



Institut für Biotechnologie

***„Reaktionstechnische Untersuchungen zur
sekretorischen Produktion von
rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B
mit *Pichia pastoris*“***

Simon Curvers

***„Reaktionstechnische Untersuchungen zur
sekretorischen Produktion von
rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B
mit *Pichia pastoris*“***

Simon Curvers

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3867
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3851
D 82 (Diss., Aachen, RWTH, 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Reaction engineering studies on the secretory production of recombinant human chymotrypsinogen B with *Pichia pastoris*.

Abstract:

This study describes the development of fermentation technology for the secretory production of recombinant, human chymotrypsinogen B using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in an integrated approach of genetic engineering, fermentation and downstream processing. Three different fermentation approaches have been developed, each respecting the demands of an industrial production process in a different way.

In a fed-batch process using methanol as the sole source of carbon and energy during the production, a space-time-yield of $5.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, combined with a high product titer of $480 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ and biomass concentration of $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ cdw has been achieved. Avoiding the high oxygen demand of the latter high-cell-density process, two different continuous approaches have been investigated on, yielding space-time-yields of $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ using methanol as the sole substrate and $10.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in a simplified mixed-feed approach using glucose and methanol, respectively.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von Fermentationsverfahren für die sekretorische Produktion von rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B mit der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* in einem integrierten Ansatz von Stammentwicklung, Fermentation und Aufarbeitung. Es wurden drei verschiedene Fermentationsansätze entwickelt, die jeweils den Anforderungen an ein industrielles Produktionsverfahren in unterschiedlicher Weise gerecht werden.

In einer Fermentation im Zulaufverfahren mit Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle während der Produktion wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $5,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, verbunden mit einem Produkttiter von $480 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und einer Biotrockenmassekonzentration von $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht. Unter Vermeidung des hohen Sauerstoffbedarfs der genannten Hochzelllichtfermentation wurden zwei verschiedene kontinuierliche Ansätze untersucht. Eine Raum-Zeit-Ausbeute von $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ wurde in einem Ansatz mit Methanol als Einzelsubstrat erreicht, mit einem stark vereinfachten Ansatz mit Glucose und Methanol als Mischsubstrat noch $10,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	3
3	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Einsatz, Bedeutung und Herstellung rekombinanter Proteine	5
3.2	Proteasen	8
3.3	Proteinsekretion in Eukaryonten	12
3.4	Die methylotrophe Hefe <i>Pichia pastoris</i> als Modellsystem zur Expression rekombinanter Proteine	14
3.5	Prozeßführung in Bioreaktoren	28
4	Material und Methoden	32
4.1	Produktionsstämme.....	32
4.2	Chemikalien und Reagenzien.....	34
4.3	Fermentationsmedien und Hilfsstoffe	35
4.4	Aufbau und Durchführung der Fermentationsversuche	39
4.5	Analytische Methoden	51
5	Ergebnisse und Diskussion	64
5.1	Expression von hCTRB mit <i>Pichia pastoris</i> im Schüttelkolben.....	64
5.2	Entwicklung eines Zulaufverfahrens.....	65
5.3	Untersuchungen zum Einsatz kontinuierlicher Verfahren	91
5.4	Einsatz von kontinuierlichen Verfahren mit Mischsubstratdosierung	103
5.5	Produktaufarbeitung	114
6	Zusammenfassung	116
7	Ausblick	120
7.1	Molekularbiologische Ansätze.....	120
7.2	Verfahrenstechnische Ansätze	121

Anhang A: Literatur	123
Anhang B: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole.....	143
Anhang C: Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	146
Anhang D: Datenbankeintrag Chymotrypsinogen B-Vorläufer	150

1 Einleitung

„Biotechnology is the integration of natural sciences and engineering sciences in order to achieve the application of organisms, cells, parts thereof and molecular analogues for products and services.“

Definition der European Federation of Biotechnology [Dec00]

Die European Federation of Biotechnology hebt mit ihrer Definition des Begriffes die drei wichtigsten Aspekte der modernen Biotechnologie in den Vordergrund:

- Die Orientierung der Wissenschaft auf die konkrete Anwendung in Form von Produkten und Dienstleistungen
- Die Verwendung biologischer Systeme
- Der interdisziplinäre Ansatz

Die Biotechnologie mit ihren klassischen Produkten ist eine der ältesten Disziplinen, die sich der Mensch hat dienstbar machen können. Produkte wie Brot, Wein, Bier, Sake, Essig und viele andere Nahrungs- und Genußmittel werden mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt und sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Kulturgeschichte. Diese Techniken wurden über Jahrtausende hinweg empirisch und ohne Kenntnis der mikrobiologischen Hintergründe entwickelt und eingesetzt.

Die moderne Biotechnologie entsprechend der obengenannten Definition ist hingegen eine sehr junge Wissenschaft und begann etwa um die Jahrhundertwende mit der gezielten Herstellung der ersten Produkte, vornehmlich technischer Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Invertasen. Seit dieser Zeit hat sich die Biotechnologie sprunghaft weiterentwickelt, wesentlichen Anteil hatte daran die Entwicklung rekombinanter DNA-Technologie. Die Gentechnologie ist also ein wichtiger Bestandteil der Biotechnologie, aber nicht mit ihr identisch.

Produkte der Biotechnologie sind vor allem solche, die durch die Chemie nicht oder nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand zugänglich sind. Das können hochmolekulare Substanzen wie Proteine oder andere Biopolymere sein oder auch niedermolekulare Produkte, die aufgrund der Stereo- oder Regioselektivität von Umsetzungen und Synthesen im biologischen System bevorzugt so produziert werden. Dadurch hat die moderne Biotechnologie eine Vorrangstellung in den Bereichen Feinchemikalien (60 % der biotechnologischen Produktion) und Arzneimittel (5-11 %) inne [OECD98]. Noch stärker ist die Betonung der medizinischen Biotechnologie bei Betrachtung von Firmenprofilen, ca. 70 % aller Biotech-Unternehmen sind im Bereich der pharmazeutischen Biotechnologie angesiedelt.

Bei der Herstellung von Industriechemikalien setzt sich die Biotechnologie nur langsam durch, was in erster Linie darauf zurückzuführen ist, daß biotechnische Verfahren ge-

genüber traditionellen Methoden keine nennenswerten wirtschaftlichen Vorteile besitzen. Dies ändert sich erst allmählich mit der Einbeziehung ökologischer Faktoren in Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen. Die Hauptvorteile biotechnologischer Verfahren liegen in der Regel darin, daß durch den Verzicht auf petrochemische Ausgangsmaterialien eine ausgeglichene CO₂-Bilanz angestrebt werden kann und darin, daß Abfälle aus biotechnologischer Produktion sich besser für eine konventionelle Abwasserbehandlung eignen [OECD98].

Die vorliegende Arbeit behandelt die Entwicklung eines Produktionsverfahrens für ein rekombinantes Protein, das humane Chymotrypsinogen B. Proteine sind ausschließlich durch biologische Systeme zugänglich, sie können entweder aus natürlichen Quellen (homolog) isoliert oder unter Einsatz rekombinanter DNA-Technologie heterolog exprimiert werden. Ein chemisch-synthetischer Zugang existiert nur für vergleichsweise kurze Oligo- und Polypeptide durch die Festphasensynthese nach MERRIFIELD [Mer85].

Chymotrypsin ist eine spezifische Verdauungsprotease, die im Darm aller Wirbeltiere vorkommt und als inaktives Zymogen, dem Chymotrypsinogen, im Pankreas gebildet wird. Neben verschiedenen technischen Einsatzmöglichkeiten wird Chymotrypsin in hohen Konzentrationen im Rahmen der systemischen Enzymtherapie als Arzneimittel eingesetzt. Zur Zeit wird Chymotrypsin ebenso wie Trypsin in aktiver Form aus den Bauchspeicheldrüsen von Schlachtvieh gewonnen. Dadurch ist dieses Produkt in Preis und Qualität wesentlich vom Anfall der Ausgangsmaterialien abhängig. Dies und die durch die aktuelle BSE-Diskussion aufgebauten psychologischen Vorbehalte machen einen rekombinanten Zugang zu diesem wichtigen Enzym wünschenswert. Schließlich erlaubt dies den Einsatz des humanen Enzyms, das bislang gar nicht zugänglich ist und eröffnet die Möglichkeit, mittels „protein engineering“ eine gezielte Weiterentwicklung auch des Wirkstoffs selbst voranzutreiben und dadurch neue Einsatzgebiete zu erschließen.

Pichia pastoris ist eine methylotrophe Hefe, die in den letzten Jahren als System für die Expression heterologer Proteine zunehmend an Bedeutung gewann. Hefen sind häufig das Expressionssystem der Wahl, wenn notwendige, posttranslationale Modifikationen am Produkt, wie z. B. die Ausbildung von Disulfidbrücken in prokaryontischen Systemen nicht durchgeführt werden können.

Ausgehend von den genannten Überlegungen soll im Rahmen dieser Arbeit eine Prozeßentwicklung zur fermentativen Herstellung von rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B durchgeführt werden. Innerhalb eines interdisziplinär ausgerichteteten Forschungsprojektes unter Beteiligung der Firma Mucos Pharma GmbH & Co (Koordination und Stammentwicklung), dem Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (downstream processing) und dem Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH beschreibt die vorliegende Arbeit die Entwicklung des Fermentationsverfahrens.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* hat in den letzten Jahren ständig wachsende Bedeutung als Expressionssystem für die Produktion rekombinanter Proteine erlangt. Nachdem der Organismus zunächst für die Produktion von Einzellerprotein entwickelt worden war, folgte nach der Einstellung dieser Arbeiten die Etablierung als Expressionssystem und später der Einsatz als Modellsystem für die Peroxisomenbiogenese.

Da das *Pichia*-System durch die Firma Invitrogen als Kit vertrieben wird und für Forschungszwecke weitgehend frei genutzt werden kann, hat sich sehr schnell eine weltweite Verbreitung eingestellt. In erster Linie konzentriert sich diese Forschung aber auf den rein molekularbiologischen Ansatz zur Optimierung des Expressionssystems. Sofern die Kultivierung nicht überhaupt nur im Schüttelkolben durchgeführt wird, werden in der absoluten Majorität aller Untersuchungen die Kultivierungstechniken eingesetzt, die bereits für die SCP-Gewinnung mit *Pichia pastoris* entwickelt worden waren. Die Optimierung der Fermentationsverfahren unter Einbeziehung verfahrenstechnischer Ansätze erscheint vor diesem Hintergrund besonders vielversprechend.

Für die vorliegende Arbeit wurden die folgenden Ziele und Aufgabenstellungen erarbeitet:

- **Promotorwahl**

Für die Expression von rekombinatem Chymotrypsinogen B mit *Pichia pastoris* standen zwei verschiedene Promotorsysteme zur Verfügung: Der methanolinduzierbare AOX1-Promotor und der konstitutive GAP-Promotor. Auf der Basis publizierter Protokolle soll für beide Systeme eine Hochzelllichtfermentation im Zulaufverfahren erarbeitet werden. Anhand der Ergebnisse soll dann möglichst schnell eine Entscheidung zugunsten eines der beiden Promotorsysteme fallen, auf das sich dann die weitere Prozeßentwicklung konzentriert.

- **Integration von Fermentation und Produktaufarbeitung**

In enger Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen soll die Entwicklung der Produktion und der Produktaufarbeitung in einem integrierten Ansatz erfolgen. Durch die frühzeitige Abstimmung der beiden Prozesse können Inkompatibilitäten zwischen dem Fermentationsprodukt und den Anforderungen der Aufarbeitung vermieden werden. Eine Entscheidung für eine Fermentationsstrategie muß, wenn sie auch wirtschaftliche Aspekte einbezieht, unter starker Berücksichtigung der Eignung für eine integrierte Produktabtrennung getroffen werden.

- **Regelungstechnische Optimierung der Substratversorgung**

Nach der Wahl des Promotorsystems soll unter Einsatz geeigneter Regelungsstrategien die Substratdosierung für das Zulaufverfahren optimiert werden. Bei Einsatz des pAOX1-Systems mit Methanol als Substrat ist die Applikation einer Regelung im

geschlossenen Regelkreis mit online-Analytik geplant. Sollte sich das konstitutive System mit Glucose als Substrat als Methode der Wahl herausstellen, kann die Glucosedosierung entweder auch durch eine online-Substratregelung oder aber durch eine indirekte Methode, z.B. durch rQ-Regelung optimiert werden.

- **Untersuchungen zum Einsatz alternativer Prozeßmodelle**

Wie eingangs beschrieben, beruhen die für die Expression heterologer Proteine eingesetzten Fermentationsprotokolle auf der Entwicklung von *Pichia pastoris* als Futtermasse. Dementsprechend sind diese Protokolle auf eine Maximierung der Biomassekonzentration hin optimiert. Primäres Ziel bei der Proteinexpression ist aber nicht die Produktion von Biomasse sondern die des rekombinanten Zielmoleküls. Biomasse, obwohl als Katalysator für die Produktbildung notwendig, ist in letzter Konsequenz als Abfallprodukt zu betrachten.

Durch den Vergleich verschiedener Prozeßstrategien soll deshalb ein Ansatz für eine sinnvolle Reduzierung des Biomasseanfalls (z.B. kontinuierliche Prozeßführung, Limitierung des Biomassewachstums) erarbeitet werden.

- **Makrokinetische Charakterisierung von Wachstum und Produktbildung**

Voraussetzung für die gezielte Optimierung eines Systems ist ein weitreichendes Verständnis von dessen Verhalten. Es soll versucht werden, makrokinetische Modelle für das Wachstum von *Pichia pastoris* und für die Produktbildung mit dem gewählten Promotorsystem als Funktion z.B. der Substratkonzentration zu erstellen. Um eine möglichst genaue Schätzung der beteiligten Modellparameter für die makrokinetische Modellbildung durchführen zu können, sollen die kinetischen Untersuchungen möglichst im steady-state durchgeführt werden.

- **Optimierung der Prozeßtechnik**

Nach Untersuchung wichtiger Prozeßparameter wie Temperatur, pH-Wert und pO_2 und unter Einbeziehung der aus den anderen Bereichen gewonnenen Erkenntnissen soll eine optimierte Prozeßführung etabliert werden. Die Wahl des bevorzugten Prozeßmodells soll dabei vorwiegend auf der Grundlage wirtschaftlicher Überlegungen erfolgen. Wichtige Kriterien sind dabei neben einer möglichst hohen Raum-Zeit-Ausbeute die Scale-Up Fähigkeit des Verfahrens und eine einfache, robuste Prozeßführung.

- **Produktion von humanem Chymotrypsinogen B**

Für den Einsatz in vorklinischen Studien ist es notwendig, in Zusammenarbeit mit dem IET der Mucos-Pharma eine größere Menge des Produktes zur Verfügung zu stellen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Einsatz, Bedeutung und Herstellung rekombinanter Proteine

Innerhalb des stetig wachsenden Marktes für biotechnologisch hergestellte Produkte nehmen die rekombinanten Proteine und hier vor allem solche für den Einsatz als Pharmawirkstoffe eine besondere Stellung ein. Obwohl mengenmäßig fast unbedeutend, stellen rekombinante Proteine aufgrund ihrer hohen Wertschöpfung einen erheblichen Anteil am Umsatz dar. Nach aktuellen Schätzungen für das Jahr 2000 [Dec00] sind am Weltmarkt für Arzneimittel mit einem Gesamtjahresumsatz von 250 Mrd. US\$ rekombinante Proteine mit 17 % (42,5 Mrd. US\$) beteiligt. Noch 1995 waren es nur 5 % und 1985 lediglich 1 %. Eine Prognose [Dec00] rechnet bis zum Jahr 2002 mit einem Anwachsen des weltweiten Marktes für pharmazeutische Produkte auf 406 Mrd. US\$, wobei der Anteil rekombinanter Produkte weiter ansteigen wird.

Zur Zeit sind in Deutschland bzw. in der EU ca. 60 Arzneimittel auf der Basis rekombinanter Proteine auf dem Markt. Für diese Medikamente sind insgesamt 42 verschiedene Wirkstoffe zugelassen, darunter 8 rekombinante Antikörper und zwei Impfstoffe. Von diesen 42 Wirkstoffen werden jedoch lediglich fünf auch in Deutschland hergestellt. Beispielhaft sind im Folgenden diese fünf Produkte mit den zugehörigen Indikationen aufgeführt, die Namen der Antragsteller, deren Produkte auch in Deutschland produziert werden, sind jeweils unterstrichen. Bei den aufgeführten Firmennamen handelt es sich um die ursprünglichen Antragsteller für die Zulassung als Arzneimittel, nicht unbedingt um den aktuellen Hersteller bzw. Vertreiber.

<u>Wirkstoff</u>	<u>Indikation</u>	<u>biol. System</u>	<u>Antragsteller</u>
Erythropoetin β	renale Anämie	Säugerzellen	<u>Boehringer Mannheim</u> kohl pharma GmbH
Interferon γ 1b	chronische Granulomatose	Säugerzellen	<u>Dr. Karl Thomae GmbH</u> (j. Boehringer Ingelheim)
Insulin, human	Diabetes mellitus Typ 1	<i>E. coli</i>	Lilly Deutschland GmbH Lilly Industries Novo Nordisk <u>Hoechst</u>
t-PA (Alteplase)	Myokardinfarkt, Thrombosen	Säugerzellen	<u>Dr. Karl Thomae GmbH</u>
r-PA (Reteplase)	Myokardinfarkt, Thrombosen	Säugerzellen	<u>Boehringer Mannheim GmbH</u>

Der Apothekenumsatz für Arzneimittel auf der Basis rekombinanter Proteine lag 1997 bei 1,8 Mrd. DM. Aktuelle Zahlen für den Jahresumsatz einzelner Wirkstoffe in Deutschland liegen nicht vor.

Als weitere Beispiele sind an dieser Stelle einige der wichtigsten Produkte mit dem weltweiten Umsatz für 1999 angeführt

<u>Protein</u>	<u>Anbieter</u>	<u>Produkt</u>	<u>Umsatz 1999</u>
Erythropoetin	Amgen	Epogen	1760 Mio. US\$
Hepatitis B-Impfstoffe	Verschiedene		1400 Mio. US\$
G-CSF	Amgen	Neupogen	1260 Mio. US\$
Insulin, human	Eli Lilly	Humulin	1088 Mio. US\$

Ein weiterer, wichtiger Markt für rekombinante Proteine ist der Einsatz in der Diagnostik sowie im wissenschaftlichen Bereich und der Lebensmittelindustrie. Für diese Bereiche liegen jedoch keine exakten Zahlen vor, da dieser Markt keiner dem Pharmasektor vergleichbaren Kontrolle unterliegt.

Die verschiedenen Systeme, die für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden können, lassen sich in drei Klassen unterteilen:

- Prokaryontische Systeme (Bakterien, z.B.: *Escherichia coli*, *Staphylococcus carnosus*)
- Niedere Eukaryonten (Pilze, z.B.: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*)
- Zellen höherer Eukaryonten (Zelllinien aus Vertebraten z.B. BHK: Baby Hamster Kidney, CHO: Chinese Hamster Ovary)

Wie schon in der Reihenfolge der Auflistung angedeutet, nehmen Hefesysteme eine Mittelstellung unter den Expressionssystemen ein. Sie verbinden die einfache Kultivierbarkeit und die molekulargenetischen Möglichkeiten mikrobieller Systeme mit der Fähigkeit, als Eukaryonten viele wichtige co- und posttranslationale Modifikationen wie z.B. die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken, am Produkt vornehmen zu können. Andererseits reichen sie hinsichtlich der Wachstumsrate und der maximalen Expressionsrate nicht an bakterielle Systeme heran. Gegenüber höheren Zelle unterscheiden sich Pilzsysteme oft durch die fehlende Fähigkeit, korrekte Glycosilierungsmuster bei N- und O-Glycosilierung aufzubauen.

Als Produktionsverfahren im industriellen Maßstab werden alle bekannten Verfahren auch eingesetzt, beginnend mit der industriellen Herstellung von Erythropoetin aus CHO-Zellen in Rollflaschen [Yos98] über die bei allen mikrobiologischen Systemen üblichen Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor (z.B. Insulin in *Escherichia coli*) bis hin zu kontinuierlichen Verfahren und Perfusionsverfahren mit Zellkultursystemen.

Für die Expression von rekombinantem Chymotrypsinogen B fiel aus den oben genannten Gründen die Wahl auf ein Hefesystem. Das Molekül enthält sieben Disulfidbrücken, die Expression des Proteins in aktiver Form in einem Bakteriensystem war deshalb bislang nicht möglich [Kla98]. Für den Einsatz eines Zellkultursystems bestand keine

Notwendigkeit, da Chymotrypsinogen nicht glycosiliert ist und durch Hefesysteme in aktiver Form dargestellt werden kann.

3.2 Proteasen

Proteasen sind hydrolytische Enzyme, die Peptidbindungen zwischen Aminosäuren in Peptiden und Proteinen spalten. In Abhängigkeit davon, wo das jeweilige Substrat angegriffen wird, werden Endoproteasen, die im Inneren einer Peptidkette ansetzen, von Exoproteasen, die carboxyterminal oder aminoterminal am Enden einer Peptidkette ansetzen, unterschieden. Während Exoproteasen in der Regel ohne Einschränkungen alle Aminosäuren als Substrate akzeptieren, reicht die Palette der Endoproteasen von weitgehend unspezifischen Enzymen über solche, die bestimmte Aminosäuren bevorzugen (z.B. Chymotrypsin) bis hin zu hochspezifischen Proteasen, die exakte Bindungsstellen benötigen und oft spezifische Aufgaben im Metabolismus haben (z.B. tissue plasminogen activator, t-PA).

Eine gängige Grobeinteilung von Proteasen erfolgt nach HARTLEY anhand charakteristischer Gruppen im aktiven Zentrum der Enzyme.

Serinproteasen (Serin), z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin

Metallproteasen (M^{2+}), z.B. Collagenase, Carboxypeptidase A u. B

Thiolproteasen (Cystein), z.B. Bromelain, Papain, Ficin

Saure Proteasen (COOH-Seitenkette), z.B. Pepsin, Labferment (Rennin)

Eine weitere Einteilung von Proteasen kann nach dem pH-Optimum erfolgen. Für vorwiegend technische Zwecke werden alkalische Proteasen, neutrale Proteasen und saure Proteasen differenziert.

3.2.1 Chymotrypsin

Chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1; s. Anhang D) ist eine Serinprotease, die im Dünndarm aller Wirbeltiere vorkommt und hinsichtlich ihrer Sequenz und Spezifität hochkonserviert ist [Hou94]. Enzyme mit chymotryptischer Aktivität wurden aber auch in vielen anderen Organismen nachgewiesen, zuletzt auch in filamentös wachsenden Pilzen [Scr00]. Das Enzym spaltet Peptidbindungen am Carboxyterminus der hydrophoben Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Leucin. Es wird in Form einer inaktiven Vorstufe, des Zymogens Chymotrypsinogen, im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) synthetisiert. Bildungsort innerhalb des Pankreas sind die sogenannten Acinuszellen, von denen die Enzyme in Form von proteinreichen Zymogengranula in das Duodenum exocytiert werden. Das sekretierte Chymotrypsinogen B des Menschen (CTRB_{hum}) ist eine Polypeptidkette aus 245 Aminosäuren und durch fünf Disulfidbrücken quervernetzt. Die Molekülmasse beträgt 26 kD. Die in der vollständigen Kartierung des Proteins aufgeführten ersten (N-terminalen) 18 Aminosäuren stellen die Sekretionssequenz des Proteins dar und werden bereits vor der Sekretion durch eine Signalpeptidase im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle abgespalten. Diese Abspaltung der Signalse-

quenz findet sowohl bei der homologen Expression in den Acinuszellen des Pankreasgewebes als auch bei der heterologen Expression in dem System *Pichia pastoris* statt, so daß, unabhängig von der verwendeten Sequenz, das gleiche, 245 Aminosäuren große Produkt entsteht.

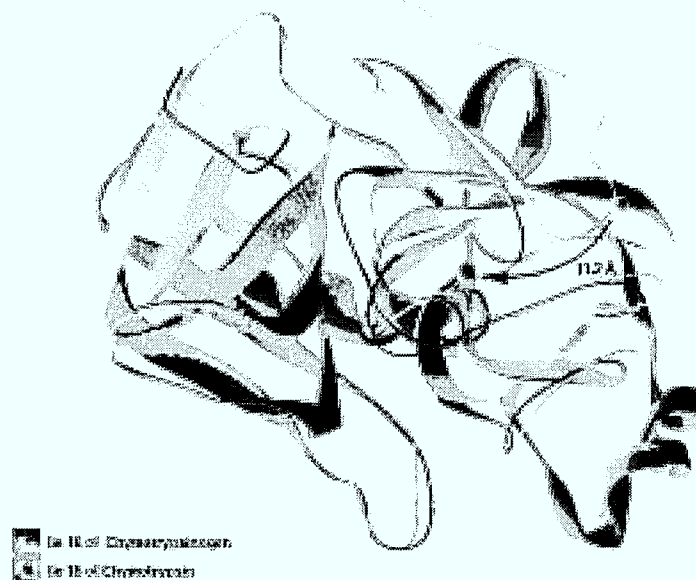


Abb. 3-1: Dreidimensionale Struktur des Chymotrypsin- bzw. Chymotrypsinogenmoleküls. Der Positionswechsel von Ile 16 verdeutlicht die beschriebene Konformationsänderung bei Aktivierung des Enzyms.
Quelle und (C): SWISS-3DIMAGE: P00766; <http://www.expasy.ch>

Im Dünndarm erfolgt die Aktivierung [Str90] des Zymogens durch Trypsin und autokatalytisch durch aktives Chymotrypsin. Zunächst entsteht durch die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Arg15 und Ile16, katalysiert durch aktives Trypsin, das π -Chymotrypsin, welches bereits volle katalytische Aktivität besitzt. Dieses π -Chymotrypsin wirkt nun auf andere π -Chymotrypsinmoleküle und durch die Abspaltung der beiden Dipeptide Ser14-Arg15 und Thr147-Asn148 entsteht das aus drei Peptidketten bestehende, stabile α -Chymotrypsin, dessen Struktur durch fünf inter- und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die dreidimensionale Struktur von Chymotrypsin bzw. Chymotrypsinogen unter Heraushebung des Positionswechsels von Ile16 ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

Die proteolytische Spaltung als Aktivierungsmechanismus [Str90] verursacht eine Reihe von Konformationsänderungen am katalytischen Zentrum des Enzyms. Zunächst entsteht durch die tryptische Spaltung eine aminoterminalen Funktion am Ile16. Diese dreht sich ins Innere des Moleküls und tritt mit der Carbonsäurefunktion in der Seitenkette von Asp194 in Wechselwirkung; dadurch wird das Substratspezifitätszentrum an den Aminosäuren 189-192 erst ausgebildet. Die Protonierung der Aminofunktion von Ile16 stabilisiert dabei die aktive Form des Enzyms, woraus sich die pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität begründet.

Das humane Chymotrypsin(ogen)-Gen wurde erstmals 1989 durch eine japanische Ar-

beitsgruppe isoliert [Tom89] und charakterisiert [Hou93]. Erste Versuche zur rekombinanten Produktion des Enzyms wurden 1996 mit dem Rattenenzym berichtet [Ven96], für das humane Enzym wurde kürzlich ein Zugang mit einem thio-redoxin-negativen *E. coli*-System dargestellt [Ver00], hier wurden Titer in der Größenordnung von $1\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht.

3.2.2 Technische und medizinische Einsatzmöglichkeiten proteolytischer Enzyme

Proteasen für den technischen Einsatz [Cru89] sind nicht-rekombinante Proteine, die großtechnisch mit Bakterien oder filamentösen Pilzen hergestellt werden. Neben den Amylasen sind Proteasen heute die wichtigsten Industrieenzyme und werden vor allem in Waschmitteln und in der Milchwirtschaft eingesetzt aber auch in der Lederindustrie, der Lebensmittelindustrie und anderen Bereichen. Aufgrund des geringen Preises von Industrieenzymen spielen rekombinante Proteine in diesem Sektor kaum eine Rolle. Eine wichtige Ausnahme stellt jedoch das Labferment (Rennet, Chymosin, EC 3.4.23.4) für die Käseherstellung dar, das neben der ursprünglichen Quelle, den Mägen von saugenden Kälbern auch mikrobiologisch mit verschiedenen Mikroorganismen und auch rekombinant hergestellt wird. Tatsächlich war rekombinantes Chymosin für die Käsebereitung 1990 das erste von der FDA als Nahrungsmittelzusatz zugelassene rekombinante Protein [FDA00]. Ein Beispiel für den medizinischen Einsatz von Proteasen neben den unter 3.2.3 beschriebenen ist das bereits erwähnte Enzym tissue plasminogen activator.

Ein interessanter, neuer Ansatz für die Verwendung proteolytischer Enzyme liegt in der Gegenreaktion, der Knüpfung von Peptidbindungen. So wurde Chymotrypsin erfolgreich für die Synthese des Peptidhormons Kyotorphin eingesetzt [Lev00]. Die Verschiebung des thermodynamischen Gleichwichts der hydrolytischen Reaktion wird dabei durch die Verwendung organischer Lösungsmittel erreicht.

Bei der fermentativen Produktion von Proteinen haben natürlich vorkommende Proteasen einen negativen Einfluß auf Produktausbeute und -qualität. Durch Kontamination mit Proteasen kann es zu einer vollständigen oder partiellen Degradation des Zielmoleküls kommen. Besonders problematisch ist dabei, daß die Abbauprodukte noch viele Eigenschaften mit dem Ursprungsmolekül gemeinsam haben und sich deshalb nur schwer von diesem abtrennen lassen. Für die Herstellung rekombinanter Proteine werden deshalb in der Regel Organismen ausgewählt, die eine geringe extrazelluläre Proteaseaktivität haben.

3.2.3 Einsatz proteolytischer Enzyme als orale Therapeutika

Im pharmazeutischen Bereich werden proteolytische Enzyme in Rahmen der sog. Systemischen Enzymtherapie eingesetzt [Kle97]. Indikationsbereiche dieser Therapie sind dabei vor allem die orthopädische Chirurgie, Traumatologie und Sportmedizin aber

auch die begleitende Krebstherapie. Eingesetzt werden Enzymkombinationspräparate aus tierischen Serinproteasen (z.B. Trypsin, Chymotrypsin) und pflanzlichen Thiolproteasen (z.B. Bromelain, Papain), die über eine antiinflammatorische und antiödematöse Wirkung verfügen. Präparate für die Systemische Enzymtherapie werden exklusiv durch die Firma Mucos-Pharma GmbH & CO hergestellt, die in dem der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Projekt als industrieller Kooperationspartner der Forschungszentrum Jülich GmbH fungierte.

Zur Zeit sind für die Anwendung im Rahmen der Systemischen Enzymtherapie in Deutschland die Präparate Wobenzym N, Phlogenzym, WOB-MUGOS E, Mucozym, Mulsal N, WOB-MUGOS Th, Wobenzym N (Salbe) und WOB-MUGOS E (Salbe) im Handel [Muc00]. Neben den Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Pankreatin, Bromelain und Papain werden auch das pflanzliche Flavonoid Rutin und Kalbsthymusextrakt eingesetzt. Die Anwendung reicht von Ödemen und Entzündungen [Woo97] in Folge von Traumata (z.B. Sportverletzungen oder nach Operationen) über die Behandlung von bakteriellen Entzündungen [Suk97], Viruserkrankungen [Sta97] oder Rheumatoider Arthritis [Maz97] und anderer degenerativer Erkrankungen [Sta97b] bis zur Therapie bösartiger Tumoren [Sy97] [Geb97] (alle Referenzen in diesem Abschnitt sind in einer Sondernummer des Int. J. Immunotherapy (1997) zusammengefaßt).

Für die antiinflammatorische Wirkung oraler Enzymtherapeutika wird der folgende Wirkmechanismus postuliert [Kle97]: Nach Aufnahme der Enzyme in den Blutkreislauf werden diese an bestimmte Blutproteine, z.B. das α 2-Makroglobulin (α 2M) gebunden. Dabei werden die Antigene der Proteasen maskiert, die Aktivität bleibt jedoch zumindest teilweise erhalten. Der α 2M-Proteasekomplex blockiert das entzündungsauslösende Cytokin IL-1 β . Bei einem pH-Wert unterhalb von 6, wie er z.B. im Bereich verletzter Gewebe auftritt, dissoziiert der α 2M-Proteasekomplex und die aktiven Proteasen werden freigesetzt. Hier können nun die Proteasen das C1q-Protein aus der Immunglobulinfamilie Ig-SF spalten, das wesentliche Aufgaben in der Aktivierung des Komplementsystems hat. Dadurch können ein Überschießen der Immunantwort und pathogene Effekte vermeiden werden.

Bislang werden im Rahmen der Systemischen Enzymtherapie ausschließlich homologe Proteine eingesetzt, die aus tierischen oder pflanzlichen Quellen isoliert werden. Chymotrypsin wird aus den Bauchspeicheldrüsen von Rindern nach Aufschluß wäßrig extrahiert und als Acetonpräzipitat eingesetzt. [Kla98] [Bru98].

3.3 Proteinsekretion in Eukaryonten

An der Sekretion von Proteinen in Eukaryonten ist eine Reihe von Zellkompartimenten beteiligt, wobei das Endoplasmatische Reticulum (ER) eine zentrale Rolle spielt. Im Anschluß an die Transskription eines Gens diffundiert die entstandene mRNA aus dem Zellkern heraus in das Cytoplasma und bindet sich an ein Ribosom, die Translation in eine Aminosäuresequenz beginnt. Bei sekretorischen Proteinen wird dabei zunächst die sogenannte Sekretionssequenz translatiert, beim humanen Chymotrypsinogen handelt es sich bei der nativen Sekretionssequenz um eine Abfolge von 18 Aminosäuren. Diese Sekretionssequenz bewirkt nun eine Unterbrechung der Translation, bis sich das Ribosom über die Sekretionssequenz an das Endoplasmatische Reticulum (ER) anlagert. Die weitere Translation erfolgt in das Lumen des ER hinein. Zu den vielfältigen Aufgaben des ER gehören die co- und posttranslationale Faltung der Proteine, verschiedene Modifikationen, Qualitätskontrolle und schließlich der Weitertransport in andere Organellen.

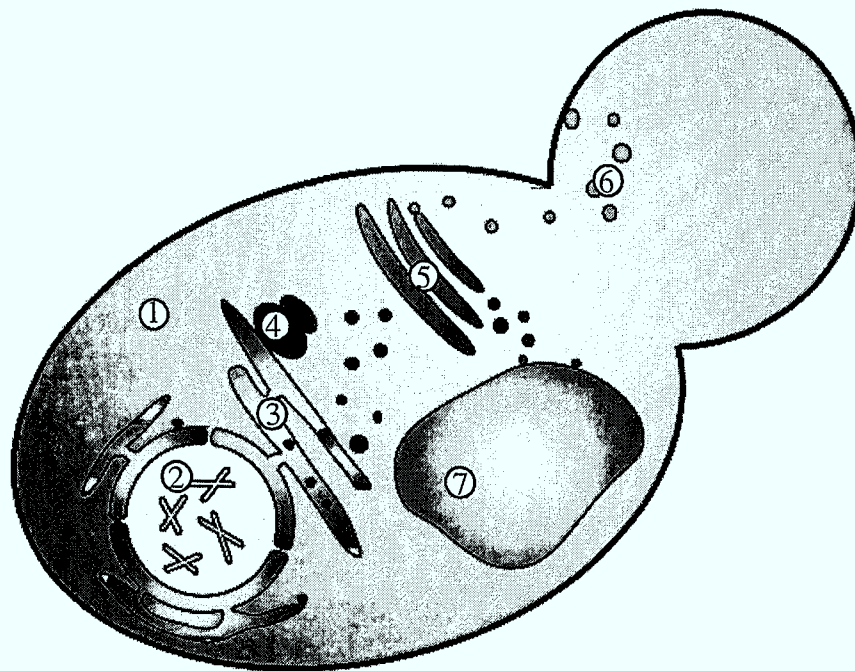


Abb. 3-2 : Schema der an der Proteinsekretion beteiligten Organellen und Zellstrukturen.
 Legende: 1) Cytoplasma 2) Nucleus
 3) rauhes ER 4) Ribosom
 5) Golgi-Apparat 6) Exportvesikel
 7) Vakuole

Obwohl die Konformation eines Proteins alleine durch die Primärsequenz determiniert wird [Gef92], sind doch an der Faltung zahlreiche Hilfsstrukturen beteiligt. Grundsätzlich erhalten Proteine ihre abschließende Konformation in den Zielkompartimenten, lediglich sekretierte Proteine werden im ER prozessiert.

Hauptaufgabe des ER ist in diesem Zusammenhang die Bereitstellung einer hinsichtlich Ionenstärke, Redoxpotential und pH-Wert kontrollierten Umgebung, die ein Intermediat

zwischen Cytoplasma und dem extrazellulären Raum darstellt. Zielproteine und Hilfsstrukturen wie Chaperone, Disulfidisomerasen und Glycosyltransferasen liegen in lokal sehr hohen Konzentrationen vor. Dadurch können auch komplexe, mehrkettige Proteine, die nur in geringer Menge synthetisiert werden, eine korrekte Konformation erhalten [Hel92]. Korrekt gefaltete Proteine werden im ER aufkonzentriert [Miz93] und dann in sog. CopII-Vesikeln [Ros99b] in den Golgi-Apparat transportiert. Nachdem, soweit notwendig, im Golgi noch weitere Glycosylierungsschritte folgen, werden die Proteine sekretiert, wobei diese Sekretion bei Hefen über die Knospen erfolgt [Nov81].

Fehlgefaltete Proteine werden im Endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten und später abgebaut. Die Mechanismen für diese Qualitätskontrolle sind bislang im wesentlichen unklar [Hum95], es muß sich jedoch um die Erkennung allgemeiner Eigenschaften von Proteinen mit falscher Konformation handeln, z.B. um die Bindung an Chaperone.

3.4 Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* als Modellsystem zur Expression rekombinanter Proteine

3.4.1 Historie

Im Jahr 1969 berichtete eine japanische Forschergruppe erstmals die Isolierung von Hefespezies, die in der Lage waren, auf Methanol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen [Oga69]. In der Folgezeit wurden die methanolassimilierenden Hefen den Gattungen *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* und *Torulopsis* zugeordnet [Lee80] [Lee83].

Zielsetzung der Arbeit mit methylotrophen Hefen war zunächst die Entwicklung von Kultivierungsprozessen zur Produktion von Einzellerprotein (single-cell-protein: SCP) auf der Basis des sehr preiswerten, petrochemisch erzeugten Substrates Methanol [Hit86] [Tor86] [Bab87]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden die wesentlichen Grundlagen der Kultivierung geschaffen, wie sie teils heute noch für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt werden. Mit der Ölkrise der 70'er Jahre und der damit einhergehenden Preissteigerung für Methanol jedoch wurde die Herstellung von SCP auf Grundlage von Methanol im Vergleich mit preiswertem, pflanzlichen Protein aus Sojabohnen wirtschaftlich uninteressant [Lin00].

In der Folge wurden zwei der zunächst für die SCP-Produktion eingesetzten Hefearten, *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha*, konsequent für die Produktion rekombinanter Proteine entwickelt. Grundlage dieser Entwicklungen war die Entdeckung der sehr starken Promotoren, die die Expression des Enzyms Alkoholoxidase regulieren. Mittlerweile wurden auch weitere Arten dieser Gruppe, so z.B. *Pichia methanolica* [Ray98] oder *Candida glabrata* [Mac94] für die Expression heterologer Proteine eingesetzt, diese besitzen jedoch bis heute noch keine wirtschaftliche Bedeutung.

Die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha* [Rog86] wurde im Arbeitskreis von Prof. Hollenberg an der Universität Düsseldorf bearbeitet, die wirtschaftliche Nutzung erfolgt durch die zu diesem Zweck gegründete Firma Rhein Biotech. *Pichia pastoris*, der für die vorliegende Arbeit eingesetzte Produktionsorganismus, wurde im Auftrag der Firma Phillips Petroleum am SIBIA (Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates, La Jolla, CA) durch den Arbeitskreis von James Cregg für die Produktion rekombinanter Proteine etabliert [Cre85]. Nach der ersten Publikation im Jahr 1985 erfolgte schnell die Weiterentwicklung des Systems, z. B. die Applikation integrativer Vektoren [Cre87] und der Einsatz für verschiedene Zielprodukte [Cre88]. Durch die Isolierung und Etablierung weiterer Promotorsysteme [Wat97] [She98] wurde die Variabilität des Systems erhöht und eine noch breitere Palette von Anwendungen eröffnet.

Die weltweite Verbreitung von *Pichia pastoris* für die fermentative Produktion rekombinanter Proteine begann 1993 mit dem Verkauf der Lizenzen für das Expressionssy-

stem an die Firma Research Corporation Technologies (Tucson, AZ), der Vertrieb für die Forschung erfolgt über die Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Bis heute wurde ein Vielzahl von Proteinen erfolgreich mit *Pichia* exprimiert. Eine weitere wissenschaftliche Applikation findet *Pichia pastoris* als Modellorganismus für die genetische und molekulare Analyse der Peroxisomenbiogenese [Gou92].

Für eine vollständigere Auflistung als die hier dargestellte wird auf den Artikel von Joan Lin Cereghino und James M. Cregg [Lin00] verwiesen, der zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit die umfangreichste Zusammenfassung darstellt. Die Auflistung umfaßt 223 verschiedene Proteine aus allen Reichen, davon 17 aus Bakterien, 21 aus Pilzen, 6 aus Protisten, 28 aus Pflanzen, 14 aus Invertebraten, 11 aus Viren, 80 humane Proteine und 46 Produkte aus anderen Vertebraten, die bis zum Jahre 1999 einschließlich publiziert wurden.

Im folgenden ist eine Auswahl verschiedener Proteine aufgeführt, die erfolgreich in *Pichia pastoris* exprimiert wurden. Es wurde auf eine einheitliche Nomenklatur der Produkte zugunsten der von den jeweiligen Autoren gewählten, englischen Bezeichnungen verzichtet, um eine eindeutige Zuordnung zu den zitierten Literaturstellen zu gewährleisten. Dies gilt auch für die aufgeführten Titer bzw. Raum-Zeit-Ausbeuten. Die Großbuchstaben hinter dieser Angabe bezeichnen, ob es sich um sekretorische (S) oder intrazelluläre (I) Expression handelt. Bei allen Beispielen wurde der AOX1-Promotor aus *Pichia pastoris* eingesetzt.

<u>Protein</u>	<u>Titer / RZA</u>	<u>Prozeßführung</u>	<u>Referenz</u>
Aprotinin (bovine)	930 mg·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Ved91b]
Barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase	15 nkat·ml ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Hoc98]
Bovine enterokinase	6,3 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Voz96]
Bovine β-lactoglobulin	> 1g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Kim97]
Carcinoembryonic antigen N-A3 domain	S	Zulaufverf.	[Hel99]
Collagen type 3 + prolyl 4-hydroxylase (human), Koexpression	15 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Vuo97]
<i>E. coli</i> β-lactamase	I	Schüttelkolben	[Tsc87a]
Dextranase	3500 EUA ¹⁾ ·ml ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Rod96a]
Fungal Endo-β-1,4-xylanase	60 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Ber00]
Gelatine	14,8 g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Wer99]
Hepatitis B surface antigen	0,4 g·l ⁻¹ , S > 1g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf. Zulaufverf.	[Cre87] [Cha99b]
Hepatitis E ORF3-protein	I	Schüttelkolben	[Sun97]

¹⁾ Einheit nicht charakterisiert

HIV-envelope protein	20 mg·l ⁻¹ , S 1,25 g·l ⁻¹ , I	Zulaufverf. Zulaufverf.	[Sco93a]
Honeybee odorant-binding protein	150 mg·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Bri99]
Hookworm anticoagulant peptide	1,2 g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Ina99]
Human β_2 -glycoprotein I domain V	S 0,4 g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf. MeOH-geregt Zulaufverf. mixed-feed, MeOH-ger.	[Kat98]
Human cathepsin F	keine Angaben		[Wan98]
Human gelatinase B	300 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Roy99]
Human granzyme B	S	Schüttelkolben	[Sun99]
Human Lewis fucosyltransferase III	S / I	Zulaufverf.	[Gal98]
Human macrophage inflammatory protein	70 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Mae00]
Human mast cell tryptase	55 U·ml ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Nil98]
Human single-chain urokinase-type plasminogen activator-annexin V chimeras	600 IU·ml ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Tsu96]
Human tumor necrosis factor	10 g·l ⁻¹ , I 0,11 g·l ⁻¹ ·h ⁻¹ , S	Zulaufverf. mixed-feed Konti.	[Sre88] [Sre89]
Insulin precursor (human)	S	Schüttelkolben	[Kje99]
Invertase (<i>S. cerevisiae</i>)	2,5 g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Tsc87a]
Lysozyme (bovin)	13 mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹ , S	semi-kontinuierlich	[Dig89]
Mast cell tryptase (human)	164 nM, S	Schüttelkolben	[Cha99a]
Rat acetylcholinesterase	1 mg·l ⁻¹ , S	Schüttelkolben	[Mor97]
Spider dragline protein	I	Schüttelkolben	[Fah97]
Spinach glycolate oxidase + <i>S. cerevisiae</i> catalase, Koexpression	I	Schüttelkolben	[Pay97]
Tetanus toxin fragment C	12 g·l ⁻¹ , I	Zulaufverf.	[Cla91a]
Thrombomodulin	S	Perfusion	[Che96]
Tick anticoagulant peptide	1,7 g·l ⁻¹ , S	Zulaufverf.	[Lar94]

Für den größten Teil aller Veröffentlichungen zur Expression rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* gilt, daß es sich um ausschließlich molekularbiologisch orientierte Arbeiten handelt. Die Kultivierung erfolgt in der Regel unter Verwendung von Schüttelkolben oder mit dem häufig beschriebenen Protokoll für die Hochzelllichtfermentation im Zulaufverfahren, wobei die Methanoldosierung über ein einfaches Profil manuell gesteuert wird. Obwohl die Vorteile einer nicht-limitierenden Methanoldosierung für das Zulaufverfahren bekannt sind [Gua97] und auch bereits erste Daten zum Einfluß der Methanolkonzentration publiziert wurden [Kat98], werden diese Techniken bisher nur sehr selten eingesetzt. Es sind jedoch Ansätze publiziert, unter Einbeziehung anderer metabolischer Parameter (Biomasse, pO₂) eine optimale Substratversorgung zu gewähr-

leisten [Cha99b]. Die Möglichkeit, anstelle von reinem Methanol eine Mischung verschiedener Substrate zu verwenden, ist ebenfalls seit geraumer Zeit bekannt [Bri90], auch hier ist eine Umsetzung in einem Produktionsverfahren bislang selten publiziert.

Kontinuierliche Fermentationsverfahren sind zwar prinzipiell beschrieben [Sre96], bei den wenigen, bekannten Anwendungen wurde jedoch nie ein steady-state verwirklicht, da entweder mit Biomasserückhaltung gearbeitet wurde [Che96] oder nur eine kurze Phase mit kontinuierlicher Prozeßführung zur Verlängerung des fed-batch Verfahrens [Dig89] angehängt wurde. Kontinuierliche Fermentationen von rekombinanten *Pichia pastoris* mit nutristatischer Substratregelung sind bislang nach Wissen des Verfassers nicht als Anwendung beschrieben.

3.4.2 Grundstoffwechsel methylotropher Hefen

Der Stoffwechsel in *Pichia pastoris* entspricht im wesentlichen dem Standard für aerob wachsende Organismen (EMP-Weg, Citratzyklus, Atmungskette) und wird deshalb an dieser Stelle nicht im Detail erläutert.

Wesentlich für das Verständnis der Ergebnisse ist der Stoffwechsel bei Wachstum auf Methanol, wie er in Abb. 3-3 dargestellt ist.

Im Gegensatz zu konventionellen Hefespezies vom *Saccharomyces*-Typ vermögen methylotrophe Hefen der Genera *Pichia*, *Hansenula* (*Pichia*), *Candida* und *Torulopsis* auf Methanol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen [Sah77]. Die Aufnahme von Methanol in die Zelle erfolgt diffusiv über die Zellmembran. Der Unterschied in der Metabolisierung von Methanol zwischen den genannten Hefegattungen und methylotrophen Bakterien liegt im Wesentlichen in der Art der primären Oxidation des Methanols. Während dieser Schritt bei Prokaryonten über eine Dehydrogenase unter $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Gewinn erfolgt, kommt bei Hefen eine Alkoholoxidase zum Einsatz [Cou80]. Bei der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd werden zwei Protonen direkt auf Sauerstoff übertragen. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird durch eine Katalase in Wasser und Sauerstoff gespalten, die Zelle vermag aus dieser Reaktion keine Energie zu gewinnen.

Die Alkoholoxidase und die Katalase sind in speziellen Organellen, den Peroxisomen organisiert. Dies wird allgemein damit begründet, daß die Kompartimentierung dieser Reaktion in speziellen Microbodies die Strukturen des Cytosols vor dem starken Oxidationsmittel H_2O_2 und in Verbindung damit auftretenden Peroxid-Radikalen schützt. Das Enzym Alkoholoxidase ist in diesen speziellen Organellen auch strukturbildendes Element und kann bis zu 30 % des Gesamtproteins in der Zelle ausmachen.

Das Formaldehyd kann nun entweder zur Energiegewinnung weiter oxidiert (Katabolismus) oder zum Aufbau von Biomasse (Anabolismus) eingesetzt werden [Pap78].

Ameisensäuremethylester. Durch eine bislang nicht nachgewiesene Esteraseaktivität könnte dieses Molekül sodann in zwei Moleküle Formiat gespalten werden. Diesem Stoffwechselweg wird vor allem eine Rolle in der Entgiftung von akkumuliertem Formaldehyd zugewiesen.

Eine weitere Möglichkeit zur Formaldehydentgiftung, die $\text{NADH} + \text{H}^+$ -gekoppelte Reduktion zum Methanol durch das Enzym Formaldehydreduktase (in Abb. 3-3 durch einen gestrichelten Reaktionspfeil dargestellt) wurde bereits 1984 vorgeschlagen [Tro84] [Tan85]. Bei kritischer Betrachtung der Hypothese ist jedoch zu beachten, daß diese metabolische Reaktion bei ungehemmter Aktivität der Alkoholoxidase eine gefährliche Senke für Reduktionsäquivalente im Sinne eines „futile cycling“ darstellen würde. Wahrscheinlich ist deshalb, daß es sich wirklich nur um eine Notfallantwort im Falle toxischer Formaldehydkonzentrationen handelt. Wie bereits 1975 für *Candida boidinii* gezeigt werden konnte [Pil75], ist Formaldehyd um den Faktor 100 toxischer als Methanol, so daß eine effiziente Möglichkeit zur Detoxifikation durchaus sinnvoll erscheint. Es sollte jedoch nicht die Möglichkeit außer Acht gelassen werden, daß zur Vermeidung eines „futile cycling“ eine gleichzeitige Inhibierung der Alkoholoxidase auftreten könnte.

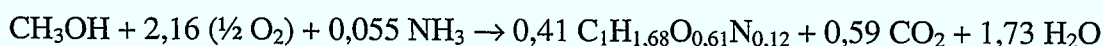
Wird das Formaldehyd zum Aufbau von Biomasse eingesetzt, so geschieht dies im sogenannten Ribulosemonophosphatzyklus, an anderer Stelle auch als Xylulosephosphatzyklus benannt. In diesem Stoffwechselabschnitt dient zunächst Xylulose-5-phosphat als Akzeptor für den Eingangsbaustein Formaldehyd. Durch das Enzym Dihydroxyacetonsynthase [Mur97] erfolgt eine C-C-Knüpfung, wobei eine zu postulierende C6-Zwischenstufe sofort in Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat zerfällt. Dihydroxyaceton wird durch das Enzym Triokinase unter ATP-Verbrauch zum Dihydroxyacetonphosphat phosphoryliert, welches zum Aufbau von Biomasse aus dem Zyklus abgezogen werden kann.

