

LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER
DISSERTATION
PHILIPP PAUL GRÜNERT
2017

Entwicklung eines biotechnologischen Plattformprozesses für die Produktion von Flavonoiden durch Ganzzellbiotransformation

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
Philipp Paul Grünert, M. Sc.

geboren am 07.03.1987 in Elsterwerda

2017

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferentin: Prof. Dr. Ursula Rinas
Tag der Promotion: 13.01.2017

Meiner Familie und Sabrina

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, meine Dissertation mit diesem interessanten Thema in seinem Arbeitskreis anzufertigen.

Gleichzeitig möchte ich Prof. Dr. Ursula Rinas für die Übernahme des Korreferats Dank sagen.

Für die Betreuung bedanke ich mich recht herzlich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Sascha Beutel.

Bei Egon Gross und Dr. Torsten Geissler bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren.

Für die vielen hilfreichen Diskussionen bei dem ein oder anderen Lernsaft und die Hilfestellung bei technischen Fragen danke ich Herrn Dr. Michael Büring.

Frau Martina Weiß danke ich für ihre kompetente Hilfestellung bei der Verwendung praktisch allen analytischen Equipments.

Bei meinen ehemaligen Kommilitonen und Doktorandenkollegen Christian Ude und Thore Frister möchte ich mich für die schöne Zeit im Technikum bedanken, schließlich haben wir da gemeinsam in den vergangenen Jahren einen Großteil unserer Zeit verbracht. Ich möchte diese Zeit nicht missen und freue mich wirklich Euch zu meinen Freunden zählen zu dürfen.

Ebenso allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des TCI bin ich zu Dank verpflichtet für eine interessante, abwechslungsreiche und schöne Zeit. Das TCI ist *one of a kind*.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Frank und Irene, sowie bei meiner Schwester Tabea, aber auch bei meinen engsten Freunden für das Verständnis und die fortwährende Unterstützung in den verschiedensten Belangen während meines gesamten Studiums bedanken!

Einen ganz speziellen Platz in meinem Leben hat während dieser Zeit Sabrina Baganz eingenommen. Danke, dass Du da bist!

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ein biotechnologischer Ganzzellbiotransformationsprozess für Flavonoide mit rekombinanten *Escherichia coli*-Produktionsstämmen entwickelt werden. Dabei wurde die Reaktion von Naringenin zu Phloretin betrachtet. Mit einem *E. coli*-Rosetta-Stamm wurden lebensmittelrechtliche und wirtschaftliche Prozessaspekte untersucht. Da ein hochwertiger Aromastoff produziert werden sollte, wurde der Prozess zusätzlich auch gustatorisch und olfaktorisch optimiert. Der Prozess wurde aus einem Komplexmedium in ein adaptiertes definiertes Medium und auf einen *E. coli*-S1-Stamm mit pStaby-Plasmidsystem übertragen, womit kein äußerer Selektionsdruck während der Prozessführung mehr nötig war. Um eine volumetrische Produktivität bei der Phloretindarstellung von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ zu erreichen, wurden verschiedene Prozessstrategien evaluiert. Es wurden moderne ISPR-Strategien mit Hohlfasermodule und Membranadsorption entwickelt, welche jedoch nicht erfolgreich umgesetzt werden konnten. Eine Akkumulation der Flavonoide im Inneren der Zellen und eine unzureichende Freisetzungskinetik der Flavonoide wurden festgestellt.

Das Konzept eines Hochzelllichtprozesses erwies sich dann als erfolgreich. Mit definiert aufkonzentrierten Zellen wurde erstmals der angestrebte Produkttiter erreicht und es konnten notwendige Prozessparameter definiert werden. Eine spezifische cytotoxische Flavonoidkonzentration wurde als Ursache für die Ausbeutelimittierung identifiziert. Das *downstream processing* wurde an die komplexen Zellsuspensionen angepasst. Durch eine Reihe technischer Modifikationen und ein speziell entwickeltes *fed-batch*-Steuerungs-Computerprogramm wurde erfolgreich eine reproduzierbare Durchführung des Hochzelllichtprozesses mit höherem Grad an Automatisierung ermöglicht. Unter Berücksichtigung des Metabolismus von *E. coli* wurde neben Glucose eine Reihe von alternativen Kohlenstoffquellen in verschiedenen Prozessvarianten eingesetzt und ihr Einfluss auf die Proteinproduktion untersucht. Dabei wurde erfolgreich ein robuster dreiphasiger Hochzelllichtprozess entwickelt. Dieser Prozess wurde dann auf *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed übertragen. Durch die Produktion einer gezielt modifizierten Chalkonisomerase wurden die Substrat- und Produktspektren um glykosylierte Flavonoide erweitert. Darüber hinaus wurden erfolgreich erste nötige *scale-up* Experimente durchgeführt, wobei die Automatisierung des Prozesses weiter ausgebaut wurde.

Schlagwörter: Flavonoide, Naringenin, Phloretin, *Escherichia coli*,
Ganzzellbiotransformation, Hochzelllichtkultivierung

Abstract

The aim of this work was to develop a biotechnological whole cell biotransformation process for flavonoids using recombinant *Escherichia coli* production strains. The development was done in regard to the reaction of naringenin to phloretin. Foodstuff regulatory and economical aspects of the process were investigated using an *E. coli* Rosetta strain. Additionally, since a high value flavouring substance was to be produced the process was optimised for gustatoric and olfactoric factors. The process was transferred from a complex medium to a process adapted defined medium and to an *E. coli* S1 production strain with a pStaby plasmid system. Thus, no external selection pressure was necessary for the process.

To reach a volumetric productivity of $3,0 \text{ g L}^{-1}$ a vast number of process strategies was evaluated. Modern ISPR strategies using hollow fiber modules and membrane adsorbers were developed but could not be implemented successfully. An accumulation of the flavonoids on the inside of the cells and insufficient release kinetics of the flavonoids were found.

The concept of a high cell density process proved to be successful. With cells concentrated to defined high densities the desired product titer was reached for the first time. Thereby necessary process parameters were defined. A specific cytotoxic flavonoid concentration was identified as the reason for the yield limitation. The *downstream processing* was successfully adapted to the complex cell suspensions. Following technical modifications and using a specifically developed fed-batch control computer program the reproducible execution of a high cell density process was made possible with a higher degree of automation.

In regard to the metabolic networks of *E. coli* glucose and a variety of alternative carbon sources were used in a multitude of process variations and their influence on the protein production was evaluated. A robust three phase high cell density process was successfully developed. Furthermore, this process was transferred to *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed. By the production of a purposefully altered chalcone isomerase the substrate and product spectra were expanded to include glycosylated flavonoids. Additionally and successfully, first scale-up experiments were carried out and the process automation was developed further.

Keywords: Flavonoids, naringenin, phloretin, *Escherichia coli*, whole cell biotransformation, high cell density cultivation

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften:

Dipl.-Biol. Mechthild Gall, Dipl.-Biochem. Maren Thomsen, Dipl.-Biochem. Christin Peters, Dr. Ioannis V. Pavlidis, M. Sc. Patrick Jonczyk, **M. Sc. Philipp P. Grünert**, Dr. Sascha Beutel, Prof. Dr. Thomas Scheper, Egon Gross, Dr. Michael Backes, Dr. Torsten Geißler, Dr. Jakob P. Ley, Dr. Jens-Michael Hilmer, Dr. Gerhard Krammer, Dr. Gottfried J. Palm, Prof. Dr. Winfried Hinrichs, Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer; „Enzymatic Conversion of Flavonoids using Bacterial Chalcone Isomerase and Enoate Reductase“; 2014; Angewandte Chemie (Internatiol Edition), Volume 53, Issue 5, pp. 1439-1442

Poster:

P.P. Grünert, P. Jonczyk, E. Gross, T. Geissler, S. Beutel, J. Ley, T. Scheper; „Extraction of Flavonoids from a Whole Cell Biotransformation Process“; 11th International Conference in Catalysis in Membrane Reactors (ICCMR 11), 2013, Porto (Portugal)

P.P. Grünert, E. Gross, T. Geissler, J. Ley, S. Beutel, T. Scheper; „Optimisation of the Biocatalytic Production of Dihydrochalcones“; 7th International Congress on Biocatalysis (BioCat2014), 2014, Hamburg (Deutschland)

P.P. Grünert, E. Gross, T. Geissler, J. Ley, S. Beutel, T. Scheper; „Optimisation of the Biocatalytic Production of Dihydrochalcones“; 2nd Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel, 2015, Hannover (Deutschland)

T. Frister, S. Hartwig, **P.P. Grünert**, S. Alemdar, S. Irmischer, T. Scheper, S. Beutel; „Recombinant production of a patchoulol synthase isoenzyme and its application for the synthesis of sesquiterpens“; 2nd Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel, 2015, Hannover (Deutschland)

T. Geissler, E. Gross, C. Peters, I. Pavlidis, M. Thomsen, **P.P. Grünert**, P. Jonczyk, S. Beutel, J. Ley, T. Scheper, U. Bornscheuer; „Biocatalytic formation of flavonoid-based flavor compounds“; Biofalvour 2015 - International Conference on Flavour and Fragrance

Biotechnology, 2015, Frankfurt am Main (Deutschland)

Verschiedenes:

E. Gross, P.P. Grünert, M. Gall, M. Thomsen, C. Peters, Ioannis Pavlidis, S. Beutel, U.T. Bornscheuer, T. Scheper, J. Ley; „Abschlussbericht zum BMBF-Projekt P46 „Optimierung der Biokatalytischen Herstellung von Phloretin“ im Cluster BOKATALYSE2021“; 2015

Im Rahmen der Promotion betreute Abschlussarbeiten aus denen Ergebnisse in die vorliegende Dissertation eingeflossen sind:

Joachim Angermann, Diplomarbeit: „Aufreinigung der bakteriellen Chalkonisomerase (CHI) mittels chromatographischer Methoden“, im Studiengang Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2013

Lars Kalz, Bachelorarbeit: „Hochzelldichtekultivierung eines rekombinanten Escherichia coli-Produktionsstammes für die Flavonoidbiotransformation“, im Studiengang Biotechnologie an der Hochschule Emden–Leer, 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	2
3	Theorie	3
3.1	Flavonoide	3
3.2	<i>In-Situ-Product-Removal</i> -Methoden	5
3.3	Proteinproduktion mit Hochzelldichtekulturen von <i>Escherichia coli</i>	7
3.3.1	<i>E. coli</i> -Produktionsstämme	8
3.3.1.1	<i>E. coli</i> BL21, BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS	9
3.3.1.2	<i>E. coli</i> Origami TM , Rosetta TM , Rosetta-gami TM und Tuner TM	9
3.3.1.3	Weitere Modifikationsmöglichkeiten	11
3.3.1.3.1	Promotorwahl	11
3.3.1.3.2	Nutzung und Verhinderung von <i>inclusion bodies</i>	13
3.3.1.3.3	Minimierung der Acetat-Akkumulation	13
3.3.1.4	Plasmidstabilität und Selektionsdruck	15
3.3.2	Prozessentwicklung	17
3.3.2.1	Verfahren der Hochzelldichtekultivierung	18
3.3.2.2	Induktionsstrategie	20
4	Experimenteller Teil	23
4.1	Untersuchungen wirtschaftlicher und lebensmittelrechtlicher Faktoren	25
4.1.1	Induktion mit Laktose	25
4.1.2	Untersuchung der Basalexpression in Komplexmedium	26
4.1.3	Untersuchung der Plasmidstabilität bei einer antibiotikafreien Prozessführung	29
4.1.4	Untersuchung alternativer Substrat- <i>feed</i> -Strategien in der Biotransformation	31
4.2	Evaluierung verschiedener ISPR-Strategien	33
4.2.1	ISPR von Flavonoiden mit Hohlfasermodulen	33
4.2.2	Charakterisierung der Adsorption von Flavonoiden an Standardmembranen	36
4.2.2.1	Membranscreening	37

4.2.2.2	Weitere Charakterisierung von PES als Adsorber	41
4.2.2.2.1	Kompetitive Adsorption	42
4.2.2.2.2	Untersuchung der Adsorption bei unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen	43
4.2.2.2.3	Maximale Bindekapazitäten von Flavonoiden an PES	44
4.2.3	Umsetzung und Bilanzierung des <i>dead-end-setup</i> s	46
4.2.4	Untersuchung der Freisetzungskinetik von Flavonoiden aus <i>E. coli</i>	50
4.3	Entwicklung eines Hochzelllichtprozesses mit <i>E. coli</i> SE1	51
4.3.1	Übertragung des Prozesses auf den <i>E. coli</i> SE1 CHI_sERed-Stamm	51
4.3.2	Biotransformation bei definierten hohen Zelldichten	53
4.3.3	Konzept eines Hochzelllichtprozesses inklusive Downstreaming	57
4.3.4	Hochzelllichtprozessführung mit Glucose als primärer Kohlenstoffquelle	58
4.3.4.1	Optimierung der Kultivierungsparameter für die Hochzelllichtkultivierung	59
4.3.4.2	<i>Repeated-fed-batch</i> -Prozessführung	61
4.3.5	Untersuchung der Proteinproduktion in Abhängigkeit von der Substratauswahl und der Prozessstrategie	63
4.3.6	Übertragung des Prozesses auf den <i>E. coli</i> SE1 delLid CHI_sERed-Stamm	74
4.3.6.1	Umsetzung von Naringenin zu Phloretin	76
4.3.6.2	Umsetzung von Naringin zu Naringindihydrochalkon	77
4.4	<i>Scale-up</i> in den 30 L-Maßstab	78
4.4.1	Experimentelle Übertragung des Prozesses in den 30 L-Maßstab	79
4.4.2	Maßstabsübertragung des Prozesses in den 30 L-Maßstab	84
5	Zusammenfassung und Ausblick	93
6	Anhang A – Chemikalien und Materialien	i
6.1	Chemikalien und Reagenzien	i
6.2	Materialien	ii
6.2.1	Verbrauchsmaterialien	ii
6.2.2	Verwendete Geräte	iii

6.3	Kulturmedien und Puffer	v
6.3.1	LB-Medium	v
6.3.2	TB-Medium	vi
6.3.3	ZYP-Medium (definiertes Medium)	vii
6.3.4	Lösemittelmischung für die Elution von Flavonoiden nach DEMMER <i>et al.</i> (2011)	ix
6.3.5	Antibiotika	ix
6.3.6	Kaliumphosphatpuffer für den Zellaufschluss	ix
6.3.7	SDS-PAGE: Färbelösung, TGS- und Probenpuffer	x
6.4	Stämme und Stamm-Haltung	x
6.5	Plasmidkarten	xi
6.5.1	<i>Escherichia coli</i> BL21 CHI_sERed	xi
6.5.2	<i>Escherichia coli</i> S1 CHI_sERed	xii
6.5.3	<i>Escherichia coli</i> S1 delLidCHI_sERed	xii
7	Anhang B – Methoden	xii
7.1	Das Programm „ORKFeeder“ (<i>Online-Runge-Kutta-Feeder</i>)	xii
7.2	Prozessführung (für 2 L-Maßstab- <i>batch</i> -Kultivierung) (TB-Medium)	xv
7.3	Prozessführung (für 2 L-Maßstab- <i>batch</i> -Kultivierung) (ZYP-Medium)	xvi
7.4	Prozessführung (für 2 L-Maßstab- <i>fed-batch</i> -Hochzelldichtekultivierung) (ZYP- Medium)	xvi
7.5	Membran- <i>screening tool</i>	xvi
7.5.1	Aufbau des Membran- <i>screening-tools</i>	xvi
7.5.2	Vorgehen bei Verwendung des Membran- <i>screening-tools</i>	xvii
7.6	Analytik	xvii
7.6.1	Optische Dichte bei 600 nm	xvii
7.6.2	Zellaufschluss	xvii
7.6.3	SDS-PAGE	xviii
7.6.4	Färbung mit kolloidalem Coomassie	xix
7.6.5	Flavonoidextraktion mit Ethylacetat	xix
7.6.6	HPLC	xx
7.6.6.1	HPLC: Flavonoide	xx
7.6.6.2	HPLC: Metabolite und Substrate	xx
7.6.7	HPLC-Kalibrationsgeraden	xxi

8	Anhang C – Experimentelle Daten	xxiv
8.1	Untersuchung des Einsatzes von Cosolventien zur Erhöhung der Flavonoidlöslichkeit	xxiv
8.2	Optimierung des 2 L-Bioreaktorsystems für die Hochzelldichtekultivierung	xxvi
8.3	Untersuchung eines stufenförmigen <i>Feed</i> -Profils	xxix
8.4	Untersuchung verschiedener Induktionsstrategien	xxix
8.5	Untersuchung des Wachstumsverhaltens auf alternativen Kohlenstoffquellen	xxxi

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht aller Flavonoidklassen	4
2	Enzymatischer Mechanismus der Biotransformation	24
3	Biotransformation: Induktion durch Laktose	26
4	Biotransformation: ohne Induktion	27
5	Wachstumskurven: LB- und TB-Medium	27
6	Basalexpression: LB-Medium	28
7	Basalexpression: TB-Medium	29
8	Plasmidstabilität: Abhängigkeit des Prozesses von Ampicillin	30
9	Biotransformation mit niedrigen Flavonoidkonzentrationen	31
10	Biotransformation: stufenweise Zugabe von Naringenin	32
11	Schema: ISPR-System mit seriell geschalteten Hohlfasermodulen	34
12	ISPR: Extraktion mit seriell geschalteten Hohlfasermodulen	35
13	Flavonoidbindekapazitäten von einer Auswahl von Standardmembranen	37
14	Membranscreening: Kompetitive Adsorption von Flavonoiden an PES	42
15	Adsorption von Naringenin und Phloretin an PES bei unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen	43
16	Bestimmung der statischen Bindekapazität von PES: Flavonoide separat	45
17	Approximation der statischen Bindekapazität von PES: Flavonoide kompetitiv	46
18	ISPR: Schemata zweier Membranadsorber- <i>setups</i>	47
19	ISPR: Biotransformationsverlauf	49
20	Lokalisation und Freisetzung der Flavonoide Naringenin und Phloretin während einer Biotransformation	50
21	Biotransformation mit niedrigen Flavonoidkonzentrationen: SE1 pStaby TM	52
22	Hanes-Woolf-Plots: Biotransformation bei definierten hohen Zelldichten (100 rel. AU und 200 rel. AU)	56
23	Michealis-Menten-Plots: Biotransformation bei definierten hohen Zelldichten (100 rel. AU und 200 rel. AU)	56
24	Prozessschema: <i>Repeated Fed-Batch</i> -Hochzelldichtekultivierung	57
25	<i>Repeated-fed-batch</i> -Kultivierung	62
26	Proteinproduktionsphase: Hochzelldichtekultivierung mit Fructose	70
27	SDS-PAGE: Proteinproduktion, Fructose als Kohlenstoffquelle	71
28	Biotransformation: Hochzelldichtekultivierung mit Fructose	71
29	Proteinproduktionsphase: Hochzelldichtekultivierung mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin	72
30	SDS-PAGE: Proteinproduktion, Glycerin als Kohlenstoffquelle	73
31	Biotransformation: Hochzelldichtekultivierung mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin	73
32	Übertragung auf <i>E. coli</i> SE1 delLid CHI_sERed: Hochzelldichtekultivierung mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin	74
33	SDS-PAGE: Übertragung des Prozesses auf <i>E. coli</i> SE1 delLid CHI_sERed	76
34	Biotransformation mit <i>E. coli</i> SE1 delLid CHI_sERed: Naringenin zu Phloretin	76
35	Biotransformation mit <i>E. coli</i> SE1 delLid CHI_sERed: Naringenin zu Naringindihydrochalkon	77
36	<i>Scale-up</i> in den 30 L-Maßstab: <i>feed-</i> und Begasungs-Verlauf	80

37	<i>Scale-up</i> in den 30 L-Maßstab: Proteinproduktionsphase	82
38	SDS-PAGE: <i>Scale-up</i> in den 30 L-Maßstab	83
39	Biotransformationen: <i>Scale-up</i> in den 30 L-Maßstab	84
40	Plasmid-Karte des Vektors pET-28(a-c)(+)	xi
41	Plasmid-Karte des Vektors pET-52b(+)	xi
42	Plasmid-Karte des Vektors pStaby CHI_sERed	xii
43	Plasmid-Karte des Vektors pStaby delLidCHI_sERed	xii
44	GUI des Programmes ORKFeeder	xiv
45	HPLC: Naringenin-Kalibrationsgerade	xxi
46	HPLC: Phloretin-Kalibrationsgerade	xxii
47	HPLC: Glycerin-Kalibrationsgerade	xxii
48	HPLC: Fructose-Kalibrationsgerade	xxiii
49	HPLC: Acetat-Kalibrationsgerade	xxiii
50	HPLC: Laktose-Kalibrationsgerade	xxiv
51	Einfluss von Cosolventien auf die Löslichkeit von Flavonoiden	xxv

Tabellenverzeichnis

1	Membranscreening: Evaluation der Extraktion (Adsorption und Elution) von Flavonoiden an einer PES-Membranen.	39
2	Fortsetzung: Membranscreening: Evaluation der Extraktion (Adsorption und Elution) von Flavonoiden an HIC- und flavonoidspezifischen Cellulosehydrat-Membranen (FCM).	40
3	ISPR: Bilanzierung und Lokalisation der Flavonoidkonzentrationen bei der Anwendung des <i>dead-end</i> -ISPR-Systems (bezogen auf die erste Biotransformation).	49
4	Biotransformation bei definierten Zelldichten: $OD_{600} = 100$ rel. AU	54
5	Biotransformation bei definierten Zelldichten: $OD_{600} = 200$ rel. AU	54
6	Optimierung der Kultivierungsparameter für die Hochzelldichtekultivierung	61
7	Vergleich des Wachstumsverhaltens auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Glycerin und Fructose).	64
8	Proteinproduktion: Alternative Substrate	66
9	Mathematischer <i>scale-up</i> vom 2 L- in den 30 L-Rührreaktormaßstab. Zusammenfassung und Gegenüberstellung der Gerätemaße und Kennzahlen des errechneten, theoretisch notwendigen Reaktors und der beiden experimentell verwendeten Reaktoren.	89
10	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	i
11	Verwendete Verbrauchsmaterialien	ii
12	Verwendete Laborgeräte	iii
13	LB-Medium (lysogeny broth). Rezept für 1 L Medium	v
14	TB-Medium (terrific broth). Rezept für 1 L Medium.	vi
15	10x Kaliumphosphat-Puffer. Rezept für 1 L Medium	vi
16	Puffer und Salze für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium.	vii
17	Spurelemente-Stammlösungen.	vii
18	Zucker für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium. Originalzusammensetzung.	vii
19	Zucker für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium. An mit TB-Medium erreichte optische Dichte angepasste Zusammensetzung.	viii
20	ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium.	viii
21	Lösemittelmischung für die Elution von Flavonoiden von einer mikroporösen Cellulosehydratmembran mit kationenaustauschenden Sulfonatgruppen (Volumen: 100 mL	ix
22	Antibiotikastammlösungen (1.000 x)	ix
23	Kaliumphosphatpuffer für den Zellaufschluss (50 mM, pH 6,4), Rezept für 500 mL	ix
24	10 x TGS-Puffer (für SDS-PAGE)	x
25	2 x SDS-Probenpuffer (für SDS-PAGE)	x
26	Laemmli-Puffer (für SDS-PAGE)	x
27	Kolloidale Coomassie-Färbelösung (Blue Silver)	x
28	Rezept für zwei Trenngele (12 %ig)	xviii
29	Rezept für zwei Sammelgele (6 %ig)	xviii

30	HPLC-Gradienten-Programm für die Auftrennung von Flavonoiden (SCHMIDT, 2011)	xx
31	Standardeinstellungen der Sauerstoffanreicherung: PI-Regler	xxvii
32	Optimierte Einstellungen der Sauerstoffanreicherung: PID-Regler	xxvii
33	Medienzusammensetzung: Magnesiumkonzentrationen	xxix

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
BTM	Biotrockenmasse
°C	Grad Celsius, Temperaturskala
CER	CO ₂ -Bildungsrate
<i>d</i>	Durchmesser des Rührorgans in einem Bioreaktor
<i>D</i>	Innendurchmesser des Bioreaktors
DCU	Engl.: <i>digital control unit</i>
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DoE	Design of Experiments
ECS	Extracapillarraum (engl.: <i>extra capillary space</i>)
ERed	Enoatreduktase
g	Gramm
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,80665 m s ⁻²)
h	Stunden
<i>H</i>	Höhe des Bioreaktors
HFM	Hohlfasermodul
HIC	Engl.: <i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high pressure liquid chromatography</i>)
ICS	Intracapillarraum (engl.: <i>inter capillary space</i>)
IEX	Engl.: <i>ion exchange chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranose
ITS	Rührerspitzen geschwindigkeit (engl.: <i>impeller tip speed</i>)
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante, Substratkonzentration bei $\frac{V_{max}}{2}$
kDa	Kilodalton
<i>k_La</i>	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient (in der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf Sauerstoff bezogen)
L	Liter (entsprechend mL, cL, dL)
<i>lacO</i>	Gensequenz des Lac-Operators
<i>lacP</i>	Gensequenz des Lac-Promotors
LacI	Lac-Inhibitor
LB	<i>lysogeny broth</i> (Standardmedium für Bakterien)
m	Meter (entsprechend μm, cm, dm)
M	Mol (entsprechend μM, mM)
min	Minuten
<i>μ_{max}</i>	Maximale spezifische Wachstumsrate
<i>n</i>	Betriebsdrehzahl eines Rührers in einem Bioreaktor
<i>N_M</i>	Mischzeitkennzahl
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OUR	O ₂ -Aufnahmerate
<i>P</i>	Physikalisches Symbol für Leistung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
PES	Polyethersulfon
π	Kreiszahl ($\pi = 3,1415926\dots$)
Q	Belüftungskennzahl
Re	Reynoldszahl
rel. AU	Relative Absorptionseinheiten (engl.: <i>relative absorption units</i>)
RQ	Respirationsquotient
sERed	Sequenzoptimierte Enoatreduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TB	<i>terrific broth</i> (Standardmedium für die Plasmidproduktion in Bakterien)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Θ_{90}	Mischzeit
UpM	Umdrehungen pro Minute (entspricht engl.: rpm)
V	Volumen
\dot{V}_{Feed}	Volumenstrom des <i>Feed</i> -Mediums
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
vvm	Begasungsrate (engl.: <i>volume per volume medium and minute</i>)
$Y_{P/X}$	Ausbeutekoeffizient Produkt je Biomasse
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient Biomasse je Substrat
ZYP	Definiertes Medium auf Phosphatpufferbasis (geht auf STUDIER (2005) zurück)

1 Einleitung

In mediterranen Ländern wie Frankreich und Griechenland gibt es auffällig niedrige Zahlen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und eine gegenüber dem Durchschnitt aller Industrieländer deutlich erhöhte Lebenserwartung. Als man in dem 20. Jahrhundert der Ursache für dieses als „Französisches Paradox“ bekannten Phänomens auf den Grund gehen wollte, fand man eine mögliche Erklärung in dem Rotweinkonsum der Bevölkerung. Die gesundheitsförderliche Wirkung war allerdings nicht auf den Alkohol, sondern auf die roten Farbstoffe im Wein zurück zu führen. Diese roten Farbstoffe werden Anthocyane genannt und gehören zu der Stoffklasse der Polyphenole.

Polyphenole sind in der Pflanzenwelt weit verbreitete sogenannte Sekundärmetabolite. Das bedeutet, dass sie aus primären Metaboliten wie zum Beispiel Aminosäuren und Zuckern synthetisiert werden und weder der Energiegewinnung noch dem Aufbau von Strukturen dienen. Sie dienen den Pflanzen beispielsweise als Farbpigment und spielen so eine wichtige Rolle bei der Bestäubung oder beim Schutz gegen UV-Strahlen. Polyphenole sind auch entscheidend für die Entwicklung der Pflanzen.

Doch warum sind Polyphenole so gesund für uns? Neben der Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System ist mittlerweile auch bekannt, dass sie die Gehirnfunktion verbessern und sogar die Entwicklung von Krebszellen blockieren können. Besonders wichtig sind dabei ihre antioxidativen und enzymhemmenden Eigenschaften. Zu den Polyphenolen gehören auch die sogenannten Flavonoide, die in der Pflanzenwelt ubiquitär verbreitet sind, und die wir zwangsläufig über Obst und Gemüse als Teil unserer täglichen Ernährung aufnehmen. Darüber hinaus weist eine große Zahl der heutzutage medizinisch genutzten Pflanzen eine sehr hohe Konzentration an diesen Flavonoiden auf.

Flavonoide werden i.d.R. aus Pflanzen oder Pflanzenmaterialien extrahiert, welche auch als Nahrungsmittel dienen könnten. Oft ist in einem zweiten Schritt noch die chemische Abspaltung des Zuckerrests notwendig. Diese bisher praktizierte chemische Herstellung ist aufwändig und kostenintensiv. Für eine ökonomische, nachhaltige und ökologische Alternative bedient man sich mit Mitteln der modernen Biotechnologie am Vorbild Natur. Z.B. ist das im menschlichen Darm lebende Bakterium *Eubacterium ramulus* bekannt dafür, dass es verschiedene Flavonoidtypen ineinander umwandeln bzw. diese abbauen kann. Dieses Bakterium ist allerdings nur sehr kompliziert und aufwändig zu kultivieren, da es auf strikt anaerobe Kultivierungsbedingungen angewiesen ist. Deswegen wurden die für die Umwandlungsreaktion verantwortlichen Enzyme identifiziert und in *Escherichia*

coli exprimiert. Bei *Escherichia coli* handelt es sich um den am besten charakterisierten und erforschten biotechnologischen Produktionsstamm. Durch rekombinante DNA-Technologien und bestimmte Bioprozessauslegungen ist es somit heute möglich Proteine, wie die für den Prozess nötigen Enzyme, in großen Mengen herzustellen. Da dieser Stamm darüber hinaus äußerst anspruchslos ist, wird der Prozess weniger komplex und somit wirtschaftlich durchführbar. Mit diesem neuen Verfahren können einfach zugängliche in seltenere Flavonoide umgewandelt werden, welche besondere für den Menschen nutzbare Eigenschaften besitzen.

2 Zielsetzung

Das Ziel der im Rahmen des Biokatalyse2021-Cluster-Projektes „P46 – Optimierung der biokatalytischen Herstellung von Phloretin“ in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie und Enzymkatalyse der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald und Symrise AG (Holzminden, Deutschland) am TCI (Hannover, Deutschland) durchgeführten Arbeiten war es, einen biotechnologischen Ganzzellbiotransformationsprozess für Flavonoide mit einem rekombinanten *E. coli*-Produktionsstamm zu entwickeln. Der Großteil der nötigen Experimente sollte anhand der Reaktion von Naringenin zu Phloretin evaluiert und optimiert werden.

Die Grundlagen des Prozesses waren bereits in dem Vorgängerprojekt „P19 – Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ untersucht worden. Die beschriebenen Arbeiten bauen auf diesen Vorarbeiten auf.

Um die späteren Prozesskosten möglichst gering zu halten, sollten verschiedene Prozessbestandteile, wie z. B. das verwendete Medium und der genutzte Induktor, aus ökonomischer Sicht untersucht und gegebenenfalls verändert werden.

Als konkretes Ziel wurde vom Projektkoordinator eine volumetrische Phloretinausbeute von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ vorgegeben. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten verschiedene Prozessstrategien entworfen und umgesetzt werden. Als Teilziele des Projektes sollten als mögliche Strategien eine Biotransformation mit stufenförmiger Flavonoidzugabe und moderne ISPR-Strategien mit Lösemittelextraktion über Hohlfasermodule und Membranadsorption untersucht werden.

Da mit diesen Strategien die Ziele nicht erreicht werden konnten, wurde ein Hochzell-dichteprozess erfolgreich entwickelt. Als Abschluss des Projektes sollte ein *scale-up* in den 30 L-Maßstab erfolgen.

3 Theorie

3.1 Flavonoide

Was sind Flavonoide? Flavonoide sind in allen essbaren Gemüsen, Früchten, Kräutern, Nüssen, Samen, Tees und Weinen enthalten (COOK & SAMMAN, 1996; SAHU & GRAY, 1996; O'PREY *et al.*, 2003). Sie sind bekannt für ihre antioxidative Aktivität (WILLIAMS *et al.*, 2004; HOTTA *et al.*, 2002), die in der Funktion ihrer Phenolgruppen als Wasserstoffdonoren und durch das Vorhandensein von Hydroxylgruppen begründet ist (TRIPOLI *et al.*, 2007). Die Bezeichnung Flavonoid ist von dem lateinischen Wort „flavus“ für „gelb“ abgeleitet und ist in der zumeist gelblichen Färbung der Vertreter dieser Substanzklasse begründet.

Flavonoide zählen als Phenole zu den sogenannten pflanzlichen Sekundärmetaboliten, welche durch weitere Umsetzung der Produkte ihres Primärmetabolismus produziert werden. Die Sekundärmetabolite stehen weder zum Zellerhalt, zum Wachstum noch zur Entwicklung in Bezug (ROSENTHAL, 1991). Sie sind aber z. B. in die Photosynthese, die Photosensibilisierung, den Energietransfer, die Atmung, die Morphogenese und die Festlegung des Geschlechts der Pflanze involviert (SCHAFFER & WINK, 2009; SANDHAR *et al.*, 2011). Sie bieten Schutz vor Fraßfeinden, pathogenen Mikroorganismen, Viren und abiotischem Stress wie UV-Strahlung (MAZID *et al.*, 2011; SANDHAR *et al.*, 2011). Als Farbpigmente tragen sie zur Bestäubung bei (RIESENBERG & SCHILLING, 1985). Pflanzen produzieren mehr als 100.000 solcher Sekundärmetabolite (BALDWIN, 2010). Die wichtigsten Gruppen sind die Terpene (HUMPHREY & BEALE, 2006), Alkaloide (ZULAK *et al.*, 2006), Acetylene, Psoralene (CHRISTENSEN & BRANDT, 2006) und die Phenole (CROZIER *et al.*, 2006).

Flavonoide leiten sich vom Flavan ab, welches durch ein C₆-C₃-C₆-Kohlenstoffgerüst charakterisiert ist (Abb. 1: Ringe „A“, „B“ und „C“). Die beiden C₆-Anteile sind Benzene- ringe, die sie verbindende C₃-Einheit kann als ein O-heterocyclischer Pyranring vorliegen (SANDHAR *et al.*, 2011; TAPAS *et al.*, 2008). Flavonoide kommen als Aglykone oder methylierte Derivate (HARBORNE, 1988), jedoch meist in Form von O- und C-Glykosiden vor. Bei O-Glykosiden sind die Zuckeranteile für gewöhnlich an die Positionen C₃ oder C₇ des Aglykons gebunden. Bei C-Glykosiden befinden sich die Bindungen an den Positionen C₆ und C₈ (RIJKE *et al.*, 2006). Unter den ca. 80 bisher nachgewiesenen möglichen Glykosidanteilen sind L-Rhamnose, D-Glucose, Glucorhamnose, D-Galaktose und L-Arabinose am häufigsten (HARBORNE & BAXTER, 2001; DÖRING, 2010). Darüber hinaus sind Methylierungen, Acetylierungen und Sulphatisierungen als Modifizierungen möglich (SANDHAR

et al., 2011).

Flavonoide werden in mehrere Unterklassen unterteilt. Eine Übersicht ist in Abbildung 1 gezeigt.

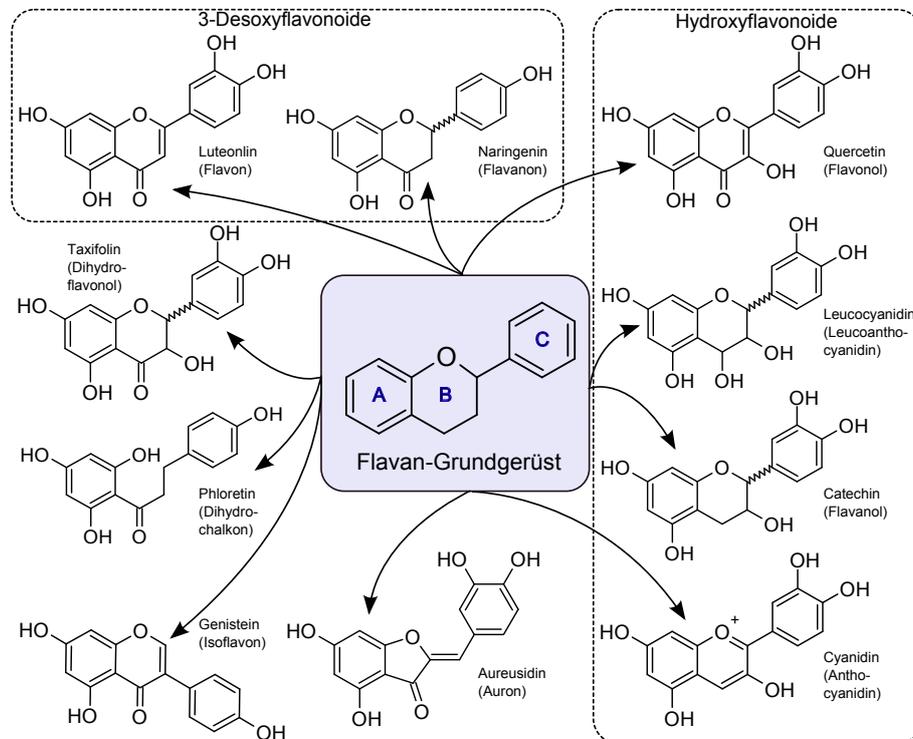


Abbildung 1: Übersicht aller Flavonoidklassen. Im Zentrum ist Flavan als Grundgerüst aller Flavonoide gezeigt. Je Klasse ist beispielhaft je ein Vertreter abgebildet.

Die Hydroxyflavonoide besitzen eine Hydroxygruppe in der C3-Position des C-Rings. Zu dieser Unterklasse gehören die Flavonole, Anthocyanidine, Flavanole und die farblosen Leucoanthocyanidine (NAKAJIMA *et al.*, 2001). Anthocyanidinen und Flavanolen fehlt zusätzlich auch die C4-Carbonylgruppe. Eine weitere Unterklasse stellen die 3-Desoxyflavonoide dar, denen die Hydroxygruppe in der Position C3 fehlt. Dieser Gruppe werden Flavone und Flavanone zugeordnet. Die restlichen Flavonoidklassen sind die Isoflavone, deren „B“-Ring nicht über das C2 des „C“-Rings sondern über dessen C3 gebunden ist, die Chalkone und Dihydroflavonole, die zusätzliche Hydroxy- und Methylgruppen aufweisen (WILLIAMS & HARBOURNE, 1994; HEIM *et al.*, 2002) und die Aurone, die anstelle des „B“-C6-Rings einen C5-Ring aufweisen, der durch Ringschluss einer chalkonartigen Gruppe hervorgeht (NAKAYAMA, 2002). Es wurden bislang über 9.000 Flavonoidverbindungen identifiziert (WILLIAMS & GRAYER, 2004). Dennoch umfassen die Flavonoide, deren Struktur bereits vollständig aufgeklärt wurde, nicht einmal 1 %

aller theoretisch möglichen Variationen, und die Anzahl wird durch die Chiralität der Moleküle noch weiter erhöht (SANDHAR *et al.*, 2011).

3.2 *In-Situ-Product-Removal-Methoden*

Bei chemischen und biotechnologischen Prozessen können Produkte und Nebenprodukte akkumulieren, die den Katalysator und damit eine weitere Reaktion inhibieren. Es resultiert eine niedrige Produktivität. Durch die sogenannte *in-situ-product-removal*-Technik (kurz ISPR) können selektiv Produkte oder Nebenprodukte, direkt nach ihrer Bildung, aus einem Prozess, bzw. von dem Katalysator (z. B. den Zellen im Falle einer Ganzzellbiotransformation) entfernt werden. Dadurch wird einer Produktinhibierung des Katalysators und dem Verlust des Produkts durch Degradation oder Evaporation entgegen gewirkt. Bei mehrstufigen Reaktionen kann durch ISPR das Reaktionsgleichgewicht hin zum Produkt verschoben werden. Die Reaktion kann dann mit der maximalen Geschwindigkeit über einen längeren Zeitraum iterativ oder sogar kontinuierlich weiter laufen, wodurch die volumetrische Produktivität erheblich gesteigert werden kann (FREEMAN *et al.*, 1993; DAFOE & DAUGULIS, 2014). Gerade in der Biotechnologie, in der mit wässrigen Systemen gearbeitet wird, liegen die Produkte stark verdünnt vor, wodurch bei der Produktisolation und -aufreinigung hohe Kosten entstehen (LYE & WOODLEY, 1999). In diesem Aspekt stellt ISPR daher eine moderne Alternative zur klassischerweise eingesetzten Hochzelldichtekultivierung dar. Beim Einsatz von ISPR-Techniken kann darüber hinaus potentiell die Anzahl von *downstream processing*-Schritten (DSP) verringert werden.

Die Anwendung von ISPR-Techniken ist allerdings auf extrazelluläre Produkte beschränkt. Intrazelluläre Produkte lassen sich nur kompliziert durch Permeabilisierung der Zellmembranen freisetzen, wobei die Viabilität der Zellen beeinträchtigt wird (PARK & GENG, 1992). Verstärkt eingesetzt wird ISPR im Bereich mikrobiell hergestellter Aromen, Sekundärmetabolite, Proteine und Feinchemikalien (STARK & VON STOCKAR, 2003).

Abhängig von den Eigenschaften des hergestellten Produktes bieten sich unterschiedliche Extraktionsmechanismen an. Es wurden bereits Systeme beschrieben, die erfolgreich zur Gewinnung einer Substanz auf Basis ihrer Größe, Ladung, Hydrophobizität, Flüchtigkeit und anderen spezifischeren Bindeeigenschaften genutzt werden können (FREEMAN *et al.*, 1993; CHAUHAN & WOODLEY, 1997). Als beispielhaft müssen an dieser Stelle die Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen (*two-phase partitioning bioreactor*, TPPB) (PUZISS & HEDÉN, 1965; DAFOE & DAUGULIS, 2014), mit wasserunlöslichen organischen Lösemitteln

oder überkritischen Fluiden wie CO₂ unter Hochdruck (SCHWARTZ & MCCOY, 1977), mit Gasen oder mit Feststoffen (DAFOE & DAUGULIS, 2014) erwähnt werden. Bei der Verwendung von Zweiphasensystemen kann es allerdings aufgrund einer zu starken Durchmischung durch hohe Rührerdrehzahlen zur Bildung von Emulsionen kommen. Das gilt es bei der Anwendung derartiger Systeme zwingend zu beachten (STARK & VON STOCKAR, 2003).

Weitere ausführlich in der Literatur beschriebene Systeme sind die Immobilisierung in Ionenaustauschchromatographieharzen (IEX-Harze) (TONE *et al.*, 1968), die Evaporation durch Anlegen eines Vakuums (CYSEWSKI & WILKE, 1977) und die Abtrennung eines Produktes durch Permeation (FRIEDMAN & GADEN JR., 1970) oder Präzipitation (BUCHTA, 1983).

Es wird zwischen internen und externen ISPR-Systemen unterschieden. Ein wichtiger technisch-mikrobiologischer Gesichtspunkt ist hierbei ob mit ruhenden oder proliferierenden Zellen gearbeitet werden soll (STARK & VON STOCKAR, 2003). Ein internes System wäre beispielsweise eine im Inneren eines Bioreaktors installierte Dialyseeinheit, durch diese – angetrieben durch einen Konzentrationsgradienten – das gewünschte Produkte gezielt von der Kulturbrühe abgetrennt wird. In externen Systemen werden ISPR-Einheiten, beispielsweise Säulen, außerhalb des Reaktorraums in Bypassen oder sog. *loops* integriert. Dies ermöglicht im Gegensatz zu internen Systemen eine *on-line*-Regeneration der verwendeten ISPR-Einheit, wodurch bspw. *fouling* unterbunden wird und eine zusätzliche Leistungssteigerung erzielt werden kann (FREEMAN *et al.*, 1993). Bei externen Systemen können jedoch die Sauerstoffversorgung, verstärkter Scherstress und Nährstofflimitierungen zu kritischen Faktoren werden (STARK & VON STOCKAR, 2003).

Neben *de novo*-Herstellungsprozessen hat ISPR gerade auch in Biotransformationsprozessen besonderes Potential. Bei Biotransformationsprozessen ähneln sich Substrat und Produkt physikochemisch so stark, dass es aber bedeutend anspruchsvoller ist ein geeignetes DSP- bzw. ISPR-System zu entwickeln (CHAUHAN & WOODLEY, 1997).

Der *scale-up* o. g. Systeme in den industriellen Produktionsmaßstab ist oft allerdings aus rein ökonomischen Gründen nicht möglich. In den betroffenen Industriezweigen werden in der Regel *multi-purpose*-Anlagen (Mehrzweckanlagen) genutzt. Bei der Konstruktion einer solchen *multi-purpose*-Anlage müsste ein Kompromiss zwischen hoher Selektivität für ein Produkt und niedriger Selektivität für verschiedene Produkte getroffen werden. In Anbetracht der verhältnismäßig jungen Geschichte von ISPR kann jedoch mit Sicherheit von einer Zunahme von Anwendungsbeispielen und der Popularität dieser Techniken

ausgegangen werden, da hier sehr hohes Potential für neue Entwicklungen besteht (STARK & VON STOCKAR, 2003).

3.3 Proteinproduktion mit Hochzelldichtekulturen von *Escherichia coli*

Die Natur bietet eine Vielfalt an Proteinen – insbesondere die katalytisch aktiven Enzyme – die ein großes medizinisches, wissenschaftliches und technisches Potential aufweisen. In vielen Fällen werden sie von den natürlich produzierenden Organismen aber nur in geringen Konzentrationen produziert. Durch gentechnische und molekularbiologische Methoden können diese Proteine mittlerweile sequenziert, gezielt verändert, optimiert und heterolog in anderen Organismen hergestellt werden. In der Kombination mit ausgefeilten mikrobiologisch-technischen Verfahren half dies der Biotechnologie in den vergangenen Jahrzehnten enorm zu florieren (STORHAS, 2013).

Escherichia coli (*E. coli*) ist immer noch das wichtigste Produktionssystem der modernen Biotechnologie, obwohl mittlerweile auch andere prokaryotische, höhere eukaryotische Zelllinien und Mehrzeller als Produzenten komplexer Proteine etabliert sind. Bereits in den 80er Jahren begann durch eine extensive Erforschung seiner Genetik, Physiologie und Molekularbiologie die Erfolgsgeschichte des heute am häufigsten verwendeten prokaryotischen Produktionssystems. *E. coli* ist der am besten charakterisierte Wirtsorganismus überhaupt (MAKRIDES, 1996; LEE, 1996).

Mit *E. coli* können allerdings nur Proteine produziert werden, die einen gewissen Grad von Komplexität nicht überschreiten. So sind zum Beispiel posttranslationale Modifikationen mit *E. coli* nicht möglich und heterolog produzierte Proteine haben typischerweise nur eine Masse von bis zu 50 kDa, wobei es auch Beispiele für die Produktion größerer Proteine gibt (LEE, 1996). Auch zu Disulfidbindungen ist *E. coli* von Natur aus nicht befähigt. Da es sich um ein gram-negatives Bakterium handelt, müssen bei der Produktion zwingend Endotoxine beseitigt werden (STORHAS, 2013). Darüber hinaus können Proteine im Cytosol akkumuliert oder in das Periplasma sekretiert werden. Mittlerweile sind aber auch Möglichkeiten für eine Sekretion von heterologen Proteinen in das Kulturmedium patentiert worden (YOON *et al.*, 2010). Eine Sekretion in den zellfreien Kulturüberstand stellt neben der Stabilität der Proteine auch für das DSP einen großen Vorteil dar. Hierfür werden momentan jedoch noch generell gram-positive Bakterien und Hefen bevorzugt (CHOI *et al.*, 2006).

Vorwiegend werden Proteine in *E. coli* jedoch in das Cytosol produziert, wo sie dann proteolytischer Degradation ausgesetzt sind. Von der Wahl des Produktionssystems sind

letztendlich auch das Design des Prozesses und diverse ökonomische Faktoren abhängig. Da *E. coli* anspruchslos und durch eine kurze Generationszeit gekennzeichnet ist, wurden sehr große Bemühungen unternommen *E. coli* besser nutzbar zu machen.

Sollen in der Industrie große Massen an rekombinanten Proteinen, Enzymen oder deren Katalyseprodukten, Aminosäuren oder Primär- und Sekundärmetaboliten wie Alkoholen oder organischen Säuren produziert werden, wird häufig auf das Verfahren der Hochzelldichtekultivierung zurück gegriffen (LEE, 1996; JEONG & LEE, 1999; GERIGK *et al.*, 2002; MIJTS & SCHMIDT-DANNERT, 2003; SHILOACH & FASS, 2005). Die Erzeugung von hohen Zelldichten ist neben den primitiven Prokaryoten auch mit Organismen aus den Domänen der Archaea und Eukarya möglich; *E. coli* wird jedoch bevorzugt verwendet (RIESENBERG & GUTHKE, 1999).

Hochzelldichteprozesse bieten eine verbesserte Wirtschaftlichkeit, Kulturvolumina und Abwässer werden reduziert und das DSP erleichtert. Mit den reduzierten Volumina einher geht eine reduzierte Größe der benötigten Geräte und damit reduzierte Anschaffungskosten (SHILOACH & FASS, 2005; CHOI *et al.*, 2006). Die Proteinproduktion in Hochzelldichtekulturen von *E. coli* ist auch aktuell noch immer Bestandteil der Forschung. Diese intensive Forschung hat bereits eine Fülle von Produktionsstämmen, zahlreichen Expressionssystemen, molekularbiologischen und verfahrenstechnischen Strategien und Methoden hervorgebracht um die Defizite, die dieses System mit sich bringt, zu umgehen oder zu beseitigen. Heute werden diese Produktionsstämme und -systeme mit modernsten Hochdurchsatzmethoden auf Transkriptom- und Proteomebene immer weiter entwickelt (CHOI *et al.*, 2006). Die folgenden Ausführungen sollen einen Überblick über die wichtigsten und ausschlaggebenden Fakten zur Proteinproduktion und zur Entwicklung entsprechender Prozesse mit *E. coli* in Hochzelldichtekulturen bieten.

3.3.1 *E. coli*-Produktionsstämme

E. coli K12- und B-Stämme sind die am weitesten verbreiteten Produktionssysteme (WAEGEMAN & SOETAERT, 2011). Diese beiden Varianten haben sehr verschiedene Wachstumscharakteristika, die wichtig für ihre Verwendung in Hochzelldichtekulturen sind. Ein entscheidender Unterschied ist, dass B-Stämme – selbst bei einem Überangebot von Glucose – wesentlich weniger Acetat produzieren als K12-Stämme (NORONHA *et al.*, 2000; SHILOACH *et al.*, 1996). Dies ist darauf zurück zu führen, dass in diesen Stämmen der Glyoxylatzyklus aktiviert ist (VAN DE WALLE & SHILOACH, 1998; PHUE & SHILOACH, 2004). Dieser auch Krebs-Kornberg-Beevers-Zyklus genannte Stoffwechselweg überlappt mit

dem Zitronensäurezyklus und dient der Assimilation von Acetat (KORNBERG & KREBS, 1957; KORNBERG & BEEVERS, 1957).

3.3.1.1 *E. coli* BL21, BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS

Bei *E. coli* BL21 und den von diesem Stamm abgeleiteten BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS sind die intrazelluläre Protease Lon und die extrazelluläre Protease ompT inaktiv. Dadurch werden Proteine im Cytoplasma weniger stark proteolytisch degradiert, was zu erhöhten Ausbeuten an rekombinantem Protein führt (GRODBERG & DUNN, 1988; GOTTESMANN, 1996).

Als weitere Modifikation wurde bei den Stämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS das für die T7-RNA-Polymerase codierende Gen aus dem Prophagen λ DE3 in das chromosomale Genom insertiert. Das Gen wird durch einen schwachen *lacUV5*-Promotor reguliert, der durch Laktose bzw. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar ist. Werden in einem solchen Stamm Plasmidsysteme verwendet, bei denen das zu produzierende Protein unter Kontrolle eines T7- Φ 10-Promotors steht (pET-ExpressionssystemTM, Novagen), kann heterologe Proteinproduktion stattfinden (CASALI & PRESTON, 2003). Der entscheidende Vorteil ist dabei die gegenüber der *E. coli*-RNA-Polymerase fünfmal höhere Transkriptionsgeschwindigkeit (STUDIER & MOFFATT, 1986). Bei diesem System wird allerdings die T7-RNA-Polymerase basal exprimiert, was prozessseitig Probleme verursachen kann. In BL21 (DE3) pLysS wurde dieses Problem durch zusätzliches T7-Lysozym gelöst, dessen codierendes Gen auf einem separaten Plasmid vorliegt. Das T7-Lysozym wird ebenfalls basal exprimiert und kann so effektiv die basal produzierte T7-RNA-Polymerase inhibieren, bis eine intentionale Induktion erfolgt (MOFFATT & STUDIER, 1987).

3.3.1.2 *E. coli* OrigamiTM, RosettaTM, Rosetta-gamiTM und TunerTM

Eines der Hauptprobleme bei der rekombinanten Proteinproduktion mit *E. coli* ist die Bildung sogenannter *inclusion bodies* (IB; Einschlusskörperchen) (BUCHNER & RUDOLPH, 1991). Hervorgerufen durch das Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-System und das Glutaredoxin-Glutaredoxinreduktase-System weist das Cytoplasma von *E. coli* ein negatives Redoxpotential auf. Durch ein negatives Redoxpotential wird die Bildung von Disulfidbrücken erschwert. Disulfidbrücken werden innerhalb einer oder zwischen verschiedenen Aminosäureketten ausgebildet und sorgen so für die korrekte dreidimensio-

nale Struktur des Proteins. Wird die korrekte Faltung nicht erreicht, wird die Bildung von IBS gefördert (DERMAN *et al.*, 1993; STEWART *et al.*, 1998).

Mit *E. coli* OrigamiTM wurde dieses Problem beseitigt. Es handelt sich hierbei um einen von *E. coli* K12 abgeleiteten Stamm der Firma Novagen. Die Gene *trxB* und *gor*, die für die bereits erwähnten Thioredoxin- und Glutathionreduktasen codieren, wurden in diesem Stamm deletiert. Durch diese gezielte Veränderung wird das Cytoplasmamilieu weniger reduzierend, was die Bildung von Disulfidbindungen in diesen Bakterien ermöglicht. Dadurch nehmen die Löslichkeit und die Aktivität der rekombinanten Proteine zu (DERMAN *et al.*, 1993).

Bis zur Entwicklung dieses Stammes waren Disulfidbindungen nur in Kombination mit einer Sekretion in das Periplasma möglich, da dieses das nötige oxidative Milieu bietet. Dafür ist es zwingend notwendig ein kurzes Signalpeptid an das Zielprotein anzuhängen, welches aber während des Sekretionsvorganges abgespalten wird. Die Proteaseaktivität im Periplasma ist geringer als im Cytosol und das Protein wird weniger durch andere Proteine verunreinigt. Die für den selektiven Aufschluss notwendigen Methoden sind im industriellen Maßstab aber nur kompliziert umzusetzen (PUGSLEY, 1993; HOCKNEY, 1994). Das ebenfalls von Novagen entwickelte BL21-Derivat RosettaTM löst ein weiteres häufig auftretendes Problem. Es enthält das Plasmid pRARE. Auf diesem Plasmid sind sechs seltene tRNAs (Transfer-RNAs) codiert. In den Bakterien werden diese tRNAs kontinuierlich coexprimiert und wirken – wenn Proteine eukaryotischen Ursprungs produziert werden sollen – den durch die unterschiedliche *codon usage* verursachten Komplikationen entgegen (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Codons sind dabei Triplets der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, welche im Genom die 20 proteinogenen Aminosäuren kodieren. Es sind insgesamt 64 solcher Basenkombinationen möglich, wovon drei die Translation terminieren. Mit den übrigen 61 ergeben sich also Aminosäuren, welche durch eine Auswahl unterschiedlicher Codons codiert werden (GUSTAFSSON *et al.*, 2004). Die statistische Verteilung und Häufigkeit der tRNAs, deren Anticodons komplementär zu diesen Codons sind, sind in jedem Organismus unterschiedlich, so auch bei Ursprungs- und Produktionsorganismus (bei der heterologen Proteinproduktion). Dadurch kann es bei der Translation zur Belastung des tRNA-Pools kommen, wenn die benötigten tRNAs nur in geringen Konzentrationen durch den Produktionsorganismus gebildet werden (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; ROSANO & CECCARELLI, 2014; NORDHEIM & KNIPPERS, 2015).

Typische Folgen dieser Engpässe sind der Einbau falscher Aminosäuren, Leserasterverla-

gerungen (engl.: *frameshift*), ein frühzeitiges Translationsende oder niedrige Proteinausbeuten (KURLAND & GALLANT, 1996; SØRENSEN *et al.*, 2003).

Durch Codonoptimierung werden seltene Codons durch synonyme weniger seltene Codons ersetzt. Dabei bleibt das resultierende Protein unverändert. Bei der Codonharmonisierung handelt es sich um eine Variante dieser Methode, bei der Codons entsprechend ihrer statistischen Verteilungen zwischen dem Ursprungs- und Produktionsorganismus übertragen werden. Dadurch wird gewährleistet, dass langsam translatierte Abschnitte weiterhin mit geringer Geschwindigkeit translatiert werden, wodurch eine verbesserte Produktion löslichen Proteins erzielt werden kann (ANGOV *et al.*, 2011).

Der Stamm Rosetta-gamiTM verbindet die Vorteile von OrigamiTM und RosettaTM was sich gerade bei der Produktion komplexer humaner Proteine, wie bestimmter Wachstumsfaktoren, als positiv erwiesen hat (ZHANG *et al.*, 2010). Im Einzelfall ließe sich die Eignung von *E. coli* Rosetta-gamiTM für die Produktion humaner Therapeutika aber weiter optimieren. Das durch *E. coli* N-terminal an Proteine angefügte Methionin stellt bei der Produktion humaner Therapeutika oft ein Problem dar, denn humanen Proteinen fehlt dieses Methionin. Die Lösung für dieses Problem stellt die Koexpression einer Methionin-Aminopeptidase dar, wodurch das Methionin nach der Produktion abgespalten wird (LIAO *et al.*, 2004).

Ein anderer Stamm weist eine weitere für die Produktion von Proteinen interessante Veränderung auf. Die Induktoren Laktose und IPTG werden von *E. coli* normalerweise aktiv durch die Laktosepermease und passiv durch Diffusion aufgenommen. Aufgrund einer variierenden Induktoraufnahme ist eine alle Zellen übergreifend gleichmäßige Induktion so nicht möglich (FERNÁNDEZ-CASTANÉ *et al.*, 2012). Darüber hinaus können durch eine zu starke Induktion auch IBs hervorgerufen werden. Bei dem durch Novagen entwickelten BL21-Derivat TunerTM ist das Laktosepermeasegen deletiert worden und somit eine von der Konzentration des Induktors abhängige Induktion möglich, da die Diffusion als einzige Aufnahmemöglichkeit bleibt (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

3.3.1.3 Weitere Modifikationsmöglichkeiten

3.3.1.3.1 Promotorwahl

Um IBs zu vermeiden, gibt es neben den bereits aufgeführten Lösungsansätzen noch eine Vielfalt weiterer genetischer und molekularbiologischer Möglichkeiten. Die Effizienzen

der Transkription und der Translation bestimmen in großem Maße den Erfolg der Proteinproduktion. Ein grundlegender Aspekt ist aus dieser Sicht die Wahl des Promoters unter dessen Kontrolle die Proteinproduktion stattfinden soll. Es gibt Promotoren, die durch einen Temperatur- oder pH-Shift oder durch chemische Induktoren induzierbar sind. Aber auch konstitutive Promotoren wurden bereits erfolgreich in Hochzelldichtekulturen verwendet (POO *et al.*, 2002; JEONG *et al.*, 2004). Induzierbare Promotoren bieten allerdings eine bessere Plasmidstabilität (SLEIGHT *et al.*, 2010).

Die am häufigsten eingesetzten Promotoren sind die durch Laktose und IPTG induzierbaren T7 (STUDIER & MOFFATT, 1986), *lac* (GRONENBORN, 1976), *lacUV5* (WANNER *et al.*, 1977) und *trc* (BROSIUS *et al.*, 1985). Da IPTG die Proliferation und die Proteinproduktion inhibieren kann, wird in der Industrie häufig Laktose verwendet (JEONG & LEE, 1999; CHOI *et al.*, 2000). Die genannten Promotoren unterscheiden sich in ihren Transkriptionsinitiationsfrequenzen, die hauptsächlich durch die Affinität des Promotors zur RNA-Polymerase bestimmt wird. Durch die Wahl eines schwachen Promotors kann der Plasmiderhalt weiter erleichtert werden (SLEIGHT *et al.*, 2010). Außerdem wird dadurch die Proteinsyntheserate reduziert, wodurch anteilig höhere Ausbeuten löslichen und korrekt gefalteten Proteins erzielt werden können (BOWDEN & GEORGIU, 1990; TERPE, 2006).

Einen weiteren entscheidenden, jedoch variablen Faktor stellen die zu transkribierende Nukleotidsequenz und das jeweilige Protein dar (TEGEL *et al.*, 2011). Ausschlaggebend sind bei letzterem die Löslichkeit, die Hydrophobizität und die Komplexität des Zielproteins, wobei die erreichbare Produktivität durch die starke Abhängigkeit vom jeweiligen Protein letzten Endes nicht vorhersagbar ist (KANE & HARTLEY, 1988). Liegen z. B. kurz nach der Produktion hydrophobe Bereiche des Proteins frei, können diese miteinander interagieren und es bilden sich IBs (KING *et al.*, 1996; TEGEL *et al.*, 2011). Erreichen Proteine oder sogar Teile dieser Proteine ihre korrekte Faltung nicht rechtzeitig, wird in der Zelle eine Stressantwort ausgelöst, was auch zur Degradation des heterologen Proteins führen kann (GILL *et al.*, 2000).

Bei der Wahl eines Promotorsystems ist neben der Geschwindigkeit vor allem die Regulation ein wichtiges Kriterium, denn Basalexpression ist gerade bei der Produktion eines Proteins, welches toxisch für die Wirtszelle ist, ein Problem (HANNIG & MAKRIDES, 1998). In einem solchen Fall sind Folgen wie eine verminderte Proliferation, eine niedrige maximale Zelldichte und Zellyse zu erwarten (DOHERTY *et al.*, 1993).

3.3.1.3.2 Nutzung und Verhinderung von *inclusion bodies*

Oft wird die rekombinante Produktion toxischer Proteine erst möglich, wenn sie in Form von IBs produziert werden, da sie dann nur noch geringfügig bis nicht mehr toxisch sind (CHOI *et al.*, 2006). Tatsächlich wurden IBs bereits als Möglichkeit erkannt große Massen an Protein in hoher Reinheit zu gewinnen. Sie werden gezielt produziert, da sie im Vergleich zu nativ strukturierten Proteinen in höheren Konzentrationen im Cytoplasma produziert werden. Zusätzlich unterliegen IBs nicht dem Abbau durch Proteasen, wodurch die Ausbeuten weiter gesteigert werden können. Im DSP kann die *recovery* nach dem Aufschluss der Zellen unkompliziert durch Zentrifugation erfolgen, wodurch in diesem Schritt Kosten reduziert werden können (DE BERNANDEZ CLARK, 1998). Wird allerdings zwingend die native Form des Proteins benötigt, schließen sich der Produktion kostenintensive Solubilisierungs- und Renaturierungsschritte an. Eine korrekte dreidimensionale Faltung, korrekte Disulfidbindungen und die Aktivität des Proteins sind dabei nicht garantiert und die Ausbeuten werden reduziert (GONZÁLEZ-MONTALBÁN *et al.*, 2007).

Auf die Bildung von IBs kann seitens der Prozessführung Einfluss genommen werden, indem Umgebungseinflüsse wie der pH-Wert, die Kultivierungstemperatur und die Versorgung mit Cofaktoren oder prosthetischen Gruppen optimal eingestellt werden (CHALMERS *et al.*, 1990; STRANDBERG & ENFORS, 1991; YANG *et al.*, 2003).

Weitere Methoden, mit denen der Bildung von IBs entgegengewirkt werden kann, sind die Coexpression von Chaperonen oder die Konstruktion von Chimären aus dem Zielprotein und einem Fusionsprotein. Diese Techniken haben aber auch Nachteile. Die Coexpression von Chaperonen wirkt als weitere Last auf die Zellen und im Falle der Fusionsproteine muss oftmals nach der Produktion das Fusionsprotein durch Restriktion vom Zielprotein abgetrennt werden, wobei es zu einer Minderung der Ausbeute kommen kann. Außerdem entstehen durch den Einsatz von Proteasen Kontaminationen und weitere Kosten im DSP (WALL & PLÜCKTHUN, 1995; NILSSON *et al.*, 1997; BANEYX, 1999; CHOI *et al.*, 2006; RARAN-KURUSSI & WAUGH, 2012).

3.3.1.3.3 Minimierung der Acetat-Akkumulation

Das Wachstum und die Proteinproduktion können entscheidend durch die Akkumulation von Nebenprodukten beeinflusst werden. Das wichtigste metabolische Nebenprodukt

bei *E. coli* ist Acetat. Acetat wird normalerweise via Acetyl-CoA, Glyoxylatzyklus und Zitronensäurezyklus verbraucht (OH *et al.*, 2002). Gebildet wird es bei hohen Temperaturen, unzureichender Versorgung mit Sauerstoff und bei Substratüberschuss (SHILOACH & BAUER, 1975; DOELLE *et al.*, 1982; BÖCK & SAWERS, 1996). Es wird angenommen, dass es durch eine Übersättigung des Zitronensäurezyklus und der Elektronentransportkette der Atmungskette durch die Kohlenstoffquelle zum Abfluss in die Nebenwege, also zum anaeroben Abbau und damit zur Bildung von Acetat kommt. Also selbst bei aeroben Bedingungen und Substratlimitierung wird durch den „Überflussmetabolismus“ Acetat gebildet (EL-MANSI & HOLMS, 1989; MAJEWSKI & DOMACH, 1990; HAN *et al.*, 1992). Verstärkt wird die Acetatbildung noch durch Wachstum über einer kritischen Wachstumsrate, die stammabhängig zwischen $0,2 \text{ h}^{-1}$ und $0,35 \text{ h}^{-1}$ liegen kann (MEYER *et al.*, 1984; EL-MANSI & HOLMS, 1989; PAALME *et al.*, 1990).

Kurzkettige organische Säuren wie Acetat führen zur Induktion regulatorisch aktiver Proteine, wodurch die Expression einzelner Gene beeinflusst wird (BLANKENHORN *et al.*, 1999; ARNOLD *et al.*, 2001). Sie inhibieren die Biosynthese von RNA, DNA, Lipiden, Proteinen und ab einer Konzentration von $1,5 - 2,0 \text{ g L}^{-1}$ auch das Wachstum (CHERRINGTON *et al.*, 1990; SHILOACH & FASS, 2005).

Technisch kann die Acetatbildung durch die Reduzierung der Kultivierungstemperatur reduziert werden. Bei niedrigeren Temperaturen werden die Aktivität intrazellulärer Proteasen und die Geschwindigkeiten der Transkription und der Translation verringert. Die Nährstoffaufnahme, der Sauerstoffbedarf, die Wachstumsrate, und damit auch die metabolische Wärmeproduktion werden reduziert. Auf diese Weise kann neben einer reduzierten Acetatbildung relativ einfach eine Steigerung der Ausbeute und der Löslichkeit des heterolog produzierten Proteins erreicht werden (SCHEIN, 1989; LEE, 1996; MAKRIDES, 1996; PALOMARES *et al.*, 2004; PAPANEOPHYTOU & KONTOPIDIS, 2014).

Alternative Kohlenstoffquellen zu verwenden stellt eine weitere einfach umsetzbare Möglichkeit dar die Acetatbildung zu minimieren. Glucose reprimiert den Glyoxylatzyklus und stimuliert damit direkt die Bildung von Acetat, Laktat und Formiat (CLARK, 1981). Mögliche Alternativen stellen Mannose (ANDERSEN & VON MEYENBURG, 1980), Fructose (ARISTIDOU *et al.*, 1999) und Glycerin (MÄRKL *et al.*, 1993) dar. Bei der Verwendung dieser Substrate wird die Cometabolisierung von Acetat nicht reprimiert und es kommt nicht zur Bildung von Laktat und Formiat (ARISTIDOU *et al.*, 1999; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2012).

Die Aufnahme dieser Substrate ist allerdings weniger effektiv als die von Glucose.

Fructose wird stark *feedback*-reguliert aufgenommen, demnach kann mit Fructose eine bis zu 65 % gesteigerte Proteinausbeute erreicht werden (KORNBERG, 1990; MARR, 1991). Glycerin wird passiv durch Diffusion und ATP-abhängig importiert, wodurch sich ein verlangsamtes Wachstum ergibt (WEISSENBORN *et al.*, 1992; KORZ *et al.*, 1995). Ein positiver Nebeneffekt bei der Verwendung von Glycerin als Substrat ist, dass die Plasmidstabilität verbessert wird (WARNES *et al.*, 1991).

Weiter wurde nachgewiesen, dass der Zusatz der Aminosäuren Methionin oder Glycin in ein Kulturmedium die Wachstumsrate steigern, die rekombinante Proteinproduktion verstärken und gleichzeitig die Bildung von Acetat mindern kann. Dies wird auf eine Steigerung der Atmungskapazität infolge einer Erhöhung der Konzentration eines Cytochrom-Enzymkomplexes zurückgeführt (HAN *et al.*, 1993).

Mit Mitteln der Molekularbiologie wurden bisher drei unterschiedliche Strategien verfolgt. Um die Acetatproduktion zu minimieren, wurden Mutanten mit *Pta*- oder *Ack*-Defizienzen entwickelt, in denen die Glucoseaufnahme modifiziert wurde (BAUER *et al.*, 1990; DIAZ-RICCI *et al.*, 1991; CHOU *et al.*, 1994). Um den Acetatverbrauch zu steigern wurden *fadR*-Mutanten entwickelt (Glyoxylatzyklus-Repressor-Peptide) (FARMER & LIAO, 1997). Eine weitere Strategie basiert auf der Umwandlung von Pyruvat in andere Substanzen wie Acetolaktat, Acetoin und Aceton durch Enzyme aus *Bacillus* und *Clostridium*, welche in *E. coli* heterolog coproduziert werden (ARISTIDOU *et al.*, 1994; BERMEJO *et al.*, 1998).

3.3.1.4 Plasmidstabilität und Selektionsdruck

Der Plasmiderhalt stellt für die Wirtszelle eine metabolische Bürde dar, die die Wachstumsrate und die Viabilität beeinträchtigen kann (Ow *et al.*, 2006). Mit einer zunehmenden Generationszahl wird deswegen die genetische Stabilität des Produktionssystems immer wichtiger. In Hochzelldichtekulturen kommt es mit Antibiotikaresistenz-basierten Plasmidsystemen neben chromosomalen Mutationen deswegen oft auch zu einem verstärkten Plasmidverlust und damit zu einem Überwachsen der Kultur durch plasmidfreie Bakterien. Außerdem besteht bei der Verwendung von Antibiotika immer ein Risiko das Produkt zu kontaminieren. Als Folge dieser Veränderungen wird die heterologe Proteinausbeute verringert (VETHANAYAGAM & FLOWER, 2005; SEVASTSYANOVICH *et al.*, 2009). Der Einsatz von Antibiotika ist zusätzlich auch mit hohen Kosten verbunden, weswegen diese Konstrukte nur schlecht industriell skalierbar sind (DURANY *et al.*, 2005).

Neben dieser traditionellen Herangehensweise werden auch andere Mechanismen eingesetzt, um einen Selektionsdruck aufzubauen. Sehr populär sind bspw. PSK-Mechanismen (engl.: *post-segregational killing*), die von natürlich vorkommenden Plasmiden stammen. Der Selektionsdruck basiert dabei auf einer Wechselwirkung zwischen einem chromosomal integriert Toxin und dem zugehörigen auf einem Plasmid codierten Antitoxin, dessen Halbwertszeit kürzer ist als die des Toxins. Wird das Plasmid verloren wird die Zelle aufgrund des fehlenden Antitoxins getötet (DURANY *et al.*, 2005). PSK-Systeme steigern jedoch nicht die Plasmidstabilität, liefern aber einen zusätzlichen Vorteil bei der Plasmid-Plasmid-Kompetition in bakteriellen Populationen (COOPER & HEINEMANN, 2000). Etablierte Systeme sind beispielhaft das Hok/Sok-System (GERDES *et al.*, 1986), das RM-System (Restriktionsmodifikation) (HANDA & KOBAYASHI, 1999) und das CcdB/CcdA-System (SZPIRER & MILINKOVITCH, 2005).

Ein weiterer, seit einiger Zeit angewandter Mechanismus ist die Auxotrophie. Ein Plasmid trägt hierbei ein Gen, dessen Produkt die Auxotrophie komplementiert. Wird ein solches System verwendet muss allerdings die Zusammensetzung des verwendeten Mediums verändert werden (DURANY *et al.*, 2005).

Weitaus komplexer sind Systeme die auf RNA-RNA-Interaktion basieren. In Gegenwart des Plasmids wird die Expression eines Repressors durch RNA-RNA-*antisense*-Interaktion inhibiert. Geht das Plasmid – und damit die Inhibierung – verloren, wird die Expression eines essentiellen Gens durch diesen Repressor herabgesetzt (PFAFFENZELLER *et al.*, 2006; LUKE *et al.*, 2009).

Bei sogenannten Operator-Repressor-Titrations-Systemen (ORT) werden für das Überleben der Zellen wichtige Gene wie *dapD* (CRANENBURGH *et al.*, 2001), *infA* (HÄGG *et al.*, 2004) oder für Antibiotikaresistenzenzyme codierende Gene auf dem Chromsom unter die Kontrolle eines *lac*-Promotor/Operator-Systems gestellt. Dadurch können sich die Bakterien nur dann vermehren und wachsen, wenn der konstitutiv produzierte Inhibitor „LacI“ durch einen passenden Induktor „titriert“ wird und damit der *lac*-Promoter induziert wird. Bei einer Variante dieser Technik werden die Zellen mit einem *multi-copy*-Plasmid transformiert, welches die *lac*-Operatorsequenz beinhaltet. Das Vorhandensein dieser Sequenz ist dann ausreichend für eine Derepression des Inhibitors, das chromosomale *lac*-Promotor/Operator-System wird weniger stark inhibiert und die Produktion eines zusätzlichen Proteins ist nicht mehr notwendig. Dadurch wird der Metabolismus von *E. coli* entlastet (WILLIAMS *et al.*, 1998).

Die Plasmidstabilität ist aber auch stammabhängig, was am Beispiel des BL21 *recA*-

Mutanten *E. coli* BLR gezeigt werden kann. Das Genprodukt von *recA* ist an der DNA-Reparatur und an homologen Rekombinationsvorgängen beteiligt. Ein Vergleich mit BL21 zeigte, dass 4 h nach der Induktion der Anteil Plasmid-besitzender BL21-Bakterien von 87 % auf 0 % sank, während BLR bei 100 % blieb (TAKAHASHI & NORDÉN, 1994; ZHAO *et al.*, 2007).

Ein sehr ähnlicher Effekt wird durch die Insertion der *cer*-Sequenz in Plasmide erzielt, welche dem ColE1-Plasmid entstammt und zwingend für Rekombinationen erforderlich ist. Liegen Plasmide ungetrennt als Multimer vor, kommt es zur sogenannten „Dimerkatastrophe“. Dabei entstehen bei der Zellteilung plasmidfreie Zellen. Durch Rekombination werden diese Multimere in Monomere getrennt, wobei als Nebeneffekt die Plasmide in einer höheren Kopienanzahl vorliegen können (SUMMERS & SHERRATT, 1984; SUMMERS *et al.*, 1993).

Alternativ zu plasmidbasierten Systemen ist es natürlich möglich das zu exprimierende Gen chromosomal zu integrieren. Die Aubeute dieser Produktionssysteme ist dann zwar mit der Anzahl der integrierten Kopien linear steigerbar (höhere Gendosis), reicht allerdings nicht an die mit auf Plasmiden basierenden Systemen erreichten Ausbeuten heran (CHEN *et al.*, 2008).

3.3.2 Prozessentwicklung

Die Kultivierung von *E. coli* zu hohen Zelldichten ist durch diverse chemische, physikalische und biochemische Faktoren limitiert. Das Wachstum von *E. coli* ist abhängig von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Magnesium, Kalium, Eisen, Mangan, Zink, Kupfer und einigen Wachstumsfaktoren. Hohe Konzentrationen dieser Medienbestandteile können das Wachstum aber inhibieren (GUNSALUS & STANIER, 1960; STUDIER, 2005). Ein definiertes Medium mit den maximalen nicht inhibierenden Konzentrationen aller Nährstoffe ergäbe so eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 15 g L^{-1} (LEE, 1996).

Kritisch ist auch die Versorgung der dichten Kulturen mit Sauerstoff. Aber nicht das bloße Angebot von Sauerstoff ist entscheidend. *E. coli* kann nur bis zu einer bestimmten Maximalgeschwindigkeit Sauerstoff verbrauchen ($15 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$); und diese Sauerstoffverbrauchsrate korreliert mit der kritischen Wachstumsrate und ist ein wichtiger Einflussfaktor auf die Acetatproduktion (BAUER & ZIV, 1976; VARMA & PALSSON, 1994). Mit zunehmender Zelldichte nimmt neben dem Sauerstoffbedarf auch die Viskosität des Mediums zu, was den Sauerstoffeintrag zusätzlich erschwert. Ab einer Biotrockenmas-

sekonzentration von ca. 220 g L^{-1} verliert die Kulturbrühe ihre Fließfähigkeit komplett (LEE, 1996). Der aktuelle Biomassekonzentrationsrekord liegt bei 190 g L^{-1} und konnte nur durch ausgefeilte Kulturtechniken erreicht werden (NAKANO *et al.*, 1997; FUCHS *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang ist *E. coli* als gram-negatives Bakterium aber durch seine äußerst geringe Xerotoleranz limitiert. *E. coli* toleriert einen minimalen a_W -Wert (Wasseraktivität) von 0,96. Hefen und filamentös wachsende Pilze tolerieren im Gegensatz dazu a_W -Werte bis zu 0,87 respektive 0,60 (KRÄMER, 2011).

3.3.2.1 Verfahren der Hochzelldichtekultivierung

Die Entwicklung der Hochzelldichtetechniken geht bis in die 30er-Jahre zurück. Heute sind die *fed-batch*-, Dialyse- und Perfusionstechniken die am häufigsten verwendeten Strategien.

In *fed-batch*-Prozessen wird über den Volumenstrom des *feed*-Mediums (\dot{V}_F) die Wachstumsrate unterhalb des kritischen Werts (μ_{krit}) eingestellt (RIESENBERG, 1991; LEE, 1996). Maximal können so – abhängig von der Substratkonzentration im *feed*-Medium und \dot{V}_F – Wachstumsraten zwischen $0,14 \text{ h}^{-1}$ und $0,17 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden, bevor es zu einer verstärkten Acetatbildung kommt (KORZ *et al.*, 1995). In Komplexmedien kann die Acetatbildung durch *E. coli* nicht effektiv unterdrückt werden, weswegen die kritischen Wachstumsgeschwindigkeiten hier niedriger sind (FIESCHKO, 1989). Aus diesem Grund werden für Hochzelldichtekulturen definierte Medien verwendet, durch die die Produktivität und die Reproduzierbarkeit dieser Verfahren gesichert werden.

Bereits die Medienzusammensetzung und -bereitung sind Teil des Prozesses. Werden Fehler bei der Präparation oder der Sterilisation des Mediums gemacht, kommt es zur Präzipitation, wodurch die Medienzusammensetzung verändert wird. Präzipitierte Salze können die *online*-Analytik und das DSP beeinträchtigen. Auch die Produktion organischer Säuren wie Acetat können zu Präzipitation führen (SHILOACH & FASS, 2005). Für die Minimierung von Präzipitation ist die Fütterungsstrategie entscheidend (PÖRTNER & MÄRKEL, 1998).

Hier wurden bereits erfolgreich konstante, stufenartig oder linear ansteigende Fütterungsraten und exponentielle *feed*-Profile genutzt, um hohe Zelldichten zu erreichen (KONSTANTINOV *et al.*, 1991; QIU *et al.*, 1998; BABU *et al.*, 2000; WONG *et al.*, 2003; SLETTA *et al.*, 2004). Exponentielle Fütterungsstrategien ermöglichen als einzige eine bestimmte Wachstumsrate einzustellen. Der limitierende Faktor ist dabei die Kohlenstoffquelle. Die

feed-Profile, die dafür zum Einsatz kommen basieren auf mathematischen Modellen, die das Wachstum der Kultur beschreiben (LEE, 1996; LI *et al.*, 1998).

Zusätzlich sind für die Prozessautomatisierung auch diverse *feedback*-Regulationen möglich. In der Literatur wurden für diesen Zweck die *DO*-stat-Methode (engl.: *dissolved oxygen*), die *pH*-stat-Methode, die Regulierung anhand von Abgasmessungen (*RQ* (*Respirationsquotient*), *OUR* (engl.: *oxygen uptake rate*), *CER* (engl.: *carbon dioxide evolution rate*), der Biomasse und der Substratkonzentration beschrieben (ZABRISKIE & HUMPHREY, 1978; RIESENBERG *et al.*, 1990; LEE, 1996; RIESENBERG & GUTHKE, 1999; EL-MANSI *et al.*, 2011; HEINRICH *et al.*, 2011).

Das *fed-batch*-Verfahren wurde auf verschiedene Weise weiter entwickelt. Bei temperaturlimitierten *fed-batch*-Prozessen („TLFB“) wird der Sauerstoffverbrauch weniger über den Substrat-*feed* als vielmehr über ein graduell abnehmendes Temperaturprofil kontrolliert. Zwei dadurch eingeleitete Mechanismen führen mit dieser Technik zu einer Ausbeutesteigerung. Zum einen wird die proteolytische Aktivität im Cytosol bei niedrigen Temperaturen gesenkt, zum anderen werden durch die Verringerung des Zelltods bei niedrigen Temperaturen weniger Proteasen in das Medium abgegeben, wodurch die Proteolyse weiter gesenkt wird und weniger Endotoxine freigesetzt werden (JAHIC *et al.*, 2003). Für die Produktion von Proteinen in das Periplasma können TLFB-Prozesse einen entscheidenden Vorteil bieten. Die Stabilität der Zellmembranen gegenüber osmotischem Druck nimmt mit sinkender Temperatur zu, wodurch einer Verunreinigung des Periplasmas durch Cytoplasmaproteine und DNA entgegengewirkt wird (HAN & ZHONG, 2003; SVENSSON *et al.*, 2005).

Bei der Accelerostatentechnik handelt es sich um eine Kombination des *fed-batch*-Verfahrens mit Techniken der kontinuierlichen Kultur. Im Gegensatz zu kontinuierlichen Kulturen werden – um eine hohe Zelldichte zu erreichen – die Verdünnungsrate verändert und die Zellen zurück gehalten (PAALME *et al.*, 1995). Dabei kommt es zu einem stetigen Austausch von Medium.

Das Konzept derartiger Dialyse- oder Perfusionsreaktorführungen wurde erstmals durch GERHARDT & GALLUP (1963) demonstriert. In Dialyse-, Perfusions- und Accelerostat-Prozessen können mit Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen $0,35\text{ h}^{-1}$ und $0,48\text{ h}^{-1}$ schneller hohe Zelldichten erreicht werden als mit dem *fed-batch*-Verfahren (PAALME *et al.*, 1997; VEMURI *et al.*, 2006). Das Dialyseverfahren unterscheidet sich von dem Perfusionsverfahren dadurch, dass die Zellen durch eine semipermeable Membran zurückgehalten werden und die Abreicherung von schädlichen Nebenprodukten entlang eines Kon-

zentrationsgradienten mit einer Dialyseflüssigkeit stattfindet. Im Perfusionsverfahren, wird das Medium vollständig ausgetauscht. Die Filtermodule können hierfür innerhalb oder außerhalb des Reaktors in einem *loop* installiert werden. Da die Betriebskosten bei diesen Verfahren sehr hoch sind, werden sie eher in der Zellkultur eingesetzt als bei Mikroorganismen (MÄRKL *et al.*, 1993; SHILOACH & FASS, 2005; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008). Bei allen erwähnten Verfahren lässt sich um den wachsenden Sauerstoffbedarf zu decken der Kopfraumdruck erhöhen (STRANDBERG & ENFORS, 1991). Wird der Druck im Reaktorraum erhöht, steigt die *OTR*. Gleichzeitig nehmen allerdings der $k_L a$ -Wert ab (LOPES *et al.*, 2013) und die CO_2 -Löslichkeit zu. CO_2 dient *E. coli* normalerweise als ein Substrat für Carboxylierungsreaktionen in wichtigen metabolischen Zyklen. Bei der Erhöhung des Kopfraumdrucks wird jedoch das meiste produzierte CO_2 im Medium angereichert. Die tatsächliche Konzentration hängt dann von der Begasungsrate ab, wodurch ein Teil des CO_2 wieder verdrängt wird (ONKEN & LIEFKE, 1989). CO_2 beeinflusst ab einem Partialdruck von $>0,304$ bar das Wachstum der Zellen und stimuliert die Acetatbildung (PAN *et al.*, 1987). Es wurde berichtet, dass bei Drücken bis 4 bar eine Verringerung der maximal erreichten Zelldichten auftritt (BELO & MOTA, 1998). Hohe CO_2 -Konzentrationen sind außerdem in der Lage den pH-Wert im Medium zu senken (HANNIG & MAKRIDES, 1998).

Bei Hochzelldichtekultivierungen wird über traditionelle pH-Korrekturmittel wie HCl und NaOH die Salzfracht im Medium erhöht. Der erhöhte osmotische Druck und die gesteigerte Leitfähigkeit beeinflussen das Membranpotential der Bakterien und können Stressmechanismen auslösen, die die Wachstumsgeschwindigkeit bis zur Terminierung des Wachstums reduzieren können (WINZER *et al.*, 2002). Deswegen wird der pH favorisiert mit Ammoniaklösungen statiert. Hierüber kann zusätzlich auch die Stickstoffversorgung erfolgen. Allerdings sollte eine Überversorgung mit Ammonium vermieden werden, da hierdurch das Wachstum inhibiert werden kann. Für diesen Zweck werden NIR-Technologien als *feedback*-Kontrolle bereits erfolgreich eingesetzt. Abhängig von den gemessenen Ammoniumkonzentrationen wird Ammoniak temporär als pH-Titrationsmedium durch NaOH ersetzt (JENSEN & CARLSEN, 1990; RIESENBERG, 1991; LEE, 1996; MACALONEY *et al.*, 1996).

3.3.2.2 Induktionsstrategie

Zur Maximierung der Proteinproduktion ist es oft sinnvoll die Wachstumsphase von

der Produktionsphase zu trennen (CHOI *et al.*, 2006). Ursächlich hierfür ist, dass die künstlich herbeigeführte Proteinüberproduktion eine metabolische Last darstellt und Stress auf die produzierende Zelle ausübt. Durch eine verzögerte Induktion werden die Plasmidstabilität verbessert und die Produktausbeute gesteigert (CHOI *et al.*, 2006; PEUBEZ *et al.*, 2010).

Generell kann es nach einer starken Induktion durch den schlagartig steigenden Bedarf für die Proteinproduktion zu einer Erschöpfung der Energie-, Kohlenstoff- und Aminosäure-pools kommen. Die Produktion des zusätzlich benötigten ATPs ist eine der Hauptfunktionen der Acetatsynthese, weswegen es gleichzeitig zu einer starken Acetatproduktion kommt (HAHM *et al.*, 1995; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008). Um dieser Acetatproduktion entgegenzuwirken, können Hungerphasen vor und nach der Induktion eingeführt werden (FAULKNER *et al.*, 2006), in denen keine Fütterung erfolgt. Nach der Glucosedepletion erfolgt eine diauxische Acetatkonzumtion, wodurch inhibierende Acetatkonzentrationen verhindert werden (NAMDEV *et al.*, 1993).

Bei der Produktion von Proteinen ist der Induktionszeitpunkt neben der Proteinausbeute auch ausschlaggebend für die spezifische Produktivität (HELLMUTH *et al.*, 1994). In der stationären Phase werden verstärkt Proteasen produziert, wodurch die heterologen Ausbeuten gesenkt werden. Deswegen empfiehlt sich die Wahl eines Induktionszeitpunkts in der Mitte der Wachstumsphase (YILDIR *et al.*, 1998; STUDIER, 2005; GRÄSLUND *et al.*, 2008). Die Optimierung der Induktorkonzentration, des Induktionszeitpunktes und des Produktionszeitraums muss für jeden Prozess empirisch erfolgen (YIM *et al.*, 2001; PALOMARES *et al.*, 2004). Unter optimalen Bedingungen lassen sich bei hohen Zelldichten Anteile von 30 – 50 % des heterologen Proteins am Proteinanteil der gesamten Zelle erreichen (RIESENBERG, 1991).

Das *feed*-Profil nach der Induktion – also in der Proteinproduktionsphase – ist ebenfalls ein strategisch wichtiger Bestandteil der Prozessentwicklung, um die Effizienz der Produktion zu optimieren (WONG *et al.*, 2003). Es gibt für die Produktion eines jeden Proteins eine in einem Produktionssystem optimale niedrige Wachstumsgeschwindigkeit. Durch das verlangsamte Wachstum haben die Proteine mehr Zeit für eine korrekte Faltung. Es wird also nicht die Produktkonzentration, sondern die Aktivität des Proteins gesteigert (HELLMUTH *et al.*, 1994; GILL *et al.*, 2000). Für eine optimale Produktion wird ein exponentielles *feed*-Profil empfohlen (JUNG *et al.*, 1988).

Zweistufige *repeated-fed-batch*-Prozesse, bei denen die Produktion in einem vom Anzuchtreaktor unabhängigen Bioreaktor stattfindet, sind eine der aktuellsten Entwicklungen in

der Biotechnologie. Dabei wird ein Teil der Biomasse vor der Induktion zurückgehalten und für eine weitere Kultivierung bis zur Produktionsdichte verwendet, während parallel mit dem entnommenen Volumen Protein produziert wird. Auf diese Art und Weise lassen sich Faktoren wie der pH-Wert und die Temperatur in der Produktion unabhängig von der Kultivierung optimal einstellen. Dadurch lässt sich die volumetrische Ausbeute sogar noch weiter steigern (CHANG *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 2001).

4 Experimenteller Teil

Für die vorliegende Dissertation wurden Arbeiten im Rahmen des Projektes „P46 – Optimierung der biokatalytischen Herstellung von Phloretin“ bearbeitet. Es handelte sich um ein Folgeprojekt zu Projekt „P19 – Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“. Beide Projekte wurden im BOKKATALYSE2021-Cluster durch das Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Die zu bearbeitenden Arbeitspakete ließen sich allgemein in zwei Bereiche unterteilen. Proteinchemische und molekularbiologische Untersuchungen, sowie die Entwicklung von Produktionsstämmen wurde durch den Kooperationspartner Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bornscheuer, Institut für Biotechnologie und Enzymkatalyse (BEC)) durchgeführt. Der Part der Bioprozessentwicklung wurde durch die Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Scheper, Institut für Technische Chemie (TCI)) in enger Kooperation mit dem Industriepartner und Projektkoordinator Symrise AG (Holzminden, Deutschland) bearbeitet. Die Arbeiten des TCI bilden die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Zu Beginn der Arbeiten waren bereits alle grundlegenden Bestandteile des biotechnologischen Prozesses zur Produktion einer Auswahl von Flavonoiden patentiert (HILMER *et al.*, 2012). Bei dem Ursprungsorganismus der verwendeten Enzyme handelt es sich um das gram-positive gastrointestinal-Bakterium *Eubacterium ramulus*, welches in der Lage ist verschiedene Flavonoide zu metabolisieren (SCHNEIDER & BLAUT, 2000). Eine weitere Metabolisierung des als Produkt interessanten Phloretins durch *E. ramulus* konnte jedoch nicht verhindert werden (SCHMIDT *et al.*, 2010). Da bei der Kultivierung von *E. ramulus* strikt anaerobe Bedingungen einzuhalten sind, ist dieser Mikroorganismus nur unter großem Aufwand für einen Ganzzellbiotransformationsprozess nutzbar (JONCZYK *et al.*, 2011, 2013). Die Enzyme Chalkonisomerase (CHI) und Enoatreduktase (ERed) wurden im Vorgängerprojekt nach einer Vollgenomsequenzierung von *E. ramulus* und durch Abgleich der Peptidsequenzen mit dem Genom identifiziert (GALL *et al.*, 2014; THOMSEN *et al.*, 2015) und in einen *Escherichia coli*-Rosetta-Produktionstamm kloniert. Bei der verwendeten Chalkonisomerase handelte es sich um die erste bekannte bakterielle CHI (HERLES *et al.*, 2004).

Die verwendete ERed beinhaltet ein für diese Klasse von Enzymen typisches Eisen-Schwefel-Cluster-Motiv. Diese Cofaktoren machen das Protein sensitiv gegenüber Sauerstoff, weswegen die Proteinproduktion zu Beginn der Arbeiten unter anaeroben Bedin-

gungen erfolgte. Diese Vorgehensweise führte allerdings zu einer Verlangsamung der Proteinproduktion und erniedrigte somit die Effizienz der Biokatalysereaktion. Der Prozess wurde als aerober *batch*-Ganzzellbiotransformationsprozess in TB-Komplexmedium (engl. *terrific broth*) weiter entwickelt. Bei diesem Ganzzellbiotransformationsprozess fand vor der Umsetzung der Flavonoide kein Aufschluss der Zellen und keine Aufreinigung der Enzyme statt, wodurch die ERed verstärkt Sauerstoff ausgesetzt worden wäre.

Neben dieser Schwierigkeit bot der Prozess noch eine Reihe weiterer Herausforderungen. Es mussten zwei Enzyme in ausreichendem Maße in aktiver Form coproduziert werden. Das Enzym CHI stellte diesbezüglich mit einer Masse von 32,5 kDa keine Schwierigkeit für ein *E. coli*-Produktionssystem dar. Jedoch war die ERed mit ihrer molekularen Masse von etwa 74,5 kDa relativ groß (LEE, 1996). Die Prozessparameter wurden für eine maximale Ausbeute durch DoE optimiert (30 °C, 3 mM Naringenin, 0,1 mM IPTG, ~4h Biotransformation) (GRÜNERT, 2012).

Im Vorgängerprojekt war eine Enantioselektivität der CHI nachgewiesen worden. Da das Substrat Naringenin als Racemat eingesetzt wurde und durch die CHI nur enantioselektiv (+)-Naringenin umgesetzt wurde, war theoretisch nur eine Ausbeute von 50 % zu erwarten. Der postulierte Mechanismus der Biotransformationsreaktion wird in Abbildung 2 dargestellt. Darüber hinaus wurde eine ausgeprägte Substrat- und Produktinhibierung der Reaktion festgestellt (GRÜNERT, 2012), wodurch nicht die angedachten Produkttiter erreicht wurden und der Prozess nicht wirtschaftlich umsetzbar war.

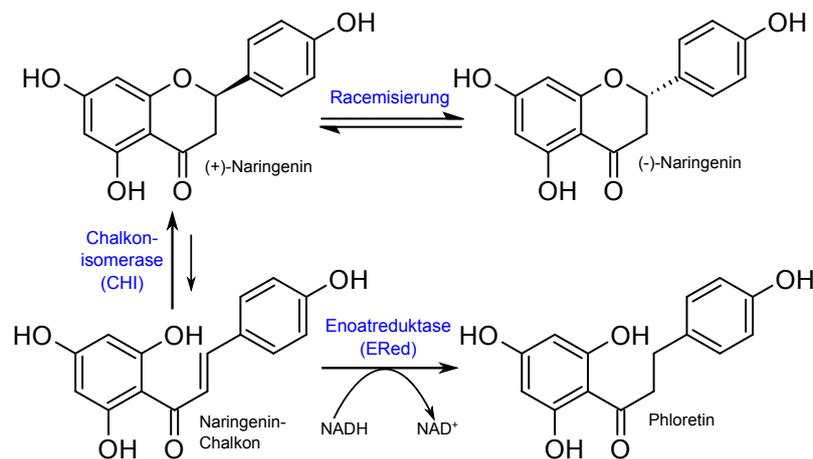


Abbildung 2: Postulierter enzymatischer Mechanismus der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin. Das Enzym Chalkonisomerase setzt enantioselektiv (+)-Naringenin um. (-)-Naringenin racemisiert zur gleichen Zeit geringfügig zu (+)-Naringenin, wodurch die Reaktion mit niedriger Geschwindigkeit weiter läuft.

4.1 Untersuchungen wirtschaftlicher und lebensmittelrechtlicher Faktoren

Bei der Entwicklung eines Prozesses ist es immer empfehlenswert möglichst nah an den späteren Prozessrealitäten zu sein. Deswegen wurde zu Beginn der Arbeiten eine Reihe von lebensmittelrechtlichen und wirtschaftlichen Aspekten betrachtet. Die Ziele dabei waren es einerseits die Prozesskosten möglichst gering zu halten und andererseits dabei die für eine Zulassung eines solchen Produktionsprozesses notwendigen Faktoren zu berücksichtigen.

4.1.1 Induktion mit Laktose

Aufgrund von lebensmittelrechtlichen Gründen war die Verwendung von Laktose anstelle von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) als Induktionsmittel wünschenswert. In Hinsicht auf die Skalierung des Prozesses in den industriellen Großmaßstab könnte man so auch die Prozesskosten verringern.

Bei der Verwendung von äquimolaren Konzentrationen von Laktose liegt allerdings praktisch weniger Induktor vor, als bei der Verwendung von IPTG, da Laktose im Gegenteil zu IPTG auch als Substrat verbraucht wird. Tatsächlich erfolgt die Induktion durch Anlagerung der Allolactose, einem Produkt der β -Galactase aus Laktose, an den *lac*-Repressor. Hierdurch wird der Operator für die RNA-Polymerase zugänglich. Dies kann potentiell zu einer Verringerung der Prozessausbeuten führen. Aufgrund dessen wurde das Induktionsverhalten des Produktionsstammes *E. coli* CHI_sERed (Der Buchstabe „s“ steht hierbei für „sequenzoptimiert“) hinsichtlich der Expression der heterologen Gene bei der Induktion mit Laktose untersucht. Zur Beurteilung der Qualität der Induktion wurde der Verlauf der mit der resultierenden Biomasse durchgeführten Biotransformation betrachtet.

Analog zum in den Vorarbeiten verwendeten Induktionsprotokoll wurde eine Konzentration von 0,1 mM Laktose eingesetzt (GRÜNERT, 2012). Die Zellen wurden in TB-Medium, bei 30 °C und mit 2 vvm Begasung (Druckluft) kultiviert. Kurz nach der Induktion bei einer optischen Dichte von 16 rel. AU wurde die Biotransformationsreaktion durch die Zugabe von 544 mg L⁻¹ (2,00 mM) Naringenin eingeleitet. Für die Flavonoidanalytik wurden Kulturbrüheproben entsprechend der unter 7.6.5 und 7.6.6 beschriebenen Protokolle mit Ethylacetat aufgeschlossen, extrahiert und für die Vermessung via HPLC aufbereitet. Die Verläufe der Konzentrationen des Substrates Naringenin und des Produktes Phloretin werden in Abbildung 3 dargestellt.

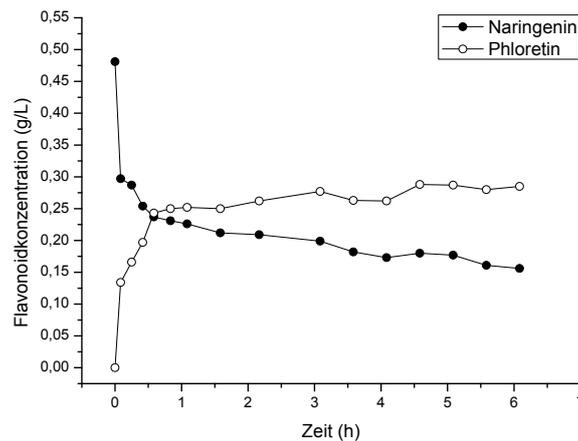


Abbildung 3: Konzentrationsverläufe bei der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin nach Induktion durch Laktose.

Nach 35 min wurde eine Phloretinkonzentration von $0,243 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, was einer Ausbeute von 50 % entsprach. Danach war eine Verringerung der Umsetzungsgeschwindigkeit zu erkennen. In den folgenden 4 h wurde die Produktkonzentration weiter auf $0,288 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert, was einer Ausbeute von 59,7 % entsprach. Danach konnte kein weiterer signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Die beobachteten biokatalytischen Prozessausbeuten und Konzentrationsverläufe der Flavonoide zeigten keine signifikanten Veränderungen gegenüber den vorhergehenden Arbeiten (GRÜNERT, 2012).

Die maximale Ausbeute wurde also auch bei Induktion mit 0,1 mM Laktose erreicht. Eine höhere Konzentration war aus diesem Grund nicht erforderlich. Damit wurde erfolgreich gezeigt, dass IPTG durch Laktose ersetzt werden konnte.

4.1.2 Untersuchung der Basalexpression in Komplexmedium

Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte *leakyness* bei einem *E. coli* Rosetta-Produktionsstamm nachgewiesen werden. Eine mögliche Basalexpression sollte deswegen auch bei dem nun verwendeten *E. coli* BL21-Produktionsstamm (CHI_sERed) untersucht werden. Dafür wurde der unter Punkt 4.1.1. beschriebene Versuch analog, aber ohne Induktion, durchgeführt. Die Konzentrationsverläufe der Flavonoide während der Biotransformation werden in Abbildung 4 dargestellt.

Bei diesem Experiment wurde nach 50 min eine Phloretinkonzentration von $0,258 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, was einer Ausbeute von 50 % entsprach. In den folgenden 3 h wurde die Produktkonzentration weiter auf $0,290 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert. Es wurde eine Ausbeute von 57,1 % erreicht. Danach konnte kein weiterer signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Eine

Induktion wäre demnach nicht notwendig. Da sich in der Kooperation diesbezüglich aber widersprüchliche Ergebnisse ergaben, wurde ergänzend ein Parallelexperiment durchgeführt. Hierfür wurde in Kooperation zwischen TCI und BEC ein harmonisiertes Protokoll entworfen und angewandt.

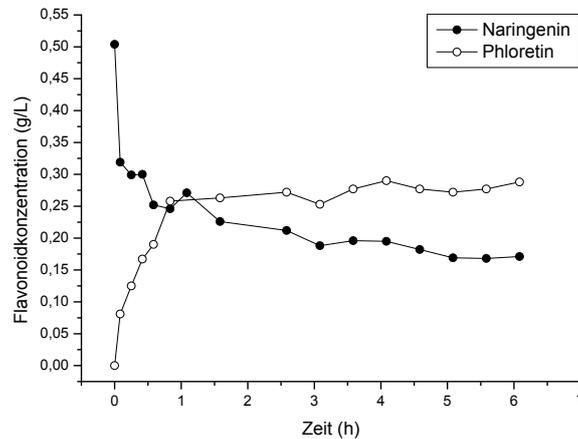


Abbildung 4: Konzentrationsverläufe bei der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin ohne Induktion.

Die erforderlichen Kultivierungen wurden jeweils in schikanierten 500 mL-Kolben, mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL, bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 Upm durchgeführt. Zwei parallele Kulturen in LB- (*lysogeny broth*) und TB-Medium wurden aus derselben LB-Vorkultur von *E. coli* BL21 CHI_sERed mit einer Animpfdichte von 0,1 rel. AU inokuliert. Die lag-Phase, die exponentielle Wachstumsphase und die stationäre Phase wurden gleichermaßen beprobt, um eine möglichst vollständige Beurteilung zu gewährleisten.

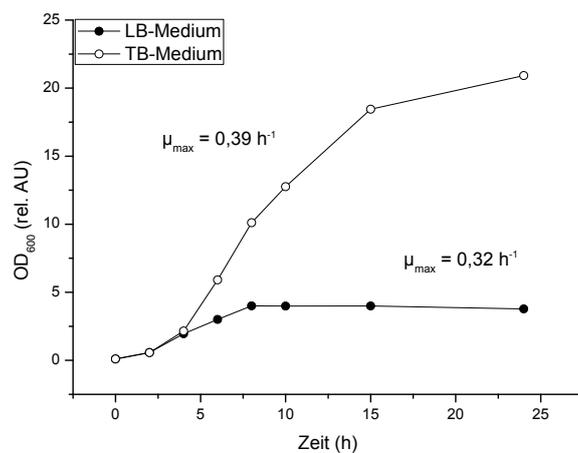


Abbildung 5: Verläufe der optischen Dichte bei 600 nm in LB- und TB-Medium.

Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, war die Proliferation der Bakterien in der LB-Kultur nach 8 h beendet. Dabei wurde eine OD_{600} von 4 rel. AU erreicht. Es wurde eine maximale spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ ermittelt.

Die Proben für die SDS-PAGE-Analytik wurden auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert. Durch die Normalisierung war die Proteinproduktion pro Zellmasse klarer ersichtlich und es ließen sich genauere Aussagen hinsichtlich Produktionsbeginn und -ausmaß treffen. Darüber hinaus wurden die Proben in unlösliche und lösliche Proteinfractionen fraktioniert (das Vorgehen wird unter 7.6.2 beschrieben). In den Proben konnte keine signifikante Proteinproduktion festgestellt werden (Abbildung 6).

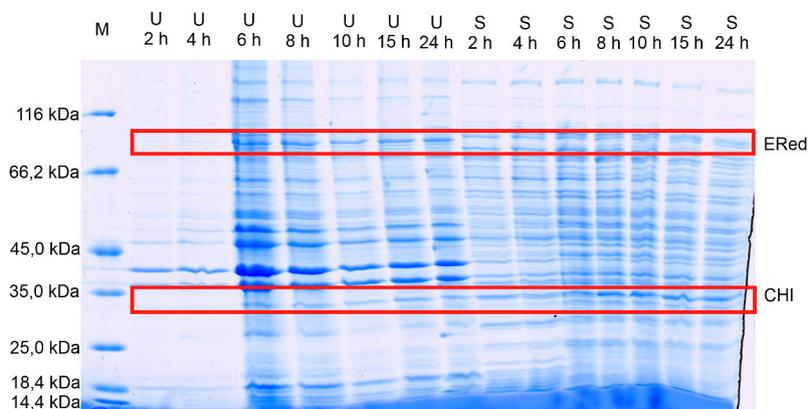


Abbildung 6: SDS-PAGE: Proteinproduktion durch Basalexpression in LB-Medium. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

Die Proliferation der Bakterien war in der TB-Kultur nach 24 h beendet (Abbildung 5). Zu diesem Zeitpunkt wurde eine OD_{600} von 21 rel. AU erreicht. Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug in dieser Kultivierung $0,39 \text{ h}^{-1}$. Die SDS-PAGE-Analytik zeigte, dass die Proteinproduktion zwischen der sechsten und achten Stunde der Kultivierungszeit einsetzte (Abbildung 7). Zuvor war keine signifikante heterologe Proteinproduktion zu erkennen. Die CHI wie auch die ERed wurden löslich und unlöslich produziert. Der Hauptanteil des heterolog produzierten Proteins fand sich in den löslichen Fraktionen. Nach 24 h war eine Verringerung der Proteinkonzentrationen zu erkennen.

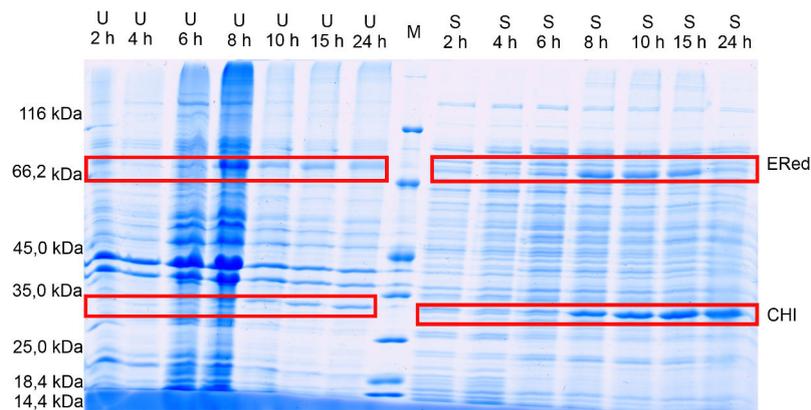


Abbildung 7: SDS-PAGE: Proteinproduktion durch Basalexpression in TB-Medium. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

Beim Vergleich mit den Experimenten zur Untersuchung des Induktionsverhaltens bei Verwendung von Laktose sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen gewesen. Die Biokatalyse verlief mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit. Auch die Ausbeute war vergleichbar. Eine Induktion war demnach nicht erforderlich. Die Ergebnisse wurden seitens BEC bestätigt. Es handelt sich bei TB-Medium um ein sehr dichtes Medium. Vermutlich war durch die Komplexmedienbestandteile ausreichend Laktose enthalten, um eine intensive Induktion hervorzurufen. Für die Durchführung des Prozesses im *batch* ist bei Verwendung von TB-Medium keine Induktion durch Zugabe von Laktose oder IPTG notwendig.

4.1.3 Untersuchung der Plasmidstabilität bei einer antibiotikafreien Prozessführung

Ein wichtiges Projektziel war es den Prozess frei von Antibiotika durchführen zu können. Einige der in Lebensmitteln nachweisbaren Antibiotika können eine Reihe von gesundheitsschädigenden Folgen hervorrufen. Dies betrifft vor allem aber Lebensmittel, die tierischen Ursprungs sind. Die potentiellen Risiken umfassen zum Beispiel die Übertragung von bakteriellen Resistenzen via interbakteriellem DNA-Transfer, das Auftreten von Allergien oder allergische Reaktionen, Karzinogenität, Mutagenität, Nephropatie, Hepatotoxizität oder Knochenmarkschädigung (DARWISH *et al.*, 2013).

Das im bearbeiteten Prozess als Selektionsdruck eingesetzte Ampicillin (bzw. Carbenicillin) stellte allerdings nicht nur aus lebensmittelrechtlicher Hinsicht ein Problem dar. Bei der Skalierung des Prozesses in den industriellen Produktionsmaßstab sind für die Expansion der Zellen verlängerte *seed trains* notwendig und es werden deutlich höhere Generationszahlen erreicht. Für die größeren Volumina sind größere Massen an An-

tibiotika notwendig. Damit wären zum einen die Prozesskosten sehr hoch und zum anderen fiele das Problem des Plasmidverlusts zunehmend stärker ins Gewicht, wodurch wiederum die Prozessausbeute sinken würde.

Mit dem Produktionsstamm *E. coli* BL21 CHI_sERed wurde untersucht inwieweit eine Prozessführung unter Antibiotikaausschluss die Prozessausbeute beeinträchtigt. Es wurden zu diesem Zweck zwei Kultivierungen im 2 L-Rührkesselbioreaktor in TB-Medium durchgeführt. Die Temperatur wurde auf 30 °C und der pH-Wert auf pH = 7 statiert. Die Begasung erfolgte mit 2 vvm Druckluft. Die Rührergeschwindigkeit wurde kaskadierend geregelt, so dass ein *DO* von 30 % nicht unterschritten wurde. In einer Kultur wurde eine Arbeitskonzentration von 100 µg mL⁻¹ Ampicillin eingestellt. In der parallel durchgeführten Kultur wurde kein Antibiotikum eingesetzt. Beide Kulturen wurden aus derselben Vorkultur identisch inokuliert. Die Biotransformation von 544 mg L⁻¹ (2,00 mM) Naringenin zu Phloretin erfolgte bei *OD*₆₀₀ = 20 rel. AU. Die Flavonoidkonzentrationsverläufe werden in Abbildung 8 dargestellt.

In beiden Fällen verlief die erste Reaktionsphase schnell. Nach 30 min wurde in der Kultur mit Ampicillin eine Phloretinkonzentration von 0,228 g L⁻¹ gemessen, was einer Ausbeute von 48,5 % entsprach. In der Kultur ohne Ampicillin wurde eine Phloretinkonzentration von 0,241 g L⁻¹ gemessen, was einer Ausbeute von 51,6 % entsprach. Im weiteren Verlauf der Reaktion (nach 6 h) wurden die Konzentration weiter auf 0,280 g L⁻¹ (mit Ampicillin) und 0,260 g L⁻¹ (ohne Ampicillin) gesteigert. Dies entsprach Ausbeuten von 59,6 % (mit Ampicillin) und 56,6 % (ohne Ampicillin).

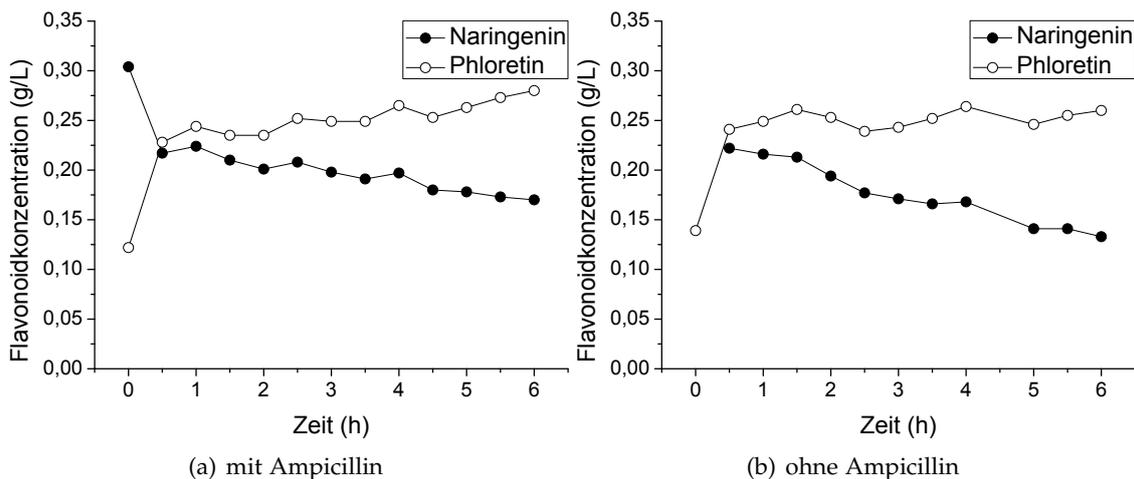


Abbildung 8: Verläufe von Biotransformationen in Biomasse, welche mit und ohne Selektionsdruck durch Ampicillin generiert wurde.

Die biokatalytischen Prozessausbeuten und die erreichten Phloretinkonzentrationen differierten zwischen den beiden Versuchen mit 3 % nur geringfügig. Eine Prozessführung ohne Antibiotika war im 2 L-Maßstab also möglich ohne den Prozess zu gefährden.

4.1.4 Untersuchung alternativer Substrat-feed-Strategien in der Biotransformation

Es wurde beobachtet, dass beim Einsatz geringer Substratkonzentrationen eine Steigerung der Ausbeute erreicht wurde. Beispielhaft wurden in den Abbildungen 9(a) und 9(b) Umsetzungen von je $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,15 \text{ mM}$) und $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,5 \text{ mM}$) Naringenin dargestellt (*E. coli* BL21 CHI_sERed).

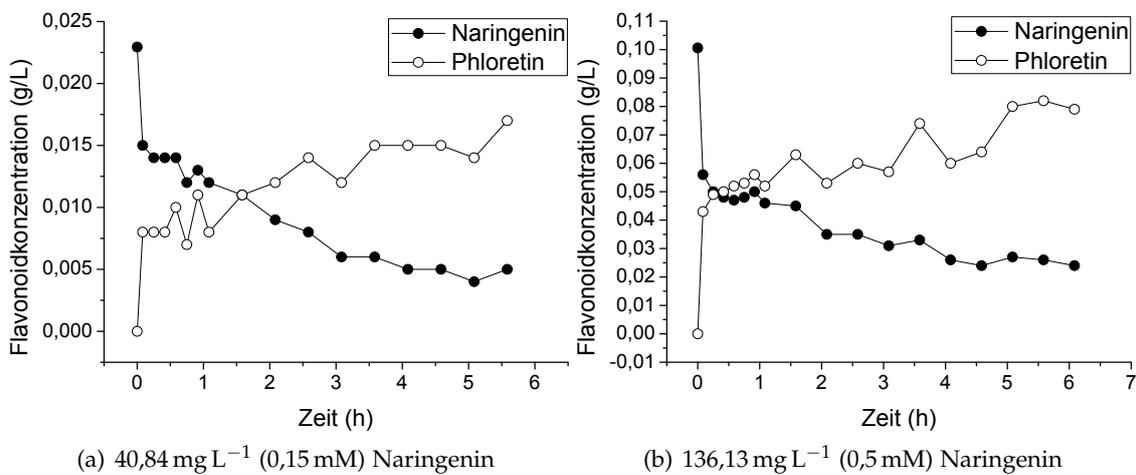


Abbildung 9: Verläufe von Biotransformationen mit niedrigen Naringeninkonzentrationen. links: $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,15 \text{ mM}$) Naringenin, rechts: $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,5 \text{ mM}$) Naringenin.

In beiden Experimenten erfolgte die initiale Umsetzung innerhalb von Minuten. Bei dem Telexperiment mit $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,15 \text{ mM}$) Naringenin wurde nach 6 h eine Ausbeute von 73,6% erreicht. Bei dem Einsatz von $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,5 \text{ mM}$) Naringenin wurde im gleichen Zeitraum eine Ausbeute von 80,9% erreicht. Demnach war eine verstärkte Umsetzung des nicht bevorzugten Enantiomers des racemisch eingesetzten Substrates möglich. In einem Zeitraum von 6 h wurde so die Ausbeute um bis zu 20,0% gegenüber Biotransformationen, bei denen 544 mg L^{-1} ($2,00 \text{ mM}$) Naringenin zugesetzt wurden, gesteigert. Diese Beobachtung wurde mit der Racemisierungsreaktion von (-)-Naringenin zu (+)-Naringenin begründet, deren Einfluss auf die resultierende Ausbeute bei geringeren Konzentrationen größer ist.

In dem im Folgenden dargestellten Experiment wurde das Substrat Naringenin stufenförmig in Intervallen zugegeben. In jedem Schritt wurden hierbei der Kulturbrühe

(Arbeitsvolumen: 2 L) nach einstündigen Biotransformationsreaktionen je weitere 544 mg Naringenin zugesetzt. Es sollte untersucht werden, ob mit dieser Herangehensweise eine Steigerung der Volumenproduktivität erreichbar war. Der Verlauf der Biotransformation wurde via HPLC analysiert; hierfür wurde die komplette Kulturbrühe (Zellen und Medium) aufgearbeitet. Die Flavonoidkonzentrationsverläufe sind in Abbildung 10 dargestellt.

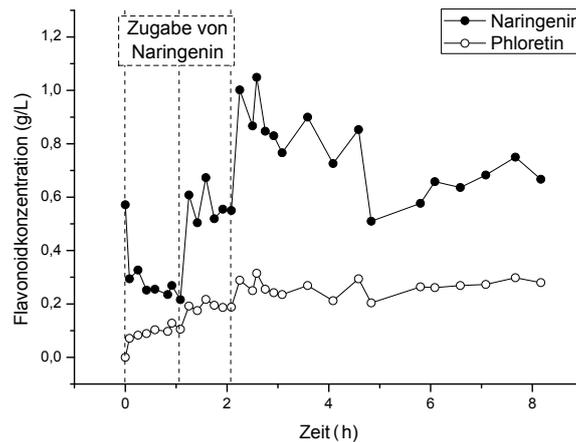


Abbildung 10: Konzentrationsverläufe bei der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin bei einer stufenweisen Zugabe des Substrates.

Nach der ersten Flavonoidzugabe wurde eine Ausbeute von 32,0 % nachgewiesen. Nach der zweiten Naringeninzugabe ergab sich eine Ausbeute von 21,9 % in Bezug auf die sich additiv aus dem zugegebenen racemischen Naringenin und dem noch im Reaktor befindlichen Naringenin ergebende Konzentration. Die Ausbeute sank demnach um 10 %. Bis zum Abbruch der Reaktion, 8 h nach der dritten Naringeninzugabe wurde, in Bezug auf die Naringeninkonzentration zu Beginn der dritten Biotransformationsphase, eine Ausbeute von 16,1 % und damit ein weiterer Ausbeuterückgang um 6 % zur vorhergehenden Stufe ermittelt. Absolut ergab sich, bezogen auf die Gesamtmenge des während des Versuchs eingesetzten Naringenins, mit einer Phloretinendkonzentration von $0,298 \text{ g L}^{-1}$ (1,06 mM) eine Ausbeute von 25,8 %.

Durch die mehrfache Substratzugabe konnte keine Ausbeutesteigerung erzielt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass durch eine Akkumulation der Flavonoide im System eine limitierenden Konzentration sowohl des Substrates als auch des Produktes erreicht wurde. Ab dieser Konzentration (3 mM Flavonoide) wirkten die Flavonoide in dem Ganzzellbiotransformationsprozess inhibierend oder cytotoxisch. Eine ausgeprägte Substrat- und Produktinhibierung der Enzyme wurde durch den

Projektpartner BEC bestätigt. Da die durch ERed katalysierte Teilreaktion abhängig von NADH ist, ist zusätzlich eine Verknappung der Cofaktor-Verfügbarkeit als Begründung für die Ergebnisse denkbar, wenn NADH nicht schnell genug regeneriert werden kann. Da NADH/NAD⁺ als Cofaktor bei über 300 Redox-Reaktionen mitwirkt und verschiedene Enzyme und genetische Prozesse reguliert (BERRÍOS-RIVERA *et al.*, 2002), würde in diesem Fall allerdings nicht nur die Biotransformationsreaktion zum Erliegen kommen. Durch eine starke Verschiebung des Redoxpotentials könnte so die Viabilität der Zellen negativ beeinflusst werden, was letztendlich auch zum Abbruch der Reaktion führen würde.

Naringenin war unter den Prozessbedingungen (30 °C) bis zu einer Konzentration von 0,125 g L⁻¹ (0,46 mM) löslich. Phloretin ließ sich bis zu 0,2 g L⁻¹ (0,71 mM) in wässrigen Medien lösen. Die geringe Wasserlöslichkeit beider Substanzen ist dem hydrophoben Charakter nichtglykosylierter Polyphenole geschuldet. Im bisherigen Prozess wurden mit 544 mg L⁻¹ (2,00 mM) des als Substrat eingesetzten Naringenins und 280 mg L⁻¹ (1,00 mM) des Produktes Phloretin bereits die Löslichkeitsprodukte beider Substanzen überschritten. Der im Projekt angestrebte Produkttiter betrug 3 g L⁻¹ (11 mM Phloretin) und war demnach nur in unlöslicher Form als Suspension produzierbar.

Eine maximale Ausbeute von 50 % vorausgesetzt, müssten 6 g L⁻¹ Naringenin (22 mM) eingesetzt werden, um diese Phloretinkonzentration zu erhalten. Da bereits bei einer Flavonoidabsolutkonzentration von 3 mM die Reaktion inhibiert wurde, erwies sich dieser Titer mit dem bisherigen Prozess als nicht machbar.

4.2 Evaluierung verschiedener ISPR-Strategien

4.2.1 ISPR von Flavonoiden mit Hohlfasermodule

Um das produzierte Flavonoid oder ein Gemisch aus dem Substrat und dem Produkt aus dem Fermentationssystem zu extrahieren, wurde ein ISPR-System entworfen, welches sich aus zwei Kreisläufen zusammensetzte. Hierfür wurden Hohlfasermodule angewendet, die prinzipiell baugleich mit solchen Hohlfasermodule waren, welche für Perfusionsanwendungen genutzt werden. Als Membranmaterial wurde modifiziertes Polyethersulfon (PES) gewählt.

Das System setzte sich aus einem Lösemittel- und einem Kulturbrühekreislauf zusammen. Die Kulturbrühe wurde durch den Extrakapillarraum („ECS“) und das organische Lösemittel in der entgegengesetzten Richtung durch den Intrakapillarraum („ICS“) geleitet. Dadurch wurde ein möglichst großer Konzentrationsunterschied aufrecht erhalten. Dies

ermöglichte theoretisch eine effektivere Extraktion.

Die grundsätzliche Funktionalität des beschriebenen Prinzips konnte bereits erfolgreich vorher im Rahmen einer Masterarbeit erwiesen werden (GRÜNERT, 2012). Die dabei erreichten Extraktionsgeschwindigkeiten reichten jedoch noch nicht aus, um dieses System erfolgreich anzuwenden. Es wurden außerdem mehrere technische Probleme beobachtet. Zum einen fand ein Flüssigkeitsaustausch zwischen den beiden Kreisläufen über die Kapillaren statt, der durch eine Verringerung des molekularen *cut-offs* nicht beeinflusst werden konnte. Zum anderen wurden Verklebungen in den Modulen durch die Lösemittel beschädigt. Butanol verursachte dabei die geringsten Schäden.

Um das Hohlfaser-ISPR-System weiter zu charakterisieren, wurde im Rahmen der neuen Arbeiten eine serielle Schaltung kommerzieller Hohlfasermodule als ein Optimierungsansatz getestet. Ein Schema, welches den Aufbau dieses Systems verdeutlichen soll, ist in Abbildung 11 dargestellt.

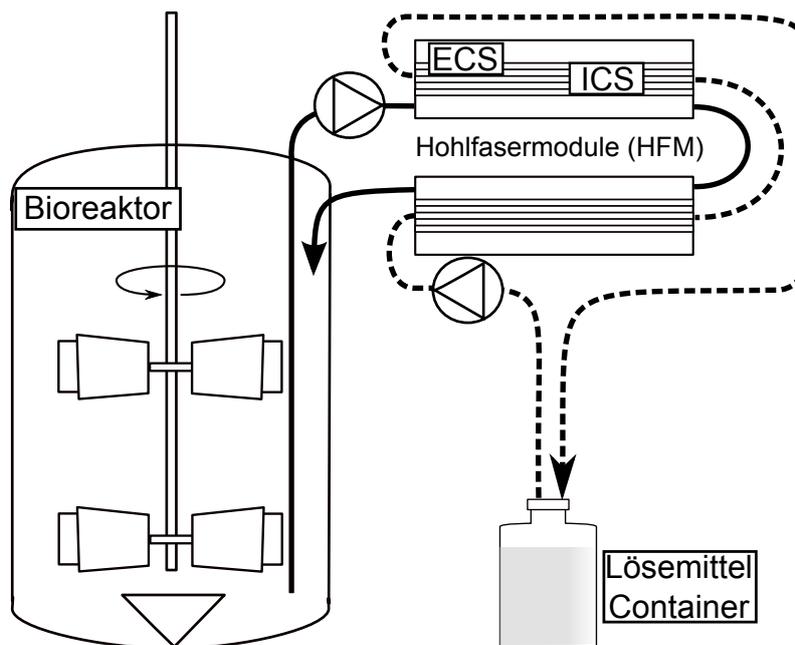


Abbildung 11: Schema eines ISPR-Systems mit seriell geschalteten Hohlfasermodulen.

Die zugrundeliegende Biotransformation wurde im 2 L-Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 2 L TB-Medium durchgeführt. Es wurden 544 mg L^{-1} (2,00 mM) Naringenin eingesetzt, um die maximale Prozessausbeute zu erreichen. Für das Experiment wurden ein kommerzielles Modul mit einem *cut-off* von 3 kDa und ein Modul mit einem *cut-off* von 10 kDa in Serie geschaltet (Spectrum Labs). Die Extraktion wurde 3,75 h nach Beginn der Biotransformation gestartet. Zu diesem Zeitpunkt konnte davon ausgegangen werden,

dass die Biotransformation beendet war. Aufgrund des Verlustes von Lösemittel in den Reaktorkreislauf musste während der Versuchsdurchführung mehrfach frisches Butanol in den Lösemittelkreislauf nachgefüllt werden. Der Butanolverlust betrug 20 mL h^{-1} . Zum besseren Verständnis wurden deswegen die absolut extrahierten Flavonoidmassen für die Analyse herangezogen (siehe Abbildung 12).

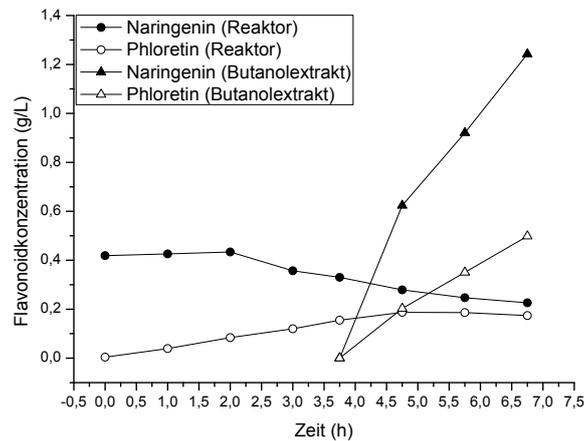


Abbildung 12: Konzentrationsverläufe der Biotransformation und der Extraktion von Naringenin und Phloretin mit seriell geschalteten Hohlfasermodule.

Die Flavonoidkonzentrationen nahmen im Extrakt vom Start der Extraktion an mit annähernd konstanten Geschwindigkeiten zu. Im Reaktor befand sich nach Abbruch des Experiments 30 % mehr Naringenin als Phloretin. Im Extrakt befand sich zu diesem Zeitpunkt 150 % mehr Naringenin als Phloretin. Daraus lässt sich schließen, dass Naringenin bevorzugt extrahiert wurde.

Naringenin wurde mit $0,036 \text{ g h}^{-1}$ ($R^2 = 0,97$) 2,44-mal schneller als Phloretin mit $0,015 \text{ g h}^{-1}$ ($R^2 = 0,99$) extrahiert. Auf die gesamte Flavonoidmasse bezogen, wurden demnach $0,051 \text{ g h}^{-1}$ extrahiert. Die serielle Schaltung der Hohlfasermodule ergab demnach in Relation zu Vorversuchen (GRÜNERT, 2012) keine Steigerung der Extraktionsgeschwindigkeit. Die Extraktion wäre theoretisch über den Versuchszeitraum hinaus fortführbar gewesen bis das Löslichkeitsprodukt beider Flavonoide in Butanol erreicht worden wäre. Eine vollständige Extraktion beider Flavonoide wäre die Voraussetzung für eine weitere Substratzugabe. Unter Annahme der erhaltenen Extraktionsgeschwindigkeiten würde eine vollständige Extraktion bei gleichem Aufbau $>15 \text{ h}$ dauern. In dieser Zeit würden die Zellen in die Absterbephase übergehen. Eine weitere Biotransformationsreaktion wäre dadurch nicht mehr möglich. Dieses ISPR-System musste deswegen verworfen werden.

4.2.2 Charakterisierung der Adsorption von Flavonoiden an Standardmembranen

Es wurden zellfreie Proben von Naringenin und Phloretin in TB-Medium mithilfe von Zentrifugalkonzentratorröhrchen filtriert (Sartorius VivaSpin®, MWCO: 30 kDa, 2 mL), die normalerweise für das Umpuffern von Proben in der chromatographischen Analytik eingesetzt werden. Die Röhrchen wiesen eine Polyethersulfon-Membran (PES) auf. Nach dem Zentrifugieren konnten im Filtrat weder Naringenin noch Phloretin nachgewiesen werden. Beide Flavonoide schienen innerhalb eines Filtrationsschrittes vollständig an den Membranen gebunden zu haben. Durch Spülen mit Ethylacetat konnte erfolgreich ein Teil der auf der Membran gebundenen Flavonoide eluiert werden. Hierdurch war die Grundlage für ein weiteres ISPR-System gegeben.

Bei der Elution wurde beobachtet, dass das in den Zentrifugalkonzentratorröhrchen verwendete Polystyrol aufgrund seiner Löslichkeit in Ethylacetat eintrübte. Da diese Kunststoffe aufgrund ihrer chemischen Beständigkeit in einer Vielzahl von Verbrauchsmaterialien standardmäßig verwendet werden, bestünde somit eine Gefahr der Verunreinigung des Produktes. Aufgrund dessen schied Ethylacetat für eine technische Implementierung aus. Dies stellt den Ausgangspunkt für die im Folgenden dargestellten Untersuchungen dar.

Die Auswahl der Membranmaterialien für die systematische Untersuchung dieser Technik fiel zum einen auf PES, da die Bindung an PES durch die oben beschriebene Beobachtung bereits erwiesen war. Da eine Bindung aufgrund der Hydrophobizität der Flavonoide möglich erschien, wurde eine HIC-Membran (engl.: *hydrophobic interaction chromatography*) mit in die Tests aufgenommen. Darüber hinaus wurde eine mikroporöse Cellulosehydrat-Membran mit kationenaustauschenden Sulfonatgruppen getestet, welche für die Bindung von Flavonen, Flavonolen, Flavanolen, Flavanonen, Flavanonolen, Anthocyanen, Proanthocyanen, Isoflavonoiden und Biflavonoiden patentiert worden war und durch Sartorius (Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde (DEMMER *et al.*, 2011).

In Vorversuchen erwies sich die statische Bindekapazitäten durch die Hydrophobizität der Membranmaterialien als schlecht bestimmbar. Die Membranscheiben schwammen auf der Oberfläche der Testlösungen, wodurch keine Durchdringung der Membran erreicht werden konnte und eine verringerte Kontaktfläche vorlag. Aus diesem Grund wurden im Folgenden nur noch dynamische Bindekapazitäten untersucht.

4.2.2.1 Membranscreening

Für eine systematische und detaillierte Charakterisierung der Membranen bezüglich der Adsorption und Elution von Flavonoiden wurde ein *high-throughput-screening-tool* eingesetzt. Es handelte sich hierbei um ein Werkzeug mit dem Membranadsorbermaterialien im 96-well-Plattenformat bezüglich optimaler Bindungs- und Aufreinigungsbedingungen untersucht werden können.

Das Werkzeug setzt sich aus mehreren Teilen zusammen, welche sandwichartig aufeinander befestigt werden. Auf eine Basis wird eine Adapterplattform gesetzt, auf welcher wiederum eine Sammlerplatte platziert wird. In dieser Platte werden die Filtrate aufgefangen. Die zu untersuchende Membran wird durch Verschraubungen zwischen zwei Rahmenteilen fixiert und gespannt. Pro Vial werden hierbei $0,565 \text{ cm}^2$ Membranfläche genutzt. Dieses Konstrukt wird auf der Sammlerplatte platziert. Das *screening-tool* wird mit einer Vakuumpumpe konnektiert. Über ein Mehrwegeventil kann das Vakuum wahlweise angelegt werden. Durch den entstehenden Unterdruck werden aufgegebene Proben durch die Membran gezogen. Der Aufbau und die Funktionsweise des Gerätes werden im Anhang unter 7.5 detailliert beschrieben.

Die Flavonoide wurden unabhängig voneinander untersucht. In den Experimenten wurde jeweils 1 mL wässriger Flavonoidlösung je Vial appliziert (Naringenin: $0,1 \text{ g L}^{-1}$; Phloretin: $0,2 \text{ g L}^{-1}$). Die Membranen waren diesen Lösungen systembedingt bis zu 10 s ausgesetzt. Die Filtrate wurden anschließend analysiert. In Abbildung 13 sind die aus den Konzentrationsdifferenzen der Testlösungen und der zugehörigen Filtrate erhaltenen Bindekapazitäten der drei Membranen dargestellt.

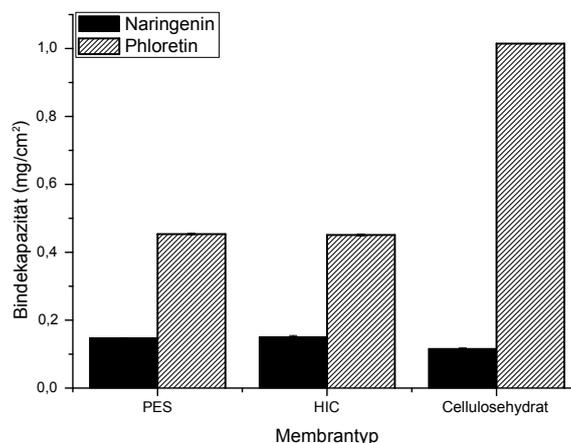


Abbildung 13: Bindekapazitäten von einer Auswahl von Membrantypen. Separate Bindekapazitäten für Naringenin und Phloretin.

Auffällig war hierbei, dass PES und HIC vergleichbare Bindekapazitäten aufwiesen. Die flavonoidspezifische Cellulosemembran band im Vergleich dazu geringfügig weniger Naringenin aber etwa doppelt so effektiv Phloretin.

Um in separaten Experimenten auch eine Elution der an den Membranen gebundenen Flavonoide zu evaluieren, wurden als potentielle Elutionsmittel Methanol, 1-Butanol, 2-Butanol und eine aus dem Patent zur o. g. Membran von Sartorius entnommene Lösemittelmischung ausgewählt (die Zusammensetzung wird im Anhang unter 6.3.4 beschrieben). Alle Lösemittel oder Lösungen sind für den Prozess einsetzbar und lebensmittelrechtlich kompatibel. Darüber hinaus sind die im *screening-tool* verbauten Materialien chemischen inert gegenüber diesen Lösemitteln.

Ergänzend zum oben beschriebenen Vorgehen (Filtration von wässrigen Flavonoidlösungen und Bindung der Flavonoide an Membranen) wurden für die Elution der im *screening-tool* an den Membranen gebundenen Flavonoide im Anschluss jeweils 1 mL Lösemittel je Vial appliziert. Die Lösemittel wurden auf gleiche Weise wie die wässrigen Flavonoidlösungen durch einen Unterdruck durch die Membranen gesogen und aufgefangen. Systembedingt betrug die Kontaktzeit bis zu 10 s.

In den folgenden drei Tabellen werden die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst. Dargestellt werden zum einen der Anteil der in den Ausgangslösungen vorhandenen Flavonoide, welcher an den Membranen adsorbierte („Adsorbiert“) und zum anderen der prozentuale Anteil der adsorbierten Flavonoide, welcher von den Membranen eluiert werden konnte („Eluiert“). Zusätzlich wurde ermittelt welchen Anteil die eluierten Flavonoide im Bezug auf die in den Ausgangslösungen angebotenen Flavonoide darstellen („Extrahiert“) (Tabellen 1,2). Jede Zeile der Tabellen stellt hierbei ein Telexperiment dar um eine durch Schwankungen in der Adsorptionseffizienz hervorgerufene Verzerrung der Ergebnisse zu verhindern.

Tabelle 1: Membranscreening: Evaluation der Extraktion (Adsorption und Elution) von Flavonoiden an einer PES-Membranen.

PES – Naringenin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	95,60	20,83	17,85
2-Butanol	94,50	26,74	25,27
Methanol	82,14	86,95	71,42
Lösemittelmischung	95,60	11,49	10,98
PES – Phloretin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	91,30	69,04	63,04
2-Butanol	91,30	64,28	58,69
Methanol	95,65	88,63	84,78
Lösemittelmischung	98,07	23,92	23,46

Tabelle 2: Fortsetzung: Membranscreening: Evaluation der Extraktion (Adsorption und Elution) von Flavonoiden an HIC- und flavonoidspezifischen Cellulosehydrat-Membranen (FCM).

HIC – Naringenin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	89,01	34,56	30,76
2-Butanol	89,01	22,22	19,78
Methanol	95,60	100,00	95,60
Lösemittelmischung	100,00	27,47	27,47
HIC – Phloretin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	97,69	0,00	0,00
2-Butanol	97,30	62,45	60,76
Methanol	100,00	78,84	78,84
Lösemittelmischung	97,30	23,32	22,69
FCM – Naringenin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	85,52	1,53	1,31
2-Butanol	84,86	2,32	1,97
Methanol	84,21	1,56	1,31
Lösemittelmischung	90,78	1,44	1,31
FCM – Phloretin			
Elutionsmittel	Adsorbiert (% von Gesamt)	Eluiert (% von Adsorbiert)	Extrahiert (% von Gesamt)
1-Butanol	98,18	22,22	3,63
2-Butanol	100,00	10,90	10,90
Methanol	100,00	0,00	0,00
Lösemittelmischung	100,00	5,45	5,45

Mit der getesteten PES-Membran wurden im Mittel 92,0 % der Naringeninmenge adsorbiert, was einer Bindekapazität von $0,15 \text{ mg cm}^{-2}$ entsprach. Für die Bindung von Phloretin wurde hierbei ein Mittelwert von 94,1 % erhalten, woraus sich eine Bindekapazität von $0,45 \text{ mg cm}^{-2}$ ergab. Mit der HIC-Membran wurden im zweiten Teil des Experiments im Mittel 93,4 % des Naringenins adsorbiert, was einer Bindekapazität von $0,15 \text{ mg cm}^{-2}$ entsprach. Phloretin wurde im Mittel zu 98,1 % adsorbiert, was ei-

ner Bindekapazität von $0,45 \text{ mg cm}^{-2}$ entsprach. Die Bindekapazitäten der PES- und HIC-Membranen unterschieden sich demnach nicht signifikant.

Für den dritten und letzten Teil des *screenings* wurde die o. g. flavonoidspezifische Cellulosehydrat-Membran verwendet. Hierbei wurden 86,35 % des Naringenins gebunden (Mittelwert), was einer Bindekapazität von $0,12 \text{ mg cm}^{-2}$ entsprach. Mit der flavonoidspezifischen Cellulosehydrat-Membran wurde dementsprechend die geringste Bindekapazität gegenüber Naringenin ermittelt. Von der angebotenen Masse an Phloretin wurden jedoch 99,7 % gebunden, was einer Bindekapazität von $1,01 \text{ mg cm}^{-2}$ und damit der höchsten gegenüber Phloretin gemessenen Bindekapazität entsprach. Damit wurde eine bevorzugte Bindung von Phloretin gezeigt.

Es fiel auf, dass sich sowohl Naringenin als auch Phloretin nur sehr schlecht wieder von der flavonoidspezifischen Membran eluieren ließen. Die Bindung schien demnach stärker als bei den PES- und HIC-Membranen zu sein, deren Interaktion nicht spezifisch war. Die Elutionslösung, deren Zusammensetzung der Patentschrift zur flavonoidspezifischen Membran entnommen wurde, war im gesamten Experiment – selbst bei der flavonoidspezifischen Membran – für die Elution beider getesteter Flavonoide wenig effizient. Hier war 2-Butanol das beste Elutionsmittel. Die flavonoidspezifische Membran war nicht für die angestrebte ISPR-Anwendung geeignet. Deswegen musste zwischen den PES- und HIC-Membranen eine Entscheidung getroffen werden.

Naringenin wurde durch 1-Butanol von der HIC-Membran um ca. 12 % besser eluiert als von der PES-Membran. Allerdings konnte mit 1-Butanol Phloretin nicht von der HIC-Membran eluiert werden. Durch 2-Butanol wurde Naringenin von der PES-Membran um ca. 5 % effektiver eluiert als von der HIC-Membran. Bezüglich Phloretin gab es bei der Elution mit 2-Butanol keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Membranen.

Bei beiden Membranen und Flavonoiden erwies sich Methanol als bestes Elutionsmittel. So wurde Naringenin durch Methanol zwar effektiver von der HIC-Membran eluiert als von der PES-Membran, das Reaktionsprodukt Phloretin jedoch konnte durch Methanol von der PES-Membran effektiver eluiert werden. Aus diesem Grund wurde für das angestrebte ISPR-System die Kombination von PES-Membran als Adsorber und Methanol als Elutionsmittel für die weiteren Experimente gewählt.

4.2.2.2 Weitere Charakterisierung von PES als Adsorber

Für eine weitere Charakterisierung des ausgewählten Systems aus PES-Membran als

Adsorber und Methanol als Elutionsmittel wurde in Hinsicht auf eine Umsetzung als ISPR-Methode das Adsorptionsverhalten von Naringenin und Phloretin separat konzentrationsabhängig und kompetitiv untersucht.

4.2.2.2.1 Kompetitive Adsorption

Für die Untersuchung einer möglichen Bevorzugung bei der Bindung der Flavonoide in Mischung, wurden drei wässrige Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen von Naringenin zu Phloretin verwendet. Für die Durchführung dieses Experiments wurden Spritzenfiltervorsätze mit einer Membranfläche von 0,785 cm² PES verwendet. 10 mL der Testlösungen wurden mit geringer Geschwindigkeit durch die Membranen geleitet, um eine möglichst lange Kontaktzeit zu erreichen.

Bei der Mischung beider Komponenten in einem Massenverhältnis von 1 : 2 (Naringenin zu Phloretin) wurden beide Substanzen zu 93 % gebunden. Bei einem Mischverhältnis von 1 : 1 wurden Naringenin zu 96 % und Phloretin zu 95 % gebunden. In dem Telexperiment in dem beide Flavonoide in einem Massenverhältnis von 2 : 1 (Naringenin zu Phloretin) gemischt wurden, wurde eine Bindungseffizienz von 93 % für Naringenin erhalten. Phloretin wurde zu 83 % in Relation zur Ausgangskonzentration gebunden.

Wie den Abbildungen 14(a) bis 14(c) zu entnehmen ist, konnte bei einer Wiederholung der Telexperimente die Bindung von Phloretin schlechter reproduziert werden als die von Naringenin. Eine signifikante Bevorzugung einer der beiden Substanzen konnte in diesen Experimenten jedoch nicht gezeigt werden.

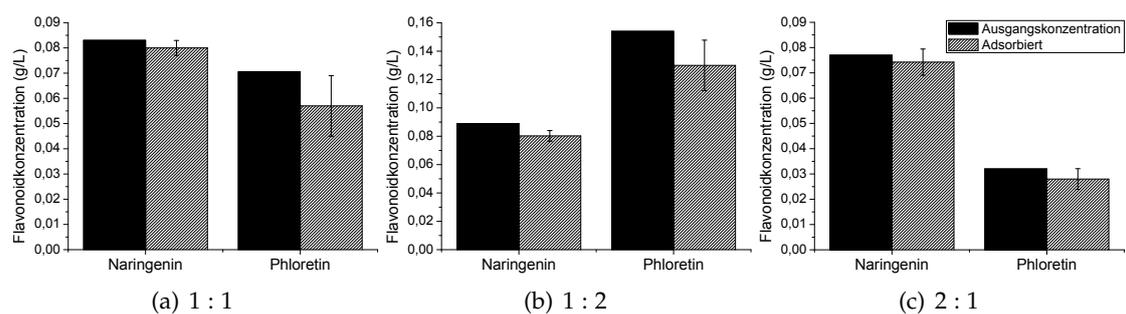


Abbildung 14: Kompetitive Adsorption von Naringenin und Phloretin an einer PES-Membran. Dargestellt wurden die Konzentration der angebotenen Lösung und die Differenz zum Permeat.

4.2.2.2.2 Untersuchung der Adsorption bei unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen

Für die weitere Untersuchung der Flavonoidadsorption an PES wurde gleich vorgegangen wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten. Es wurden erneut Spritzenfiltervorsätze mit einer Membranfläche von $0,785 \text{ cm}^2$ PES verwendet. Die Testlösungen (10 mL) wurden mit geringer Geschwindigkeit durch die Membranen geleitet, um eine möglichst lange Kontaktzeit zu erreichen (ca. 30 s). Je Flavonoid wurden fünf wässrige Testlösungen verschiedener Konzentration angesetzt. Die Adsorption von Naringenin wurde in einem Konzentrationsbereich von $0,01 - 0,10 \text{ g L}^{-1}$ untersucht. Die Adsorption von Phloretin wurde in einem Konzentrationsbereich von $0,01 - 0,20 \text{ g L}^{-1}$ untersucht. Die erhaltenen Daten sind in den Abbildungen 15(a) und 15(b) dargestellt.

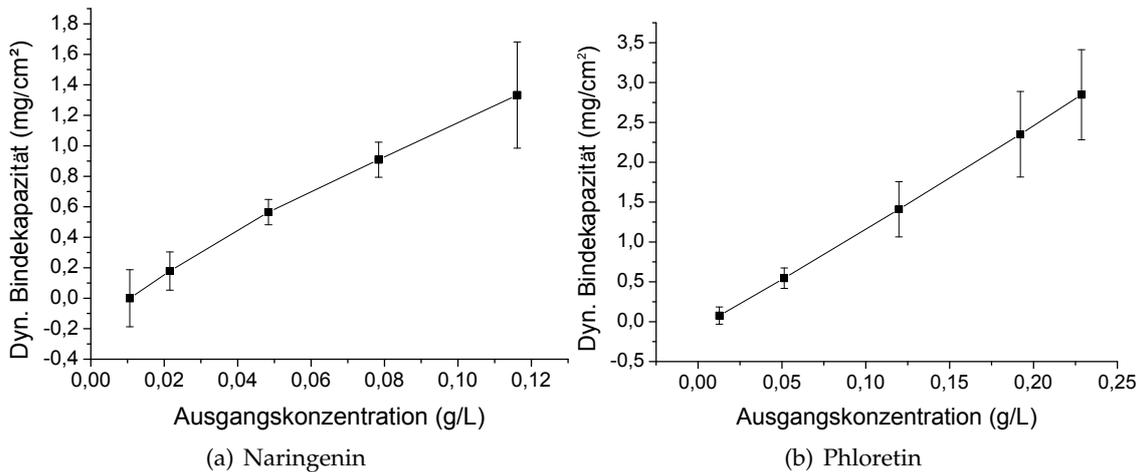


Abbildung 15: Adsorption von Naringenin und Phloretin an PES bei unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen.

Bei Flavonoidkonzentrationen $\geq 0,05 \text{ g L}^{-1}$ wurden in jedem Fall über 90 % adsorbiert. Bei geringeren Konzentrationen nahm die Adsorptionseffizienz ab und erreichte bei einer Konzentration von $0,01 \text{ g L}^{-1}$ einen Wert von 63,0 %. Phloretin wurde bei Konzentrationen $\geq 0,05 \text{ g L}^{-1}$ zwischen 1 – 8 % besser adsorbiert als Naringenin.

Bei der Auftragung der resultierenden Bindekapazitäten gegen die angebotenen Ausgangskonzentrationen fiel bei beiden Flavonoiden ein linearer Verlauf auf. Es wurde kein typisches Sättigungsverhalten erhalten. Dies deutete darauf hin, dass bei den getesteten Konzentrationen noch nicht die maximale Bindekapazität erreicht wurde. Da höhere Konzentrationen der Flavonoide bei vollständiger Lösung in Wasser jedoch nicht mög-

lich waren, müssten größere Flavonoidmengen indirekt über ein größeres Volumen der Testlösungen angeboten werden.

Durch lineare Regression der mit Naringenin erhaltenen Kurve wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,993$ die folgende Gleichung erhalten, wobei „ BK_{dyn} “ für die dynamische Bindekapazität, „ K “ für den linearen Koeffizienten und „ x “ für die angebotene Konzentration stehen:

$$BK_{dyn} = K \cdot x = 11,47 \cdot x \quad (1)$$

Durch lineare Regression der mit Phloretin erhaltenen Kurve wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,988$ die folgende Gleichung erhalten:

$$BK_{dyn} = K \cdot x = 11,62 \cdot x \quad (2)$$

Auch in diesen Experimenten konnte keine signifikant bevorzugte Bindung eines der beiden Flavonoide an die PES-Membran nachgewiesen werden. Die enzymatisch bedingte Umsetzung von lediglich 50% des racemisch eingesetzten Naringenins würde eine Extraktion aufgrund dessen nicht negativ beeinflussen.

4.2.2.2.3 Maximale Bindekapazitäten von Flavonoiden an PES

Um die maximalen Bindekapazitäten der Flavonoide an PES-Membranen zu ermitteln, wurden verschiedene Experimente mit Spritzenfiltervorsätzen (0,785 cm² Fläche) durchgeführt. Die Flavonoide wurden separat und in Mischungen aufgebracht. Dazu wurden jeweils Volumina von 50 mL wässriger Flavonoidlösung (Naringenin: 0,1 g L⁻¹ und Phloretin: 0,2 g L⁻¹) verwendet. Die Lösungen wurden fünfmal langsam durch die Membran geleitet, um eine möglichst lange Kontaktzeit zu erreichen (ca. 2 min). Damit sollten annähernd Bedingungen für die Bestimmung statischer Bindungskapazitäten erreicht werden. Anschließend wurden die gebundenen Flavonoide mit 50 mL Methanol eluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

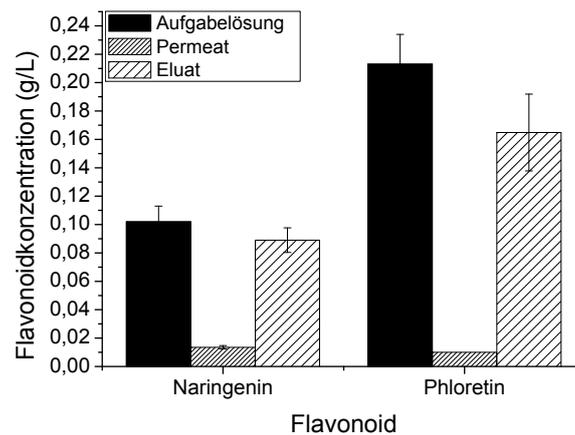


Abbildung 16: Bestimmung der statischen Bindekapazitäten. Separate Adsorption von Naringenin und Phloretin.

Für das Naringenin wurde im Permeat eine Konzentration von $0,014 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt. Daraus ergibt sich eine Adsorption des Naringenin auf PES Membranen von 86,8 % und eine maximale Bindekapazität von $5,63 \text{ mg cm}^{-2}$. Über die Elution mit Methanol konnten 100,0 % des gebundenen Flavonoids eluiert werden. Insgesamt ließen sich also 86,3 % des in der Aufgabelösung vorhandenen Naringenins wieder gewinnen.

Bei den Phloretinlösungen wurden im Permeat $0,010 \text{ g L}^{-1}$ wiedergefunden. Dies entspricht einer Adsorption von 95,3 % des Phloretins und einer maximalen Bindekapazität von $12,92 \text{ mg cm}^{-2}$. Nur 81,2 % des gebundenen Phloretins konnten im Anschluss mit Methanol eluiert werden. Damit konnten 77,4 % des Phloretins aus der Aufgabelösung wiedergewonnen werden.

Die erhaltenen Bindekapazitäten bestätigten beide in gleicher Weise die unter 4.2.2.2 beschriebenen Ergebnisse (linearer Zusammenhang zwischen Angebotener Flavonoidmasse und adsorbierter Flavonoidmasse). Dementsprechend war damit zu rechnen, dass eine weitere Bindung von Flavonoiden bei analogem Vorgehen mit noch größeren Volumina erfolgen würde. Dies sprach dafür, dass es sich im Fall der PES-Membran nicht – wie angenommen – um eine Adsorption, sondern vermutlich um eine Kristallisation infolge einer lokalen Übersättigung in der Membran-Lösung-Grenzfläche handelte.

Für die ergänzende Untersuchung der kompetitiven Adsorption wurde analog 50 mL wässriger Flavonoidlösung (Mischung aus Naringenin: $0,1 \text{ g L}^{-1}$ und Phloretin: $0,1 \text{ g L}^{-1}$) aufgetragen und mit 50 mL Methanol eluiert. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse dargestellt.

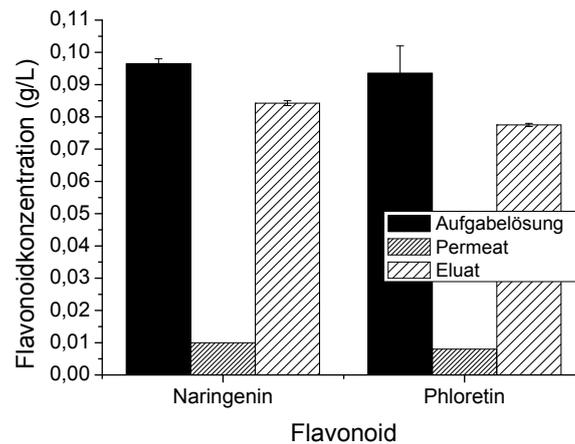


Abbildung 17: Approximation der statischen Bindekapazitäten. Kompetitive Adsorption von Naringenin und Phloretin.

Im Permeat wurde eine Naringeninkonzentration von $0,010 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt, was einer Adsorption von 89,6 % und damit einer Bindungskapazität von $5,51 \text{ mg cm}^{-2}$ entspricht. Es wurde im selben Permeat eine Phloretinkonzentration von $0,008 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt, was einer Adsorption von 91,4 % entspricht und damit eine Bindungskapazität von $5,44 \text{ mg cm}^{-2}$ ergibt. Phloretin wurde demnach von PES besser gebunden als Naringenin. Eine signifikante Bevorzugung war bei einer Differenz von 2 % jedoch nicht gegeben.

Hinsichtlich der Elution ergaben sich allerdings signifikante Unterschiede. Mit Methanol konnten in diesem Experiment 97,4 % des adsorbierten Naringenins und 90,6 % des adsorbierten Phloretins eluiert werden. Insgesamt konnten demnach 87,3 % des in der Aufgabelösung enthaltenen Naringenins und 82,9 % des Phloretins wiedergewonnen werden. Phloretin ließ sich demnach bei gleicher Adsorbatmasse mit einer um 7 % geringeren Effizienz eluieren. D. h., dass ein größeres Volumen von Methanol aufgewandt und mehrfach durch die Membran geleitet werden müsste um eine vollständige Elution zu erzielen.

4.2.3 Umsetzung und Bilanzierung des *dead-end-setups*

Auf Basis der gesammelten Ergebnisse wurden zwei mögliche technische *setups* für die ISPR-Extraktion von Flavonoiden erdacht. Es wurden ein *dead-end-* und ein *Rekuperator-setup* entwickelt. Beiden war gleich, dass flavonoidhaltiges Medium im Kreislauf durch Adsorbermodule und wieder zurück in den Reaktorraum geleitet wurde. Die Adsorbermodule sollten revolverartig geschaltet werden, um durch Binde- und Elutionszyklen einen quasi kontinuierlichen Betrieb zu ermöglichen. Der Unterschied zwischen beiden

setups bestand darin, dass im *dead-end-setup* in einem ersten Teilschritt der Kulturüberstand durch *crossflow*-Filtration von den Zellen separiert werden sollte. Das zellfreie und flavonoidhaltige Medium sollte dann durch *dead-end*-Filter-Module gepumpt werden. Im *Rekuperator-setup* sollte keine Separation der Zellen von dem Kulturüberstand erfolgen. Die Kulturbrühe würde direkt durch gewickelte Adsorbermodule gepumpt werden. Die Prozessschemata werden in den Abbildungen 18(a) und 18(b) dargestellt.

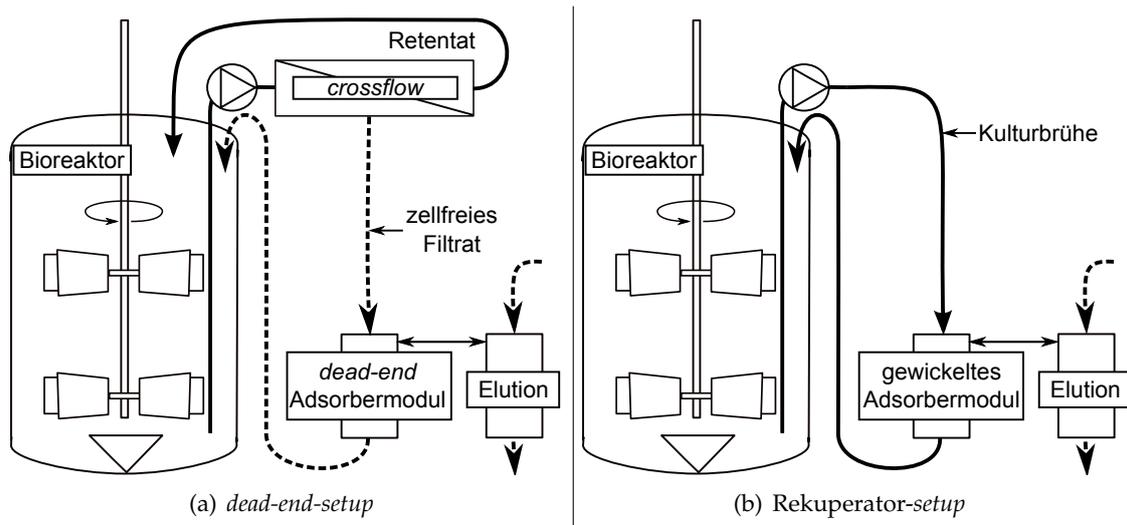


Abbildung 18: Schemata zweier konzipierter Membranadsorber-ISPR-setups.

Zur Bilanzierung der Extraktionseffizienz wurde zunächst das *dead-end-setup* experimentell umgesetzt. Bei diesem Aufbau war eine Adsorption eines Teils der Flavonoide an der *crossflow*-Membran aus Cellulose zu erwarten (Sartorius VivaFlow 200). Um diesen Aspekt in Hinsicht auf eine vollständige Bilanzierung einschätzen zu können, wurde das *dead-end-system* zunächst zellfrei getestet.

Für diesen Versuch wurden in einem 2 L-Bioreaktor beide Flavonoide in Mischung zu gleichen Konzentrationen ($0,09 \text{ g L}^{-1}$) in einem Arbeitsvolumen von 1 L Wasser gelöst. Vor der Zugabe zum Wasser wurden beide Flavonoide in diesem Experiment nicht – wie zuvor – in DMSO, sondern in 1,2-Propylenglykol vorgelöst. Die Verwendung von DMSO zur Produktion eines hochwertigen Aromastoffes war durch den Industriepartner nicht mehr gewünscht, da *E. coli* es zu DMS umsetzt, welches einen intensiven kohlrartigen Geruch aufweist. 1,2-Propylenglykol wird hingegen lediglich zu geruchsneutralen Stoffen umgesetzt und ist als Trägerlösemittel für Enzyme und Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen (BMEL & AID, 2015). Diese Umstellung erfolgte unter Berücksichtigung der unter 8.1 beschriebenen Experimente.

Während des Versuchs wurden im *crossflow*-Filtrationsschritt 50 % des Arbeitsvolumens abgetrennt. In dem im Reaktor verbliebenen Volumen wurde die Naringeninkonzentration um 75,3 % in Relation zur Ausgangskonzentration auf $0,02 \text{ g L}^{-1}$ gesenkt. Die Phloretinkonzentration wurde um 36,8 % auf $0,03 \text{ g L}^{-1}$ gesenkt. Im Permeat konnte kein Naringenin nachgewiesen werden. Die Phloretinkonzentration betrug $0,006 \text{ g L}^{-1}$. Demnach wurden insgesamt 87,7 % des in der Aufgabelösung enthaltenen Naringenins und 69,9 % des Phloretins während der *crossflow*-Filtration an der Cellulosemembran adsorbiert. Die adsorbierten Flavonoide konnten mit 250 mL Methanol in einem Schritt vollständig von der Membran eluiert werden. In der Filterreinigungslösung (0,1 M NaOH-Lösung) konnten nur noch 0,6 % des gesamten Phloretins nachgewiesen werden.

Mit identischem Aufbau wurde für einen weiteren Versuch inklusive Ganzzellbiotransformation der *E. coli*-Stamm CHI_sERed im 1 L-Rührreaktor in TB-Medium kultiviert. Die Proteinproduktion fand ohne Induktion durch Basalexpression statt. Für die Biotransformation wurde eine Naringeninstartkonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ eingestellt.

1,25 h nach der Substratzugabe waren 54,8 % des eingesetzten Naringenins zu Phloretin umgesetzt worden. Damit war die Biotransformation abgeschlossen. Es wurden – analog zum zuvor ohne Zellen durchgeführten Versuch – innerhalb von 0,75 h 0,5 L Kulturüberstand durch eine *crossflow*-Filtration abgetrennt. Dabei wurden die Zellen im Reaktor aufkonzentriert.

Entsprechend der erdachten Prozessstrategie wurde nach der Abtrennung eine weitere Biotransformation durchgeführt. Dafür wurde bis zum Ausgangsvolumen von 1 L wieder frisches Medium mit neuem Naringenin zugeführt. Auch in dieser Biotransformation wurden erfolgreich 55 % des eingesetzten Naringenins zu Phloretin umgesetzt. Der Verlauf der Biotransformationen ist in Abbildung 19 dargestellt.

Im Vergleich zu dem in Abschnitt 4.1.4 vorgestellten Versuch zu einer stufenförmigen Fütterungsstrategie ohne ISPR konnten in diesem Experiment in beiden Biotransformationsphasen höhere und vergleichbare Phloretinausbeuten erhalten werden (> 50%). Darüber hinaus verlief auch die zweite Biotransformationsreaktion mit vergleichbarer Geschwindigkeit. Es wurde beobachtet, dass die Flavonoidkonzentrationen während der *crossflow*-Filtration erhöht wurden. Vermutlich hätte ein weiterer sequenzieller Prozessschritt zu toxischen Flavonoidkonzentration geführt.

Mit dem im ersten Prozessschritt erhaltenen zellfreien Permeat wurden durch Spritzenvorsatzfilter (PES) *dead-end*-Adsorbermodule simuliert um den gesamten erdachten Prozess untersuchen zu können.

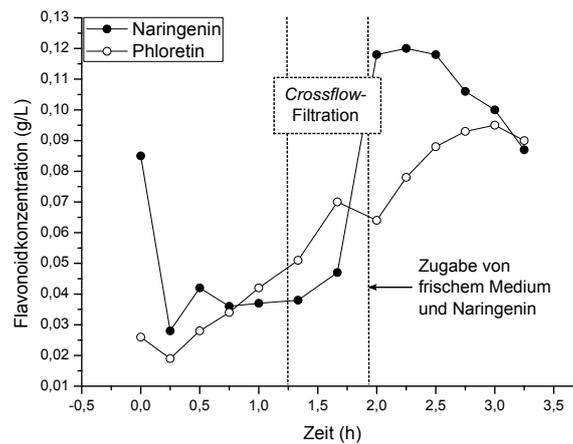


Abbildung 19: Verlauf der Biotransformation bei der Anwendung des *dead-end-ISPR-Systems*.

Im Permeat der *crossflow*-Filtration lagen lediglich geringe Konzentrationen von Naringenin vor, so dass die Adsorption an die PES-Membran (Spritzenvorsätze) wenig effizient war. Es konnten lediglich 52,2 % des im Permeat vorliegenden Naringenins adsorbiert und anschließend mit Methanol eluiert werden. Damit konnte allerdings gezeigt werden, dass das entwickelte ISPR-System mit Membranadsorption grundsätzlich funktionieren würde, wenn sich die Flavonoide in einer ausreichenden Konzentration im Kulturüberstand befänden. Dies würde erreicht werden, wenn die *crossflow*-Membran durch eine wiederholte Filtration mit Flavonoiden abgesättigt wäre.

Um weiteren Aufschluss über den Prozess zu erhalten, wurde der Verlauf des Experiments über alle Versuchsabschnitte analysiert. Für eine detailliertere Analytik und eine vollständige Bilanzierung des Experiments wurde zum einen auch die Reinigungslösung und zum anderen die Zellen getrennt vom zellfreien Kulturüberstand aufbereitet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: ISPR: Bilanzierung und Lokalisation der Flavonoidkonzentrationen bei der Anwendung des *dead-end-ISPR-Systems* (bezogen auf die erste Biotransformation).

Flavonoidfraktion		Naringenin	Phloretin
Kulturbrühe im Reaktor	Zellen	90,86 %	100,00 %
	Überstand	9,14 %	0,00 %
<i>crossflow</i> -Membran (Filtrat)		6,18 %	0,00 %
<i>crossflow</i> -Membran (Methanol-Eluat)		9,46 %	3,14 %
<i>crossflow</i> -Membran (NaOH-Waschlösung)		1,08 %	0,00 %
Spritzenvorsatzfilter (PES) (Methanol-Eluat)		3,23 %	0,00 %

Da *E. coli* keine aktiven Transportmechanismen für Flavonoide besitzt (WINTER *et al.*, 1989; DÍAZ *et al.*, 2001), muss das Naringenin passiv durch Diffusion aufgenommen werden. Die Flavonoide wurden jedoch im Experiment nicht wieder freigesetzt und akkumulierten im Cytosol. Demnach musste das zugegebene Naringenin zellintern zu Phloretin umgesetzt werden. Durch die folgende Substrat- und Produktinhibierung der Enzyme können die bis dahin erzielten Produkttiter begründet werden. Obwohl das in der Biotransformation produzierte Phloretin nicht aus den Zellen freigesetzt wurde, konnten im Experiment 3,14% des gesamten Phloretins von der *crossflow*-Membran eluiert werden. Es wurde vermutet, dass sich während der Filtration Bakterienzellen im Filter festsetzten und bei der Elution mit Methanol lysierten, wodurch das Phloretin freigesetzt wurde.

4.2.4 Untersuchung der Freisetzungskinetik von Flavonoiden aus *E. coli*

Ziel dieses Experiments war es, gezielt die Freisetzung der Flavonoide aus den Zellen nach erfolgter Biotransformation zu untersuchen. Dafür wurden alle während des Experiments entnommenen Proben in ihre Zellfraktion und den Kulturüberstand separiert analysiert. Die Verläufe der Naringenin- und Phloretinkonzentrationen in den Zellen, dem zugehörigen Volumen Kulturüberstand und der vollständigen Kulturbrühe sind in den Abbildungen 20(a) bis 20(c) dargestellt.

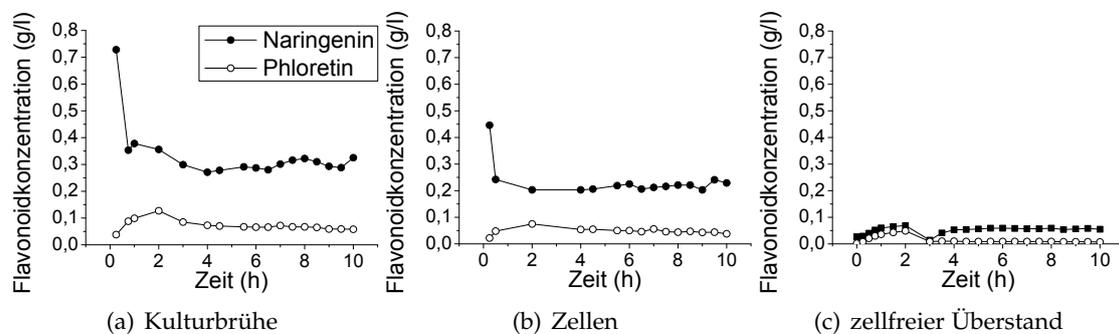


Abbildung 20: Lokalisation und Freisetzung der Flavonoide Naringenin und Phloretin während einer Biotransformation.

Zunächst wurde im 2 L-Reaktor, in einem Arbeitsvolumen von 1 L, bei 30 °C eine *E. coli*-Kultivierung in TB-Medium durchgeführt. Die Proteinproduktion fand durch Basal-expression statt. Nachdem eine optische Dichte von 15 rel. AU erreicht war, wurde Naringenin zugegeben (544 mg L^{-1} (2 mM)) und damit die Biotransformationsreaktion gestartet. Nach 2 h wurde die Reaktion abgebrochen. Am Ende der Biotransformation lagen in der Kulturbrühe eine Naringeninkonzentration von $0,356 \text{ g L}^{-1}$ und eine Phloretin-

tinkonzentration von $0,127 \text{ g L}^{-1}$ vor. Die Ausbeute der Biotransformation betrug 22,2 %. An diesem Punkt wurde zunächst angenommen, dass die Flavonoide in den Zellen akkumulierten. Die Kulturbrühe wurde vollständig entnommen und zentrifugiert (4.000 Upm , $3.488 \times \text{g}$, 20 min). Das Zellpellet wurde vom zellfreien Überstand getrennt, in 1 L frischem TB-Medium resuspendiert und wieder in den Reaktor überführt.

Beide Flavonoide lagen direkt nach dem Medienwechsel vollständig im Inneren der Zellen vor. Es wurde angenommen, dass durch die Zugabe flavonoidfreien Mediums ein Konzentrationsgradient eingestellt wurde, welcher zu der maximalen Freisetzungsgeschwindigkeit der Flavonoide aus den Zellen führen sollte. Ab diesem Zeitpunkt wurden Proben mit hoher Frequenz genommen, um die Konzentrationsverläufe detaillierter nachvollziehen zu können.

Die Phloretinkonzentration im Kulturüberstand veränderte sich über den weiteren Versuchszeitraum nicht ($0,009 \text{ g L}^{-1}$). Phloretin wurde demnach nicht freigesetzt. Die gemessene geringe Phloretinkonzentration im zellfreien Überstand war vermutlich auf geplatze Zellen zurückzuführen. Die Naringeninkonzentration nahm innerhalb einer Stunde mit einem Sättigungsverhalten zu ($0,024 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ verlangsamte sich bis zu $0,002 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bis eine Konzentration von $0,059 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Es wurden demnach 5 % des Naringenins aus den Zellen freigesetzt, was vermutlich auf die höhere intrazelluläre Konzentration von Naringenin in Relation zu Phloretin zurückzuführen war. Über den weiteren Verlauf des Experiments (6 h) wurde beobachtet, dass die Konzentrationen beider Flavonoide sanken. Diese Abnahme der Naringenin- und Phloretinkonzentrationen hing mit der bereits bekannten Instabilität beider Substanzen zusammen.

Die dem Versuch zugrundeliegenden Vermutungen der Akkumulation und der ungenügend schnellen Freisetzungskinetik konnten demnach bestätigt werden. Es wurde erkannt, dass ein Aufschluss der Zellen unumgänglich war, um die Flavonoide am Ende des Prozesses isolieren zu können. Dies erforderte ein konzeptionelles Umdenken im Projekt. Für die weitere Entwicklung wurde deswegen von dem ISPR-Konzept Abstand genommen.

4.3 Entwicklung eines Hochzelldichteprozesses mit *E. coli* SE1

4.3.1 Übertragung des Prozesses auf den *E. coli* SE1 CHI_sERed-Stamm

Durch den Kooperationspartner BEC wurde – um ein weiteres Projektziel zu erreichen – ein *E. coli*-Produktionsstamm kloniert, der ohne einen äußeren Selektionsdruck – wie etwa

durch Antibiotika – die Stabilität des Plasmids gewährleistete. Durch die Verwendung eines pStaby-Plasmidsystems, welches auf der Toxin-Antitoxin-Wechselwirkung von CcdA und CcdB basiert, wird der Prozess einfacher und kostengünstig skalierbar. Die Abkürzung „Ccd“ steht in beiden Fällen für *control of cell death* (engl.: Kontrolle des Zelltodes). CcdB ist ein Topoisomerasehemmer und ist als solches in der Lage die Zellteilung entscheidend zu inhibieren. CcdA stellt das entsprechende Antitoxin dar. Bei dem Produktionsstamm war *ccdB* im Genom und *ccdA* auf einem Plasmid codiert. Beim Verlust des Plasmids wird der Zelltod eingeleitet.

Es sollte eingeschätzt werden wie gut der bisher etablierte Prozess auf diesen Stamm übertragbar war. Es wurden hierfür Kultivierungen in TB-Medium, in einem 2 L-Rührkesselreaktor und mit einem Arbeitsvolumen von 2 L durchgeführt. In den Biotransformationen wurden je $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ (0,15 mM), $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ (0,5 mM) und 544 mg L^{-1} (2,00 mM) Naringenin eingesetzt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 21(a) bis 21(c) dargestellt.

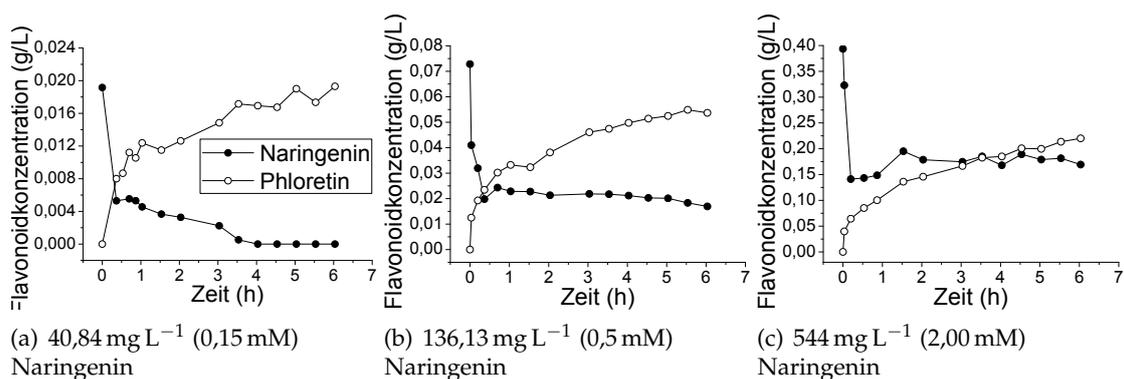


Abbildung 21: Verläufe von Biotransformationen mit niedrigen Naringeninkonzentrationen. Übertragung auf den Produktionsstamm *E. coli* SE1 pStaby™ CHI_sERed. links: $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ (0,15 mM) Naringenin, mittig: $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ (0,5 mM) Naringenin, rechts: 544 mg L^{-1} (2,00 mM).

In allen der drei Experimenten war zu beobachten, dass die initiale Umsetzung nicht wie beim zuvor verwendeten BL21-Stamm innerhalb von Minuten erfolgte. Im direkten Vergleich zu *E. coli* BL21 sind die mit SE1 erreichten Initialgeschwindigkeiten der Phloretinproduktion von $0,073 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (bei $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ (0,15 mM) Naringenin), $0,375 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (bei $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ (0,5 mM) Naringenin) und $1,194 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (bei 544 mg L^{-1} (2,00 mM) Naringenin) zwischen 387 % und 682 % geringer. Die Reaktionsgeschwindigkeit sank anschließend, bis eine Ausbeute von 50 % erreicht wurde, auf $0,041 \pm 0,010 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bei dem Telexperiment mit $40,84 \text{ mg L}^{-1}$ (0,15 mM) Naringenin wurde nach 6 h eine Ausbeute von 100,0 % erreicht, was einer Steigerung um 26 % gegenüber BL21 entsprach.

Eine vollständige Umsetzung wurde bei keinem bis dahin durchgeführten Experiment erreicht. Bei dem Einsatz von $136,13 \text{ mg L}^{-1}$ (0,5 mM) Naringenin hingegen wurde eine Ausbeute von 73,2 % und mit 544 mg L^{-1} (2,00 mM) Naringenin eine Ausbeute von 55,5 % erreicht. Die erreichten finalen Konzentrationen waren jedoch vergleichbar mit den bisherigen Ergebnissen (BL21) und bestätigten die Schlussfolgerungen bezüglich der die Reaktion limitierenden Mechanismen (siehe Abschnitt 4.1.4).

4.3.2 Biotransformation bei definierten hohen Zelldichten

Durch die bisherigen Arbeiten mit verschiedenen Biotransformations- und ISPR-Strategien konnte keine Steigerung der volumetrischen Produktivität erreicht werden. Es wurde angenommen, dass dies aber durch die Verwendung höherer Zelldichten erreicht werden könnte. Für die weitere Prozessentwicklung wurde ein STUDIER (2005) entlehntes definiertes Autoinduktionsmedium namens ZYP-31 vorgeschlagen. Um zu dem bis dahin verwendeten TB-Medium vergleichbare Ergebnisse erreichen zu können, wurde das Medium durch Modifikation seiner Zusammensetzung angepasst. Die Zusammensetzungen des modifizierten und des ursprünglichen Mediums werden im Anhang 6.3.3 beschrieben. Für die Statierung des pH-Wertes wurde die NaOH-Titrationslösung durch 10 Gew.-% NH_3 ersetzt. Dies ist bei der Verwendung von definierten Medien üblich, da Ammoniak zusätzlich zur pH-Statierung auch den Stickstoffbedarf der Kultur deckt (RIESENBERG, 1991). Durch die Modifikationen konnte reproduzierbar eine optische Dichte von ~ 22 rel. AU gewährleistet werden.

Im Experiment wurde die Kulturbrühe nach Beendigung des Wachstums steril aus dem Reaktor entnommen und die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt (4.000 Upm , $3.488 \times g$, 30 min). Mithilfe des zellfreien Kulturüberstandes wurden definierte Zelldichten von 100 und 200 rel. AU eingestellt. Auf diese Weise sollte eine Abweichung der Medienbedingungen vermieden und eine möglichst starke Nähe zu den Realbedingungen gewährleistet werden. Parallelisiert wurden in Schraubflaschen (Arbeitsvolumina von 50 und 100 mL), in einem auf 30°C temperierten Wasserbad Biotransformationen mit unterschiedlichen Naringeninkonzentrationen durchgeführt. Die Zugabe der Flavonoide erfolgte vorsuspensiert in $<1 \text{ mL}$ Propylenglykol. Durch eine tauchbare Rührplattform wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine ausreichende Durchmischung gewährleistet (600 UpM).

Da weit oberhalb der Löslichkeitsgrenzen der Flavonoide gearbeitet wurde, musste deren Extraktion aus derart komplexen Zellsuspensionen extra für diese Versuche neu etabliert

werden. Aufgrund der hohen Viskosität und Hydrophobizität war es nicht möglich die Kulturbrühe – wie üblich – für die Extraktion mit Ethylacetat zu mischen. Eine Lösung für dieses Problem wurde im Aufschluss durch osmotischen Schock gefunden. Die $10 \times$ verdünnten und aufgeschlossenen Proben wurden analog zum bisherigen Protokoll mit Ethylacetat extrahiert. Durch die Verdünnung mit reinem Laborwasser wurden bereits via HPLC messbare Konzentrationen eingestellt, sodass keine weitere Verdünnung durchgeführt werden musste.

Die bei den Experimenten erreichten Umsätze, sowie die Zeiten in denen sie erreicht wurden, werden in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Biotransformationen bei $OD_{600} = 100$ rel. AU. Bei der Biotransformation verschiedener Ausgangskonzentrationen von Naringenin erhaltene Phloretinkonzentrationen, die prozentualen Prozessausbeuten und Biotransformationszeiten.

Naringeninkonzentration		Phloretinkonzentration (g L^{-1})	Dauer der Biotransformation (h)	Ausbeute (%)
(mM)	(g L^{-1})			
2	0,544	0,254	3	46,3
3	0,817	0,356	3	43,3
4	1,089	0,357	3	32,5
5	1,361	0,361	3	26,3
6	1,635	0,455	3	27,6
7	1,906	0,368	3	19,2
10	2,725	1,170	22	42,7
20	5,445	1,280	22	23,3
30	8,168	1,305	22	15,9

Tabelle 5: Biotransformationen bei $OD_{600} = 200$ rel. AU. Bei der Biotransformation verschiedener Ausgangskonzentrationen von Naringenin erhaltene Phloretinkonzentrationen, die prozentualen Prozessausbeuten und Biotransformationszeiten.

Naringeninkonzentration		Phloretinkonzentration (g L^{-1})	Dauer der Biotransformation (h)	Ausbeute (%)
(mM)	(g L^{-1})			
2	0,544	0,293	3	53,3
3	0,817	0,653	3	79,3
4	1,089	0,655	3	59,7
5	1,361	1,170	3	85,3
6	1,635	1,008	3	61,3
7	1,906	1,032	3	53,8
20	5,445	3,050	22	55,6
30	8,168	2,850	22	34,6

Bei den Versuchen mit einer definierten Zelldichte von $OD_{600} = 100$ rel. AU wurde bei Naringeninkonzentrationen von 0 – 7 mM eine stete Abnahme der Ausbeuten beobachtet. Die Reaktionszeit wurde auf 22 h verlängert, wodurch die resultierenden Ausbeuten und Phloretinkonzentrationen zunächst erfolgreich gesteigert werden konnten. Die Ausbeuten nahmen bei höheren Substratkonzentrationen wieder ab. Bei 30 mM Naringenin wurde mit $1,3 \text{ g L}^{-1}$ die höchste Phloretinmaximalkonzentration erreicht. Unter Berücksichtigung der Biotrockenmassekonzentration von ca. 31 g L^{-1} ergab sich ein $Y_{P/X}$ von 0,041.

Mit einer definierten Zelldichte von $OD_{600} = 200$ rel. AU wurden in sämtlichen Biotransformationen höhere Ausbeuten als bei $OD_{600} = 100$ rel. AU erreicht. Die Ausbeuten und Phloretinkonzentrationen entwickelten sich bei analoger Veränderung der Biotransformationszeiten ähnlich. Bei der Steigerung der Konzentration von 20 mM zu 30 mM Naringenin wurde die Ausbeute um ca. 21 % verringert. Bei 30 mM Naringenin wurde mit $3,1 \text{ g L}^{-1}$ das Maximum der Phloretinkonzentration erreicht. Damit wurde zum ersten Mal im Projektverlauf der angestrebte Produkttiter erzielt. Unter Berücksichtigung der Biotrockenmassekonzentration von ca. 64 g L^{-1} wurde ein $Y_{P/X}$ von 0,048 erhalten, was eine Steigerung um 17 % gegenüber $OD_{600} = 100$ rel. AU darstellte. Die maximal erreichbare Phloretinkonzentration korrelierte beinahe linear mit der optischen Dichte. Die gesteigerte volumetrische Ausbeute bei höheren optischen Dichten bestätigte somit die Annahme, dass eine definierte limitierende Flavonoidkonzentration existierte. Mit den erhaltenen $Y_{P/X}$ -Werten resultierte eine spezifische limitierende Flavonoidkonzentration von $0,045 \pm 0,004 \text{ g g}^{-1}$. Für die weitere Prozessentwicklung wurde mit diesen Experimenten eine wichtige Erkenntnis gewonnen. Um die angestrebte Produktkonzentration von 3 g L^{-1} zu erzielen, musste im Prozess eine optische Dichte von 200 rel. AU erreicht werden.

Die aufgenommenen Daten sollten zur Untersuchung der Umsetzungskinetik für die Darstellung in einem Michaelis-Menten-Plot aufgearbeitet werden. Dabei sollte die gesamte Biotransformationsreaktion von Naringenin zu Phloretin betrachtet werden. Da nicht mit aufgereinigten Enzymen sondern mit einem komplexen System (intakte Zellen) gearbeitet wurde, wurde ein größerer Fehler erwartet. Darüber hinaus war, durch den Extraktionsprozess bedingt, bei niedrigen Flavonoidkonzentrationen mit weiteren Abweichungen zu rechnen. Um V_{max} und K_M möglichst exakt ermitteln zu können, wurden die Daten deswegen zunächst nach Hanes-Woolf linearisiert (Abbildungen 22(a) und 22(b)). Durch Ausschluss vereinzelter bei niedrigen Konzentrationen erhaltener

Werte wurden für OD_{100} $V_{max} = 21,40 \mu\text{mol min}^{-1}$ und $K_M = 3.361,33 \mu\text{mol}$ ($R^2 = 0,9774$) und für OD_{200} $V_{max} = 29,63 \mu\text{mol min}^{-1}$ und $K_M = 4.917,17 \mu\text{mol}$ ($R^2 = 0,9987$) erhalten. Die erhaltenen Werte wurden für die Erstellung der Michaelis-Menten-Plots verwendet, die in den Abbildungen 23(a) (100 rel. AU) und 23(b) (200 rel. AU) dargestellt sind.

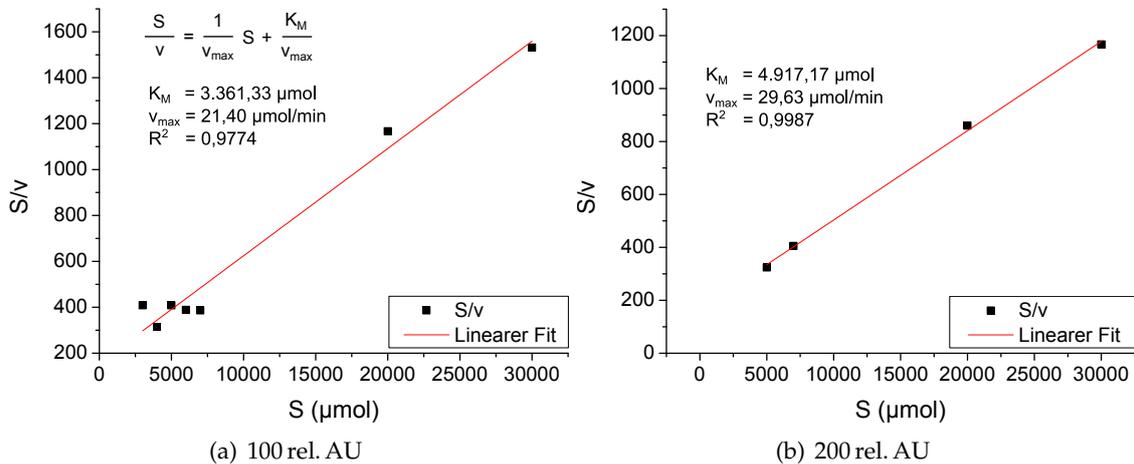


Abbildung 22: Hanes-Woolf-Plots: Reaktionskinetik der Flavonoidbiotransformation bei definierten hohen Zelldichten. links: 100 rel. AU, rechts: 200 rel. AU. v = Initialgeschwindigkeit der Phloretinbildung, S = Naringeninkonzentration.

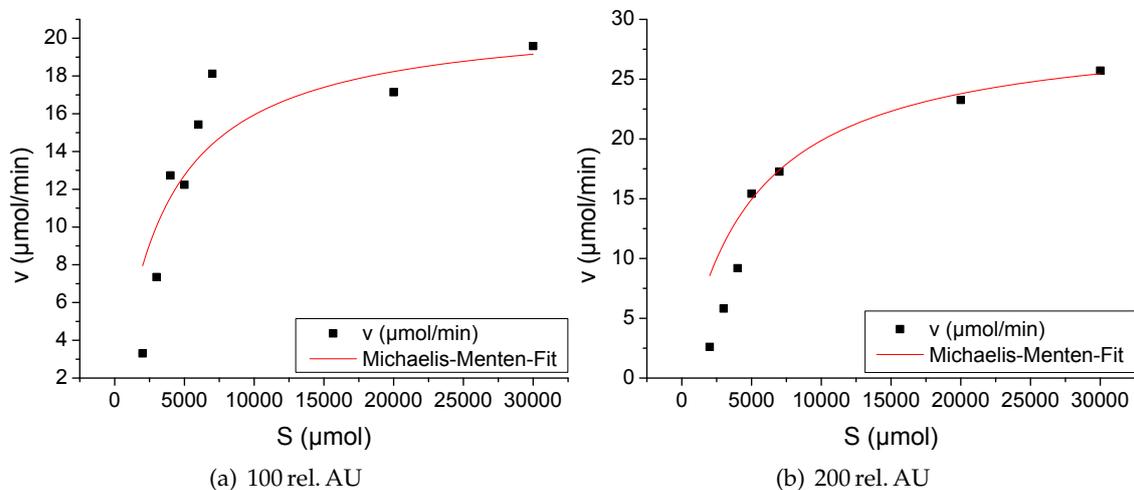


Abbildung 23: Michealis-Menten-Plots: Biotransformation bei definierten hohen Zelldichten. links: 100 rel. AU, rechts: 200 rel. AU. Für die Darstellung wurden die mittels Hanes-Woolf-Auftragung erhaltenen Werte für V_{max} und K_M verwendet. v = Initialgeschwindigkeit der Phloretinbildung, S = Naringeninkonzentration.

Die erhaltene Proportionalität konnte durch die mathematische Anpassung erneut bestätigt werden. Beide Plots zeigen ein auffälliges Sättigungsverhalten. Entsprechend der bei der Verwendung von mehr Katalysator zu erwartenden Steigerung von V_{max} unterschiede-

den sich die erreichten Maximalgeschwindigkeiten um 38 %. Die für K_M erhaltenen Werte wichen um 46 % voneinander ab, was durch die Verwendung intakter Zellen als Katalysator und das bei der Extraktion der Flavonoide notwendige Vorgehen begründet werden konnte. Als Mittelwert der erhaltenen Werte konnte mit $K_M = 4.139,25 \pm 777,92 \mu\text{mol}$ somit der tatsächliche Wert eingegrenzt werden.

4.3.3 Konzept eines Hochzelldichteprozesses inklusive Downstreaming

Nachdem bewiesen werden konnte, dass durch die Umsetzung von Flavonoiden bei hohen Zelldichten sehr effektiv die volumetrische Ausbeute des Prozesses gesteigert werden kann, wurde auf Basis des experimentellen Vorgehens im 100 mL-Maßstab ein neuer Prozess entworfen. Ein Schema dieses Prozesses ist in Abbildung 24 dargestellt.

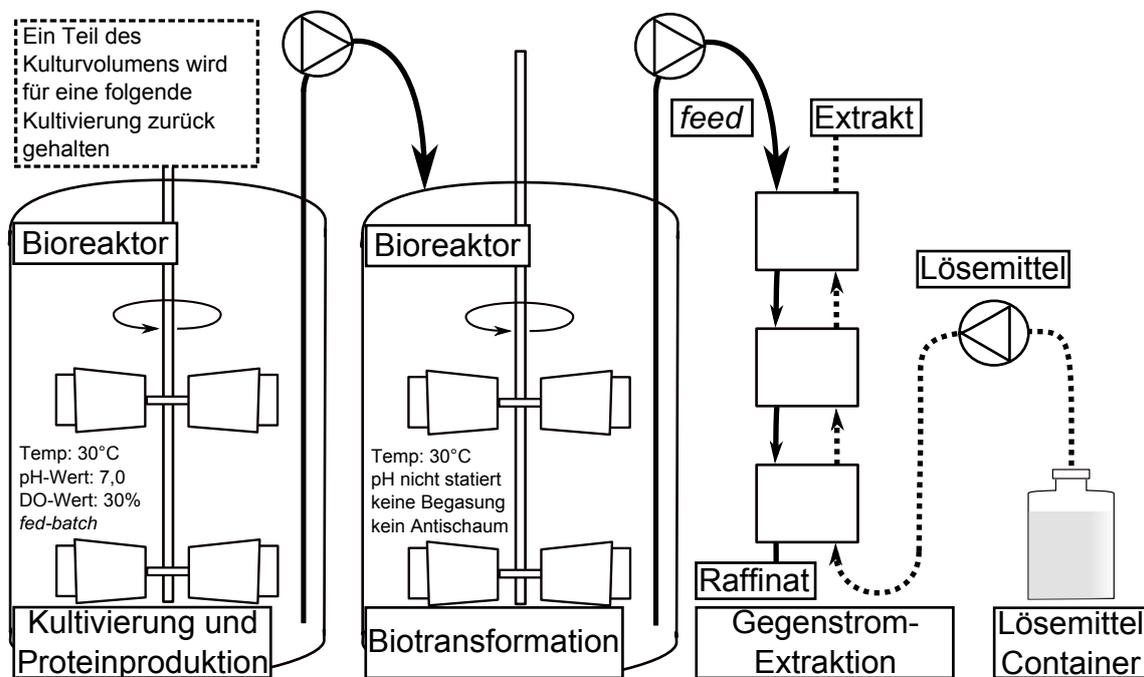


Abbildung 24: Schema für den entwickelten Hochzelldichte-Ganzzellbiotransformations-Prozess. Für eine optimale Volumen- und Zeitausbeute wurde eine *repeated-fed-batch*-Strategie entwickelt.

In dem dreiteiligen Prozess sollte in einem ersten Tank mittels *fed-batch*-Kultivierung eine Zelldichte von $OD_{600} = 200$ rel. AU erreicht werden. In diesem Abschnitt sollte die Proteinproduktion erfolgen. Die erhaltene Biomasse sollte unter teilweisem Zellrückhalt in einen zweiten Tank gepumpt werden. Auf diese Art und Weise sollte eine *repeated-fed-batch*-Betriebsweise möglich gemacht werden. Parallel zum zweiten *batch* sollte in der entnommenen Kulturbrühe, unter Rühren und anaerob die Biotransformationsreaktion

stattfinden. In diesem Prozessabschnitt sollte weder gefüttert, begast, noch der pH-Wert statiert werden.

Mit dem *downstream processing* sollte auf gleiche Weise das Präparationsprotokoll für die Analyse der Flavonoidkonzentrationen im Labormaßstab imitiert werden. Zunächst würden dafür die Zellen durch eine zehnfache Verdünnung mit demineralisiertem Wasser aufgeschlossen und verdünnt werden. Im Produktionsmaßstab sollte die Extraktion via Gegenstromextraktion erfolgen. Bei diesem Verfahren erfolgt die Extraktion in mehreren ähnlichen Teilschritten. Jede Stufe der Extraktion findet in einem weiteren Zentrifugalseparator statt. An einem Ende der Extraktionskaskade wird die Flavonoide-enthaltende Reaktorbrühe als *feed* eingeleitet. Am anderen Ende wird das reine organische Lösemittel eingeleitet. Die Raffinate und Extrakte werden zwischen den einzelnen Schritten in entgegengesetzter Richtung weitergeleitet. Durch die dadurch aufgebauten Gradienten und die iterative Mischung und Separation wird eine zügige Extraktion ermöglicht (HOSSEINZADEH *et al.*).

Wenn der resultierende Extrakt durch Erhitzen zur Evaporation des verwendeten organischen Lösemittels gebracht werden würde, würden die Flavonoide aufgrund ihrer Instabilität gegenüber hohen Temperaturen zerstört werden. Dies wäre mit erheblichen Produkteinbußen verbunden. Im Labormaßstab wurde hierfür ein Vakuumkonzentrator eingesetzt. Im industriellen Produktionsmaßstab würde sich in diesem Fall jedoch die Lyophilisierung anbieten. Das Lösemittel würde hier sublimieren, wodurch die Flavonoide geschützt blieben. Um die Prozesskosten zu senken, sollte in der industriellen Anwendung das Ethylacetat danach wiederverwendet werden.

4.3.4 Hochzelllichtprozessführung mit Glucose als primärer Kohlenstoffquelle

Durch technische Änderungen und Ergänzungen am Reaktorsystem, die Etablierung einer Sauerstoffanreicherung der Begasungsluft, sowie die Optimierung ihrer Regelparametrisierung (PID-Regler) wurde erfolgreich ein Reaktorsystem geschaffen, in dem ein angemessener Sauerstoffeintrag gewährleistet werden konnte. Darüber hinaus konnte die Zusammensetzung der *batch*- und *feed*-Medien erfolgreich optimiert werden. In rein manuell gesteuerten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die angestrebte optische Zelldichte von 200 rel. AU reproduzierbar und ohne den Einsatz von Perfusionstechniken erreicht werden konnte (siehe Anhang 8.2). Eine Durchführung des geplanten Prozesses war somit möglich.

Lineare oder stufenförmige *feed*-Profile führen potentiell zu temporären Überfütterungen

und zu längeren Kultivierungszeiten (Anhang 8.3). Wird ein Substrat im *fed-batch*-Betrieb überfüttert, so ist das Substrat nicht mehr limitiert und das Wachstum wird über die kritische Wachstumsrate hinaus beschleunigt. Durch die Kombination aus einer hohen Substratkonzentration, einer hohen Zelldichte und Wachstum oberhalb der kritischen Geschwindigkeit wird die Acetatproduktion getriggert. Dieser Mechanismus ist unter den Begriffen „Überflussmetabolismus“ und „Kurzzeit-Crabtree-Effekt“ bekannt.

Es sollte vermieden werden, dass Acetat akkumuliert wird, damit das Wachstum und die rekombinante Proteinproduktion nicht beeinträchtigt wurden. Mit steigender optischer Dichte steigt auch der Bedarf an der Kohlenstoffquelle. Durch ein exponentielles *feed*-Profil kommt man dieser Tatsache entgegen, kann eine konstante Wachstumsrate einstellen und somit die Acetatbildung verhindern.

Nach Rücksprache wurde entsprechend der Bedienungs- und Kontrollbedürfnisse speziell für diesen Hochzelllichtprozess ein Programm entwickelt, mit dem nach Eingabe der entscheidenden Parameter μ , S_0 , S_{feed} , V_0 , X_0 und $Y_{X/S}$ ein exponentielles *feed*-Profil ausgegeben werden konnte. Dieses Profil ist das Ergebnis einer Simulation auf der Basis der Monod-Kinetik. Das Programm „ORKFeeder“ („*online*-Runge-Kutta-*feeder*“) war darüber hinaus in der Lage direkt Pumpen anzusteuern. Weitere Ausführungen zum Programm befinden sich im Anhang 7.1. Dieses Programm wurde für alle der im Folgenden dargestellten Experimente eingesetzt.

4.3.4.1 Optimierung der Kultivierungsparameter für die Hochzelllichtkultivierung

Um das Programm ORKFeeder korrekt und gezielt einsetzen zu können, sollte zunächst als nötiger Parameter der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ für Glucose in einer *batch*-Kultur ermittelt werden. Bei einem entsprechenden *batch* wurde mit einer Animpfdichte von 0,78 rel. AU gestartet. Innerhalb von 8 h wurden $24,19 \text{ g L}^{-1}$ Glucose zu $10,67 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse umgesetzt, was einem Ausbeutekoeffizienten von $Y_{X/S} = 0,44$ entsprach. Es wurde eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu_{max} = 0,51 \text{ h}^{-1}$ ermittelt.

Der erhaltene Ausbeutekoeffizient wurde als Grundlage der Programmeinstellungen in einer Reihe von *fed-batch*-Experimenten verwendet. In einem ersten Versuch wurden $Y_{X/S} = 0,44$, $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ und $X_0 = 7 \text{ g L}^{-1}$ eingestellt. D. h. der erhaltene Ausbeutekoeffizient und die kritische Wachstumsgeschwindigkeit wurden als Simulationsgrundlage verwendet. Die Wahl der Ausgangsbiomasseeinstellung hatte eine künstliche Reduktion des *feed*-Stroms als Ziel. Auf diese Art und Weise sollte der Einstieg in die *fed-batch*-

Phase geringfügig verlangsamt und somit eine frühzeitige Überfütterung verhindert werden. Diese Einstellung wurde für alle Teilversuche gleich belassen. Der *feed* mit dem 40 w/v-%-Glucose-*feed*-Medium wurde gestartet nachdem ein Sauerstoff-*peak* beobachtet wurde. Dieser schnelle Anstieg des *DO*-Wertes deutete darauf hin, dass die für die *batch*-Kultur vorgelegte Glucose vollständig verbraucht war. Denn daraufhin wird schlagartig die metabolische Aktivität herabgesetzt und es wird weniger Sauerstoff benötigt. Der Sauerstoff-*peak* wurde stets von einem gleichzeitigen Sinken der Rührerdrehzahl begleitet, was durch die kaskadierte Regelung begründet war.

Zu Beginn der *fed-batch*-Phase wurde eine Acetatkonzentration von $0,06 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Die Acetatkonzentration wurde über den weiteren Verlauf erfolgreich unter $0,25 \text{ g L}^{-1}$ gehalten. Im Mittel konnte in dieser Phase des Versuchs eine Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ ermittelt werden.

Obwohl in diesem Experiment der experimentell erhaltene Ausbeutekoeffizient als Grundlage für die Simulation einprogrammiert wurde, wurde demnach nicht die eingegebene Wachstumsgeschwindigkeit von $0,3 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Dies lässt sich dadurch begründen, dass durch die für die Simulation verwendeten Differentialgleichungssysteme die durch die pH-Statierung herbeigeführte Volumenveränderung nicht berücksichtigt wurde. Ein weiterer nicht berücksichtigter Aspekt sind Überfütterungen, infolge deren Acetatproduktion die Proliferation verlangsamt. Außerdem kommt es dabei zu einer Verdünnung durch den *feed*. Zu dem Zeitpunkt der durchgeführten Arbeiten stand keine mobile Glucose-*online*-Analytik zur Verfügung, weswegen im Rahmen der Arbeiten keine *feedback*-Regulation etabliert werden konnte.

6,25 h nach Beginn der *fed-batch*-Phase stieg die Glucosekonzentration im Medium an. 2 h später wurde bereits eine Glucosekonzentration von $31,87 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Die Wachstumsrate in der letzten Stunde des Versuchs betrug $0,04 \text{ h}^{-1}$. Sie war damit um 82,3 % gesunken. Das Experiment wurde an dieser Stelle abgebrochen. Final wurden eine optische Dichte von 138,4 rel. AU und eine Biotrockenmassekonzentration (BTM) von $57,13 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Um die Überfütterung weiter hinaus zu zögern und eine höhere Biotrockenmassekonzentration zu erreichen, wurde die Einstellung des Simulationsparameters μ auf $0,2 \text{ h}^{-1}$ gesenkt. Es wurden noch zwei weitere Experimente durchgeführt, wobei der Parameter $Y_{X/S}$ variiert wurde, um eine weitere künstliche Verlangsamung des *feeds* zu bewirken. Die Ergebnisse werden in Tabelle 6 zusammengefasst. Es wurden nur die Biotrockenmassekonzentrationen dargestellt, da die Korrelation mit den zugehörigen OD_{600} -Werten

teilweise schwankte. Die Biotrockenmassekonzentration ist ein weitaus präziseres Maß für die produzierte Biomasse und ermöglicht somit eine bessere Vergleichbarkeit der Kultivierungen.

Tabelle 6: Optimierung der Kultivierungsparameter für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli*. Es wurden verschiedene exponentielle *feed*-Profile getestet. Dabei wurden die Einstellungen von μ und $Y_{X/S}$ variiert. (*in der letzten Phase wurde linear gefüttert)

μ	$Y_{X/S}$	erreichte BTM-Konzentration	Zeitpunkt der Überfütterung	erreichte Glucosekonzentration	
$0,3 \text{ h}^{-1}$	0,44	$57,13 \text{ g L}^{-1}$	8,25 h	$31,82 \text{ g L}^{-1}$	
$0,2 \text{ h}^{-1}$	0,44	$63,20 \text{ g L}^{-1}$	12,00 h	$42,50 \text{ g L}^{-1}$	
$0,2 \text{ h}^{-1}$	0,47	$63,33 \text{ g L}^{-1}$	12,00 h	$14,60 \text{ g L}^{-1}$	
$0,2 \text{ h}^{-1}$	0,50	$63,33 \text{ g L}^{-1}$	15,00 h	$3,53 \text{ g L}^{-1}$	*

Gegenüber dem bereits beschriebenen Versuch ($0,3 \text{ h}^{-1}$, 0,44) wurde durch die Erhöhung von $Y_{X/S}$ in allen weiteren Versuchen eine höhere Biotrockenmassekonzentration erreicht und eine Überfütterung verzögert. Alle anderen Einstellungen wurden beibehalten. Zusätzlich wurden die bei den Überfütterungen erreichten Glucosekonzentrationen reduziert. Durch eine konstante Pumprate von $74,52 \text{ mL h}^{-1}$ in den letzten 3 h der *feed*-Phase wurde die Glucosekonzentration – in Relation zum Maximalwert in diesem Experiment – erfolgreich um 91,7% auf $3,5 \text{ g L}^{-1}$ gesenkt. Das erreichte Maximum der Biotrockenmassenkonzentration betrug $63,3 \text{ g L}^{-1}$. Damit wurde erfolgreich ein dreistufiges Hochzelldichtekultivierungsprotokoll mit hoher reproduzierbarer Sicherheit erhalten.

4.3.4.2 Repeated-fed-batch-Prozessführung

Gemäß dem in Abschnitt 4.3.3 vorgestellten Schema war eine *repeated-fed-batch*-Prozessführung Teil des zu entwickelnden Biotransformationsprozesses. Auf diese Weise sollte eine zeitlich parallele Biotransformation mit der Biomasse einer Kultivierung und die Erzeugung neuer Biomasse für eine folgende Biotransformation realisiert werden. Für ein derartiges Verfahren ist ein sehr robustes und gut reproduzierbares Protokoll notwendig. Die Qualität des entwickelten dreiteiligen *feed*-Profils sollte untersucht werden. Dafür wurde eine Kultivierung als *repeated-fed-batch* mit teilweisem Zellrückhalt durchgeführt. Es wurden sowohl *online*- als auch *offline*-Daten aufgezeichnet. Die Daten werden in Abbildung 25 dargestellt.

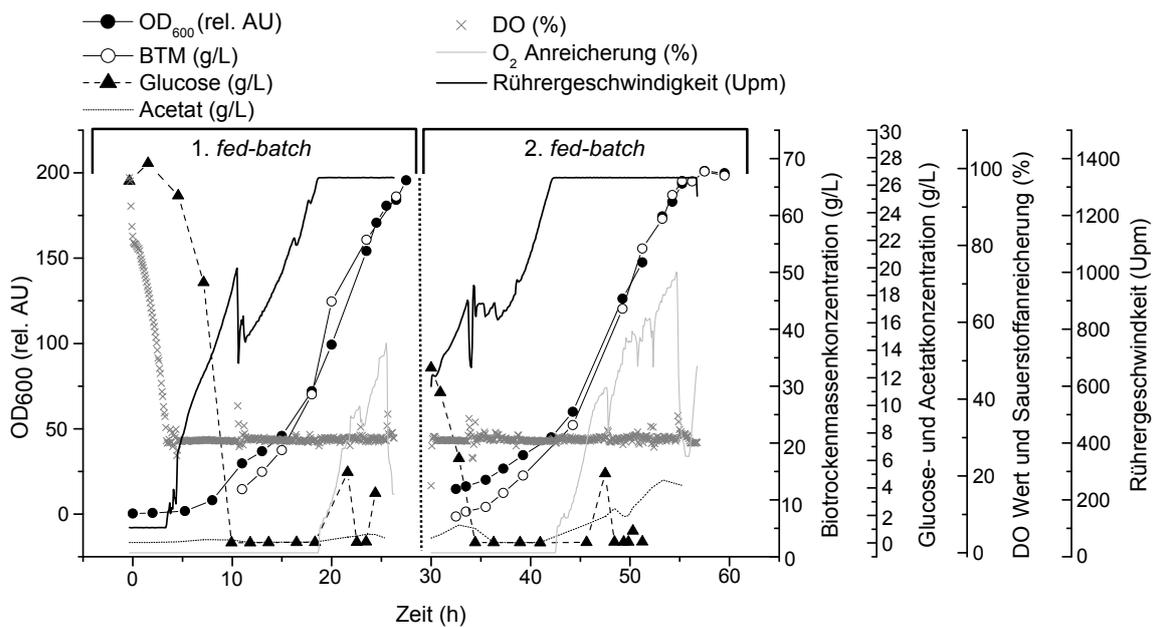


Abbildung 25: *Repeated-fed-batch*-Kultivierung. Optische Dichte, Biotrockenmassekonzentration, Glucose- und Acetatkonzentration, *DO*-Wert, Sauerstoffanreicherung und Rührergeschwindigkeit.

Die erste *batch*-Kultivierung wurde mit einer Glucosekonzentration von 26 g L^{-1} und einer Animpfdichte von $0,34 \text{ rel. AU}$ gestartet. Nach 11 h wurde das Ende der *batch*-Phase anhand eines Sauerstoff-peaks erkannt. In der *batch*-Phase wurden $\mu_{max} = 0,56 \text{ h}^{-1}$ sowie eine Biotrockenmassekonzentration von $11,86 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Anschließend wurde die *fed-batch*-Phase gestartet. In der exponentiellen *feed*-Phase wurde eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit von $0,13 \text{ h}^{-1}$ gehalten. Nach $23,5 \text{ h}$ wurde mit $5,14 \text{ g L}^{-1}$ Glucose eine Überfütterung festgestellt. Die Acetatkonzentration war zu diesem Zeitpunkt bereits von $0,07 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,49 \text{ g L}^{-1}$ angestiegen. Die exponentielle *feed*-Phase wurde abgebrochen und es wurde eine konstante Pumprate des Glucose-feeds von $74,52 \text{ mL h}^{-1}$ eingestellt. In dieser Phase sank die Wachstumsgeschwindigkeit bis auf $0,02 \text{ h}^{-1}$ ab. Nach weiteren 3 h wurde mit $3,62 \text{ g L}^{-1}$ Glucose erneut eine Überfütterung festgestellt und daher die Zufütterung gestoppt. Die Kultivierung wurde 1 h später beendet, nachdem $OD_{600} = 195,63 \text{ rel. AU}$ erreicht wurde. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $63,33 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Es wurden 90% des Reaktorinhalts entnommen. Neues Medium und eine Glucoselösung wurden steril in den Bioreaktor überführt, so dass erneut ein *batch*-Volumen von 1 L erhalten wurde. Die Biomasse wurde auf $OD_{600} = 14,7 \text{ rel. AU}$ bzw. $0,36 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse verdünnt. Dem experimentell erhaltenen Ausbeutekoeffizienten für Glucose

entsprechend wurde eine Glucosekonzentration von 15 g L^{-1} im *batch*-Medium eingestellt. Es wurde ein μ_{max} von $0,16 \text{ h}^{-1}$ ermittelt und am Ende des *batches* wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $11,20 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Dieser Wert wich lediglich $5,6 \%$ vom ersten *batch* ab, wodurch der Ausbeutekoeffizient nochmals bestätigt wurde.

Analog zur vorhergehenden Kultivierung wurde nach $37,25 \text{ h}$ – relativ zum Start der ersten Kultivierung – das identische *feed*-Profil gestartet. In der exponentiellen *fed-batch*-Phase wurde eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit von $0,13 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Nach $51,25 \text{ h}$ wurde mit $5,04 \text{ g L}^{-1}$ Glucose eine Überfütterung festgestellt. Die Acetatkonzentration war zu diesem Zeitpunkt von $0,03 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,92 \text{ g L}^{-1}$ gestiegen. Die exponentielle *fed-batch*-Phase wurde abgebrochen und es wurde mit $74,52 \text{ mL h}^{-1}$ konstant weiter gepumpt. In dieser Phase sank die Wachstumsgeschwindigkeit bis auf $0,07 \text{ h}^{-1}$ ab. Die Glucosekonzentration wurde über den Rest der *fed-batch*-Phase konstant unter $0,10 \text{ g L}^{-1}$ gehalten. Die Kultivierung war nach $55,25 \text{ h}$ beendet und es wurden $OD_{600} = 193,6 \text{ rel. AU}$ und eine Biotrockenmassekonzentration von $66,07 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Demnach erwies sich das entwickelte *feed*-Protokoll auch hier als sicher und reproduzierbar. So wurde in beiden Teilkultivierungen am Ende der *batch*-Phase Biotrockenmassekonzentrationen erhalten, welche mit einer geringen Abweichung von $5,5 \%$ übereinstimmten. Darüber hinaus wurde in beiden Fällen in der exponentiellen *feed*-Phase eine Wachstumsrate von $0,13 \text{ h}^{-1}$ gehalten. Es war absehbar, dass einer Durchführung von weiteren Kultivierungen auf diese Weise nichts entgegenstände.

4.3.5 Untersuchung der Proteinproduktion in Abhängigkeit von der Substratauswahl und der Prozessstrategie

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass auch bei glucoselimitiertem Wachstum die Laktoseaufnahme durch einen Katabolitrepersionsmechanismus verringert wurde und keine ausreichende Proteinproduktion stattfand (STÜLKE & HILLEN, 1999; BROWN, 2002) (Anhang 8.4). Als Lösungsstrategie wurden alternative Kohlenstoffquellen evaluiert, welche die gleichzeitige Aufnahme von Laktose erlaubten. So wurde bei dem Einsatz von Glycerin das aus dem Inokulum stammende Acetat während der *batch*-Kultivierung vollständig verbraucht. Eine mögliche Begründung war über die Wachstumsgeschwindigkeit herzuführen. Sie betrug in dem Glycerin-basierten Medium $0,37 \text{ h}^{-1}$. Dabei handelte es sich um den geringsten bei den Experimenten erhaltenen Wert. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist durch die ineffiziente Aufnahme von Glycerin in die bakteriellen Zellen begründet, wodurch der begünstigte Verbrauch des Acetats resultierte.

Beim Einsatz von Fructose hingegen konnte zwar keine derartige Metabolisierung beobachtet werden, die Acetatkonzentration stieg jedoch auch nicht weiter an. Die Aufnahme von Fructose ist im Gegensatz zu Glycerin sehr effizient. Fructose triggert, wie auch Glycerin, im Gegensatz zu Glucose die Acetatproduktion nicht direkt. Diese Kombination lieferte mit $0,86 \text{ h}^{-1}$ die höchste ermittelte Wachstumsrate und die effizienteste Umwandlung von Substrat zu Biomasse. Die erhaltenen Wachstumsraten und Ausbeutekoeffizienten werden in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Vergleich des Wachstumsverhaltens auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Glycerin und Fructose).

Kohlenstoffquelle	$Y_{X/S}$	μ_{max}
Glucose	0,44	$0,51 \text{ h}^{-1}$
Glycerin	0,58	$0,37 \text{ h}^{-1}$
Fructose	0,77	$0,86 \text{ h}^{-1}$

In weiteren Vorversuchen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Hochzelllichtkultivierungen mit den Substraten Glycerin und Fructose möglich waren (Anhang 8.5). Für die Übertragung des mit Glucose entwickelten Hochzelllichtkultivierungsprotokolls auf die alternativen Substrate wurde der für die Simulation eingegebene Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient analog zu den in 4.3.4.1 dargestellten Experimenten um etwa 16 % erhöht. Für Glycerin ergab dies einen einzustellenden Ausbeutekoeffizienten von $Y_{X/S} = 0,67$. Für Fructose wurde ein Wert von $Y_{X/S} = 0,90$ verwendet. Damit wurde zum einen eine ähnliche Wachstumsrate und zum anderen eine ähnliche Versuchsdauer erzielt. Über diese Abweichungen hinaus waren für die Verwendung von Fructose keine weiteren Anpassungen notwendig. Bei der Verwendung von Glycerin wurde allerdings ein verstärkter Sauerstoffbedarf beobachtet. Bei Erreichen der angestrebten Biotrockenmasse von $>60 \text{ g L}^{-1}$ war im 2 L-Bioreaktorsystem teilweise eine Anreicherung der Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff von 100 % notwendig. Trotz dieser Auffälligkeit sollte Glycerin aufgrund der metabolischen Vorteile weiter untersucht werden. Mit Fructose wurde kein erhöhter Bedarf an Sauerstoff beobachtet.

Die alternativen Substrate sollten bezüglich ihrer Wirkung auf die Proteinproduktion untersucht werden. Hierfür wurde – entsprechend den bis dahin gewonnenen Erkenntnissen – ein dreiphasiges Kultivierungsprotokoll aus einer *batch*-Kultur, einer exponentiellen *fed-batch*-Phase und einer *fed-batch*-Phase mit konstantem \dot{V}_{feed} verwendet. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 100 rel. AU durch Zugabe von 5 g L^{-1} Laktose.

Da die im Gegensatz zu Glycerin hohen Rohstoffkosten von Fructose der industriellen Nutzung potentiell im Wege stehen könnten, wurden im Rahmen dieser Experimente zusätzlich günstigere Alternativen getestet. Es wurden Invertzuckersirup und *high-fructose-corn*-Sirup ausgewählt. Bei diesen beiden Produkten handelt es sich um Mischungen von Zuckern, welche einen großen Anteil an Fructose enthalten. Es wurde angenommen, dass damit ähnliche positive Effekte zu beobachten wären wie mit reiner Fructose.

Invertzucker- und Fructosesirup werden gewöhnlicherweise in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt. Invertzucker kann durch eine Vielzahl von Techniken produziert werden. Klassisch erfolgt seine Produktion durch säurekatalysierte oder enzymatisch durch Invertase-katalysierte Hydrolyse von Saccharose in die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose. Beide Monosaccharide sind im Endprodukt zu gleichen Teilen enthalten (GEHLAWAT, 2001). Als mögliche effizientere Techniken für die Herstellung von Invertzuckersirup wurden auch enzymatische *fixed-bed*-Reaktoren und die Säurekatalyse in kationischen Chromatographieharzen beschrieben. *High-fructose-corn*-Sirup, oder Fructosesirup, wird durch enzymatische Katalyse produziert. Hierbei kommen drei Enzyme zum Einsatz. Als Rohstoff wird Stärke durch α -Amylase und Glucoamylase zu Dextrose umgewandelt. Die erhaltene Dextrose wird abschließend durch Glucoseisomerase zu Fructose umgesetzt. Auf diese Weise kann Sirup mit bis zu 90 % Fructoseanteil am Trockengewicht erhalten werden (HOBBS, 2009).

Als eine weitere mögliche Strategie zur Senkung der Prozesskosten wurde ein Wechsel der Substrate untersucht. Hierbei sollten die Prozesskosten dadurch gesenkt werden, dass für die erste Hälfte des Prozesses weiterhin Glucose verwendet werden würde. Das jeweilige Alternativsubstrat würde erst in der Proteinproduktionsphase eingesetzt werden. Das hieße, dass der Substratwechsel erst bei einer optischen Dichte von 100 rel. AU und damit kurz vor der Induktion erfolgen würde.

Als Bewertungskriterium wurden die in den Biotransformationen mit den jeweiligen Kulturen produzierten Phloretinkonzentrationen herangezogen. Die entscheidenden Ergebnisse werden mit zusammenfassenden Anmerkungen in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Proteinproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Kohlenstoffquelle	Kommentar	erreichte Phloretin-konzentration
Invertzuckersirup	Akkumulation von Fructose Acetatproduktion sichere und gezielte Steuerung ohne <i>online</i> -Analytik nicht möglich	keine ausreichende Aktivität
Fructosesirup	Akkumulation von Fructose Acetatproduktion sichere und gezielte Steuerung ohne <i>online</i> -Analytik nicht möglich	keine ausreichende Aktivität
Fructose	Zielkonzentration erreicht	3,26 g L ⁻¹
Glycerin	hoher Sauerstoffverbrauch Zielkonzentration erreicht	2,90 g L ⁻¹
Glucose mit Wechsel zu Glycerin	Zielkonzentration erreicht hoher Sauerstoffverbrauch	3,13 g L ⁻¹
Glucose mit Wechsel zu Fructose	hoher Sauerstoffverbrauch geringe Laktoseaufnahme und Proteinproduktion	1,10 g L ⁻¹

In den Versuchen mit Invertzuckersirup und Fructosesirup wurde die angestrebte Biotrockenmasse erreicht, dennoch waren diese Teilversuche nicht erfolgreich.

Um ein *feed*-Profil zu erstellen, wurde im Falle der Kultivierung mit Invertzuckersirup ein Ausbeutekoeffizient von $Y_{X/S} = 0,50$ eingestellt. Bei diesem Versuch wurde die Glucose innerhalb der *batch*-Phase von 10 h vollständig verbraucht. Die maximale Wachstumsrate betrug $0,48 \text{ h}^{-1}$. Für den größten Teil der Kultivierung konnte die Glucosekonzentration erfolgreich unterhalb von $0,10 \text{ g L}^{-1}$ gehalten werden. 25,5 h nach der Inokulation, d.h. 15,5 h nachdem die *fed-batch*-Phase gestartet wurde, wurde eine geringfügige Überfütterung von $0,59 \text{ g L}^{-1}$ Glucose erkannt, wonach ein konstanter niedriger *feed* eingestellt wurde, bis die Kultivierung nach 27,5 h beendet wurde. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $66,43 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Erst die HPLC-Analytik zeigte, dass es zu einer Akkumulation von Fructose kam, während die Glucose vollständig verbraucht wurde. Die Akkumulation begann bereits zum

Start der *fed-batch*-Phase und setzte sich auch weiter fort nachdem auf einen konstanten niedrigeren \dot{V}_{feed} umgeschaltet worden war. Am Ende der Kultivierung wurde eine Fructosekonzentration von $17,65 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen. Zu einer verstärkten Acetatproduktion kam es erst 14,5 h nachdem die *fed-batch*-Phase gestartet wurde, als eine Fructosekonzentration von $21,64 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Am Ende der Kultivierung lag mit $6,94 \text{ g L}^{-1}$ eine inhibierende Acetatkonzentration im Kulturmedium vor.

Für das Telexperiment mit Fructosesirup wurde ein Ausbeutekoeffizient von 0,9 im Programm ORKFeeder eingestellt. Auch in diesem Versuch wurde die Glucose in der *batch*-Phase vollständig verbraucht. Während der Kultivierung konnte die Glucosekonzentration erfolgreich unterhalb von $0,40 \text{ g L}^{-1}$ gehalten werden. Über den aufgezeichneten Zeitraum der *fed-batch*-Phase wurde eine Zunahme der Glucosekonzentration mit beinahe linearem Verhalten beobachtet ($0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $R^2 = 0,949$).

26 h nach der Inokulation, d.h. 16 h nachdem die *fed-batch*-Phase gestartet wurde, wurde Lyse festgestellt. Es wurde zur nächsten Prozessphase mit einem konstanten *feed* übergegangen. Erwartungsgemäß konnte die Kultivierung nach 29 h beendet werden. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $66,33 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Die HPLC-Analytik zeigte, dass es zu einer Akkumulation von Fructose kam. Auch in diesem Telexperiment wurde während dessen die Glucose nahezu vollständig verbraucht. Die Akkumulation begann bereits nachdem $OD_{600} = 100$ rel. AU erreicht wurde. Die maximale Fructosekonzentration betrug $70,82 \text{ g L}^{-1}$. Die Acetatkonzentration betrug zu diesem Zeitpunkt $3,69 \text{ g L}^{-1}$. Nachdem der *feed* abgeschaltet worden war, sank die Fructosekonzentration innerhalb von 2 h um 45,66 % bis auf einen Wert von $32,34 \text{ g L}^{-1}$. Am Ende der Kultivierung wurde mit $12,97 \text{ g L}^{-1}$ Acetat eine inhibierende Konzentration festgestellt.

Der ermittelte Laktosekonzentrationsverlauf ähnelte den Versuchen mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle (Anhang 8.4). Die Abnahme der Konzentration wurde auch in diesem Fall hauptsächlich auf die Verdünnung durch das *feed*-Medium zurückgeführt. Die zugehörigen SDS-PAGE-Ergebnisse zeigten mit Ausnahme einer geringfügigen Konzentrationszunahme der CHI in der löslichen Fraktion keine deutliche Proteinproduktion. In der Biotransformation wurde lediglich ein Produkttiter von $1,41 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin produziert (Ausbeute = 22,35 %).

In den Telexperimenten, in welchen Invertzucker- und Fructosesirup eingesetzt wurden, gab es auf metabolischer Ebene Probleme, welche sehr wahrscheinlich Bestandteil des beobachteten Versuchsverlaufes waren. Beide Substrate stellen aufgrund ihrer Produkti-

onsprozesse Mischungen dar. Sie enthalten Fructose, Glucose, Asche und in geringen Konzentrationen auch das Disaccharid Saccharose. Dies bedeutet, dass aufgrund metabolischer Wechselwirkungen die Umsetzung aller Zucker weniger effizient erfolgt. Glucose wird unter diesen Umständen immer bevorzugt. CLARK & HOLMS (1976) wiesen nach, dass Glucose die Synthese der fructosespezifischen Enzyme des Phosphotransferasesystems reprimiert und auch die Aktivität dieser Enzyme senkt. Hierdurch kam es im Experiment zu einer Akkumulation der Fructose in der Kulturbrühe. Wie anhand beider Telexperimente jedoch veranschaulicht werden konnte, ist *E. coli* gegenüber Überfütterungen mit Fructose deutlich toleranter als gegenüber Glucose. Demnach war der metabolische Vorteil von Fructose tatsächlich bei den Kultivierungen mit Invertzucker- und Fructosesirup gegeben. Dies bedeutete aber auch, dass das etablierte Kultivierungsprotokoll nicht problemlos übertragen werden konnte, denn das *feed*-Profil war nicht an diese metabolischen Abweichungen angepasst. Invertzucker- und Fructosesirup sind ohne ein dezidiertes auf *online*-Messungen basierendes und *feedback*-reguliertes *fed-batch*-System nur äußerst kompliziert für reine Hochzelllichtkultivierungen nutzbar.

Des Weiteren entfiel durch die selbst bei Substratlimitierung permanente Anwesenheit von Glucose der zweite beobachtete Vorteil reiner Fructose. Die Aufnahme von Laktose wird durch die Mechanismen der Katabolitrepression inhibiert (NELSON *et al.*, 1983). Dadurch kann es bei der Verwendung von Invertzucker- und Fructosesirup nicht zu einer effizienten Proteinproduktion kommen, wie in den Experimenten bestätigt wurde.

Auch die Prozessstrategie, bei der Glucose und Fructose durch einen Substratwechsel voneinander getrennt wurden, erbrachte nur eine geringe Phloretinausbeute und eine unzureichende Proteinproduktion. Nachdem der Substratwechsel durchgeführt worden war, begann eine geringfügige Akkumulation der Fructose. Die exponentielle *fed-batch*-Phase wurde 22,0 h nach der Inokulation beendet und ein geringerer linearer Volumenstrom eingestellt. Die Akkumulation lief dennoch weiter und die Kultivierung wurde nach weiteren 2,0 h abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Fructosekonzentration von $1,65 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die maximale im Experiment erreichte Fructosekonzentration. Da die Substratkonzentration derart erfolgreich niedrig gehalten werden konnte, wurde während des Versuchs im Maximum nur $0,17 \text{ g L}^{-1}$ Acetat produziert und es konnte eine Biotrockenmassekonzentration von $75,2 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Damit wurde eine Steigerung der Biotrockenmassekonzentration um 27 % gegenüber allen bis dahin durchgeführten Versuchen erzielt. Das *feed*-Profil konnte demnach erfolgreich angepasst und übertragen werden. Trotz des komplikationsfreien Versuchsab-

laufs konnte nahezu keine Laktoseaufnahme nachgewiesen werden. Vermutlich erfolgte die metabolische Umstellung bei dieser Prozessvariante besonders langsam, da sowohl Glucose als auch Fructose über das PTS-System aufgenommen werden und es eine Vielzahl metabolischer Überschneidungen gab. Die SDS-PAGE-Ergebnisse bestätigten diesen Zusammenhang. Es war nur eine geringfügige Produktion heterologen Proteins nachweisbar. In der mit der erhaltenen Biomasse durchgeführten Biotransformation wurden innerhalb von 24 h nur $1,13 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin gebildet, was einer Ausbeute von 21,85 % entsprach.

Wie in den Vorversuchen beobachtet, zeichnen sich Hochzelllichtkultivierungen von *E. coli* mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle durch eine geringe Acetatproduktion aus. Aufgrund dessen wurde in einem weiteren Telexperiment die Proteinproduktion bei Verwendung von Glycerin untersucht. Es wurde eine optische Dichte von 195 rel. AU erreicht. Während des Versuches wurden 344 L elementarer Sauerstoff durch die kaskadierte Anreicherung der Begasungsluft verbraucht und der Verbrauch der 10 Gew.-% wässrigen Ammoniaklösung belief sich auf 250 mL. Die zu einer Konzentration von $5,05 \text{ g L}^{-1}$ zugegebene Laktose wurde beinahe vollständig verbraucht. Zum Zeitpunkt der Induktion lag mit $0,23 \text{ g L}^{-1}$ keine kritische Acetatkonzentration vor. Zeitgleich mit der Induktion begann die bakterielle Kultur dann verstärkt Acetat zu produzieren. Bis die Kultivierung abgebrochen wurde, d.h. 8 h nach der Induktion, akkumulierte Acetat weiter bis zu $7,93 \text{ g L}^{-1}$. Diese Acetatproduktion stand im Gegensatz zu den Vorversuchen mit Glycerin als Substrat, wird jedoch durch die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen bestätigt (JENSEN & CARLSEN, 1990; KRACKE-HELM *et al.*, 1991; KORZ *et al.*, 1995). Im Widerspruch zu dieser Beobachtung konnte HOLMS (1996) die Acetatbildung bei Verwendung von Glycerin allerdings vollständig verhindern.

Am Ende der Kultivierung lagen noch $0,36 \text{ g L}^{-1}$ Laktose in der Kulturbrühe vor. D.h. es wurden 92,87 % der Laktose aufgenommen und umgesetzt. Die Induktion war erfolgreich, was auch durch SDS-PAGE bestätigt wurde. Über den Induktionszeitraum war eine deutlich erkennbare Proteinproduktion zu verzeichnen. Hauptsächlich wurde in diesem Experiment jedoch unlösliches Protein produziert, was vermutlich auf die verstärkte Acetatproduktion zurückzuführen war. In den mit der erhaltenen Biomasse durchgeführten Biotransformationen wurde ein Produkttiter von $2,88 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin erreicht.

Am erfolgreichsten waren die Experimente bei mit Verwendung von Fructose für den gesamten Prozessablauf und mit einem Substratwechsel von Glucose zu Glycerin.

Der Verlauf des Versuchs mit Fructose ist in Abbildung 26 zusammengefasst. Es wurde innerhalb von 26,5 h eine optische Dichte von 199 rel. AU erreicht. Die Induktion erfolgte nach 20,5 h mit $7,37 \text{ g L}^{-1}$ Laktose. Bis zum Ende der Kultivierung wurde die Laktosekonzentration auf $1,00 \text{ g L}^{-1}$ gesenkt. Entgegen den Versuchen mit Glucose, Invertzucker und Fructosesirup war demnach anzunehmen, dass die Differenz von 86,4 % der Laktose während der sechsstündigen Induktionsphase aufgenommen und umgesetzt wurde. Die Acetatkonzentration betrug bis zum Beginn einer geringfügigen Überfütterung nach 26,5 h maximal einen Wert von $0,29 \text{ g L}^{-1}$. Während dieser Überfütterung wurde eine maximale Fructosekonzentration von $4,79 \text{ g L}^{-1}$ und eine Acetatkonzentration von $1,36 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Dadurch, dass die *feed*-Rate anschließend auf $37,26 \text{ mL h}^{-1}$ gesenkt wurde, sank die Acetatkonzentration wieder. Die Pumprate wurde dann geringfügig auf $44,71 \text{ mL h}^{-1}$ erhöht, bis eine optische Dichte von 200 rel. AU erreicht war und die Kultivierung beendet wurde. Für die Kultivierung wurden 164 L elementarer Sauerstoff, 280 mL 10 Gew.-% wässrige Ammoniaklösung und insgesamt 670 mL der 40 w/v-% Fructoselösung verbraucht.

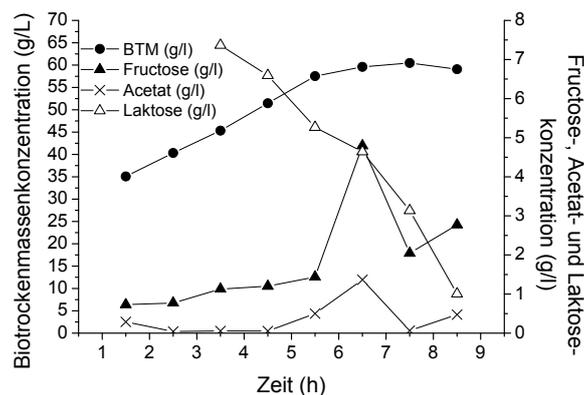


Abbildung 26: Verlauf der Biotrockenmasse-, Fructose- und Laktosekonzentrationen in der Proteinproduktionsphase. Hochzelldichtekultur.

Die während der Proteinproduktionsphase entnommenen Proben wurden in ihre löslichen und unlöslichen Fraktionen geteilt und via SDS-PAGE analysiert (Abbildung 27). Die ERed war ausschließlich in den löslichen Fraktionen zu erkennen. In den unlöslichen Fraktionen waren keine Banden erkennbar. Auch die CHI wurde zum größten Teil löslich produziert; wurde allerdings in geringerem Maße produziert als die ERed.

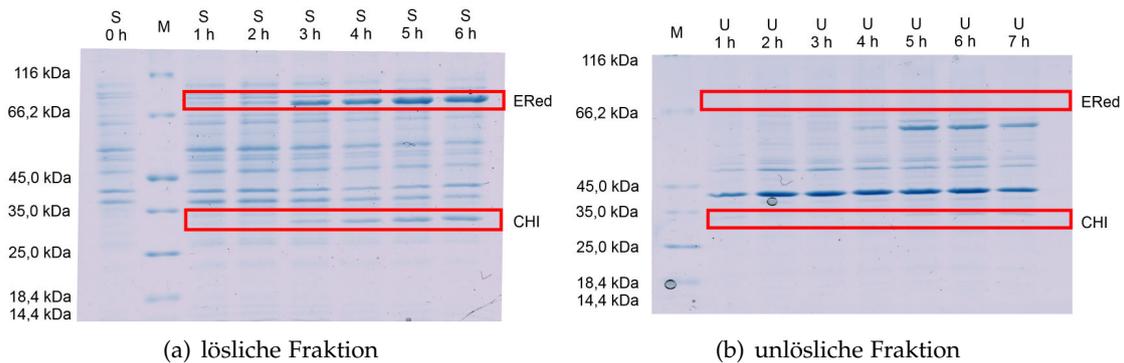


Abbildung 27: SDS-PAGE: Proteinproduktion bei der Verwendung von Fructose als Kohlenstoffquelle. Die Proben wurden auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

In den zugehörigen Biotransformationen wurden innerhalb von 24 h $3,27 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin produziert. Dies entsprach einer Ausbeute von 58,5 %. Demnach konnte mit dieser Prozessvariante die angestrebte Phloretinkonzentration von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ erreichen werden. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$ betrug $0,054 \text{ g g}^{-1}$. Die Konzentrationsverläufe der Flavonoide während der Biotransformation wurden in Abbildung 28 dargestellt.

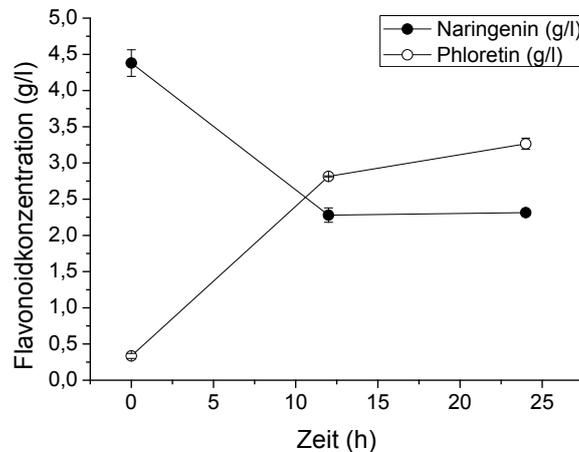


Abbildung 28: Biotransformation mit Biomasse, die mit Fructose als Kohlenstoffquelle produziert wurde. Verlauf der Konzentrationen von Naringenin und Phloretin.

In dem Versuch in welchem ein Substratwechsel von Glucose zu Glycerin erfolgte, wurden innerhalb von 26,5 h eine optische Dichte von 198 rel. AU und eine Biotrockenmassekonzentration von $65,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht (Abbildung 29). Nach 19,5 h erfolgte die Induktion mit $5,97 \text{ g L}^{-1}$ Laktose. Am Ende der Kultivierung konnte eine Laktosekonzentration von $0,16 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden, wonach – wie auch schon beim Versuch mit Fructose – anzunehmen war, dass die Differenz von 97,3 % der Laktose während der achtstündigen

Produktionsphase aufgenommen und umgesetzt wurde. Die Acetatkonzentration sank, bis nach 22,5 h eine Überfütterung festgestellt wurde, auf einen Wert von 0 g L^{-1} ab. Während der Überfütterung wurde eine maximale Glycerinkonzentration von $16,02 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Gleichzeitig stieg die Acetatkonzentration auf einen Wert von $0,92 \text{ g L}^{-1}$, sank anschließend aber wieder, da der *feed* für 1,33 h komplett abgeschaltet wurde. Erst dann wurde eine konstante *feed*-Rate von $61,5 \text{ mL h}^{-1}$ eingestellt. Die Kultivierung wurde nach 26,5 h beendet, als eine optische Dichte von 198 rel. AU erreicht wurde. Für die Kultivierung wurden 244 L elementarer Sauerstoff, 200 mL 10 Gew.-% wässrige Ammoniaklösung und insgesamt 84 g Glucose und 147 g Glycerin verbraucht.

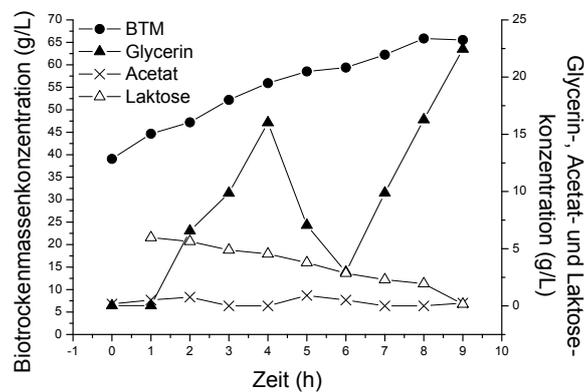


Abbildung 29: Verlauf der Biotrockenmassen-, Glycerin- und Laktosekonzentrationen in der Proteinproduktionsphase. Hochzelllichtkultur mit Substratwechsel.

Die während der Proteinproduktionsphase entnommenen Proben wurden in ihre löslichen und unlöslichen Fraktionen geteilt und via SDS-PAGE analysiert (Abbildung 30). Die heterologen Proteine wurden hauptsächlich löslich produziert. In den unlöslichen Fraktionen waren nur schwache Banden erkennbar. Im Gegensatz zum Versuch mit Fructose als einzige Kohlenstoffquelle wurden beide Enzyme gleich stark produziert.

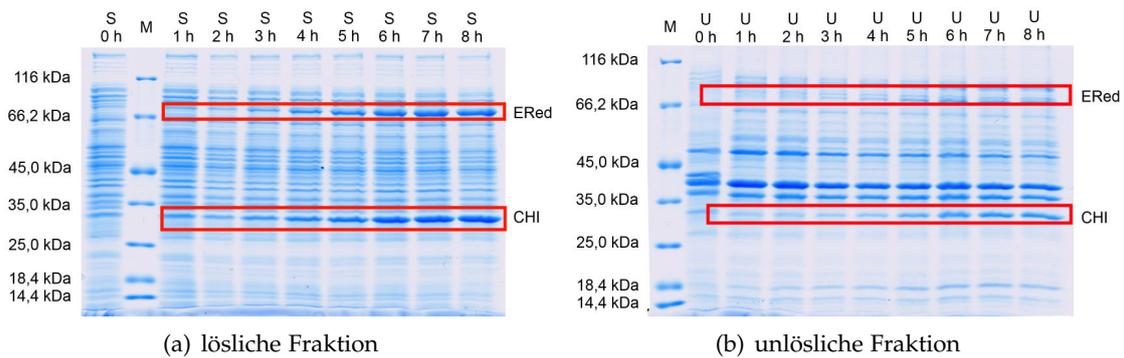


Abbildung 30: SDS-PAGE: Proteinproduktion beim Wechsel von Glucose zu Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die Proben wurden auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

In den zugehörigen Biotransformationen wurden innerhalb von 24 h $3,13 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin produziert. Dies entsprach einer Ausbeute von 55,64 %. Demnach konnte mit dieser Prozessvariante die angestrebte Phloretinkonzentration von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ erreichen werden. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$ betrug $0,048 \text{ g g}^{-1}$. Die Konzentrationsverläufe der Flavonoide während der Biotransformation werden in Abbildung 31 dargestellt.

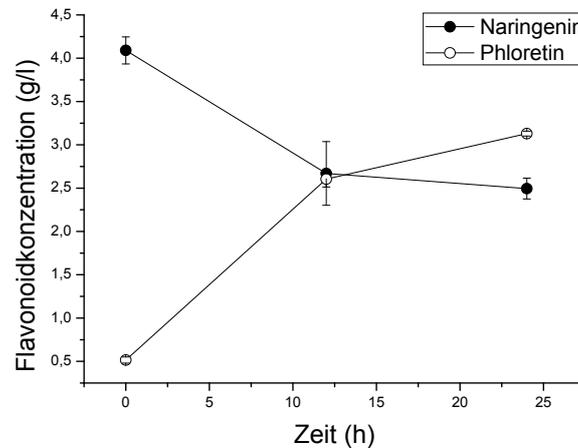


Abbildung 31: Biotransformation mit Biomasse, die mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin produziert wurde. Verlauf der Konzentrationen von Naringenin und Phloretin.

Aus ökonomischen Gründen fiel die Wahl des *feed*-Protokolls für die weitere Prozessentwicklung auf das System mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin.

4.3.6 Übertragung des Prozesses auf den *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed-Stamm

Vom Projektpartner BEC (Greifswald) wurde ein weiterer optimierter Produktionsstamm bereitgestellt. Auch dieser *E. coli*-Stamm basierte auf dem Staby™-System von Delphy Genetics. Bei diesem Produktionsstamm wurde eine modifizierte Chalkonisomerase produziert, bei der der Abschnitt der Chalkonisomerase aus *Eubacterium ramulus*, welcher im nativ gefalteten Enzym einen das katalytische Zentrum verschießenden Deckel formt, deletiert wurde. Durch die vergrößerte Öffnung des Enzyms konnten neben Flavanonen nun auch deren Flavanonglycoside akzeptiert und umgesetzt werden. Das Enzym wurde bereits patentiert (LEY *et al.*, 2015).

Diese Enzymvariante ist vorteilhaft, da die günstigeren glykosylierten Flavonoide verwendet werden könnten. Tatsächlich werden in der Produktion deglykosylierter Flavonoide die Zuckerbestandteile häufig aufwändig chemisch abgespalten. Zusätzlich sind Glykoflavonoide durch eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit gekennzeichnet, wodurch theoretisch höhere Konzentrationen eingesetzt werden könnten.

Ziel der in diesem Abschnitt dargestellten Experimente war es den mit *E. coli* SE1 CHI_sERed entwickelten Prozess auf *E. coli* SE1 delLidCHI_sERed zu übertragen. Die aufgezeichneten Daten und Analyseergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

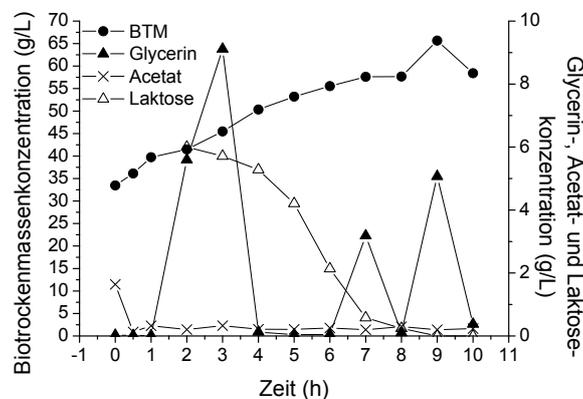


Abbildung 32: Übertragung des Prozesses auf den *E. coli*-SE1-Stamm delLid CHI_sERed. Verlauf der Biotrockenmassen-, Glycerin- und Laktosekonzentrationen in der Proteinproduktionsphase. Hochzelldichtekultur mit Substratwechsel.

In der *batch*-Phase wurden 20 g L^{-1} Glucose vorgelegt. Nachdem das Ende der *batch*-Phase durch einen Sauerstoff-*peak* erkannt wurde, wurde eine exponentielle *fed-batch*-Phase mit 40 w/v-% Glucose-*feed*-Medium gestartet. Das Medium wurde gewechselt, nachdem eine optische Dichte von 100 rel. AU erreicht war. Es folgte eine exponentielle *fed-batch*-Phase mit Glycerin. Als Initialwert für die Kalkulation des exponentiellen *feed*-

Profils (*Glycerin-feed*) wurde der Biotrockenmassekonzentrationswert verwendet, der den Simulationsdaten zum Zeitpunkt der Umschaltung entnommen wurde (*Glucose-feed*). Zusätzlich wurde der Ausbeutekoeffizient im Programm entsprechend des Substratwechsels auf $Y_{X/S} = 0,67$ erhöht. Auf diese Weise sollte eine nahtlose gleichartige Fütterung gewährleistet werden.

Direkt nach dem Medienwechsel erfolgte die Induktion durch Zugabe von Laktose auf $6,00 \text{ g L}^{-1}$. Die Proteinproduktionsphase erstreckte sich über einen Zeitraum von 8 h, in denen die Laktose vollständig verbraucht wurde. In den letzten beiden Stunden des Experiments konnte keine Laktose mehr in der Kulturbrühe nachgewiesen werden.

Nach 20,5 h, zeitgleich mit der Induktion, wurde eine erste Überfütterung festgestellt. Es wurde eine maximale Glycerinkonzentration von $9,11 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Die Acetatkonzentration stieg während der Überfütterung von $0,20 \text{ g L}^{-1}$ um 60 % auf $0,33 \text{ g L}^{-1}$ an. Als Reaktion wurde das exponentielle *feed*-Profil beendet und eine konstante Pumprate von $37,26 \text{ mL h}^{-1}$ eingestellt. Die Acetatkonzentration sank wieder auf einen Wert von $0,21 \text{ g L}^{-1}$ ab. Nach zwei weiteren Stunden wurde der \dot{V}_{feed} auf $44,71 \text{ mL h}^{-1}$ erhöht. Nach 24,5 h und 26,5 h erfolgten weniger stark ausgeprägte Überfütterungen, denen analog durch Unterbrechungen des *feeds* entgegengewirkt wurde. Die Acetatkonzentration verblieb dadurch über den restlichen Versuchszeitraum relativ konstant bei ca. $0,20 \text{ g L}^{-1}$. Es wurden eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $65,67 \text{ g L}^{-1}$ und $OD_{600} = 197,97$ rel. AU erreicht. Der Verbrauch an wässriger Ammoniaklösung (10 Gew.-%) belief sich auf 183 mL. Für die Anreicherung der Begasungsluft wurden während des Versuches 222 L reiner Sauerstoff verbraucht.

Die Proteinproduktion wurde via SDS-PAGE untersucht. In Abbildung 33 sind die erhaltenen Gele dargestellt.

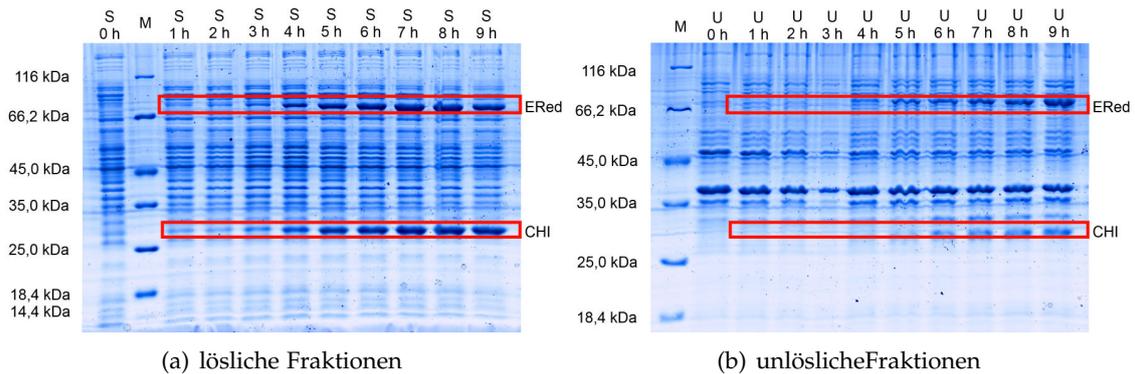


Abbildung 33: SDS-PAGE: Übertragung des Prozesses auf *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed. links: lösliche Fraktionen, rechts: unlösliche Fraktionen. Die Proben wurden auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

Mit der in der Kultivierung produzierten Biomasse wurden parallel Biotransformationsexperimente mit Naringenin (4.3.6.1) und Naringin (4.3.6.2) in Doppelbestimmung durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit beider Prozesse zu gewährleisten.

4.3.6.1 Umsetzung von Naringenin zu Phloretin

Zwei Biotransformationen wurden parallel im 100 mL-Maßstab, in verschlossenen Flaschen, unter Rühren in einem auf 30 °C temperierten Wasserbad durchgeführt. Die erfassten Verläufe der Flavonoidkonzentrationen während der Umsetzung wurden in Abbildung 34 dargestellt.

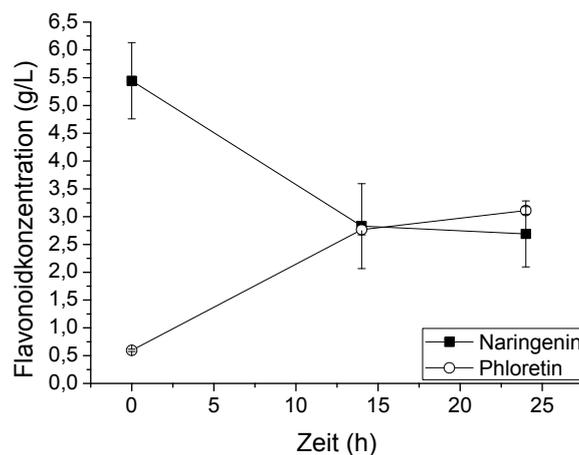


Abbildung 34: Übertragung des Prozesses auf den Produktionsstamm *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed Biotransformation mit Biomasse, die mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin produziert wurde. Verlauf der Konzentrationen von Naringenin und Phloretin.

Aus $6,04 \text{ g L}^{-1}$ Naringenin wurden innerhalb von 24 h $3,11 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin produziert. Dies entsprach einer Ausbeute von 51,49 %. Der Standardfehler betrug $0,05 \text{ g L}^{-1}$, was prozentual 1,60 % der gemessenen Konzentration darstellte. Das mit dem Produktionsstamm *E. coli* SE1 CHI_sERed entwickelte Hochzelldichtekultivierungsprotokoll konnte demnach erfolgreich auf den neuen *E. coli*-Produktionsstamm SE1 delLidCHI_sERed übertragen werden. Die Produktion der angestrebten Phloretinkonzentration und der zu erzielenden Ausbeute konnte reproduziert werden.

4.3.6.2 Umsetzung von Naringin zu Naringindihydrochalkon

Auch mit Naringin wurden in Doppelbestimmung Biotransformationen analog durchgeführt. Die HPLC-Analyse wurde vom Projektkoordinator Symrise AG (Holzminden, Deutschland) durchgeführt. Die erfassten Verläufe der Flavonoidkonzentrationen während der Umsetzung sind in Abbildung 35 dargestellt.

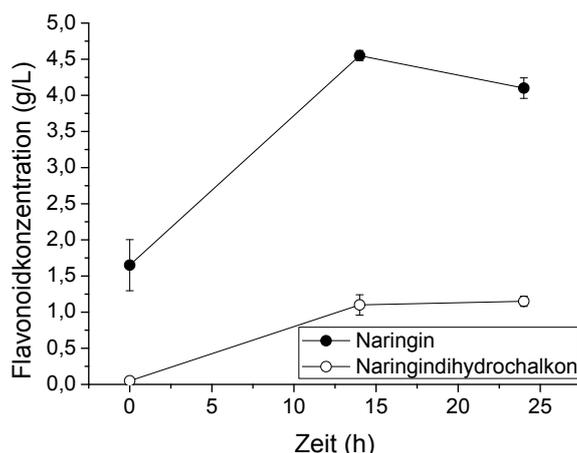


Abbildung 35: Übertragung des Prozesses auf den Produktionsstamm *E. coli* SE1 delLid CHI_sERed Biotransformation mit Biomasse, die mit Substratwechsel von Glucose zu Glycerin produziert wurde. Verlauf der Konzentrationen von Naringin und Naringindihydrochalkon.

Durch die gezielte Änderung der Chalkonisomerase wurde das Substratspektrum des Prozesses erfolgreich erweitert und die Umsetzung der glykosylierten Form des Naringenins, dem Naringin, ermöglicht. Aus $5,65 \text{ g L}^{-1}$ Naringin wurden innerhalb von 24 h $1,15 \text{ g L}^{-1}$ Naringindihydrochalkon produziert. Dies entsprach einer Ausbeute von 20,36 %. Der Standardfehler betrug auch in diesem Fall $0,05 \text{ g L}^{-1}$, was prozentual 4,35 % der gemessenen Konzentration darstellte. Die Ausbeute war demnach um 31 % geringer als im Parallelexperiment mit Naringenin. Die Möglichkeit glykosylierte Flavonoide

umzusetzen machte den Prozess dennoch zu einem umso vielseitiger einsetzbaren Plattformprozess.

Die Verläufe der Flavonoidkonzentrationen in den parallel durchgeführten Umsetzungsexperimenten zeigten einen auffälligen Unterschied. Bei der Biotransformation von Naringenin zeigte sich, dass zum Zeitpunkt (t_0) nach der Flavonoidzugabe bereits eine nahezu homogene Durchmischung erreicht wurde. Naringin ist mit einer Wasserlöslichkeit von $1,00 \text{ g L}^{-1}$ um ein Vielfaches besser in Wasser löslich als Naringenin und bei den Biotransformationsexperimenten mit Naringin wurde analog verfahren. Dennoch war in den direkt nach der Substratzugabe entnommenen Proben keine gleichmäßige Verteilung des Naringins in der Kulturbrühe nachweisbar. Tatsächlich waren erst 28,95 % des eingesetzten Naringins in Lösung.

Die Proben wurden in diesem Fall zwar nicht im eigenen Haus sondern durch den Projektpartner Symrise AG aufbereitet und analysiert, eine Abweichung im Präparationsprotokoll konnte jedoch ausgeschlossen werden. Die Vorgehensweise, welche im Rest dieser Arbeit genutzt wurde, wurde durch den Projektpartner adaptiert. Vermutlich war die Suspendierung in Propylenglykol nicht im gleichen Maß erfolgreich wie mit Naringenin. In diesem Fall würde ein größerer Anteil des Substrates über einen längeren Zeitraum auf der Oberfläche der Kulturbrühe im Reaktor treiben. Da die Suspendierung zweimal in separaten Gefäßen durchgeführt wurde und in beiden Fällen das gleiche Ergebnis erhalten wurde, konnte ein praktischer Fehler allerdings ausgeschlossen werden. Vermutlich kam es zu dieser Abweichung aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten in dem verwendeten Propylenglykol.

4.4 *Scale-up in den 30 L-Maßstab*

Der Prozess wurde im Folgenden in den 30 L-Maßstab übertragen. Eine Anreicherung der Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff wäre im industriellen Maßstab aus ökonomischen und sicherheitstechnischen Gründen nicht möglich. Aufgrund dessen sollte auch im angestrebten *scale-up* der Kopfraumdruck genutzt werden, um die benötigte Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

Ein erster *scale-up*-Versuch schlug fehl (nicht dargestellt). Mithilfe des dabei gewonnenen Prozesswissens konnten aber gezielt für den Folgeversuch nötige Einstellungen der Startparameter vorgenommen werden und eine detaillierte Prozesssteuerung konzipiert werden. Die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration wurde neben der Rührergeschwindigkeit um die Begasungsrate als zweite Stufe und eine stufenweise Druckerhö-

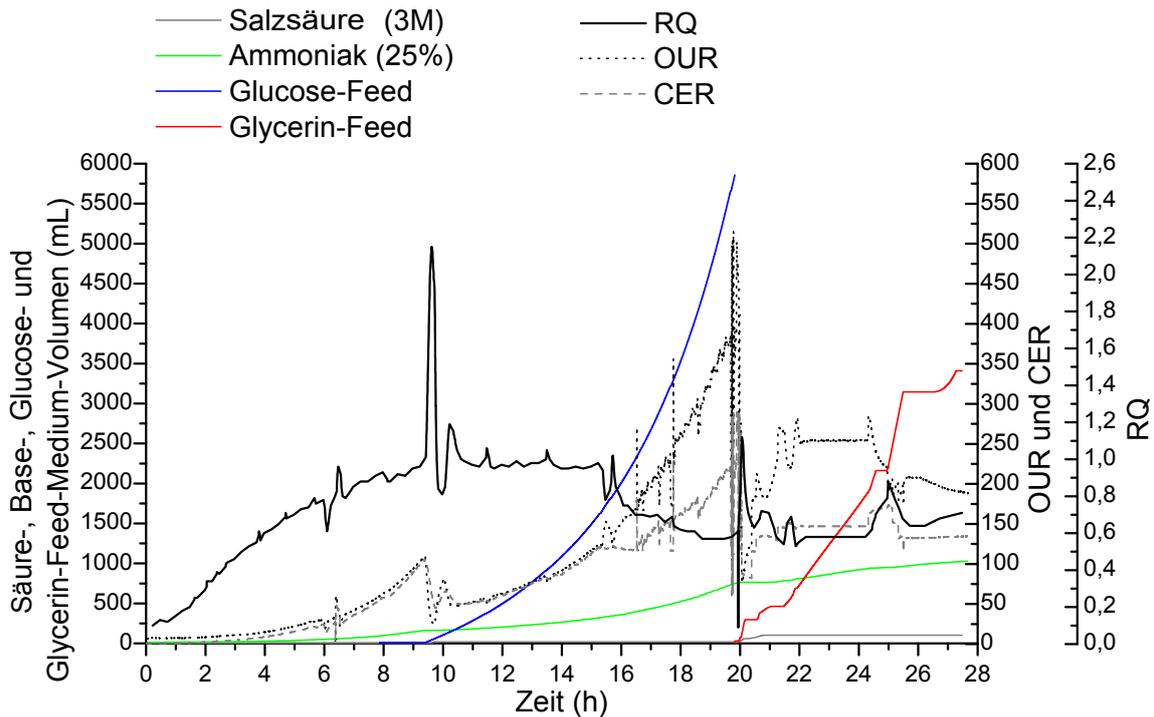
hung als dritte Regelstufe ergänzt. Diese technischen Lösungen sind im industriellen Maßstab notwendig, da dann typischerweise die Schaumbildung zu einem großen Problem wird. Dies steht mit der Dosage von Antischaummitteln im Zusammenhang, da hierdurch die konzipierten Volumina nicht eingehalten werden könnten. Zum anderen können die angestrebten Produkttiter herab gesetzt werden und damit die anfallenden Prozesskosten steigen (SAHM *et al.*, 2012).

Im Labormaßstab kam es im Zusammenhang mit Überfütterungen oft sehr schnell zur Lyse und damit zu Schaumbildung. Die Überfütterungen ließen sich aufgrund fehlender *online*-Analytik und *feedback*-Regulation nur indirekt und verzögert feststellen. Aufgrund dessen wurden für den *scale-up* über MFCS Sicherheitsalgorithmen implementiert, die sich am Vorgehen im Labor orientierten. In der *fed-batch*-Phase in der auf Glucose basierendes *feed*-Medium verwendet wird, sollte das Fütterungsprofil im 2 h-Takt unterbrochen werden. Danach wurde als Prüfkriterium ein Anstieg des *DO*-Wertes auf über 50 % festgelegt. Die Fütterung sollte erst fortgesetzt werden nachdem dieser Wert erreicht wurde. Auf diese Weise sollten selbst geringfügige Überfütterungen unterbunden werden, um einen optimalen Kulturverlauf zu gewährleisten.

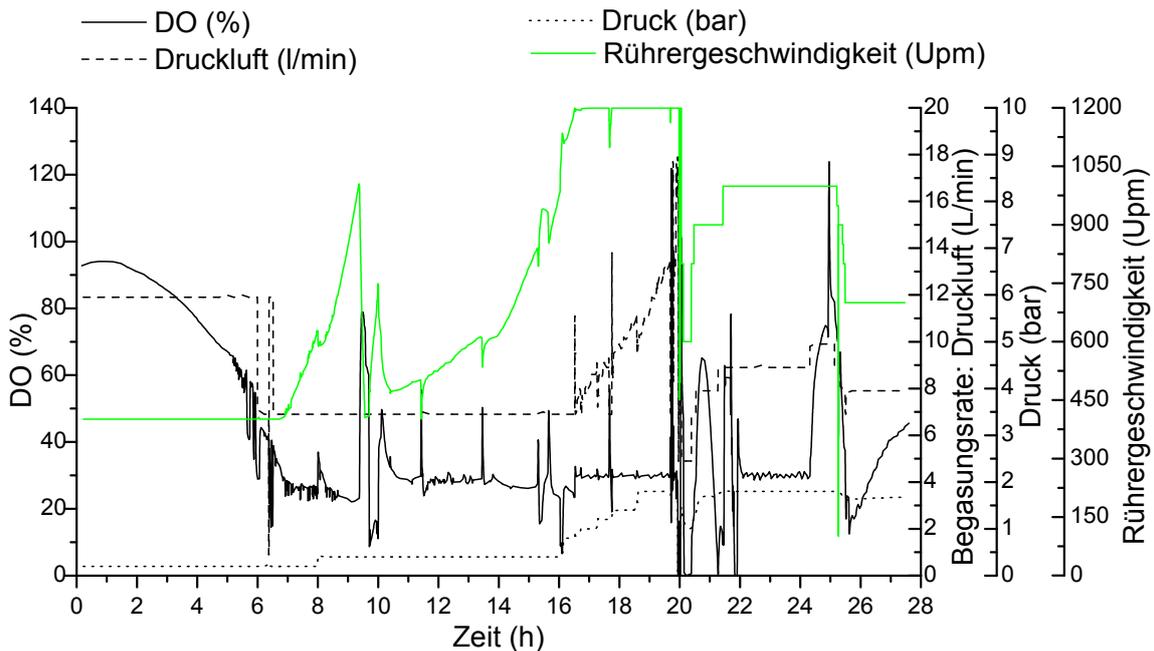
Nach dem Substratwechsel zu Glycerin sollte die Medienzugabe in Abhängigkeit von *OTR*, *CER* und *RQ* automatisch geregelt werden. Der Prozess wurde auf diese Weise bis auf die Laktoseaddition und die Flavonoidzugabe vollständig automatisiert.

4.4.1 Experimentelle Übertragung des Prozesses in den 30 L-Maßstab

Analog zum Laborprotokoll wurde die Medientemperatur auf 30 °C thermostatiert und pH 7,0 durch Titration von Ammoniakwasser (25 Gew.-%) reguliert. Die Kaskadierung der Rührergeschwindigkeit, der Begasungsrate und des Kopfraumdruckes wurden so programmiert, dass die Sauerstoffsättigung auf *DO* = 30 % geregelt wurde. Die Mindestgeschwindigkeit des Rührers wurde auf 400 Upm eingestellt. Bereits zu Beginn des *batches* wurde im Kopfraum ein Druck von 0,2 bar eingestellt. Da im oben erwähnten Vorversuch durch eine Begasungsrate von 15 L min⁻¹ (1 vvm) der für das Anlaufen der Regelkaskade notwendige Wert *DO* = 30 % nicht unterschritten wurde, wurde in diesem Versuch zu Beginn eine niedrigere Rate gewählt. Es wurde mit 12 L min⁻¹ (0,8 vvm) begast. Der Volumenstrom wurde aus demselben technischen Grund noch während der *batch*-Phase ein weiteres Mal auf 7 L min⁻¹ (0,47 vvm) angepasst, wie Abbildung 36 entnommen werden kann.



(a) feed-Verlauf



(b) Begasung

Abbildung 36: Scale-up in den 30 L-Maßstab: feed- und Begasungs-Verlauf

Die Rührerkaskade startete nach 6,84 h. Da die Rührgeschwindigkeit sehr schnell anstieg, wurde der Kopfraumdruck nach 8,00 h auf 0,4 bar verdoppelt. Nach 9,5 h kennzeichnete ein *DO-peak* das Ende der *batch*-Phase. Das exponentielle *feed*-Profil mit Glucose-

basiertem Medium wurde sofort gestartet. Nachdem nach 16,50 h die Rührerhöchstgeschwindigkeit von 1.200 Upm erreicht wurde, startete die Regelung über die Begasungsrate und den Kopfraumdruck. Nach 18,63 h wurde mit 1,8 bar der höchste Druck während des Experiments erreicht.

Die Induktionsphase wurde nach 19,72 h manuell eingeleitet und das exponentielle Fütterungsprofil wurde abgebrochen. Bevor die Laktose manuell zugegeben werden konnte, musste der Kopfraumdruck zunächst stufenweise abgesenkt werden. Dadurch wurde zum einen verhindert, dass übermäßig Schaum gebildet wurde, zum anderen wurde auf diese Weise auch einem damit verbundenen Überlaufen des Reaktorkessels entgegengewirkt. Für die Induktion der Proteinproduktion wurden abweichend von den Laborversuchen 100 g trockene Laktose verwendet. Die Laktose wurde demnach nicht schon vor der Zugabe in einem Aliquot der Kulturbrühe suspendiert.

Die Induktion erfolgte verzögert bei $OD_{600} = 151$ rel. AU. Die OD_{600} -Messungen wurde bereits beim Vorversuch mit dem Photometer, welches im TCI verwendet wurde, abgeglichen. Es war keine Umrechnung notwendig. Der gesamte Induktionszeitraum umfasste dennoch 8,46 h. Die Laktose wurde innerhalb von 4 h vollständig verbraucht, wodurch ein Verdünnungseffekt ausgeschlossen werden konnte. Dies deutete auf eine erfolgreiche Induktion hin.

Der Verlauf der Proteinproduktionsphase wurde anschließend ausführlicher analysiert. Die gesammelten Analyseergebnisse sind separat in Abbildung 37 dargestellt.

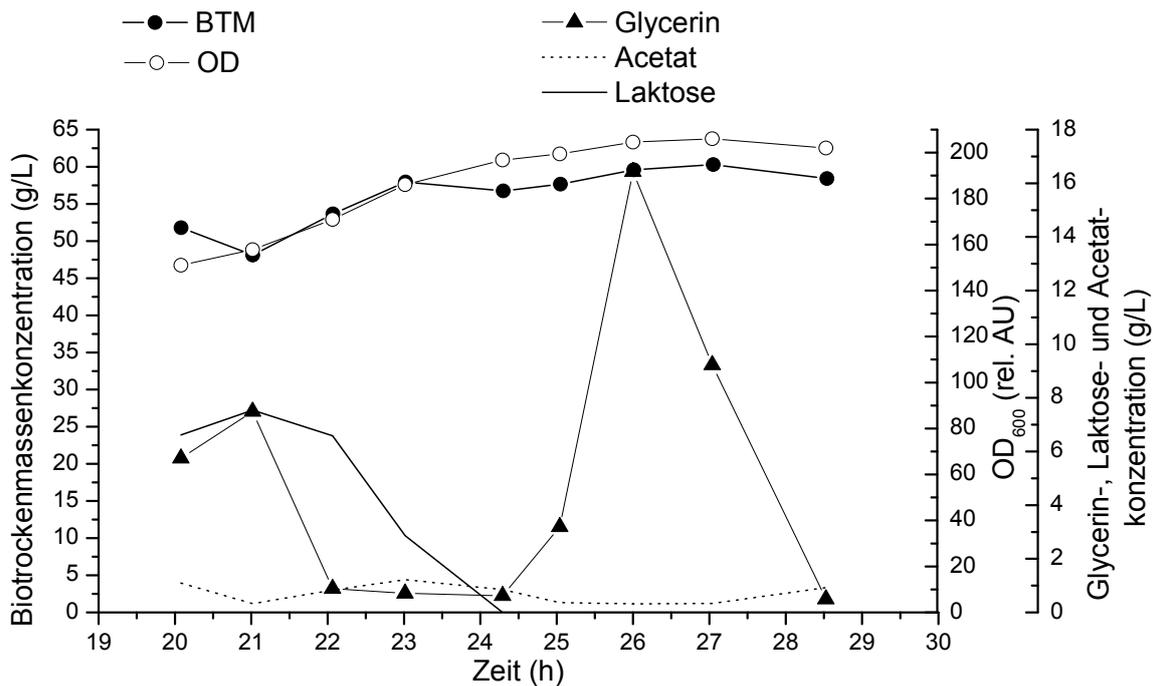


Abbildung 37: Scale-up in den 30 L-Maßstab. Verlauf der Biotrockenmassen-, Glycerin- und Laktose- und Acetatkonzentrationen in der Proteinproduktionsphase. Hochzelldichtekultivierung mit Substratwechsel.

Direkt nach der Zugabe der Laktose wurde das *feed*-Medium durch Umschalten eines Ventils gewechselt. Nach dem Substratwechsel zum Glycerin-basierten Medium erfolgte die Regelung der Medienpumpe in Abhängigkeit von *CER*, *OUR*, *RQ* (siehe Abbildung 36(a)). Der Kopfraumdruck wurde bei 1,8 bar belassen. Der \dot{V}_{Luft} wurde auf $9,00 \text{ L min}^{-1}$ abgesenkt. Nach 24,40 h schaltete sich aufgrund einer Überfütterung die *feed*-Pumpe über einen Zeitraum von 1,2 h ab. Während dieser Zeitspanne erfolgte eine Begasung mit 10 L min^{-1} .

Als Reaktion auf eine weitere festgestellte Überfütterung (Maximum: $16,4 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin) wurde die *feed*-Pumpe nach 27,27 h vollständig abgeschaltet und das Glycerin konnte vollständig verbraucht werden. Die Acetatkonzentration wurde während der Proteinproduktionsphase zwischen $0,31 \text{ g L}^{-1}$ und $1,22 \text{ g L}^{-1}$ gehalten. Die Konzentrationsspitzen waren dabei lediglich von kurzer Dauer, so dass sich der negative Einfluss des Acetats nicht manifestieren konnte. Die Biomasse wurde nach 28,54 h geerntet. Es wurde eine maximale Biotrockenmassenkonzentration von 60 g L^{-1} erreicht.

Zur Analyse der Proteinproduktion wurden die gesammelten Proben für die SDS-PAGE aufgearbeitet und in unlösliche und lösliche Proteinfraktionen aufgeteilt. Die resultierenden Gele wurden in Abbildung 38 dargestellt.

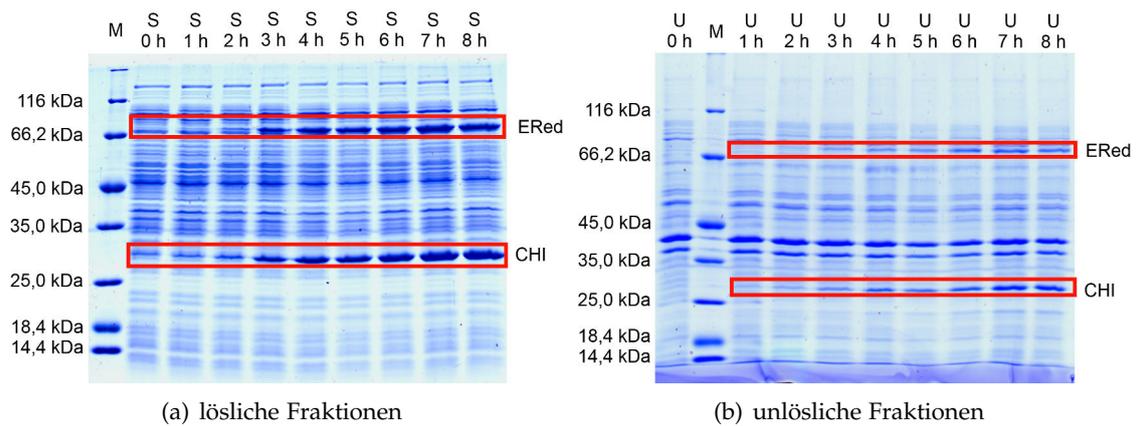


Abbildung 38: SDS-PAGE: *Scale-up* in den 30 L-Maßstab. links: lösliche Fraktionen, rechts: unlösliche Fraktionen. Die Proben wurden auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert. „S“ = lösliche Fraktionen, „U“ = unlösliche Fraktionen.

Vornehmlich in den löslichen Fraktionen war eine deutliche Überproduktion der CHI und der ERed sichtbar. In den letzten 3,00 h waren auch in den unlöslichen Fraktionen deutliche Banden erkennbar.

Für Biotransformationen wurde die Biomasse in zwei Reaktoren aufgeteilt um sowohl Naringenin als auch Naringin umsetzen zu können und so eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Reaktoren wurden vor der Befüllung auf 30 °C vortemperiert, sodass die minimale durch den Umfüllvorgang aufgetretene Abkühlung sofort kompensiert wurde. Die Biomasse wurde für den gesamten Biotransformationszeitraum mit 300 Upm durchmischt. Die Kulturbrühe wurde dabei nicht begast, da die Biotransformation im anaeroben Milieu ablaufen sollte. Es erfolgte weder eine pH-Statierung noch eine Zudosierung von Antischaummittel. Auf diese Weise wurde eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Volumenveränderung verhindert. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse des Biotransformationsverlaufs sind in den Abbildungen 39(a) und 39(b) dargestellt.

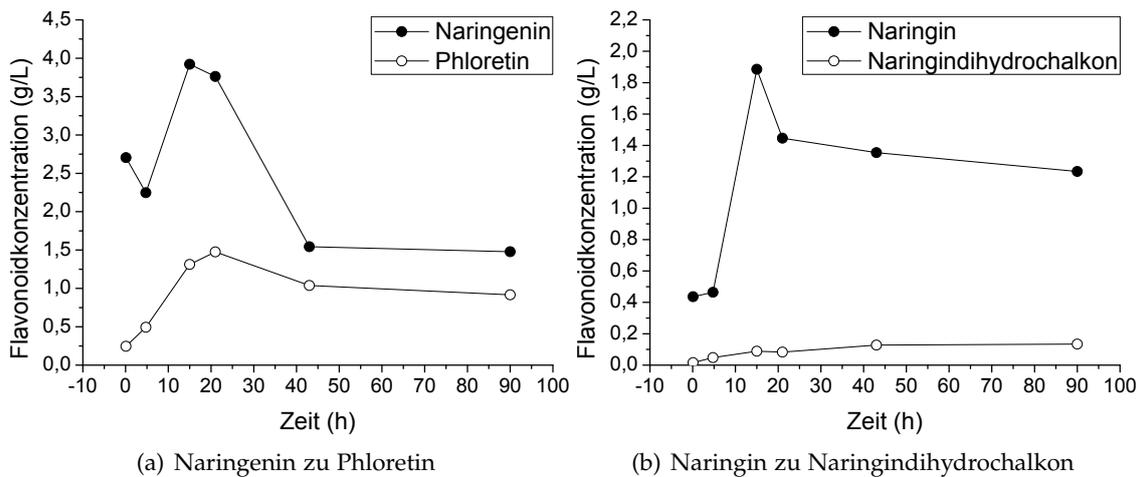


Abbildung 39: Biotransformationen: Scale-up in den 30 L-Maßstab. links: Naringenin zu Phloretin, rechts: Naringin zu Naringindihydrochalkon. Die Proben wurden aus patentrechtlichen Gründen vollständig durch Symrise vermessen.

Es wurden über den im Laborprotokoll vorgesehenen Umsetzungszeitraum hinaus Proben genommen, um auch die Stabilität und gegebenenfalls eine weitere Umsetzung untersuchen zu können. Im Falle des Naringenins wurde nach 21 h die maximale Umsetzung von 28 % festgestellt. Es wurde lediglich ein Produkttiter von $1,48 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Dies entsprach 49,4 % der zu erreichenden Phloretinkonzentration. Nach diesem Zeitpunkt sanken sowohl die Naringenin- als auch die Phloretinkonzentration, was auf ihre bereits im Vorgängerprojekt festgestellte thermische Instabilität zurückzuführen ist. Im Falle des Naringins nahm die Naringindihydrochalkonkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum von 90 h zu. Nach 90 h wurde mit 6,79 % die maximale Umsetzung festgestellt. Es wurde lediglich ein Produkttiter von $0,13 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Dies entsprach 10,0 % der erwarteten Produktkonzentration. Die glykosylierten Derivate schienen eine deutlich bessere thermische Stabilität aufzuweisen.

4.4.2 Maßstabsübertragung des Prozesses in den 30 L-Maßstab

Nachdem in der Prozessentwicklung bereits für einen *scale-up* wichtige biologische Faktoren wie die Generationszahl, die Gestaltung des *seed trains*, der Selektionsdruck und die Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen bedacht wurden, sollten nun auch chemische Faktoren und physikalische Faktoren betrachtet werden.

Die Qualität des verwendeten Wassers wurde als negativer Einflussfaktor ausgeschlossen. Da mit ZYP ein synthetisches Medium verwendet wurde, welches eigens aus den einzelnen reinen Bestandteilen hergestellt wurde, wurde auch die Qualität des Mediums

als negative Einflussgröße ausgeschlossen. Die einzigen Variablen waren in dem oben beschriebenen Experiment die Konzentration der Ammoniaklösung und das verwendete Antischaummittel. Die Ammoniakkonzentration wurde im 2 L-Maßstab auf 10 Gew.-% gesenkt, da so im Falle einer starken Regelung des Reaktorsteuerungssystems der pH-Wert weniger stark schwanken konnte. Im 30 L-Maßstab war dies nicht notwendig. Tatsächlich würde dadurch, dass die Ammoniakkonzentration gesteigert wurde, theoretisch eine kürzere Prozessdauer erreicht werden.

Anstelle des silikonfreien auf Polyethern basierenden Antischaummittels, welches in der Prozessentwicklung verwendet wurde, war beim Projektpartner ein Silikonöl-basiertes Antischaummittel verfügbar. Durch die Verwendung eines anderen Antischaummittels kann der Sauerstofftransport durch das Medium beeinflusst werden. Die Versorgung der Kultur mit Sauerstoff wurde demnach potentiell beeinflusst. Die Bildung von Schaum stellt allerdings einen physikalischen Faktor da, der – neben anderen – im folgenden Abschnitt betrachtet wird.

Über die gegebenen Bioreaktoren hinaus sollten an dieser Stelle nun auch die theoretisch für einen erfolgreichen *scale-up* notwendigen Reaktorbemaßungen ermittelt und als Bezugsgrößen bedacht werden. In diesem Zusammenhang sollten auch dimensionslose Kennzahlen ermittelt und verglichen werden.

Die dafür üblichen Richtlinien basieren auf der Ähnlichkeitstheorie. Neben der geometrischen Ähnlichkeit der Reaktorsysteme gehen die dimensionslosen Kennzahlen stets auch von der hydrodynamischen und energetischen Ähnlichkeit aus. Die Kriterien sind so ausgerichtet, dass alle relevanten Prozessdaten beim *scale-up* möglichst identisch in einem größeren Maßstab realisiert werden können. Dabei betrachtet jede Richtlinie die Beibehaltung eines anderen Auslegungskriteriums. Werden mehrere dieser Richtlinien für eine Übertragung verwendet können sich deswegen Widersprüche ergeben. Die Auswahl des Übertragungskriteriums bzw. der Übertragungskriterien sollte deshalb wohl überlegt erfolgen (WOLF, 1994; CHMIEL, 2011; SAHM *et al.*, 2012; TAKORS, 2014).

Im Folgenden wurden anhand des Laborreaktorsystems alle für einen Vergleich notwendigen Kennzahlen des theoretischen *scale-up*-Reaktors errechnet. Zunächst wurde die geometrische Ähnlichkeit betrachtet. Basierend auf dem 2 L-Laborreaktor wurde gemäß dem folgenden mathematischen Zusammenhang der Reaktordurchmesser (D) des theoretisch notwendigen Reaktors im 30 L-Maßstab berechnet (V = Volumen). Der Nenn-durchmesser stellt in nicht-chemischen Reaktoren wie diesem den Innendurchmesser dar.

Die verwendeten Indices S und L stehen für *scale-up* und Labor.

$$\frac{D_S}{D_L} = \left(\frac{V_S}{V_L} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3a)$$

$$\Rightarrow D_S = D_L \cdot \left(\frac{V_S}{V_L} \right)^{\frac{1}{3}} = 12,8 \text{ cm} \cdot \left(\frac{30 \text{ L}}{2 \text{ L}} \right)^{\frac{1}{3}} = 31,6 \text{ cm} \quad (3b)$$

Mit dem somit erhaltenen Reaktordurchmesser ließen sich über den Schmalheitsgrad s und die Rührerdurchmesserrelation auch die Höhe des nötigen Reaktors (H) und der Durchmesser der notwendigen Rührorgane (d) berechnen.

$$s = \frac{H_L}{D_L} = \frac{H_S}{D_S} \quad (4a)$$

$$\Rightarrow H_S = \frac{H_L}{D_L} \cdot D_S = \frac{24 \text{ cm}}{12,8 \text{ cm}} \cdot 31,6 \text{ cm} = 59,2 \text{ cm} \quad (4b)$$

$$\frac{d_L}{D_L} = \frac{d_S}{D_S} \quad (5a)$$

$$\Rightarrow d_S = \frac{d_L}{D_L} \cdot D_S = \frac{4,8 \text{ cm}}{12,8 \text{ cm}} \cdot 31,6 \text{ cm} = 11,8 \text{ cm} \quad (5b)$$

Wäre im *scale-up*-Experiment die Zahl der Rührerstufen beibehalten worden, ergäbe sich nach dem folgenden Zusammenhang der Rührorganabstand (Indice R steht für Rührorgan).

$$\frac{h_{RL}}{D_L} = \frac{h_{RP}}{D_S} \quad (6a)$$

$$\Rightarrow h_{RS} = \frac{h_{RL}}{D_L} \cdot D_S = \frac{11,4 \text{ cm}}{12,8 \text{ cm}} \cdot 31,6 \text{ cm} = 28,1 \text{ cm} \quad (6b)$$

Wäre dieser Rührorganabstand und die Zahl der Rührerstufen von 2 beibehalten worden, wäre die geplante Hochzelldichtekultivierung in diesem Arbeitsvolumen höchstwahrscheinlich nicht möglich gewesen. Um einem Rückgang der Biomasseausbeute entgegenzuwirken, wurden drei zusätzliche axiale Rührer eingebaut. Als Rührertypus wurden ebenfalls Rushton-Rührer verwendet. Der Einfluss der Strömungsbrecher auf die Durchmischung konnte an dieser Stelle aufgrund unzureichender Daten nicht betrachtet werden.

Da weder im 2 L- noch im 30 L-Maßstab Messungen zur Ermittlung des Leistungseintrags erfolgten, konnte der volumenspezifische Leistungseintrag $\frac{P}{V}$ (P = Leistung) weder ermittelt, noch in der mathematischen Maßstabsübertragung betrachtet werden. Im Produktionsmaßstab sind die erreichbaren Leistungseinträge aus technischen und wirtschaftlichen Gründen in der Regel deutlich niedriger als im Labormaßstab. Da die

Mischzeit (Θ_{90}) zum Teil vom Leistungseintrag abhängt, steigt sie mit sinkendem volumetrischem Leistungseintrag an. Demnach kann beim *scale-up* auch dieses Kriterium kaum aufrecht gehalten werden. Eine mathematische Abschätzung der Mischzeit nach EINSELE (1978) würde ebenfalls den Leistungseintrag erfordern. Aus diesem Grunde konnten die Mischzeit (Θ_{90}) und die Mischzeitkennzahl (N_M) als Vergleichskriterien nicht mit in die Auswertung einfließen.

Ein weiterer Zusammenhang, der oft für die Übertragung aerober Prozesse herangezogen wird, ist der Sauerstofftransfer. Die $k_L a$ -Werte (volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient) sind im Prozessverlauf nicht konstant. Bei der Verwendung des Gelöstsauerstoffs als Leitgröße wäre zusätzlich auch die Berücksichtigung der Gradienten in den Reaktoren notwendig. Deswegen ist die Verwendung als Übertragungskriterium sehr schwierig. Aufgrund veränderlicher Prozessbedingungen würden hierfür bei einem *fed-batch*-Prozess mehrere Bezugspunkte betrachtet werden. Bei dem experimentellen *scale-up* wurde eine Reihe von prozesstechnischen Abweichungen vorgenommen. Während im Labormaßstab die Rührerdrehzahl und Sauerstoffanreicherung für den Erhalt der Sauerstoffsättigung genutzt wurden, erfolgte dies beim Industriepartner durch die Rührgeschwindigkeit, die Begasungsrate und den Kopfraumdruck. Zusätzlich wurde ein abweichendes Antischaummittel eingesetzt. Durch die vorgenommenen Veränderungen wurde der $k_L a$ -Wert also komplex beeinflusst. Da neben diesen Veränderungen bereits im *batch* ein definierter Kopfraumdruck eingestellt wurde, ist ein mathematischer Vergleich zu keinem Prozesszeitpunkt sinnvoll gewesen. Daher wurde dieses Kriterium nicht betrachtet.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung der Belüftungsrate ($\dot{V} = \text{Volumenstrom}$) als Übertragungskriterium dar. Wird allerdings einfach die folgende Annahme getroffen:

$$\dot{V}_L = \dot{V}_S \quad (7)$$

und die Begasungsrate beibehalten, kann es zu einer weiteren Veränderung der $k_L a$ -Werte kommen. Abhängig vom *scale-up*-Maßstab kann diese Herangehensweise zu sehr hohen Gasleerrohrgeschwindigkeiten führen, was wiederum zu einer starken Schaumbildung führen kann. Schaum wiederum verringert den Sauerstofftransfer. Die Belüftung ist darüber hinaus stark abhängig von der Art und Geometrie der Rührorgane und der Betriebsdrehzahl des Rührers (n). Dies wird durch die Belüftungskennzahl Q in Zusammenhang gebracht.

$$Q = \frac{\dot{V}_L}{n_L} \cdot d_L^3 \quad (8a)$$

$$\frac{Q_L}{Q_S} = \left(\frac{d_L}{d_S} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (8b)$$

$$\Rightarrow Q_S = \frac{Q_L}{\left(d_L \div d_S \right)^{\frac{2}{3}}} \quad (8c)$$

$$Q_S = \frac{2,00 \cdot 10^2}{\left(4,8 \text{ cm} \div 11,8 \text{ cm} \right)^{\frac{2}{3}}} = 3,67 \cdot 10^2 \quad (8d)$$

Aus diesem Zusammenhang wurden die folgenden Formeln für den nötigen Volumenstrom und die Betriebsdrehzahl erhalten.

$$\dot{V}_S = \frac{Q_S}{d_L^3} \cdot n_L \quad (9a)$$

$$n_S = n_L \cdot \left(\frac{d_L}{d_S} \right)^{\frac{11}{3}} \cdot \frac{\dot{V}_S}{\dot{V}_L} \quad (9b)$$

Gegenüber der Herangehensweise über die Rührer-Reynolds-Zahl Re wird auf diese Weise die Begasungsrate berücksichtigt. Die Reynolds-Zahl kann in der Regel im *scale-up* nicht konstant gehalten werden.

$$Re_L = Re_S \quad (10a)$$

$$\frac{n_S}{n_L} = \left(\frac{d_L}{d_S} \right)^2 \quad (10b)$$

Die von der Belüftungskennzahl abgeleiteten Zusammenhänge für \dot{V}_S und n_S wurden auf ein Minimalwertproblem reduziert und gemeinsam gelöst. Dabei wurden aus Vergleichbarkeitsgründen die am Ende der *batch*-Phase im Labormaßstab notwendigen \dot{V}_L - und n_L -Werte für die Rechnung verwendet.

$$\dot{V}_S = 10,9 \text{ L min}^{-1} \quad (11a)$$

$$n_S = 493 \text{ Upm} \quad (11b)$$

Eigentlich wird die Rührgeschwindigkeit nur bei einer Scherstresssensitivität des Produktionsstammes als wichtiges Übertragungskriterium herangezogen. *E. coli* hat keine derart ausgeprägte Scherstresssensitivität. Darüber hinaus sind in der Regel in größeren Reaktorvolumina geringere Drehzahlen notwendig, um den gleichen Energieeintrag zu erzielen. Als einen letzten wichtigen Faktor wurde die Rührerspitzen geschwindigkeit (*ITS*, engl.: *impeller tip speed*) betrachtet. Der *ITS* ist definiert als:

$$ITS = \pi \cdot n_{max} \cdot d \quad (12)$$

Ab einer Geschwindigkeiten von $3,2 \text{ m s}^{-1}$ können generell Zellen beschädigt werden. Die Rührerspitzen­geschwindigkeit von Produktionsreaktoren liegen in der Regel aber zwischen 5 m s^{-1} und 7 m s^{-1} (JUNKER, 2004). Für die Berechnung vom ITS musste zunächst die höchste erforderliche Rühr­geschwindigkeit ermittelt werden. Unter Betrachtung der geometrischen Ähnlichkeit ergab sich für diesen Zweck der folgende Zusammenhang:

$$\frac{n_{Lmax} \cdot d_S}{n_{Smax} \cdot d_L} = \left(\frac{V_S}{V_L} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (13a)$$

$$\Rightarrow n_{Smax} = \frac{n_{Lmax} \cdot d_S}{(V_S \div V_L)^{\frac{1}{3}} \cdot d_L} \quad (13b)$$

$$n_{Smax} = \frac{22,22 \text{ s}^{-1} \cdot 0,12 \text{ m}}{(30 \text{ L} \div 2 \text{ L})^{\frac{1}{3}} \cdot 0,05 \text{ m}} = 22,22 \text{ s}^{-1} \quad (13c)$$

$$ITS_S = \pi \cdot 22,22 \text{ s}^{-1} \cdot 0,12 \text{ m} = 8,26 \text{ m s}^{-1} \quad (14)$$

Für die im Labor und bei dem Industriepartner verwendeten Reaktoren wurden die oben beschriebenen Maße und Kennzahlen analog ermittelt. Für Vergleichszwecke werden alle Ergebnisse in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Mathematischer scale-up vom 2 L- in den 30 L-Rührreaktormaßstab. Zusammenfassung und Gegenüberstellung der Gerätemaße und Kennzahlen des errechneten, theoretisch notwendigen Reaktors und der beiden experimentell verwendeten Reaktoren.

Kennzahl	Einheit	Biostat Aplus (Labor)	Biostat Cplus (scale-up)	Kalkulierter Reaktor	Anmerkungen
D	cm	12,8	26,7	31,56	
H	cm	24,0	77,2	59,18	
$s (H/D)$		1,875	2,891	1,875	
d	cm	4,8	10,4	11,8	
d/D		0,375	0,389	0,375	
h_R	cm	11,4	9,0	28,1	
h_R/D		0,890	0,337	0,890	
V	L	2	30	30	
	L min^{-1}	2	7	11	
\dot{V}	$\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$	$3,33 \cdot 10^{-5}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-4}$	während der batch-
	vvm	1,00	0,23	0,36	Kultivierung
Q		$2,01 \cdot 10^{-2}$	$8,31 \cdot 10^{-3}$	$3,67 \cdot 10^{-2}$	
n	Upm	900	749	493	
	s^{-1}	15,0	12,5	8,2	am Ende der batch-Phase
n_{max}	Upm	1.333	1.200	1.333	maximale
	s^{-1}	22,2	20,0	22,2	Drehzahl
ITS	m s^{-1}	3,35	6,53	8,26	

Abhängig vom vorliegenden Prozess empfehlen sich unterschiedliche Herangehensweisen an die Reaktorkonstruktion und den *scale-up*. Eine Statierung des *OTR* erfordert beispielsweise theoretisch einen konstanten volumetrischen Energieeintrag. Ähnliche Durchmischungscharakteristika werden durch eine konstante Rührerdrehzahl erreicht. Konstante Reynoldszahlen führen zu ähnlichen Strömungsmustern und die Beibehaltung der Rührerspitzen-geschwindigkeit verhindert einen Anstieg von mechanischem und hydrodynamischem Stress. All diese Vorstellungen sind in der Regel nicht technisch umzusetzen. Bei Prozessen wie dem vorliegenden *fed-batch*-Hochzell-dichteprozess existiert eine große Anzahl Faktoren, welche sich im Prozessverlauf stark ändern. Bei dem beschriebenen Experiment stellten die Mischproblematik und die Versorgung mit Sauerstoff die prädominanten Ansatzpunkte dar.

Wie den geometrischen Kennzahlen zu entnehmen ist, wies der Reaktor, welcher für die *scale-up*-Experimente zur Verfügung stand, einen um 54 % größeren Schlankheitsgrad auf als der Laborreaktor. D.h. dass das Volumen/Oberfläche-Verhältnis im *scale-up* weniger stark anstieg als es mit dem errechneten Reaktor der Fall gewesen wäre. Dies wirkt sich positiv auf die Substrat- und Sauerstoffgradienten im Reaktor aus. Auch die Kühlung wird – neben der mechanisch eingetragenen Energie – durch die Oberfläche/Volumen-Relation beeinflusst (LEE, 1996). Gerade bei *fed-batch*-Prozessen wird die Kühlung des Reaktors mit wachsendem Arbeitsvolumen und steigender Zelldichte durch die metabolisch generierte Wärmeenergie ein immer entscheidenderer Faktor. Im Experiment konnte die Temperatur erfolgreich auf 30 °C statiert werden.

Die Rührer wiesen im *scale-up*-Reaktor einen in Relation zum Reaktornenn-durchmesser größeren Durchmesser auf. Der 30 L-Reaktor wurde im Gegensatz zum Laborreaktor, für eine optimale Durchmischung des Mediums und als ein Mittel die Begasung zu optimieren zusätzlich um drei weitere Rushton-Rührer ergänzt. Die dadurch erreichte Distanz zwischen den einzelnen Rührer-stufen war damit sogar 21 % geringer als im Labormaßstab. Diese Veränderung gewährleistete eine bessere Durchmischung des Mediums zu jedem Zeitpunkt des Prozesses, da sich das Arbeitsvolumen, bedingt durch die Art des Prozesses, stark veränderte.

Für den theoretischen Reaktor ergaben sich eine Begasungsrate von 11 L min^{-1} (0,36 vvm) und eine Rührergeschwindigkeit von 493 Upm für die *batch*-Phase. Diese Rechnungen setzten voraus, dass keine weitere Veränderung am Reaktor vorgenommen wurde. Jedoch wurde im Experiment am Anfang ein erhöhter Kopfraumdruck eingestellt, wodurch die Sauerstofflöslichkeit im Medium erhöht wurde. Dies konnte bei dem mathematischen

scale-up nicht berücksichtigt werden. Die anfänglich im Experiment eingestellte Belüftungsrate von 12 L min^{-1} musste deswegen auf 7 L min^{-1} (0,23 vvm) korrigiert werden, damit die Gelöstsauerstoffkonzentration unter 50% sinken konnte, was die Voraussetzung für das Anlaufen der Rührerkaskade war. Am Ende der *batch*-Phase war mit 749 Upm trotz der niedrigen Begasungsrate eine in Relation zum Laborreaktor geringere Drehzahl ausreichend.

Als ein primäres Ziel sollte der *DO*-Wert bei 30% konstant gehalten werden, ohne die Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff anreichern zu müssen. Mit einem Kopfraumdruck von 1,8 bar und einer maximalen Rührergeschwindigkeit von 1.200 Upm wurde bei der experimentellen Übertragung beinahe die technische Grenze des Reaktorsystems erreicht. Eine Anreicherung der Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff war nicht erforderlich. Auch diese aus Sicherheitsgründen gesetzte Zielsetzung wurde also erfolgreich umgesetzt. Damit stand einer Übertragung in den Produktionsmaßstab aus technischer Sicht nichts entgegen.

Als ein indirektes Maß für den Scherstress wurde die Rührerspitzen geschwindigkeit berechnet. Im Labormaßstab wurde ein Wert von $3,35 \text{ m s}^{-1}$ erhalten. Bei dieser Geschwindigkeit muss nicht mit einer Schädigung der Zellen gerechnet werden. Im Experiment wurde ein *ITS*-Wert von $6,53 \text{ m s}^{-1}$ erreicht. In diesem Bereich kann zwar mit Zellschäden und damit verbundener Schaumbildung gerechnet werden, Geschwindigkeiten dieser Größenordnung sind allerdings in der industriellen Produktion alltäglich. Im mathematisch konstruierten Reaktor wäre eine Maximalgeschwindigkeit von $8,26 \text{ m s}^{-1}$ erreicht worden. Dieser Wert wäre bereits relativ hoch, wobei es auch ähnliche Beispiele in Produktionsprozessen gibt (JUNKER, 2004).

Das Prozessprotokoll wurde darüber hinaus um eine Reihe von regulatorischen Algorithmen ergänzt, womit ein weiterer Grad an Automation erreicht werden konnte. Mit Hilfe dieser technischen Lösungen konnte der Prozess erfolgreich in den 30 L-Maßstab übertragen werden. Gemäß der Zielsetzung wurde mit 60 g L^{-1} die angestrebte Biotrockenmassenkonzentration realisiert. Die Induktion war erfolgreich und es wurde eine hohe Ausbeute löslichen Enzyms erreicht.

Dennoch war im *scale-up* ein Ausbeuterückgang von 50% bei der Phloretinproduktion zu verzeichnen. Bei Ausbeuterückgängen dieser Art handelt es sich um keine Seltenheit bei der Skalierung von biotechnologischen Prozessen (PEUBEZ *et al.*, 2010). Dies hängt mit den damit verbundenen technischen und ökonomischen Möglichkeiten zusammen. In diesem speziellen Prozess kommen hierfür eine Reihe von technischen Gründen in Frage.

Durch den hohen Druck bedingt erhöht sich die CO₂-Konzentration in der Kulturbrühe. CO₂ wirkt in hohen Konzentrationen inhibierend auf das Wachstum der Zellen und stimuliert die Acetatproduktion. Dadurch wird wiederum die Proteinproduktion beeinflusst. Die CO₂-Konzentration ist also ein möglicher Grund für die erhaltene reduzierte Produktausbeute.

Eine weitere Möglichkeit hing mit der *feedback*-Kontrolle der *feed*-Pumpe über den Respirationsquotienten zusammen, welche während der Proteinproduktionsphase eingerichtet wurde. Die Regulation war im beschriebenen Experiment zu träge, wodurch es zu einer Überfütterung mit Glycerin kam, woraufhin der *feed* vollständig abgeschaltet werden musste. Bereits während einer Überfütterung konnte beobachtet werden, dass der DO-Wert anstieg. Dies wies darauf hin, dass aufgrund der hohen Substratkonzentrationen die Aktivität der Bakterien abnahm (LEE, 1996). Es wurde dennoch keine Schaumbildung beobachtet, was mit dem Kopfraumdruck und dem Antischaummittel zusammenhängen konnte. Eine teilweise Lyse der Zellen konnte also nicht vollständig ausgeschlossen werden, wobei gemessen an der erhaltenen Biotrockenmassekonzentration keine ausgeprägte Lyse stattgefunden haben konnte.

Eine weitere mögliche Ursache ist ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation der *feed*-Pumpe zu sehen. Die als Induktionsmittel eingesetzte Laktose kann auch als Kohlenstoffquelle von *E. coli* genutzt werden und beeinflusst damit *CER*, *OUR* und *RQ*. Es wurde analytisch nachgewiesen, dass bereits nach vier der neun Stunden der Produktionsphase keine Laktose mehr in der Kulturbrühe vorlag. Die Laktose wurde so schnell als Kohlenstoffquelle verbraucht, weil der *feed* gestoppt wurde. Dadurch wiederum war der tatsächliche Induktionszeitraum kürzer als in der Prozessentwicklung. Tatsächlich ist anzunehmen, dass in den letzten 5,5 h des Experiments keine weitere Induktion mehr stattfand. Trotz der identischen Dauer der Produktionsphase kann so die Proteinproduktion verschlechtert worden sein. Vermutlich handelte es sich hierbei um die Hauptursache für das erhaltene Ergebnis.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses ist es wichtig möglichst früh möglichst nahe an den späteren Prozessrealitäten zu arbeiten. Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Arbeiten zunächst Aspekte des Prozesses, wie die Plasmidstabilität bei antibiotikafreier Prozessführung und der Austausch des Induktors IPTG durch Laktose, untersucht.

In *food-grade* Prozessen kann aus lebensmittelrechtlicher Sicht kein Antibiotikum als Selektionsdruck eingesetzt werden (HAN, 2004). Es wurde deswegen anhand eines vorliegenden Produktionsstammes experimentell gezeigt, dass auch ohne den Einsatz von Ampicillin mit 56,6 % die angestrebte Phloretinausbeute erreichbar war.

Laktose wurde aus Kostengründen vom Industriepartner als Induktor gewünscht. Des Weiteren war das bis dahin für die Prozessentwicklung eingesetzte IPTG aufgrund seiner potentiellen Toxizität nicht *food-grade* (FIGGE *et al.*, 1988). Es wurde gezeigt, dass eine Induktion mit Laktose (0,1 mM) zu einer Ausbeute von 59 % und damit zu einem mit IPTG (0,1 mM) vergleichbaren Ergebnis führte. Im weiteren Verlauf des Projektes konnte bei der Untersuchung des Induktionsverhaltens in TB-Medium eine ausgeprägte Basalexpression festgestellt werden. Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass auch ohne separate Zugabe von Laktose eine für die Biokatalyse ausreichende Konzentration aktiven Proteins produziert wurde.

Auf Wunsch des Industriepartners wurde der Prozess aus einem Komplexmedium (TB-Medium) in ein an den Prozess adaptiertes definiertes Medium übertragen. Auch gustatorische und olfaktorische Faktoren wurden berücksichtigt, da ein hochwertiger Aromastoff produziert werden sollte. Da das für die Lösung des Naringenins vor der Biotransformation verwendete DMSO durch *E. coli* zum kohlartig riechenden DMS umgesetzt wird, wurde es durch den als E 1520 zugelassenen Lebensmittelzusatzstoff 1,2-Propylenglykol ersetzt. 1,2-Propylenglykol wird lediglich zu aromatisch neutralen Substanzen umgesetzt. Auf diese Weise wurde einer Kontamination des Produktes entgegen gewirkt.

Da eine Substrat- und Produktinhibierung, sowie eine durch eine Enantioselektivität der beteiligten Enzyme bedingte maximale Ausbeute von 50 % bei der Biotransformation bekannt waren, wurde eine Vielzahl verschiedener Prozessstrategien evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Biotransformation geringer Naringeninkonzentrationen (Substrat) höhere Ausbeuten erreichbar waren. Deswegen wurde eine Zugabe

des Naringenins in Stufen getestet. Auch mit dieser Strategie zeigte sich ab einer Flavonoidgesamtkonzentration von 3 mM eine inhibierende Wirkung und der angestrebte Produkttiter von 3 g L^{-1} war nicht erreichbar.

Die an den zu entwickelnden Prozess gestellten Ansprüche bezüglich der volumetrischen Produktivität und des Antibiotikaeinsatzes, mit dem Ziel der Wirtschaftlichkeit des Prozesses und möglichst breiten Einsatzmöglichkeiten des Produktes, konnten auf diese Weise noch nicht befriedigt werden, weswegen alternative Strategien entwickelt wurden. Unter Berücksichtigung der Löslichkeitsproblematik und der Substrat- und Produktinhibierung lag die Umsetzung eines *in-situ*-Produktentfernungsverfahrens (engl.: *In-situ-product-removal*, ISPR) nahe. Da durch dieses Prinzip theoretisch eine iterative Zugabe von Naringenin möglich ist und folglich die Produktivität gesteigert werden könnte, wurden verschiedene ISPR-Strategien entwickelt und getestet. Doch die Ideen moderner ISPR-Prozessführungen mit Hohlfasermodule und Membranadsorption konnte in der Praxis selbst mit großem Aufwand nicht erfolgreich umgesetzt werden. In diesen Versuchen wurde eine Akkumulation der Flavonoide im Inneren der Zellen festgestellt. Nachdem dieses kurzfristige Projektziel verworfen werden musste, musste der Ganzzellbiotransformationsprozess von Grund auf neu durchdacht werden. Ein für den Erfolg des Projektes entscheidender Abschnitt begann.

Ein neuer Produktionsstamm, welcher von einem Projektpartner zur Verfügung gestellt wurde, verwendete das pStabyTM-System von Delphi Genetics. Dieses Expressionssystem ermöglichte entgegen des zuvor für die Entwicklung eingesetzten *E. coli* BL21 CHI_sERed eine Prozessführung ohne äußeren Selektionsdruck (Antibiotika) und machte den Prozess somit ökonomischer und leichter skalierbar, was einen großen Vorteil für die weitere Prozessentwicklung darstellte.

Die neue Richtung der Prozessentwicklung wurde durch eine Reihe von Versuchen vorgegeben, die der Vermutung nachgingen, dass eine definierte cytotoxische Flavonoidkonzentration als Ursache für die Ausbeutelimittierung existierte. Es wurde folglich angenommen, dass zwischen der Produktausbeute und der Biotrockenmassekonzentration eine Abhängigkeit bestünde. In gezielt auf definierte Zelldichten konzentrierter Kulturbrühe wurden Umsetzungsexperimente mit unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen durchgeführt. In diesen Experimenten konnte ein neues, an die komplexen Zellsuspensionen angepasstes, Extraktionsprotokoll für die Flavonoide entwickelt werden, das prinzipiell für das spätere *downstream processing* adaptiert werden sollte.

Eine kinetische Untersuchung der Ganzzellbiotransformation ergab dann den erwartete-

ten mathematischen Zusammenhang. Für die optischen Dichten von 100 rel. AU und 200 rel. AU ergaben sich $Y_{p/X}$ -Ausbeutekoeffizienten, welche sich nur um 17% unterschieden. Der Zusammenhang war demnach nahezu linear. Darüber hinaus wurde ein Sättigungsverhalten nachgewiesen und damit die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Mit den erhaltenen $Y_{p/X}$ -Werten konnte die erwartete cytotoxische Konzentration identifiziert werden. Das aus wirtschaftlicher Sicht primäre Projektziel war die Produktion von $3,00 \text{ g L}^{-1}$ Phloretin bei einer Ausbeute von mehr als 50%, was der maximalen möglichen Ausbeute des Prozesses entsprach. Dieses angestrebte Ziel wurde erfolgreich erreicht.

Damit waren auch die Rahmenbedingungen des nötigen Prozesses gesteckt. Die Biotransformation hatte laut der gesammelten Erkenntnisse im Grenzbereich dessen zu erfolgen, was in Hochzelldichtekulturen von *E. coli* praktisch ohne den Einsatz von Perfusions-techniken möglich ist. Somit wurden hohe Ansprüche an den zu entwickelnden Prozess gestellt. Ein solcher biotechnologischer Prozess muss gut reproduzierbar, robust und automatisierbar sein. Durch den neuen Produktionsstamm mit pStabyTM-System als mikrobiologische und molekularbiologische Grundlage wurden hierfür neue Möglichkeiten der Prozessführung eröffnet und eine optimale Proteinausbeute in hohen Zelldichten gewährleistet.

Durch technische Ergänzungen, die Etablierung einer Anreicherung der Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff und eine Reparametrisierung des Kultierungssystems wurde dann auch die technische Grundlage für die weitere Entwicklung im Labormaßstab geschaffen. Weiter wurde ein Simulations- und Pumpensteuerungsprogramm entwickelt. Das Programm ORKFeeder wurde für die Etablierung der nötigen *fed-batch*-Parameter und die Automatisierung des Prozesses eingesetzt. Die mit diesen Mitteln erreichbare hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit konnte durch ein *repeated-fed-batch*-Experiment mit teilweisem Zellrückhalt noch zusätzlich belegt werden.

In Hochzelldichtekulturen wurde zunächst Glucose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Durch Katabolitrepression war so jedoch keine effiziente Induktion durch Laktose mehr möglich. Die letztendlich ausschlaggebenden Arbeiten in der Prozessentwicklung erfolgten dann unter Berücksichtigung der metabolischen Netzwerke von *Escherichia coli*. Der Coimport von Laktose und der Kohlenstoffquelle musste ermöglicht werden. Aus dieser Perspektive wurden Fructose und Glycerin als ökonomisch mögliche Alternativsubstrate zu Glucose ausgewählt. Neben diesen beiden Produkten wurden auch die noch günstigeren potentiellen Alternativen Invertzucker- und Fructosesirup in einer Vielzahl

verschiedener Prozessvarianten eingesetzt und ihr Einfluss auf die Proteinproduktion untersucht.

Es wurde ein Prozess etabliert, der sich übergeordnet aus einer Kultivierungs-, Proteinproduktions- und einer Biotransformationphase zusammensetzte. Die Kultivierung setzte sich wiederum aus einer *batch*- und einer exponentiellen *fed-batch*-Phase mit auf Glucose basierendem Medium zusammen. Bei einer optischen Dichte von 100 rel. AU erfolgte ein Substratwechsel zu Glycerin und eine gleichzeitige Induktion mit Laktose. Zu Beginn der Proteinproduktionsphase erfolgte eine weitere Fütterung mit exponentiellem Profil. Um einer verstärkten Acetatproduktion entgegen zu wirken und die Biomassenausbeute zu maximieren, wurde in einer abschließenden Prozessphase auf eine reduzierte und konstante Pumpgeschwindigkeit umgestellt. Die produzierte Biomasse wurde dann ohne pH-Statierung, ohne Antischaumdosierung und unter anaeroben Bedingungen für die Biotransformation verwendet. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die optische Dichte wie auch die Produkttiter ohne Aufkonzentrierung der Zellen im Laborreaktor erreichbar waren. Auch mit einem weiteren Produktionsstamm waren diese Resultate reproduzierbar.

Dieser neue Stamm *E. coli* SE1 delLidCHI_sERed stellte den Abschluss der Stammentwicklung dar und erweiterte die Substrat- und Produktspektren des Plattformprozesses um glykosylierte Flavonoide. Die erfolgreiche Umsetzung von Naringin wurde durch den Projektkoordinator Symrise AG überprüft. Auch wurden die erhaltenen Ergebnisse der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin durch den Projektpartner untersucht und die Konzentrationsverläufe bestätigt. Damit wurden bereits alle gesetzten Projektziele erreicht. Durch den Projektpartner Symrise AG wurde jedoch noch zusätzlich ermöglicht vor Ort, d.h. in der Firmenzentrale in Holzminden, die nötigen ersten *scale-up*-Experimente durchzuführen.

Das Programm ORKFeeder wurde für die detaillierte Übertragung auf das Reaktorsystem von Symrise Biosystems genutzt. In Relation zum Laborreaktor wurden mehr Rührerstu-
fen und eine Regelung des *DO*-Wertes durch eine kaskadierende Begasungsraten- und Kopfraumdruckregelung ergänzt. Das aus Sicherheitsgründen gesetzte Ziel den *DO*-Wert konstant bei 30 % zu halten, ohne die Begasungsluft mit elementarem Sauerstoff anreichern zu müssen, wurde erfolgreich umgesetzt. Das Prozessprotokoll wurde darüber hinaus um eine Reihe von regulatorischen Algorithmen ergänzt, womit ein weiterer Grad an Automation erreicht werden konnte. Mit Hilfe dieser technischen Lösungen konnte der Prozess erfolgreich in den 30 L-Maßstab übertragen werden. Gemäß der Zielsetzung

wurde mit 60 g L^{-1} die angestrebte Biotrockenmassenkonzentration realisiert. Die Induktion war erfolgreich und es wurde eine hohe Ausbeute löslichen Enzyms erreicht. Aus technischer Sicht stand damit einer Übertragung in den Produktionsmaßstab nichts entgegen.

Dennoch war im *scale-up* ein Ausbeuterückgang von 50 % bei der Phloretinproduktion zu verzeichnen. Die experimentelle Klärung der Ursachen und die eventuell erforderlichen Anpassungen der Prozessregulation waren Teil der nach Abschluss des Projekts durchzuführenden Arbeiten des Industriepartners Symrise AG. Unabhängig davon sollen im Folgenden basierend auf den vorliegenden Ergebnisse Lösungsvorschläge formuliert werden.

Als mögliche Hauptursache wurde im Zusammenhang mit der Regulation der *feed*-Pumpe angenommen, dass die als Induktionsmittel eingesetzte Laktose verstärkt als Kohlenstoffquelle von *E. coli* genutzt wurde und damit die Regelung des *feed*-Stroms über *CER*, *OUR* und *RQ* beeinflusste, wodurch der *feed* zeitweise aussetzte. Es wurde analytisch nachgewiesen, dass bereits nach vier der neun Stunden der Produktionsphase keine Laktose mehr in der Kulturbrühe vorlag. Die Laktose wurde so schnell als Kohlenstoffquelle verbraucht, weil der *feed* gestoppt wurde. Dadurch wiederum war der tatsächliche Induktionszeitraum kürzer als in der Prozessentwicklung. Tatsächlich ist anzunehmen, dass in den letzten 5,5 h des Experiments keine weitere Induktion mehr stattfand.

Als Lösungsansatz wäre aufgrund dessen – statt der Regelung über *CER*, *OUR* und *RQ* und analog zum Laborprotokoll – eine konstante aber niedrige *feed*-Rate möglich. Die Versorgung mit Glycerin würde so nie abbrechen und die Gefahr einer Überfütterung wäre minimiert. Gleichzeitig würde die Konsumption von Laktose verzögert werden, wodurch die Induktion über den gesamten Produktionszeitraum ausgedehnt werden würde.

Der Lösungsansatz könnte um eine weitere Maßnahme ergänzt werden. Im Experiment wurden während der Produktionsphase die Begasungsrate und die Rührgeschwindigkeit herabgesetzt. Vermutlich stieg hierdurch die durch den applizierten Druck von 1,8 bar ohnehin bereits erhöhte CO_2 -Konzentration in der Kulturbrühe. Diesem Problem könnte mit einer erhöhten Begasungs- und Rührrate begegnet werden, um einen Teil des CO_2 durch Sauerstoff zu verdrängen. Dadurch könnte die Proteinproduktion noch effizienter gemacht werden.

Würden durch diese Techniken noch nicht die angestrebten Ausbeuten erzielt werden,

böte das definierte Medium einen weiteren Ansatzpunkt für Optimierungen. Definierte Medien wie ZYP sind aus biochemischer Sicht nur für Prozesse ausgerichtet, bei denen eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff im gesamten Reaktorraum gewährleistet ist. In Schüttelkolben und größeren Reaktormaßstäben kann bereits durch transiente Substrat- und Sauerstofflimitierungen der FHL-Komplex (engl.: *formate hydrogen lyase complex*) induziert werden, wodurch Ameisensäure gebildet wird. Ameisensäure kann einen toxischen Effekt auf *E. coli* haben. Eines der nötigen Elemente – das Molybdän – war bereits in ZYP enthalten. Würde das Medium noch um Selen und Nickel ergänzt werden, könnte die Bildung von Ameisensäure vollständig unterbunden werden und der Prozessverlauf noch mehr an den Labormaßstab angeglichen werden (SOINI *et al.*, 2008).

6 Anhang A – Chemikalien und Materialien

6.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Land
Acetonitril (HPLC-Grade)	VWR International, LLC, Deutschland
Ammoniak (25 %)	AppliChem GmbH, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
2-Butanol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Carbenicillin Coomassie-Brilliant-Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Dimethylsulfoxid (RotiDry [®])	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisen(III)-chlorid Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Essigsäure (100 %, HPLC-Grade)	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol (96 %)	VWR International, LLC, Deutschland
Ethylacetat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Fructose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fructosesirup	Asperga Brau Riese GmbH
Glucose (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Deutschland
Invertzuckersirup	Symrise AG, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat Trihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kobaltchlorid Hexahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Deutschland
Magnesiumchlorid (trocken)	AppliChem GmbH, Deutschland
Mangan(II)-chlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Methanol (HPLC-Grade)	Merck KGaA, Deutschland
Naringenin	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Naringin	Symrise AG, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA

Fortsetzung: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Land
Natriummolybdat Dihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Nickel(II)-sulfat Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Phloretin	Symrise AG, Deutschland
Phosphorsäure (85 %)	Merck KGaA, Deutschland
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>protein molecular weight marker</i> 26610/26611, <i>unstained</i>	Thermo Fisher Scientific, USA
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Salzsäure (1 mM)	AppliChem GmbH, Deutschland
Schwefelsäure (95 %)	VWR International GmbH, LLC, Deutschland
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
TEGO® Antifoam KS 911	Evonic Industries AG, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton/Pepton aus Casein	AppliChem GmbH, Deutschland
Zinkchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Zinksulfat Heptahydrat	AppliChem GmbH, Deutschland

6.2 Materialien**6.2.1 Verbrauchsmaterialien****Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller, Land
Alu-Bördelkappen	–	Ochs GmbH, Deutschland
Nitrilhandschuhe	–	Ansell Healthcare LLC, USA
Einwegspritzen (2 mL – 20 mL)	Omnifix	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einwegspritzen	Terumo®Hypodermic	Terumo Corporation, Japan
Halb-Mikro-Küvette	–	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
HPLC Probengefäße		VWR International, USA
HPLC Probengefäßkappen		VWR International, USA
Pipettenspitzen (versch. Größen)	–	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	–	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller, Land
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm	WICOM GmbH, Deutschland
Sterilfilter (Luer-Lock)	Minisart 0,25 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland

6.2.2 Verwendete Geräte

Tabelle 12: Verwendete Laborgeräte

Gerät/System	Geräte-Bezeichnung	Hersteller, Land
Autoklav	Systemec V-150	Systemec GmbH, Deutschland
Bioreaktor	Biostat [®] A Plus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Bioreaktor	Biostat [®] C	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Cleanbench	Herasafe [™]	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Eismaschine	AF 103	Scotsman Ice Systems, USA
Gefrierschrank	Forma [™] 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Glucose Analysegerät	YSI 2300 STAT Plus [™]	YSI Life Sciences, USA
HPLC	Autosampler L-7200	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	DAD L-7455	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	HPLC System	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	Interface D-7000	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	Pumpe L-7100	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	RI Detektor Lachrom I-7490	Merck KGaA, Deutschland
HPLC	Säulenofen L-7350	Merck-Hitachi, Japan
HPLC	Security Guard Cartridge (AJ0-4287)	phenomenex [®] , Deutschland
HPLC	Trennsäule Zorbax SB-C18	Agilent, USA
HPLC	Trennsäule Aminex HPX-87H	Bio-Rad, USA
HPLC	Vorsäule Carbo-H4 3,00 mm ID	phenomenex [®] , Deutschland
HPLC	Vorsäule C-18 3,00 mm ID	phenomenex [®] , Deutschland
Kühlaggregat	ECO RE 415	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland
Kühlaggregat	Frigomix [®] 1000	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Kühlaggregat	MultiTemp III	Amersham Biosciences, USA
Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf [®] Research	Eppendorf AG, Deutschland

Fortsetzung: Verwendete Laborgeräte

Gerät/System	Geräte-Bezeichnung	Hersteller, Land
Kolbenhubpipetten	Transferpette [®] S	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland
Kultur-Schrank	Certomat BS-1	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kultur-Schrank	KS4000 ic control	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph Instruments GmbH
Magnetrührer	VMS-A	VWR International, USA
Peristaltikpumpe	Ismatec/TReg IPC	IDEX Health & Science GmbH, Deutschland
pH-Elektrode	Easyferm Plus K8 200	Hamilton, Schweiz
pH-Meter	605 pH-Meter	Metrohm Deutschland GmbH, Deutschland
Photometer	Multiskan [™] GO Microplate	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Reinstwasser-System	arium [®] pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Rotations-Evaporator	RVC 2-18	Martin Christ GmbH, Deutschland
Rotations-Evaporator	Vacuum System MZ 2 CNT + AK + EK	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Deutschland
Rotations-Evaporator	Multitemp III	Amersham Biosciences/GE Healthcare
Sauerstoffsonde (optisch)	Visiform DO 225	Hamilton, Schweiz
Sauerstoffsonde	Oxyferm FDA 225	Hamilton, Schweiz
Scanner (für SDS-PAGE)	Scanjet 3500c	Hewlett Packard Co., USA
Scanner (für SDS-PAGE)	Perfection V 750 Pro	Seiko Epson Corp., Japan
Schüttler	CH-4103	Infors HT, Schweiz
Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
SDS-PAGE Gelsystem	Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
SDS-PAGE-Gelsystem	PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Ultraschall-Bad	Sonore Super RK510H	Bandelin GmbH & Co. KG, Deutschland
Ultraschallsonde	LABSonic [®]	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Vibro-Mixer	Vortex Mixer VM-300	Gemmy Industrial Corp., Taiwan
Waage	Analytic AC 210 S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

<i>Fortsetzung: Verwendete Laborgeräte</i>		
Gerät/System	Geräte-Bezeichnung	Hersteller, Land
Waage	CP8201	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Waage	EA6DCE-I	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Waage	Isocal AC211 S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Waage	LP 6200 S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge	Heraeus® Pico 21	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge	Heraeus® Biofuge Pico	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

6.3 Kulturmedien und Puffer

6.3.1 LB-Medium

Tabelle 13: LB-Medium (lysogeny broth). Rezept für 1 L Medium

Bestandteil	Masse oder Volumen
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
deion. H ₂ O	ad 1.000 mL

Sofern Platten gegossen werden sollen, werden zusätzlich 15 g Agar zum Medium gegeben. Nach dem Lösen aller Medienbestandteile in destilliertem Wasser wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Das Medium wird autoklaviert und im Anschluss auf 60 °C abkühlen gelassen. Für den während dieser Masterarbeit verwendeten *Escherichia coli* Rosetta Stamm wurden als Selektionsdruck Antibiotika verwendet. Je Antibiotikum wurde 1 mL der steril filtrierten 1.000 x Stammlösung zum abgekühlten Medium gegeben. Um eine gleichmäßige Vermischung zu bewerkstelligen wurden die Kolben geschüttelt.

6.3.2 TB-Medium

Tabelle 14: TB-Medium (terrific broth). Rezept für 1 L Medium.

Bestandteil	Masse oder Volumen
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 g
Trypton	12 g
10x TB-Puffer	100 mL
deion. H ₂ O	ad 1.000 mL

Sofern Platten gegossen werden sollen werden zusätzlich 15 g Agar zum Medium gegeben. Die Medienbestandteile werden auf 9/10 des Finalvolumens mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Medium wird autoklaviert und im Anschluss auf 60 °C abkühlen gelassen. Es wird mit 10x Kaliumphosphatpuffer bis auf das Finalvolumen aufgefüllt. Für den während dieser Master-Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Rosetta Stamm wurden als Selektionsdruck Antibiotika verwendet. Je Antibiotikum wurde 1 mL der steril filtrierten 1.000 x Stammlösung zum abgekühlten Medium gegeben. Um eine gleichmäßige Vermischung zu bewerkstelligen, wurden die Kolben geschüttelt. Platten werden dann gegebenenfalls gegossen.

Tabelle 15: 10x Kaliumphosphat-Puffer. Rezept für 1 L Medium

Bestandteil	Masse oder Volumen
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat (K ₂ HPO ₄)	125,40 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	23,14 g
deion. H ₂ O	ad 1.000 mL

Der Puffer ist nach dem Autoklavieren bereit für die Verwendung im TB-Medium. Je 100 mL TB-Puffer werden zu 900 mL TB-Medium gegeben.

6.3.3 ZYP-Medium (definiertes Medium)

Tabelle 16: Puffer und Salze für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium.

Bestandteil	Masse oder Volumen
KH_2PO_4	6,8 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8,9 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,3 g
deion. H_2O	ad 840 mL

Tabelle 17: Spurelemente-Stammlösungen.

Bestandteil	Masse oder Volumen
MgSO_4 -Stammlösung (0,2 M; 100x)	1,20 g MgSO_4 50 mL deion. H_2O
MgSO_4 -Stammlösung für Hochzelldichtekultivierung (0,4 M; 100x)	2,400 g MgSO_4 50 mL deion. H_2O
FeCl_3 -Stammlösung (0,2 M; 2000x)	1,60 g MgSO_4 50 mL deion. H_2O
NaMoO_4 -Stammlösung (1,06 mM; 2000x)	0,218 g MgSO_4 50 mL deion. H_2O
Spurenelemente-Stammlösung (1000x):	
ZnCl_2	6,54 mg
H_3BO_3	2,00 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,90 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	400,00 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5,00 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	10,00 mg
$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10,00 mg
deion. H_2O	100 mL

Tabelle 18: Zucker für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium. Originalzusammensetzung.

Bestandteil	Masse oder Volumen
Glycerol	120,0 g
Glucose - H_2O	13,2 g
Laktose - H_2O	16 g
deion. H_2O	ad 400 mL

Um mit TB-Medium vergleichbare optische Dichten zu erreichen wurde die Glucosekonzentration verdoppelt während die Laktose- und Glycerinkonzentrationen gleich belassen wurden.

Tabelle 19: Zucker für ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium. An mit TB-Medium erreichte optische Dichte angepasste Zusammensetzung.

Bestandteil	Masse oder Volumen
Glycerol	120,0 g
Glucose - H ₂ O	26,4 g
Laktose - H ₂ O	16 g
deion. H ₂ O	ad 400 mL

Für Hochzelldichtekultivierungsexperimente wurden in den Batchkulturen nur jeweils ein Substrat verwendet. Die Zusammensetzung mit Glucose, Glycerin und Laktose in Mischung musste verworfen werden, da kein Autoinduktionsmedium mehr benötigt wurde. Die Substrate Glycose, Glycerin, Fructose, Invertzuckersirup und Fructosesirup wurden in gleichen Konzentrationen von 20 g L⁻¹ eingesetzt (Stammlösung hatte eine Konzentration von 400 g L⁻¹). Die Zusammensetzung und Präparation wich darüber hinaus aber nicht von der folgenden Tabelle ab.

Tabelle 20: ZYP-Medium (definiertes Medium). Rezept für 1 L Medium.

Bestandteil	Masse oder Volumen
840 mL Puffer vorlegen, autoklavieren und abkühlen lassen	
Substrat-Stammlösung	50,0 mL
Spurenelemente-Stammlösung	1,0 mL
FeCl ₃ -Stammlösung	0,5 mL
NaMoO ₄ -Stammlösung	0,5 mL
MgSO ₄ -Stammlösung	10,0 mL
Vorkultur	100,0 mL

6.3.4 Lösemittelmischung für die Elution von Flavonoiden nach Demmer *et al.* (2011)

Tabelle 21: Lösemittelmischung für die Elution von Flavonoiden von einer mikroporösen Cellulosehydratmembran mit kationenaustauschenden Sulfonatgruppen (Volumen: 100 mL)

Bestandteil	Volumen
Ethanol	10 mL
iso-Butanol	10 mL
Natriumchlorid-Puffer (1 M)	80 mL

6.3.5 Antibiotika

Tabelle 22: Antibiotikastammlösungen (1.000 x)

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin	deion. H ₂ O	100 mg mL ⁻¹
Carbenicillin	deion. H ₂ O	100 mg mL ⁻¹
Kanamycin	deion. H ₂ O	50 mg mL ⁻¹

Es werden größere Volumina angesetzt und diese in 1 mL aliquotiert. Die Aliquots werden bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

6.3.6 Kaliumphosphatpuffer für den Zellaufschluss

Tabelle 23: Kaliumphosphatpuffer für den Zellaufschluss (50 mM, pH 6,4), Rezept für 500 mL

Bestandteil	Masse oder Volumen
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat (K ₂ HPO ₄)	2,6 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,01 g
deion. H ₂ O	ad 500 mL

Die Bestandteile werden nach dem Einwiegen in deionisiertem H₂O gelöst. Der pH-Wert wird auf 6,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren ist der Kaliumphosphat-Puffer bereit zur Verwendung.

6.3.7 SDS-PAGE: Färbelösung, TGS- und Probenpuffer

Tabelle 24: 10 x TGS-Puffer (für SDS-PAGE)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Glycin	140 g
Tris-Base	3 g
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10 g
deion. H ₂ O	ad 1.000 mL

Tabelle 25: 2 x SDS-Probenpuffer (für SDS-PAGE)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Bromphenolblau	20 mg
EDTA-Dinatriumsalz	58 mg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5 g
Tris-HCl	0,315 g
deion. H ₂ O	ad 80 mL

Tabelle 26: Laemmli-Puffer (für SDS-PAGE)

Bestandteil	Konzentration
2x SDS-Probenpuffer	80 %
β -Mercaptoethanol	10 %
55 %ige Glycerin-Lösung (in deion. H ₂ O)	10 %

Tabelle 27: Kolloidale Coomassie-Färbelösung (Blue Silver)

Bestandteil	Konzentration
Ammoniumsulfat	10,00 %
Coomassie Brilliant Blue G250	0,12 %
Methanol	20,00 %
Phosphorsäure (85 %)	10,00 %
deion. H ₂ O	60,00 %

6.4 Stämme und Stamm-Haltung

Der verwendete *E. coli* Stamm Rosetta DE3 (Bestellnr.: 70953, Merck KGaA, USA) wurde direkt aus Gefrierkulturen verwendet. Sofern Platten verwendet werden sollen, werden

diese nach dem Ausstreichen für einen Tag bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Platten müssen monatlich erneuert werden.

6.5 Plasmidkarten

6.5.1 *Escherichia coli* BL21 CHI_sERed

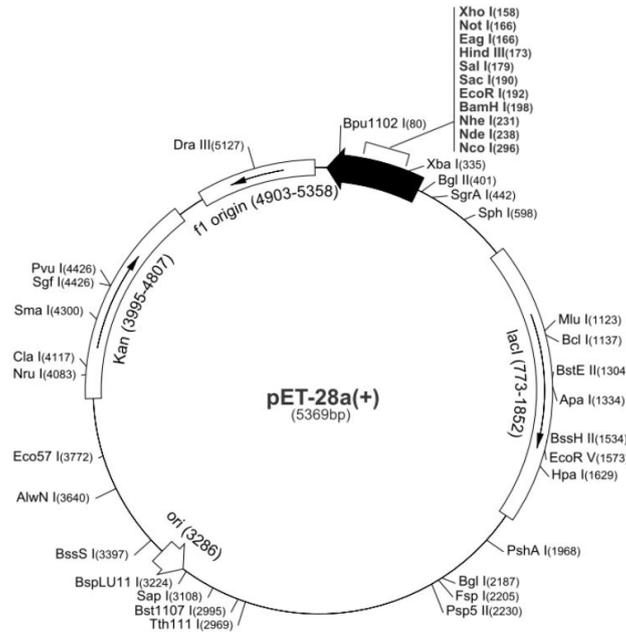


Abbildung 40: Plasmid-Karte des Vektors pET-28(a-c)(+)

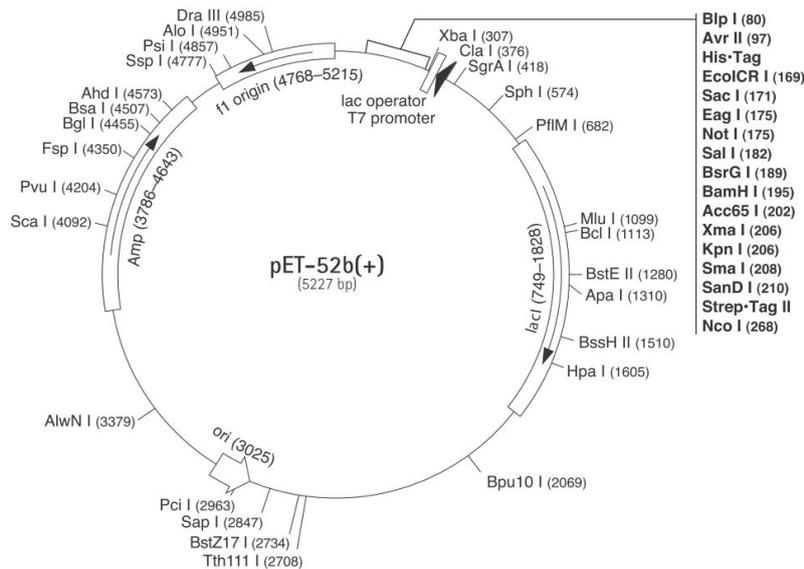


Abbildung 41: Plasmid-Karte des Vektors pET-52b(+)

6.5.2 *Escherichia coli* S1 CHI_sERed

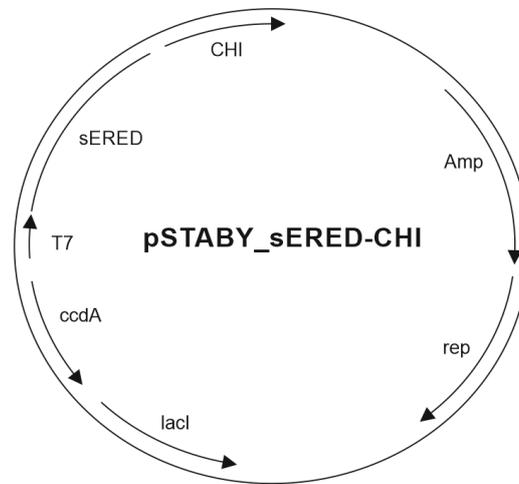


Abbildung 42: Plasmid-Karte des Vektors pStaby CHI_sERed

6.5.3 *Escherichia coli* S1 delLidCHI_sERed

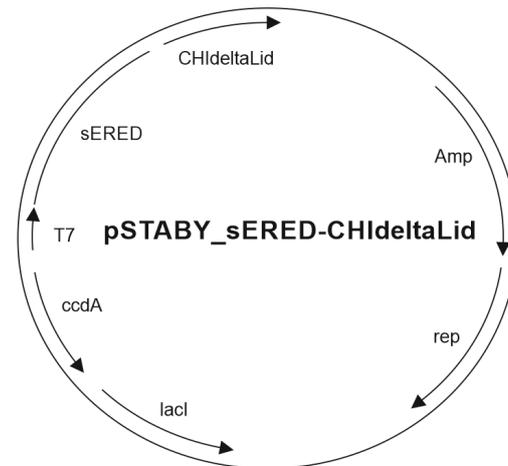


Abbildung 43: Plasmid-Karte des Vektors pStaby delLidCHI_sERed

7 Anhang B – Methoden

7.1 Das Programm „ORKFeeder“ (Online-Runge-Kutta-Feeder)

Das Ziel war es eine für die Automatisierung der Hochzelldichtekultivierung notwendige Simulations- und Pumpensteuerungssoftware zu entwickeln. Das Programm sollte nach Eingabe der entscheidenden Parameter $\mu, S_0, S_{Feed}, V_0, X_0$ und $Y_{X/S}$ ein exponentielles *feed-*

Profil ausgeben. Des Weiteren sollte es im Biotechniklabor verfügbare entsprechend fein einstellbare Pumpen ansteuern kann. In Zusammenarbeit mit einem Mitarbeiter des Instituts wurde mit „ORKFeeder“ ein Programm entwickelt, welches genau dies erfüllt. In der Anwendung gesammelte Erfahrungen flossen in die Weiterentwicklung des Programmes ein. Die hier beschriebene Version des Programmes ist Version 1.1.0.0.. Nach Eingabe der o. g. Kennzahlen erfolgt durch das Programm *online* die numerische Integration eines Differenzialgleichungssystems für ideale Rührkesselbioreaktoren basierend auf der Monod-Kinetik im Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung. Die Zeitintervalle lassen sich neben den o. g. Kennzahlen ebenfalls über das GUI („*graphical user interface*“) eingeben. Die verwendeten Differenzialgleichung lauten:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_M + S} \quad (15)$$

$$\frac{dV_R(t)}{dt} = \dot{V}_{feed}(t) \frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_M + S} \cdot X(t) - \frac{\dot{V}_{feed}(t)}{V_R(t)} \cdot X(t) \quad (16)$$

$$\frac{dS_0}{dt} = -\frac{\mu_{max} \cdot S}{K_M + S} \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} - \frac{\dot{V}_{feed}(t)}{V_R(t)} \cdot (S_{feed} - S_0) \quad (17)$$

Unter Berücksichtigung der Substratlimitierung wird die Substratkonzentration im Reaktor im *fed-batch*-Betrieb nicht verändert. Das zugegebene Substrat wird sofort in Biomasse umgewandelt. Entsprechend gilt:

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (18)$$

Formel 17 kann demzufolge zum folgenden Ausdruck abgeleitet werden:

$$\dot{V}_{feed}(t) = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_M + S} \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} - \frac{1}{S_{feed} - S_0} \cdot V_R(t) \quad (19)$$

ORKFeeder wurde in der Umgebung C#.NET (Version 3.5) programmiert. Das GUI ist in Abbildung ?? dargestellt.

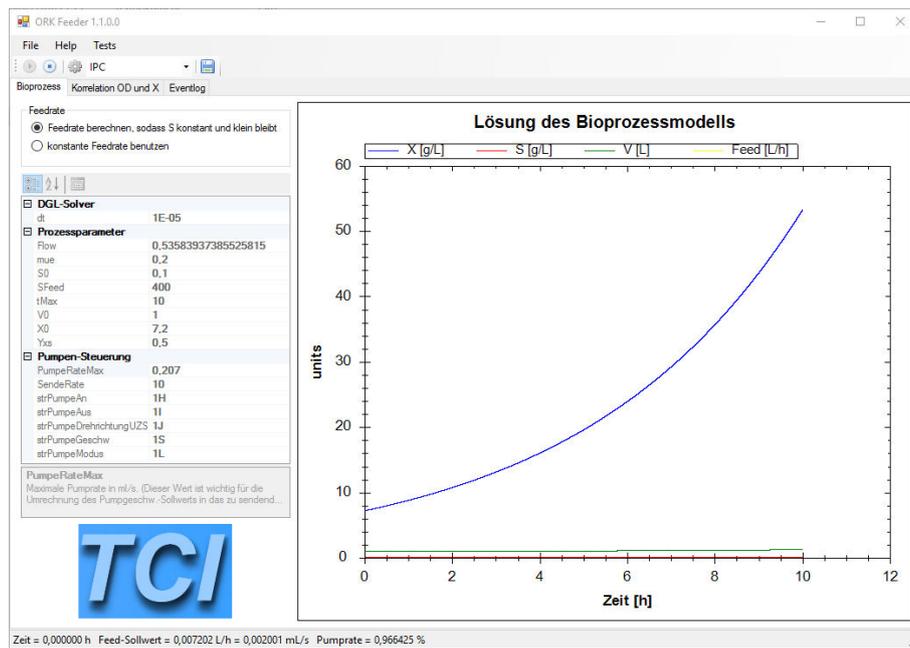


Abbildung 44: GUI des Programmes ORKFeeder

Über „File“ lässt sich das Programm beenden. Unter „Help“ finden sich Angaben zum Autor des Programmes. Beim Klicken auf „Tests“ öffnet sich ein *Drop-Down*-Menu in dem zum einen ein Simulationsmodus und zum anderen drei Testmöglichkeiten für Pumpen angeboten werden. Der Simulationsmodus muss eingestellt werden, sofern keine Pumpe angeschlossen ist und dennoch eine Berechnung durchgeführt werden soll. Die Pumpentest dienen der Bestätigung einer Korrekten Funktionsweise des Programms. Unterhalb des Menüs finden sich v. l. n. r. ein Startknopf, ein Stoppknopf und die Einstellungen der COM-Port-Verbindung zur Pumpe und die Art der Pumpe. Zum Zeitpunkt der Promotion war das Programm für die Pumpentypen Ismatec „IPC“ und SciLog „LabTec“ ausgelegt. Mit diesen beiden Laborpumpen kann die Software im 2 L- bis 30 L-Maßstab einsetzbar werden. Diese Möglichkeit wurde bereits bei der Betreuung von Versuchen anderer Doktoranden erfolgreich eingesetzt. Die Wahl der Pumpe in diesem Feld bestimmt direkt die im linken Eingabefeld angezeigte Pumpensteuerungssyntax. Hier wird u.a. die Pumpennummer angezeigt oder kann verändert werden. Theoretisch ließen sich somit auch einzelne Pumpen in einer *daisy-chain*-Verkettung mehrerer Pumpen ansteuern.

Weiter unterhalb finden sich drei Reiter. In "Bioprozess" werden wie angegeben die Prozesskennzahlen eingegeben, die für die Simulation notwendig sind. Liegt der Mauszeiger oberhalb eines Eingabefeldes so wird im unteren Bereich der GUI eine Erklärung an-

gezeigt. Hier finden sich Angaben zu den notwendigen Einheiten der Eingaben. Die Simulationsdaten werden im rechten Diagramm dargestellt. Unter „Korrelation OD_{600} und X “ können während der Kultivierung aufgenommene optische Dichten aufgetragen werden. Sie werden dann automatisch mit den auf der Simulation basierenden Biotrockenmassekonzentrationen zu den gleichen Zeitpunkten korreliert. Unter der Voraussetzung, dass es zwischen diesen beiden Werten einen linearen Zusammenhang gibt kann man in diesem Fenster leicht während des Experiments Hinweise auf Abweichungen wie Überfütterungen ableiten und zeitnah reagieren.

Die Daten der Simulation lassen sich zu jedem Zeitpunkt einzeln durch Fahren des Mauszeigers über die entsprechende Kurve im Diagramm anzeigen. Sollte eine Unterbrechung des *feeds* notwendig werden, kann so gestoppt werden und im Anschluss direkt der *feed* fortgesetzt werden. Eine Pausierung ist nicht anders möglich. Die Simulationsdaten können über das Diskettensymbol im Menübereich auch als txt-Datei exportiert werden. Damit ist auch die Nutzung anderer Pumpen möglich. Diese Möglichkeit wurde während der *scale-up*-Experimente beim Industriepartner Symrise AG (Holzminden, Deutschland) für die detaillierte Übertragung des entwickelten Prozesses in das Steuerungssystem vor Ort genutzt.

7.2 Prozessführung (für 2 L-Maßstab-*batch*-Kultivierung) (TB-Medium)

Es wird eine erste Vorkultur (Vorkultur I) in 25 mL LB-Medium mit 2 mL Gefrierkultur beimpft. Das Medium wird mit den entsprechenden Antibiotika-Lösungen versetzt (siehe Tabelle 22). Vorkultur I wird für 5 h, bei 37 °C und 150 min⁻¹ inkubiert. Anschließend werden mit 2 mL aus Vorkultur I 100 mL LB-Medium angeimpft (Vorkultur II). Das Medium wird mit denselben Antibiotika-Konzentrationen angesetzt. Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C und 150 min⁻¹ für 5 h, bis auf eine optische Dichte von 3 bis 3,5 rel. AU. Parallel wird der Reaktor mit 1,7 mL TB-Medium vorbereitet. Die eingewogenen Massen der Medienbestandteile sind in Tabelle 14 zu finden und entsprechen 2 mL TB Medium. Zu den 1,7 mL TB-Medium werden über eine Animpfgarnitur 200 mL 10 x Kaliumphosphat-Puffer gegeben. 2 mL aller Antibiotikalösungen werden über ein Septum in den Reaktor überführt. Mit Vorkultur II wird der Reaktor über ein Septum auf einen Start-OD-Wert von 0,15 angeimpft. Die Reaktor-Kultivierung erfolgt bei 25 – 30 °C über Nacht. Der pH-Wert wird auf pH 7 geregelt. Die Begasung erfolgt mit 2 vvm Luft. Sobald eine optische Dichte von 12 – 15 rel. AU erreicht ist, wird die Begasung von Luft auf Stickstoff umgeschaltet. Die Begasung wird so eingestellt, dass eine Leichte Blasenbildung

zu erkennen ist. Anschließend wird mit IPTG induziert, das Naringenin als Substrat zugegeben und mit der Probennahme begonnen.

7.3 Prozessführung (für 2 L-Maßstab-*batch*-Kultivierung) (ZYP-Medium)

Das Vorgehen verläuft prinzipiell analog zu dem in 7.2 beschriebenen Protokoll. Nach einer ersten Vorkultur in LB-Medium wird davon abweichend allerdings eine zweite Vorkultur in ZYP-Medium inokuliert. Die Zusammensetzung und die Präparation des ZYP-Mediums wird unter 6.3.3 beschrieben. Der pH-Wert des Mediums wird nach einer Rekalibration durch NaOH auf $\text{pH} = 7$ korrigiert, um Präzipitation zu verhindern. Die MgSO_4 -Stammlösung wird dem Medium erst kurz vor der Inokulation mit der vollständigen zweiten Vorkultur zugegeben, um der Bildung von Struvit entgegenzuwirken. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wird 10 Gew.-% Ammoniaklösung für die pH-Statierung eingesetzt, da so auch der Bedarf an Stickstoff gedeckt wird.

7.4 Prozessführung (für 2 L-Maßstab-*fed-batch*-Hochzelldichtekultivierung) (ZYP-Medium)

Zunächst wird hierfür eine *batch*-Kultivierung analog zu Abschnitt 7.3 durchgeführt. Nachdem das vorgelegte Substrat vollständig verbraucht ist und ein *DO-spike* auftritt, wird unter Zuhilfenahme der *software* ORKFeeder ein exponentielles *feed*-Profil gestartet (siehe Abschnitt 7.1). In einer abschließenden Prozessphase ist es notwendig das exponentielle *feed*-Profil zu beenden und eine niedrigere lineare Pumprate einzustellen (ca. 50 % der Pumprate vor der Abschaltung). Auf diese Weise wird einer Überfütterung entgegengewirkt und somit die Acetatbildung vermindert oder gar verhindert. Ohne den Einsatz von Perfusionstechniken ist nur eine Biotrockenmassekonzentration von ca. 63 g L^{-1} erreichbar.

7.5 Membran-screening tool

7.5.1 Aufbau des Membran-screening-tools

Die Grundlage des Membran-screening tools bildet eine Sammlerbasis, über welche das Tool an eine Vakuumpumpe angeschlossen wird. Das Vakuum kann durch ein Drei-Wege-Kontrollventil wahlweise angesetzt oder diskonnektiert werden. Die Proben werden durch den entstehenden Unterdruck durch die Membran gezogen, was sich positiv auf die für die Durchführung von *screenings* benötigte Zeit auswirkt. Auf die Basis wird eine

optionale Adapterplattform gesetzt, auf welcher wiederum die Sammlerplatte platziert wird. In dieser Platte werden die Filtrate aufgefangen. Die zu untersuchende Membran wird sandwichartig durch Verschraubungen zwischen zwei Rahmenteilern fixiert und gespannt. Das Sandwich aus Membran und Rahmen wird auf die Sammlerplatte gesetzt. Durch das 96-well-Format der Rahmenteilern und die Fixierung ist so eine Durchführung der Experimente mit definierter Membranfläche und minimierten Kreuzkontaminationen möglich.

Durch den oben beschriebenen Aufbau entstehen Ansatzgefäße, mit einer abgetrennten Membranfläche von je $0,565 \text{ cm}^2$.

7.5.2 Vorgehen bei Verwendung des Membran-screening-tools

Für das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Membran-screening wurden zunächst je well 1 mL wässriger Flavonoidlösung appliziert. Durch einen angelegten Sog wird ein Unterdruck erzeugt, wodurch die Proben durch die Membran hindurch gesogen werden. Die Proben werden durch eine zum Gerät gehörige Sammelplatte aufgefangen. Die Permeate wurden in getrennte Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Sammelplatte gereinigt und wiederverwendet. Zur Untersuchung der Elution von Flavonoiden wurden – analog zu den wässrigen Lösungen – verschiedene organische Lösemittel durch die Membran geleitet. Auch diese Eluate wurden getrennt in Reaktionsgefäße überführt. Während die Eluate sofort in der HPLC vermessen werden konnten, mussten die wässrigen Permeate zunächst extrahiert werden. Auf diese Weise konnten bis zu 96 verschiedene Telexperimente bezgl. Adsorption und Elution mit einem Aufbau durchgeführt werden.

7.6 Analytik

7.6.1 Optische Dichte bei 600 nm

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm in Relation zu 0,9 %iger Saline (Natriumchlorid-Lösung). Der lineare Bereich des Photometers liegt bei 0,1 – 0,8 rel. AU. Die Proben wurden dementsprechend mit Saline verdünnt.

7.6.2 Zellaufschluss

Für die SDS-PAGE-Analytik werden die Proben zunächst auf einen OD_{600} von 10 rel. AU normalisiert. Dafür wird je Probe ein zuvor mathematisch ermitteltes Volumen Kul-

turbühe bei 13.000 min^{-1} für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibende Biofeuchtmasse wird in 1 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 6,4) resuspendiert, so dass ein OD_{600} von 10 rel.AU resultiert. Für den Zellaufschluss wird eine Ultraschallsonde verwendet (Amplitude = 100 %, Zyklus = 0,6 second). Die Proben wurden jeweils auf Eis gekühlt 3 x für je 1,5 min beschallt. Zwischen zwei Beschallungen einer Probe sollte diese mindestens eine Minute auf Eis ruhen. Deswegen wurden mehrere Proben abwechselnd beschallt. Die aufgeschlossenen Zellen werden anschließend für 30 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wird in 400 μL Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert.

7.6.3 SDS-PAGE

Tabelle 28: Rezept für zwei Trenngele (12 %ig)

Bestandteil	Volumen
Rotisphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig	3,0 mL
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,8 mL
SDS (1 %ig)	1,0 mL
deion. H_2O	3,2 mL
TEMED	20,0 μL
APS (25 %ig)	20,0 μL

Tabelle 29: Rezept für zwei Sammelgele (6 %ig)

Bestandteil	Volumen
Rotisphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig	750,00 μL
Tris-HCl (1,5 M, pH 6,8)	630,00 μL
SDS (1 %ig)	300,00 mL
deion. H_2O	3,77 mL
TEMED	10,00 μL
APS (25 %ig)	10,00 μL

Nachdem das Polyacrylamid-Gel auspolymerisiert ist (die Rezepte für die verwendeten Trenn- und Sammelgele finden sich in den Tabellen 28 und 29) werden Proben und Lämmli-Puffer zu gleichen Teilen miteinander vermischt (jeweils bspw. 15 μL) und auf dem Schüttler bei 95°C für 10 min aufgekocht. Danach sind die Proben für das Auftragen

auf das Gel bereit. Bei Gelen mit zehn Taschen wurden 7 μL des Proteinmarkers und 10 μL der Proben aufgetragen. Bei Gelen mit 15 Taschen wurden 4 μL des Proteinmarkers und 7 μL der Proben aufgetragen. Die Gele werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Elektrophoresekammer bis zu der der Anzahl der Gele entsprechenden Markierung mit SDS-Laufpuffer gefüllt (1 x TGS-Puffer). Das Stacking erfolgt bei 100 V innerhalb eines Zeitraums von bis zu 30 min. Anschließend wird die Spannung auf 200 V erhöht. Die gelelektrophoretische Auftrennung wird beendet kurz bevor die Bromphenollauffront die untere Gelgrenze erreicht.

7.6.4 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Das Gel wird nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung dreimal in deion. H_2O gewaschen. Das Gel wird anschließend über Nacht (min. 3 h) in der Färbelösung, auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Blue Silver Stains nach (CANDIANO *et al.*, 2004). Ein separater Fixierschritt ist nicht notwendig, da die Fixierung ebenfalls in der Färbelösung stattfindet. Die Entfärbung erfolgt durch Waschen in deion. H_2O . Das Wasser wird solange ausgetauscht bis der Gel-Hintergrund komplett entfärbt ist. Die Entfärbung ist auch über Nacht durchführbar.

7.6.5 Flavonoidextraktion mit Ethylacetat

1 mL Ethylacetat werden zu 0,5 mL Probe gegeben. Proben aus Hochzelldichtekulturen ($OD_{600} = 200$ rel. AU) müssen zuvor mit deionisiertem Wasser zehnfach verdünnt werden, um die Zellen aufzuschließen und die Flavonoidkonzentration herabzusetzen. Beide Phasen werden durch ausgiebiges Vortexen über 30 s miteinander vermischt. Anschließend wird die Probe für 30 s bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert, wodurch eine Phasentrennung auftritt. Sollte nach der Zentrifugation eine zähflüssige Mischphase existieren wird erneut zentrifugiert.

Die resultierende obere organische Phase wird abgenommen und in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde ohne erneute Zugabe von Ethylacetat ein weiteres Mal gemixt und zentrifugiert. Auf diese Weise ist es möglich weiteres Ethylacetat ab zu pipettieren und Fehler zu minimieren. Das resultierende Ethylacetat wird bei 40°C im Zentrifugalevaporator verdampft. Es bleibt ein gelb-braunes Pellet zurück, welches in Methanol gelöst wird. Anschließend wird die Methanollösung direkt in der HPLC vermessen.

7.6.6 HPLC

7.6.6.1 HPLC: Flavonoide Als Eluenten werden 0,1 %ige Essigsäurelösung (wässrige Phase) und reines Acetonitril (organische Phase) verwendet. Beide müssen vor der Verwendung für mindestens 15 min im Ultraschallbad entgast werden. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels der HPLC-Säule Zorbax SB-C18 (1,8 μm). Das HPLC-Programm beruht auf einem durch SCHMIDT (2011) etablierten Gradienten-Programm. Das injizierte Proben-Volumen beträgt 5 μL . Die Flussrate beträgt 1,3 mL min^{-1} und die Temperatur des Säulenofens wird auf 40 °C eingestellt. Die Detektion erfolgt über einen Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Tabelle 30: HPLC-Gradienten-Programm für die Auftrennung von Flavonoiden (Schmidt, 2011)

Zeit [h]	0,1 %ige Essig-Säure [%]	100 %iges Acetonitril [%]
0,0	90	10
2,5	90	10
15,0	60	40
17,0	0	100
20,0	0	100
20,1	90	10
23,0	90	10

7.6.6.2 HPLC: Metabolite und Substrate Als Eluent wird 0,05 mM Phosphorsäurelösung verwendet. Die Lösung muss vor der Verwendung sterilfiltriert und für mindestens 15 min im Ultraschallbad entgast werden. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels der HPLC-*ion exclusion*-Säule Aminex HPX-87H. Das injizierte Probenvolumen beträgt 30 μL . Die Flussrate beträgt 0,7 mL min^{-1} und die Temperatur des Säulenofens wird auf 60 °C eingestellt. Die Detektion erfolgt über einen RI-Detektor.

Vermessen wurden für die vorliegende Arbeit Glycerin, Fruktose, Laktose und Acetat.

7.6.7 HPLC-Kalibrationsgeraden

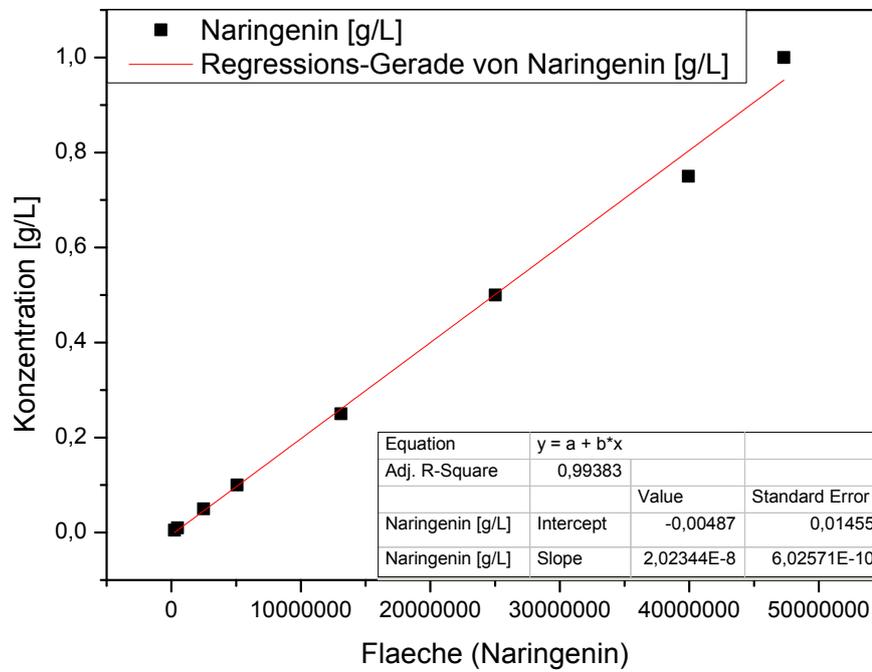


Abbildung 45: Für die HPLC wurde eine Zehn-Punkte-Kalibration von Naringenin im Bereich zwischen 0,001 g/L und 1,0 g/L durchgeführt.

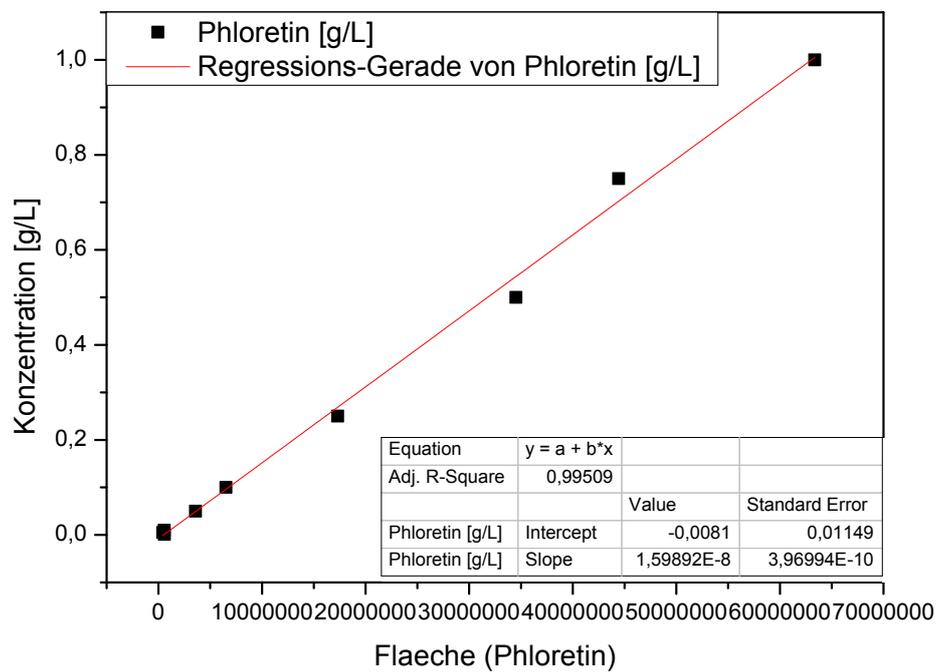


Abbildung 46: Für die HPLC wurde eine Zehn-Punkte-Kalibration von Phloretin im Bereich zwischen 0,001 g/L und 1,0 g/L durchgeführt.

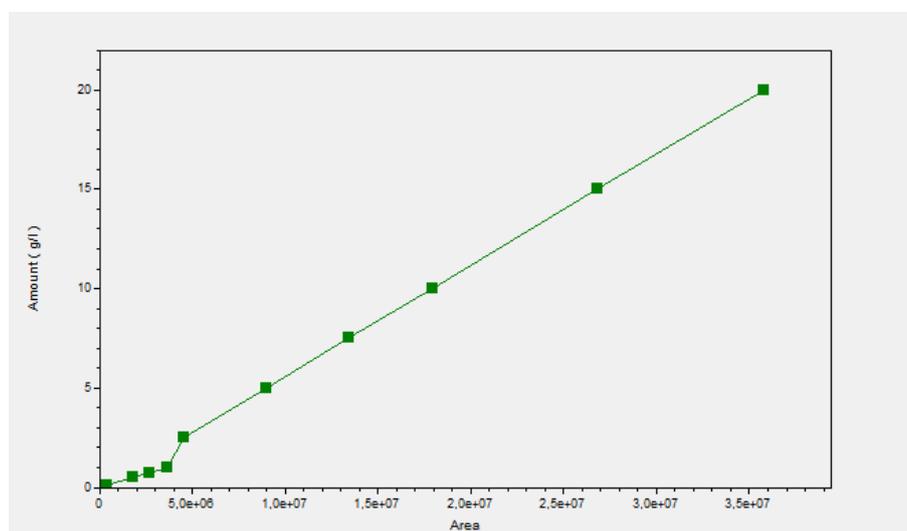


Abbildung 47: Für die HPLC wurde eine Zehn-Punkte-Kalibration von Glycerin im Bereich zwischen 0,1 g/L und 20,0 g/L durchgeführt.

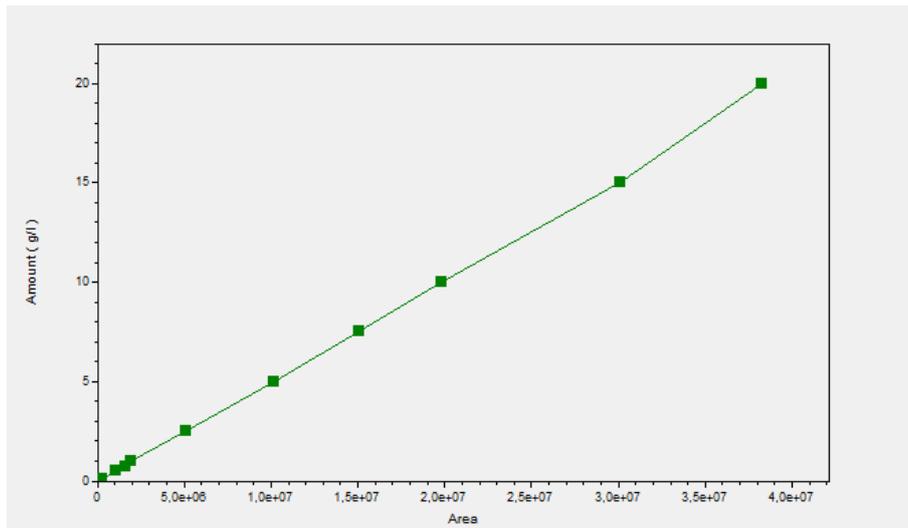


Abbildung 48: Für die HPLC wurde eine Zehn-Punkte-Kalibration von Fructose im Bereich zwischen 0,1 g/L und 20,0 g/L durchgeführt.

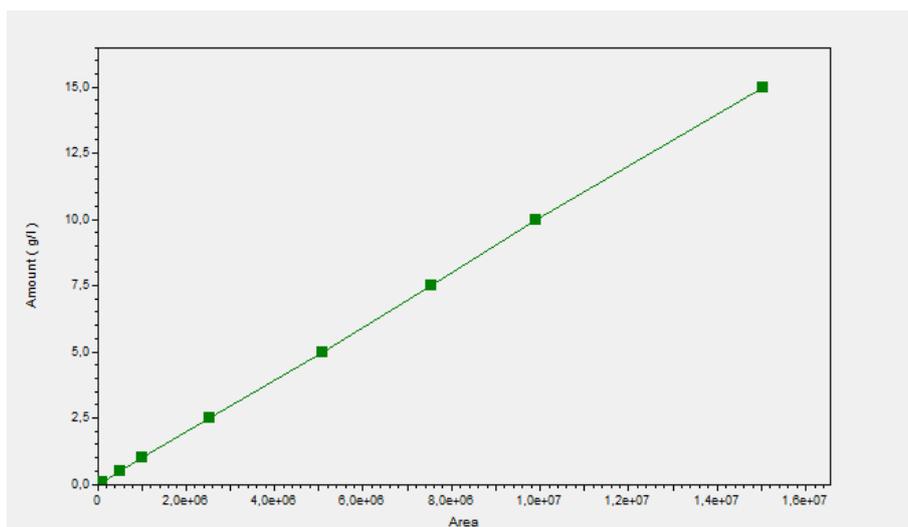


Abbildung 49: Für die HPLC wurde eine Neun-Punkte-Kalibration von Acetat im Bereich zwischen 0,1 g/L und 15,0 g/L durchgeführt.

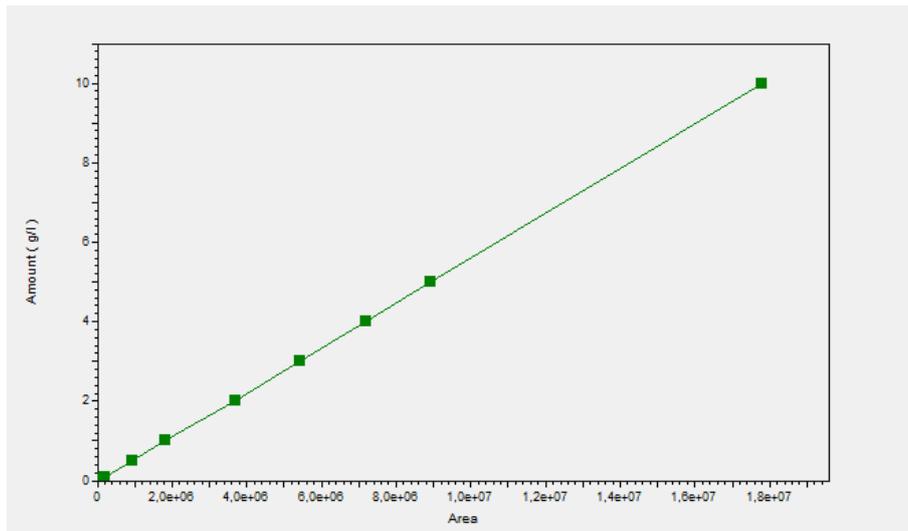


Abbildung 50: Für die HPLC wurde eine Neun-Punkte-Kalibration von Laktose im Bereich zwischen 0,1 g/L und 10,0 g/L durchgeführt.

8 Anhang C – Experimentelle Daten

8.1 Untersuchung des Einsatzes von Cosolventien zur Erhöhung der Flavonoidlöslichkeit

Als eine Möglichkeit die volumetrische Prozessausbeute zu steigern, wurde die Erhöhung der Flavonoidlöslichkeit durch den Einsatz von Cosolventien evaluiert. Untersucht wurde hierfür die Löslichkeit von jeweils Naringenin oder Phloretin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen der organischen Lösemittel Methanol und 1,2-Propylenglykol. Beide Lösemittel sind aus lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten unbedenklich und daher für einen Einsatz prinzipiell geeignet.

Für das Experiment wurden 2 mL-Ansätze von zellfreiem TB-Medium mit sättigenden Massen der Flavonoide versetzt. Zu diesen Ansätzen wurden die Lösemittel zugegeben, so dass Volumenanteile von 0 – 4 Vol.-% eingestellt wurden. Die Proben wurden anschließend durch Vortexen gemischt und unter Schütteln bis auf 45 °C erwärmt. Danach wurden die ungelösten Flavonoide in den Proben durch Zentrifugation abgetrennt. Für die Analysen wurde dann Überstand entnommen, da hier die Flavonoide nur vollständig gelöst vorlagen. Die Proben wurden nach dem unter 7.6.5 im Anhang beschriebenen Protokoll mit Ethylacetat extrahiert. Die Messung erfolgte nach dem unter 7.6.6 im Anhang beschriebenen Protokoll in der HPLC. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 51 dargestellt.

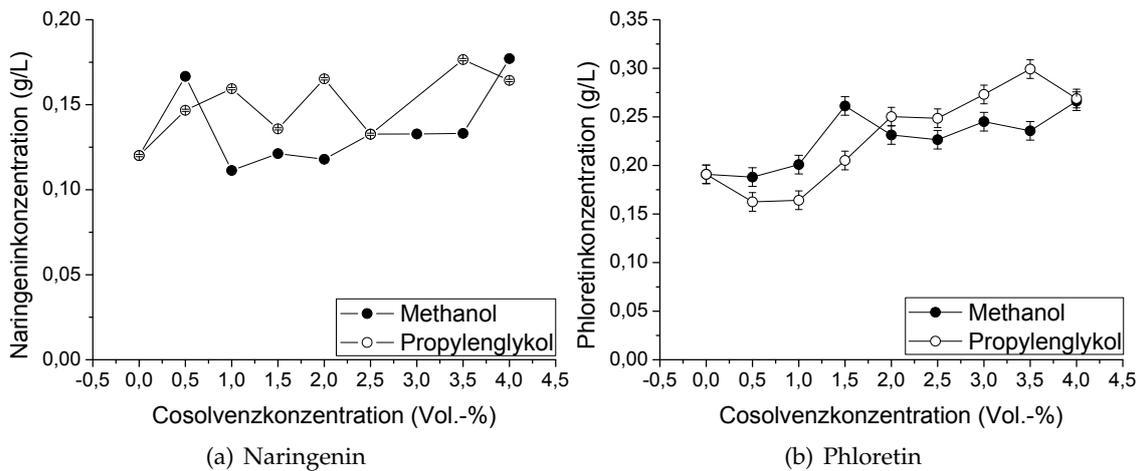


Abbildung 51: Einfluss der Cosolventien Methanol und Propylenglykol auf die Löslichkeiten von Naringenin und Phloretin in TB-Medium.

In den Versuchsreihen mit Methanol und 1,2-Propylenglykol konnte keine Steigerung der Naringeninkonzentration erzielt werden. In den Versuchsreihen mit Phloretin konnte für beide getesteten Cosolventien eine signifikante löslichkeitssteigernde Wirkung gezeigt werden. Bei Verwendung von 4 Vol.-% 1,2-Propylenglykol konnte die Phloretinkonzentration um 93 % von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,5815 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden. Bei Verwendung von 4 Vol.-% Methanol konnte die Phloretinkonzentration um 135 % auf $0,706 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden.

Von den beiden getesteten Lösemitteln kann in höheren Konzentrationen antibakterielle Wirkung ausgehen. Aufgrund dessen ist die Anwendung von Cosolventien nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich möglich. Da die Substratkonzentration nicht gesteigert werden konnte wurde die Verwendung von Cosolventien zur Steigerung der Wasserlöslichkeit der Flavonoide als Möglichkeit für die Erhöhung der volumetrischen Ausbeute verworfen.

Da *E. coli* das für die Suspendierung von Naringenin vor der Zugabe zur Kulturbrühe verwendete DMSO zu DMS umsetzt, welches einen intensiven kohlrartigen Geruch aufweist, war seine Verwendung zur Produktion eines hochwertigen Aromastoffes durch den Industriepartner Symrise AG (Holzminden, Deutschland) nicht gewünscht. DMSO wurde nach den beschriebenen Experimenten für diesen Zweck durch 1,2-Propylenglykol ersetzt. 1,2-Propylenglykol wird von *E. coli* lediglich zu geruchsneutralen Stoffen umgesetzt und ist als Trägerlösemittel für Enzyme und Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen (BMEL & AID, 2015). Alle folgenden Experimente wurden unter Verwendung von 1,2-Propylenglykol durchgeführt.

8.2 Optimierung des 2 L-Bioreaktorsystems für die Hochzelldichtekultivierung

Im nächsten Schritt der Prozessentwicklung sollte gezeigt werden, dass der geplante Prozess im verwendeten 2 L-Rührreaktorsystem durchführbar war. In Abschnitt ... wurde erkannt, dass für den Prozess $OD_{600} = 200$ rel. AU bzw. eine Biotrockenmassekonzentration von 65 g L^{-1} erreicht werden musste. Dies bedeutete, dass mit dem Prozess die Grenze dessen erreicht werden musste, was ohne Perfusionstechnik mit *E. coli* im *Fed-Batch*-Verfahren erreichbar ist (FUCHS *et al.*, 2002). Aufgrund der anspruchsvollen Prozessführung musste das 2 L-Rührreaktorsystem optimiert werden.

Es wurde eine Reihe von technischen Änderungen vorgenommen um den Sauerstoffeintrag zu steigern. Die einzelnen Anpassungen wurden hierbei empirisch-experimentell begründet vorgenommen. In einem ersten Schritt wurde eine Vorrichtung mit vier Schikanen verbaut. Weiterhin standen pro 2 L-System zwei Impeller zur Verfügung, deren Rührerstufenhöhen an das *Fed-Batch*-Verfahren angepasst werden mussten. Der Prozess begann mit einer 1 L-*Batch*-Kultur. Durch den *Feed* sollten im weiteren Verlauf Volumina bis maximal 2 L erreicht werden. Um im *Batch* einen optimalen Sauerstoffeintrag zu gewährleisten, wurde die untere Rührerstufe eine Rührerhöhe über dem *Sparger* angebracht. Hierbei wurde eine besonders feine Verteilung der Luftbläschen im Reaktorinnenraum erreicht. Verfahrenstypischen nahm das Arbeitsvolumens zu und die Turbidität der Kulturbrühe nahm zunehmend ab. Die Höhe der zweiten Rührerstufe wurde deswegen gezielt so gewählt, dass sie zu greifen begann bevor durch die geringe Durchmischung im Reaktorsystem kein ausreichender Sauerstoffeintrag mehr gewährleistet war.

Da keine *Glucose-online*-Analytik verfügbar war, wurde zunächst in Kultivierungsexperimenten \dot{V}_{Feed} rein manuell gesteuert. In dem modifizierten Reaktorsystem wurde beobachtet, dass im späteren Verlauf eine Begasung mit Druckluft nicht ausreichte um die Kultur mit Sauerstoff zu versorgen. Eine kaskadierende Steigerung der Begasungsrate war seitens der Betriebssoftware (μ DCU, Sartorius) und der dazugehörigen MFCS-Version (Version ...) nicht möglich. Um möglichst nahe an der Prozessrealität des Produktionsmaßstabs zu arbeiten, wurde für die gesamte Kultivierung eine konstante Begasungsrate \dot{V}_G von 2 L min^{-1} gewählt. D. h. dass in der *Batch*-Kultur ein \dot{V}_{Gmax} von 2 vvm vorlag. Der minimale erreichte Volumenstrom \dot{V}_{Gmin} sollte zum Ende der *Fed-Batch*-Phase 1 vvm betragen.

In einem ersten Schritt wurde hierfür die kaskadierte Anreicherung der Begasungsluft

mit elementarem Sauerstoff etabliert. Die Reihenfolge der Mechanismen zur Sauerstoffeintragssteigerung wurde so festgelegt, dass erst kaskadierend über die Rührerdrehzahl $DO = 30\%$ statiert wurde. Die Startrührerdrehzahl n_{R0} wurde auf 100 Upm festgelegt. Sobald die maximale Rührerdrehzahl n_{Rmax} von 1.233 Upm erreicht wurde, wurde diese konstant gehalten und die weitere Regelung erfolgte kaskadierend durch die Sauerstoffanreicherung. Beim BIOSTAT[®] Aplus wird die Begasungsluft nicht graduell durch Zumischung, sondern impulsartig durch ein sich temporär umschaltendes Ventil angereichert. Der Volumenstrom des elementaren Sauerstoffs \dot{V}_{OXYmax} betrug $1,6 \text{ L min}^{-1}$ (0,8 vvm).

Die Sauerstoffanreicherung wurde nur sehr ineffizient und unsicher geregelt. Entweder sank der DO auf 0% und es kam zur Zellyse oder es kam durch eine zu starke Sauerstoffanreicherung zur Depolarisierung der verwendeten Clark-Elektroden. Als Grund hierfür konnten die Standardeinstellungen der Sauerstoffanreicherungskaskade und der globalen Hysteresezeit identifiziert werden. Die Standardeinstellung sah einen PI-Regler ("proportional-integral-contoller") vor. Die Standardeinstellungen wurden inklusive der voreingestellten Hysteresezeit in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Standardeinstellungen der BIOSTAT[®] Aplus-Sauerstoffanreicherung: PI-Regler.

Minimum	Maximum	P	I	D	Deadband	Hysterese
0 %	100 %	100 %	100 s	0 s	0,5 %	5 min

Für die neue Parameterisierung der Sauerstoffanreicherungskaskade wurde eine Sprungantwort aufgenommen (Abbildung ...). Hierfür wurde Der Reaktor mit 2 L deionisiertem Wasser gefüllt und mit Stickstoffbegasung von Sauerstoff befreit. Im Anschluss wurde unter Rühren bei maximaler Drehzahl mit Druckluft begast bis $DO = 100\%$ erreicht wurde. Die Parameter wurden graphisch ermittelt und experimentell angepasst. Es resultierte ein PID-Regler ("proportional-integral-derivative-contoller"). Die neue Parametrisierung wurde in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Optimierte Einstellungen der BIOSTAT[®] Aplus-Sauerstoffanreicherung: PID-Regler.

Minimum	Maximum	P	I	D	Deadband	Hysterese
0 %	100 %	180 %	50 s	9 s	0,5 %	1 min

Mit einem proportionale Anteil „P“ von 180 % und einer Nachstellzeit (I-Anteil) von 50 s

regelte dieser Regler deutlich schneller als der Standardregler. Durch die Erweiterung um einen differentiellen Regleranteil (D-Anteil) von 9 s wurde einem starken Überschwingen entgegengewirkt. Die Hysteresezeit wurde gekürzt damit die Kaskadierungen möglichst schnell gestartet wurde nachdem die maximale Rührerdrehzahl erreicht war. Dies hat nur eine unwesentliche Auswirkung auf die Kaskadierung der Rührerdrehzahl.

Da ein *Fed-Batch*-Verfahren entwickelt werden sollte konnte kein Autoinduktionsmedium mehr verwendet werden, da diese Art von Kulturmedium für *Batch*-Kultivierungen ausgelegt ist. