (K ist eine Diagonal-Matrix
und
% C eine Matrix mit den Eigenvektoren) und
% Syy = CC·KK
[C,K]=eig(Sy);
A=C*diag(sqrt(diag(K)));
[CC,KK]=eig(Syy);
AA=CC*diag(sqrt(diag(KK)));

% Die generierten Zufallswerte y werden bezüglich ihrer Verteilung kontrolliert. Dazu wird die
% Covarianz von n Datensätzen des Vektors y (Parameter der Boltzman-Funktion für
% Biotrockenmassekonzentration) und yy (Parameter der Boltzman-Funktion für PhCT2-
% Konzentration) berechnet und mit der eingesetzten Covarianz-Matrix Sy (Biomasse) und Syy
% (PhCT2) verglichen.
% n Datensätze der Vektoren y (Biotrockenmasse) und yy (PhCT2) werden mit Hilfe einer
% Schleife generiert.
% Anfang der Schleife:
n=1000;
```

```
Y=zeros(4,n); % Zusätzliche Matrizen Y und YY um die Covarianz-Matrizen der generierten
YY=zeros(4,n); % Vektoren y und yy zu kontrollieren

tsteps=72;  % Achtung: die Vektoren haben auch t=0, deshalb tsteps+1
ttot=72;
tstepsize=1/6;

Cp=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte PhCT2-Konzentrationen
Cx=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte Biotrockenmassekonzentrationen
mu=zeros(n,tsteps+1); % Matrix für simulierte Wachstumsraten
time=zeros(1,tsteps+1); % Matrix für simulierte Zeit

for i=1:tsteps+1
  time(i)=(i-1)*tstepsize;     % generiert Werte für Zeit (Stunden).
end

for i=1:n
  x=randn(4,1);
  y=yest+A*x;
  Y(:,i)=y(:,1);

  xx=randn(4,1);   % Es wird angenommen das x (y) unabhängig von xx (yy) ist.
  yy=yyest+AA*xx;
  YY(:,i)=yy(:,1);

  % Cx(t)=A2+(A1-A2)/(1+exp((t-x0)/dx)) = A2+(A1-A2)/(1+zx)
  % und zx(t) = exp((t-x0)/dx)
  % dCx/dt = (A2-A1)*zx/(dx*(1+zx)^2)
  % mu = (1/Cx)*(dCx/dt)
  % dabei ist y = [A1 A2 x0 dx] !!!!!!!!

  for k=1:tsteps+1
    t = tstepsize*(k-1);      % 12 Stunden lang wird alle 10 Minuten ein Wert generiert.
    zy = exp((t-y(3))/y(4));
    zyy = exp((t-yy(3))/yy(4));
    Cx(i,k) = y(2)+(y(1)-y(2))/(1+zy);
    Cp(i,k) = yy(2)+(yy(1)-yy(2))/(1+zyy);
    mu(i,k) = (1/Cx(i,k))*(y(2)-y(1))*zy/(y(4)*(1+zy)*(1+zy));
    qp(i,k) = (1/Cx(i,k))*(yy(2)-yy(1))*zyy/(yy(4)*(1+zyy)*(1+zyy));
  end
end
% Ende der Schleife

% Berechnung der Covarianz der simulierten Werte
cov(Y')
cov(YY')

% Berechnung der 95%-Vertrauensintervalle der simulierten Daten für
% die Biotrockenmassekonzentration:
Cxconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
 Cxconf(ii,1)=mean(Cx(:,ii))-1.96*sqrt(cov(Cx(:,ii)));
 Cxconf(ii,2)=mean(Cx(:,ii));
 Cxconf(ii,3)=mean(Cx(:,ii))+1.96*sqrt(cov(Cx(:,ii)));
end

% die Wachstumsrate:
muconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
 muconf(ii,1)=mean(mu(:,ii))-1.96*sqrt(cov(mu(:,ii)));
 muconf(ii,2)=mean(mu(:,ii));
 muconf(ii,3)=mean(mu(:,ii))+1.96*sqrt(cov(mu(:,ii)));
```

```
end

% die PhCT2-Konzentration:
Cpconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
  Cpconf(ii,1)=mean(Cp(:,ii))-1.96*sqrt(cov(Cp(:,ii)));
  Cpconf(ii,2)=mean(Cp(:,ii));
  Cpconf(ii,3)=mean(Cp(:,ii))+1.96*sqrt(cov(Cp(:,ii)));
end

% die zellspezifische PhCT2-Produktbildungsgeschwindigkeit:
qpconf=zeros(ttot+1,3);
for ii=1:ttot+1
  qpconf(ii,1)=mean(qp(:,ii))-1.96*sqrt(cov(qp(:,ii)));
  qpconf(ii,2)=mean(qp(:,ii));
  qpconf(ii,3)=mean(qp(:,ii))+1.96*sqrt(cov(qp(:,ii)));
end
```

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit im Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich GmbH in der Zeit von Februar 1997 bis Januar 2000.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, seine Begeisterungsfähigkeit, die stets positive Sicht der Dinge und die lehrreiche Zeit.

Herrn Prof. Dr. W. Hartmeier, Institut für Biotechnologie der Rheinisch Westfälischen Hochschule Aachen für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. D. Weuster-Botz für die hilfreichen Diskussionen und vielen Tips und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. R. Takors für zahlreiche Diskussionen.

Herrn PD Dr. R. Freudl und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Mikroorganismen und die fruchtbaren Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. F. Götz und Herrn Dr. U. Theobald, Universität Tübingen, für zahlreiche wertvolle Tips, die die Arbeit wesentlich vorangetrieben haben.

Herrn Dipl.-Biol. W. Paul und Herrn D. Herforth für ihren im Rahmen von Diplomarbeiten geleisteten großen Beitrag an der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dipl.-Biol. A. Sandgathe für die fruchtbare Zusammenarbeit, die zu dem Erfolg wesentlich beigetragen hat.

Herrn Dipl.-Biol. L. Raeven, Herrn Dipl.-Biol. S. Curvers, Herrn Dipl.-Ing. D. Maaß und Dr. G. Neveling für unzählige fachliche und zwischenmenschliche Diskussionen.

Herrn Dipl.-Ing. H. Krüger für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitgliedern der Fermentationsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre, die dazu beigetragen hat, daß der Spaß an der Arbeit auch in den angespannten Phasen nicht verlorengegangen ist.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Werkstätten, des Elektronik- und des Fotolabors und der Verwaltung, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Meiner Familie für die Unterstützung und den Rückhalt, den ich durch sie zu jedem Zeitpunkt erfahren habe.

Sabine für die gemeinsam verbrachte Zeit, die allen Laborstreß vergessen läßt.

Forschungszentrum Jülich

Jül-3765
April 2000
ISSN 0944-2952