Unter Bildung von verschiedenen C4 bis C7 Zwischenstufen unter Beteiligung der Enzyme Aldolase, Bisphosphatase sowie Transaldolase und Transketolase wird schließlich der Formaldehydakzeptor Xylulose-5-phosphat regeneriert, wobei dessen unmittelbare Vorstufe, der Zucker Ribulose-5-phosphat für den Zyklus namensgebend ist. Netto wird aus diesem Zyklus in drei Umläufen ein Mol Dihydroxyacetonphosphat aus drei Mol Formaldehyd unter Verbrauch von drei Mol ATP generiert. Der vollständige Stoffwechselweg ist in Abb. 3-3 dargestellt.

3.4.3 Kalkulation der Reaktionswärme bei Wachstum auf verschiedenen Substraten

Wie bereits erwähnt, wird bei der Metabolisierung von Methanol der erste Oxidationsschritt durch eine Oxidase katalysiert, ohne daß die Zelle metabolische Energie gewinnen kann. Die Folge dieser ineffizienten Nutzung ist eine vergleichsweise geringe Biomasseselektivität von $0,32 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ($= 0,41 \text{ C-mol} \cdot \text{C-mol}^{-1}$) aus diesem Substrat (eigene

Ergebnisse aus fed-batch Fermentationen). Dieser Vorgriff auf experimentelle Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit ermöglicht an dieser Stelle die Berechnung der Gesamtreaktion für das Wachstum der Zellen auf Methanol und somit auch die Kalkulation der als Wärme freiwerdenden Energiedifferenz zwischen den Metaboliten. Neben der genannten Biomasseselektivität, die als Mittelwert aus allen Fermentationen im Zulaufverfahren ermittelt wurde, muß dazu noch die Elementarzusammensetzung der Biomasse herangezogen werden. Diese wurde durch die Zentralabteilung für chemische Analysen der Forschungszentrum Jülich GmbH mittels eines CHNS-Analysators zu $C_1H_{1,68}O_{0,61}N_{0,12}$ ($M = 25,1 \text{ g-C-mol}^{-1}$) bestimmt, wobei sich zwischen Zellproben nach Wachstum auf Glucose, Glycerin oder Methanol keine signifikanten Unterschiede in der Biomassezusammensetzung ergaben. Diese Zusammensetzung weicht etwas von der bei Heijnen 1997 [Hei97] angegebenen theoretischen Summenformel $C_1H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ ab. Unter Berücksichtigung dieser Daten und der Annahme, daß außer Biomasse nur CO_2 produziert wird, kann nun die Gesamtstoffwechselreaktion für das Wachstum von *Pichia pastoris* auf Methanol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wie folgt summiert werden:



Dabei wird Ammonium als einzige Stickstoffquelle eingesetzt. Ausgehend von dieser Reaktionsgleichung kann nun die freie Standardreaktionsenthalpie als Summe aller Standardbildungsenthalpien berechnet werden. Diese werden wie folgt eingesetzt [Hei97]:

$$\Delta H_f^0(CH_3OH) = -246 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta H_f^0(C_1H_{1,68}O_{0,61}N_{0,12}) = -91 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta H_f^0(NH_3) = -133 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta H_f^0(CO_2) = -394,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

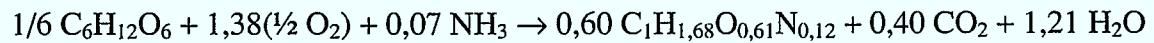
$$\Delta H_f^0(H_2O) = -286 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Für die Gesamtreaktion ergibt sich somit:

$$\begin{aligned} \Delta H_r^0 &= \sum_i \nu_i \cdot \Delta H_f^0 = (-1) \cdot (-246) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + (-0,055) \cdot (-133) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ &+ 0,41 \cdot (-91) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + 0,59 \cdot (-394,1) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + 1,73 \cdot (-286) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{Gleichung 3.1} \\ &= -485 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

Rechnet man nun diesen Wert zum Vergleich auf die freigesetzte Wärmeenergie für die Bildung von einem C-mol Biomasse um, so ergibt sich ein Wert von $Q = 1183 \text{ kJ-C-mol}^{-1}$. Bei Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wird aufgrund der günstigeren Energieausbeute im Vergleich zum Methanol eine wesentlich höhere Biomasseselektivität von $0,5 \text{ g-g}^{-1}$ (eigene Daten) erreicht. Ausgehend

von diesem Wert und unter Annahme der gleichen Biomassezusammensetzung ergibt sich die Gesamtreaktion für die Bildung von Biomasse und CO_2 aus Glucose, bezogen auf 1 C-mol Substrat wie folgt:



Setzt man nun als Standardbildungsenthalpie für die Glucose

$$\Delta H_f^0(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = -1264 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} = -210,7 \text{ kJ} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$$

ein, so errechnet sich analog zu Gleichung 3.1 die Standardreaktionsenthalpie wie folgt:

$$\begin{aligned} \Delta H_r^0 &= \sum_i \nu_i \cdot \Delta H_f^0 = (-1) \cdot (-210,7) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + (-0,07) \cdot (-133) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ &+ 0,60 \cdot (-91) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + 0,40 \cdot (-349,1) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} + 1,21 \cdot (-286) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{Gleichung 3.2} \\ &= -320,3 \text{ kJ} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

Bezogen auf Bildung von einem C-mol Biomasse werden demnach bei Wachstum auf Glucose nur $534 \text{ kJ} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Gleichung 3.2) in Form von Wärme frei.

3.4.4 Kalkulation des theoretischen Sauerstoffverbrauchs

Vergleicht man weiterhin die theoretischen Biomasseselektivitäten gegenüber Sauerstoff $Y_{X/O}$ anhand der aufgestellten Reaktionsgleichungen, so ergibt sich bei Wachstum auf Glucose diese Größe zu $Y_{X/O} = 0,68 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, bei Wachstum auf Methanol alleine hingegen zu $Y_{X/O} = 0,30 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Für die Bildung von einem Gramm Biomasse wird also mehr als doppelt soviel Sauerstoff benötigt, wenn Methanol anstelle von effizienter metabolisierten Substraten wie z.B. Glucose eingesetzt wird. Dies liegt darin begründet, daß *Pichia pastoris* die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd ohne Energiegewinn mit dem Enzym Alkoholoxidase katalysiert.

Im Gegensatz zum Methanolstoffwechsel in Hefen verfügen Prokaryonten für den ersten Oxidationsschritt über einen Methanoldehydrogenase. Bei Verwendung einer Dehydrogenase erhöht sich Biomasseselektivität um ca. 50 % gegenüber der Reaktion über Oxidase. Die theoretischen, maximalen Biomasseselektivitäten für Wachstum auf Methanol werden mit $0,41 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ bzw. $0,62 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ angegeben [Bab87].

3.4.5 Wachstum auf Mischsubstraten

Werden in einer ansatzweise geführten Kultur zwei verschiedene Substrate vorgelegt, so werden diese sequentiell metabolisiert und es kommt zu einem diauxischen Wachstumsverlauf. Wie bereits mehrfach, z.B. für die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha* [Egl86], gezeigt werden konnte, verhält es sich ganz anders, wenn mehrere Substrate im Chemostaten gleichzeitig zugefüttert werden. Unter wachstumslimitierenden Bedingungen können in kontinuierlicher Kultur mehrere Substrate parallel metabolisiert werden [Egl82]. Dies gilt auch dann, wenn zu den verschiedenen Substraten ganz unterschiedliche Affinitäten bestehen, wie es z.B. beim System Glucose / Methanol der

Fall ist. So konnte auch gezeigt werden, daß die Aktivitäten der am C1-Stoffwechsel beteiligten Enzyme Alkoholoxidase, Katalase, Formaldehyddehydrogenase und Formiatdehydrogenase sich in Zellen, die auf einer Glucose-Methanol-Mischung gewachsen sind, nicht signifikant von denen in auf Methanol alleine gewachsenen unterscheiden.

Die Metabolisierung der Kohlenstoffquelle erfolgt dabei unabhängig davon, ob es allein oder gleichzeitig mit einem Cosubstrat verstoffwechselt wird. Das bedeutet, daß sich z.B. die Biomasseselektivität für ein bestimmte Substrat nicht ändert, wenn es gleichzeitig mit einem zweiten metabolisiert wird. In einem solchen System ergibt sich also die Gesamtbiomasseselektivität als einfache Summe der Selektivitäten für die einzelnen Substrate im Verhältnis zu ihren Verbrauchsraten $Y_{x/s} = \sum_i \sigma_i \cdot Y_{x/s_i}$ [Egl84].

3.4.6 Mut-Phänotyp und Regulation bei Wachstum auf Methanol

Der erste Oxidationsschritt von Methanol zu Formaldehyd bei Wachstum methylopholer Hefen auf Methanol wird durch das Enzym Alkoholoxidase katalysiert (s.3.4.2). Bei *Pichia pastoris* ist dieses Enzym in Form von zwei identischen Isoenzymen vorhanden, die sich ausschließlich hinsichtlich der Stärke des vorgeschalteten Promotors unterscheiden [Kum94] [Cre89a]. Während in Wildtyp-Stämmen das AOX1-Gen für über 90 % der vorhandenen Alkoholoxidaseaktivität codiert, hat der Promotor des AOX2-Genes eine wesentlich geringere Aktivität. Ansonsten sind die beiden Gene nach heutigem Kenntnisstand funktionell und hinsichtlich ihrer Regulation vollkommen identisch und in der Lage, sich gegenseitig funktionell zu substituieren. Insgesamt kann das Enzym Alkoholoxidase über 30 % des Gesamtproteingehaltes der Zelle ausmachen. Eine physiologische Ursache für das Vorliegen zweier Gene bzw. zweier Isoenzyme ist nicht bekannt. So verfügt z. B. die nahe verwandte und ebenfalls für die Expression heterologer Proteine eingesetzte Hefe *Hansenula polymorpha* über nur eine Kopie des MOX-Genes (Methanoloxidase), welches für das Enzym Alkoholoxidase kodiert [Han96], während in *Pichia methanolica* [Ray99] auch zwei Enzyme aktiv sind.

Für die Regulation der AOX-Promotoren werden zwei Mechanismen postuliert [Ell85] [Tsc87] [Cre89a]: Ein Repressions- / Derepressionsmechanismus und ein zusätzlicher Induktionsmechanismus. Zuckersubstrate wie Glucose aber auch andere Alkohole wie Glycerin oder Ethanol reprimieren den AOX-Promotor vollständig [Ohi94]. Derepression in Abwesenheit aller reprimierenden Kohlenstoffquellen reicht jedoch noch nicht für die Bildung signifikanter Mengen des Enzyms aus, dafür bedarf es der zusätzlichen Induktion durch Methanol. Dieser ungewöhnlich strikte Regulationsmechanismus wird in der gesamten maßgebliche Literatur immer wieder hervorgehoben [Lin00]. Im Gegensatz dazu ist bei der nahe verwandten Hefe *Hansenula polymorpha* eine wesentlich weniger enge Regulation bekannt. Deren MOX-Promotor, der ebenso wie der AOX1-Promotor von *Pichia pastoris* für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt wird, zeigt bereits bei Derepression eine deutliche Aktivität, ohne daß Methanol vor-

handen sein müßte [Egg78].

So wird auch beim Einsatz von *Hansenula polymorpha* als Expressionssystem in der Regel auf den Einsatz von Methanol als Induktor verzichtet [Han96], dennoch werden mit diesem System hohe Expressionsraten erreicht [May99]. Trotz der unterschiedlichen Regulation können AOX und MOX wechselseitig zur Komplementierung von Defektmutanten in *Pichia pastoris* bzw. *Hansenula polymorpha* eingesetzt werden, auch wurde bereits die Expression heterologer Gene in *Hansenula* unter der Kontrolle des *Pichia*-Promotors verwirklicht [Ras96] [Rod96b].

Während bei *Pichia pastoris* faktisch keine Daten über die molekularen Mechanismen der Regulation des Methanolstoffwechsels vorliegen, ist für *Hansenula polymorpha* wenigstens ein Genprodukt bekannt, das an dem Repressions- / Derepressionsmechanismus der Enzyme des C1-Stoffwechsels beteiligt ist [Par98]. Eine rezessive Mutation *glr2-1* bedingt einen pleiotropen Phänotyp, der die Derepression aller wesentlichen Enzyme des Methanolstoffwechsels bei Glucoseüberschuß beinhaltet. Hingegen ist die Repression durch Ethanol von der Mutation nicht betroffen. Wahrscheinlich handelt es sich bei Glr2p um ein durch Glucose induziertes Repressorprotein, das in *trans* die Transkription der betroffenen Strukturgene inhibiert

Die funktionelle Inaktivierung des AOX1-Genes resultiert in einem Phänotyp, dessen Alkoholoxidaseaktivität drastisch reduziert ist. In der Folge können diese Zellen nur wesentlich langsamer auf Methanol wachsen und werden deshalb als Mut^S-Phänotypen (Methanol utalization slow im Unterschied zu Mut⁺-Stämmen, die hinsichtlich der AOX-Aktivität dem Wildtyp entsprechen) bezeichnet, sind aber auch weniger empfindlich gegenüber den toxischen Auswirkungen einer erhöhten Methanolkonzentration. Letzteres ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Primäroxidation des Methanols zum Formaldehyd bei diesen Varianten der geschwindigkeitslimitierende Schritt des Gesamtstoffwechsels ist. Im Gegensatz dazu liegt bei Mut⁺-Stämmen der geschwindigkeitslimitierende Schritt stromabwärts des Formaldehyds, so daß es zur Akkumulation von Formaldehyd kommen kann.

Bei Inaktivierung beider AOX-Gene resultiert ein Phänotyp, der gar nicht mehr in der Lage ist, Methanol zu verwerten und deshalb als Mut⁻ (Methanol utalization negative) bezeichnet werden [Chi97].

3.4.7 Expression heterologer Proteine

Der oben beschriebene AOX1-Promotor bildet die Grundlage des Expressionssystems *Pichia pastoris*, mittlerweile stehen jedoch auch weitere Promotoren zur Verfügung.

Die Konstruktion von Stämmen zur Expression rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* umfaßt drei grundsätzliche Schritte:

1. Die Insertion des Genes für das Zielprodukt in einen geeigneten Expressionsvektor.

2. Die Insertion des Expressionsvektors in das Genom von *Pichia pastoris*.
3. Die Selektion von Transformanten

	Bezeichnung	Ursprungsgen / -enzym	Quellorganismus	Beschreibung
Promotoren	AOX1	Alkoholoxidase 1	<i>Pichia pastoris</i>	Induktion (MeOH)
	GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	<i>Pichia pastoris</i>	konstitutiv
	FLD1	Formaldehyddehydrogenase	<i>Pichia pastoris</i>	Induktion (MeOH, Methylamin)
	PEX8	Peroxisomales Matrixprotein	<i>Pichia pastoris</i>	schwache Induktion (MeOH)
	YPT1	GTPase	<i>Pichia pastoris</i>	schwach, konstitutiv
Sekretionssignale	Pho1	saure Phosphatase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	intrazelluläre Expression
	α -MF	α -pro-pro-Mating Factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	SUC2	Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	PHA-E	<i>P. vulgaris</i> Lektin	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
Selektionsmarker	kein			
	HIS4	Histidinoldehydrogenase		Histidinauxotrophie
	URA3	Uridin-5'-monophosphatsynthase		Uracillauxotrophie
	Zeo ^r	<i>Sh ble</i>		Zeozyminresistenz
	ADE1	Phosphoribosylaminoimidazolsynthetase		Adeninauxotrophie
	ARG4	Argininosuccinatlase		Argininauxotrophie
Akzeptorstämme	G418	<i>Tn903kan^r</i>		G418-Resistenz
	Bezeichnung	Genotyp	Phänotyp	
	X-33	Wildtyp	Wildtyp, Mut ⁺	
	GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ ; Histidinauxotrophie	
	KM71	$\Delta aox1::SARG4 his4 arg4$	Mut [±] ; Histidinauxotrophie	
	SMD1168	$\Delta pep4::URA3 his4 ura3$	Mut [±] ; Histidinauxotrophie; Protease A-negativ	

Tab. 3-1 : Übersicht über gängige Strukturelemente für die Konstruktion integrativer Vektoren zur Expression rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*. Die Auflistung der Akzeptorstämme wurde auf die kommerziell über die Firma Invitrogen erhältlichen Stämme beschränkt.

Für die Konstruktion von Expressionsvektoren steht eine Reihe von verschiedenen Funktionsbausteinen zur Verfügung, die in Tabelle 3-1 zusammenfassend dargestellt sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Aufzählung der Akzeptorstämme auf die Stämme beschränkt, die zur Zeit kommerziell erhältlich sind. Auch sind nicht alle literaturbekannten Akzeptorstämme bereits explizit beschrieben. Gleiches gilt für die noch größere Anzahl der Plasmide, weswegen die Aufzählung auf die einzelnen Strukturelemente eingeschränkt werden mußte. Sämtliche möglichen Kombination dieser Strukturelemente sind als Plasmidkonstrukte existent, stehen aber nicht alle allgemein zur Verfügung. Die sich aus der Verwendung des Plasmides pHIL-S1 und dem Akzeptorstamm GS115 ergebende Kombination von Strukturelementen, wie sie sich in dem Referenzstamm #647 findet (s. 4.1), ist in Tab.3-1 durch Fettdruck hervorgehoben.

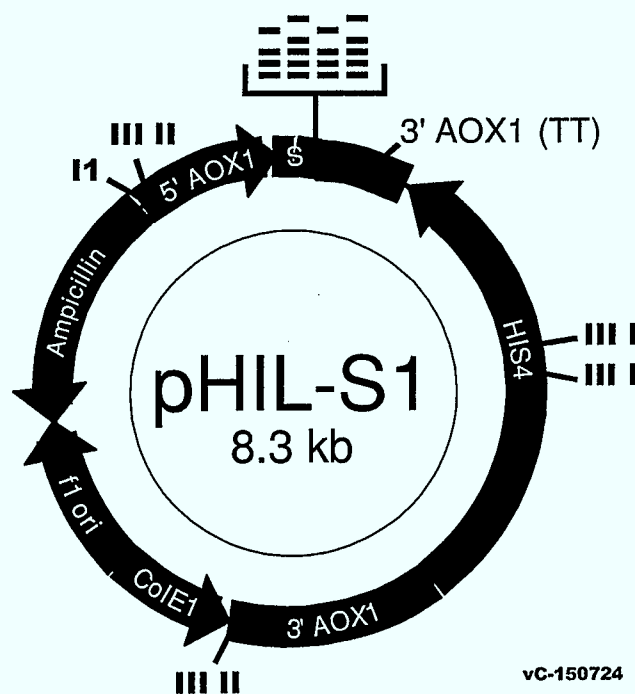
Als Beispiel ist in Abb. 3-4 das 8,3 kb große Plasmid pHIL-S1 dargestellt, das für die Konstruktion der in dieser Arbeit eingesetzten, *AOX1*-basierten Produktionsstämme verwendet wurde [Kla98]. Gemeinsam ist allen Expressionsplasmiden, daß es sich um Shuttlevektoren für die Amplifizierung in *Escherichia coli* handelt, die ein „origin of replication“ für die autonome Replikation enthalten. Weiterhin dient das Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*. pHIL-S1 als typischer *Pichia*-Expressionsvektor enthält weiter die eigentliche Expressionskassette, bestehend aus dem 5' *AOX1*-Promotorfragment, dem PHO1-Sekretionssignal, einer Schnittstelle für verschiedene Restriktionsenzyme (die sog. „multiple cloning site“) und dem 3' *AOX1*-Terminatorfragment. Die multiple cloning site dient zur Insertion des Gens für das Zielprotein, wobei Gen und Vektor mit einem der möglichen Restriktionsenzyme geschnitten werden müssen. Schließlich enthält der Vektor noch das vollständige Gen *HIS4*, welches bei Einsatz eines *his4*-Akzeptorstammes als Selektionsmarker dient und ein Fragment des *AOX1*-Strukturgens als Matrize zur Insertion der Vektorsequenz in das

Hefegenom durch homologe Rekombination.

Nach Linearisierung des Plasmides durch geeignete Restriktionsenzyme erfolgt die Transfektion des gewählten Akzeptorstammes. Die Transfektion erfolgt dabei in der Regel durch Protoplastierung oder durch Elektroporation. Da die Vektoren nicht die für die autonome Replikation in *Pichia pastoris* notwendigen Sequenzen enthalten, entstehen stabile Transformanten nur durch Insertion des linearisierten Vektors in das Genom des Akzeptorstammes.

Comments for pHIL-S1:
8260 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-941
5' AOX1 primer site: bases 856-876
PHO1 secretion signal (S): bases 942-1007
Multiple Cloning Site Region: bases 1006-1026
3' AOX1 primer site: bases 1099-1119
3' AOX1 transcription termination (TT) fragment: bases 1025-1190
HIS4 ORF: bases 4286-1753
3' AOX1 fragment: bases 4641-5397
ColE1 origin: bases 6556-5937
f1 origin of replication: bases 6651-7106
Ampicillin resistance gene: bases 7922-7062



The sequence of pHIL-S1 has been compiled from information in sequence databases, published sequences and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in this sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department at 1-800-955-6288, ext. 2 (U. S.) or +31 (0) 5945-15175 (Europe).

U.S. Headquarters

Tel: 1-800-955-6288
Fax: 1-619-597-6201

European Headquarters

Tel: +31 (0) 5945-15175
Fax: +31 (0) 5945-15312

Abb. 3-4 : Vektorkarte des für die Konstruktion der verwendeten AOX1-Stämme verwendeten Plasmids pHIL-S1. Die Abbildung ist der Internet-Vektordatenbank der Firma Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) entnommen und wurde nicht verändert. Für weitere Erläuterungen wird auf den Text verwiesen.

Durch die Wahl des Restriktionsenzymes für die Linearisierung des Plasmides kann eine Präferenz für den Integrationsort in das Hefegenom vorgegeben werden. So wird das Plasmid durch die Restriktionsenzyme SalI und StuI innerhalb der *HIS4*-Sequenz ge-

schnitten. Dementsprechend erfolgt die Insertion des Vektors in das defekte *his4*-Gen des Akzeptorstammes wobei sich durch Sequenzkomplementierung wieder ein aktives *HIS4*-Gen bildet. Die Histidinauxotrophie des Akzeptorstammes wird dadurch kuriert, Histidinprototrophie dient als Selektionsmarker für Transformanten.

Wird der Vektor hingegen mit Bgl II geschnitten, so gehen die *Coli*-Anteile verloren und es entsteht ein Vektorfragment, das von Fragmenten des *AOX1*-Genes flankiert wird. Dementsprechend ist der wahrscheinlichste Integrationsort eines solchen Fragmentes das *AOX1*-Gen des Wirtes. Dieses wird durch die Insertion unterbrochen und aus diesem Transformationsereignis resultiert ein *Mut^S*-Phänotyp. Die Histidinauxotrophie wird auch in diesem Fall kuriert, da das inserierte Vektorfragment das vollständige *HIS4*-Gen enthält. Eine weitere Möglichkeit, *Mut^S*-Phänotypen zu erhalten, liegt in der Verwendung des *Mut^S*-Akzeptorstammes KM71, bei dem das *aox1*-Gen durch Insertion eines *ARG4*-Genes unter Verwendung einer arginauxotrophen Mutante disruptiert wurde.

Obwohl der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf dem Einsatz von Produktionsstämmen beruht, die das hCTRB-Gen unter Kontrolle dieses *AOX1*-Promotors exprimieren, wurden auch vergleichende Untersuchungen mit dem GAP-Promotor angestellt. Dieser reguliert im Ursprungsgen die Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase. Der Promotor aus der Glycolyse bewirkt eine konstitutive Expression des nachgeschalteten Gens, diese ist bei Wachstum auf Glucose maximal [Wat97]. Davon abgesehen, daß der *Mut*-Phänotyp bei Verzicht auf Methanol als Substrat keine Bedeutung hat, können pGAP-basierte Vektoren in exakt der gleichen Weise wie die beschriebenen pAOX1-basierten Vektoren eingesetzt werden.

In manchen Fällen läßt sich, unabhängig von der Promotorwahl, die Produktivität steigern, indem Mehrfach-Transformanten zum Einsatz kommen. Für die Generierung solcher Transformanten gibt es verschiedene Möglichkeiten: Bei der Verwendung der geschilderten Transformationsverfahren kommt es mit einer geringen Häufigkeit zu Mehrfachinsertionen bei einer Zelle. Derartige Mehrfachinsertionen können durch Verwendung quantitativer Selektionsmarker wie z.B. dem *Tn903kan'*-Gen, das Resistenz gegen das Antibiotikum G418 vermittelt, gefunden werden [Sco93]. Da zwischen dem maximalen Toleranzlevel der Transformanten und der Gendosis von *Tn903kan'* ein proportionaler Zusammenhang besteht, können durch Selektion mit steigender G418-Konzentration gezielt Mehrfachtransformanten selektiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, in einen Expressionsvektor direkt mehrere Kopien eines Produktgens als tandem-repeat einzubauen [Cla91], diese werden dann durch ein einziges Transformationsereignis in das Hefegenom integriert. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit, unter Verwendung von Stämmen mit multiplen Auxotrophien Supertransformanten herzustellen. Hier werden bereits erfolgreich transformierte Stämme unter Verwendung alternativer Selektionsmarker ein weiteres Mal transformiert. Mit dieser Methode lassen sich auch Stämme gewinnen, die mehrere Gene simultan exprimieren

[Pay97].

Die Verwendung von Mehrfachtransformanten führt jedoch nicht immer zu einer erhöhten Produktbildung, es kann genauso auch zu einem negativen Effekt kommen [Cre93]. Untersuchungen mit *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, daß es ein optimale Expressionslevel für jedes individuelle Gen gibt [Wit94]. Wird dieses Level überschritten, kann es einer Überlastung des Expressionsapparates der Zelle kommen [Par95], wobei sich unkorrekt gefaltete Proteine im Endoplasmatischen Reticulum anreichern und morphologische Veränderungen in der Zelle hervorrufen können [Ume97].

3.5 Prozeßführung in Bioreaktoren

Wenn die Biotechnologie die technische Nutzung biologischer Systeme ist, so ist als Bioreaktor im Wortsinne jedes Gerät zu betrachten, mit dessen Hilfe ein biologisches System „gezähmt“ [Mos81] werden, also der Kontrolle des Experimentators unterworfen werden kann. Diese Anforderungen erfüllen einfachste Geräte zur Oberflächen- oder Submerskultivierung im mikrobiologischen Labor (Petrischalen bzw. Schüttelkolben) ebenso wie große Submersfermenter im Industriemaßstab oder eine Kläranlage.

Um der Fülle der durch die oben genannte Definition erfaßten Anlagen Herr zu werden, wurden mehrere Möglichkeiten zur Einteilung dieser Anlagen nach den verschiedenen Kriterien vorgeschlagen. MOSER [Mos81] schlägt für die prozeßtechnische Systematisierung von Bioreaktoren die folgenden Kriterien vor:

- Geometrie, d.h. Verteilung der katalytischen Masse im Reaktorraum z.B. heterogen als Flocke oder als Film, bei Einbeziehung von Enzymen als biologisches System auch homogen in Lösung
- Operationsweise des Reaktors: diskontinuierlich, kontinuierlich, semi-kontinuierlich
- „Mischungszustand“ des Bioreaktors, hier kann zwischen den beiden Extremfällen „idealer Rührkesselreaktor“ (maximal gemischt) und „idealer Rohrströmungsreaktor“ (total segregiert) unterschieden werden. Reale Reaktoren werden als Annäherung an diese beiden Grenzfälle betrachtet.

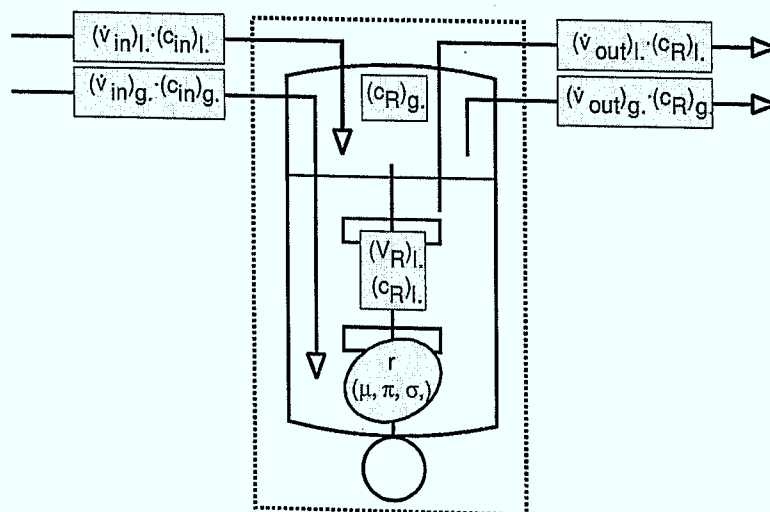


Abb. 3-5 : Bilanzschema eines idealen Rührkesselreaktors. Die Bilanzgrenze ist als gepunktete Linie eingezeichnet.

Weiterhin kann die Einteilung von Bioreaktoren z.B. nach Einsatzzweck, Gaseintrag, Einrichtungen zur Durchmischung oder Umwälzung oder dem Phasenzustand des Hauptsubstrates erfolgen. Ein weitere, grundlegende Unterscheidung muß zwischen Oberflächenverfahren und Submersverfahren gemacht werden.

Als Standardreaktor kann heute der belüftete Rührkesselreaktor zur Submersfermentati-

on bezeichnet werden, der, mit verschiedenen Rührwerken oder Einbauten zur Strömungsleitung ausgestattet, allgemein einsetzbar ist. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich dieser Reaktortyp eingesetzt wurde, sind die Betrachtungen im folgenden Teil auf diesen Typus beschränkt.

Die wesentliche Operation bei der Untersuchung einer biologischen Reaktion ist die Stoffbilanz. Auf der Basis des Konzeptes des ideal durchmischten Rührkesselreaktors kann dazu folgende Betrachtung angestellt werden:

Die Masseänderung eines bestimmten Reaktanden innerhalb der Bilanzgrenzen ist die Summe der Masseänderungen aus dem Zustrom des Reaktanden, dem Abfluß des Reaktanden und der Masseänderung durch die biologische Reaktion.

In mathematischer Form ergibt sich aus dieser Betrachtung die allgemeine Bilanzgleichung [Mos81] für alle ideal durchmischten Rührkesselreaktoren (Gleichung 3.3). Der ideal durchmischte Zustand des Reaktors drückt sich in der Gleichsetzung von c_R und c_{out} aus.

$$\frac{d(V \cdot c_R)}{dt} = \dot{v}_{in} \cdot c_{in} - \dot{v}_{out} \cdot c_R \pm r_i \cdot V \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Diese allgemeine Bilanzgleichung läßt sich anhand der durch die Prozeßführung gegebenen Randbedingungen anpassen. Durch Auflösung der Bilanzgleichung nach r_i lassen sich anhand der gemessenen Konzentrationen, Volumina und Massenströme alle Reaktionsraten berechnen.

3.5.1 Diskontinuierliche Prozeßführung

Im einfachsten Fall der Prozeßführung, dem ansatzweisen oder batch-Verfahren, werden alle flüssigen und festen Substrate im Fermenter vorgelegt und inokuliert. Die Fermentation dauert an, bis mindestens ein Substrat limitierend wird. Somit gelten im ansatzweisen Verfahren für die Flüssigphase die folgenden Randbedingungen

$$\begin{aligned} V &= const. \\ \dot{v}_{in} &= \dot{v}_{out} = 0 \\ c_R &= f(t) \end{aligned}$$

Für diesen Fall reduziert sich die Bilanzgleichung zu der Form:

$$\frac{dc_R}{dt} = \pm r_i \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Soll die Fermentation weitergeführt werden, wird das Zulaufverfahren oder fed-batch-Verfahren eingesetzt. Hier wird das limitierende Substrat nachdosiert. Diese Dosierung kann unter Einsatz einer on-line Substratmessung geregelt werden (nutristatische Prozeßführung), häufiger wird jedoch eine Steuerung eingesetzt. Diese kann z.B. auf Erfahrungswerten aus vorhergegangenen Fermentationen, auf zeitnah gewonnenen offline-

Analysedaten oder auf einem Prozeßmodell unter Einbeziehung einer Hilfsgröße beruhen (Auxostat). Für das Zulaufverfahren gelten als Randbedingungen:

$$V = f(t)$$

$$\dot{v}_{in} = f(t)$$

$$\dot{v}_{out} = 0$$

$$c_R = f(t)$$

Daraus resultiert die Bilanzgleichung in der Form:

$$\frac{d(V \cdot c_R)}{dt} = \dot{v}_{in} \cdot c_{in} \pm r_i \cdot V$$

Gleichung 3.5

3.5.2 Kontinuierliche Prozeßführung

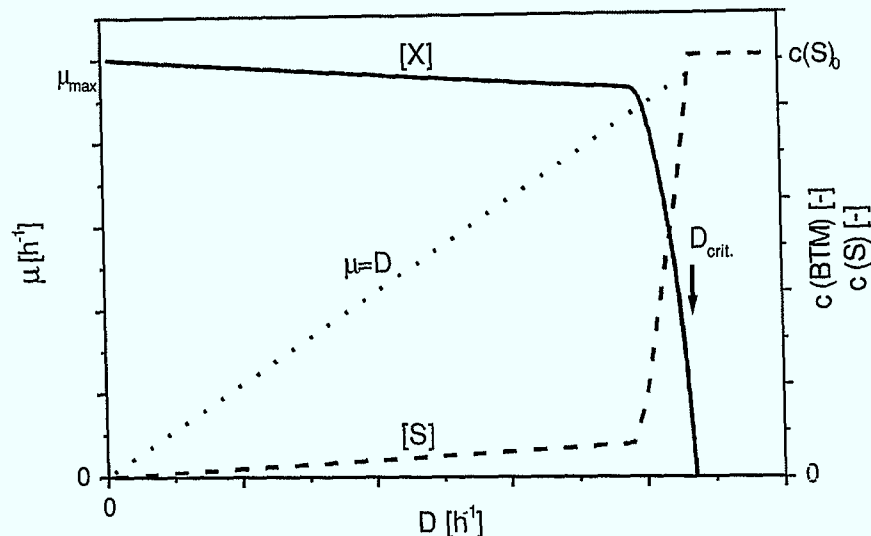


Abb. 3-6 : Idealisiertes X/D-Diagramm zur kontinuierlichen Prozeßführung. Dargestellt sind die Biomassekonzentration $[X]$ (durchgezogene Linie), die Substratkonzentration $[S]$ (Striche) und die Wachstumsrate μ (Punkte) in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate D . Der Pfeil zeigt die kritische Durchflußrate an, bei der die Zellen vollständig aus dem System ausgewaschen werden. Die Substratkonzentration entspricht dann der Zulaufkonzentration. In der Darstellung wurde der Maintainanceanteil vernachlässigt.

Eine weitere Möglichkeit der Prozeßführung ist die kontinuierliche Fermentation. Hier wird ein konstanter Massestrom des Fermentationsmediums, das alle notwendigen Komponenten enthalten muß, in den Fermenter geführt. Gleichzeitig wird ein entsprechender Massestrom aus dem Fermenter abgezogen, so daß das Reaktionsvolumen konstant bleibt. Dies kann durch eine Gewichts- oder Niveauregulierung sichergestellt werden. Unter diesen Bedingungen stellt sich bezüglich aller Konzentrationen im Fermentationsmedium ein Fließgleichgewicht („steady state“) ein, in dem z.B. die Biomasse mit der gleichen Geschwindigkeit nachwächst, wie sie aus dem Fermenter ausgewaschen

wird. Bedingung dafür ist, daß die Verdünnungsrate $D = \frac{\dot{v}_{in}}{V}$ kleiner als die maximale Wachstumsrate unter den gegebenen Bedingungen bleibt. Die der maximalen Wachstumsrate μ_{max} entsprechende Verdünnungsrate wird als kritische Verdünnungsrate $D_{crit.}$

bezeichnet (Abb. 3-6 [Mos81]). Verschiedene Strategien können eingesetzt werden, um ein solches Fließgleichgewicht zu erreichen. Im einfachsten Fall, dem Chemostat, wird die Verdünnungsrate vorgegeben. Die Konzentrationen aller Reaktanden ergeben sich aus der Verdünnungsrate. Beim Nutristat wird die Durchflußrate als Funktion einer vorgegebenen Substratkonzentration geregelt. Mittels dieses Verfahrens lassen sich auch Substratkonzentrationen einstellen, die oberhalb des Wachstumsoptimums liegen, was im Chemostaten prinzipiell unmöglich ist. Im Turbidostat schließlich wird die Biomassekonzentration über die Durchflußrate geregelt. Dieses Verfahren ist besonders dazu geeignet, D an $D_{crit.}$ heranzuführen, in diesem Bereich ist die Regelgröße Trübung sehr sensitiv.

Unabhängig davon, welcher dieser Ansätze verfolgt wird, gelten für die homogen-einstufige kontinuierliche Fermentation im Fließgleichgewicht die folgenden Bedingungen:

$$D = \mu = const.$$

$$\mu_{max.} = D_{crit.}$$

$$D \leq D_{crit.}$$

$$\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out}$$

$$V = const.$$

$$\frac{dc}{dt} = 0$$

Unter Einbeziehung dieser Randbedingungen stellt sich die Bilanzgleichung wie folgt dar:

$$0 = D(c_{in} - c_R) \pm r_i \quad \text{Gleichung 3.6}$$

4 Material und Methoden

4.1 Produktionsstämme

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden die folgenden, von der Fa. Mucos-Pharma zur Verfügung gestellten Produktionsstämme von *Pichia pastoris* eingesetzt. Soweit nicht ausdrücklich angegeben, wurde für die Untersuchungen der Stamm #647 eingesetzt.

Die gentechnischen Arbeiten zur Stammentwicklung wurden ausschließlich durch die Fa. Mucos-Pharma durchgeführt und sind im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert beschrieben.

<u>Nr. des Klons</u>	<u>Kommentar</u>
#647	Referenzstamm (pAOX1), basierend auf dem Akzeptorstamm GS115, wurde für die gesamte Prozeßentwicklung mit Methanol als Substrat oder Cosubstrat eingesetzt, Sekretionssequenz der sauren Phosphatase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
#661	Genotypisch und phänotypisch identisch zu #647, wurde in fed-batch Fermentation getestet.
#663	Genotypisch und phänotypisch identisch zu #647, wurde in fed-batch Fermentation getestet .
#769	Mut ^s -Stamm (pAOX1) basierend auf dem Akzeptorstamm KM71, wurde in fed-batch Fermentation getestet, Sekretionssequenz der sauren Phosphatase aus <i>S. cerevisiae</i>
#769C46	Dieser Stamm wurde als Abkömmling des Stammes #769 aus einer kontinuierlichen Fermentation isoliert. Die Mutante zeichnet sich durch eine gegenüber dem Mut ^s -Stamm noch weiter reduzierte Methanolverbrauchsrate aus.
#774	leer transformierter Klon (Mut ⁺) ohne Produktgen, wurde für vergleichende Untersuchungen zur Identifizierung von Proteinkontaminationen im fed-batch Verfahren eingesetzt
#778	Klon mit hCTRB-Gen unter Kontrolle des GAP-Promotors, wurde für die Entwicklung des fed-batch Verfahrens mit Glucose eingesetzt, Sekretionssequenz der sauren Phosphatase aus <i>S. cerevisiae</i>
#779	Phänotypisch identisch mit #778, wurde in fed-batch Fermentation mit Glucose getestet
#787	proteasedefizienter Stamm (pep ⁻) (pAOX1), wurde im fed-batch Verfahren mit Methanol im Rahmen der Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität untersucht, Sekretionssequenz der sauren Phosphatase aus <i>S. cerevisiae</i>

#885 Klon (pAOX1) mit dem hCTRB-Gen als vierfach-repeat, wurde für die Untersuchungen zur Derepression des AOX1-Promotors eingesetzt, Sekretionssequenz der Invertase aus *S. cerevisiae*.

#1012 Stamm (pAOX1) mit optimierter codon-usage für das hCTRB-Gen, Sekretionssequenz der Glucoamylase aus *S. cerevisiae*.

Weiterhin wurde für Untersuchungen vor Beginn der gentechnischen Arbeiten der Stamm *Pichia pastoris* ATCC2848 (DSMZ) eingesetzt.

4.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle eingesetzten Chemikalien und Reagenzien von der Firma Merck in der Reinheit p.A. oder „reinst“, komplexe Medienbestandteile in der Qualitätsstufe „für die Mikrobiologie“ bezogen.

<u>Chemikalien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AHMT (Purbald)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Alkaline Phosphatase Conjugated Affinity	
Purified anti-Rabbit IgG [H&L] [Goat]	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Azocasein	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
BCA-Protein Assay	Pierce, Rockford IL, USA
Hefeextrakt, granuliert	Merck
IgG fraction of anti-Alcohol Dehydrogenase	
[Yeast] [Rabbit]	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Merck
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
Trypsin (porc.)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Difco

4.3 Fermentationsmedien und Hilfsstoffe

4.3.1 YEP-Agar

Hefeextrakt	10,0 g·l ⁻¹
Pepton aus Casein	20,0 g·l ⁻¹
Agar	25,0 g·l ⁻¹

Alle Komponenten wurden gemeinsam autoklaviert und in Portionen von ca. 20 ml in sterile Polystyrol-Petrischalen gegossen. Der erstarrte Agar wurde bis zum Einsatz bei 4 – 8 °C aufbewahrt.

4.3.2 YNB-Agar

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	6,7 g·l ⁻¹
Agar	25,0 g·l ⁻¹

Der Agar wurde in 90 % des Endvolumens autoklaviert. In die noch flüssige Agarlösung wurde unmittelbar vor dem Gießen der Platten die 10-fach konzentriert gelöste Yeast Nitrogen Base über ein Sterilfilter zugegeben. Der Agar wurde in Portionen von ca. 20 ml in sterile Polystyrol-Petrischalen gegossen und bis zum Einsatz bei 4 – 8 °C aufbewahrt.

4.3.3 Medium 1. Vorkultur (YEP-D)

Hefeextrakt	10,0 g·l ⁻¹
Pepton aus Casein	20,0 g·l ⁻¹
Glucose·H ₂ O	21,8 g·l ⁻¹ (=20,0 g·l ⁻¹ Glucose)

Glucose und Komplexbestandteile wurden separat autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

4.3.4 Medium 2. Vorkultur

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	13,4 g·l ⁻¹
Glycerin	20,0 ml·l ⁻¹
Biotinstammlösung	2,5 ml·l ⁻¹

Die Bestandteile wurden gemeinsam gelöst und sterilfiltriert.

4.3.5 Anzuchtmedium für Schüttelkolbenexpression [Kla98]

Pepton aus Casein	20,0 g·l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	6,7 g·l ⁻¹

Glycerin	10,0 g·l ⁻¹
Biotinstammlösung	2,0 ml·l ⁻¹

Das Medium wurde autoklaviert, das Biotin wurde über ein Sterilfilter in das abgekühlte Medium zugegeben.

4.3.6 Induktionsmedium für Schüttelkolbenexpression [Kla98]

MES	2,0 g·l ⁻¹
Pepton aus Casein	16,0 g·l ⁻¹
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	10,0 g·l ⁻¹
Biotinstammlösung	2,0 ml·l ⁻¹
Methanol	5,0 ml·l ⁻¹

Das Medium wurde autoklaviert, Methanol und Biotin wurden über ein Sterilfilter in das abgekühlte Medium gegeben.

4.3.7 Vorlagemedium (BSM) [Cla91a]

H ₃ PO ₄	26,0 ml·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,6 g·l ⁻¹
K ₂ SO ₄	18,0 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,0 g·l ⁻¹
KOH	4,0 g·l ⁻¹
Glycerin	20 ml·l ⁻¹
Spurenlösung A	8,0 ml·l ⁻¹
Biotinlösung	8,0 ml·l ⁻¹
Antischaummittel	1,0 ml·l ⁻¹

Das Medium wurde ohne Biotin und Spurensalze im Fermenter autoklaviert, diese wurden anschließend über Sterilfilter in das abgekühlte Medium gegeben.

4.3.8 Glycerin-Zulaufmedium (fed-batch)

Glycerin	500 ml·l ⁻¹
Spurenlösung A	10,0 ml·l ⁻¹
Biotinstammlösung	10,0 ml·l ⁻¹

Das Medium wurde ohne Biotin und Spurensalze autoklaviert, diese wurden anschließend über Sterilfilter in das abgekühlte Medium gegeben.

4.3.9 Methanol-Zulaufmedium (fed-batch)

Spurenlösung A	10 ml·l ⁻¹
Biotinstammlösung	10 ml·l ⁻¹
	in Methanol

Das Methanolmedium wurde als autosteril angenommen.

4.3.10 Glucose-Zulaufmedium

Glucose·H ₂ O	544 g·l ⁻¹ (= 500 g·l ⁻¹ Glucose)
Spurenlösung A	10,0 ml·l ⁻¹
Biotinstammlösung	10,0 ml·l ⁻¹

4.3.11 Zulaufmedium für kontinuierliche Fermentation

H ₃ PO ₄	8,65 ml·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g·l ⁻¹
K ₂ SO ₄	6,0 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,67 g·l ⁻¹
KOH	1,35 g·l ⁻¹
NH ₄ OH, 25 %	6,0 ml·l ⁻¹
Spurenlösung A	2,7 ml·l ⁻¹
Biotinstammlösung	5,4·10 ⁻³ g·l ⁻¹
Antischaummittel	1,0 ml·l ⁻¹

Zu diesem Grundmedium wurde Glycerin, Glucose und / oder Methanol in den für die einzelnen Versuche jeweils angegebenen Konzentrationen zugegeben. Das Medium wurde durch Filtration sterilisiert, wobei die methanolische und die wäßrige Fraktion separat sterilfiltriert werden mußten. Das Antischaummittel wurde entweder in dem Methanol gelöst filtriert oder separat autoklaviert.

4.3.12 Spurenelemente-Stammlösung

H ₂ SO ₄	5,0 ml·l ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6,0 g·l ⁻¹
KI	0,08 g·l ⁻¹
MnSO ₄ ·H ₂ O	3,0 g·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄	0,2 g·l ⁻¹

H_3BO_3	$0,02 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
CoCl_2	$0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
ZnCl_2	$20,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$65,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

4.3.13 Biotinstammlösung

Biotin $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

NaOH zur vollständigen Lösung des Biotins.

4.3.14 Antischaummittel

Sigma AF 289

4.3.15 pH-Korrekturmittel

NH_4OH 25 %

4.4 Aufbau und Durchführung der Fermentationsversuche

4.4.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden Glycerin-Kryokulturen angelegt. Dazu wurden 100 ml einer Kultur entsprechend der unten beschriebenen ersten Vorkulturstufe mit 50 ml sterilem Glycerin vermischt, zu 1,5 ml in Nalgene-Kryoröhrchen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.4.2 1. Vorkultur

Die erste Vorkulturstufe wurde in 1 l-Schüttelkolben mit Schikanen und jeweils 100 ml des oben beschriebenen YEP-D durchgeführt. Das Medium wurde mit 1,5 ml Kryokultur inokuliert und für 18 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm im Schüttelinkubator kultiviert.

4.4.3 2. Vorkultur

Die zweite Vorkulturstufe wurde unter den gleichen Bedingungen wie die erste durchgeführt. In einem 1 l-Schikaneschüttelkolben wurden 175 ml des beschriebenen Mediums für die zweite Vorkulturstufe mit 10 ml der ersten Vorkultur inokuliert. Nach 8 h Inkubationszeit wurde mit dieser Kultur die nächste Kultivierungsstufe angeimpft.

4.4.4 3. Vorkultur

Soweit eine dritte Vorkulturstufe benötigt wurde, wurde diese im Rührkesselbioreaktor durchgeführt und entsprach vollständig der unten beschriebenen batch-Phase für das Zulaufverfahren (s. 4.4.7)

4.4.5 Proteinexpression im Schüttelkolben (P_{AOX1})

Die Proteinexpression im Schüttelkolben folgte einem zweistufigen Protokoll, wobei in der ersten unter nicht-induzierenden Bedingungen die Biomasse generiert wurde. In der zweiten Stufe wurde dann die Proteinbildung induziert, eine signifikante Biomassebildung fand hier nicht mehr statt.

Das gesamte Verfahren wurde in schikanierten 1 l-Schüttelkolben mit einem Inhalt von 100 ml oder in 100 ml-Schüttelkolben mit einem Inhalt von 10 ml Medium durchgeführt. Die Kolben wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Biomasseanzucht

Für die Biomasseanzucht wurde zunächst jeweils ein Kolben mit dem beschriebenen Anzuchtmedium mit einer Kryokultur inokuliert. Nach 21 h wurde aus dieser Vorkulturstufe mit jeweils 10 % die benötigte Anzahl von Schüttelkolben mit Anzuchtmedium überimpft und für 18 h inkubiert.

Induktion

Zur Induktion des AOX1-Promotors wurden die auf Glycerin gewachsenen Zellen abzentrifugiert und in der gleichen Menge des Induktionsmediums wieder aufgenommen. Jeweils nach 24 h und 48 h wurde $5,0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ Methanol in die Kultur nachdosiert.

4.4.6 Fermentersysteme

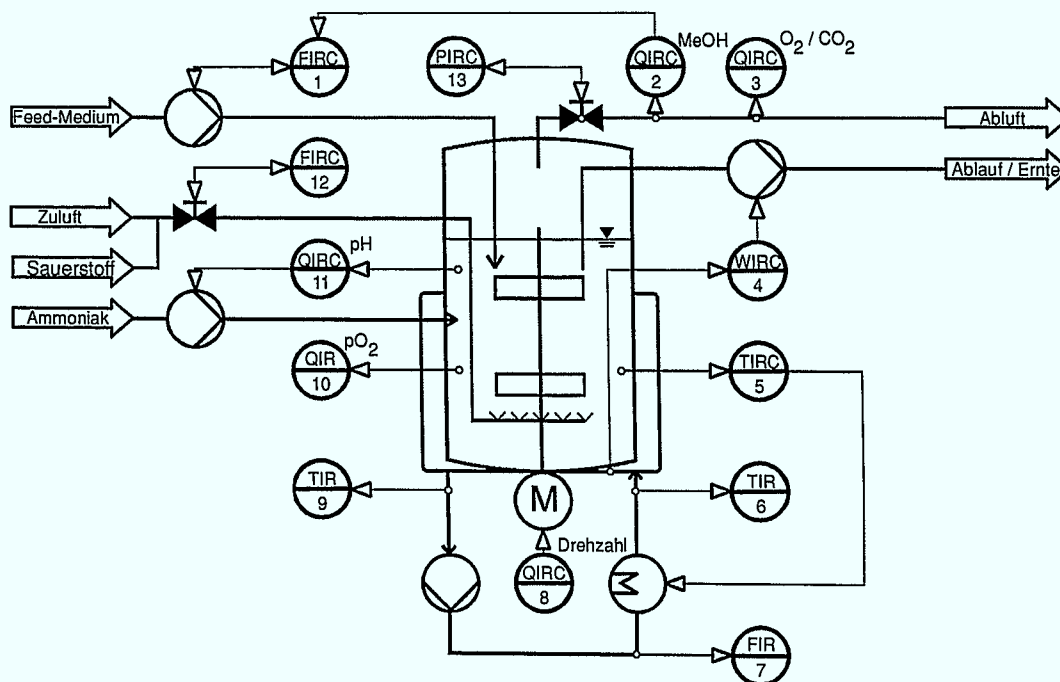


Abb. 4-1 : Darstellung des allgemeinen Prozeßschemas für Fermentationen im Rührkesselreaktor. Die einzelnen MSR-Stellen sind im Folgenden aufgelistet. Welche MSR-Stellen bei den individuellen Versuchsaufbauten verwirklicht wurden, ist im Text detailliert beschrieben.

FIRC1	Flußregelung Zulaufmedium	QIRC8	Drehzahlregelung Rührer
QIRC2	Regelung Methanolkonz.	TIR9	Temp. Doppelmantelablauf
QIRC3	Abgasanalytik O_2 / CO_2	QIR10	pO_2 -Messung
WIRC4	Gewichtsregelung	QIRC11	pH-Regelung
TIRC5	Temperaturregelung	FIRC12	Zuluftregelung
TIR6	Temp. Doppelmantelzulauf	PIRC13	Druckregelung
FIR7	Flußmessung Kühlkreislauf		

Für die einzelnen Versuche wurden verschiedene Rührkesselfermenter eingesetzt, die alle dem in Abb. 4-1 aufgezeigten Prozeßschema entsprachen. Individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Systemen sind im Folgenden dargestellt. Alle Fermenter waren mit jeweils 2 6-Blatt Scheibenrührern (Rushton-Impeller) ausgestattet.

- Für die Fermentationen im Zulaufverfahren wurde ein fest verrohrter Techni-kumsfermenter der Firma Chemap, Volketsvil, Ch, mit einem Totalvolumen von 30 l eingesetzt. Die Ausstattung des Gerätes entsprach dem Schaubild (Abb. 4-1) ohne die MSR-Einheiten 6, 7 und 9 (Thermobilanzierung). Ebenfalls in Abwei-chung von der Darstellung wurde die pH-Regelung nicht über eine Pumpe als Stellglied sondern über ein Membranventil in Verbindung mit einem drucküber-lagerten Vorratstank verwirklicht. Über einen zusätzlichen Regelkreis konnte die Gelöstsauerstoffkonzentration durch automatische Anreicherung der Zuluft mit

Reinsauerstoff geregelt werden. Die MSR-Stelle 4 (Gewichtsregelung) wurde auch im Zulaufverfahren eingesetzt, da bei einigen Versuchen zum Ende der Fermentation hin das maximale Arbeitsvolumen von 22 l ansonsten überschritten worden wäre.

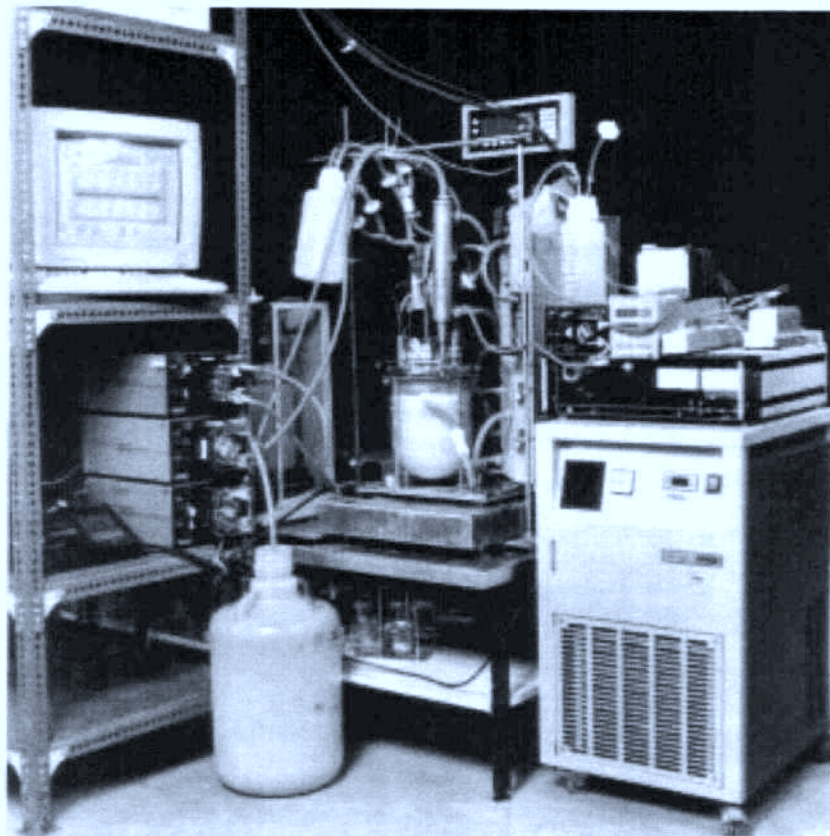


Abb. 4-2 : Photographie des Labfors-Bioreaktors als Beispiel für das in Abb. 4-1 dargestellte, allgemeine Prozeßschema

- Für die Maßstabsvergrößerung der Fermentation im Zulaufverfahren wurde ein dem oben beschriebenen 30 l-Fermenter baugleicher und geometrisch ähnlicher 300 l-Pilotfermenter des gleichen Herstellers eingesetzt. Aufgrund der Größe des Reaktors konnte die pO_2 -Regelung durch Beimischung von Reinsauerstoff hier nicht verwirklicht werden
- Für kontinuierliche Fermentationen wurde ein Rührkesselbioreaktor vom Typ CF3000 (ebenfalls Chemap, Volketsvil, Ch) mit 7 l Totalvolumen eingesetzt. Das Arbeitsvolumen für kontinuierliche Fermentation in diesem Reaktor betrug 4,0 l
- Ebenfalls für kontinuierliche Fermentationen wurde Glas-Laborfermenter vom Typ „Labfors“ (Infors AG, Bottmingen, Ch) mit einem Totalvolumen von 3,7 l (Arbeitsvolumen 2,0 l) eingesetzt. Die Ausstattung des Gerätes (Abb. 4-2) entspricht dem Schaubild (Abb. 4-1) ohne die MSR-Einheiten 6, 7, 9 (Thermobilanzierung) und 13 (Drucküberlagerung Fermenter). Die Zuluft wurde nicht, wie im Schaubild angegeben, mit Flußmessung automatisch geregelt sondern manuell über einen Schwebekörperdurchflußmesser und ein Nadelventil gesteuert. Im

Gegensatz zu allen anderen eingesetzten Rührkesselfermentern, die sämtlich für in-situ Sterilisation ausgerüstet waren, wurden hier Gefäß und die gesamte Peripherie im Autoklaven sterilisiert

- Ebenfalls für kontinuierliche Fermentationen wurde ein Technikumsfermenter vom Typ ISF 200 (Infors AG, Bottmingen, Ch) mit einem Totalvolumen von 7,5 l eingesetzt. Das Arbeitsvolumen im kontinuierlichen Betrieb betrug 4,0 l. Die Ausstattung des Gerätes entsprach dem Schaubild (Abb. 4-1) ohne die MSR-Einheiten 6, 7 und 9.

Zur präzisen Regelung der Substratvolumenströme wurden für alle Anlagen Dosierstrecken vom Typ YFC 01Z der Firma Sartorius, Göttingen, in Verbindung mit Schlauchpumpen der Firma Watson-Marlow, Falmouth, GB, eingesetzt. Mittels dieser Geräte wird eine Pumpe über ein 4-20 mA Signal so gesteuert, daß ein vorgegebener Volumenstrom eingehalten wird. Die Rückkopplung erfolgt über eine Waage, die kontinuierlich die Masse des Vorlagegefäßes überwacht. Unterschreitet das Vorlagegefäß ein vorgegebenes Minimalgewicht, wird es über eine zweite Schlauchpumpe automatisch nachgefüllt.

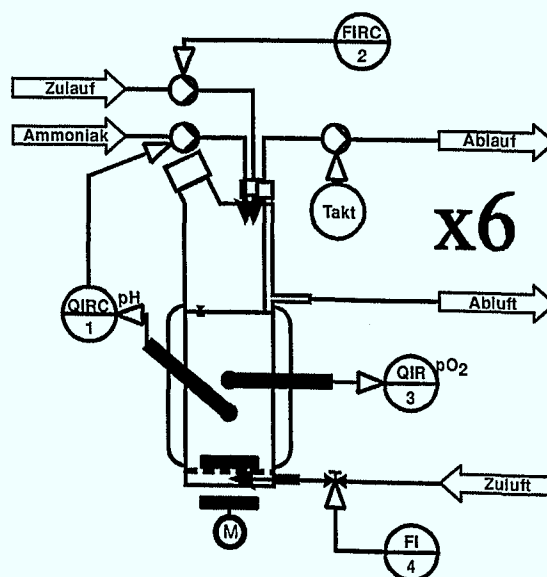


Abb. 4-3 : Darstellung des allgemeinen Prozeßschemas für eine Einheit der Parallelfermentationsanlage. Die vollständige Anlage umfaßte sechs Einheiten.

QIRC1 pH-Regelung
FIR2 Medienzulauf.

QIR3 pO₂-Messung
FI4 Zuluft

- Eine Anlage von sechs parallelen Kleinreaktionsgefäßen (Blasensäulen / gerührte Blasensäulen) wurde für verschieden Reihenuntersuchungen eingesetzt (Abb. 4-3, Abb. 4-4), die Anlage wurde sowohl für Fermentationen im Zulaufverfahren als auch für kontinuierlich geführte Prozesse eingesetzt. Zur Deckung des Sauerstoffbedarfes der Zellen konnte bei dieser Anlage der Zuluft manuell Sauerstoff beigemischt werden.

Für den kontinuierlichen Betrieb wurde die Mediendosierung wie bereits oben beschrieben mittels Dosierstrecke und Schlauchpumpe verwirklicht, wobei ein Kassetten-

Mehrfachpumpenkopf mit sechs (max. acht) Pumpenschläuchen eingesetzt wurde. Für das vereinfachte Zulaufverfahren wurden einzelne, vorkalibrierte Schlauchpumpen für jedes Reaktionsgefäß eingesetzt.



Abb. 4-4 : Photographie der Parallelermentationsanlage, wie sie z.B. zum Cosubstratscreening in kontinuierlicher Fermentation eingesetzt wurde.

4.4.7 Fermentation im Zulaufverfahren mit Methanol als Substrat

Dieses Verfahren für die Fermentation von Produktionsstämmen, bei denen das Produktgen unter Kontrolle des AOX1-Promotors aus *P. pastoris* steht, gliederte sich in drei unterschiedliche Phasen, wobei in der dritten Phase, der Produktionsphase, als einziges Substrat Methanol eingesetzt wurde. In den dieser vorhergehenden Wachstumsphasen, die im Wesentlichen der Biomassebildung dienen, wurde Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet. Die Angabe eines bestimmten Substrates für eine der zur Anwendung kommenden Prozeßvarianten bezieht sich wie hier immer nur auf die Produktionsphase.

Nach Einbau aller Elektroden wurde der Fermenter mit 10 l des unter 4.3.7 angegebenen Vorlagemediums sterilisiert. Die automatische Sterilisation des Fermenters sowie der fest verrohrten Peripherie wurde dabei durch die speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) des Fermentersystems gesteuert.

Das auf die Fermentationstemperatur von 25 °C abgekühlte Medium wurde zunächst auf den für den individuellen Versuch festgelegten pH-Wert titriert, dann erfolgte die

Zugabe von Biotin und Spurenelementen. Zum Start der Fermentation wurde das Medium mit 1,75 l zweiter Vorkultur nach 4.4.3 inokuliert. Diese erste Phase der Fermentation, im Folgenden Wachstumsphase genannt, dauerte bis zum vollständigen Verbrauch der vorgelegten Kohlenstoffquelle an. Das Ende der Wachstumsphase wurde durch den plötzlichen und starken Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration angezeigt. Der Ablauf bis zu diesem Punkt war für alle Fermentationsansätze, unabhängig von Produktionssubstrat und Prozeßführung gleich.

In der zweiten Phase der Fermentation, der Derepressionsphase, wurde ein wachstums-limitierender Substratzulauf mit Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle angelegt. Nach Verbrauch des vorgelegten Substrates wurde für 4 h mit einer Dosierate von $220 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ das unter 4.3.8 beschriebene Glycerin-Zulaufmedium in den Fermenter dosiert.

Nach Ende dieses Zeitraumes wurde durch die Zugabe von Methanol die Kultur induziert und die Produktionsphase eingeleitet. Dabei wurde die Dosierate des Methanolmediums (4.3.9) entweder unter Verwendung der sog. „oxygen-peak“-Methode manuell gesteuert oder im geschlossenen Regelkreis nutristatisch geregelt.

Die „oxygen-peak“-Methode beruht darauf, daß bei Wachstum unter substratlimitierten Bedingungen eine Unterbrechung der Substratversorgung innerhalb weniger Sekunden zu einem drastischen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration führt. Umgekehrt verursacht eine Erhöhung der Substratzufuhr einen sofortigen Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate und somit ein Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration. Unter Zuhilfenahme dieser Zustandsaussagen kann der Experimentator schrittweise die Dosierate steigern. Die Verwendung dieser Methode resultiert in einer streng substratlimitierten Prozeßführung.

Im Verlauf der Fermentation wurden Druck, Rührerdrehzahl und Begasungsrate manuell so angepaßt, das die Gelöstsauerstoffkonzentration zu keiner Zeit unter 30 % Luft-sättigung sank.

4.4.8 nutristatische Prozeßführung im Zulaufverfahren mit Methanol

Alternativ zu der beschriebenen, substratlimitierten Prozeßführung wurde durch den Einsatz einer online-Methanolanalytik (4.5.5) eine nutristatische geführte Fermentation ohne Substratlimitierung verwirklicht. Die nutristatische Substratregelung diente dabei gleichermaßen dem Zweck, toxische Substratkonzentrationen zu vermeiden wie der Aufhebung der Substratlimitierung. Als Regler wurde der im Abschnitt „Datenerfassung und Prozeßregulation“ beschriebene Minimalvarianzregler mit semikontinuierlichem KALMAN-Filter eingesetzt.

Nach dem Ende von Wachstums- und Derepressionsphase wurde zunächst als Puls eine definierte Menge an Methanol, z.B. $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, in den Fermenter gegeben. Das daraus resultierende Signal der Abgasanalytik wurde dazu benutzt, die Abgasanalytik auf die Konzentration im Fermenter zu kalibrieren, gleichzeitig wurde die Totzeit für die Messung

bestimmt. Nun wurde die minimal zu verwirklichende Dosierate von $20 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ für die automatische Methanoldosierung eingestellt, gleichzeitig wurde der KALMAN-Filter der Regelstrecke aktiviert. Nicht in allen Fermentation war die minimale Flußrate der Dosiereinrichtung ausreichend klein, eine Anreicherung des Methanols zu vermeiden. So war es notwendig, den Prozeß persönlich zu überwachen und die Methanoldosierung immer wieder aus- und einzuschalten. Sobald die Methanolkonzentration bei kontinuierlicher Dosierung nicht weiter anstieg, konnte der Minimalvarianzregler eingeschaltet werden, dieser regelte dann für die restliche Fermentation die Methanolkonzentration automatisch auf den vorgegebenen Sollwert.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auch bei dieser Prozeßvariante zunächst manuell eingestellt, jedoch wurde die maximale Sauerstoffeintragsrate bei einer Rührerdrehzahl von 1150 rpm, einem Begasungsvolumenstrom von $37 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ und einem Überdruck von 1,85 bar rasch erreicht. Um den darüber hinausgehenden Sauerstoffbedarf der Kultur zu decken, wurde der Begasungsluft Sauerstoff beigemischt, wobei die Beimischung über einen in das Datenerfassungssystem Medusa integrierten PID-Regler automatisch auf den Sollwert von 30 % Luftsättigung geregelt wurde.

4.4.9 Fermentation im Zulaufverfahren mit Glucose als Substrat

Bei der Verwendung von Produktionsstämmen, bei denen die Expression des hCTRB-Genes durch den GAP-Promotor kontrolliert wurde, wurde im Zulaufverfahren Glucose als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle im Zulauf eingesetzt.

Nach Verbrauch des vorgelegten Glycerins wurde ein Dosierstrom des unter 4.3.10 beschriebenen Glucose-Zulaufmediums in den Fermenter angelegt. Dieser wurde unter Verwendung der „oxygen-peak“-Methode manuell gesteigert, so daß jederzeit eine Limitierung des Wachstums durch das C-Substrat gegeben war. Eine Anreicherung von Glucose mußte vermieden werden, da *Pichia pastoris* unter diesen Bedingungen Ethanol anreichern kann.

4.4.10 Fermentation in parallelen Kleinreaktionsgefäßen (vereinfachtes Zulaufverfahren mit Methanol)

Zur Vorbereitung der Fermentation wurden die trocken autoklavierten Fermentationsgefäße (Abb. 4-10, S. 47) mit 300 ml des separat sterilisierten Vorlagemediums befüllt und eingebaut. Nach Einstellung von pH-Wert und Temperatur und Polarisierung der O_2 -Elektroden wurden die Gefäße dann mit 30 ml Vorkultur nach 4.4.3 inokuliert. Die Wachstumsphase erfolgte analog zu den beschriebenen Fermentationen, auf eine Derepressionsphase wurde verzichtet, da die Anlage nicht für die Dosierung zweier verschiedener Medienströme ausgestattet war. Nach dem Verbrauch der vorgelegten Kohlenstoffquelle wurde die Kultur sofort induziert.

Für die Fermentation in Kleinreaktionsgefäßen konnte das unter 4.4.7 beschriebene

Verfahren nicht übernommen werden, da für die individuell gesteuerte Mediendosierung in die Bioreaktoren die apparative Ausstattung (sechs Dosierstrecken) nicht vorhanden war. Aus diesem Grund wurde die Methanoldosierung über Dosierpulse von auf eine Förderleistung von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ vorkalibrierte Schlauchpumpen (Typ Watson-Marlow 101 U) realisiert. Diese Pumpen wurden über ein einfaches Steuerungsprogramm an- und ausgeschaltet, wobei die Einschaltzeit auf 1 min festgelegt war während die Pausenzeit im Fermentationsverlauf manuell festgelegt wurde. Grundlage für die manuelle Anpassung der Pausenzeiten war das Verhalten der Gelöstsauerstoffkonzentration in Reaktion auf einen Substratpuls. Die Zeit zwischen einem Substratpuls und der Anzeige einer Substratlimitierung durch einen „oxygen-peak“ wurde als Basis für die Festlegung der neuen Pausenzeit herangezogen wobei stets darauf geachtet wurde, daß zwischen den Pulsen das gesamte Substrat verbraucht wurde, damit keine Anreicherung des Methanol auftreten kann.

4.4.11 Kontinuierliche, nutristatisch geführte Fermentation mit Methanol als Substrat

Für die kontinuierlich geführten Fermentationen wurde das Arbeitsvolumen abzüglich dem Inokulationsvolumen an Vorlagemedium im Fermenterkessel autoklaviert. Das abgekühlte Medium wurde auf den Start-pH der Fermentation titriert und nach Zugabe von Spurensalzen und Vitaminen mit 300 ml (4 l Arbeitsvolumen) bzw. 200 ml (2 l Arbeitsvolumen) der ersten Vorkultur inokuliert.

Nach Verbrauch der vorgelegten Kohlenstoffquelle wurde die Kultur durch die Zugabe von methanolhaltigem Zulaufmedium induziert. Wie bereits in 4.4.8 geschildert, wurden dann Kalman-Filter und Minimalvarianzregler zur nutristatischen Regelung der Methanolkonzentration eingesetzt. Mit diesem Aufbau ergab sich dann im steady-state die Verdünnungsrate als Funktion der eingestellten Methanolkonzentration.

4.4.12 Kontinuierliche, chemostatisch geführte Fermentation mit Mischsubstrat

Bei der Verwendung von Substratmischungen, in der Regel Glucose / Methanol, sollte eine zumindest teilweise Entkopplung von Wachstum und Produktbildung erreicht werden, wobei das Wachstum durch das Hauptsubstrat Glucose limitiert wurde. Die Konzentration des Induktors Methanol, relevant für die Produktbildung, wurde in diesen Ansätzen durch Variation der Zulaufkonzentration gesteuert.

Die Prozeßführung erfolgte vollständig analog zu 4.4.11, nur daß unter Verzicht auf die automatische Regelung die Durchflußrate manuell eingestellt wurde. Die Heranführung an diesen Wert erfolgte wiederum unter Einsatz der „oxygen-peak“-Methode, da alle Ansätze unter Glucoselimitierung durchgeführt wurden.

4.4.13 Kontinuierliche, chemostatisch geführte Fermentation in parallelen Kleinreaktionsgefäßen

In den beschriebenen Kleinreaktionsgefäßen (Abb. 4-5) konnten kontinuierliche Fermentationen nur chemostatisch geführt werden. Aus diesem Grund konnten hier nur Glucose und Glycerin als Hauptsubstrate erfolgreich eingesetzt werden.

Die Vorbereitung der Gefäße erfolgte wie bereits für die Experimente im Zulaufverfahren mit diesem System beschrieben, die Prozeßführung folgte dem gleichen Schema wie die Versuche im Rührkessel.

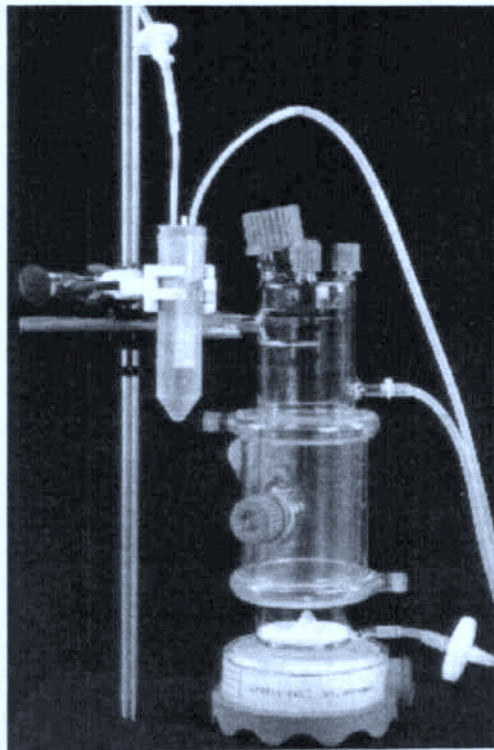


Abb. 4-5 : Detailphotographie eines Blasensäulenreaktors mit Magnetrührer, kombiniertem Überlauf-/ Abluftanschluß und Schaumfalle.

4.4.14 Datenerfassung und Prozeßregulation

Für die Datenerfassung bei allen behandelten Prozessen wurde das am Institut für Biotechnologie entwickelte Programm „Medusa 1.2“ eingesetzt. Auch alle Regler, soweit nicht die in den Fermentersystemen eingebauten Regelungsmechanismen eingesetzt wurden, waren als Software-Tool in dieses Programm implementiert.

Digitale Datensätze, so z.B. die Datenstrings der eingesetzten Infors-Fermenter wurden über eine Parallelschnittstelle in den Prozeßrechner eingelesen und über ein im Hintergrund laufendes Hilfsprogramm (sog. „Userprogramm“) für die Darstellung und Aufzeichnung in „Medusa 1.2“ aufbereitet. Ebenfalls über parallele Schnittstellen erfolgte die Kommunikation von Medusa 1.2 mit den für die Volumendosierung eingesetzten Sartorius-Dosierstrecken wobei das Kommunikationsprotokoll in die Prozeßsoftware fest implementiert war.

Alle anderen ein- und ausgehenden Signale wurden als Analogsignale über einen Mehrkanal A/D-Wandler (Siemens-SMP) ausgetauscht. Dies betraf alle externen online-Analysengeräte sowie die Daten aus den älteren Chemapfermentern und den selbstgebauten Fermentationsanlagen (parallele Kleinreaktionsgefäße). Für jedes Analogsignal wurde ein Eingangs- oder Ausgangskanal am SMP-Interface konfiguriert.

Die Steuerung der Dosierpumpen im vereinfachten Zulaufverfahren bei Kultivierung in parallelen Kleinreaktionsgefäßen erfolgte über jeweils ein Relais im SMP-Interface, welches wiederum durch das Programm Medusa 1.2 angesteuert wurde. Die Festlegung der Zustände an / aus erfolgte über ein einfaches Timer-Programm in C++-Code, welches als sog. „Userprogramm“ im Hintergrund der Anwendung Medusa gestartet wurde.

Die Regelung der Sauerstoffbeimischung während der nutristatisch geführten Fermentation im Zulaufverfahren mit Methanol erfolgte über einen in das Programm Medusa integrierten PID-Regler. Unter Beibehaltung eines konstanten Gesamtvolumenstroms in den Fermenter wurde ein automatisches Brooks-Ventil mit thermokapazitiver Durchflußmessung für den O₂-Strom eingesetzt. Der Sollwert für diese Stellgröße wurde als Analogsignal von „Medusa 1.2“ als Reaktion auf die Veränderung der Regelgröße pO₂ übertragen.

Die Regelung der Methanolkonzentration erfolgte bei allen nutristatisch geführten Fermentationen durch einen Minimalvarianzregler mit semikontinuierlichem KALMAN-Filter, dieser Regelalgorithmus ist als Software-Tool in die Prozeßsoftware „Medusa 1.2“ implementiert. Der anhand der aktuellen Methanolkonzentration errechnete neue Stellwert wurde über digitale Schnittstellenkommunikation an die Dosierstrecke als Stellglied übertragen.

Die hier eingesetzte Kombination von Minimalvarianzregler mit einem adaptiven, semikontinuierlichen KALMAN-Filter wurde am Institut für Biotechnologie entwickelt und bereits vielfach mit Erfolg für die nutristatische Regelung biotechnologischer Prozesse eingesetzt, so z.B. für die kontinuierliche Produktion von Formiatdehydrogenase mit *Candida boidinii* [Weu97] oder die Produktion von L-Lysin im Zulaufverfahren mit *Corynebacterium glutamicum* [Kel96].

In dieser Anordnung ist die Aufgabe des semikontinuierlichen KALMAN-Filters, anhand der diskreten und / oder totzeitbehafteten Meßwerte der online-Substratanalytik eine gewichtete Schätzung der aktuellen Zustandsgrößen zu erstellen. Mittels des durch die Gleichungen 4.1 – 4.3 definierten Prozeßmodells werden die aktuelle, geschätzte Substratkonzentration im Reaktor $[\hat{S}]_R$, die geschätzte Verbrauchsrate $\hat{r}_S$ und die geschätzte Änderung $\hat{\alpha}$ der Verbrauchsrate bis zur nächsten Abtastzeit ermittelt. Das hier dargestellte Prozeßmodell beschreibt einen fed-batch Ansatz, bei kontinuierlicher Betriebsweise muß ein entsprechend modifiziertes Modell verwendet werden. Die manuell vorgegebene Abtastzeit wurde auf das Zweifache der Totzeit des System, 10 min, festgelegt. Der in allen Gleichungen vorkommende Term g_n bezeichnet den jeweils be-

rücksichtigten stochastischen Rauschterm.

$$\frac{d[\hat{S}]_R}{dt} = \frac{\dot{v}_{in} \cdot [S]_{in}}{V_R} + \hat{r}_S + g_1 \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$$\frac{d\hat{r}_S}{dt} = \hat{\alpha} + g_2 \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$$\frac{d\hat{\alpha}}{dt} = \hat{\alpha} \cdot \frac{\dot{v}_{in}}{V_R} + g_3 \quad \text{Gleichung 4.3}$$

$$[\hat{S}]_m = [\hat{S}]_R + g_4 \quad \text{Gleichung 4.4}$$

$$\hat{\alpha} = e^{\left\{ \frac{\dot{v}_{in,t}}{V_R} \right\}} + const. \quad \text{Gleichung 4.5}$$

Durch Lösung der drei Modellgleichungen und Einsetzen des Ergebnisses in die Meßwertgleichung (Gleichung 4.4) ergibt sich die geschätzte Substratkonzentration bis zur nächsten Abtastzeit. Die Änderung der Hilfsgröße $\hat{\alpha}$ hängt in diesem Modell von der relativen Zulaufgeschwindigkeit $\frac{\dot{v}_{in}}{V_R}$ ab. Wie die Lösung der Gleichung 4.3 in Gleichung 4.5 zeigt, wird bei der Berechnung von $\hat{\alpha}$ ein exponentieller Verlauf berücksichtigt, wie dies in batch oder fed-batch Ansätzen der Fall ist. In kontinuierlichen Ansätzen ist dies nicht notwendig, da im Fließgleichgewicht Wachstumsrate μ und Verdünnungsrate D konstant sind [Weu99] $\frac{d\alpha}{dt} = 0$. Auf dieser Basis wird das Prozeßmodell für die kontinuierliche Reaktorführung analog formuliert (s. Gleichungen 3.1 – 3.6).

Mit der durch den KALMAN-Filter ermittelten, erwarteten Substratkonzentration $[\hat{S}]_m$ steht nun ein Echtzeit-Wert für den nachgeschalteten Regelalgorithmus zur Verfügung. In der Prozeßsoftware Medusa 1.2 ist ein Minimalvarianzregler implementiert, der unter Verwendung der erwarteten Substratkonzentration und der zuletzt eingestellten Stellgrößen die Pumprate als Stellgröße so anpaßt, daß der Meßwert dem Sollwert angeglichen wird. Dies geschieht durch Minimierung des Terms $F_{(t+1)}$ in Gleichung 4.6.

$$F_{(t+1)} = \{ ([S]_m - [S]_{\infty})_{(t+1)}^2 + u \cdot (\dot{v} - \dot{v}_{\infty})_{(t)}^2 \} \quad \text{Gleichung 4.6}$$

Als Kriterium für die Festlegung der neuen Stellgröße werden dabei einerseits die Abweichung der aktuellen Substratkonzentration $[S]_m$ vom Sollwert $[S]_{\infty}$ zum Zeitpunkt $t+1$ und andererseits die Abweichung der Stellgröße $\dot{v}$ vom Gleichwert $\dot{v}_{\infty}$ berücksichtigt. Der Gleichwert $\dot{v}_{\infty}$ wird als arithmetisches Mittel der letzten n Stellgrößen ermittelt, wobei durch Variation der Gleichwertbildung über n Einfluß auf die Dynamik des Reglers genommen werden kann. Durch den Gewichtungsfaktor u wird festgelegt, wie schnell die Stellgröße an den Gleichwert herangeführt wird. Die Größe von u bestimmt

den Anteil der Stellgrößenabweichung an $F_{(t+1)}$, bei großen u wird demzufolge der Regler nur sehr langsam die Stellgröße verändern, um die Differenz von Stellgröße und Gleichwert zu minimieren. Umgekehrt wird bei kleinen u der Regler sehr schnell auf jede Regelgrößenabweichung reagieren, da die Differenz zwischen Meßwert und Sollwert stärker in die Regelung einfließt. Das Verhalten des Reglers kann demzufolge wesentlich durch die Wahl von Gleichwertbildung und Gewichtungsfaktor bestimmt werden. Für die Regelung der Methanolkonzentration sowohl im Zulaufverfahren als auch bei kontinuierlicher Prozeßführung haben sich die folgenden Einstellungen bewährt.

Gewichtungsfaktor u :	3-5	
n für Gleichwertbildung $\dot{v}_\infty$:	5-20	
Rauschterm g_1 :	0,1 absolut	10 % relativ
Rauschterm g_2 :	0,2 absolut	10 % relativ
Rauschterm g_3 :	0,5 absolut	10 % relativ
Rauschterm g_4 :	1,0 absolut	20 % relativ

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Messung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde während der Fermentationen mit gelstabilisierten Einstab-Meßketten der Firma Broadley-James (Fermprobe) gemessen. Die Kalibrierung der Meßanordnung erfolgte mit Pufferlösungen der pH-Werte 7,0 (Nullpunkt) und 3,0 (Steigung) bei Raumtemperatur.

4.5.2 Messung der relativen Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Sauerstoffsättigung des Mediums wurde mit Standard-pO₂-Elektroden (Clark-Elektroden) der Firmen Broadley-James oder Mettler-Toledo gemessen. Die Kalibrierung der Meßanordnung erfolgte durch Begasung mit Stickstoff (Nullpunkt) und Luft (Sättigung) bei Normaldruck und der Fermentationstemperatur.

4.5.3 Messung der Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Abluft

Die CO₂-Konzentration in der Abluft wurde mittels NIR-Absorption bestimmt. Dazu wurden die im Folgenden benannten Meßgeräte der Firma Fisher-Rosemount, Hanau, D eingesetzt:

- Binos 462 (Leybold-Heraeus, heute Fisher-Rosemount)
- Binos 200M

4.5.4 Messung der Sauerstoffkonzentration in der Abluft

Die O₂-Konzentration in der Abluft wurde mittels paramagnetischer Messung bestimmt. Dazu wurden die im Folgenden benannten Meßgeräte der Firma Fisher-Rosemount, Hanau, D eingesetzt:

- Oxynos 100
- Binos 200M

4.5.5 Online Bestimmung der Alkoholkonzentration im Fermentationsmedium

Die Alkoholkonzentration im Fermentationsmedium wurde indirekt über die Konzentration in der Abluft bestimmt. Dazu wurden drei verschiedenen Meßmethoden verwendet. Die Messung mit dem Gerät Binos 462 (Leybold-Heraeus, heute Fisher-Rosemount) erfolgte über NIR-Absorption, wohingegen das Gerät MC-168 (PTI-Instruments, Lincoln; NE) mit einem elektrochemischen Sensor arbeitete. Mit einem optoakustischen Meßverfahren arbeitete der Fermentation Monitor 1313 der Firma Innova AirTech Instruments (Ballerup, Dänemark).

Die Signale aller Geräte wurden über externe Messungen mittels Gaschromatographie mit der aktuellen Konzentration in der Flüssigphase korreliert.

4.5.6 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Biotrockenmassekonzentration in der Fermentationsbrühe wurde gravimetrisch bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Fermentationsbrühe abzentrifugiert und das Pellet bei 70 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde das Pellet, das sich aus dem Reaktionsgefäß ausschütten ließ, ausgewogen. Auf einen Waschschrift wurde bewußt verzichtet, da sich die Pellets nur unter Zuhilfenahme eines Rührspatels resuspendieren ließen, wodurch ein deutlicher Meßfehler entstand.

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurde als Vierfach-Ansatz durchgeführt.

4.5.7 Gaschromatographische Messung der Konzentrationen von Methanol und Ethanol

Methanol und Ethanol wurde unter Verwendung eines Gaschromatographen CP-3800 mit CP-8200 Autosampler der Firma Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA aus den Überständen der Fermentationsbrühe bestimmt.

Methode:

Injektor:	Split 1:50; 120 °C
Injektionsvolumen:	0,3 µl
Säule:	FS-FFAP-CB-0,5; Länge 50 m; ID 0,25 mm; Filmdicke 0,48 µm
Trärgas:	N ₂ , 25 psi
Temperaturprofil:	70 °C; 5 min → 150 °C; 10 °C·min ⁻¹
Detektor:	FID; 250 °C
Interner Standard:	10 mM n-Butanol
Probenmatrix:	0,1 N HCl _{aq.}
Externer Standard:	150 mM MeOH, 150 mM EtOH
Nachweisgrenze:	< 0,5 mM MeOH

Die Steuerung des Gaschromatographen und des Autosamplers sowie die automatische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software „Star Workstation“ des gleichen Herstellers. Außer Methanol und Ethanol erfaßte die Methode auch Acetat und verschiedene andere organische Säuren sowie höherwertige Alkohole. Keiner dieser Analyten kam in den Kulturüberständen von *Pichia* vor.

4.5.8 Bestimmung der Chymotrypsinogenkonzentration [Bru98]

Die Chymotrypsinogenkonzentration wurde als Aktivität des durch Trypsin aktivierten Chymotrypsins gegenüber dem spezifischen Substrat Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Phenylalanyl-paraNitroanilid (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa) bestimmt. Durch Hydrolyse der Peptidbindung carboxyterminal der Aminosäure Phenylalanin wird aus dem farblosen Substrat der gelbe Farbstoff para-Nitroanilin freigesetzt. Die Kinetik der Substratspaltung wurde mit einem Spektrophotometer bei $\lambda=406$ nm erfaßt und auf eine Kalibrierreihe mit aufgereinigtem hCTRb bezogen.

Zusammensetzung der Lösungen:

Puffer I:	100 mM Tris pH 7,8 (HCl), 20 mM CaCl ₂
Puffer II:	100 mM Tris pH 7,8 (HCl), 20 mM CaCl ₂ , 0,05 % Triton X
Trypsinlösung:	1 mg Trypsin (porc.)·ml ⁻¹ in 1mM HCl
Substratlösung:	2,1 mg Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa ·ml ⁻¹ in Puffer I, Titration mit NaOH bis zur vollständigen Lösung
Probe I:	zu untersuchende Probe, adäquat mit H ₂ O verdünnt
Probe II:	Aktivierungsansatz

Ansatz und Durchführung:

<u>Aktivierung:</u>	Puffer I	355 µl
	Probe I	40 µl
	Trypsinlösung	5 µl

Aktivierung bei Raumtemperatur für 30 min, die Aktivierung startet mit der Zugabe der Trypsinlösung.

<u>Messung:</u>	Puffer I	1160 µl
	Probe II	40 µl
	Substratlösung	200 µl

Die Messung startet mit der Zugabe der Substratlösung. Die Kinetik der Farbstofffreisetzung wurde bei $\lambda=406$ nm für 1 min vermessen. Dazu wurden Halbmikroküvetten aus Polystyrol mit einer Schichtdicke von 10 mm eingesetzt. Zur Kalibrierung der Methode wurden Standards von 0, 50 und 100 mg·l⁻¹ hCTRb eingesetzt.

Die im Überstand gemessene Konzentration mußte nun noch auf das Gesamtvolumen korrigiert werden, dazu wurde eine Korrelation zwischen den gemessenen Biotrockenmassekonzentration und dem Volumen der Zellen in der Fermentationsbrühe von 1:3 ermittelt. Alle innerhalb dieser Arbeit angegebenen Konzentrationsangaben und davon abgeleitete Größen beziehen sich also auf die vollständige Kulturbrühe und nicht auf den Überstand. Die im Überstand gemessenen Konzentrationen sind stets wesentlich höher.

4.5.9 Bestimmung der zellinternen Alkoholoxidaseaktivität [Fer91]

Die Aktivität der Alkoholoxidase im Zellaufschluß wurde indirekt über die Bildung von Wasserstoffperoxid bei der Oxidation von Methanol bestimmt. Durch das Enzym Peroxidase wird Wasserstoffperoxid reduziert, dabei dient ortho-Dianisidin als Akzeptor für den Sauerstoff. Die Bildung des orange-braunen Oxidationsproduktes wird bei $\lambda=420$ nm photometrisch gemessen. Die Peroxidase wurde dabei im hohen Überschuß eingesetzt, um den Einfluß von im Zellaufschluß vorhandener Katalase zu eliminieren.

Unter verschiedenen physiologischen Zuständen kann sich die Morphologie der Zellen in einer Kultur signifikant ändern, was sich auch auf die Effizienz der eingesetzten Aufschlußmethode auswirkt. Um derartige Einflüsse auszuschließen, wurde die gemessene Alkoholoxidaseaktivität stets auf den Rohproteingehalt in dem zu untersuchenden Zell-extrakt bezogen und als spezifische Aktivität ausgedrückt.

Zusammensetzung der Lösungen:

Pichia-Lysepuffer: 62,5 mM Tris pH 8,7 (HCl); 5,0 mM EDTA; 2,0 mM PMSF

Meßpuffer: 100 mM Na_2HPO_4 pH 7,5 (HCl)

Peroxidase-Lsg.: Rettich-Peroxidase ca. $60 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ im Meßpuffer

o-Dianisidin-Lsg.: $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ in H_2O

Methanol p.A.

Ansatz und Durchführung:

Zellaufschluß:

Als Ausgangsmaterial wurden Zellen nach der Probenahme aus dem Fermenter in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und ohne weitere Behandlung bei -20°C eingefroren. Zum Aufschluß wurde dieses Pellet in der dreifachen Menge des beschriebenen Lysepuffers resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 500 μl auf 1 g Glasperlen ($\varnothing$ 0,5 mm, neutral gewaschen u. getrocknet) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Aufschluß wurde dann auf einem Labormixer (Vortex) bei voller Leistung für 5 min durchgeführt. Anschließend wurden Glasperlen und intakte Zellen durch Kurzzentrifugation (1 min) bei $6.750 \cdot g$ abgesetzt. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und nach geeigneter Verdünnung in Meßpuffer als Probe eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in der Kühltzentrifuge bei 0°C durchgeführt.

<u>Messung:</u>	Meßpuffer	1000 μl
	o-Dianisidinlsg.	20 μl
	MeOH p.A.	100 μl
	Peroxidaselsg.	100 μl
	Probe	100 μl

Die Messung startete 60 s nach Zugabe der Probe. Die Kinetik wurde bei $\lambda=420$ nm und $T = 27,5$ °C für 1 min vermessen. Dazu wurden Halbmikroküvetten aus Polystyrol mit einer Schichtdicke von 10 mm eingesetzt.

Durch Kalibrierung der Extinktionsänderung mit H_2O_2 -Lösung wurde die Aktivität wie folgt festgelegt: 1 U ist die Aktivität der Alkoholoxidase, die in der Meßprobe $1\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ freisetzt und dadurch eine Extinktionsänderung von $\Delta\epsilon = 0,00113 \cdot \text{min}^{-1}$ bewirkt.

Proteingehaltsbestimmung:

Zur Bestimmung des Proteingehalts im Zellaufschluß wurde der BCA-Protein Assay der Firma Pierce, Rockford IL, USA entsprechend der Vorschrift eingesetzt. Verwendet wurde das „Advanced protocol“ mit Inkubation der Proben bei 60 °C. Zur Kalibrierung wurde bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V als Standard eingesetzt. Als Probe wurde der um den Faktor 100 mit Wasser verdünnte Zellaufschluß eingesetzt.

4.5.10 Bestimmung der Formaldehydkonzentration im Fermentationsüberstand [Avi83]

Die photometrische Messung der Formaldehydkonzentration beruht auf der Interaktion aliphatischer Aldehyde mit 4-Amino-5-hydrazino-3-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT, Handelsname „Purbald“) unter Bildung eines farbigen, 6-substituierten *s*-Triazolo-[4,3-*b*]-*s*-tetrazin-3-thiols. Dessen Konzentration kann bei einer Wellenlänge von $\lambda=548$ nm unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes photometrisch bestimmt werden.

Zusammensetzung der Lösungen:

AHMT-Lösung: 10,0 g·l⁻¹ Purbald in 1N NaOH

Quenchlösung: 2,0 g·l⁻¹ NaBH₄ in 1N NaOH

Ansatz und Durchführung:

Farbreaktion: Probe oder Standard 200 µl

AHMT-Lösung 300 µl

Nach Zugabe der Reagenzlösung wird das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 30 min mit 200 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde in Reagenzröhrchen mit den Abmessungen 23,5 · 40 mm durchgeführt, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag für die Oxidationsreaktion zu gewährleisten. Andernfalls verlängert sich die einzuhaltende Reaktionszeit.

Quenchen: Quenchlösung 500 µl

Nach dem Ende der Reaktionszeit von 30 min wird die Oxidation durch die Zugabe von Natriumborhydrid abgestoppt. Nach Maßgabe der verwendeten Literatur [Avi83] ist dieses Quenchen nicht unbedingt notwendig, erhöht und stabilisiert jedoch die gemess-

senen Endwerte der Absorption. Die Messung erfolgt in einer Halbmikro-Quarzglasküvette gegen aldehydfreies Reagenz bei einer Wellenlänge von $\lambda=548$ nm. Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit wäßriger Formaldehyd-Standardlösung. Als Meßbereich für die Methode wird 0 – 50 nM Formaldehyd angegeben. Bei überhöhter Analytkonzentration konnte das Reaktionsgemisch vor der Messung mit 0,8 N Natronlauge geeignet verdünnt werden.

4.5.11 Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Fermentationsüberstand

Die proteolytische Aktivität wurde unter Verwendung des Substrates Azocasein gemessen. Bei der proteolytischen Degradation des Azocasein wird ein roter Azofarbstoff freigesetzt, dessen Konzentration nach Säurefällung des verbleibenden Proteins im Überstand photometrisch meßbar ist. Die Aktivität wurde auf Pronase aus *Streptomyces griseus* als Referenzprotease bezogen und als Äquivalentkonzentration ausgedrückt. Zur Eliminierung der Eigenfärbung wurde jede Probe im Doppelansatz mit und ohne Substratzugabe behandelt.

Zusammensetzung der Lösungen:

Azocaseinlg.:	10 mg·ml ⁻¹ in H ₂ O
Inkubationspuffer:	100 mM Tris pH 7,5 (HCl), 100 mM CaCl ₂
TCA-Lsg.:	100 g·l ⁻¹ Trichloressigsäure

Ansatz und Durchführung:

<u>Proteaseverdau:</u>	Probe o. Standard	400 µl
	Azocaseinlg.	100 µl
<u>Probenleerwert:</u>	Probe o. Standard	400 µl
	Inkubationspuffer	100 µl

Die Ansätze wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach 15 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl TCA-Lsg. abgestoppt, zur vollständigen Ausfällung aller Proteine wurden die Ansätze bei 37 °C für weitere 15 min inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min; 18.845·g) abgetrennt. 800 µl des Überstandes wurden nun im Spektrophotometer bei $\lambda=345$ nm gegen Wasser vermessen. Aus der Differenz zwischen der zum Proteaseverdau eingesetzten Probe und dem Probenleerwert konnte nun anhand der Kalibriergeraden die proteolytische Aktivität im Fermentationsüberstand bestimmt werden.

4.5.12 Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration)

Die Gelpermeationschromatographie wurde zur Trennung der Proteine im Fermentationsüberstand im Rahmen der Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität eingesetzt.

Die Trennung der Analyten in der Gelpermeationschromatographie beruht auf einem Verteilungsgleichgewicht von Molekülen zwischen dem Innen- und dem Außenraum einer porösen Matrix mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle dringen entsprechend ihrer Größe tiefer in die Gelmatrix ein und benötigen dementsprechend ein größeres Volumen an Elutionsmittel, um durch die Säule transportiert zu werden.

Das Elutionsverhalten eines Stoffes läßt sich, unabhängig von der Säulendimension, durch den K_{av} -Wert (Verteilungskoeffizient) formelmäßig beschreiben.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Gleichung 4.7}$$

mit	V_e	Elutionsvolumen
	V_t	Totalvolumen der Säulenpackung
	V_0	Volumen der mobilen Phase

Zur Trennung der Proteine im Fermentationsüberstand wurde eine Chromatographieanordnung mit den folgenden Spezifikationen eingesetzt. Als Ausgangsmaterial wurde Fermentationsüberstand eingesetzt, der zuvor durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze 3 kD) um den Faktor 20 aufkonzentriert wurde.

Probenvolumen:	1 ml
Gelmatrix:	Superdex G 200 (Pharmacia)
Betthöhe:	56,5 cm
Bettradius:	0,8 cm
Bettvolumen:	113,6 ml
V_0 :	38,458 ml (Bestimmung mit Blue Dextran, MW=2·10 ⁶ Da)
Laufmittel:	35 mM KH ₂ PO ₄ ; 15 mM K ₂ HPO ₄ ; 150 mM NaCl; pH 6,5
Flußrate:	1 ml·min ⁻¹
Detektion:	$\lambda = 280$ nm
Fraktionierung:	autom. Fraktionssammler, 1 ml
<u>Kalibrierung:</u>	Die beschriebene Säulenordnung wurde mit Proteinen definierter Größe kalibriert.

Thyroglobin	667.000 Da	Albumin	67.000 Da
Ferritin	444.000 Da	Ovalbumin	43.000 Da
Katalase	232.000 Da	Chymotrypsinogen A	25.000 Da
Alolase	156.000 Da	Ribonuklease	13.700 Da

4.5.13 SDS-PAGE

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde eine Elektrophoresekammer XCell Mini der Firma Novex (heute Invitrogen, San Diego, CA) mit den Fertiggelele des gleichen Herstellers eingesetzt. Für die Auftrennung kleiner und mittelgroßer Proteine wurden dazu NuPage Bis-Tris Gele (Schichtdicke 1 mm; MES-Laufpuffer) mit einem Vernetzungsgrad von 12 % eingesetzt, für größere Proteine NuPage Tris-Acetat Gele (Schichtdicke 1 mm, Tricin-Laufpuffer) mit einem Gradienten von 3-8 % im Vernetzungsgrad. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Vorgaben und Empfehlungen der Hersteller.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen:

SDS-Probenpuffer: 293 mM Saccharose; 141 mM Tris, 106 mM Tris-HCl; 69,5 mM SDS; 0,51 mM EDTA; 0,22 mM Coomassie Brilliant Blue G 250; 0,175 mM Phenolrot; pH = 8,5

MES-Laufpuffer: 50 mM MES; 50 mM Tris; 3,5 mM SDS; 1 mM EDTA; pH = 7,3

Tricin-Laufpuffer: 50 mM Tris; 50 mM Tricin; 3,5 mM SDS; pH = 8,24

CBB-Färbelösung: 2,5 g·l⁻¹ Coomassie Brilliant Blue R250; 454 ml·l⁻¹ Ethanol (96 %); 92 ml·l⁻¹ Essigsäure (Eisessig)

Entfärbelösung: 300 ml·l⁻¹ Ethanol (96 %); 100 ml·l⁻¹ Essigsäure (Eisessig)

DTT-Stammlösung: 1,0 M 1,4-Dithiothreitol

Probenvorbereitung:

Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden alle Proben in denaturierter und reduzierter Form aufgetragen. Zur Vorbereitung der Proben wurde der unten angegebene Ansatz für 10 min auf 80 °C erhitzt.

reduzierte Probe: 65 µl Probe (z.B. Fermentationsüberstand); 25 µl vierfach konzentrierter Probenpuffer; 10 µl DTT-Stammlösung

Trennung

Die aufgetragenen Proteine wurden im Gel bei einer konstanten Spannung von 200 V getrennt.

CBB-Färbung

Das Gel wurde zunächst für mindestens 1 h in CBB-Färbelösung gefärbt und anschließend mit der Entfärbelösung entfärbt, bis eine ausreichende Kontrastierung der Proteinbanden erreicht war.

Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurde das „Silver Staining Kit“ der Firma Novex entsprechend den Angaben der Hersteller eingesetzt.

4.5.14 CTRB-Aktivitätsfärbung

Für die CTRB-Aktivitätsfärbung war es zunächst notwendig, das durch SDS denaturierte Zielprotein zu renaturieren und anschließend zu aktivieren. Dann konnte mittels des auch für die Aktivitätsmessung eingesetzten chromogenen Substrates eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden. Da der hierbei freigesetzte Farbstoff wasserlöslich ist, konnte diese Methode nur unmittelbar während und nach der Färbung ausgewertet werden, da der Farbstoff in der Gelmatrix frei diffundieren und sich verteilen konnte.

Renaturierung

Unter Verwendung des bei der Durchführung der Zymogramm-PAGE angegebenen Renaturierungspuffers wurde zunächst das SDS aus dem Gel herausgewaschen. Dazu wurde das Gel für zweimal 30 min in jeweils 100 ml dieses Puffers inkubiert. Vor der Durchführung der weiteren Arbeitsschritte wurde das Gel nun mit dem Zymogramm-Entwicklungspuffer (s.u.) für 30 min vorinkubiert.

Aktivierung

Für die Aktivierung wurde das Gel für 30 min in 50 ml Zymogramm-Entwicklungspuffer mit $12,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ der Trypsinlösung, wie sie in Kapitel 4.5.8 beschrieben ist, inkubiert. Durch mehrmaliges Spülen mit dem Puffer wurde anschließend das Trypsin von der Oberfläche des Gels abgewaschen.

Färbung

Zur Färbung von Bereichen des Gels, in denen Proteine mit chymotryptischer Aktivität vorliegen, wurde das Gel mit dem beschriebenen Entwicklungspuffer mit 20 % der für die CTRB-Aktivitätsmessung beschriebenen Substratlösung inkubiert.

4.5.15 Zymogramm-PAGE

Für den Nachweis und die Charakterisierung proteolytischer Aktivität in Fermentationsüberständen wurden Zymogramm-Fertiggele der Firma Novex eingesetzt. Es kamen dabei Gelatine (Zymogram Gelatin Gel, 10 % Vernetzungsgrad) und Casein (Zymogram Blue Casein Gel, 4-16 % Vernetzungsgrad) als Proteasesubstrate zum Einsatz. In beiden Fällen wurden Gele mit 1,0 mm Schichtdicke und die unten beschriebenen Puffer eingesetzt.

Das Prinzip des Zymogramms beruht darauf, daß ein Proteasesubstrat so in die Gelmatrix eingebunden ist, daß es nicht im elektrischen Feld wandert. Nach Auftrennung einer proteasehaltigen Probe wird während der Entwicklung des Gels das Substrat im Bereich dieser Proteasen abgebaut, wodurch nach Anfärbung des Substrates ein klarer, ungefärbter Bereich entsteht.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen:

Probenpuffer: 63 mM Tris-HCl; 100 $\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}$ Glycerin; 69,4 mM SDS; 0,25 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
 Bromphenolblau; pH = 6,8

Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 34,7 mM SDS; pH = 8,3

Renaturierungspuffer: 27 g·l⁻¹ Triton X-100

Entwicklungspuffer: 50 mM Tris; 40 mM HCl; 200 mM NaCl; 5 mM CaCl₂·2H₂O; 2,0 g·g⁻¹ Brij 35

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit dem doppelt konzentrierten Probenpuffer gemischt und direkt aufgetragen.

Trennung:

Die aufgetragenen Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 125 V im elektrischen Feld getrennt.

Entwicklung:

Zur Renaturierung der aufgetrennten Proteine mußte zunächst durch Inkubation im Renaturierungspuffer (2·30 min) das SDS aus dem Gel ausgewaschen werden. Nach Vorinkubation in Entwicklungspuffer wurde dann das Gel über Nacht bei 37 °C in diesem Puffer entwickelt. Das in die Gelmatrix eingebundene Proteasesubstrat Casein bzw. Gelatine wurde in dieser Zeit im Bereich der vorhandenen Proteasen abgebaut.

Färbung:

Es wurden zwei verschiedene Arten von Gelen mit unterschiedlichen Proteasesubstraten eingesetzt. Bei den Blue-Casein Gelen war dieses Substrat bereits vorgefärbt, die Gelatine-Gele wurden entsprechend dem Protokoll für die Coomassie-Färbung für SDS-PAGE gefärbt.

4.5.16 Western-Blot

Für die immunologische Identifizierung der Alkoholdehydrogenase in Zellaufschlüssen von *Pichia pastoris* mittels Western-Blot wurden die zu untersuchenden Proben zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Proben wurden Zellaufschlüsse von *Pichia pastoris*-Zellen (s. 4.5.9) aus kontinuierlicher Fermentation in angemessener Verdünnung untersucht. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das zu der beschriebenen Elektrophoresekammer gehörige Blotting-Modul der Fa. Novex und PVDF-Membranen des gleichen Herstellers verwendet.

Der qualitative Nachweis bestimmter Proteine beruht auf den spezifischen Bindungseigenschaften von Antikörpern. Nach Übertragung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran werden zunächst die freibleibenden Bindungsstellen auf der Membran mit einem nicht-antigenen Protein, z.B. bovines Serumalbumin, abgesättigt. Anschließend wird der primäre Antikörper, z.B. anti-Alkoholdehydrogenase, an das zu detektierende Protein gebunden. Im zweiten Schritt wird nach dem Entfernen

von überschüssigem Primärantikörper der sekundäre Antikörper eingesetzt. Dieser bindet sich spezifisch an den Primärantikörper. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein Konjugat mit einem Enzym, welches eine Farbreaktion zu katalysieren vermag, z.B. alkalische Phosphatase. Nun ist an das zu detektierende Protein indirekt das Enzym alkalische Phosphatase gebunden.

Nach weiteren Waschschritten erfolgt dann die Entwicklung des Blots. Mit dem chromogenen Substrat BCIP/NBT kann das Zielprotein auf der Membran gezielt angefärbt werden. Durch die alkalische Phosphatase wird das BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) dephosphoriliert. Das entstehende BCI bildet mit dem NBT (Nitro-Blau Tetrazolium) einen unlöslichen, tiefblauen Farbstoff.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen:

Transferpuffer:	4,08 g·l ⁻¹ Bicin; 5,23 g·l ⁻¹ Bis-Tris; 0,3 g·l ⁻¹ EDTA; 100 ml·l ⁻¹ Methanol
Blockierpuffer	30,0 g·l ⁻¹ BSA; 9,0 g·l ⁻¹ NaCl; 10,0 ml·l ⁻¹ 1M Tris-HCl pH 7,5
Waschpuffer	100 ml·l ⁻¹ Blockierpuffer; 90 ml·l ⁻¹ 1M Tris-HCl pH 7,5; 9,0 g·l ⁻¹ NaCl; 1,0 ml·l ⁻¹ Tween 20
Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl pH 9,5; 1,0 g·l ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O
Entwicklerlösung:	1 Tablette „Sigma Fast™, BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet“ in 10 ml H ₂ O; das entspricht 0,15 g·l ⁻¹ BCIP; 0,3 g·l ⁻¹ NBT in Detektionspuffer
1. Antikörperlösung	IgG Fraktion anti-Alkoholdehydrogenase [Hefe] [Kaninchen]; 1:50000 in Waschpuffer
2. Antikörperlösung	anti-Kaninchen IgG-alkalische Phosphatasekonjugat [H&L] [Ziege]; 1:10000 in Waschpuffer

Trennung durch SDS-PAGE:

s. 4.5.13

Blot auf PVDF-Membran

Für die Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen wurde das beschriebene Blot-Modul mit den angegebenen Puffern verwendet. Für 60 min. wurde eine konstante Spannung von 25 V angelegt.

Entwicklung

- 20 ml Blockierpuffer, 1 h, 37 °C	Blockieren
- 20 ml 1. Antikörperlösung, 1 h, 37 °C	Binden prim. Antikörper
- 2 x 40 ml Waschpuffer, 15 min, 37 °C	Waschen
- 20 ml 2. Antikörperlösung, 1 h, 37 °C	Binden sek. Antikörper

-
- | | |
|---|---------------|
| - 2 x 40 ml Waschpuffer, 15 min, 37 °C | Waschen |
| - 25 ml Detektionspuffer, 10 min, 37 °C | Vorinkubation |
| - 10 ml Entwicklerlösung, RT | Entwickeln |
| - Spülen mit H ₂ O bei ausreichender Färbung | Stoppen |

Die entwickelten Blots wurden zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

4.5.17 Densitometrische Auswertung von SDS-Gelen

Zur Abschätzung der Reinheit des Produktes im Fermentationsüberstand wurden SDS-PAGE Gele mittels Densitometrie ausgewertet. Nachdem die Gele mit einem Flachbett-scanner digitalisiert worden waren, wurde dazu das Programm Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland) eingesetzt. Die densitometrische Auswertung beruhte auf der Zuordnung von Grauwerten für Einzelbereich des Gels in Laufrichtung. Die Verteilung dieser Grauwerte wurde durch das Programm in Form eines Chromatogramms, wobei auf der X-Achse die Laufweite des Proteins und auf der Y-Achse die Farbdichte dargestellt war. Eine Proteinbande erschien in dieser Darstellung als Peak und konnte durch Integration der Peakfläche in einen Zahlenwert umgesetzt werden.

4.5.18 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung wurde als Auftragsarbeit an das folgende Institut vergeben:

Universität Bielefeld
Arbeitsbereich Biochemie
Prof. Dr. Harald Tschesche
Universitätsstraße 23
33615 Bielefeld

Probenvorbereitung:

Die Proteine zur Sequenzierung wurden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Färbung mit Coomassie-Blue konnten die relevanten Banden ausgeschnitten und der Sequenzierung zugeführt werden.

4.5.19 Mut-phänotypische Charakterisierung von *Pichia pastoris*

Zur Charakterisierung des Mut-Phänotyps (Methanol ut_{il}ization) von *Pichia pastoris*-Isolaten wurde das Wachstum auf Agarplatten mit Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bewertet. Die Kultivierung fand stets bei Raumtemperatur statt.

Zunächst wurden durch den Ausstrich von zellhaltigem Proben auf YEP-Agar die zu untersuchenden Klone vereinzelt. Einzelkolonien wurden dann in ein Raster auf Ma-

sterplatten (YEP-Agar) übertragen. Ausgehend von diesen Masterplatten wurden die Kolonien durch replica-plating mittels Lederbergstempel auf YNB-Agarplatten übertragen, als einziges Substrat wurde Methanol angeboten, das in den Deckel der umgedrehten Platte pipettiert und über die Gasphase aufgenommen wurde. Für eine Platte erwies sich eine einmalige Gabe von 200 µl als ausreichend.

Die Differenzierung von Mut⁺- und Mut^S-Phänotypen erfolgte optisch durch Vergleich mit entsprechenden Referenzstämmen aus der Stammsammlung.

4.5.20 DNA-Fingerprinting

Die molekulargenetische Analyse von mutmaßlich mutierten Produktionsstämmen erfolgte als Auftragsanalyse durch die Firma

GEN-IAL GmbH

Mülheimer Straße, Tor 3, Geb. 159

D-53840 Troisdorf

Aus den isolierten Kulturen wurde zunächst die DNA isoliert und dann mittels RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) untersucht. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein „Fingerprinting“, das die PCR mit einbezieht und auf der Beobachtung beruht, daß mit Hilfe eines willkürlich gewählten Primers ein reproduzierbares Muster von DNA-Sequenzen amplifiziert wird. Die Methode wurde durch den zusätzlichen Restriktionsverdau der Amplifikate erweitert.

Mittels dieser Methode können solche Mutanten erkannt werden, bei denen sich die untersuchten Genbereich hinsichtlich der Länge unterscheiden, reine Austauschmutationen können nicht detektiert werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression von hCTRB mit *Pichia pastoris* im Schüttelkolben

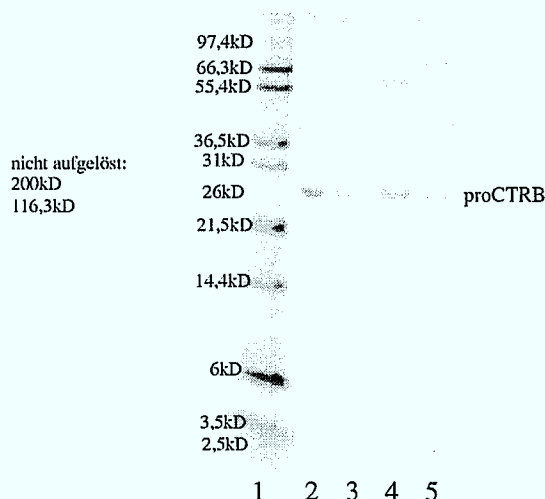


Abb. 5-1 : SDS-PAGE von Kulturüberständen aus Schüttelkolbenexpression. Auf den numerierten Spuren sind die folgenden Proben aufgetragen:

- 1 Größenmarker
- 2 hCTRB-Standard (26 kD)
- 3-5 versch. Ansätze im Schüttelkolben

Der Produktionsstamm #647 (pAOX) wurde zusammen mit dem Protokoll für die Expression im Schüttelkolben (4.4.5), von der Firma Mucos Pharma GmbH & Co bereitgestellt. Unter Verwendung des beschriebenen Protokolls wurden Produkttiter zwischen $6,0$ und $19,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ im Kulturüberstand bei einer durchschnittlichen Biotrockenmassenkonzentration von $10,7 \pm 1,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht. Die gelelektrophoretische Untersuchung der Fermentationsüberstände (Abb. 5-1) zeigte ein im Wesentlichen homogenes Produkt mit der erwarteten, apparenten Molekülmasse von ca. 26 kD.

5.2 Entwicklung eines Zulaufverfahrens

5.2.1 Etablierung eines Methanol-limitierten Zulaufverfahrens nach Literaturangaben

Auf der Grundlage gängiger Literatur [Cla91a] wurde mit dem Standard-Produktionsstamm #647 eine Fermentation im Zulaufverfahren (4.4.7) durchgeführt. Dabei wurden die Ausgangsparameter anhand der Ergebnisse des Kooperationspartners [Kla98] auf $\text{pH} = 5,5$ und $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die gesamte Fermentation festgelegt. Nach dem Ende der Wachstumsphase wurde die Methanoldosierung unter Verwendung der Oxygen-Peak-Methode allmählich erhöht. Im Verlauf von vier vergleichbaren Versuchansätzen wurde dabei die Dosierate immer weiter erhöht, wobei Biomassewachstum und Produktbildung proportional mit der Erhöhung der dosierten Methanolmenge anstiegen.

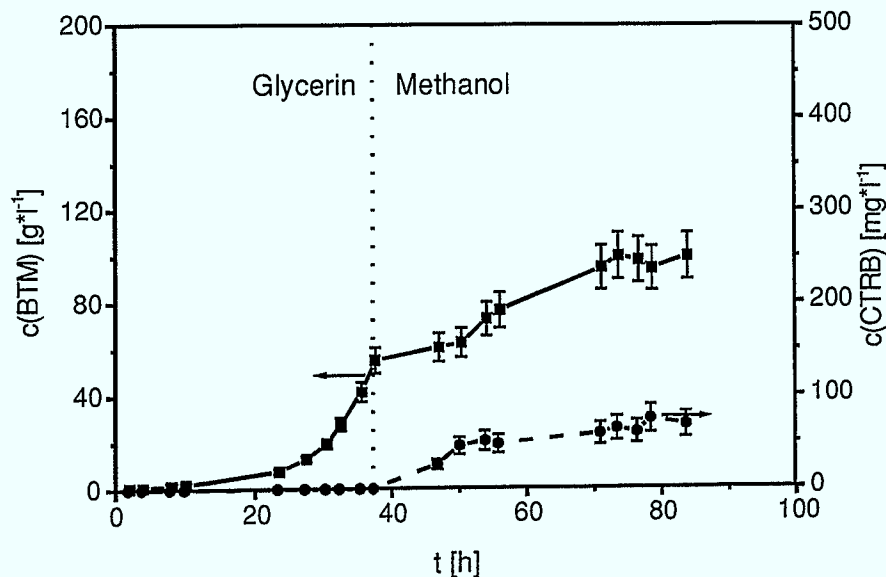


Abb. 5-2 : Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im Methanol-limitierten Zulaufverfahren. Die gepunktete, senkrecht zur Zeitachse stehende Linie zeigt den Zeitpunkt der Induktion durch Umschalten von Glycerin auf Methanol an.

In der gezeigten Beispielfermentation wurde eine maximale Dosiergeschwindigkeit von $185\text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ bei einem Startvolumen der Fermentation von 10 l eingesetzt. Mit Ausnahme kurzer Zeiträume nach Beginn der Induktion war während der gesamten Fermentationsdauer mittels Gaschromatographie kein Methanol im Fermentationsüberstand nachweisbar. Während des Prozesses wurde die C-Limitierung immer wieder mittels der Oxygen-Peak-Methode bestätigt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde durch die Adaptierung von Rührerdrehzahl, Begasungsrate und Druck über 30 % Luftsättigung gehalten. Bei einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von $100\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde nach 78,5 h Fermentationsdauer ein Produkttiter (gemessen als Aktivität) von $75\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,96\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Verläufe von

Biotrockenmasse- und Produktkonzentration sind in Abbildung 5-2 dargestellt. Die angegebenen Produkttiter sind hier wie in allen Angaben um den Volumenanteil der feuchten Biomasse korrigiert und beziehen sich auf die vollständige Fermentationsbrühe, nicht auf den Fermentationsüberstand.

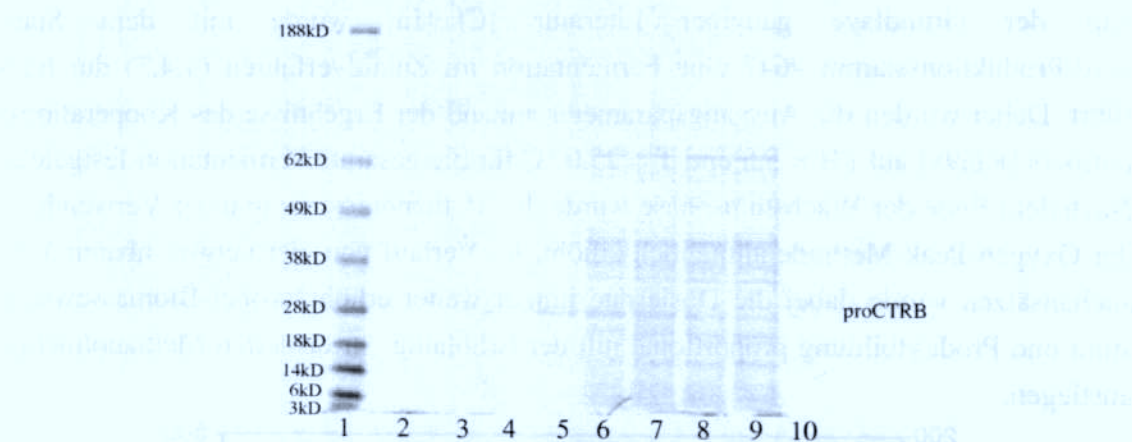


Abb. 5-3 : SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im Methanol-limitierten Zulaufverfahren (vgl. Abb. 5-2). Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	6	71,0 h
2	10,0 h	7	76,5 h
3	37,5 h	8	78,5 h
4	47,0 h	9	83,8 h
5	56,0 h	10	hCTRB-Standard (26 kD)

Wie das in Abb. 5-3 dargestellte Elektropherogramm zeigt, sind außer der Produktbande noch weitere Proteinbanden sichtbar. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Kultivierung im Schüttelkolben konnte also durch das Fermentationsverfahren eine erhebliche Steigerung des Titters erreicht werden, gleichzeitig trat aber auch eine deutliche Kontamination mit anderen Proteinen auf. Ob es sich dabei um Fremdproteine oder womöglich um Degradationsprodukte des Chymotrypsinogens handelte, war zu diesem Zeitpunkt in der Prozeßentwicklung noch unklar.

5.2.2 Nutristatische Prozeßführung für das Methanol-Zulaufverfahren

In dem verwendeten Expressionssystem ist der Promotor der Alkoholoxidase 1 von zweifacher Bedeutung. Zunächst kontrolliert er die Expression des Genes für das Zielprotein Chymotrypsinogen B, außerdem ist auch die Expression der homologen Alkoholoxidase unter seiner Kontrolle. Bei Wachstum auf Methanol werden also die Bildung des Zielproduktes und die primäre Oxidation der einzigen Kohlenstoff- und Energiequelle durch die gleiche regulatorische DNA-Sequenz gesteuert. Daraus folgt zwingend, daß die Verfügbarkeit von Methanol einen wesentlichen Einfluß auf Wachstum und Produktbildung haben muß. Dieser Aspekt wurde auch bereits in einigen Arbeiten untersucht [Gua97] [Kat98], wobei klar bestätigt werden konnte, daß der oben formulierte Gedanke schlüssig und zutreffend ist. Bislang liegen jedoch keine verlässlichen Informationen darüber vor, welche Methanolkonzentration eine optimale

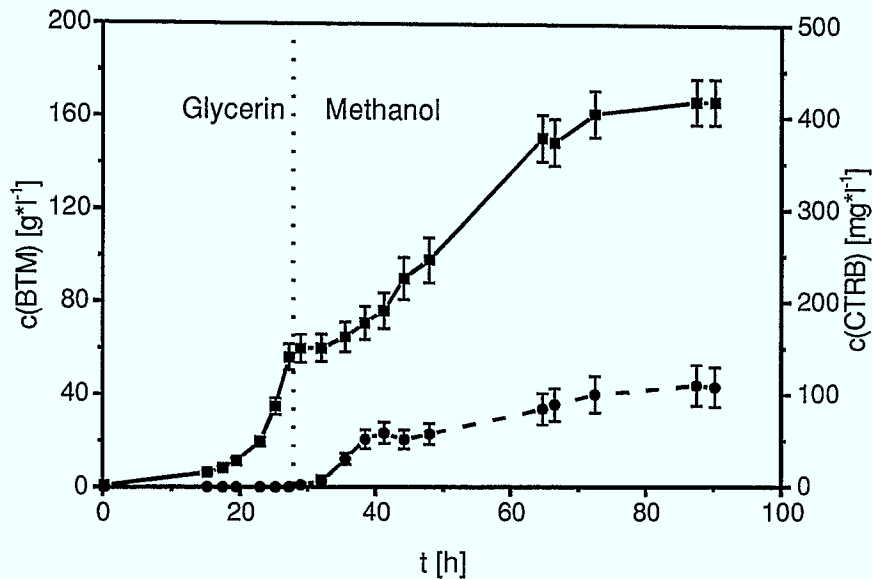


Abb. 5-4 : Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren. Die gepunktete, senkrecht zur Zeitachse stehende Linie zeigt den Zeitpunkt der Induktion durch Umschalten von Glycerin auf Methanol an.

tionen darüber vor, welche Methanolkonzentration eine optimale Induktion des AOX1-Promotors bewirkt.

Aus diesen Gründen wurde als Strategie zur Optimierung von Wachstum und Produktbildung bei der Herstellung von rekombinantem Chymotrypsinogen B mit *Pichia pastoris* eine nutristatische Prozeßführung gewählt. Unter Verwendung eines online-Sensors wurde die Methanolkonzentration auf einen Wert von ca. $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ geregelt. In ersten Versuchen zeigte sich, daß dieser Wert deutlich oberhalb der Sättigungskonzentration für die Induktion des AOX1-Promotors liegen muß, da auch erhebliche Konzentrationschwankungen von mehr als $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ um diesen Wert herum keine sensible Reaktion in der metabolischen Aktivität der wachsenden Zellen auslösten. Andererseits war auch noch kein toxischer Effekt zu erwarten, da eine Methanolkonzentration von 0,5 % Vol. = $3,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ standardmäßig bei der Expression im Schüttelkolben [Sre96] eingesetzt wird.

Bei der Etablierung des Verfahrens unter Verwendung von Standardrührkesselreaktoren traten jedoch erhebliche Schwierigkeiten auf. Durch das unlimitierte Wachstum der Zellen auf dem stark reduzierten Substrat Methanol konnte eine vollständige Sauerstofflimitierung der Kultur nur durch die Beimischung von Reinsauerstoff zur Prozeßluft verhindert werden. Um die Sauerstoffsättigung während des Fermentationsverlaufs auf dem angestrebten Minimalwert von 30 % Luftsättigung zu halten, wurde über einen in das Prozeßleitsystem „Medusa“ implementierten PID-Regler die Zusammensetzung der Prozeßluft automatisch eingestellt.

Obwohl diese Modifikation das Problem der unzureichenden Sauerstoffversorgung löste, wurde durch das nun auch hinsichtlich der Sauerstoffversorgung unlimitierte Wachstum die Kühlkapazität des Fermenters überlastet, so daß die Prozeßtemperatur von $25,0^\circ \text{C}$ nicht mehr gewährleistet werden konnte. Die hohe Wärmeentwicklung einer Hefe-

kultur bei Wachstum auf Methanol ist im Kapitel 3.4.3 anhand eines thermodynamischen Ansatzes beschrieben, bei der Fixierung von 1 mol Kohlenstoff in Biomasse werden als Abwärme 1183 kJ frei. Erst nach dem Wechsel in den unter 4.4.6 beschriebenen fest verrohrten 30 l-Fermenter, der mit zehnfach überdimensionierten Wärmetauschern (ausgelegt für 300 l-Fermenter) für den geschlossenen Kühlkreislauf ausgestattet war, konnte dieser hohen Wärmefreisetzung Rechnung getragen werden.

Die hier beschriebene Beispielfermentation wurde wie auch die im vorherigen Abschnitt beschriebene bei 25 °C und pH 5,5 durchgeführt. Nach dem Ende der Wachstumsphase wurde die Methanolkonzentration um den Sollwert 4 g·l⁻¹ geregelt. Die Sauerstoffsättigung wurde nach dem Erreichen den Maximalwerte für den Überdruck (1,8 bar), die Begasungsrate (36,7 l·min⁻¹) und Rührerdrehzahl (1111 rpm) durch die Beimischung von reinem Sauerstoff zur Begasungsluft auf 30 % Luftsättigung gehalten. Dabei wurde im Prozeßverlauf eine maximale Sauerstoffeintragsrate $OTR_{max.} = 2000 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht, der Sauerstoffpartialdruck in der Zuluft mußte dazu auf 850 mbar (unter Normalbedingungen) erhöht werden. Die damit korrespondierende maximale Dosierrate für das Substrat von 1025 ml·h⁻¹ MeOH (=25,3 mol·h⁻¹) bei einem aktuellen Prozeßvolumen von 23 l ergibt eine theoretische Wärmefreisetzung von 12272 kJ·h⁻¹ für das Gesamtsystem (Abb. 5-5). Das entspricht einer Heizleistung von 148 W·l⁻¹, die

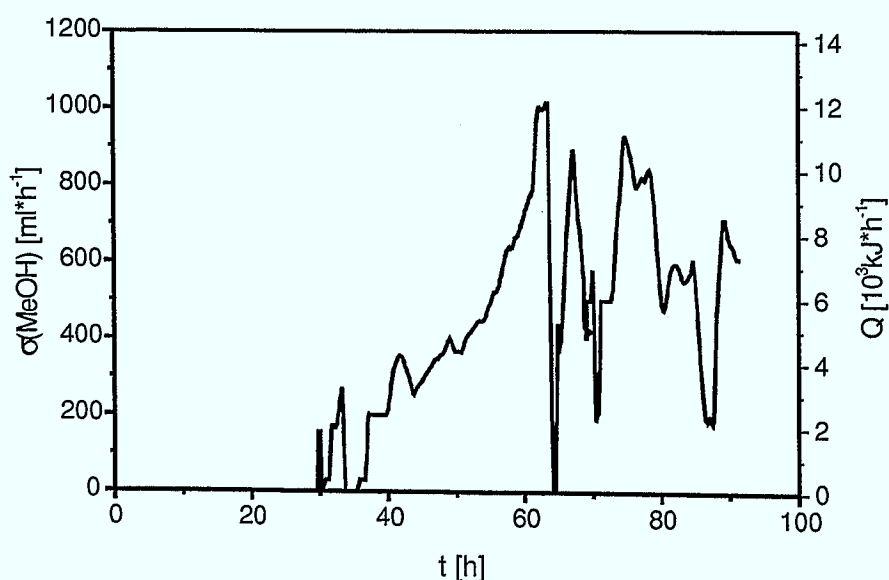


Abb. 5-5 : Online-Verlauf von Methanoldosierung (linke Y-Achse) und korrespondierender Wärmeentwicklung (rechte Y-Achse) für das Gesamtsystem in einer Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren bei pH 5,5.

durch entsprechende Kühlleistung ausgeglichen werden mußte.

Nach einer Fermentationszeit von 87,5 h wurde mit diesem Verfahren eine Biotrockenmassekonzentration von 167 g·l⁻¹ und eine Produktkonzentration von 110 mg·l⁻¹ (als Aktivität gemessen) erreicht. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,26 mg·l⁻¹·h⁻¹ und stellt somit zunächst nur eine geringe Verbesserung gegenüber dem limitierten Verfahren dar. Wie das Elektropherogramm in Abb. 5-6 zeigt, ist die Gesamt-

menge an Proteinen im Fermentationsüberstand jedoch gegenüber dem limitierten Verfahren deutlich erhöht, das 26 kD große Produkt ist gar nicht erkennbar.

Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, daß die reale Produktbildung wesentlich höher als die gemessene, apparente Produktbildungsrate war und letztere sich als Summe aus der Produktbildungsrate und einer annähernd gleich großen Abbaurate ergab. Es mußte also von einem erheblichen Verlust an Chymotrypsinogen B durch proteolytischen Abbau ausgegangen werden. Es konnte ausgeschlossen werden, daß dieser Abbau durch das eventuell aktivierte Chymotrypsin selbst hervorgerufen wurde, da im Fermentationsüberstand zu keiner Zeit chymotryptische Aktivität ohne vorherige Aktivierung mit Trypsin nachgewiesen werden konnte. Hingegen konnte mittels des Azocasein-Proteasenachweises (4.5.11) eine erhebliche, vorerst unspezifizierte Proteaseaktivität festgestellt werden (s. 5.2.4).

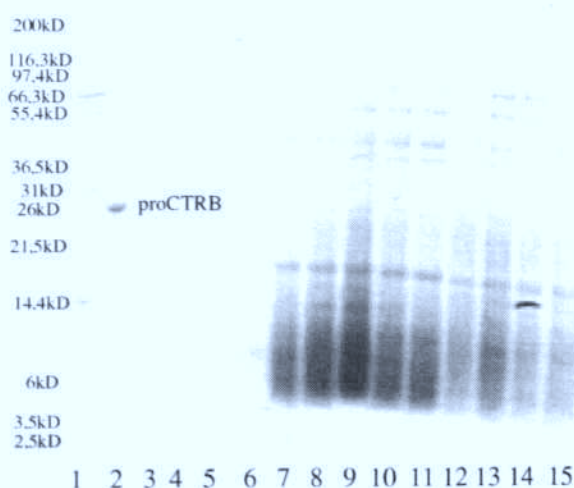


Abb. 5-6 : SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit dem Produktionsstamm #647 (vgl. Abb. 5-4). Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	9	82,50 h
2	CTRB-Standard	10	87,50 h
3	35,50 h	11	90,25 h
4	38,50 h	12	66,50 h, 1:2 verd.
5	44,25 h	13	82,50 h, 1:2 verd.
6	48,00 h	14	87,50 h, 1:2 verd.
7	64,75 h	15	90,25 h, 1:2 verd.
8	66,50		

Da durch diese Ergebnisse noch nicht klar aufgezeigt werden konnte, ob die zahlreichen kontaminierenden Proteine im Fermentationsüberstand sämtlich mit der im Folgenden näher charakterisierten proteolytischen Aktivität in Zusammenhang standen oder zumindest teilweise native Wirtsproteine darstellten, wurde nach dem gleichen Protokoll eine Fermentation mit dem „leer“ transformierten Stamm #774 durchgeführt. Dieser Stamm unterschied sich von dem Produktionsstamm #647 nur dadurch, daß das Plasmid, mit dem der Stamm transformiert wurde, kein Produktgen sondern nur den Selektionsmarker enthielt. Wie das Elektropherogramm in Abb. 5-7 zeigt, treten im Kulturüberstand dieses Stammes nur wenige der Proteine auf, die in den bisherigen Fermenta-

tionen beobachtet wurden. Die meisten dieser Proteine sind größer als 26 kD, bei diesen war ein Ursprung von dem 26 kD großen CTRB-Molekül auch nicht zu erwarten gewesen. Im Bereich der Molekulargewichte <26 kD sind im Überstand von #774 nur zwei schwache Banden bei ca. 21,5 kD und 14,5 kD sichtbar. Daraus konnte abgeleitet werden, daß es sich bei dem Großteil der kontaminierenden Proteine in den CTRB-Fermentationen um Abbauprodukte des Chymotrypsinogens handelte. Mit diesen Daten konform waren die Ergebnisse aus den Versuchen zur Aufreinigung des CTRB [Tho00]. Während die höhermolekularen Kontaminationen problemlos abgereichert werden konnten, zeigten die mutmaßlichen Abbauprodukte die gleichen Bindungs- und Extraktionseigenschaften wie das Zielprotein.

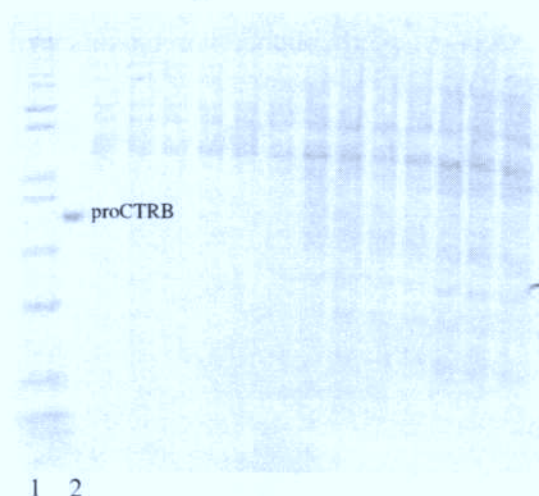


Abb. 5-7 : SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit dem Nicht-Produzenten #774 im zeitlichen Verlauf. Auf eine Zuordnung der Probenzeitpunkte wurde verzichtet

- 1 Größenmarker
- 2 CTRB-Standard

Eine Reduzierung des proteolytischen Produktabbaus sollte also eine erhebliche Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute und eine Vereinfachung der Aufarbeitung erwarten lassen.

5.2.3 Ansätze zur Kontrolle der extrazellulären proteolytischen Aktivität und der damit verbundenen Produktinstabilität

Pichia pastoris zeichnet sich im Vergleich zu vielen anderen Hefen durch eine geringe, extrazelluläre proteolytische Aktivität aus. Aufgrund der für *Pichia* üblichen Hochzell-dichtefermentation wurden jedoch als Produktionsstämme solche mit geringer Neigung zum Schäumen selektiert, diese haben in der Regel einen hohen Anteil vakuolärer Proteasen. Da während einer Fermentation ca. 1 % der Zellen lysiert, können diese in das Fermentationsmedium gelangen [Gle94]. Bislang wurden in *Pichia pastoris* drei verschiedene Genprodukte mit proteolytischer Aktivität identifiziert, es sind dies die Enzyme Proteinase A und B [Gle94] und Carboxypeptidase Y [Ohi96]. Eine besondere Bedeutung hat dabei die Proteinase A, die an der Aktivierung anderer Proteasen, z.B.

der Carboxypeptidase Y beteiligt ist.

Das Problem des proteolytischen Abbaus sekretierter Proteine in *Pichia*-Fermentationen ist in vielen Publikationen beschrieben worden und es wurden verschiedene Strategien zur Vermeidung des proteolytischen Produktabbaus entwickelt [Sre97]:

Wie alle Enzyme sind auch Proteasen in ihrer Aktivität pH-abhängig. Durch Variation des pH-Wertes kann weiterhin auch das Zielprotein stabilisiert werden. Eine Reduzierung des proteolytischen Produktabbaus in *Pichia pastoris* Fermentationen wurde bei pH-Werten zwischen 6,0 (humanes Serumalbumin) und 3,0 (muriner epidermaler Wachstumsfaktor) erzielt, der optimale pH-Wert ist also für jedes Protein individuell zu ermitteln.

Vielfach konnte eine Verminderung des Produktabbaus durch die Zugabe von Proteinhydrolysaten erzielt werden. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf einer kompetitiven Hemmung der Proteasen. Auch Proteaseinhibitoren wie Pepstatin [Cre93], PMSF [Sre88] oder EDTA wurden bereits erfolgreich eingesetzt.

Schließlich stehen mittlerweile Akzeptorstämme von *Pichia pastoris* zur Verfügung, bei denen die Gene von Proteinase A (*PEP4*) und / oder Proteinase B (*PRB1*) ausgeschaltet wurde.

Die Untersuchung der Einflußgrößen auf die proteolytische Aktivität erfolgte sowohl *in vitro* unter Verwendung von Fermentationsüberstand aus der oben angeführten Fermentation mit dem Standard-Produktionsstamm als auch *in vivo* durch Veränderung der Fermentationsbedingungen. Soweit möglich, wurden diese Fermentationsversuche unter Einsatz der Parallelfermentationsanlage, wie sie im Materialteil beschrieben ist, durchgeführt.

5.2.4 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität in Fermentationsüberständen

Inhibitor	Beschreibung	eingesetzte Konzentration	Effekt
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid Breitbandinhibitor, wirkt vornehmlich gegen Serinproteasen [Wol96]	0,5 mg·ml ⁻¹	keine Hemmung
Pepstatin A	hemmt spezifisch saure Proteasen, z.B. Pepsin, Rennin, Cathepsin D	0,7 µg·ml ⁻¹	keine Hemmung
Aprotinin	hemmt spezifisch Serinproteasen, z.B. Plasmin, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin aber nicht Thrombin, Faktor X	1,5·10 ⁻⁴ mg·ml ⁻¹	keine Hemmung
Boehringer complete	hemmt Serin-, Cystein- und Metalloproteasen	1 Tabl. in 50 ml	keine Hemmung
EDTA	komplexiert zweiwertige Metallionen, die von verschiedenen Proteasen benötigt werden. Stärkster Effekt bei Metalloproteasen.	15 mg·ml ⁻¹	60 % Hemmung

Tab. 5-1 : Charakterisierung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Pichia pastoris* mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität wurde diese zunächst quantifiziert. In Abbildung 5-8 ist der Verlauf der proteolytischen Aktivität in den beiden im Ab-

schnitt 5.2.2 beschriebenen Fermentationen aufgetragen. In beiden Verläufen steigt sie proportional mit der Biomasse an, die höhere Aktivität in dem nicht-produzierenden Stamm kann anhand des Versuchsansatzes nicht näher erklärt werden. Die in der Produktionsfermentation gemessene proteolytische Aktivität von maximal $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Pronaseäquivalent diente nun als Maß für die erreichten Verbesserungen.

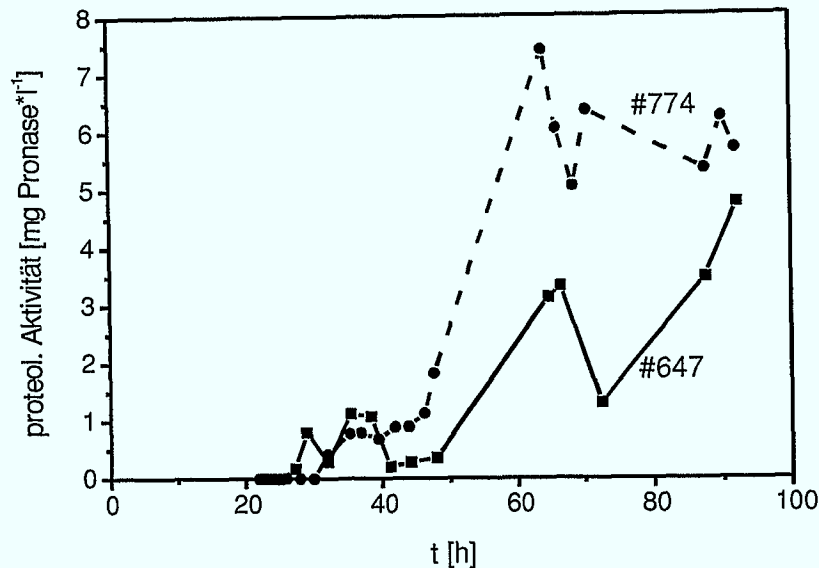


Abb. 5-8 : Verlauf der proteolytischen Aktivität in Fermentationen der Stämme #647 (Produzent) und #774 (Nicht-Produzent), dargestellt als Äquivalentkonzentration der Referenzprotease Pronase.

Die weitere Charakterisierung der proteolytischen Aktivität sollte nähere Informationen über Anzahl, Größe und Art der problematischen Proteasen bringen, um einen gezielten Ansatz zur Vermeidung des Produktabbaus entwickeln zu können. Eine exakte Identifizierung, womöglich sogar Isolierung wurde nicht angestrebt.

Durch den Einsatz verschiedener, zum Teil spezifischer Proteaseinhibitoren in Kombination mit dem Azocasein-Proteasenachweis sollte Aufschluß über die Art der vorkommenden Proteasen gewonnen werden (vgl. 3.2). Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind zusammen mit den Charakteristika der verwendeten Inhibitoren in Tabelle 5-1 zusammengefaßt. Die starke Hemmung durch EDTA legt nahe, daß zumindest ein erheblicher Teil der proteolytischen Aktivität von zweiwertigen Metallionen abhängig ist. Es kann sich dabei um echte Metallproteasen handeln oder um solche, die außerhalb des aktiven Zentrums Doppelsalzbrücken für die Stabilisierung ihrer räumlichen Struktur benötigen. Eine eindeutige Klassifizierung hätte allerdings die Hemmung durch mindestens einen weiteren Inhibitor vorausgesetzt. Dennoch ist dieses Ergebnis sehr hilfreich, da es die Möglichkeit nahelegt, durch den Zusatz von komplexierenden Agentien zum Fermentationsmedium die proteolytische Aktivität zu hemmen, ein Ansatz, dessen erfolgreiche Anwendung auch in der Literatur [Sre97] beschrieben wurde.

Zwei verschiedene Methoden wurden eingesetzt, um Daten zum Molekulargewicht der Proteasen zu erhalten. Neben dem Einsatz von Zymogramm-Gelen (4.5.15) wurden die Proteine im Fermentationsüberstand mittel Gelpermeationschromatographie (4.5.12)

aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mit dem Azocaseintest auf proteolytische Aktivität untersucht.

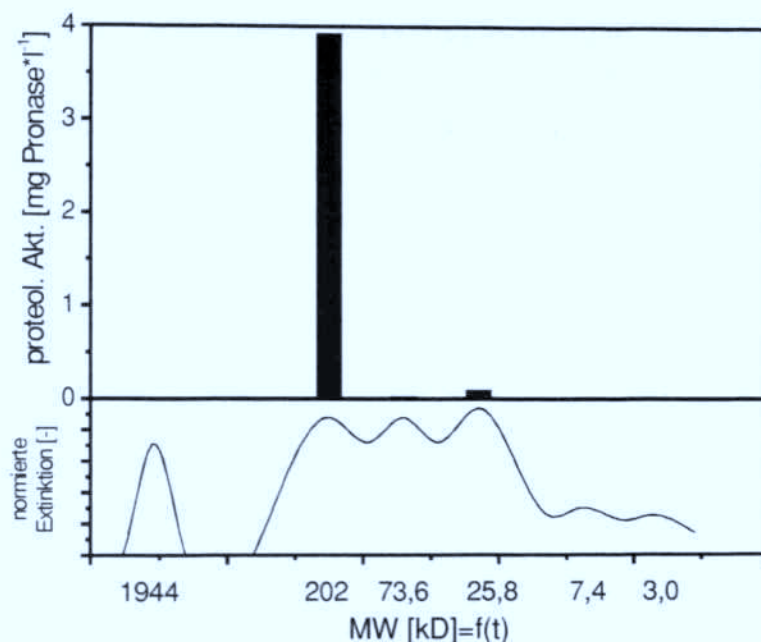


Abb. 5-9: Größencharakterisierung der proteolytischen Aktivität in Fermentationsüberstand von *Pichia pastoris*. Die untere Graphik zeigt das normierte Detektorsignal des Gelfiltrationslaufes. Die obere Graphik zeigt die proteolytische Aktivität in den Fraktionen, die den Detektionsmaxima zugeordnet wurden. Auf der gemeinsamen X-Achse ist das Molekulargewicht als Funktion der Elutionszeit aufgetragen.

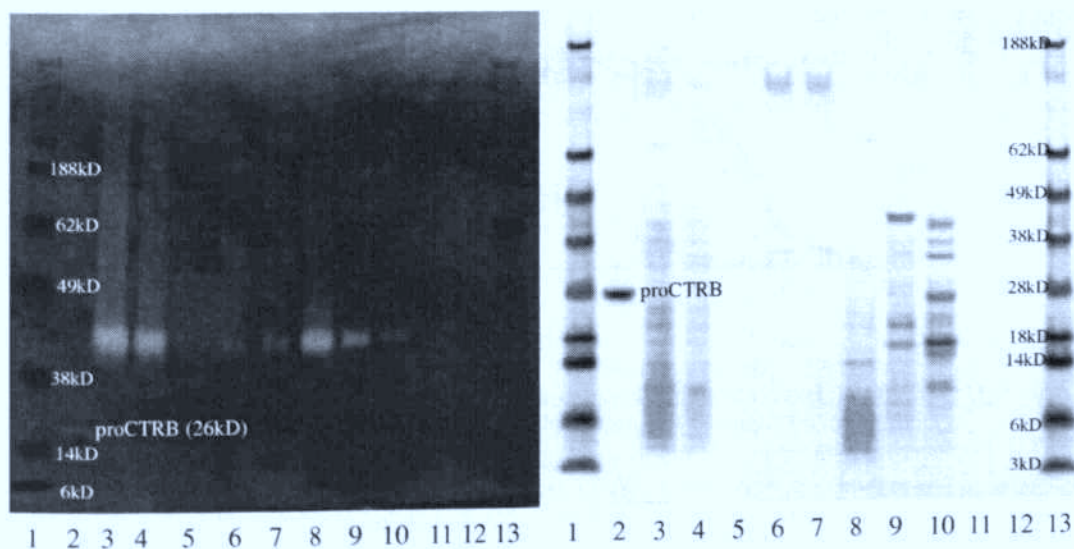


Abb. 5-10: Zymogramm (Gelatine, 10% Vernetzungsgrad) und SDS-PAGE (12% Vernetzungsgrad) mit identischer Probenbelegung. Durch den unterschiedlichen Vernetzungsgrad haben die Banden gleicher Größe leicht unterschiedliche Laufstrecken in den beiden verschiedenen Gelen.

1	Größenmarker (See-Blue)	8	73,6 kD
2	CTRB-Standard	9	25,8 kD-1
3	Auftrag 1:20 verd.	10	25,8 kD-2
4	Auftrag 1:40 verd.	11	7,0 kD
5	1950 kD	12	3,0 kD
6	202 kD-1	13	Größenmarker (See-Blue)
7	202 kD-2		

Durch den Einsatz von Zymogrammgelen mit zwei verschiedenen Proteasesubstraten und zusätzlich der Untersuchung von Fraktionen aus der Gelpermeationschromato-

graphie mittels Azocaseintest konnten zwei unterschiedliche proteolytische Aktivitäten nachgewiesen werden. Im Zymogramm mit Gelatine als Substrat konnte eindeutig ein proteolytisches Enzym mit einer ungefähren Größe von 50 kD (nach Gelpermeationschromatographie) identifiziert werden (Abb. 5-10). Im Zymogramm mit Blue-Casein als Substrat hingegen konnte diese Aktivität nicht gezeigt werden (Gel deshalb nicht dargestellt). Auch konnte diese Aktivität in den Fraktionen der entsprechenden Größe aus der Gelpermeationschromatographie mittels Azocaseintest nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres Protein mit proteolytischer Aktivität konnte in der 200 kD-Fraktion der Gelpermeationschromatographie durch den Azocaseintest nachgewiesen werden. Das Detektorsignal im Säulenablauf und die zugehörigen proteolytischen Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 5-9 dargestellt. Dieses Protein zeigte keine Aktivität gegenüber Gelatine.

5.2.5 Einsatz eines Protease A-defizienten Produktionsstammes

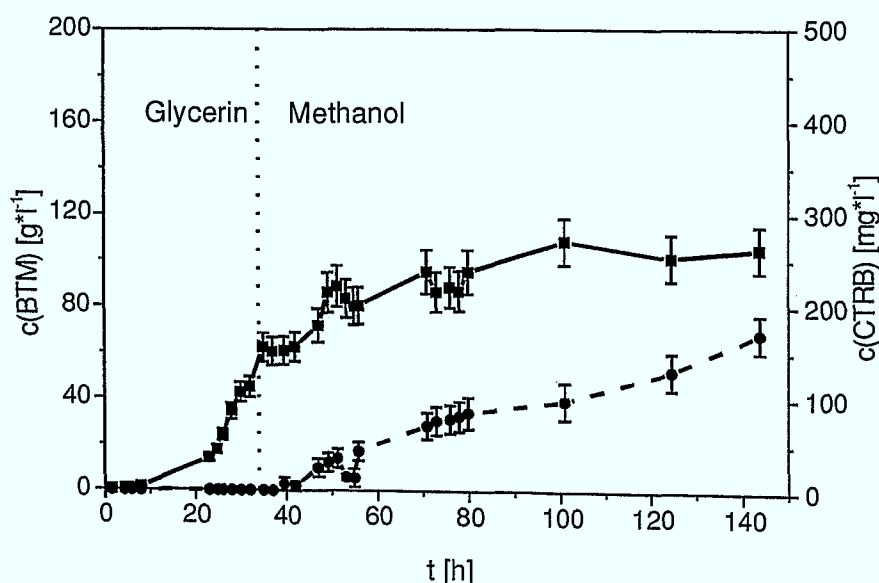


Abb. 5-11: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation des Protease A-defizienten Produktionsstammes im methanolgeregelten Zulaufverfahren. Die gepunktete, senkrecht zur Zeitachse stehende Linie zeigt den Zeitpunkt der Induktion durch Umschalten von Glycerin auf Methanol an.

Als ein Ansatz zur Reduzierung des proteolytischen Produktabbaus wurde die Verwendung von Protease A-defizienten Stämmen untersucht. Obwohl in dieser Fermentation, die nach dem gleichen Protokoll wie der Referenzversuch im methanolgeregelten Zulaufverfahren durchgeführt wurde, die im Überstand gemessene Proteaseaktivität nicht geringer war als bei den vorhergehenden Messungen (Daten nicht gezeigt), so zeigt doch die gelelektrophoretische Untersuchung des Kulturüberstandes eine signifikante Reduzierung des Produktabbaus (Abb. 5-12). Sowohl die Anzahl als auch der Anteil kontaminierender Proteine sind gegenüber der Fermentation mit dem Standardproduktionsstamm deutlich reduziert und die Produktbande bleibt klar erkennbar.

Nach einer Fermentationsdauer von 144 h wird ein Produkttiter von $171 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht (Abb. 5-11), das entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von $1,19 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Wachstumsrate des Stammes auf Methanol ist deutlich reduziert (Abb. 5-11), dieser Tatsache wurde durch die gegenüber anderen gezeigten Fermentationen verlängerte Prozeßdauer Rechnung getragen. Dennoch handelt es sich bei #787 um einen Mut^+ -Stamm, wie durch PCR-Untersuchungen gezeigt werden konnte [Kla98]. Wahrscheinlich ist die verminderte Vitalität der Stämme demnach auf den Ausfall der Proteinase A zurückzuführen. Diese vakuoläre Protease ist an der Aktivierung einer Vielzahl anderer Enzyme beteiligt, offensichtlich stellt ihr Ausfall eine erhebliche Belastung für die Zelle dar.

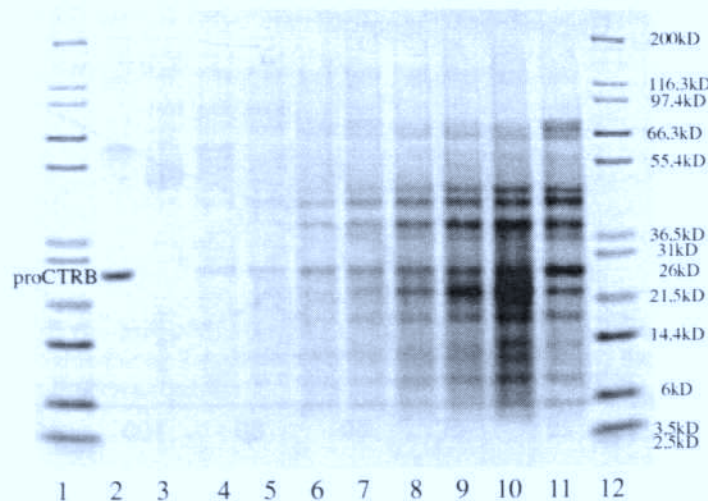


Abb. 5-12: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit dem Protease A-defizienten Produktionsstamm #787. Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	7	80,00 h
2	CTRB-Standard	8	101,00 h
3	32,00 h	9	124,50 h
4	49,25 h	10	143,75 h
5	55,00 h	11	Ernte 144 h, titriert auf pH 3
6	71,00 h	12	Größenmarker

Ein interessantes Phänomen zeigt sich in der letzten Fermentationsprobe, die auf das Elektrophoresegel in Abb. 5-12 aufgetragen wurde (Spur 11). Zwischen den Proben auf den Spuren 10 und 11 wurde die Fermentationsbrühe von 5,5 auf 3,0 titriert, was sich als Erfordernis aus der sich ebenfalls in Entwicklung befindlichen Aufarbeitungsprozedur [Tho00] ergeben hatte. Dieser Titrationsschritt erwies sich als gutes Mittel, die Belastung mit kontaminierenden Proteinen signifikant zu verringern. Offensichtlich wurde durch die pH-Verschiebung ein erheblicher Anteil der Kontaminanten präzipitiert, eine Beobachtung, die bereits bei der Aufreinigung des Proteins Bm86 aus Fermentationsbrühen von *Pichia pastoris* gemacht wurde [Bou97].

5.2.6 Verwendung von Proteinhydrolysat als kompetitivem Proteasehemmer

Wie bereits angesprochen, wird der Einsatz von Proteinhydrolysaten als Mittel zur Reduzierung des proteolytischen Produktabbaus empfohlen. Es wird davon ausgegangen,

daß die Oligopeptide und Aminosäuren in Proteinhydrolysaten als kompetitive Hemmer von Peptidhydrolasen agieren können [Cre93].

Unter Verwendung des Standardproduktionsstammes wurde eine Fermentation im Zulaufverfahren, allerdings noch Methanol-limitiert, durchgeführt. Dem Vorlagemedium wurden $18,75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Sojapepton zugegeben. Weiterhin wurde dem Glycerin-Zulaufmedium $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Sojapepton zugesetzt, im Methanol-Zulaufmedium war das Pepton unlöslich.

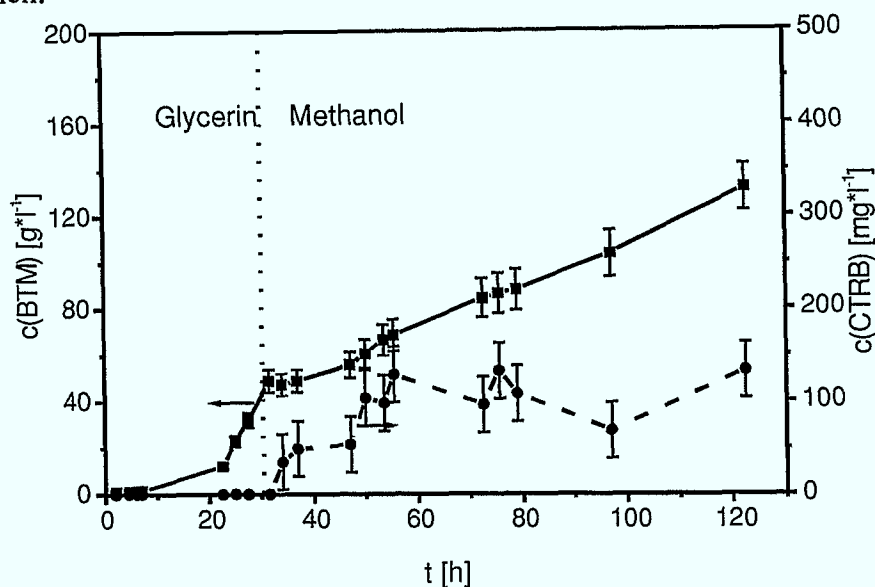


Abb. 5-13: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im methanollimitierten Zulaufverfahren mit Zugabe von Sojapepton.

Auf das Biomassewachstum (Abb. 5-13) zeigte das Pepton einen sehr positiven Einfluß, dies war auch zu erwarten gewesen. Obwohl nur eine vergleichsweise geringe Methanoldosierung von maximal $100 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ angelegt wurde, stieg die Biotrockenmassekonzentration auf $132 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ nach 122,5 h Fermentationszeit an, nach 97 h wurde ein Wert von $103,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen. Dies ist dem Biomassewachstum für die in Abschnitt 5.2.1 beschriebene Fermentation vergleichbar, hier war allerdings eine wesentliche höhere Substratdosierung von $185 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ Methanol eingesetzt worden. Durch das Sojapepton werden den Zellen zusätzliche Nährstoffquellen angeboten, die sich in einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen niederschlagen.

Bei der Messung der Produktkonzentration traten erhebliche Störungen auf, wie schon aus dem ungleichmäßigen Verlauf des gemessenen Titors in Abb. 5-13 erkennbar wird. Da derartige Probleme in keiner anderen Fermentation auftraten, müssen sie auf eine Störung durch das Pepton zurückzuführen sein. Legt man die Meßwerte dennoch für die Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute zugrunde, so ergibt sich bei einem Produkttiter von $132,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ nach 122,5 h ein Wert von $1,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für die gesamte Fermentationsdauer. Dies stellt keinerlei Verbesserung gegenüber den bisher erreichten Werten dar. Das Maximum der RZA im Fermentationsverlauf wurde allerdings nach 55,5 h mit $2,32 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ beobachtet. Für diesen Zeitpunkt war bereits ein Titer von 129 mg ge-

messen worden. Hinsichtlich der Reinheit des Produktes wurde, wie aus dem Elektropherogramm des Kulturüberstandes (Abb. 5-14) hervorgeht, kein positiver Einfluß festgestellt. Es ist eine Vielzahl von kontaminierenden Proteinen erkennbar, die Produktbande ist vor dem starken Hintergrund zum Teil nicht mehr sichtbar.

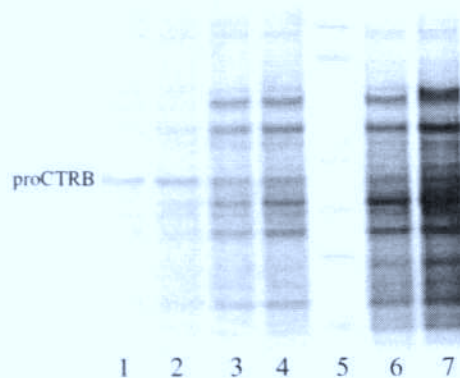


Abb. 5-14: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im methanollimitierten Zulaufverfahren unter Zugabe von Pepton. Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	47,00 h	5	Größenmarker
2	55,50 h	6	97,00 h
3	72,50 h	7	122,50 h
4	75,50 h		

Da die Produktreinheit die primäre Zielgröße der geschilderten Untersuchungen war und durch den Zusatz von Pepton außer den beschriebenen Störungen in der Produktmessung auch erhebliche Probleme in der Aufarbeitung zu erwarten waren, muß der Einsatz von Sojapepton als Medienzusatz für die Herstellung von humanem Chymotrypsinogen mit *Pichia pastoris* als ungeeignet abgelehnt werden.

5.2.7 Untersuchungen zum Einfluß von Temperatur und pH-Wert auf die Produktstabilität

Wie bereits im übergeordneten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben, kann über den pH-Wert des Fermentationsmediums ein erheblicher Einfluß auf die Produktstabilität genommen werden. Das Optimum für den jeweiligen Prozeß ist jedoch von dem individuellen Zielprotein abhängig. Eine Stabilisierung der Produktes wurde bei pH-Werten zwischen 3 und 6 erreicht. Da wie bei allen Enzymen auch bei den Enzymen, die den Produktabbau im Überstand verursachen, die Temperatur einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat, wurde der Einfluß der beiden Parameter Temperatur und pH-Wert in einem zweidimensionalen Parameterraum untersucht. Die Untersuchung dieses Versuchsraumes erfolgte unter Einsatz der im Methodenteil beschriebenen Parallelfermentationsanlage im vereinfachten Zulaufverfahren (4.4.10).

Für die Versuche wurde zunächst ein Parameterraum festgelegt, der die Bereich zwischen pH 2 und pH 7 sowie zwischen 25,0 und 30,0 °C festgelegt. Bereits die ersten

Versuche zeigten jedoch, daß bei pH 2 gar kein und bei pH 7 nur ein sehr geringes Wachstum der Zellen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt) so daß diese Bereiche von den weiteren Versuchen ausgenommen wurden. Weiterhin wurde der Bereich um den pH-Wert 4 ausgeklammert, da unter diesen Bedingungen eine Flockulation der Zellen auftrat.

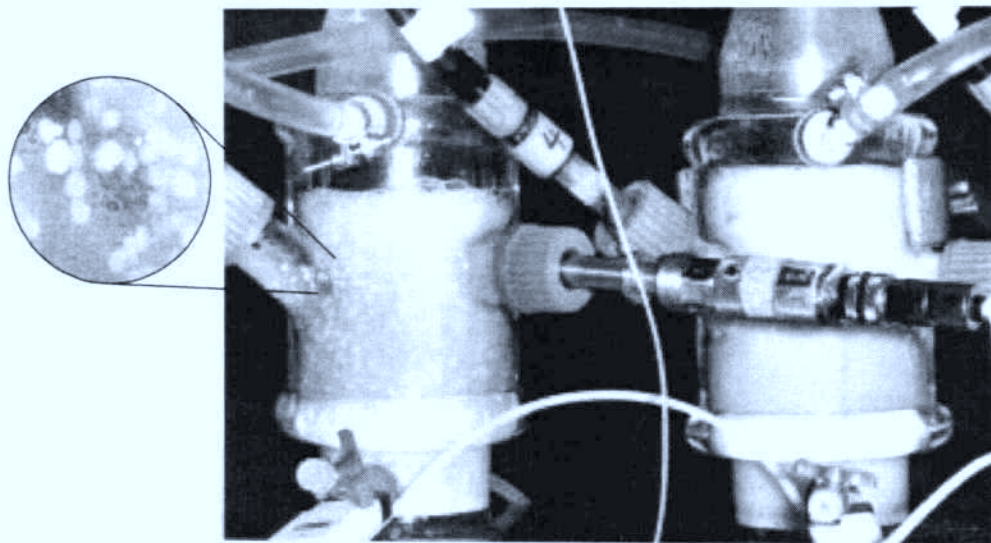


Abb. 5-15: Fermentation von *Pichia pastoris* in Blasensäulenbioreaktoren, links flockulierende Zellen bei pH 4, rechts vollständig dispergierte Zellen bei pH 5.

Das Phänomen der Flockulation bei Hefen ist seit langer Zeit bekannt und wird z.B. in Brauereiprozessen gezielt für die Abtrennung von Biomasse eingesetzt [Ste75]. Die Flockenbildung beruht auf der Wechselwirkung zwischen Lektinen und Kohlenhydraten, z.B. Mannanen, auf der Zelloberfläche unter Beteiligung von zweiwertigen Kalziumionen [Bel95]. Die genetische Determination der Flockulationsneigung durch unterschiedliche Zusammensetzung der Oberflächenmannane wurde für *Pichia pastoris* nachgewiesen. [Mbw90]. Der pH-Wert beeinflusst das Flockulationsverhalten über das elektrokinetische Potential der Zelloberfläche, weitere Einflußgrößen sind die Temperatur und die Ionenstärke im Medium. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen im ungerührten Blasensäulenreaktor kam es im pH-Wertbereich zwischen 3,5 und 4,5 zu der Bildung von bis zu 4 mm großen Zellaggregaten (Abb. 5-15), verbunden mit einer Reduzierung der Stoffwechselrate, vermutlich durch Diffusionslimitierung in den Flocken. Die Bildung der Zellaggregate war durch Verschiebung des pH-Wertes in eine Richtung vollständig reversibel und auch reproduzierbar.

Der nach diesen Einschränkungen verbleibende Parameterraum ist in Abbildung 5-16 dargestellt. Innerhalb des verbleibenden Raumes wurden neun Punkte durch Fermentationen im vereinfachten Zulaufverfahren untersucht. Dabei wurden Produkttiter, Produktreinheit und die biomassespezifische proteolytische Aktivität im Kulturüberstand bewertet. Es wurde hier die biomassespezifische proteolytische Aktivität gewählt, um den Einfluß des Wachstums auf diese Meßgröße zu eliminieren. Der Produkttiter hingegen wurde als volumetrische Größe betrachtet.

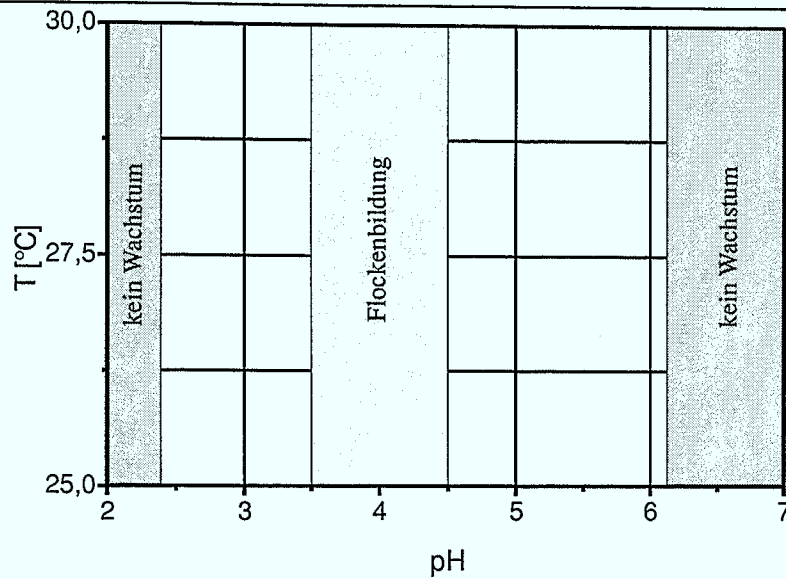


Abb. 5-16: Unter Einsatz der Parallelfermentationsanlage untersuchter Parameterraum. Die grau hinterlegten Flächen umreißen die Bereiche, die von der Untersuchung ausgenommen werden mußten (hellgrau: Flockenbildung, dunkelgrau: kein Wachstum).

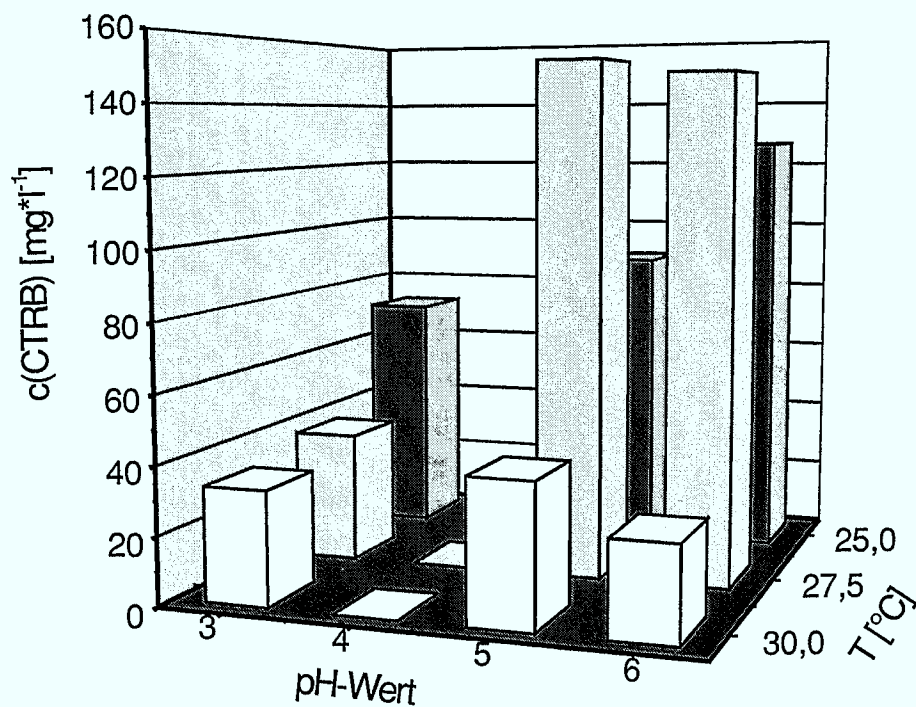


Abb. 5-17: Abhängigkeit der Chymotrypsinogentiters (Endwert) von pH-Wert und Temperatur.

Wie die Darstellung des Produkttiters in Abbildung 5-17 zeigt, liegt das Temperaturoptimum der Produktbildung bei 27,5 °C. Eine Erhöhung der Temperatur auf 30 °C verursacht eine deutliche Verringerung der Produktbildungsrate während der Abfall zu tieferen Temperaturen hin weniger steil ist. Bei der Betrachtung des pH-Wertes ist zwischen pH 5 und pH 6 keine signifikante Differenzierung möglich, die Fermentation bei pH 3 führt zu einer Verringerung der gemessenen Aktivität. Das Optimum der Produktbildung innerhalb des betrachteten Parameterraumes liegt somit bei einer Temperatur von 27,5 °C und einem pH-Wert von 5-6. Dieser Wert wurde auch als Optimum für das

Wachstum der Zellen identifiziert (Daten nicht gezeigt).

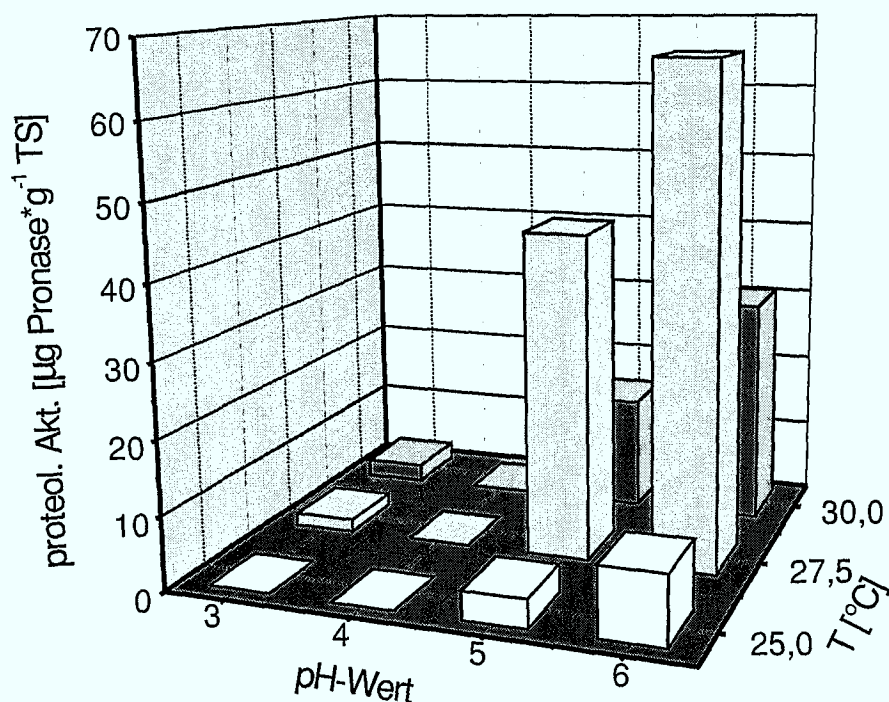


Abb. 5-18: Abhängigkeit der biomassespezifischen proteolytischen Aktivität von pH-Wert und Temperatur. Zu beachten ist die gegenüber Abb. 5-17 umgekehrte Temperaturachse.

Wie aber aus Abbildung 5-18 klar hervorgeht, liegt genau hier auch das Maximum der proteolytischen Aktivität. Die Proteaseaktivität im Überstand steigt mit höherem pH-Wert sehr deutlich an und zeigt ein Temperaturoptimum bei 27,5 °C. Bei 25,0 °C und pH 3 kann im Kulturüberstand keine proteolytische Aktivität gemessen werden. Die Darstellung des Elektropherogramms der Kulturüberstände in Abbildung 5-19 macht deutlich, daß sich die Reinheit des Produktes umgekehrt proportional zur gemessenen proteolytischen Aktivität verhält und dadurch die Signifikanz dieses Parameters bestätigt. Während sich bei höheren pH-Werten und Temperaturen die aus den bisherigen Versuchen bekannte Vielzahl von kontaminierenden Proteinbanden zeigt, ist in der Auftrennung des Kulturüberstandes aus der Fermentation bei pH 3 und 25 °C nur eine einzige prominente Bande zu erkennen, dies ist die Produktbande. Die Verschiebung des pH-Wertes verursacht also nicht nur eine Reduzierung des Produktabbaus sondern auch eine erhebliche Verringerung der *Pichia*-eigenen, kontaminierenden Proteine.

Da bereits früher festgestellt wurde (vgl. Abb. 5-12), daß eine Ansäuerung der Fermentationsbrühe auch im Nachhinein zu einer Reduzierung der Kontamination führt, kann davon ausgegangen werden, daß durch den niedrigen pH-Wert fast alle kontaminierenden Proteine präzipitiert wurden. In einem einfachen Versuch wurde klarer Kulturüberstand aus einer Fermentation bei pH 5,5 auf pH 3 titriert. Es zeigte sich ein deutlicher Niederschlag, nach dessen Abtrennung durch Zentrifugation war im Überstand keine proteolytische Aktivität mehr meßbar. Durch Rückstellung des pH-Wertes auf 5,5 konnten im Überstand und im resuspendierten Niederschlag nur sehr geringe proteolytische Aktivitäten nahe der Nachweisgrenze gemessen werden. Über die Präzipitation hinaus

erfolgt also eine weitgehend irreversible Inaktivierung der Proteasen im Fermentationsüberstand. Chymotrypsinogen hingegen ist bei diesem pH-Wert maximal stabil (Anhang D) und bleibt löslich.

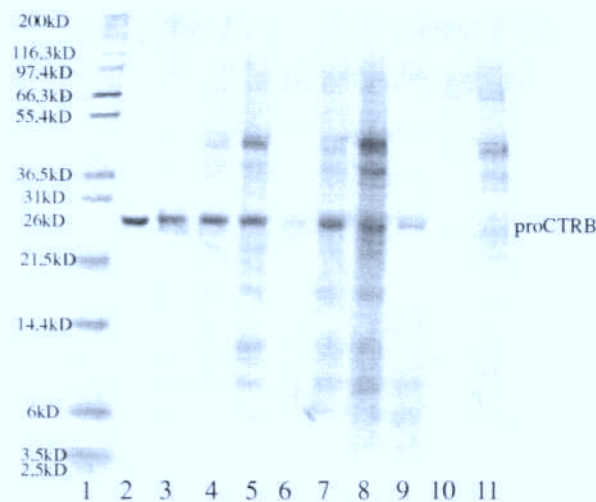


Abb. 5-19: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus den Fermentationen zur Untersuchung der Einflüsse von pH-Wert und Temperatur auf die Reinheit des Produktes Chymotrypsinogen B. Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	7	27,5 °C, pH 5
2	CTRB-Standard	8	27,5 °C, pH 6
3	25,0 °C, pH 3	9	30,0 °C, pH 3
4	25,0 °C, pH 5	10	30,0 °C, pH 5
5	25,0 °C, pH 6	11	30,0 °C, pH 6
6	27,5 °C pH 3		

Aufgrund der sehr ähnlichen Maxima für Produktbildung und Produktabbau muß die Zielsetzung, ein sauberes Produkt zu erhalten, in einen Kompromiß aus Produkttiter und Produktreinheit münden. Dabei ist alleine schon im Hinblick auf die der Fermentation folgende Aufarbeitung einer höheren Reinheit des Produktes das wesentlich höhere Gewicht beizumessen. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Fermentationen das hier identifizierte Minimum der proteolytischen Aktivität, pH 3,0 und 25 °C, als Parametersatz festgelegt.

Wie die Ergebnisse zeigen, genügte die Verschiebung des pH-Wertes auf 3, um ein Produkt zu erhalten, das weitestgehend frei von Kontaminationen ist. Auf die Einbringung der weiteren Möglichkeiten, die zu einer Verringerung des Produktabbaus führten, z.B. die Verwendung Protease A-defizienter Produktionsstämme, konnte deshalb verzichtet werden.

5.2.8 Optimierte Methanol-Zulaufverfahren

Auf der Grundlage der im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurde ein optimiertes Zulaufverfahren durchgeführt. Nachdem die Wachstumsphase mit Glycerin als Substrat bei pH 5,0 durchgeführt worden war, vorher bei 5,5, wurde mit der Induktion durch Methanol der pH-Sollwert auf 3,0 umgestellt. Die wachsende Kultur säuerte sich dann selbst auf diesen Wert an. Alle anderen Fermentationsparameter

blieben gegenüber der in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Fermentation im methanolgeregelten Zulaufparameter unverändert.

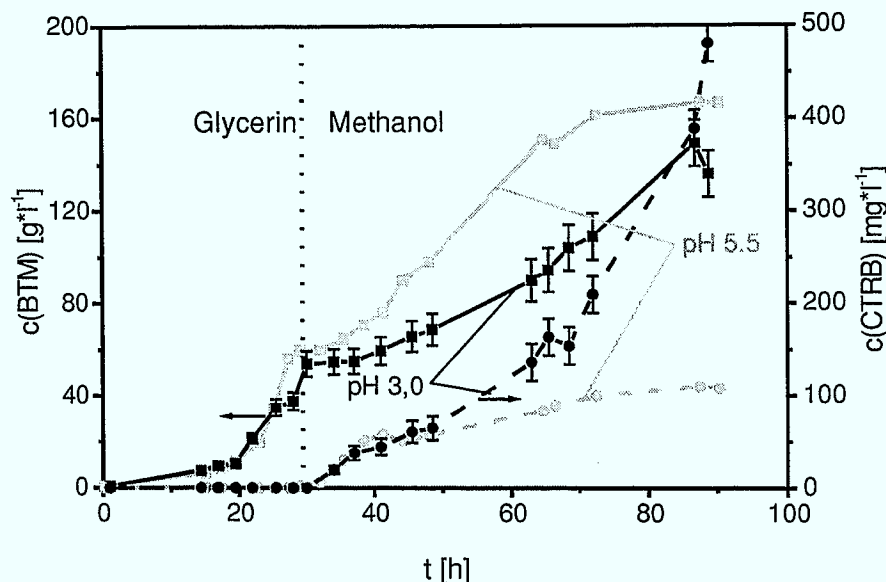


Abb. 5-20: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im Methanol-geregelten Zulaufverfahren bei pH 3 während der Produktionsphase. Hinter den schwarz dargestellten Daten ist zum Vergleich in hellgrau die Ursprungsfermentation bei pH 5,5 dargestellt (Abb. 5.4).

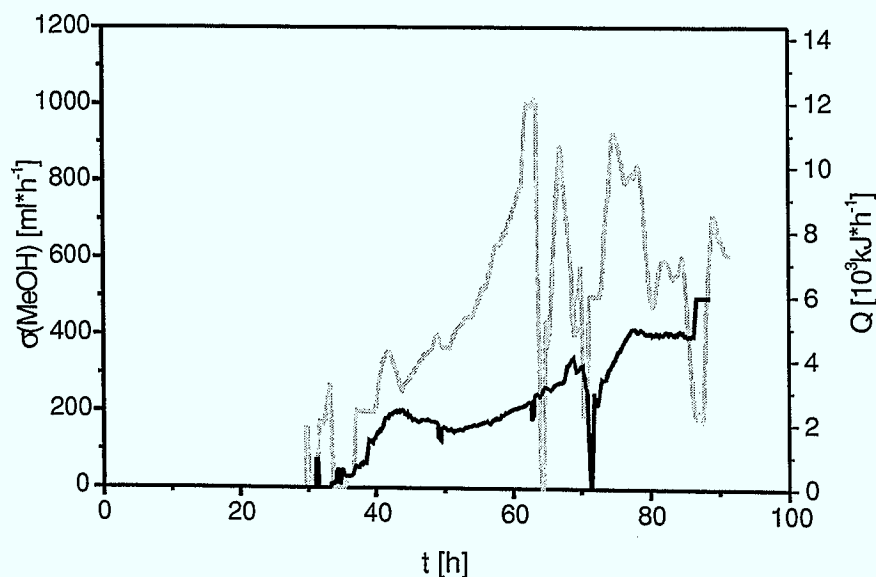


Abb. 5-21: Online-Verlauf von Methanoldosierung (linke Y-Achse) und korrespondierender Wärmeentwicklung (rechte Y-Achse) für das Gesamtsystem in einer Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren bei pH 3,0. Hinter den schwarz dargestellten Daten ist zum Vergleich in hellgrau die Ursprungsfermentation dargestellt (Abb. 5-5).

Mit dem veränderten Fermentationsprotokoll wurde nach 88,75 h Fermentationszeit ein Produkttiter von 480,5 mg·l⁻¹ (800 mg·l⁻¹ im Überstand) erreicht bei einer Biotrockenmassekonzentration von ca. 150 g·l⁻¹ (Abb. 5-20). Das entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 5,4 mg·l⁻¹·h⁻¹. Gegenüber dem Ausgangsverfahren mit der gleichen Methanolsollkonzentration und dem selben Produktionsstamm bedeutet das ein ~~Steigerung um 430%, eine RZ-Ausbeute von 2,3 mg·l⁻¹·h⁻¹ gemessen (s. 5.2.2).~~

Die Darstellung des Elektropherogramms von Kulturüberständen aus dieser Fermentation in Abbildung 5-21 zeigt, daß nur eine einzige Proteinbande, die des Produktes Chymotrypsinogen B, deutlich sichtbar ist. Die Reinheit des Produktes liegt weit über 95 %. Im Vergleich dazu war in dem Elektropherogramm der Kulturüberstände aus der Ausgangsfermentation bei pH 5,5 die Produktbande vor dem Hintergrund der kontaminierenden Protein praktisch nicht mehr erkennbar.

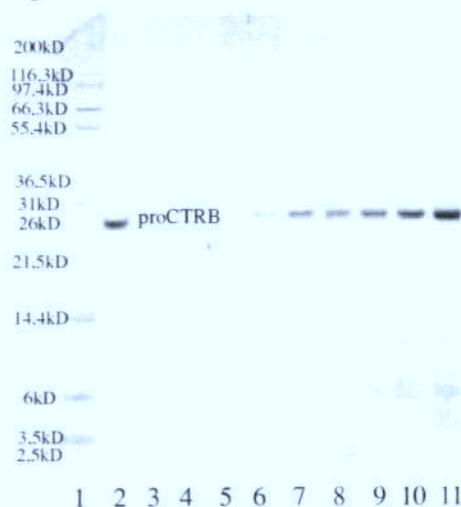


Abb. 5-22: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren bei pH 3,0 (vgl. Abb. 5-21). Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	7	41,00 h
2	CTRB-Standard	8	48,50 h
3	19,50 h	9	63,00 h
4	25,50 h	10	72,00 h
5	30,00 h	11	88,75 h
6	34,00 h		

Die Tatsache, daß der Kulturüberstand weitestgehend frei ist von Abbauprodukten und dadurch die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem Ausgangsprozess wesentlich wurde, korrespondiert mit der Messung der proteolytischen Aktivität im Fermentationsüberstand. Wie in Abbildung 5-23 im Vergleich mit den Meßwerten aus der Ausgangsfermentation dargestellt ist, wurde während der Produktionsphase bei pH 3 praktisch keine proteolytische Aktivität nachgewiesen.

Bei Betrachtung des Verlaufes der Biomassekonzentration in Abbildung 5-20 wird deutlich, daß durch den veränderten Fermentations-pH die Wachstumsrate verringert wird. Dies ist angesichts der in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Probleme mit Sauerstoffeintrag und Kühlung ebenfalls als sehr positiv zu werten. Durch die Verringerung der Wachstumsrate wurde der Spitzenwert der Sauerstoffeintragsrate OTR auf $OTR_{max} = 870 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ reduziert, zur Verwirklichung dieser Eintragsleistung bei 30 % Luftsättigung im Fermenter genügte ein Sauerstoffpartialdruck von 250 mbar (unter Normalbedingungen) bei identischen Werten für Überdruck (1,8 bar), Begasungsrate ($36,6 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$) und Rührerdrehzahl (1120 rpm). Die maximale Dosierate für Methanol während der optimierten Fermentation betrug $324 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \text{ MeOH}$ ($=10,1 \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1}$) bei einem aktuellen Prozeßvolumen von 17,0 l zum Zeitpunkt des maximalen Methanolkonsums.

Daraus ergibt sich eine theoretische Wärmefreisetzung von $4.911 \text{ kJ} \cdot \text{h}^{-1}$ für das Gesamtsystem (Abb. 5-21), was einer Heizleistung von $80 \text{ W} \cdot \text{l}^{-1}$ entspricht. Demgegenüber wurden für die methanolgeregelte Fermentation bei pH 5,5 noch $12.272 \text{ kJ} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb. 5-5) berechnet.

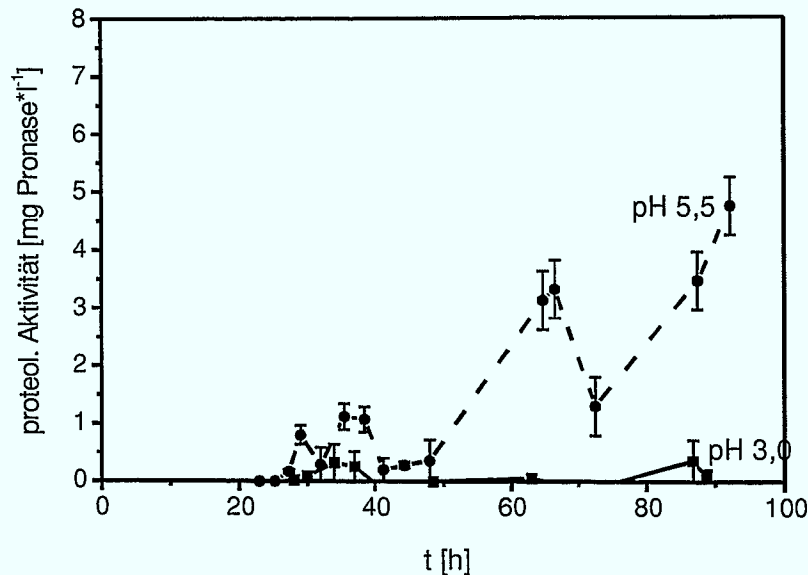


Abb. 5-23: Verlauf der proteolytischen Aktivität in Fermentationen im Methanol-geregelten Zulaufverfahren bei pH 3,0 (durchgezogene Linie, Quadrate) und pH 5,5 (Striche, Kreise), dargestellt als Äquivalentkonzentration der Referenzprotease Pronase.

Zusammenfassend betrachtet, konnten durch die Optimierung des pH-Wertes während der Produktionsphase drei wesentliche Verbesserungen im Produktionsprozeß für rekombinantes Chymotrypsinogen B mit *Pichia pastoris* erreicht werden. Durch die Verringerung des proteolytischen Produktabbaus wurde eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um 430 % auf $5,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erzielt. Das Produkt liegt in hoher Reinheit im Fermentationsüberstand vor. Schließlich wurde durch die Reduzierung der maximalen Wachstumsrate und, damit einhergehend, durch die Reduzierung von Sauerstoffeintrag und Kühlleistung, die Prozeßführung an technische Grenzen adaptiert.

Dennoch ist zu bemerken, daß ein OTR von $870 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in industriell einsetzbaren Großfermentern keinesfalls zu verwirklichen ist. Ein Scale-Up des Verfahrens in genau der geschilderten Form wäre deshalb nicht möglich. In einem industriellen Rührkessel-fermenter wäre ein OTR von weniger als $300 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zu erwarten. Etwas höhere Eintragsraten würde der Einsatz von speziell abgestimmten Airliftfermentern versprechen, mit einem speziell für die Produktion der Futterhefe *Candida utilis* entwickelten Airlift-Umwurfsystem wurde bei einem Arbeitsvolumen von 75 m^3 ein maximaler Sauerstoffeintrag von $\text{OTR} = 309 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($9,9 \text{ kg O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) verwirklicht [Ich93]. Durch das ungünstigere Oberflächen-Volumen-Verhältnis bei größeren Fermenter wäre weiterhin mit Problemen bei der Abführung der Prozeßwärme zu rechnen. Bei der Konzeption des angesprochenen Airliftfermenters wurde dem durch interne Wärmetauscherrohre im Strömungsleitsystem des Bioreaktors Rechnung getragen.

5.2.9 C-limitierte Fermentation mit Glucose als Substrat

Als Alternative zu dem bislang verfolgten Ansatz mit dem Alkoholoxidase 1-Promotor wurde auch ein Produktionsstamm untersucht, bei dem die Expression des CTRB-Genes unter die Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Promotors gestellt worden war. Analog zur der ursprünglich für die anderen Stämme (5.2.1) eingesetzten Fermentationsstrategie wurde ein substratlimitiertes Zulaufverfahren durchgeführt, wie es im Methodenteil beschrieben ist. Der pH-Wert wurde auf 5,5 geregelt.

In einer Fermentationszeit von 74 h wurde ein Produkttiter von 220 mg·l⁻¹ erreicht, das entspricht eine Raum-Zeit-Ausbeute von 2,97 mg·l⁻¹·h⁻¹ (Abb. 5-24). Damit bleibt das Verfahren deutlich hinter dem Ansatz des Methanol-geregelten Zulaufverfahrens zurück. Das Elektropherogramm der Kulturüberstände aus dieser Fermentation (Abb. 5-25) zeigt, daß bei Wachstum auf Glucose kein wesentlicher proteolytischer Abbau des Produktes erfolgte. Diese Tatsache mag zunächst als positiv erscheinen, bedeutet aber auch, daß mit einem Optimierungserfolg wie bei der Entwicklung des Methanol-Verfahrens nicht zu rechnen ist.

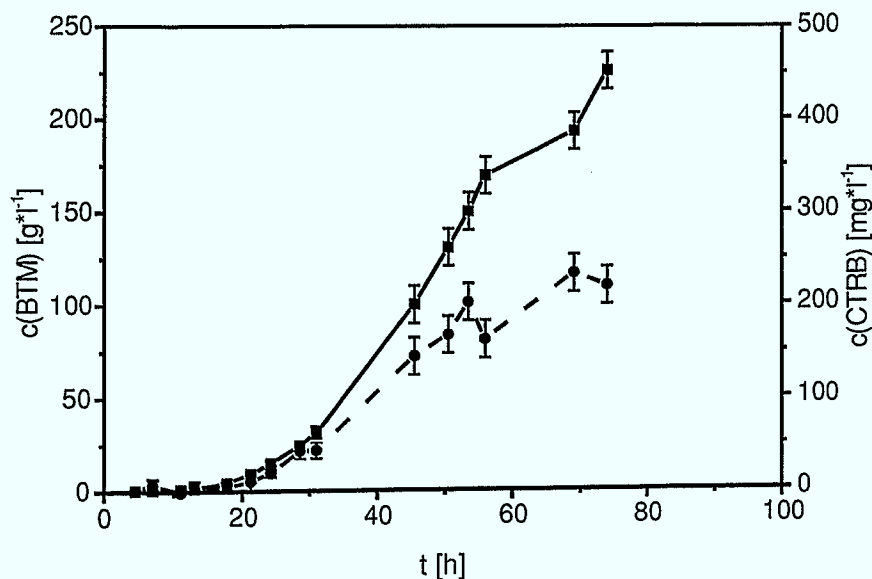


Abb. 5-24: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im Glucose-limitierten Zulaufverfahren mit dem pGAP-Produktionsstamm #778.

Wie die Auftragung des Verlaufes der Biomassekonzentration in Abbildung 5-24 zeigt, wird in dieser Fermentation eine Biotrockenmassekonzentration von 226 g·l⁻¹ erreicht. Das entspricht einem Biofeuchtmassanteil von ca. 68 % der gesamten Fermentationsbrühe. Dieser hohe Biomasseanteil, der z.B. in der Aufarbeitung erhebliche Schwierigkeiten auslösen muß, ist als Hauptnachteil des Verfahren zu werten. Da die Verwendung des GAP-Promotors, dessen Ursprungsgen für ein Enzym der Glycolyse codiert, eine streng wachstumsgekoppelte Produktbildung impliziert, ist mit einer Möglichkeit zur Verringerung dieser hohen Biomassekonzentration ohne gleichzeitige Reduzierung der Raum-Zeit-Ausbeute nicht zu rechnen.

Trotz der Vorteile, die die Verwendung von Glucose als Substrat birgt, namentlich der einfacheren Prozeßführung mit einem untoxischen Substrat, der geringeren Reaktionswärme (vgl. 3.4.3) und dem geringeren, spezifischen Sauerstoffverbrauch (vgl. 3.4.4), ist aufgrund der geringeren Raum-Zeit-Ausbeute und der prohibitiv hohen Biomassekonzentration die Verwendung von Stämmen mit GAP-Promotor nicht als sinnvolle Alternative zu dem vorher beschriebenen Verfahren zu werten.

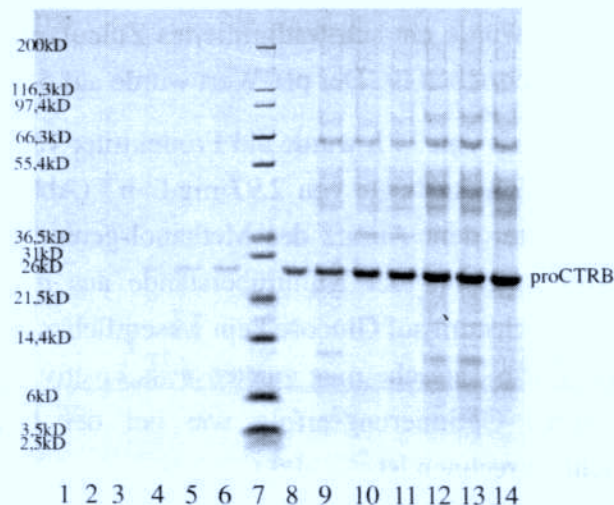


Abb. 5-25: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus der Fermentation im Glucose-limitierten Zulaufverfahren (vgl. Abb. 5-24). Auf den nummerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	4,50 h	8	CTRB-Standard
2	11,00 h	9	45,50 h
3	17,75 h	10	50,50 h
4	21,25 h	11	45,00 h
5	24,25 h	12	69,00 h
6	31,00 h	13	74,00 h
7	Größenmarker (Mark12)	14	75,00 h, Ernte bei pH 3,0

5.2.10 Einsatz alternativer Produktionsstämme

Neben der verfahrenstechnischen Optimierung zur Produktion rekombinanter Proteine kann eine Ertragssteigerung auch durch die gentechnische Optimierung der Produktionsstämme erreicht werden. Nach der Wahl des Promotors, die bereits diskutiert wurde, bieten sich hier verschiedene Ansätze an.

Es ist möglich, durch Variation der Gendosis, also der Anzahl der Kopien des Produktgens, eine Steigerung der Produktivität zu erreichen [Sre97]. Dabei ist jedoch nicht von einer allgemein anwendbaren Korrelation zwischen Kopienzahl und Produktbildung auszugehen, es sind sowohl positive als negative Effekte durch eine erhöhte Kopienzahl von Produktgenen beobachtet worden.

So wurde bei der Expression des Proteaseinhibitors Aprotinin in *Pichia pastoris* [Thi90] ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der chromosomal integrierter Expressionskassetten und dem Expressionslevel beobachtet. Während ein Stamm mit einer Expressionskassette einen Produkttiter von $143 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ erreichte, produzierte ein ansonsten identischer Stamm mit fünf Kopien des Produktgens unter identischen

Bedingungen $930 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Im Gegensatz dazu wurde bei der Expression von bovinem Lysozym mit *Pichia pastoris* genau der umgekehrte Effekt beobachtet, wobei beide Versuchsreihen von der gleichen Arbeitsgruppe unter Verwendung der gleichen Techniken durchgeführt wurden [Thi90]. Während ein Stamm mit einer Expressionskassette im Genom einen Produkttiter von $463 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Lysozym erreichte, produzierte der gleiche Stamm mit drei integrierten Kopien nur noch $254 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Autoren konnten zeigen, daß im letztgenannten Fall ein größerer Anteil des Proteins in der Zelle verbleibt, was auf eine Überlastung des Sekretionsapparates hindeutet.

In vergleichbaren Untersuchungen mit *Saccharomyces cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, daß für jedes individuelle Expressionssystem, also für jede Kombination von Expressionskassette und Produktionsstamm eine optimale Gendosis ermittelt werden kann [Wit94]. Eine überhöhte Expressionsrate überlastet den Proteinfaltungsapparat der Zelle und führt zu einer Anreicherung des Produktes oder unvollständig prozessierter Vorläuferstadien in der Zelle [Par95]. Dies kann häufig zu einer deutlichen Reduzierung der sekretierten Proteinmenge führen.

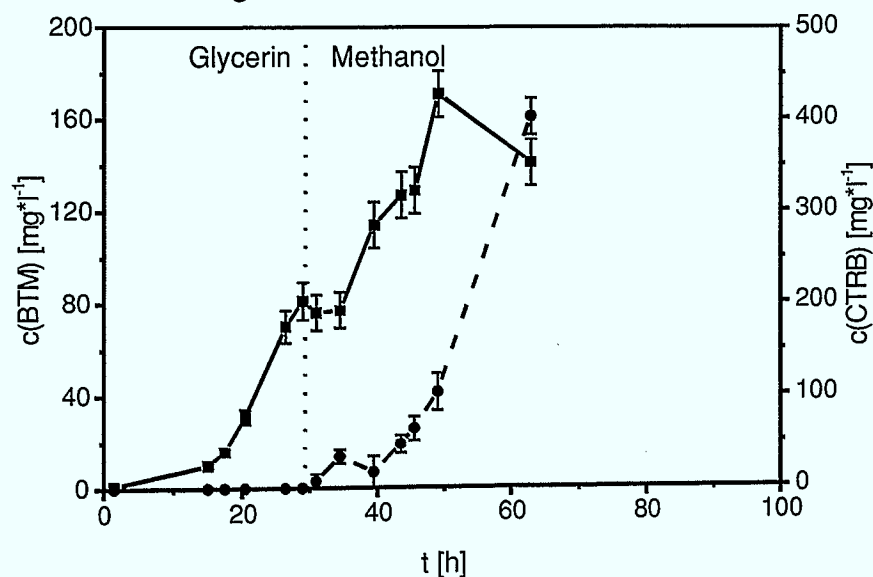


Abb. 5-26: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im Zulaufverfahren mit dem multi-copy Produktionsstamm #885.

Verschiedene Methoden zur Konstruktion von multi-copy Produktionsstämmen sind beschrieben. Bei *Pichia pastoris* ist es möglich, z.B. unter Verwendung des G418-Selektionsmarkers [Sco93] die Transformanten zu selektieren, bei denen eines der seltenen Ereignisse stattgefunden hat, die zur Integration mehrerer Produktgene führen. Da die Resistenz gegen das Antibiotikum G418 mit steigender Kopienzahl des Resistenzmarkers ansteigt, können Mehrfachtransformanten durch Selektion bei steigenden G418-Konzentrationen gezielt isoliert werden. Eine andere Möglichkeit, die auch bei der Konstruktion des hier verwendeten multi-copy Produktionsstammes eingesetzt wurde, ist, in einen Expressionsvektor mehrere Kopien des Genes hintereinander zu klonieren. Diese sogenannten „tandem-repeats“ werden dann in einem einzigen Ereignis in

das Genom der Expressionswirtes integriert [Cla91].

Im Gegensatz zu dem *Pichia*-System werden bei der eng verwandten Hefespezies *Hansenula polymorpha* grundsätzlich multi-copy Produktionsstämmen [Han96] [Gel96] [May99] für die Expression heterologer Proteine verwendet. Hier werden für die Transformation integrative Vektoren eingesetzt, die zunächst als autonom replizierende multi-copy Plasmide mehrere Generationen in den Wirtszellen erhalten bleiben. Dadurch kommt es zu einer Vielzahl von Integrationsereignissen.

Eine weitere Möglichkeit zur gentechnischen Verbesserung der Produktbildung ist die Optimierung der „codon-usage“. Obwohl der genetische Code praktisch universell ist, so gibt es bei den einzelnen Spezies doch Präferenzen zugunsten bestimmter Codes, wenn eine Aminosäure redundant codiert ist [Bir94]. Das drückt sich physiologisch so aus, daß die Aminoacyl-tRNA für eine bestimmte Aminosäure häufiger mit dem bevorzugten Triplet auf der rRNA paart als mit einem anderen. Dies kann entweder an den unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener tRNAs liegen oder an der bevorzugten Konformation sogenannter „wobble-Basen“ bei einer einzigen tRNA für eine bestimmte Aminosäure liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Stämme untersucht, bei denen jeweils eine der beiden beschriebenen Strategien getestet wurde. Bei der Konstruktion des Stammes #885 wurden 4 Kopien einer Fusion des CTRB-Genes mit der Sekretionssequenz der Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* in das stets verwendete Plasmid pHIS1 kloniert und zur Transformation des Akzeptorstamms GS115 verwendet. Der Stamm #1012 enthält ein codon-optimiertes Produktgen als Fusion mit einer Glucoamylase-Sekretionssequenz in einfacher Kopie. Zu den Konstruktionsprinzipien des optimierten Gens liegen dem Verfasser keine Informationen vor.

Zunächst wurden beide Stämme durch Expressionsexperimente im Schüttelkolben untereinander und mit dem Standard-Produktionsstamm #647 verglichen (4.4.5). Bei den Versuchen im Vierfachansatz erreichte der Stamm #647 einen Produkttiter von $8,5 \pm 2,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Im Vergleich dazu erreichte der multi-copy Stamm einen Produkttiter von $46,9 \pm 12,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und der codon-optimierte Stamm #1012 einen Titer von $5,4 \pm 2,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Während sich also die beiden Stämme, die jeweils ein einziges Produktgen tragen, nicht signifikant voneinander unterscheiden, ist die Produktbildung durch den multi-copy Stamm wesentlich höher. Dabei bleibt die Produktbildungsrate pro Expressionskassette im Rahmen der Signifikanz konstant.

Dieser Stamm #885 wurde deshalb für das folgende Scale-Up des entwickelten Fermentationsverfahrens ausgewählt. Zuvor wurde mit diesem Stamm eine Fermentation im Methanol-geregelten Zulaufverfahren durchgeführt. Dabei wurde allerdings auf die Option der Anreicherung der Zuluft mit Sauerstoff verzichtet, da diese auch später im Pilotfermenter und auch im Industriemaßstab nicht zur Verfügung stünde. Deshalb konnte in diesen Versuchen die Methanolkonzentration nicht auf dem Sollwert gehalten wer-

den, da ansonsten eine Sauerstofflimitierung nicht mehr zu verhindern gewesen sein würde.

Aufgrund technischer Probleme mußte diese Fermentation frühzeitig abgebrochen werden, es wurde aber nach einer Fermentationszeit von 62,75 h ein Produkttiter von 402 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 6,41 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und stellt somit noch einmal eine deutliche Steigerung gegenüber dem ansonsten verwendeten Stamm #647 dar, mit dem 5,4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ produziert werden konnten. Dabei ist noch in Betracht zu ziehen, daß die Produktionsphase aufgrund technischer Probleme drastisch verkürzt werden mußte.

Damit konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung eines Stammes mit vier Expressionskassetten als tandem-repeat eine erhebliche Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden konnte.

5.2.11 Einsatz von Produktionsstämmen mit Mut^S-Phänotyp

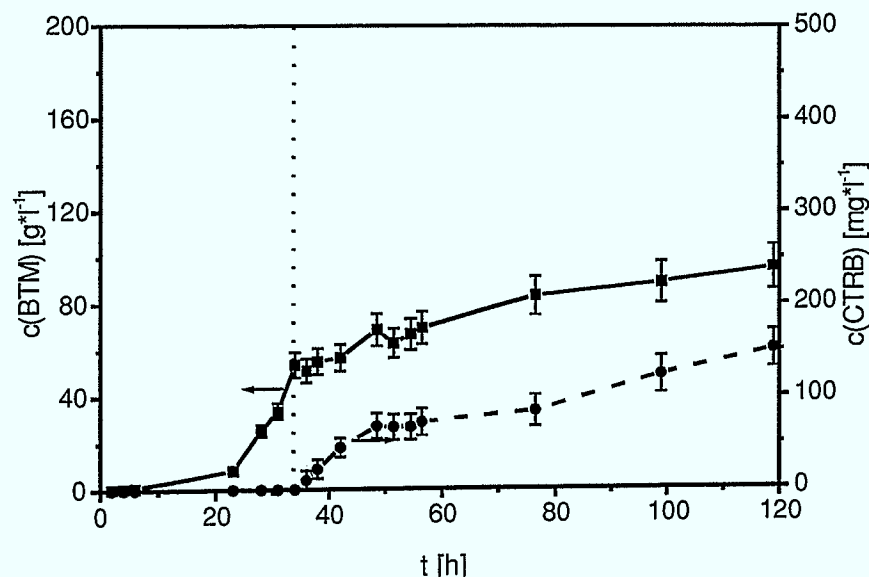


Abb. 5-27: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration (linke Y-Achse: durchgezogene Linie, Quadrate) und Produkttiter (rechte Y-Achse: Striche, Kreise) in einer Fermentation im Methanol-limitierten Zulaufverfahren mit dem Mut^S Produktionsstamm #769.

In der Besprechung der einzelnen Versuche wurde die Problematik, die sich aus der Hochzelllichtfermentation von *Pichia pastoris* mit Methanol als Substrat ergeben kann, bereits angerissen. Ein Weg, den hohen O₂-Verbrauch und die Wärmeentwicklung zu vermeiden, ist die Verwendung von Stämmen, die in ihrer Fähigkeit zur Metabolisierung von Methanol eingeschränkt sind. Diese Stämme, bei denen die stärker exprimierte Kopie des Alkoholoxidasegens, das AOX1-Gen defekt ist, werden als Mut^S-Phänotyp (Methanol ututilisation slow) bezeichnet. Auch wenn dies in der gezeigten Fermentation noch nicht verwirklicht wurde, sollte ein solcher Stamm die Möglichkeit bieten, auch im Großmaßstab eine Methanol-unlimitierte Prozeßführung konsequent durchzuführen, ohne eine Sauerstofflimitierung in Kauf nehmen zu müssen.

Die Fermentation des Stammes #769, eines Mut^S-Produktionsstammes, war noch unter

den Ausgangbedingungen (pH 5,5) und im Methanol-limitierten Zulaufverfahren durchgeführt worden. Nach einer Fermentationsdauer von 119 h wurde hier ein Chymotrypsinogentiter von $151 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ gemessen (Abb. 5-27), was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $1,27 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gleichkommt. Die Untersuchung der Fermentationsüberstände mittels SDS-PAGE (nicht dargestellt) zeigte, daß der gleiche proteolytische Produktabbau stattgefunden hatte, der auch in den vergleichbaren Fermentationen mit dem Mut^+ -Stamm #647 beobachtet worden war. Die Ergebnisse zeigen, daß der hier eingesetzte, auf Methanol nur langsam wachsende Produktionsstamm, ein dem häufiger eingesetzten Mut^+ -Stamm gleichwertiges Potential besitzt. Insbesondere in Anbetracht der vergleichsweise geringen Biotrockenmassekonzentration von $96 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Abb. 5-27) erscheint auf der Grundlage dieser Daten die Verwendung von Mut^S -Produktionsstämmen als attraktive Alternative.

Dennoch wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen aus mehreren Gründen auf die Verwendung von Mut^+ -Stämmen gelegt. Die alternativen Produktionsstämme (Mehrfachtransformanten, optimierte codon-usage) standen nur als Mut^+ -Stämme zur Verfügung. Weiterhin sind Stämme mit Mut^S -Phänotyp aufgrund ihrer reduzierten Wachstumsrate auf Methanol nicht für den Einsatz in kontinuierlicher Kultur mit Methanol als Substrat geeignet.

5.3 Untersuchungen zum Einsatz kontinuierlicher Verfahren

Die Entwicklung einer Fermentation im Zulaufverfahren zeigte deutlich die Probleme, die bei Applikation eines Hochzelldichteverfahrens mit dem stark reduzierten Substrat Methanol auftreten. Eine mögliche Strategie zur Vermeidung dieser Probleme wurde mit dem Einsatz von Stämmen aufgezeigt, die auf Methanol nur langsam wachsen (Mut^S -Phänotyp). Als ein weiterer Ansatz zur besseren Beherrschung des Expressionssystems wurde der Einsatz kontinuierlicher Verfahren untersucht.

Gegenüber Zulaufverfahren bieten kontinuierliche Verfahren eine Reihe von Vorteilen, die sich sowohl für die Prozeßführung, für die Ökonometrie des Produktionsverfahrens als auch aus wissenschaftlicher Hinsicht ergeben. Bei kontinuierlicher Kultivierung kann die Biomassekonzentration als Funktion der Zulaufkonzentration des limitierenden Substrates frei gewählt werden. Dadurch ist die Anpassung des Verfahrens an den maximalen Sauerstoffeintrag eines vorhandenen Fermentationssystems möglich.

Während im Zulaufverfahren die Prozeßdauer begrenzt ist und deshalb ein erheblicher Zeitanteil für Rüstzeiten und Anwuchsphase eingeplant werden muß, ist die Dauer des kontinuierlichen Verfahrens theoretisch nur durch die Wartungsintervalle der Anlage limitiert. Dadurch muß ein viel geringerer Zeitanteil für Phasen ohne Produktbildung aufgewendet werden. Aus wissenschaftlicher Hinsicht ist die kontinuierliche Fermentation z.B. als Instrument für die in-vivo Bestimmung von Substratkinetiken wertvoll. Durch die Untersuchung vorgegebener Kultivierungsparameter im steady-state kann die Reaktion der Zelle ungleich genauer bestimmt werden als die transienten Stoffwechselzustände während eines diskontinuierlichen Verfahrens.

Trotz aller Vorteile der kontinuierlichen Prozeßführung ist es nicht immer möglich, diese theoretischen Überlegungen umzusetzen. Absolute Voraussetzung für die Applikation einer kontinuierlichen Prozeßstrategie ist das Vorliegen genetisch stabiler Stämme. Unter den Bedingungen der kontinuierlichen Prozeßführung wird ein erheblicher Selektionsdruck auf den Produktionsstamm ausgeübt. Dieser Selektionsdruck bevorzugt entweder Mutanten, die eine höhere, maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreichen oder aber solche, die eine höhere Affinität gegenüber einem limitierten Substrat aufweisen. Häufig haben Revertanten, deren Stoffwechsel nicht durch die Produktbildung oder die Amplifikation von Plasmiden zusätzlich belastet ist (genetic burden), deshalb einen Selektionsvorteil und setzen sich im Fermentationsansatz durch. Dies ist ein häufiges Problem bei der kontinuierlichen Fermentation rekombinanter Organismen.

Bei *Pichia pastoris* erfolgt die Integration von Produktgenen in das Hefegenom, dadurch wird eine wesentlich höhere Stabilität erreicht als bei der Verwendung von plasmidbasierten Expressionssystemen. In bisherigen Untersuchungen zur Stabilität heterologer Genen in *P. pastoris* wurde bei repetitiver Kultivierung im Schüttelkolben über 70 Generationen keine genetische Instabilität festgestellt [Ohi98]. Dennoch muß bei der

Entwicklung eines kontinuierlichen Fermentationsverfahrens besonderes Augenmerk auf die Stabilität der Produktionsstämme gelegt werden.

Ein weiteres Problem bei der Umsetzung kontinuierlich geführter Prozesse ist die fehlende Akzeptanz in der Industrie. Die lange Prozeßdauer, die von der Warte der Ökonomie aus als Vorteil gesehen werden kann, wirkt sich vor dem Hintergrund der geltenden Zulassungsbestimmungen als Nachteil aus, da sich der Konsistenznachweis für die Prozeßführung entsprechend als Zeitverlust in der Entwicklungsphase niederschlägt. Weiterhin sind die vorhandenen Anlagen in der Regel auf großvolumige Ansätze im Zulaufverfahren ausgelegt. Ein neuer Prozeß muß dann in die vorhandene Anlage „hineinpassen“. Letztendlich werden bei der industriellen Umsetzung eines Fermentationsprozesses stets Wirtschaftlichkeitsüberlegungen ausschlaggebend sein, so daß auch ein kontinuierlich geführter Prozeß Eingang finden wird, wenn er unter den Gesichtspunkten der Kostenrechnung vorteilhaft ist.

5.3.1 Etablierung eines Protokolls zur kontinuierlichen Fermentation

Ausgehend von den Erfahrungen, die bei der Bearbeitung der Fermentation im Zulaufverfahren gemacht worden waren, wurde der kontinuierliche Fermentationsprozeß konzipiert. Zunächst wurde dazu das Medium entwickelt, mit dem alle Fermentationen mit kontinuierlicher Prozeßführung durchgeführt werden sollten. Im Zulaufverfahren war mit dem vorgelegten Medium eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $226 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht worden, wobei durch die Zudosierung des Kohlenstoffsubstrates eine Verdünnung der Salze im Verhältnis 1:2 eingetreten war. Auf dieser Grundlage wurde abgeschätzt, daß ein um den Faktor drei verdünntes Medium ausreichen würde, um bei einer maximalen Zulaufkonzentration von $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Methanol alle Salze und Spurenelemente in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Um sicherzustellen, daß auch das instabile Vitamin Biotin noch bei längerer Standzeit der Vorlage nicht limitierend werden würde, wurde dessen Konzentration um den Faktor 10 erhöht. Die Zusammensetzung des aufgrund dieser Überlegungen konzipierten Mediums ist unter 4.3.11 aufgeführt. In keiner der durchgeführten Fermentationen in kontinuierlicher Betriebsweise traten Hinweise auf eine andere Limitierung als die beabsichtigte C-Limitierung auf, was die Schlüssigkeit der dargelegten Konzeption belegt. Für die Startphase der Fermentation wurde das bewährte Protokoll der Fermentationen im Zulaufverfahren unverändert übernommen. Als Produktionsstamm für die kontinuierliche Fermentation kam aufgrund der Wachstumseigenschaften natürlich nur ein Stamm mit Mut^+ -Phänotyp in Frage. Alle übrigen Prozeßparameter wurden zunächst unverändert aus dem Prozeß im Zulaufverfahren übernommen.

Bei den ersten Versuchen zeigte sich schnell, daß eine chemostatische Betriebsführung mit Methanol als Substrat nicht zu verwirklichen war. Bereits kurze Ungleichmäßigkeiten in der Mediendosierung führten zu einer Reduzierung der Wachstumsrate. Durch eine positive Rückkopplung zwischen Methanolanreicherung und Wachstumshemmung

durch Methanol kam es stets zu einem Auswaschen der Zellen. Aus diesem Grund wurde die bereits erfolgreich für das Zulaufverfahren eingesetzte Methanolregelung im geschlossenen Regelkreis auch für das kontinuierliche Verfahren übernommen. Mit diesem Ansatz konnte bei niedrigen Sollwerten für Methanol die kontinuierliche Fermentation über 1000 h stabil betrieben werden. Als Nachteil der nutristatischen Prozeßführung ist der hohe Zeitaufwand bis zum Erreichen des steady-state anzuführen. Wie aus Abb. 5-33 (S. 98) ersichtlich, werden über 200 h benötigt, bis der erste Gleichgewichtszustand erreicht ist.

5.3.2 Makrokinetische Untersuchungen zum Wachstum rekombinanter *Pichia pastoris* auf Methanol in kontinuierlicher Kultur

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß der Methanolkonzentration auf die Wachstumsrate μ , die sich durch die nutristatische Mediendosierung einstellte und auf

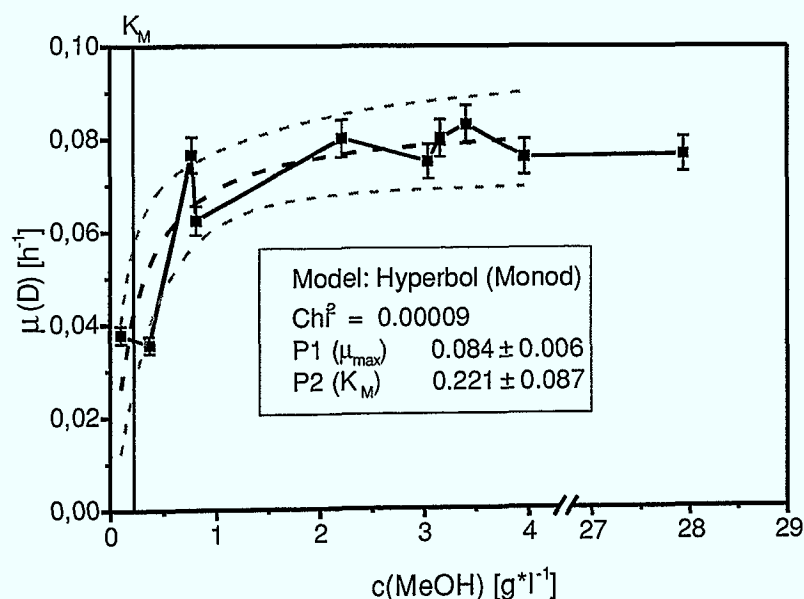


Abb. 5-28: Wachstumsrate als Funktion der Methanolkonzentration in kontinuierlicher Fermentation mit Methanolregelung im geschlossenen Regelkreis (Nutristat). Eine an die Daten angepaßte Substratsättigungskinetik nach MONOD mit dem zugehörigen 95%-Konfidenzintervall ist mit gestrichelten Linien eingezeichnet.

die Produktbildung untersucht.

Die Auftragung der Wachstumsrate über der Methanolkonzentration in Abbildung 5-28 zeigt innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches eine Abhängigkeit in Form einer Sättigungskinetik, eine Inhibierung des Wachstums ist nicht erkennbar. Eine Substratsättigungskinetik nach MONOD in der Form $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$ konnte mit hoher Ge-

nauigkeit (s. Abb. 5-28) an die Daten angepaßt werden. Aus der Modellanpassung wurden die Werte für μ_{max} mit $0,08 \text{ h}^{-1}$ und für K_M mit $0,22 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ermittelt. Die MONOD-Konstante K_M bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die Kultur mit halbmaximaler Geschwindigkeit wächst. Die maximale Wachstumsrate wird im vorliegenden Fall

bei etwa $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht. Aus diesem Grund konnten die Untersuchungen auf den Konzentrationsbereich bis ca. $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, das entspricht dem 18fachen K_M -Wert, beschränkt werden, der einzige Betriebszustand mit der sehr hohen Methanolkonzentration diente der Untersuchung der Substrattoxizität. Untersuchungen zur Produktion eines Neurotoxinfragments in *Pichia pastoris* [Zha00] unter Verwendung von pseudo-steady-state Daten aus Fermentationen im Zulaufverfahren ergaben ebenfalls eine maximale Wachstumsrate von 0,08 bei einer kritischen Methanolkonzentration von $3,65 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und einer deutlichen Substratüberschußinhibierung. Anhand der in dieser vorliegenden Daten kann diese Inhibierung nicht festgestellt werden, auch bei einer Methanolkonzentration von $28 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ wird die maximale Wachstumsrate noch erreicht.

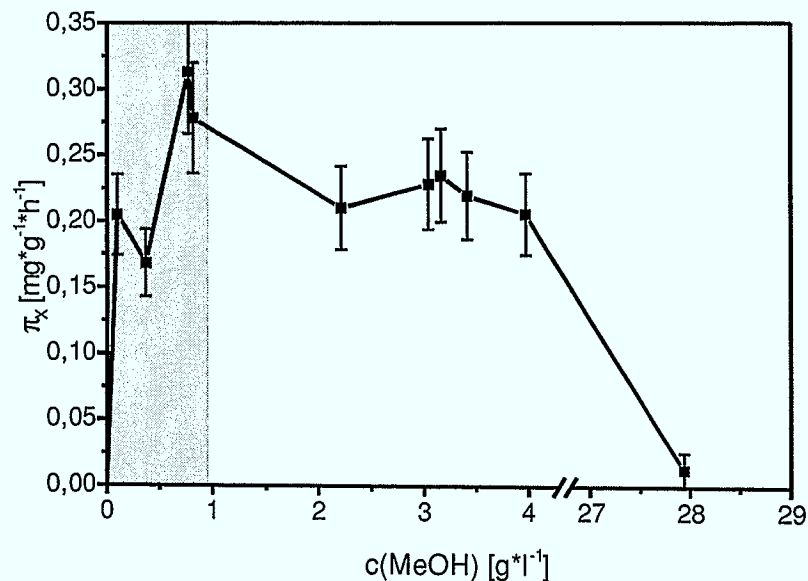


Abb. 5-29: Korrelation zwischen biomassespezifischer Produktbildungsrate und der Methanolkonzentration bei kontinuierlicher Fermentation mit Methanolregelung im geschlossenen Regelkreis (Nutristat). Die grau hinterlegte Fläche bezeichnet den Konzentrationsbereich, in dem langfristig sicher stabil gearbeitet werden kann.

Die Korrelation zwischen Methanolkonzentration und biomassespezifischer Produktbildungsrate ist in Abb. 5-29 dargestellt. Innerhalb des Konzentrationsbereiches bis $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ist auch hier keine Inhibierung der Produktbildung durch Methanol festzustellen.

Bei einer Methanolkonzentration von $0,77 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ wurde eine biomassespezifische Produktbildungsrate von $\pi_X = 0,313 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gemessen. Mit der eingestellten Biotrockenmassekonzentration von $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ wurde dadurch eine Raum-Zeit-Ausbeute von $25,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht. Im Vergleich zu der Fermentation im Zulaufverfahren, wo mit dem gleichen Produktionsstamm eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $5,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ verwirklicht werden konnte, bedeutet das eine Steigerung um 464 %. Gleichzeitig mit dieser Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde die Biotrockenmassekonzentration von $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ auf nur noch $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ reduziert, was in einer erheblichen Vereinfachung der Produktaufarbeitung resultierte. Neben der Steigerung der Produktivität ist vor allem auch der Vergleich der Daten für den Sauerstoffeintrag interessant. Im kontinuierlichen Verfahren wurde für den beschriebenen Optimalpunkt eine volumetrische Sauerstoffaufnahme von $\text{OUR}_v = 435 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ermittelt, während im Zulaufverfahren noch

minimal $870 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ verwirklicht werden mußten. Im Technikumsfermenter konnte deshalb bei kontinuierlicher Prozeßführung auf die Beimischung von Reinsauerstoff ganz verzichtet werden.

Wie angesprochen, ließ sich die Produktbildungsrate nicht formalkinetisch als Funktion der Substrat- / Induktorkonzentration darstellen. Die Produktbildungsrate steigt bis zu einer Konzentration von ca. $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ mit der Induktorkonzentration an und bleibt bei höheren Konzentrationen bis zu $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ auf einem niedrigeren Level konstant. Dieses Verhalten konnte durch keinen gängigen Kinetikansatz [Mos81] korrekt beschrieben werden. Die Auftragung der Produkt / Biomasseselektivität in Abb. 5-30 zeigt, daß sich diese mit steigender Wachstumsrate zugunsten der Biomassebildung verschiebt. Dies legt nahe, daß innerhalb des betrachteten Systems Wachstum und Produktbildung teilweise in Konkurrenz zueinander stehen, woraus sich die Ergebnisse in Abbildung 5-29 erklären lassen. Die Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Substrat- / Induktorkonzentration ergibt sich wahrscheinlich aus mindestens zwei sich überlagernden Effekten, der Induktion durch Methanol und der Konkurrenz durch das Biomassewachstum. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch bereits früher postuliert [Zha00], wobei auch hier eine Konkurrenz um die zur Verfügung stehenden Energieäquivalente angenommen wurde.

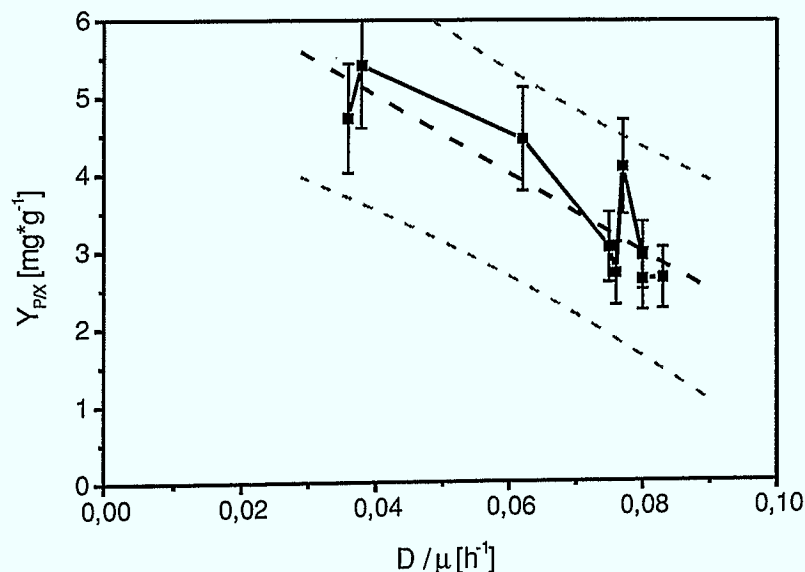


Abb. 5-30: Korrelation zwischen dem Selektivitätskoeffizienten aus Produktbildung und Wachstum und der Wachstumsrate. Die Anpassung einer linearen Funktion mit dem 95 % Konfidenzintervall ist mit gestrichelten Linien angegeben.

Bei höheren Methanolkonzentrationen tritt eindeutig eine Hemmung der Produktbildung ein, allerdings ohne daß eine Hemmung des Wachstum eintreten würde. Die Inhibition durch erhöhte Methanolkonzentrationen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, zuletzt bei Zhang et al. [Zha00] mit einer kritischen Methanolkonzentration von $3.65 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Es muß davon ausgegangen werden, daß bei dem Abfall der Produktbildungsrate mit steigender Methanolkonzentration in kontinuierlicher Kultur regulatorische Effekte und eine genetische Destabilisierung der Zellen zusammenwirken, wobei

sich die letzte Annahme auf eine entscheidende Beobachtung stützt: Der Verlust der Produktivität, wie er z.B. bei der höchsten eingestellten Konzentration auftritt, war irreversibel. Auch bei niedrigeren steady-state Konzentrationen trat ein solcher irreversibler Verlust der Produktbildung auf, wenn durch Reglerschwankungen eine transiente Anreicherung von Methanol aufgetreten war. Diese Betriebszustände ohne Produktbildung wurden nicht in die Darstellungen aufgenommen.

Es konnte gezeigt werden, daß bei niedrigen Methanolkonzentrationen die Zellen in kontinuierlicher Kultur phänotypisch stabil blieben. Eine genotypische Stabilität mußte dann auch gegeben sein. In zwei kontinuierlichen Ansätzen über 1000 h bzw. über 800 h trat kein merklicher Produktivitätsverlust auf. Anders verhielt es sich jedoch bei höheren Methanolkonzentrationen, auch wenn diese nur transient auftraten. Es trat dann neben dem Abfallen der Produktbildung auch ein Anstieg der Wachstumsrate bis zu dem zugelassenen Maximum von $0,1 \text{ h}^{-1}$ auf. Mit dem Erreichen der maximalen Dosiergeschwindigkeit trat dann wiederum eine Substratlimitierung ein, was zu diesem Zeitpunkt aber keinen Einfluß mehr hatte. Auch dies ist als Anzeichen für eine schwerwiegende Veränderung der Physiologie zu werten, wie sie z.B. durch eine genetische Veränderung auftreten würde. Ein Schwellenwert für diesen angenommenen Effekt konnte nicht bestimmt werden. Zuverlässig stabil konnte die Fermentation nur bei Konzentrationen unter $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ geführt werden. Diese Beobachtungen gaben Anlaß zu einer gesonderten Untersuchung dieses Phänomens, deren Ergebnisse in Absatz 5.3.4 dargestellt sind.

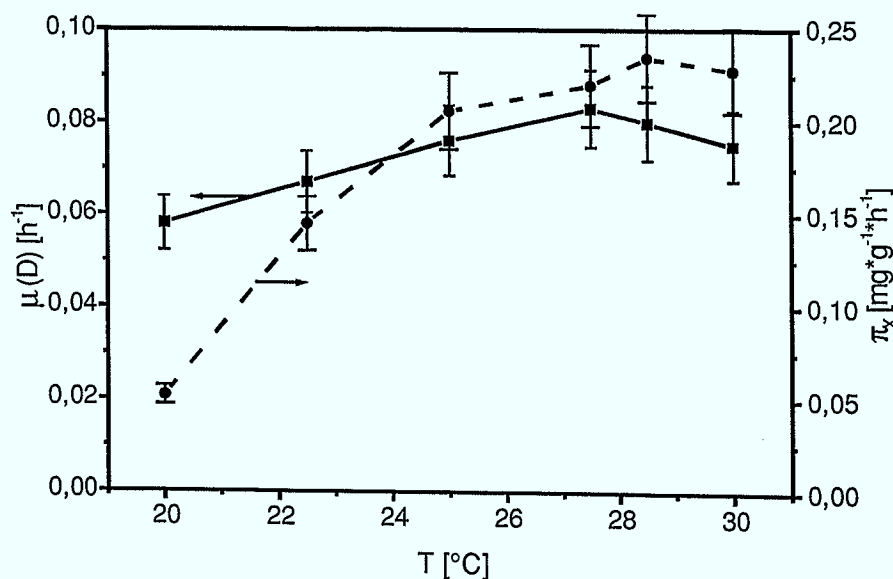


Abb. 5-31: Temperaturabhängigkeit von Wachstumsrate (durchgezogene Linie, linke Y-Achse) und biomassespezifischer Produktbildungsrate (gestrichelte Linie, rechte Y-Achse) für die kontinuierliche Fermentation im Methanol-Nutristaten.

5.3.3 Parameteroptimierung für die kontinuierliche Fermentation

Unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultivierung wurde zunächst eine erneute Optimierung der Fermentationsparameter pH-Wert und Temperatur durchgeführt.

Ausgehend vom bis dahin verwendeten Sollwert pH 3,0 führte sowohl eine Erhöhung als auch eine Verringerung des pH-Wertes zu einer signifikanten Abnahme der Wachstumsrate und auch der Produktbildung. Offensichtlich stellt pH 3 den unteren Grenzwert der pH-Toleranz von *Pichia pastoris* dar. Dies wird auch dadurch gestützt, das in keiner bekannten Literaturstelle eine erfolgreiche Kultivierung bei einem pH-Wert <3,0 berichtet wird. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 3,2 führte bereits zur Bildung von Zellaggregaten, auch wenn noch keine makroskopisch sichtbare Flockenbildung auftrat, wie dies bei der pH-Optimierung für das Zulaufverfahren festgestellt wurde. Aufgrund der Ergebnisse aus der Charakterisierung der proteolytischen Aktivität wurde auf eine Untersuchung höherer pH-Werte verzichtet.

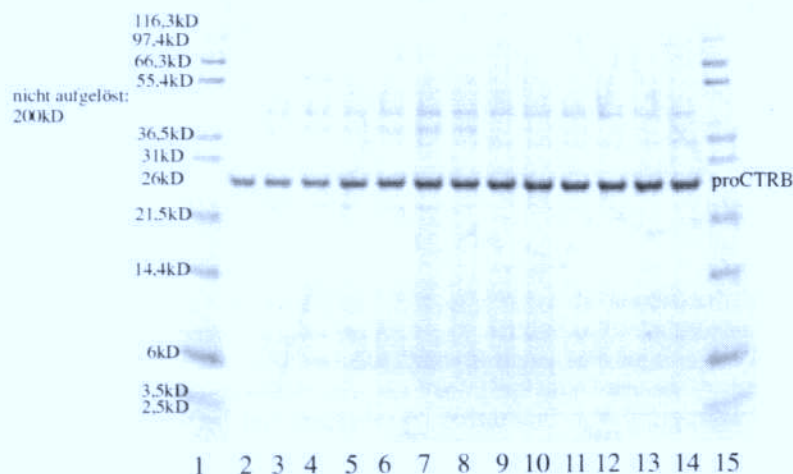


Abb. 5-32: SDS-PAGE von Kulturüberständen aus kontinuierlich geführten Fermentationen im Methanol-Nutristaten (vgl. Abb. 5-31). Auf den numerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Größenmarker	9	27,5 °C
2	proCTRB-Standard	10	27,5 °C
3	20,0 °C	11	28,5 °C
4	20,0 °C	12	28,5 °C
5	22,5 °C	13	30,0 °C
6	22,5 °C	14	30,0 °C
7	25,0 °C	15	Größenmarker (Mark12)
8	25,0 °C		

Der Einfluß der Fermentationstemperatur auf Wachstumsrate und biomassespezifische Produktbildungsrate ist in Abbildung 5-31 dargestellt. Für das Wachstum wurde in diesen Versuchen ein Optimum bei 27,5 °C bestimmt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Optimierung des fed-batch Verfahrens. Auf die Produktbildungsrate hat die Temperatur zwischen 25 °C und 30 °C nur einen geringen Einfluß, so daß in der Prozeßführung bezüglich dieses Parameters eine hohe Toleranz des Systems besteht. Da auch die Reinheit des Produktes im Kulturüberstand nicht erkennbar durch die Temperatur beeinflusst wird (Abb. 5-32), kann die Temperatur für die kontinuierliche Fermentation als unkritischer Parameter angenommen werden. In der Folge wurde die Fermentationstemperatur auf 27,5 °C festgelegt und damit auf den Mittelwert des erkannten Toleranzbereiches. So konnte sichergestellt werden, daß Temperaturschwankungen während der Prozeßführung keine signifikante Beeinflussung der Versuchsergebnisse

verursachen.

5.3.4 Untersuchungen zur Stabilität von Produktionsstämmen während der kontinuierlichen Fermentation mit Methanol als Substrat

Aufgrund der im Kapitel 5.3.2 beschriebenen Phänomene wurde ein gesonderter Versuch zur näheren Charakterisierung des Verlustes der Produktivität durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war, festzustellen ob und wie sich der Stoffwechsel der Zellen ändert und vor allem, ob es sich um einen regulatorischen oder um einen genetischen und somit irreversiblen Effekt handelt.

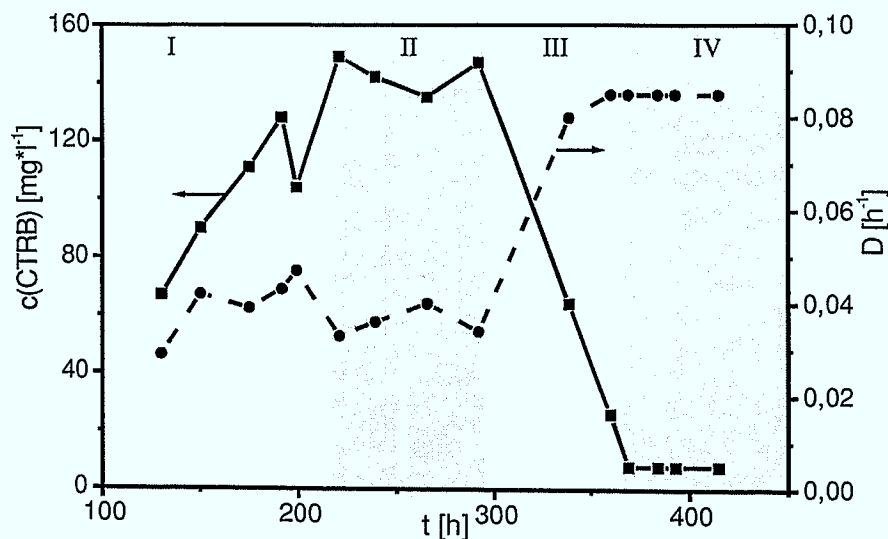


Abb. 5-33: Verlauf von Chymotrypsinogentiter und Durchflußrate während eines stabilen Betriebspunktes und anschließendem Verlust der Produktivität. Innerhalb des dargestellten Zeitraumes sind vier verschiedene Phasen erkennbar, die durch die Hintergrundschattierung voneinander abgegrenzt und mit römischen Ziffern durchnummeriert sind.

- Phase I: Anlaufphase: Einstellung des ersten Betriebspunktes
- Phase II: stabiler steady-state mit Chymotrypsinogenbildung
- Phase III: Auswaschung von produzierenden Zellen und Produkt
- Phase IV: steady-state mit erhöhter Wachstumsrate und ohne Produktbildung

In dieser Fermentation wurde zunächst ein stabiler steady-state bei einer niedrigen Methanolkonzentration von ca. $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt (Abb. 5-33: Phasen I + II). Hinsichtlich Wachstumsrate ($D = 0,036 \text{ h}^{-1}$) und spezifischer Produktbildungsrate ($0,168 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) entsprechen die Ergebnisse für diesen Betriebszustand vollständig der in Abbildung 5-28 dargestellten Formalkinetik für das Wachstum bzw. den Daten zur Produktbildung in Abbildung 5-29. Nach etwa 300 h wurde der Sollwert der Methanolkonzentration auf $1,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erhöht. Als Reaktion auf diese Änderung der Methanolkonzentration kam es zu dem bereits mehrfach beobachteten Zusammenbruch der Produktbildung, verbunden mit einer Erhöhung der Wachstumsrate (Abb. 5-33: Phasen III + IV). Die Wachstumsrate steigt dabei über den formalkinetisch bestimmten Maximalwert von $0,08 \text{ h}^{-1}$ hinaus an und wurde in diesem Versuch auf einen Maximalwert von $0,085 \text{ h}^{-1}$ begrenzt. Der Produkttiter sinkt praktisch auf 0 ab. In dem sich in der Folge einstellenden Betriebszustand ist das Wachstum streng selbstlimitierend, infolge des hohen, stabilen Methanoleingangs und des hohen Methanolsollwerts. Der Produkttiter sinkt auf 0 ab, da die Zellen nicht mehr in der Lage sind, das Substrat zu verwerten.

bildung zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit durch erhöhte Substratkonzentrationen ausgelöst oder begünstigt wurde, durch eine Substratlimitierung jedoch nicht rückgängig gemacht werden konnte. Auch eine Reduzierung der Wachstumsrate (Daten nicht gezeigt), hatte keinen derartigen Effekt.

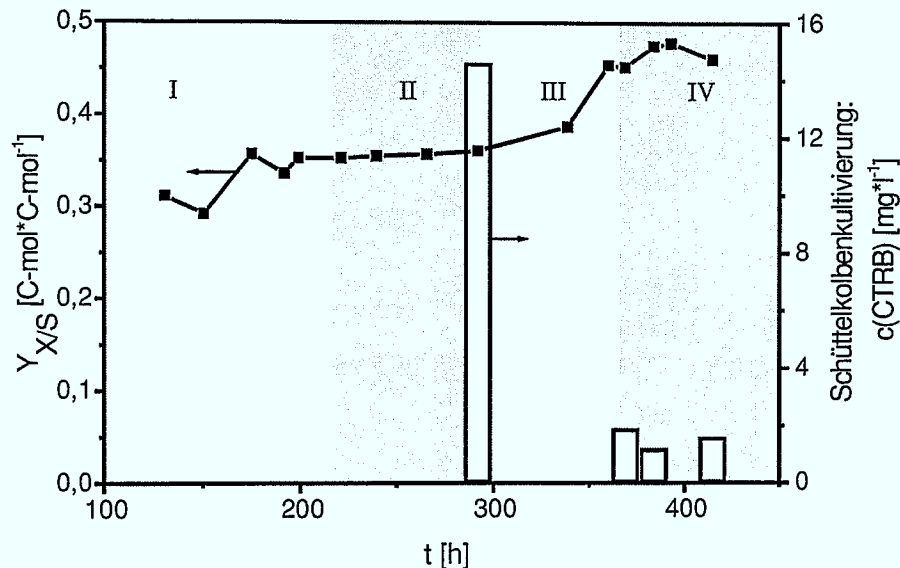


Abb. 5-34: Biomasseselektivität (linke Y-Achse) während der kontinuierlichen Fermentation und Chymotrypsinogenkonzentration nach Schüttelkolbenkultivierung von Reisolaten (Balken, rechte Y-Achse). Die Daten beziehen sich auf den gleichen Versuch wie Abb. 5-33, auch ist die Einteilung der Versuchsphasen identisch. Nähere Erläuterungen zur Schüttelkolbenkultivierung der Reisolate sind im Text gegeben.

Die Differenzierung zwischen einer regulatorischen und einer genetischen Ursache des beobachteten Effektes kann über dessen Reversibilität erfolgen. Im Prozeß war eine Reversion, wie oben besprochen, nicht möglich. Zur weiteren Charakterisierung wurden deshalb eingefrorene Zellproben als Ausgangsmaterial für eine Proteinexpression im Schüttelkolben eingesetzt. Die Chymotrypsinogentiter nach 24 h Induktion aus diesen Versuchen sind in dem Balkendiagramm in Abbildung 5-34 dargestellt. Obwohl die Zellen auf Glucose angewachsen und dann neu induziert worden waren, zeigen die Zellen, die nach dem Produktivitätsverlust aus dem Fermentationsansatz isoliert worden waren, keine signifikante Produktbildung. Die Zellen hingegen, die zu einem früheren Zeitpunkt isoliert wurden, erreichen einen Produkttiter, der mit der Referenz (s. 5.1) vergleichbar ist.

Es kann demnach angenommen werden, daß der beobachtete Verlust des Phänotyps „Chymotrypsinogen-Produzent“ auf einer Mutation beruht und nicht auf einem regulatorischen Effekt. Wie der Anstieg der Wachstumsrate deutlich zeigt, ist diese Mutation mit einem erheblichen Selektionsvorteil für die betroffenen Zellen verbunden und setzt sich deshalb in kontinuierlicher Kultur schnell durch. Die Selektion gegen Chymotrypsinogen-Produktion und zugunsten einer höheren Wachstumsrate ist im Fermentationsverlauf in der Phase III widergespiegelt. In Phase IV hatte sich der mutierte Phänotyp vollständig durchgesetzt.

Die Fragestellung nach einer grundlegenden Veränderung des Zellstoffwechsels kann durch Analyse der Biomasseselektivität angegangen werden. Die molare Biomasseselektivität $Y_{X/S}$ (Abb. 5-34) drückt aus, welcher Anteil des in Form von Methanol aufgenommenen Kohlenstoffs in der Biomasse fixiert wird. Sie ist ein Maß dafür, wie effizient die im Substrat chemisch gebundene Energie genutzt werden kann. Die Analyse des Energiestoffwechsels [Bab86] ergibt für das Wachstum von Hefen auf Methanol einen theoretischen Wert von $0,41 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$; unter Einbeziehung der Biomassezusammensetzung $\text{C}_1\text{H}_{1,68}\text{O}_{0,61}\text{N}_{0,12}$ ($M = 25,1 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$) läßt sich dieser als molare Biomasseselektivität von $0,48 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ausdrücken. In der gleichen Quelle werden Experimentaldaten zwischen $0,42$ und $0,49 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ angeführt.

In dem dargestellten Versuch steigt die molare Biomasseselektivität gleichzeitig mit dem Zusammenbruch der Produktbildung und dem Anstieg der Wachstumsrate von $0,35 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf $0,47 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ an. Dieser Wert von $0,47 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ stimmt mit dem oben angeführten Theoriewert von $0,48 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ sehr genau überein und stützt die Annahme, daß der Stoffwechsel unverändert dem angenommenen Schema (Abb. 3-3) folgt.

Der Anstieg der Biomasseselektivität parallel zu dem Anstieg der Wachstumsrate bzw. der niedrige Wert von $Y_{X/S}$ im ersten Betriebszustand erklärt sich aus dem energetischen Zustand der Zelle. Bei der sehr geringen Wachstumsrate von $\mu = 0,036 \text{ h}^{-1}$ und einer biomassespezifischen Produktbildungsrate von $\pi_x = 0,168 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ wird ein größerer Anteil der zur Verfügung stehenden Energieäquivalente für den Erhaltungsstoffwechsel und die Produktbildung aufgewendet. Bereits an früherer Stelle konnte dargelegt werden, daß Wachstum und Produktbildung energetisch kompetitive Prozesse innerhalb des Gesamtstoffwechsels sind. Demzufolge war der Verlust der Produktivität nicht mit einer grundlegenden Änderung des Zellstoffwechsels verbunden, was bei einem Regulationsphänomen als Ursache hätte angenommen werden müssen.

Diese Auffassung wird auch durch die Ergebnisse aus der Untersuchung der Rohextrakte mittels Gelelektrophorese gestützt. Wie in Abbildung 5-35 ersichtlich, kommt es im SDS-PAGE nicht zu einer erkennbaren Änderung im Bandenmuster. Auch die im Rohextrakt gemessene Aktivität der Alkoholoxidase, die als zusätzliche Information zur Induktion des AOX1-Promotors herangezogen wurde, bleibt unverändert bei ca. $300 - 400 \text{ U} \cdot \text{mg RP}^{-1}$ (RP: bezogen auf den Rohproteingehalt im Zellaufschluß).

Im Hinblick auf die veränderte Biomasseselektivität war auch untersucht worden, ob womöglich ein anderes Enzym mit methanoloxidierender Aktivität in der Zelle aktiv sein. Mittels Western-Blot konnte ein Protein identifiziert werden, das mit einem Antikörper gegen die Alkoholdehydrogenase von *Saccharomyces cerevisiae* reagierte und auch das gleiche apparente Molekulargewicht von ca. 38 kD hat. In dem Elektropherogramm in Abbildung 5-35 ist dementsprechend auch die *S. cerevisiae*-ADH als Standard mitgeführt. Es wurde nicht weiter untersucht, ob dieses Enzym tatsächlich primäre Alkohole oxidiert oder ob hier eine andere Funktion vorliegt. So wurde z.B. in *Candida boidinii* und *Pichia methanolica* eine Alkoholdehydrogenase

boidinii und *Pichia methanolica* eine Alkoholdehydrogenase entsprechender Größe identifiziert, die eine Funktion als Methylformiatsynthase erfüllt [Mur97]. Unbeachtet der Frage nach der Funktion des Proteins konnte jedoch festgestellt werden, daß dessen Anteil am Gesamtprotein über den gesamten Versuchszeitraum unverändert blieb (Abb. 5-35).

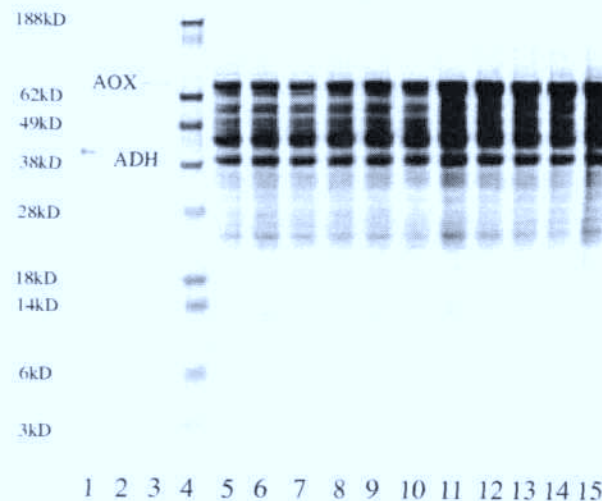


Abb. 5-35: SDS-PAGE von Rohextrakten aus Zellaufschlüssen aus dem im Text geschilderten Versuch zum Verlust der Produktivität. Auf den numerierten Banden sind die folgenden Proben aufgetragen:

1	Alkoholdehydrogenase	9	292,00 h
2	ADH wie 1, 1:10 verdünnt	10	338,50 h
3	Alkoholoxidase	11	360,00 h
4	Größenmarker (See-Blue)	12	369,00 h
5	199,00 h	13	384,00 h
6	221,00 h	14	393,00 h
7	239,50 h	15	414,75 h
8	265,60 h		

Neben den auf den Banden 1 und 2 aufgetragenen Standards enthält auch die Mischung von Größenmarkern eine Alkoholdehydrogenase von 38 kD.

Ebenfalls mit dem Ziel, eine möglicherweise auftretende Veränderung im Stoffwechsel der Zellen zu identifizieren, wurde die Formaldehydkonzentration im Fermentationsmedium gemessen. Formaldehyd ist das primäre Oxidationsprodukt des Methanols und der eigentliche Auslöser toxischer Effekte. Da Formaldehyd in Wasser unbegrenzt löslich ist und frei über die Zellmembran diffundiert, kann von einer linearen Korrelation zwischen extrazellulären und intrazellulären Pools ausgegangen werden. Auch hier konnte keinerlei signifikante Verschiebung des Metabolitpools festgestellt werden, die Formaldehydkonzentration im Fermentationsüberstand betrug durchgängig $51,8 \pm 10,5 \mu\text{M}$.

Zusammengenommen können diese Ergebnisse nur zu der Schlußfolgerung führen, daß der Verlust der Fähigkeit zur Produktbildung auf eine Mutation zurückzuführen ist. Diese Mutation muß die Expressionskassette direkt oder einen *cis*-wirksamen Regulator betreffen, da der übrige Stoffwechsel unverändert bleibt. Die Zunahme der Wachstumsrate ist vor diesem Hintergrund so zu verstehen, daß nach Wegfall der energieaufwendigen Produktsynthese mehr Energie für das Wachstum zur Verfügung steht. Auslöser der Mutation scheint die Verwendung des Substrates Methanol in höheren Konzentrationen

zu sein. Eine weitere und genauere Analyse der aufgetretenen Mutation könnte durch direkte Untersuchung der Expressionskassette mittels PCR erfolgen. Dazu wurden die reisolierten Klone an den Kooperationspartner Mucos-Pharma übersandt, bis zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit lagen jedoch noch keine Ergebnisse vor.

Zusätzlich wurden Reisolat aus der beschriebenen Fermentation mittels RAPD-PCR (4.5.20) untersucht, um das Vorliegen einer Mutation mit molekularbiologischen Methoden bestätigen zu können. Die Analyse des Genoms der isolierten Klone mit fünf verschiedenen RAPD-Primern und zusätzlicher Restriktionsmusteranalyse der RAPD-Amplifikate ergab keine Ergebnisse. Alle untersuchten Klone zeigten identische Bandenmuster. Da aufgrund aller anderen vorliegenden Daten dennoch von einer Mutation ausgegangen werden muß, ist diese entweder eine Basenaustauschmutation, die mit der gewählten Diagnostik unauffällig bleibt oder befindet sich in einem Bereich des Genoms, der mit den zufällig gewählten Primern nicht erfaßt wurde. Eine Ausweitung der Analytik unterblieb, da die Priorität der Arbeiten auf der Prozeßentwicklung gelegt wurde.

5.4 Einsatz von kontinuierlichen Verfahren mit Mischsubstratdosierung

Bei der Expression rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* wird üblicherweise Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle sowie auch als Induktor des AOX1-Promotors eingesetzt. Im Zuge der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen stellten sich aber immer stärker die Nachteile dieses stark reduzierten Substrates (Reduktionsgrad 6) heraus. Methanol wird durch Hefen nur mit geringer Effizienz metabolisiert. Dies führt dazu, daß bei Fermentation mit Methanol als Substrat Schwierigkeiten durch den hohen Sauerstoffverbrauch und die hohe Wärmefreisetzung entstehen können. Diese Probleme werden durch den Einsatz von Hochzelldichteverfahren weiter verstärkt. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit einer nutristatischen Prozeßführung, die sich aus der Toxizität des Substrates ergibt. Neben dem kostenträchtigen Aufwand für eine nutristatische Prozeßführung, führt diese bei Applikation in einem kontinuierlichen Verfahren zu einem erheblichen Selektionsdruck zugunsten von Mutanten mit höherer Wachstumsrate.

Schließlich ist Methanol giftig und hochentzündlich (LD_{50} (oral, Ratte): $5628 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, MAK: $270 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$, Flammpunkt: $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Im Hinblick auf eine Maßstabsvergrößerung des Verfahrens ist deshalb bei der Lagerung dieses Gefahrstoffs in größeren Mengen mit erheblichen Zusatzkosten durch entsprechende Sicherheitsauflagen zu rechnen.

Aus diesen Gründen sollte eine Möglichkeit aufgezeigt werden, die Verwendung von Methanol als Substrat so weit wie möglich einzuschränken. Als Methode der Wahl wurde dazu ein mixed-feed Verfahren bestimmt. Als Kohlenstoff- und Energiequelle sollte ein gängiges, preiswertes und leicht zu metabolisierendes Substrat dienen, der Induktor für den Alkoholoxidasepromotor würde dann nur noch in wesentlich geringeren Konzentrationen als Medienzusatz verwendet.

Die theoretische Grundlage für diesen Ansatz findet sich in den Arbeiten von EGLI et al. [Egl82] [Egl84] [Egl86]. Werden in einer Fermentation zwei verschiedene Substrate vorgelegt, so werden diese sukzessiv metabolisiert. Die Reihenfolge der Metabolisierung hängt dabei von der genetisch determinierten Affinität des jeweiligen Organismus ab, häufig ist Glucose das bevorzugt angenommene Substrat. Dieses Phänomen mit dem daraus resultierenden, zweistufigen Wachstum wird als Diauxie bezeichnet. Anders verhält es sich, wenn mehrere Substrate in einem chemostatisch geführten Ansatz gleichzeitig zugefüttert werden. Unter diesen Bedingungen werden auch beide Substrate parallel metabolisiert, wobei die Stoffwechselwege einander nicht beeinflussen. Am Beispiel der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* wurde dies mit dem Substratsystem Glucose / Methanol gezeigt und auch der Einfluß von Durchflußrate und Mischungsverhältnis untersucht.

Auch für *Pichia pastoris* wurden bereits Verfahren beschrieben und patentiert, bei de-

nen eine Mischung verschiedener Substrate für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt wurde [Sre89] [Bri90]. Als Alternative zum limitierten Einsatz eines reprimierenden Substrates hätte auch die Möglichkeit bestanden, ersatzweise einen Zuckeralkohol wie Sorbitol zu verwenden, da diese den AOX1-Promotor nicht reprimieren [Tho99].

5.4.1 Screening für den Einsatz von Substratmischungen

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der bereits angesprochenen Mischung Glucose / Methanol noch weitere Substanzen auf ihre Eignung als Induktor des AOX1-Promotors hin untersucht.

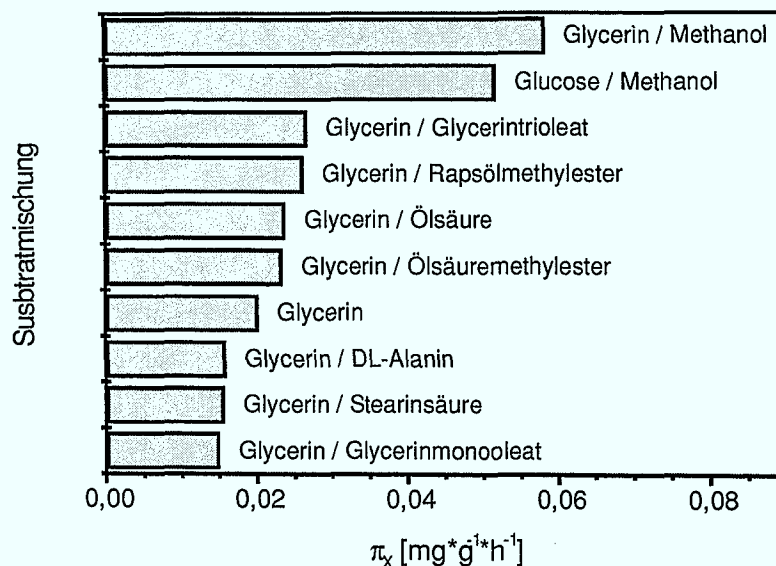


Abb. 5-36: Biomassespezifische Produktbildungsrate bei kontinuierlicher Fermentation in gerührten Blasensäulen mit chemostatischer Prozeßführung mit verschiedenen Substrat / Cosubstrat Kombinationen. Rapsöl enthält ca. 90 % Ölsäure.

Als Cosubstrate untersucht wurden neben Methanol verschiedene Substanzen, die möglicherweise den AOX1-Promotor induzieren könnten. Obwohl es in der Literatur keinen Nachweis für eine derartige Wirkung gibt, liegen doch eine Reihe von Hinweisen vor. So wurde in *Candida boidinii* gezeigt, daß die Bildung von Peroxisomen außer durch Methanol auch durch Ölsäure und D-Alanin induziert werden konnte [Goo90]. Methylo trope Hefen sind demnach auch in der Lage auf diesen Substraten zu wachsen. Die Verwendung von Ölsäure als Substrat ermöglichte die Expression heterologer Proteine im Schüttelkolben, wenn auch nur in sehr geringem Maße [Cregg JM, persönliche Kommunikation]. Schließlich existieren zwei japanische Patente, in denen die Verwendung von Fettsäuren, vorzugsweise Ölsäure bzw. von deren Methylestern als Substrat für die Expression heterologer Proteine in *Pichia pastoris* geschützt ist (Beide Schriften liegen nur in japanischer Sprache mit englischsprachigen Zusammenfassungen vor und wurden deshalb nicht in das Literaturverzeichnis aufgenommen: Kuwae et al. (1997): JP9322764A2: Suppression of human serum albumin decomposition. Kuwae et al. (1998) : JP10014564A2 : Production of protein).

Aufgrund dieser Hinweise wurden neben Methanol auch Alanin und verschiedene Fettsäuren und Fettsäurederivate untersucht. Dieses Cosubstratscreening wurde unter Glycerin-Limitierung im Chemostaten unter Verwendung der im Methodenteil beschriebenen Anlage zur Parallelfermentation durchgeführt. Als Produktionsstamm in den Blasensäulenversuchen wurde die vierfach-Transformante #885 verwendet. Dieser Stamm wurde eingesetzt, da er in vorhergehenden Versuchen eine höhere Produktbildungsrate gezeigt hatte und deshalb unter den suboptimalen Bedingungen in der Parallelfermentationsanlage eine höhere Signifikanz der Daten erwartet wurde. In allen Versuchen wurde das Hauptsubstrat (Glucose oder Glycerin) mit einer Zulaufkonzentration von $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und der jeweils zu untersuchende Induktor mit einer Zulaufkonzentration von $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt. Bei einer konstanten Verdünnungsrate von $D=0,067 \text{ h}^{-1}$ konnte eine bezüglich des Hauptsubstrates limitierte Prozeßführung im Chemostaten sichergestellt werden. Auf eine quantitative Analyse der Gleichgewichtskonzentration der Cosubstrate wurde verzichtet, da die Etablierung von Analysemethoden für alle untersuchten Substanzen zu aufwendig gewesen wäre.

Die Auswertung der Fermentation mit Glycerin als einzigem Substrat zeigte, daß es hier bereits zu einer signifikanten Expression des Chymotrypsinogen-Gens unter Kontrolle des AOX1-Promotors kommt. Das widerspricht der gesamten bisher vorliegenden Literatur [z.B. Lin00], in der stets betont wird, daß die Transkription eines AOX1-regulierten Gens sowohl Derepression mangels eines reprimierenden Substrates als auch Induktion durch Methanol voraussetzt. Dadurch unterscheide sich die Regulation des *Pichia pastoris* AOX1-Promotors von der des MOX-Promotors aus *Hansenula polymorpha*. Die vorliegenden Daten belegen jedoch, daß auch bei *Pichia* bereits eine Derepression ausreicht, um die Expression des nachgeschalteten Produktgens auszulösen. Eine zusätzliche Induktion mit Methanol führt dann zu einer erheblichen Steigerung der Produktbildungsrate.

Mit Ausnahme von Methanol bewirkt keines der untersuchten Cosubstrate eine signifikante Induktion des AOX1-Promotors. Die in verschiedenen Quellen angedeutete Eignung dieser Substrate beruht demnach auf der Tatsache, daß es sich offensichtlich um nicht-reprimierende Substrate handelt. Die biomassespezifische Produktbildungsrate ist bei Verwendung der aufgeführten Substanzen nicht höher als bei C-limitierter Kultivierung mit Glycerin alleine. Keines der untersuchten Substrate eignet sich demnach als Induktor des AOX1-Promotors. Eine Induktion wird ausschließlich durch Methanol hervorgerufen.

Der Vergleich der beiden untersuchten Substrate Glycerin und Glucose zeigt, daß auch hier keine signifikanten Unterschiede auftreten. Beide Substrate scheinen sich gleichermaßen als Basis für ein mixed-feed Verfahren zu eignen. Aufgrund wirtschaftlicher Überlegungen wurde für die weiteren Versuche Glucose als Hauptsubstrat gewählt, da diese erheblich preiswerter ist als Glycerin. Während Glucose in ausreichender Qualität einen Preis von ca. $0,60 \text{ DM} \cdot \text{kg}^{-1}$ hat, ist für Glycerin (86%) ein Preis von $1,8 - 3,5$

DM·kg⁻¹ zu veranschlagen (Preisauskunft Cognis Deutschland GmbH).

5.4.2 Kontinuierliche Fermentation im mixed-feed Verfahren mit Glucose und Methanol

Anhand der im voranstehenden Kapitel geschilderten Ergebnisse und der Erfahrungen aus der Prozeßentwicklung für das kontinuierliche Fermentationsverfahren mit Methanol als Substrat konnte das kontinuierliche mixed-feed Verfahren analog etabliert werden. Nach dem Ende des Wachstums auf dem Vorlagesubstrat wurde mit der Dosierung des Zulaufmediums begonnen, unter Verwendung der „oxygen-peak“-Methode wurde die Durchflußrate dann an den Zielwert von 0,075 h⁻¹ herangeführt. Es zeigte sich, daß innerhalb von 8 h die Dosiergeschwindigkeit bis auf diesen Wert erhöht werden konnte, ohne daß zu irgend einem Zeitpunkt eine Akkumulation von Glucose auftrat. Im Vergleich zu dem Zeitraum von ca. 200 h, die bei der Verwendung von Methanol im Nutristaten bis zum Erreichen des ersten steady-state benötigt wurden, stellt dies vor allem aus wirtschaftlicher Sicht eine erhebliche Verbesserung dar. Die Durchflußrate von 0,075 h⁻¹ wurde gewählt, da bei dieser Durchflußrate im Methanol-Nutristaten die meisten und auch die besten Ergebnisse erzielt wurden.

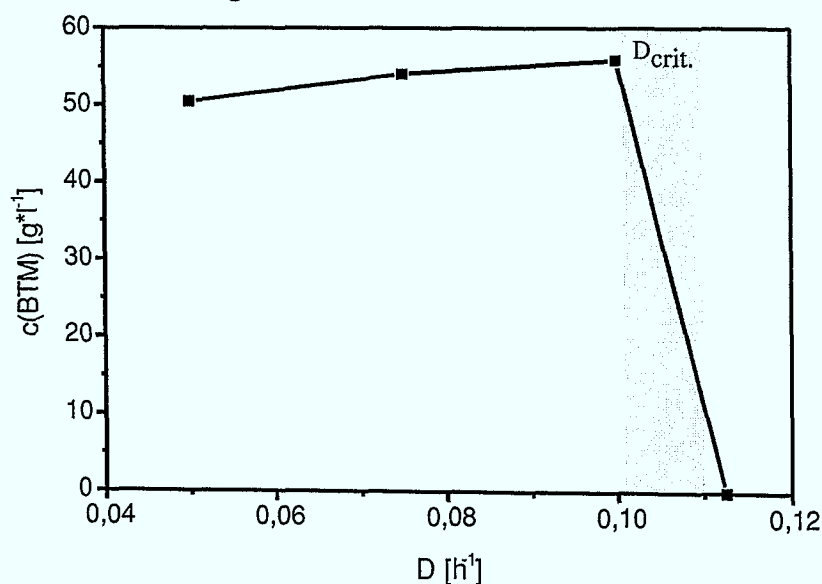


Abb. 5-37: X-D-Diagramm: Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration von der Verdünnungsrate bei konstanter Zulaufkonzentration bei kontinuierlicher Fermentation mit Glucose als einzigem Substrat. Die maximale Durchflußrate $D_{crit.}$ liegt innerhalb des grau hinterlegten Bereichs.

Die maximale Wachstumsrate auf Glucose alleine betrug zwischen 0,10 h⁻¹ und 0,11 h⁻¹, wie aus dem X/D-Diagramm in Abbildung 5-37 ersichtlich ist. Die molare Biomasse-selektivität $Y_{X/S}$ betrug bei maximaler Wachstumsrate 0,61 C-mol·C-mol⁻¹ und ist damit wesentlich höher als bei Wachstum auf Methanol, wo in einem Stamm ohne Produktbildung ein Maximalwert von 0,47 C-mol·C-mol⁻¹ gemessen wurde. In Abbildung 5-39 ist die normierte Kohlenstoffbilanz für kontinuierliche Fermentationen mit Methanol bzw. Glucose als Einzelsubstrate dargestellt. Für die Kohlenstoffbilanz sind nur Kohlenstoffdioxid und Biomasse als Komponenten signifikant, alle anderen Substanzen (z.B.

Produkt, Ethanol) können aufgrund ihres geringen Anteils vernachlässigt werden. Beide Bilanzen sind zu über 100 % geschlossen, die Überdeckung beträgt 3 % bei Methanol und 9 % bei Glucose. Der Fehler ergibt sich als Summe der Meßfehler bei Substrateinwaage, Substratdosierung, Abgasmessung und BTM-Bestimmung.

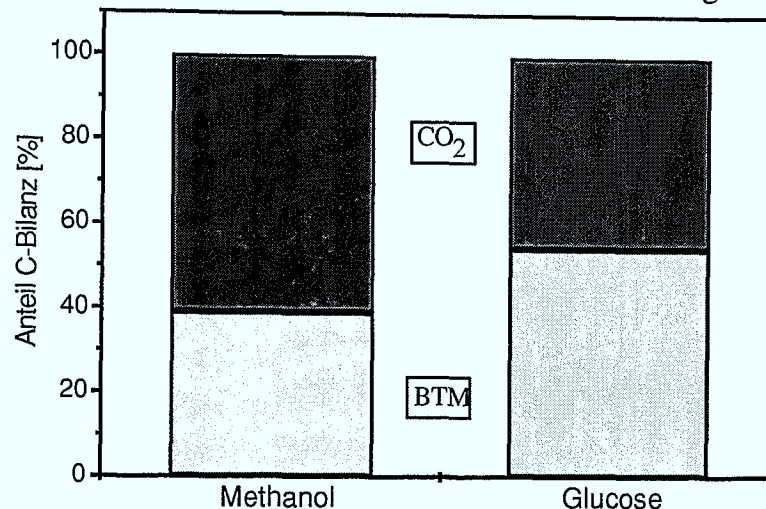


Abb. 5-38: Normierte Kohlenstoffbilanzen für die kontinuierliche Fermentation mit Methanol und Glucose als jeweilige Einzelsubstrate.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Glucose als Substrat liegt somit in der effizienteren Nutzung dieses Substrates durch Hefezellen, dies wurde im Theorieteil (3.4.3) bereits eingehend diskutiert. Die Intention des mixed-feed Verfahrens ist, den Methanoleinsatz für die Produktion rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* zu minimieren. Aus diesem Grund bietet sich der Einsatz von Stämmen mit einem Mut^S-Phänotyp für diese Kultivierungsmethode nachgerade an. Die Untersuchungen wurden deshalb sowohl mit dem Mut^S-Stamm #769 als auch mit dem Standardstamm #647 durchgeführt.

Auch im mixed-feed Verfahren trat eine genetische Instabilisierung der Zellen auf, die sich jedoch nicht direkt auf die Produktivität auswirkte sondern primär den Mut-Phänotyp betraf. Dieses Phänomen ist in Abschnitt 5.4.4 gesondert diskutiert. Für die Darstellung der Mischsubstratkinetik im folgenden Kapitel wurden nur die Datenpunkte herangezogen, bei denen eine Beeinflussung der biomassespezifischen Produktbildungsrate durch genetische Destabilisierung bzw. durch Sekundäreffekte ausgeschlossen werden konnte.

5.4.3 Mischsubstratkinetik für das System Glucose / Methanol

In den Versuchen zur Bestimmung der Mischsubstratkinetik mit dem gewählten Substratsystem Glucose / Methanol wurde bei konstanter Durchflußrate $D=0,075 \text{ h}^{-1}$ und konstanter Zulaufkonzentration für das Hauptsubstrat Glucose $c(\text{Glucose})_{\text{in}}=100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ im Chemostaten die Zulaufkonzentration des Induktors Methanol variiert.

Die schon in den Versuchen im Parallelansatz gemachte Beobachtung, daß auch ohne

Induktion durch Methanol bereits eine signifikante Produktbildung unter Glucose-limitierten Bedingungen stattfindet, konnte hier noch einmal bestätigt werden. Mit allen unter diesen Bedingungen getesteten Stämmen lag diese bei ca. $0,02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, unabhängig davon, ob Glucose oder Glycerin als Substrat eingesetzt wurden. Auch konnte unter diesen Kulturbedingungen im Zellaufschluß eine deutliche Alkoholoxidaseaktivität gemessen werden, die mit $65 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ RP}$ bei ca. 15 % des Maximalwertes in voll induzierten Zellen lag. Die Feststellung, daß auch bei *Pichia pastoris* bereits unter dereprimierenden Bedingungen eine signifikante Expression des unter der Kontrolle des AOX1-Promotors stehenden Produktgens stattfindet, steht im deutlichen Gegensatz zur den bislang publizierten Mechanismen, wie sie im Abschnitt 3.4.6 detailliert beschrieben sind.

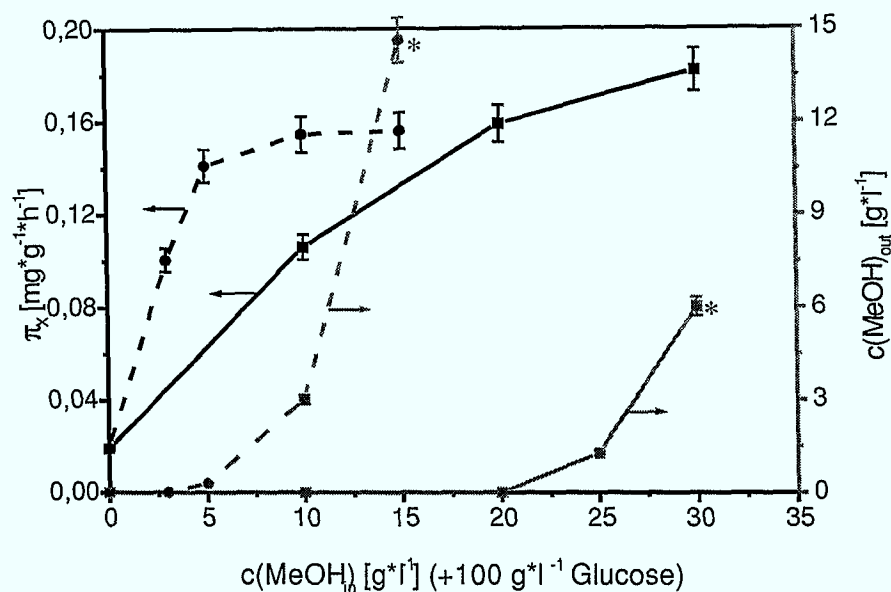


Abb. 5-39: kontinuierliche Fermentation im mixed-feed Verfahren mit dem Mut⁺-Produktionsstamm #647 (durchgez. Linien, Quadrate) und dem Mut^S-Stamm #769 (Striche, Kreise). Dargestellt sind die biomassespezifische Produktbildungsrate (schwarz, linke Y-Achse) und die Methanolkonzentration im Ablauf (grau, rechte Y-Achse) in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration im Zulauf bei konstanter Glucosedosierung und konstanter Durchflußrate. Die mit einem Stern * gekennzeichneten Datenpunkte stehen in Zusammenhang mit der im Kapitel 5.4.4 diskutierten Verschiebung des Mut-Phänotyps.

Entsprechend dem Mut-Phänotyp der beiden verwendeten Stämme waren die Methanolverbrauchsrate sehr unterschiedlich. Bei dem Stamm mit Mut^S-Phänotyp war bereits bei einer Methanolkonzentration von $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ im Zulaufmedium das Cosubstrat im Fermentationsüberstand meßbar, erst ab einer Zulaufkonzentration über $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bei Verwendung des Mut⁺-Stammes. Dementsprechend war auch die Produktbildung des Mut^S-Stammes bei deutlich niedrigeren Methanolzulaufkonzentrationen schon voll induziert. Wie erwartet konnte also bei Verwendung von Stämmen mit Mut^S-Phänotyp die einzusetzende Methanolmenge noch weiter reduziert werden. Allerdings ist die maximale, biomassespezifische Produktbildungsrate des Stammes #647 (Mut⁺) signifikant höher als die des Stammes #769 (Mut^S), dabei ist jedoch ein direkter, mechanistischer Zusammenhang der maximalen Produktbildungsrate zum Mut-Phänotyp nicht herzustellen.

len.

In der kontinuierlichen Fermentation im mixed-feed Verfahren werden maximale Raum-Zeit-Ausbeuten von $10,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $8,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht, die zugehörigen Biotrockenmassekonzentrationen betrugen $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bzw. $56 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Damit ist die Raum-Zeit-Ausbeute im mixed-feed Verfahren zwar deutlich geringer als in der kontinuierlichen Fermentation mit Methanol als einzigem Substrat ($25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) aber immer noch viel höher als in den untersuchten Zulaufverfahren. Gleichzeitig konnte auch der Sauerstoffverbrauch weiter drastisch reduziert werden. Korrespondierend zu den angeführten, maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten wurden Sauerstoffeintragsraten von $207 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die Fermentation des Mut^+ -Stammes und $157 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei Einsatz des Mut^S -Stammes verwirklicht. In dem Versuch mit Methanol als Substrat wurden hingegen $435 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ benötigt. Da sich im Verlauf der gesamten Prozeßentwicklung der Sauerstoffeintrag stets als die limitierende Prozeßgröße dargestellt hatte, muß diese auch als Referenzgröße für die Produktbildung herangezogen werden. In Abbildung 5-40 sind dementsprechend die Produkt- O_2 -Selektivitäten der einzelnen bisher dargestellten Prozesse miteinander verglichen. Alle kontinuierlichen Prozesse sind in dieser Hinsicht sehr ähnlich, die Nachteile des Zulaufverfahrens werden besonders deutlich herausgestellt.

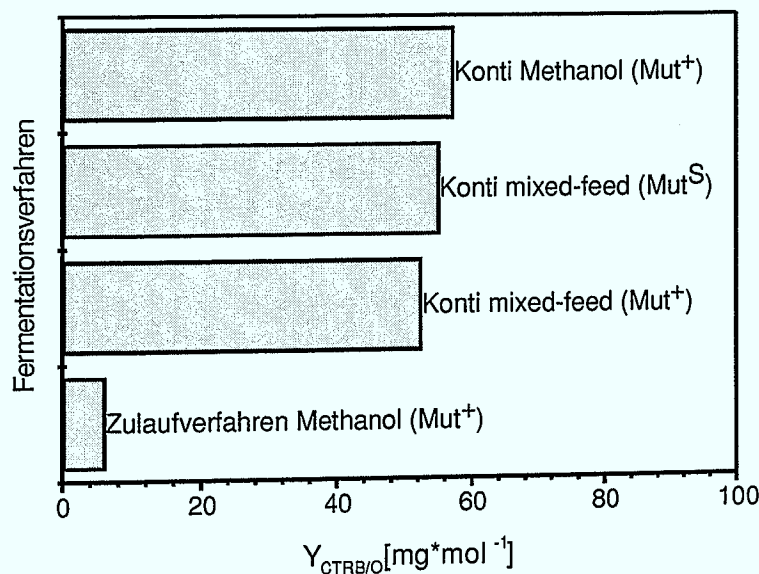


Abb. 5-40: Vergleich der verschiedenen Fermentationsverfahren bezüglich der Produkt-Sauerstoff-Selektivität. Diese drückt aus, wieviel mg Produkt, bezogen auf den maximalen Sauerstoffverbrauch, in den einzelnen Verfahren gebildet wird.

Unter den Bedingungen des Wachstums auf Glucose mit zusätzlicher Induktion durch Methanol ist die biomassespezifische Produktbildungsrate geringer als bei Wachstum auf Methanol alleine. Eine Inhibierung durch Glucose kann ausgeschlossen werden, da alle Versuche unter strikter Glucoselimitierung durchgeführt wurden. Es wurde jedoch in den Fermentationen stets eine geringe Ethanolkonzentration von bis zu 5 mM im Kulturüberstand gemessen. Da Ethanol ebenso wie Glucose die Expression des AOX1-Promotors inhibiert [Lin00], kann dies die Ursache für die geringere Expressionsrate

sein. Ein derartiger Effekt wurde bereits bei der Verwendung von Zulaufverfahren mit Mischsubstratdosierung beobachtet [Chi97], auch bei der Verwendung von Glycerin als Wachstumssubstrat kam es zur Ethanolbildung.

Das Ziel bei der Entwicklung des mixed-feed Fermentationsverfahrens war, den Bedarf an Methanol so weit wie möglich zu senken. Dieses Ziel konnte erreicht werden, insbesondere durch die Kombination des mixed-feed Verfahrens mit Produktionsstämmen, die einen Mut^S -Phänotyp zeigen. Es steht somit ein Verfahren zur Verfügung, das chemostatisch geführt werden kann. Weiterhin konnte durch den Einsatz von Glucose als Hauptsubstrat der spezifische Sauerstoffverbrauch drastisch reduziert werden. Schließlich konnte das größte Problem des kontinuierlichen Verfahrens, die genetische Instabilität der Produktionsstämmen, durch die Kombination des mixed-feed Verfahrens mit Mut^S -Produktionsstämmen sicher vermieden werden.

5.4.4 Stabilität des Mut-Phänotyps während der kontinuierlichen Fermentation mit Mischsubstrat

Wie bereits in Kapitel 5.4.2 angesprochen, trat auch bei der kontinuierlichen Fermentation im mixed-feed Verfahren eine Veränderung des Phänotyps auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit genetische Ursachen hatte. Während der Fermentation kam es plötzlich zu einer deutlichen Reduzierung der Methanolverbrauchsrate und dementsprechend zu einem Anstieg der Methanolkonzentration im Fermenter. Von diesem Phänomen waren beide Phänotypen gleichermaßen betroffen.

Ein direkter Auslöser für diesen Effekt konnte nicht ermittelt werden, jedoch trat das Phänomen häufiger bei höheren Methanolzulaufkonzentrationen auf. Als Beispiel für den Effekt dienen die mit Sternen gekennzeichneten Datenpunkte in 5-36. Es ist leicht ersichtlich, daß bei diesen Meßwerten die Methanolkonzentration überproportional hoch ist, demnach also die maximale Verbrauchsrate reduziert ist.

Tatsächlich konnte in Zellproben von Stämmen mit Mut^+ -Phänotyp aus diesen Fermentationen eine deutlich reduzierte Alkoholoxidaseaktivität gemessen werden (Abb. 5-41). Die zellintern gemessene Alkoholoxidaseaktivität nahm von durchschnittlich $490 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ Rohprotein auf $36 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ab. Proportional zu der ca. 70 kD großen AOX-Bande ist auch die CTRB-Bande (26 kD) in ihrer Stärke reduziert. Diese Veränderung im Zellmetabolismus hatte jedoch keine direkte Auswirkung auf die Produktbildung. Es kam zwar zu einer Abnahme der Produktivität, davon waren jedoch ausschließlich Mut^+ -Stämme betroffen, bei denen es zu einer erheblichen Anreicherung von Methanol gekommen war. Wie bereits gezeigt wurde, kann dies zur Instabilisierung der Fähigkeit zur Produktbildung führen. Bei Mut^S -Stämmen war die Produktivität von der verminderten Fähigkeit zur Methanolmetabolisierung in keiner Weise betroffen. Aufgrund der sehr geringen AOX-Aktivität von Mut^S -Stämmen konnte eine weitere Abnahme dieser Aktivität nicht signifikant nachgewiesen werden. Durch Messung der Verbrauchsrate aber auch hier gezeigt werden, daß die Fähigkeit der Zellen zur Methanoloxidation noch wei-

ter abgenommen hatte.

Die Phänotypisierung von Klonen (Abb. 5-42), die aus Fermentationen im mixed-feed Verfahren isoliert worden waren, bestätigte, daß die Reduzierung der Fähigkeit der Zellen, Methanol als Substrat zu nutzen irreversibel war. In Proben aus einer Fermentation mit uneingeschränktem Methanolverbrauch waren dabei 97 % aller Klone ($n=36$) eindeutig Mut^+ , dieser Anteil fiel mit dem Anstieg der Methanolkonzentration auf 16 % und weiter auf 14 % ab. In einem zweiten, gleichartigen Versuch betrug der Anteil der Mut^+ -Klone zunächst 83 % und sank dann auf 6 % und schließlich auf 0 ab. Die Zuverlässigkeit der im Abschnitt 4.5.19 beschriebenen Methode konnte durch die korrekte Phänotypisierung aller Proben von Referenzstämmen aus der Sammlung ($n=27$) verifiziert werden.

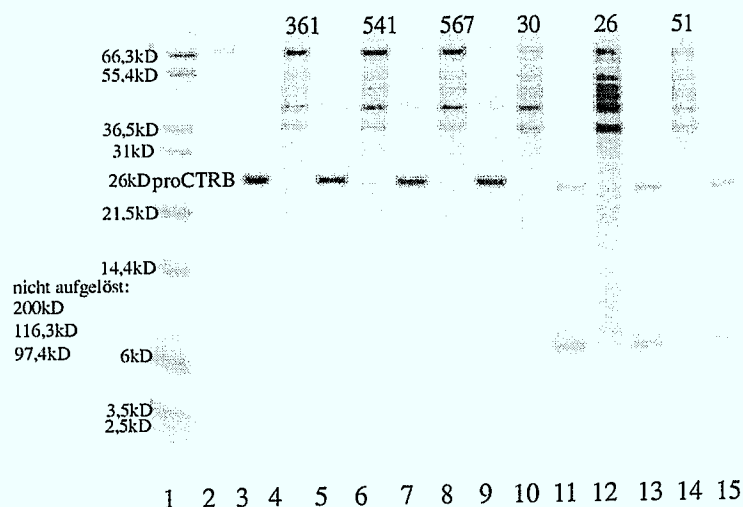


Abb. 5-41: SDS-PAGE von Rohextrakten aus Zellaufschlüssen und Kulturüberständen aus der Fermentation eines Mut^+ -Stammes im mixed-feed Verfahren. Auf den nummerierten Spuren sind die folgenden Proben aufgetragen:

- 1 Größenmarker Mark 12
- 2 Alkoholoxidase-Standard
- 3 proCTRB-Standard
- 4,6,8 Zellaufschlüsse vor Verlust AOX-Aktivität
- 5,7,9 Kulturüberstände dto.
- 10,12,14 Zellaufschlüsse nach Verlust AOX-Aktivität
- 11,13,15 Kulturüberstände dto.

Die Zahl oberhalb der Alkoholoxidasebande gibt die in den jeweiligen Proben gemessene, spezifische AOX-Aktivität in U / mg Rohprotein an.

Bei Stämmen, die schon ursprünglich einen Mut^S -Phänotyp gezeigt hatten, konnte die Methode der Typisierung auf Agarplatten nicht verwendet werden. Um auch hier ein eindeutiges Ergebnis zu erlangen, wurde mit dem reisolierten Klon #769C46 (siehe Aufstellung der Expressionsstämme in Abschnitt 4.1) eine kontinuierliche Fermentation im mixed-feed Verfahren inokuliert. Mit dieser Fermentation konnte gezeigt werden, daß bei dem verwendeten Klon eine irreversible Reduzierung der Fähigkeit zur Oxidation von Methanol eingetreten war. Dieser Phänotyp wird deshalb an dieser Stelle als Mut^S bezeichnet. Während bei der Fermentation mit dem Ursprungsstamm bei einer Methanolkonzentration von $3,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ im Zulaufmedium kein Methanol im Kulturüberstand nachweisbar war, wurde hier eine steady-state Konzentration von $0,01 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ge-

messen. Diese Methanolkonzentration stellte sich beim Ursprungstamm erst bei einer Zulaufkonzentration von $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ein. Die biomassespezifische Produktbildungsrate des Klons #769C46 unter den eingestellten Bedingungen entsprach mit $0,16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ dem Maximum der Fermentation, aus der der Klon isoliert worden war (vgl. Abb. 5-39).

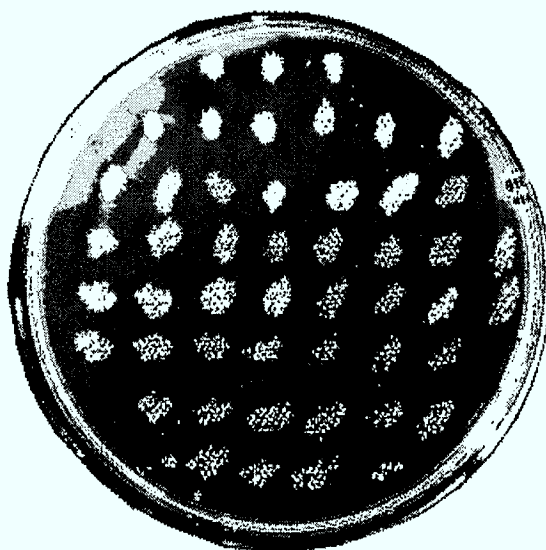


Abb. 5-42: YNB-Methanol-Agarplatte zur Mut-Phänotypisierung von Reisolaten aus kontinuierlicher Kultur. Die Differenzierung von Mut^+ - und Mut^S -Phänotypen ist sofort mit bloßem Auge möglich.

Demnach sollte der mutierte Stamm bereits bei einer niedrigeren Zulaufkonzentration des Induktors die maximale Produktbildungsrate erreichen, so wie das auch bei dem Vergleich zwischen Mut^+ und Mut^S (Abb. 5-39) dargestellt werden konnte. Eine geringere Methanolverbrauchsrate schlägt sich direkt im Sauerstoffbedarf der Fermentation nieder. So wurde in der Fermentation mit dem reisolierten Stamm #769C46 eine OTR von nur noch $141 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gemessen. Dies legt die Verwendung von Stämmen nahe, die gar nicht mehr in der Lage sind, Methanol zu verbrauchen (Mut^-). Derartige Stämme existieren [Chi97], standen aber für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung. Ein solcher Produktionsstamm könnte entweder durch Verwendung eines Akzeptorstammes mit Mut^- -Phänotyp oder durch weiterführende Selektion eines vorhandenen Stammes in kontinuierlicher Kultur erhalten werden.

Es konnte somit dargestellt werden, daß unter den Bedingungen der mixed-feed Fermentation mit Glucose als Haupts substrat und Methanol als Cosubstrat im C-limitierten Chemostaten ein Selektionsdruck gegen die Fähigkeit zur Metabolisierung von Methanol aufgebaut wird. Es setzen sich Mutanten mit immer schwächer ausgeprägtem Mut-Phänotyp (Methanol ut ilization) in der Kultur durch. Worin der Selektionsvorteil dieser Mutanten besteht, bleibt zunächst unklar. Es kann allerdings vermutet werden, daß der Verzicht auf ein zweites katabolisches System zum Abbau von Methanol den entsprechenden Mutanten einen Selektionsvorteil in kontinuierlicher Kultur auf Mischsubstrat verschafft. Da die Alkoholoxidase im Mut^+ -Stämmen bei Induktion durch Methanol bis zu 30 % des Gesamtproteins ausmacht, fordert deren Synthese der Zellen

einen erheblichen Energieaufwand ab. Da als Substrat Glucose zur Verfügung steht, stellt dieser zusätzliche Energieaufwand für die Zelle eine metabolische Last dar.

Die genetischen Ursachen einer solchen Veränderung des Phänotyps können vielfältig sein, eine Untersuchung der Reisolatate mittels RAPD-PCR ergab keine Veränderung im Bandenmuster zwischen Ausgangsstamm und Reisolaten (vgl. 5.3.4).

5.5 Produktaufarbeitung

Die Entwicklung der Aufarbeitungsmethodik war nicht Bestandteil dieser Arbeit sondern wurde in enger Kooperation am Institut für Enzymtechnologie (IET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jörg Thömmes durchgeführt. Da die Ergebnisse dieser Arbeiten jedoch für die Bewertung der einzelnen Fermentationsverfahren von Bedeutung sind, werden sie an dieser Stelle mit angeführt. Für detailliertere Informationen wird auf die zugehörige Publikation verwiesen [Tho00].

Es zeigte sich, daß die Applikation herkömmlicher Fest-Flüssig-Trennverfahren wie Filtration oder Sedimentation für das verwendete Expressionssystem *Pichia pastoris* im größeren Maßstab wenig erfolgversprechend war. Aufgrund der heterogenen Morphologie von *Pichia pastoris*-Zellen mit Bildung umfangreicher Pseudomycelien traten große Flüssigkeitseinschlüsse in Filterkuchen bzw. Sedimenten auf. Bei Sedimentation im Erdschwerefeld betrug das Sedimentvolumen einer Zellsuspension mit 50 % Feststoffanteil 85 % des Gesamtvolumens als Endwert. Dies ist typisch für ein System mit Sedimentationshinderung. Auch bei Zentrifugation in einem herkömmlichen, kontinuierlich betriebenen Separator (3000 – 5000 ·g) blieben erhebliche Flüssigkeitseinschlüsse erhalten, die mehrfache Waschschrte notwendig gemacht hätten. Ähnliches gilt für die Zellabtrennung durch Filtration, aufgrund der Zellmorphologie bildet sich ein hochkompressibler Filterkuchen mit hohem Filterwiderstand.

Aus diesen Gründen wurde die Entwicklung der Aufbereitungsverfahrens auf Methoden fokussiert, die eine Aufreinigung des Produktes ohne vorherige Biomasseabtrennung erlauben. Zwei verschiedene Verfahren wurden entwickelt, die beide eine effiziente Aufarbeitung von Chymotrypsinogen B ermöglichen.

Unter Verwendung eines wäßrigen Zweiphasensystems mit Polyethylenglycol 600 und Natriumsulfat war die Behandlung von Fermentationsbrühen mit einem Feststoffanteil von bis zu 50% möglich. Zellen und Zelltrümmer verblieben in der Unterphase (Salzphase) während das teilweise aufgereinigte Produkt in der Oberphase (PEG-Phase) aufkonzentriert werden konnte. Die weitere Aufreinigung des Produktes erfolgte durch Chromatographie mit dem Kationentauscher SP Sepharose Big Beads und Elution mit einem Salzschrte. Die vollständige Integration dieses Aufreinigungsverfahrens mit der Fermentation im Zulaufverfahren gelang durch die Abstimmung des pH-Wertes. Nach Fermentation bei pH 3,0 konnte die Kulturbrühe ohne weitere Anpassung der Aufarbeitung zugeführt werden. Es wäre durchaus möglich, Kultivierung und Prozessierung nacheinander in einem einzigen Gefäß durchzuführen.

Eine Einschrte-Aufarbeitung von Chymotrypsinogen B wurde durch die Verwendung einer expanded-bed Absorption möglich. Die verdünnte Fermentationsbrühe wird bei dieser Methode auf eine Chromatographiesäule aufgegeben, in der sich ein spezieller Ionentauscher (Streamline SP XL) in einem fluidisierten Bett befindet. Nach Absorption

des Produktes und Auswaschung der Zellen wird das Ionentauschermaterial kompaktiert und im Festbett über eine Salzschrift eluiert.

Die expanded-bed Chromatographie kann mit Suspensionen mit einem maximalen Biofeuchtmasseanteil von 10 – 12,5 % beaufschlagt werden. Deshalb eignet dieses Verfahren sich vorzugsweise für die Kombination mit dem kontinuierlichen Fermentationsverfahren. Hingegen kann das wäßrige Zweiphasensystem mit bis zu 50 % Biofeuchtmasse eingesetzt werden und ist deshalb für die Aufreinigung von Kultursuspensionen aus dem Zulaufverfahren besonders geeignet.

Beide Verfahren ergeben ein Produkt vergleichbarer Qualität, das durch Ultrafiltration / Diafiltration und anschließender Lyophilisation zu einem homogenen Präparat verarbeitet werden kann. Für beide Verfahren wurde eine Maßstabsvergrößerung mit 30 – 90 l Kulturbrühe erfolgreich durchgeführt. Aus verschiedenen Fermentationsansätzen konnte die Gesamtmenge von 70 g humanem Chymotrypsinogen B als homogenes Produkt dargestellt werden.

Der integrierte Ansatz aus Fermentation und Produktabtrennung im wäßrigen Zweiphasensystem wurde unter dem Titel „Verfahren zur Herstellung und Extraktion von Proteinen“ zum Patent angemeldet (Deutsche Patentanmeldung 199 38 703.6-41).

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Verfahrensansätze für die Produktion sekretorischer, rekombinanter Proteine mit der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* zu entwickeln. Als Modellsystem wurde dazu die Expression des rekombinanten, humanen Chymotrypsinogen B untersucht. Chymotrypsinogen B ist die inaktive Vorstufe des Enzyms Chymotrypsin B, dem ein hohes Potential als Wirkstoff in der Systemischen Enzymtherapie zuerkannt wird. Ein optimales Produktionsverfahren sollte eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute mit einer einfachen, robusten Prozeßführung kombinieren und die Belange der nachgeschalteten Aufarbeitung berücksichtigen.

Durch die Verknüpfung von biologischen und verfahrenstechnischen Ansätzen konnten mehrere Fermentationsverfahren erarbeitet werden, die den Anforderungen an ein Produktionsverfahren in unterschiedlicher Weise gerecht werden. In enger Kooperation mit dem Institut für Enzymtechnologie ist es gelungen, die dort entwickelten Aufarbeitungstechniken und die Fermentation optimal aufeinander abzustimmen. Durch den Einsatz des integrierten Verfahrens konnten dem Kooperationspartner ca. 70 g hochreines Chymotrypsinogen B für vorklinische Untersuchungen bereitgestellt werden.

- Ausgehend von bereits in der Literatur beschriebenen Verfahren wurden Protokolle zur Hochzelllichtfermentation im Zulaufverfahren etabliert. Dabei wurden die beiden wichtigsten Promotorsysteme, die für *Pichia pastoris* bekannt sind, vergleichend untersucht. Aufgrund der höheren spezifischen Produktbildungsrate wurde der AOX1-Promotor für die Expression von rekombinantem Chymotrypsinogen ausgewählt.
- Durch Optimierung der Fermentationsparameter zur Minimierung des proteolytischen Produktabbaus und durch die Applikation einer Methanolregelung im geschlossenen Regelkreis wurde das Verfahren weiterentwickelt. Bei einer Produktreinheit von >95 % konnte humanes Chymotrypsinogen mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $5,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tab. 6-1) hergestellt werden. Der Nachteil dieses Verfahrens ist der aus der Biotrockenmassekonzentration von $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ resultierende hohe Sauerstoffbedarf von bis zu $870 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, der nur durch die Beimischung von Reinsauerstoff zur Prozeßluft realisiert werden konnte.
- Der hohe Sauerstoffbedarf der Hochzelllichtfermentation stellt ein Problem bei der Übertragung in den technischen Maßstab dar, im Scale-Up führte die geringere OTR deshalb zu Produktivitätseinbußen. Als konventionelle Strategie zur Vermeidung dieser Problematik wurde der Einsatz von Mut^S-Stämmen, die auf Methanol als Substrat nur langsam wachsen, mit positivem Ergebnis untersucht.
- Als Alternative zur Hochzelllichtfermentation im Zulaufverfahren wurde erfolgreich ein kontinuierliches Fermentationsverfahren etabliert. Unter Beibehaltung der Regelung der Methanolkonzentration im geschlossenen Regelkreis wurde ein Prozeß

entwickelt, der bei einer deutlich reduzierten Biotrockenmassekonzentration von $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ eine Raum-Zeit-Ausbeute von $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ermöglichte. Durch die Verringerung der Biomassekonzentration konnte der notwendige Sauerstoffeintrag auf $435 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ reduziert werden. Die kontinuierliche Fermentationsführung mit Methanol als einzigem Substrat erfordert eine technisch anspruchsvolle Überwachung und Regelung der Methanolkonzentration. Wird eine Methanolkonzentration von ca. $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ überschritten, so kann es zur genetischen Destabilisierung der Fähigkeit zur Produktbildung kommen.

- Eine einfachere und stabilere Prozeßführung konnte durch Applikation eines kontinuierlichen Verfahrens mit Mischsubstratdosierung erreicht werden. Die Applikation dieses Verfahrens baute auf der Erkenntnis auf, daß der AOX1-Promotor aus *Pichia pastoris* bei Wachstum auf Glycerin oder Glucose unter C-Limitierung dereprimiert wurde und auch ohne Methanol bereits Aktivität zeigte. Im Chemostaten mit Glucose als Hauptsubstrat wurde Methanol nur noch als Zusatz zur vollständigen Induktion des AOX1-Promotors benötigt. Durch diese Strategie konnte, vor allem bei Einsatz von Produktionsstämmen mit Mut^S -Phänotyp, die einzusetzende Methanolmenge drastisch verringert werden. Dementsprechend konnte auch der biomassespezifische Sauerstoffverbrauch so weit abgesenkt werden, daß eine maximale OTR von $157 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Biotrockenmassekonzentration von $56 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und Verwendung eines Mut^S -Phänotyp für den Prozeß ausreichte. Mit Raum-Zeit-Ausbeuten von $10,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Mut^+) bzw. $8,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Mut^S) liegt das mixed-feed Verfahren hinsichtlich dieser Größe zwischen dem Zulaufverfahren und der kontinuierlichen Fermentation mit Methanol als Einzelsubstrat. Gegenüber beiden Vergleichsverfahren zeichnet es sich durch eine stark vereinfachte, robuste Prozeßführung aus. Die Reduzierung der biomassespezifischen Produktbildungsrate bei Verwendung von Mischsubstrat ist wahrscheinlich auf eine Teilinhibierung des AOX1-Promotors durch das Nebenprodukt Ethanol zurückzuführen.
- Während der kontinuierlichen Fermentation mit Mischsubstratdosierung kam es zu einer Instabilisierung des Mut -Phänotyps. Es werden Mutanten selektiert, die aufgrund einer niedrigeren Methanolverbrauchsrate einen größeren Anteil ihres Stoffwechsels mit Glucose als Substrat unterhalten. Diese genetische Veränderung hat jedoch keinen direkten Einfluß auf die Produktbildung, durch die Wahl von Produktionsstämmen, die von vornherein nur wenig Methanol metabolisieren, ist diese Selektion leicht vorwegzunehmen.
- Es konnte erstmalig gezeigt werden, daß der AOX1-Promotor von *Pichia pastoris* bereits bei Derepression unter C-limitierenden Bedingungen (Glucose oder Glycerin als Substrat) ohne Induktion durch Methanol eine signifikante Expression zeigt. Diese Feststellung steht im deutlichen Gegensatz zur herrschenden Literaturmeinung.

Verfahren	Zulaufverfahren	Zulaufverfahren	kontinuierliches Verfahren	kontinuierliches Verfahren	kontinuierliches Verfahren	kontinuierliches Verfahren
Prozeßführung	Dosierprofil	Nutristat	Nutristat	Chemostat	Chemostat	Chemostat
Substrat	Glucose	Methanol	Methanol	Glucose + Methanol	Glucose + Methanol	Glucose + Methanol
Genotyp / Phänotyp	pGAP (#779)	pAOX1 Mut ⁺ (#647)	pAOX1 Mut ⁺ (#647)	pAOX1 Mut ⁺ (#647)	pAOX1 Mut ^S (#769)	pAOX1 Mut ^S (#769C46)
c(BTM) [g·l⁻¹]	226	150	80	60	56	51,2
c(CTRB) [mg·l⁻¹]	220	481	326	145	115	107
RZA [mg·l⁻¹·h⁻¹]	2,97	5,40	25,00	10,90	8,70	8,10
π_x [mg·g⁻¹·h⁻¹]	n.d.	n.d.	0,31	0,18	0,16	0,16
OTR_{max} [mmol·l⁻¹·h⁻¹]	n.d.	870	435	207	157	141
Vorteile	einfache Prozeßführung	hoher Produkttiter	hohe Raum-Zeit-Ausbeute	geringer Sauerstoffverbrauch	einfache, robuste Prozeßführung	
Nachteile	geringe Produktivität	hoher Sauerstoffverbrauch	genetische Instabilität	Veränderung Mut-Phänotyp	FDA-Zulassung	

Tab. 6-1 : Zusammenfassung der wichtigsten Kenndaten für die verschiedenen Fermentationsverfahren zur sekretorischen Produktion von rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B mit *Pichia pastoris*. In den beiden unteren Spalten sind die jeweils wichtigsten Vorteile bzw. Nachteile der einzelnen Prozeßvarianten angeführt.

Es ist gelungen, mehrere neue Prozeßvarianten für die Expression rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* aufzuzeigen. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Applikation kontinuierlicher Verfahren gelegt. Gleichzeitig konnten neue Erkenntnisse zur Regulation des AOX1-Promotors und zur genetischen Integrität von *Pichia pastoris* in kontinuierlicher Kultur gewonnen werden. Eine vergleichende Bewertung der verschiedenen Fermentationsansätze mit ihren unterschiedlichen Charakteristika (Tab. 6-1) läßt ein kontinuierlich geführtes Fermentationsverfahren mit Mischsubstratdosierung als das am besten geeignete für eine großtechnische Anwendung erscheinen. Als Produktions-

stamm sollte ein Klon mit möglichst geringer, spezifischer Methanolverbrauchsrate gewählt werden. Von den vorhandenen Stämmen erfüllt der mutierte Stamm #769C46 diese Anforderung am besten.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahren für die fermentative Produktion von humanem Chymotrypsinogen B mit *Pichia pastoris* entwickelt, charakterisiert und auf ihre Eignung für den technischen Einsatz hin untersucht. Ein kontinuierlich geführtes Fermentationsverfahren mit Mischsubstratdosierung unter Verwendung eines Produktionsstammes mit minimalem Methanolverbrauch wurde als Methode der Wahl ermittelt, es stellt den besten Kompromiß zwischen den verschiedenen Anforderungen an ein geeignetes Produktionsverfahren.

Das vorgestellte Verfahren konnte durch die frühzeitige und erfolgreiche Integration von Stammentwicklung, Fermentationsentwicklung und downstream processing in einem gemeinsamen Ansatz entwickelt werden. Auch für die Fortentwicklung der erarbeiteten Ansätze sind deshalb sinnvollerweise alle beteiligten Disziplinen mit einzubeziehen.

7.1 Molekularbiologische Ansätze

Der erste Ansatz zur Optimierung von Produktionsstämmen auf das gewählte, kontinuierlich geführte Fermentationsverfahren mit Mischsubstratdosierung wäre die Verwendung eines Akzeptorstammes mit Mut⁻-Phänotyp. Die Vorteile dieser Vorgehensweise wurden bereits ausführlich besprochen.

Der einzige, wesentliche Nachteil des mixed-feed Verfahrens ist die gegenüber dem Maximum bei Wachstum auf Methanol alleine reduzierte spezifische Produktbildungsrate. Es konnte dargelegt werden, daß diese wahrscheinlich auf eine Teilinhibierung des AOX1-Promotors durch das bei Wachstum auf Glucose und Glycerin in geringem Maße gebildete Ethanol zurückzuführen ist. Dieser Nachteil ließe sich durch Verwendung eines veränderten AOX-Promotors überwinden, der ganz oder teilweise resistent gegen diese Inhibierungen ist. Die gezielte Konstruktion eines derartigen Promotors erforderte eine detaillierte Kenntnis des Aufbaus der Promotorkassette. Trotz der intensiven Forschung zum Einsatz des AOX-Promotors und des Expressionssystems *Pichia pastoris* liegen aber bis heute keine Publikationen zur Detailstruktur des AOX-Promotors, zu Bindungsstellen von regulatorischen Proteinen oder anderen Untereinheiten vor. Die einzige bislang publizierte Promotorveränderung ist ein mutierter AOX2-Promotor, der eine erhöhte Aktivität zeigt [Miu92]. Es wurde jedoch eine Regulationsmutante *glr2-1* der nahe verwandten Hefespezies *Hansenula polymorpha* beschrieben [Par98], die bei Wachstum auf Glucose im Überschuß keine Repression der Methanoloxygenase und aller anderen, am C1-Stoffwechsel beteiligten Enzyme zeigt. Wenn in *Pichia pastoris* ein dem Glr2p homologes, in *trans* wirksames Repressorprotein an der Regulation des AOX1-Promotors beteiligt ist, wäre dies ein Ansatzpunkt für die Konstruktion von Produktionsstämmen mit den gewünschten Eigenschaften.

Für das Zulaufverfahren konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung von multi-copy Produktionsstämmen eine erhebliche Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht wurde. Der Einsatz solcher Stämme auch für das kontinuierlicher Verfahren sollte noch untersucht werden, eine Optimierung der Gendosis für das gewählte Verfahren wäre sinnvoller Bestandteil der Stammentwicklung.

7.2 Verfahrenstechnische Ansätze

Durch die Verwendung von Glucose als Hauptsubstrat wurde der spezifische Sauerstoffverbrauch der Kultur so weit gesenkt, daß eine Erhöhung der Biomassekonzentration unter Beibehaltung aller anderen Prozeßparameter problemlos möglich wäre. Unter Ausnutzung der im individuellen Kultursystem jeweils zur Verfügung stehenden OTR ließe sich die Raum-Zeit-Ausbeute für das System maximieren. Geeignete Aufbereitungsverfahren für Kulturbrühen mit bis zu 50 % Feuchtmasseanteil stehen zur Verfügung.

Über diesen sehr einfachen Ansatz hinaus sind noch andere Ansätze zur weiteren Optimierung des Verfahrens denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde das mixed-feed Verfahren bei konstanter Verdünnungsrate durchsucht. Es liegen somit noch keine Daten zu der Korrelation zwischen Wachstumsrate und biomassespezifischer Produktbildungsrate vor. In dem System haben drei verschiedene Metabolite einen Einfluß auf die Induktion des AOX1-Promotors: Methanol, Ethanol und Glucose. Von diesen ist nur die Methanolkonzentration, die Verwendung entsprechender Produktionsstämmen vorausgesetzt, als unabhängige Größe zu betrachten. Wie in Abschnitt 5.4.3 besprochen, muß unter den eingesetzten Bedingungen der Glucoselimitierung von einer Teilinhibierung des AOX1-Promotors durch Ethanol ausgegangen werden. Die Gleichgewichtskonzentrationen dieses Überschußmetaboliten ist aber bei ausreichender Sauerstoffsättigung nur noch von der Durchflußrate im Chemostaten abhängig und so ist bei niedrigerer Durchflußrate mit einer noch weitergehenden Derepression des AOX1-Promotors zu rechnen. Andererseits ist von einem Einfluß des Energiestoffwechsels als Funktion der Wachstumsrate auszugehen da der Anteil des Erhaltungsstoffwechsels (maintainance) mit steigender Wachstumsrate sinkt. Die Untersuchung dieser beiden einander entgegengesetzten Einflüsse wäre in engem Zusammenhang mit der im vorherigen Abschnitt angesprochenen Entwicklung inhibierungsresistenter Produktionsstämmen zu sehen. Durch gezielte Anreicherung oder Abtrennung (z.B. durch Pervaporation) des mutmaßlichen Inhibitors mit dem Ziel einer Verweilzeitentkopplung der Ethanolkonzentration sollte ein Einblick in die Inhibierungskinetik möglich werden.

Anhang A: Literatur

- [Abi69] Abita JP, Delaage M, Lazdunski M (1969): The mechanism of activation of trypsinogen: The role of the four N-terminal residues. *Eur. J. Biochem.* **8**:314-324
- [And91] Anderson Da Silva N, Bailey JE (1991): Influence of plasmid origin and promotor strength in fermentations of recombinant yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:318-324
- [Aus96] Austriaco NR (1996): Review: To bud until death: The genetics of ageing in the yeast, *Saccharomyces*. *Yeast* **12**:623-630
- [Avi83] Avigad G (1983): A simple spectrophotometric determination of formaldehyde and other aldehydes: Application to periodate-oxidized glycol systems. *Anal. Biochem.* **134**:499-504
- [Bab86] Babel W (1986): Increase and limits of growth yields for heterotrophic microorganisms. *Acta Biotechnol.* **6**:305-309
- [Bab87] Babel W (1987): Methanol als Substrat für biotechnische Prozesse. *Z. Chem.* **2**:49-56
- [Bae91] De Baetselier A, Vasavada A, Dohet P, Ha-Thi V, De Beukelaer M, Ericum T, De Clerck L, Hanotier J, Rosenberg S (1991): Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: Scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* **9**:559-561
- [Bar92] Barr KA, Hopkins SA, Sreekrishna K (1992): Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* **12**:48-51
- [Bel95] Bellal M, Boudrant J, Elfoul L, Bonaly R (1995): Flocculation dispersion in *Kluyveromyces lactis*. *Proc. Biochem.* **30**:641-648
- [Bel99] Bellu AR, van der Klei IJ, Rechinger KB, Yavuz M, Veenhuis M, Kiel JAKW (1999): Characterization of the *Hansenula polymorpha* CPY gene encoding carboxypeptidase Y. *Yeast* **15**:181-189
- [Ber00] Berrin JG, Williamson G, Puigserver A, Chaix JC, McLauchlan WR, Juge N (2000): High-level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Prot. Expr. Purif.* **19**:179-187
- [Bir94] Birge EA (1994): Bacterial and bacteriophage genetics, third edition. Springer Verlag: New York, Berlin, Heidelberg
- [Boe99] Boehm T, Pirie-Shepherd S, Trinh LB, Shiloach J, Folkman J (1999): Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of

- full-length murine and human endostatin. *Yeast* **15**:563-572
- [Bre99] Bretthauer RK, Castellino FJ (1999): Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived protein. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:193-200
- [Bri90] Brierley RA, Siegel RS, Bussineau CM, Craig WS, Holtz GC, Davis GR, Buckholz RG, Thill GP, Wondrack LM, Digan ME, Harpold MM, Lair SV, Ellis SB, Williams ME (1990): Mixed feed recombinant yeast fermentation. International Patent Application WO 90/03431
- [Bri93] Brierley RA, Davis GR, Holtz GC (1993): Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. United States Patent 5324639
- [Bri99] Briand L, Perez V, Huet JC, Danty E, Masson C, Pernollet JC (1999): Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Prot. Expr. Purif.* **15**:362-369
- [Bru98] Brunschier R (1998): unveröffentlichte Daten. Mucos-Pharma GmbH, Geretsried, Deutschland
- [Bou97] Boué O, Sánchez K, Tamayo G, Hernández L, Reytor E, Enr'quez A (1997): Single-step purification of recombinant Bm86 protein produced in *Pichia pastoris* by salting out and by acid precipitation of contaminants. *Biotechnol. Tech.* **11**:561-565
- [Buc90] Buckholz RG (1990): *Pichia pastoris* acid phosphatase gene, gene regions, signal sequence and expression vectors comprising same. United States Patent 5268273
- [Buc91a] Buckholz RG, Gleeson AG (1991): Yeast systems for the commercial produktion of heterologous proteins. *Bio/Technology* **9**:1067-1072
- [Buc91b] Buckholz RG (1991): *Pichia pastoris* acid phosphatase gene. European Patent Application 0495208 A2
- [Bus88] Bussey H (1988): Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* **4**:17-26
- [Can96] Canales M, Ramos E, Enriquez A (1996): Estrategia de escalado para la producción de la enzima recombinante alfa-amilasa. *Biotechnol. Aplic.* **13**:202-203
- [Cha99a] Chan H, Elrod KC, Numerof RP, Sideris S, Clark JM (1999): Expression and characterization of recombinant mast cell tryptase. *Prot. Expr. Purif.* **15**: 251-257
- [Cha99b] Chauhan AK, Arora D, Khanna N (1999): A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant

- Pichia pastoris*. *Proc. Biochem.* **34**:139-1455
- [Che87] Chen NY, Srinivasan S, Leavitt RI, Coty VF, Kondis EF (1987): Low-pressure airlift fermenter for single cell protein production: II. Continuous culture of *Pichia* yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **24**:421-428
- [Che96] Chen Y, Krol J, Cino J, Freedman D (1996): Continuous production of Thrombomodulin from a *Pichia pastoris* fermentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **67**:143-148
- [Che97] Chen Y, Cino J, Hart G, Freedman D, White C, Komives EA (1997): High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. *Proc. Biochem.* **32**:107-111
- [Chi97] Chirovolu V, Cregg JM, Meagher MM (1997): Recombinant protein production in an alcohol oxidase defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. *Enzyme Microb. Tech.* **21**:227-283
- [Chi98] Chiruvolu V, Eskridge K, Cregg J, Meagher M (1999): Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **75**:163-173
- [Chu00] Chung JD (2000): Design of metabolic feed controllers: Application to high-density fermentations of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **68**:298-307
- [Cla91a] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA (1991): High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**:455-460
- [Cla91b] Clare JJ, Romanos AM, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA (1991): Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**:205-212
- [Cou80] Couderc R, Baratti J (1980): Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**:2279-2289
- [Cre85] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR (1985): *Pichia pastoris* as a host system for Transformation. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3376-3385
- [Cre87] Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR, Smiles BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP (1987): High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**:479-485

- [Cre88] Cregg JM, Madden KR (1988): Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**:33-41
- [Cre89a] Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989): Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:1316-1323
- [Cre89b] Cregg JM, Digan ME (1989): Strains of *Pichia pastoris* created by inter-locus recombination. United States Patent 5122465
- [Cre90] Cregg JM, Digan ME (1990): Novel strains of *Pichia pastoris* created by interlocus recombination. European Patent Application 0402847
- [Cre93] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993): Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**:905-910
- [Cre95] Cregg JM, Higgins RH (1995): Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot.* **73**(S1):891-897
- [Cre99] Cregg JM (1999): Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (Chapter 6). In: Fernandez JM, Hoeffler JP (eds.): Gene expression systems: Using nature for the art of expression. Academic Press San Diego London. pp 157-191
- [Cru89] Crueger W, Crueger A (1989): Biotechnologie: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Oldenbourg: München Wien
- [Cur00] Curvers S, Brixius P, Klauser T, Thömmes J, Weuster-Botz D, Takors R, Wandrey C (2000): Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part I: Fermentation. Zur Publikation eingereicht in *Biotechnol. Prog.*
- [Dec00] <http://www.dechema.de/deutsch/isb/zahlen.htm> Internetpräsentation des Informationssekretariates Biotechnologie (ISB) innerhalb der Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA)
- [Dig89] Digan ME, Lair SV, Brierley RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Provow SA, Craig WS, Velicelebi G, Harpold MM, Thill GP (1989): Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **7**:160-164
- [Dör98] Döring F, Klapper M, Theis S, Daniel H (1998): Use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotor for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **250**:531-535

-
- [Duf88] Duff SJB, Murray WD (1988): Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **31**:44-49
- [Eck96] Eckart MR, Bussineau CM (1996): Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Op. Biotechnol.* **7**:525-530
- [Egg78] Eggeling L, Sahm H (1978): Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **5**:197-202
- [Egg80] Eggeling L, Sahm H (1980): Regulation of alcohol oxidase synthesis in *Hansenula polymorpha* : Oversynthesis during growth on mixed substrates and induction by methanol. *Arch. Microbiol.* **127**:119-124
- [Egl82] Egli T, Käppeli O, Fiechter A (1982): Regulatory flexibility of methylotrophic yeasts in chemostat cultures: Simultaneous assimilation of glucose and methanol at a fixed dilution rate. *Arch. Microbiol.* **131**:1-7
- [Egl84] Egli T, Harder W (1984): Growth of methylotrophs on mixed substrates. In: *Microbial growth on C1-compounds, Proceedings of the 4th international symposium, Minn. MN.* Crawford RL, Hanson RS (eds.), pp.330-337
- [Egl86] Egli T, Bosshard C, Hamer G (1986): Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1735-1741
- [Ell85] Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR (1985): Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molec. Cell Biol.* **5**:1111-1121
- [Fab95] Faber KN, Harder W, Ab G, Veenhuis M (1995): Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**:1331-1344
- [Fah97] Fahnestock SR, Bedzyk LA (1997): Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:33-39
- [FDA00] <http://www.fda.gov>, Internetpräsenz der U.S. Food and Drug Administration (FDA).
- [Fer91] Ferbeyre G, Aguiar J, Villarreal A, Torrens I, Santizo C, Morales J (1991): La inducción de alcohol oxidasa en levadura metilotróficas. *Biotecnol. Aplic.* **8**:242-247
- [Fis99] Fischer R, Drossard J, Emans N, Commandeur U, Hellwig S (1999): Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:117-

120

- [Gal98] Gallet PF, Vaujour H, Petit JM, Maftah A, Oulmouden A, Oriol R, Le-Narvor C, Guilloton M, Julien R (1998): Heterologous expression of an engineered truncated form of human Lewis fucosyltransferase (FucTIII) by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Glycobiology* **8**:919-925
- [Geb97] Gebauer F, Micheel B, Stauder G, Ransberger K, Kunze R (1997): Proteolytic enzymes modulate the adhesion molecule CD44 on malignant cells in vitro. *Int. J. Immunotherapy* **13**:111-119
- [Gel92a] Gelissen G, Weydemann U, Strasser AWM, Piontek M, Janowicz ZA, Hollenberg CP (1992): Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems. *Trends Biotechnol.* **10**:413-417
- [Gel92b] Gelissen G, Melber K, Janowicz ZA, Dahlems UM, Weydemann U, Piontek M, Strasser AWM, Hollenberg CP (1992): Heterologous protein production in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* **62**:79-93
- [Gel96] Gelissen G, Melber K (1996): Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Arzneim.-Forsch.* **46**:943-948
- [Gel97] Gelissen G, Hollenberg CP (1997): Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, and *Kluyveromyces lactis* -a review. *Gene* **190**:87-97
- [Get92] Gething MJ, Sambrook J (1992): Protein folding in the cell. *Nature* **355**:33-45
- [Gla98] Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (1998): Expression of recombinant human soluble type II transforming growth factor-beta receptor in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*: two powerful systems to express a potent inhibitor of transforming growth factor-beta. *Prot. Expr. Purif.* **12**:201-207
- [Gle88] Gleeson MA, Sudbery PE (1988): The methylotrophic yeasts. *Yeast* **4**:1-15
- [Gle94] Gleeson MA, Howard BD (1994): Genes which influence *Pichia* proteolytic activity, and uses therefore. United States Patent 5,324,660
- [Gon90] Gonchar MV, Titorenko VI, Gladarevskaya NN, Sibirnyi AA (1990): The phenomenon of acidification of the medium by methylotrophic yeast cells and its biochemical nature. *Biokhimiya (russ.)* **55**:2148-2158
- [Gon91] Gonzalez Martinez MA (1991): Method for the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*, expression vectors and transformed microorganisms. European Patent Application 0438200

-
- [Goo90] Goodman JM, Trapp SB, Hwang H, Veenhuis M (1990): Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins. *J. Cell Sci.* **97**:193-204
- [Gou92] Gould SJ, McCollum D, Spong AP, Heyman JA, Subramani S (1992): Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly. *Yeast* **8**:613-628
- [Gua97] Guarna MM, Lesnicki GJ, Tam BM, Robinson J, Radziminski CZ, Hasenwinkle D, Boraston A, Jervis E, MacGillivray RTA, Turner RFB, Kilburn DG (1997): On-line Monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **56**:279-286
- [Ham95] Hammond C, Helenius A (1995): Quality control in the secretory pathway. *Curr. Op. Cell Biol.* **7**:523-529
- [Han77] Hansen RJ, Switzer RL, Hinze H, Holzer H (1977): Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases and proteinase inhibitors in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **496**:103-114
- [Han96] Hansen H, Hollenberg CP (1996): Hansenula polymorpha (*Pichia angusta*), Chapter 9. In: Wolf K (ed.): Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. pp 293-311
- [Haz96] van den Hazel HB, Kielland-Bradt MC, Winther JR (1996): Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **12**:1-16
- [Hei97] Heijnen JJ (1997): A thermodynamically based description of chemotrophic microbial growth stoichiometry and kinetics. In: *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Flickinger MC, Drew SW (eds.), John Wiley
- [Hel92] Helenius A, Marquardt T, Braakman I (1992): The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol.* **2**:227-231
- [Hel99] Hellwig S, Robin F, Drossard J, Raven NPG, Vaquero-Martin C, Shively JE, Fischer R (1999): Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:267-275
- [Hig98] Higgins DR, Cregg JM (1998): Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol. Biol.* **103**:1-15
- [Hit86] Hitzmann DO (1986): The Provesteen process - an ultra-high density fermentation. In: Moo-Young M, Gregory KF (eds.): Microbial biomass

- proteins. Elsevier Applied Science Publ. London. pp 27-32
- [Hoc98] Hochstrasser U, Lüscher M, De Virgilio C, Boller T, Wiemken A (1998): Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **440**:356-360
- [Hou93] Hou DX, Ozawa K, Tomita N, Maeda Y, Hashiguchi T, Yokoyama K, Soeda E (1993): Genomic cloning and partial characterization of human chymotrypsinogen gene. *Jpn. J. Human Genet.* **38**:371-380
- [Hou94] Hou DX, Wang Y, Yamashita H, Okamoto S, Yokoyama K, Soeda E, Sarai A (1994): Evolutionary conservation of chymotrypsinogen gene: Genomic analysis and protein modeling. *Jpn. J. Human Genet.* **39**:235-242
- [Hum98] Humphrey A (1998): Shake flask to fermentor: What have we learned? *Biotechnol. Prog.* **14**:3-7
- [Hur89] Hurlley SM, Helenius A (1989): Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:277-307
- [Ich93] Ichii T, Takehara S, Konno H, Ishida T, Sato H, Suzuki A, Yamazumi K (1993): Development of a new commercial-scale airlift fermentor for rapid growth of yeast. *J. Ferment. Biotechnol.* **75**:375-379
- [Ina99] Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson K, Brown S, Meagher MM (1999): Optimization of temperature -glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* **24**:438-445
- [Joh99] Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L (1999): Molecular biology of aging. *Cell* **96**:291-302
- [Kat98] Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y, Suga K (1998): Effect of methanol concentration on the production of human beta(2)-Glycoprotein I Domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferment. Bioeng.* **86**:482-487
- [Kel96] Kelle R (1996): Substratgeregelte Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertationsschrift RWTH Aachen
- [Kje99] Kjeldsen T, Frost Petterson A, Hach M (1999): Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**:79-86
- [Kla98] Klauser T (1998): unveröffentlichte Daten. Mucos-Pharma GmbH, Geretsried, Deutschland

- [Kim97] Kim TR, Goto Y, Hirota N, Kuwata K, Denton H, Wu SY, Sawyer L, Batt CA (1997): High-level expression of bovine beta-lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties. *Protein Eng.* **10**:133-1345
- [Kle95] van Kleeff BHA (1996): On-line heat flow measurement in laboratory fermenters. *Thermochim. Acta* **251**:111-118
- [Kle97] Kleine MW (1997): Introduction to oral enzyme therapy. *Int. J. Immunotherapy* **13**:59-65
- [Kob98] Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A, Ohmura T, Yokoyama K (1998): The development of recombinant human serum albumin. *Ther. Apher.* **2**:257-262
- [Kum93] Kumagai MH, Sverlow GG, della-Cioppa G, Grill LK (1993): Conversion of starch to ethanol in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing rice alpha-amylase from a novel *Pichia pastoris* alcohol oxidase promoter. *Bio/Technology* **11**:606-610
- [Kum94] Kumagai MH (1994): *Pichia pastoris* alcohol oxidase ZZA1 and ZZA2. *International Patent Application* WO 94/21802
- [Lar94] Laroche Y, Storme V, De Meutter J, Messens J, Lauwereys M (1994): High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **12**:1119-1124
- [Lee80] Lee JD, Komagata K (1980): Taxonomic study of methanol-assimilating yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**:133-158
- [Lee83] Lee JD, Komagata K (1983): Further taxonomic study of methanol-assimilating yeasts with special references to electrophoretic comparison of enzymes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**:395-416
- [Lev99] Levitsky V, Lozano P, Iborra JL (1999): Glycosylated alpha-chymotrypsin as a catalyst for kyotorphin synthesis in water-organic media. *Biotechnol. Lett.* **21**:595-599
- [Lin99] Lin Cereghino GP, Cregg JM (1999): Application of yeasts in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 422-427
- [Lin00] Lin Cereghino J, Cregg JM (2000): Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:45-66
- [Liu98] Liu Z, Cashion LM, Pu H (1998): Protein expression both in mammalian cell lines and in yeast *Pichia pastoris* using a single expression plasmid.

Biotechniques **24**:266-271

- [Mac94] Macreadie IG, Castelli LA, Mehra RK, Thorvaldsen JL, Winge DR (1994): Heterologous gene expression and protein secretion from *Candida glabrata*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**:265-269
- [Mae00] Maeda Y, Kuroki R, Suzuki H, Reiländer H (2000): High-level secretion of biologically active recombinant human macrophage inflammatory protein-1alpha by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Prot. Expr. Purif.* **18**:56-63
- [Mal96] Malissard M, Borsig L, Di Marco S, Grütter MG, Kragl U, Wandrey C, Berger EG (1996): Recombinant soluble beta-1,4-galactosyltransferases expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterization and comparison with human enzyme. *Eur. J. Biochem.* **239**:340-348
- [Mal99] Malissard M, Zeng S, Berger EG (1999): The yeast expression system for recombinant glycosyltransferases. *Glycoconj. J.* **16**:125-139
- [Mal00] Malissard M, Zeng S, Berger EG (2000): Expression of functional soluble forms of human beta-1,4-Galactosyltransferase I, alpha-2,6-Sialyltransferase, and alpha-1,3-Fucosyltransferase VI in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**:169-173
- [Mar95] Mardon CJ (1995): Automated protocols for the production of recombinant proteins from *Pichia pastoris*. *Australas. Biotechnol.* **5**:95-98
- [May99] Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, Strasser AWM, von Loon APGM (1999): An expression system matures: A highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:373-381
- [Maz97] Mazourov VI, Lila AM, Klimko NN, Raimuev KV, Makulova TG (1997): The efficacy of systemic enzyme therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Immunotherapy* **13**:85-91
- [Mbw90] Mbwala A, Al Mahmood S, Loppinet V, Bonaly R (1990): Acetolysis and ¹H NMR studies on mannans isolated from very flocculent and weakly flocculent cells of *Pichia pastoris* IFP 206. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1279-1284
- [Mer85] Merrifield RB (1985): Festphasen-Synthese (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie* **97**:801-812
- [Miu92] Miura M, Ishida Y, Oi H (1992): Mutant AOX2 Promotor, microorganism carrying same, method of preparation thereof and production of heterologous protein using such microorganism. European Patent Specifica-

- tion 0506040B1
- [Miz93] Mizuno M, Singer SJ (1993): A soluble secretory protein is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:5732-5736
- [Mor97] Morel N, Massoulié J (1997): Expression and processing of vertebrate acetylcholinesterase in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* **328**:121-129
- [Mor00] Moroz OM, Gonchar MV, Sibirny AA (2000): Efficient bioconversion of ethanol to acetaldehyde using a novel mutant strain of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **68**:44-51
- [Mos81] Moser A (1981): Bioprozeßtechnik: Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse. Springer Verlag Wien New York
- [Muc00] <http://www.mucos.de> Internetpräsentation der Firma Mucos-Pharma GmbH & Co. Stand Juni 2000
- [Mur90] Murray WD, Duff SJB, Beveridge TJ (1990): Catabolite inactivation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2379-2383
- [Mur97] Murdanoto AP, Sakai Y, Konishi T, Yasuda F, Tani Y, Kato N(1997): Purification and properties of methyl formate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1715-1720
- [Nak99] Nakagawa T, Mukaiyama H, Yurimoto H, Sakai Y, Kato N (1999): Alcohol oxidase oligomers formed *in vivo* and *in vitro*. *Yeast* **15**:1223-1230
- [Nil98] Niles AL, Maffitt M, Haak-Frendscho M, Wheelless CJ, Johnson DA (1998): Recombinant human mast cell tryptase: stable expression in *Pichia pastoris* and purification of fully active enzyme. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**:125-131
- [Nov81] Novick P, Ferro S, Schekman R (1981): Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**:461-469
- [Oco92] O'Connor GM, Sanchez-Riera F, Cooney CL (1992): Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **39**:293-304
- [OECD98] Biotechnologie für umweltverträgliche industrielle Produkte und Verfahren: Wege zur Nachhaltigkeit in der Industrie. Studie der Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), 1998 OECD Publications, Paris, Frankreich. Deutsche Übersetzung über DE-HEMA e.V., Frankfurt am Main.

- [Oga69] Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M (1969): A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Biol. Chem.* **33**:1519-15520
- [Oha99] Ohashi R, Mochizuki E, Suzuki T (1999): A mini-scale mass production and separation system for secretory heterologous proteins by perfusion culture of recombinant *Pichia pastoris* using a shaken ceramic membrane flask. *J. Biosci. Bioeng.* **87**:655-660
- [Ohi94] Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, Ohmura T (1994): The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**:489-199
- [Ohi96] Ohi H, Ohtani W, Okazaki N, Furuhashi N, Ohmura T (1996): Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* PRC1 gene encoding Carboxypeptidase Y. *Yeast* **12**:31-40
- [Ohi98] Ohi H, Okazaki N, Uno S, Miura M, Hiramatsu R (1998): Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**:895-903
- [Ohz98] Ohtani W, Ohda T, Sumi K, Kobayashi K, Ohmura T (1998): Analysis of *Pichia pastoris* components in recombinant human serum albumin by immunological assays and by HPLC with pulsed amperometric detection. *Anal. Chem.* **70**:425-429
- [Oka99] Oka C, Tanaka M, Muraki M, Harata K, Suzuki K, Jigami Y (1999): Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:1977-1983
- [Pap78] Papoutsakis E, Lim HC, Tsao GT (1978): Role of formaldehyde in the utilization of C1 compounds via the ribulose monophosphate cycle. *Biotechnol. Bioeng.* **20**:421-442
- [Par95] Parekh R, Forrester K, Wittrup D (1995): Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prot. Expr. Purif.* **6**:537-545
- [Par97] Parekh RN, Wittrup KD (1997): Expression level tuning for optimal heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **13**:117-122
- [Par98] Parpinello G, Berardi E, Strabbioli R (1998): A regulatory mutant of *Hansenula polymorpha* exhibiting methanol utilization metabolism and peroxisome proliferation in glucose. *J. Bacteriol.* **180**:2958-2967
- [Pay95] Payne WE, Gannon PM, Kaiser CA (1995): An inducible acid phosphatase from the yeast *Pichia pastoris* : Characterization of the gene and its product. *Gene* **163**:19-26

- [Pay97] Payne MS, Petrillo KL, Gavagan JE, DiCosimo R, Wagner LW, Anton DL (1997): Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: co-production of two active enzymes. *Gene* **194**:179-182
- [Pil75] Pilat P, Prokop A (1975): The effect of methanol, formaldehyde and formic acid on growth of *Candida boidinii* 11 Bh. *Biotechnol. Bioeng.* **17**:1717-1728
- [Pil76] Pilat P, Prokop A (1976): Time course of the levels of oxidative intermediates during methanol utilisation by *Candida boidinii* 11 Bh. *J. Appl. Chem. Biochem.* **26**: 445-453
- [Pre91a] Prevatt DP, Sreekrishna K (1991): Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris*. United States Patent 5330901
- [Pre91b] Prevatt WD, Sperl GT (1991): Catalase-negative *Pichia pastoris*. United States Patent 5204261
- [Pre92] Prevatt WD, Sreekrishna K (1992): Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris*. European Patent Application 0510678 A2
- [Ras96] Rasche WC, Neiditch BR, Hendricks M, Cregg JM (1996): Inducible expression of a heterologous protein in *Hansenula polymorpha* using the alcohol oxidase 1 promotor of *Pichia pastoris*. *Gene* **177**:163-167
- [Ray98] Raymond CK, Bukowski T, Holderman SD, Ching AFT, Vanaja E, Stamm MR (1998): Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast* **14**:11-23
- [Ray99] Raymond CK (1999): Recombinant protein expression in *Pichia methanolica* (Chapter 7). In: Fernandez JM, Hoeffler JP (eds.): Gene expression systems: Using nature for the art of expression. Academic Press San Diego London. pp 193-209
- [Rev98] Reverter D, Ventura S, Villegas V, Vendrell J, Aviles F (1998): Overexpression of human carboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:3535-3541
- [Rou92] De Roubin MR, Cailas MD, Shen SH, Groleau D (1992): Influence of pH, nitrogen and phosphorus sources on the production of hepatitis B virus pre-S2 antigen by *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **38**:158-164
- [Rod96a] Rodriguez E, Sánchez K, Roca H, Garcia B, Cremata J, Delgado J (1996): Procedure for the high level recombinant dextranase production. *Biotechnol. Aplic.* **13**:201
- [Rod96b] Rodriguez L, Narciandi RE, Roca H, Cremata J, Montesinos R, Rodri-

- guez E, Grillo JM, Muzio V, Herrera LS, Delgado JM (1996): Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the AOX1 promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast* **12**:815-822
- [Rod97] Rodriguez Jimenez E, Sanchez K, Roca H, Delgado JM (1997): Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotechnol. Tech.* **11**:461-466
- [Rog86] Roggenkamp RO, Hansen H, Eckart M, Janowicz ZA, Hollenberg CP (1986): Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Lom. Gen. Genet.* **202**:302-308
- [Rom92] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992): Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:426-488
- [Rom95] Romanos MA (1995): Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Op. Biotechnol.* **6**:527-533
- [Ros99a] Rosenfeld SA (1999): Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. In: Glorioso JC, Schmidt MC (eds.): *Methods in Enzymology* 306. Academic Press San Diego. pp154-169
- [Ros99b] Rossanese OW, Soderholm J, Bevis BJ, Sears IB, O'Connor J, Williamson EK, Glick BS (1999): Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **145**:69-81
- [Roy99] Roy N, Padmanabhan S, Smith M, Shi L, Navre M, Das G (1999): Expression of human Gelatinase B in *Pichia pastoris*. *Prot. Expr. Purif.* **16**:324-330
- [Sah77] Sahm H (1977): Metabolism of methanol by yeasts. *Adv. Biochem. Eng.* **6**:77-103
- [Sak95] Sakai S, Murdanoto AP, Sembiring L, Tani Y, Kato N (1995): A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeasts: Methylformate as a possible intermediate. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**:229-234
- [Sbe96] Sberna G, Cappai R, Henry A, Small DH (1996): Advantages of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for high-level expression and purification of heterologous proteins. *Australas. Biotechnol.* **6**:82-87
- [Sch91] Schomburg D, Salzmänn M (1991): *Enzyme Handbook*, Volume 5. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- [Scr00] Screen SE, Leger RJS (2000): Cloning, expression and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. *J. Biol. Chem.* **275**:6689-6694

- [Sco93a] Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, Romanos MA (1993): The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136**: 111-119
- [Sco93b] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K (1993): Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio/Technology* **12**:181-184
- [Sha87] Shay LK (1987): High-productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms. *J. Ind. Microbiol.* **2**:79-85
- [She98] Shen S, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM (1998): A strong nitrogen source-regulated promotor for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**:93-102
- [Sib88] Sibirny AA, Titorenko VI, Gonchar MV, Ubiyvovk VM, Ksheminskaya GP, Vitvitskaya OP (1988): Genetic control of methanol utilization in yeasts. *J. Basic Microbiol.* **28**:293-319
- [Sie89] Siegel RS, Brierley RA (1989): Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **34**:403-404
- [Smi85] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85
- [Sre88] Sreekrishna K, Potenz RHB, Cruze JA, McCombie WR, Parker KA, Nelles L, Mazzaferro PK, Holden KA, Harrison RG, Wood PJ, Phelps DA, Hubbard CE, Fuke M (1988): High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Basic Microbiol.* **4**:265-278
- [Sre89] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Crize R, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelbs D, Wood P, Parker K (1989): High level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **28**:4117-4125
- [Sre91] Sreekrishna K, Fuke M, Potenz RH (1991): Yeast production of human tumor necrosis factor. United States Patent 5002876
- [Sre92] Sreekrishna K, Barr KA, Brierley RA, Thill GP, Tschopp JF (1992): Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris*. European Patent Application 0510693
- [Sre96] Sreekrishna K, Kropp KE (1996): *Pichia pastoris* (Chapter 6). In: Wolf

- K (ed.): Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook. Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York. pp 203-253
- [Sre97] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA (1997): Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**:55-62
- [Sta97a] Stauder G, Kabil S (1997): Oral enzyme therapy in hepatitis C patients. *Int. J. Immunotherapy* **13**:153-158
- [Sta97b] Stauder G, Donnerstag B, Baumhackl U, Buschmanns E (1997): Use of oral enzymes in multiple sclerosis: phenotyping of peripheral blood lymphocytes from MS patients under long-term treatment with orally administered hydrolytic enzymes. *Int. J. Immunotherapy* **13**:135-137
- [Ste75] Stewart GG (1975): Yeast flocculation: Practical implications and experimental findings. *Brew. Dig.* March 1975:42-62
- [Sto89] von Stockar U, Marison IW (1989): The use of calorimetry in biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **40**:94-136
- [Str90] Stryer L (1990): Biochemie. Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft: Heidelberg
- [Sud94] Sudbery PE (1994): The non-*Saccharomyces* yeasts. *Yeast* **10**:1707-1726
- [Sud96] Sudbery PE (1996): The expression of recombinant proteins in yeast. *Curr. Op. Biotechnol.* **7**:517-524
- [Sug97] Sugrue RJ, Cui T, Xu Q, Fu J, Chan YC (1997): The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J. Virol. Meth.* **69**:159-169
- [Suk84] Sukatsch DA, Dziengel A (1984): Formelsammlung Biotechnologie. *Acta biotechnica*; **1**. Bibliomed · Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Melsungen
- [Suk97] Sukhikh GT, Loginova NS, Faizullin LZ, Zdanov AV, Malinena EV, Bozedomov VA (1997): The use of Wobenzym® to facilitate interferon synthesis in the treatment of chronic urogenital chlamydiosis. *Int. J. Immunotherapy* **13**:131-133
- [Sun97] Sunil K, Lal SK, Tulasiram P, Jameel (1997): Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* **190**:63-67
- [Sun99] Sun J, Bird CH, Buza MS, McKee KE, Whisstock JC, Bird PI (1999): Expression and Purification of recombinant human granzyme B from

- Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **261**:251-255
- [Swa81] Swartz JR, Cooney CL (1981): Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1206-1213
- [Sy97] Sy MS, Liu D, KOgermann P, Culp LA (1997): Potential of targeting cell surface CD44 proteins with proteinases in preventing tumor growth and metastasis. *Int. J. Immunotherapy* **13**:105-109
- [Tan85] Tani Y (1985): Microbiology and biochemistry of methylotrophic yeasts. In: *Methylotrophs: microbiology, biochemistry and genetics*. Hou ChT (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 55-85
- [Thi90] Thill GP, Davis GR, Stillman C, Holtz G, Brierley R, Engel M, Buckholz R, Kinney J, Provow S, Vedvick T, Siegel RS (1990): Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. *Proceedings of the 6th international symposium on the genetics of microorganisms*. Vol.2, 1990, Societe Francaise de Microbiologie. pp 477-490
- [Tho99] Thorpe ED, d'Anjou MC, Daugulis AJ (1999): Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **21**:66-672
- [Tho00] Thömmes J, Halfar M, Gieren H, Curvers S, Takors R, Brunschier R, Kula MR (2000): Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part II: Protein recovery. Zur Publikation eingereicht in *Biotechnol. Prog.*
- [Tom89] Tomita N, Izumoto Y, Horii A, Doi S, Yokouchi H, Ogawa M, Mori T, Matsubara K (1989): Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic prechymotrypsinogen cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**:569-575
- [Tor86] de la Torre-Louis M, Flores Coteria LB (1986): Techno-economic evaluations of various substrates for SCP production: a case study for Mexico. In: Moo-Young M, Gregory KF (eds.): *Microbial biomass proteins*. Elsevier Applied Science Publ. London. pp 47-59
- [Tsc87a] Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W, Grinna L (1987): High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**:1305-1308
- [Tsc87b] Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR (1987): Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucl. Acids Res.* **9**:3859-3876

- [Tsu96] Tsujikawa M, Okabayashi K, Morita M, Tanabe T (1996): Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an N-glycosylation site in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of the secreted product. *Yeast* **12**:541-553
- [Tro84] Trotsenko YA, Bystrykh LV, Ubiyvovk VM (1984): Regulatory aspects of methanol metabolism in yeast. In: *Microbial growth on C1-compounds, Proceedings of the 4th international symposium, Minn. MN.* Crawford RL, Hanson RS (eds.), pp.118-122
- [Ume97] Umebayashi K, Hirata A, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1997): Accumulation of misfolded protein aggregates leads to the formation of ruseel body-like dilated endoplasmic reticulum in yeast. *Yeast* **13**:1009-1020
- [Ved90] Vedvick TS, Engel ME, Urcan MS, Buckholz RG, Kinney JA (1990): DNA for expression of aprotinin in methylotrophic yeast cells. United States Patent 5258302
- [Ved91a] Vedvick TS (1991): Gene expression in Yeast: *Pichia pastoris*. *Curr. Op. Biotechnol.* **2**:742-745
- [Ved91b] Vedvick T, Buckholz RG, Engel M, Urcan M, Kinney J, Provow S, Siegel RS, Thill GP (1991): High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* **7**:197-202
- [Ven96] Venekei I, Graf L, Rutter WJ (1996): Expression of rat chymotrypsin in yeast: a study on the structural and functional significance of the chymotrypsinogen propeptide. *FEBS Lett.* **379**:139-142
- [Ver00] Verheyden G, Volckaert G, Engelborghs Y (2000): Expression of chymotrypsin(ogen) in the thioredoxin reductase deficient strain of *Escherichia coli* AD494(DE3) and purification via a fusion product with a hexahistidine-tail. *J. Chromatogr. B* **737**:213-224
- [Vle99] Vlekov VV, Matys VY, Sokolov DM (1999): How overproduction of foreign proteins affects physiology of the recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *J. Biosci.* **24**:279-286
- [Voz96] Vozza LA, Wittwer L, Higgins DR, Purcell TJ, Bergseid M, Collins-Racie LA, LaVallie ER, Hoeffler JP (1996): Produktion of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **14**:77-81
- [Vuo97] Vuorela A, Myllyharju J, Nissi R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI (1997): Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires co-

- expression with collagen and assembly of a stable collagen requires co-expression with prolyl 4-hydroxylase. *EMBO J.* **26**:6702-6712
- [Vuo99] Vuorela A, Myllyharju J, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI (1999): Coexpression with collagen markedly increases the half-life of the recombinant human prolyl 4-hydroxylase tetramer in the yeast *Pichia pastoris*. *Matrix Biol.* **18**:519-522
- [Wan98] Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Brömmel D (1998): Human Cathepsin F: Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J. Biol. Chem.* **273**:32008-32008
- [Wat97] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997): Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promotor. *Gene* **186**: 37-44
- [Weg90] Wegner GH (1990): Emerging application of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:279-284
- [Wer99] Werten MWT, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, De Wolf FA (1999): High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* **15**:1087-1096
- [Weu97] Weuster-Botz D, Paschold H, Striegel B, Gieren H, Kula MR, Wandrey C (1994): Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale. *Chem. Eng. Technol.* **17**:131-137
- [Weu99] Weuster-Botz D (1999): Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. *Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften / Life Sciences Band 2*. Forschungszentrum Jülich GmbH
- [Wit94] Wittrup KD, Robinson AS, Parekh RN, Forrester KJ (1994): Existence of an optimum expression level for secretion of foreign proteins in yeast. *Ann. New York Acad. Sci.* **745**:321-330
- [Wol96] Wolff AM, Din N, Litske Petersen JG (1996): Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* **12**:823-832
- [Woo89] Woodward JR (1989): Methylotrophic organisms and their uses: an update. *Enzyme Micro. Technol.* **11**:457-458
- [Woo97] Wood GR, Ziska T, Morgenstern E, Stauder G (1997): Sequential effects of an oral enzyme combination with rutosid in different in vitro and in vivo models of inflammation. *Int. J. Immunotherapy* **13**:139-145
- [Woo99] Wood MJ, Komives EA (1999): Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *J. Biomol. NMR*

13:149-159

- [Wu99] Wu S, Fallon RD, Payne MS (1999): Engineering *Pichia pastoris* for stereoselective nitrile hydrolysis by co-producing three heterologous proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:186-190
- [Wun96] Wung JL, Gascoigne NR (1996): Antibody screening for secreted proteins expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechniques* **21**:808-812
- [Yos98] Yoshimoto H, Ichahashi H, Morimoto K (1998): Automatic production process of erythropoietin. Reprints of the 7th International Conference on Computer Applications in Biotechnology, Osaka, Japan, May 31 - June 4, 1998, pp. 243-274
- [Zha94] Zhang M, Wang HY (1994): Hydrogen peroxide production using chemically treated *Pichia pastoris* cells. *Enzyme Microb. Technol.* **16**:10-17
- [Zha00] Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM (2000): Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol. Bioeng.* **70**:1-8

Anhang B: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

AHMT	4-Amino-5-hydrazino-3-mercapto-1,2,4-triazol (Purbald)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BHK	baby hamster kidney
BSE	bovine spongiphorme Enzephalitis
BSM	basal salts medium
CHO	chinese hamster ovary
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
CBB	Coomassie Brilliant Blue
hCTRB	humanes Chymotrypsinogen B
DTT	1,4-Dithiothreit
FDA	Food and Drug Administration, US-Bundesbehörde
IET	Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
IU	international units (Enzymmenge, die $1\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ des Substrates umsetzt)
kat	katal (Enzymmenge, die $1\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ umsetzt)
kb	Kilobase (1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton, Molgewicht bei Makromolekülen [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MSR-	Messen-Steuern-Regeln
NBT	Nitro-Blau Tetrazolium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
r-PA	recombinant tissue plasminogen activator
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute (s. Symbole)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPS	Speicherprogrammierbare Steuerung
TCA	Trichloressigsäure
t-PA	tissue plasminogen activator
Tricin	N-/Tris(Hydroxymethyl)-Methyl/Glycin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
vgl.	vergleiche
YEP	Yeast Extract - Peptone
YNB	Yeast Nitrogen Base

Lateinische Symbole

D	Verdünnungsrate ($1/\tau$)	$[h^{-1}]$
K_M	MONOD-Konstante	$[g \cdot l^{-1}]$
m	Masse	
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	$[mg \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}]$
r	Reaktionsrate, allgemein	$[m \cdot V^{-1} \cdot t^{-1}]$
$\hat{r}$	geschätzte Reaktionsrate	$[m \cdot V^{-1} \cdot t^{-1}]$
[S]	Substratkonzentration	$[g \cdot l^{-1}]$
$[\hat{S}]$	geschätzte Substratkonzentration	
t	Zeit	[h]
V	Volumen	[l]
$\dot{v}$	Volumenstrom	$[l \cdot h^{-1}]$
Y	Selektivitätskoeffizient (Yield)	$[g \cdot g^{-1}]$ $[mg \cdot g^{-1}]$

Griechische Symbole

α	Hilfsgröße: Änderung der Reaktionsrate r nach der Zeit	$[m \cdot V^{-1} \cdot t^{-2}]$
----------	--	---------------------------------

$\hat{\alpha}$	geschätzte Änderung von r	$[\text{m} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{t}^{-2}]$
μ	Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$
π_v	volumetrische Produktbildungsrate = RZA	
π_x	spezifische Produktbildungsrate	$[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
σ_v	volumetrische Substratverbrauchsrate	$[\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
σ_x	spezifische Substratverbrauchsrate	$[\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
τ	Verweilzeit ($1/D$)	$[\text{h}]$

Indizes

g.	gasolin, i. d. Gasphase
in	im Zulauf
l.	liquide, i.d. Flüssigphase
out	im Ablauf
p	bezogen auf Produkt
R	im Reaktor / im Ablauf
s.	solid
s	bezogen auf Substrat
v	volumenspezifisch, volumetrisch
x	biomassenspezifisch

Erläuterungen zur Nomenklatur von Genen und Genprodukten

Gene und die durch sie kodierten Proteine, werden meist durch eine Abkürzung aus drei Buchstaben und einer Zahl bezeichnet, wobei Gene kursiv geschrieben werden. Es gibt Ausnahmen, in denen Gene anders bezeichnet werden, dies hat historische Ursachen. Aktive Gene werden mit großen Buchstaben bezeichnet, defekte mit kleinen Buchstaben. Die Insertion eines genetischen Elementes in ein anderes Element wird durch zwei Doppelpunkte zwischen den Bezeichnungen beider Elemente dargestellt. Wird das vorangestellte Gen durch die Insertion des zweiten inaktiviert (Gendisruption), so wird dies außer durch Kleinschreibung des betroffenen Gens durch den vorangestellten, griechischen Buchstaben Δ gekennzeichnet. Beispiel: $\Delta pep4::URA3$.

Häufig wird das sekundäre Genprodukt, also das durch ein Strukturgen codierte Protein, außer durch die Schreibung mit normalen Buchstaben auch noch durch ein nachgestelltes p bezeichnet. So ist Glr2p das Produkt des Gens *GLR2*.

Anhang C: Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 3-1	3D-Struktur Chymotrypsinogen
Abb. 3-2	Zellstrukturen Proteinsekretion
Abb. 3-3	Methanolstoffwechsel in methylotrophen Hefen
Tab. 3-1	Strukturelemente für die Konstruktion von <i>Pichia</i> -Expressionsvektoren
Abb. 3-4	Vektorkarte Plasmid pHIL-S1
Abb. 3-5	Bilanzschema idealer Rührkesselreaktor
Abb. 3-6	idealisiertes X/D-Diagramm zur kontinuierlichen Prozeßführung
Abb. 4-1	allgemeines Prozeßschema
Abb. 4-2	Photographie Labfors-Reaktor
Abb. 4-3	Aufbau der Parallelfertigungsanlage
Abb. 4-4	Photographie Parallelfertigungsanlage
Abb. 4-5	Detailphotographie gerührte Blasensäule
Abb. 5-1	Elektropherogramm (SDS-PAGE) Kulturüberstand aus Schüttelkolben-expression
Abb. 5-2	Methanol-limitiertes Zulaufverfahren: Verlauf von Biomasse- und Produktkonzentration
Abb. 5-3	Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Fermentationsüberständen aus dem Methanol-limitierten Zulaufverfahren
Abb. 5-4	Methanolgeregeltes Zulaufverfahren: Verlauf von Biomasse und Produktkonzentration
Abb. 5-5	On-line Verlauf von Methanoldosierung und Wärmeentwicklung in einer Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren.
Abb. 5-6	Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Fermentationsüberständen aus dem methanolgeregelten Zulaufverfahren
Abb. 5-7	Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Fermentationsüberständen aus einer Fermentation des Nicht-Produzenten #774 im methanolgeregelten Zulaufverfahren.
Tab. 5-1	Charakterisierung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand von <i>Pichia pastoris</i> mit verschiedenen Proteaseinhibitoren

-
- Abb. 5-8 Methanolgeregeltes Zulaufverfahren: Proteolytische Aktivität im Kulturüberstand bei den Stämmen #647 (Produzent) und #774 (Nicht-Produzent)
- Abb. 5-9 Detektorsignal aus dem Chromatographielauf und proteolytische Aktivität ausgewählter Fraktionen für die Gelpermeationschromatographie von Fermentationsüberstand
- Abb. 5-10 Elektropherogramme (SDS-PAGE und Zymogramm-PAGE Gelatine mit identischer Probenbelegung) ausgewählter Fraktionen aus der Gelfiltration von Fermentationsüberstand
- Abb. 5-11 Fermentation des Protease A-defizienten Produktionsstammes #787 im methanolgeregelten Zulaufverfahren: Verlauf von Biotrockenmasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-12 Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Kulturüberständen aus der Fermentation des Protease A-defizienten Produktionsstammes #787 im methanolgeregelten Zulaufverfahren
- Abb. 5-13 Fermentation im Methanol-limitierten Zulaufverfahren unter Zugabe von Pepton: Verlauf von Biotrockenmasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-14 Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Kulturüberständen aus der Fermentation mit Peptonzugabe
- Abb. 5-15 Photographie von flockulierenden *Pichia pastoris*-Zellen bei pH 4 im Blasensäulenreaktor
- Abb. 5-16 Graphische Darstellung des untersuchten Parameterraumes zur Minimierung des proteolytischen Produktabbaus.
- Abb. 5-17 Chymotrypsinogenkonzentration in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur in Kulturüberständen aus Blasensäulenfermentationen
- Abb. 5-18 proteolytische Aktivität in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur in Kulturüberständen aus Blasensäulenfermentation
- Abb. 5-19 Elektropherogramm von Kulturüberständen aus Blasensäulenfermentation zur Untersuchung des Einflusses von pH-Wert und Temperatur auf die Produktreinheit.
- Abb. 5-20 Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit optimiertem pH-Wert: Verlauf von Biomasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-21 On-line Verlauf von Methanoldosierung und Wärmeentwicklung in einer Fermentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit optimiertem pH-Wert.
- Abb. 5-22 Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Kulturüberständen aus der Fer-

- mentation im methanolgeregelten Zulaufverfahren mit optimiertem pH-Wert
- Abb. 5-23 Verlauf der proteolytischen Aktivität im Fermentationsüberstand während der Fermentation bei verschiedenen pH-Werten
- Abb. 5-24 Fermentation im Glucose-limitierten Zulaufverfahren mit einem Produktionsstamm mit GAP-Promotor: Verlauf von Biomasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-25 Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Kulturüberständen aus der Fermentation im Glucose-limitierten Zulaufverfahren
- Abb. 5-26 Fermentation des multi-copy Stammes #885 im Methanol-geregelten Zulaufverfahren: Verlauf von Biomasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-27 Fermentation des Mut^S-Stammes #769 im Methanol-limitierten Zulaufverfahren bei pH 5,5: Verlauf von Biomasse- und Produktkonzentration
- Abb. 5-28 Kontinuierliche Fermentation im Nutristaten: Korrelation zwischen Methanolkonzentration und Wachstumsrate mit Methanol als Substrat
- Abb. 5-29 Kontinuierliche Fermentation im Nutristaten mit Methanol als Substrat: Korrelation zwischen biomassespezifischer Produktbildungsrate und Methanolkonzentration
- Abb. 5-30 Kontinuierliche Fermentation im Nutristaten: Korrelation zwischen dem Selektivitätskoeffizienten aus Produktbildung und Wachstum und der Wachstumsrate.
- Abb. 5-31 Einfluß der Temperatur auf Wachstumsrate und biomassespezifische Produktbildung in der kontinuierlichen Fermentation mit Methanol als Substrat
- Abb. 5-32 Elektropherogramm (SDS-PAGE) von Kulturüberständen aus kontinuierlicher Kultur im Methanol-Nutristaten bei verschiedenen Temperaturen
- Abb. 5-33 Kontinuierliche Fermentation mit Methanol als Substrat: Verlauf von Produkttiter und Durchflußrate während des Produktivitätsverlustes
- Abb. 5-34 Kontinuierliche Fermentation mit Methanol als Substrat: Verlauf der Biomasseselektivität während des Produktivitätsverlustes und Chymotrypsinogentiter nach Schüttelkolbenkultivierung von Reisolaten aus der Fermentation
- Abb. 5-35 Elektropherogramm von Rohextrakten aus Zellaufschlüssen aus der Fermentation zur Untersuchung des Produktivitätsverlustes
- Abb. 5-36 Cosubstratscreening: biomassespezifische Produktbildungsraten bei kontinuierlicher Fermentation mit verschiedenen Substratmischungen.

Abb. 5-37	Kontinuierliche Fermentation mit Glucose als einzigem Substrat: X/D-Diagramm
Abb. 5-38	Kohlenstoffbilanz für die kontinuierliche Fermentation mit Methanol und Glucose als Einzelsubstrate
Abb. 5-39	Kontinuierliche Fermentation mit Mischsubstrat: Produktbildung und Methanolverbrauch bei zwei verschiedenen Phänotypen
Abb. 5-40	Vergleich der verschiedenen Produktionsverfahren, Produktbildung bezogen auf den (maximalen) Sauerstoffeintrag
Abb. 5-41	Elektropherogramm (SDS-Page) von Fermentationsüberständen und Zellaufschlüssen aus kontinuierlicher Fermentation im mixed-feed Verfahren.
Abb. 5-42	YNB-Methanol-Agarplatte zur Mut-Phänotypisierung von <i>Pichia pastoris</i> Reisolaten
Tab. 6-1	Aufstellung der wichtigsten Kenndaten für die verschiedenen Prozeßvarianten

Anhang D: Datenbankeintrag Chymotrypsinogen B-Vorläufer

Im Folgenden ist der vollständige, unveränderte Eintrag für den humanen Chymotrypsinogen B-Vorläufer in der Swiss-Prot Datenbank (<http://www.expasy.ch>) unter der Zugriffsnummer P17538 aufgeführt. Das für die vorliegende Arbeit eingesetzte Gen wurde durch die Firma Mucos-Pharma aus humaner Pankreas-mRNA mittels PCR gewonnen. Es entspricht dem beschriebenen Protein in den Positionen 19-263, die ersten 18 Aminosäuren stellen die native Sekretionssequenz des Proteins dar.

Die diesem Datenbankeintrag zugrundeliegende Veröffentlichung ist im Literaturverzeichnis unter der Signatur [Tom89] zitiert.

ID CTRB_HUMAN STANDARD; PRT; 263 AA.

AC P17538;

DT 01-AUG-1990 (Rel. 15, Created)

DT 01-AUG-1990 (Rel. 15, Last sequence update)

DT 01-NOV-1995 (Rel. 32, Last annotation update)

DE CHYMOTRYPSINOGEN B PRECURSOR (EC 3.4.21.1).

GN CTRB1 OR CTRB.

OS Homo sapiens (Human).

OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

OC Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

RN [1]

RP SEQUENCE FROM N.A.

RC TISSUE=PANCREAS;

RX MEDLINE; 89134264.

RA Tomita N., Izumoto Y., Horii A., Doi S., Yokouchi H., Ogawa M.,

RA Mori T., Matsubara K.;

RT "Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic

RT prechymotrypsinogen cDNA.";

RL Biochem. Biophys. Res. Commun. 158:569-575(1989).

CC -!- CATALYTIC ACTIVITY: PREFERENTIAL CLEAVAGE: TYR-, TRP-, PHE-, LEU-

CC -!- SUBCELLULAR LOCATION: EXTRACELLULAR.

CC -!- SIMILARITY: BELONGS TO PEPTIDASE FAMILY S1; ALSO KNOWN AS THE

CC TRYPSIN FAMILY.

CC -----

CC This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration

CC between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL outstation -
CC the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its
CC use by non-profit institutions as long as its content is in no way
CC modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial
CC entities requires a license agreement (See <http://www.isb-sib.ch/announce/>
CC or send an email to license@isb-sib.ch).

CC -----

DR EMBL; M24400; AAA52128.1; -.

DR PIR; A31299; A31299.

DR HSSP; P00766; 1CHG.

DR MIM; 118890; -.

DR INTERPRO; IPR001254; -.

DR INTERPRO; IPR001314; -.

DR PFAM; PF00089; trypsin; 1.

DR PRINTS; PR00722; CHYMOTRYPSIN.

DR PROSITE; PS00134; TRYPSIN_HIS; 1.

DR PROSITE; PS00135; TRYPSIN_SER; 1.

KW Hydrolase; Serine protease; Digestion; Pancreas; Zymogen; Signal.

FT SIGNAL 1 18

FT CHAIN 19 263 CHYMOTRYPSINOGEN B.

FT CHAIN 19 31 CHYMOTRYPSIN B, A CHAIN.

FT CHAIN 34 164 CHYMOTRYPSIN B, B CHAIN.

FT CHAIN 167 263 CHYMOTRYPSIN B, C CHAIN.

FT ACT_SITE 75 75 CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).

FT ACT_SITE 120 120 CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).

FT ACT_SITE 213 213 CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).

FT DISULFID 19 140 BY SIMILARITY.

FT DISULFID 60 76 BY SIMILARITY.

FT DISULFID 154 219 BY SIMILARITY.

FT DISULFID 186 200 BY SIMILARITY.

FT DISULFID 209 238 BY SIMILARITY.

SQ SEQUENCE 263 AA; 27870 MW; 4C1C055A490B8701 CRC64;

MAFLWLLSCW ALLGTTFGCG VPAIHPVLSG LSRIVNGEDA VPGSWPWQVS LQDKTGFHFC
GGSLISEDWV VTAAHCGVRT SDVVVAGEFD QGSDEENIQV LKIAKVFKNP KFSILTVNND
ITLLKLATPA RFSQTVSAVC LPSADDDFPA GTLCATTGWG KTKYNANKTP DKLQQAALPL

LSNAECKKSW GRRITDVMIC AGASGVSSCM GDSGGPLVCQ KDGAWTLVGI VSWGSDTCST
SSPGVYARVT KLIPWVQKIL AAN

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Zeit vom Oktober 1997 bis September 2000.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey für die interessante Themenstellung und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Winfried Hartmeier, Institut für Biotechnologie der RWTH Aachen, für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meinen Gruppenleitern, Herrn Dr. Ralf Takors und Herrn Prof. Dr. Dirk Weuster-Botz für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, für ihre Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Hilfestellungen. Herrn Dr. Takors insbesondere auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Biol. Peter Brixius und Herrn Dipl.-Ing. Jörg Linnemann für die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten geleisteten, wesentlichen Beiträge zu der vorliegenden Arbeit und für die angenehme, fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Thomas Klauser, Mucos-Pharma GmbH & Co, für die Bereitstellung der Produktionsstämme und die wertvollen Diskussionen.

Herrn Dr. Jörg Thömmes und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, namentlich Herrn Markus Halfar, Herrn Dipl.-Ing. Holger Gieren und Frau Dipl.-Ing Esther Kneips für die sehr angenehme und lehrreiche Kooperation.

Den Mitgliedern der Fermentationsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre, für unzählige Anregungen und Tips, konstruktive Kritik und noch so vieles mehr.

Allen Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstätten, der Informatikgruppe, des Fotolabors und der Verwaltung, ohne deren ständige Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

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

Yvonne, für Alles!

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie unter dem Förderkennzeichen 011413 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3867
Mai 2001
ISSN 0944-2952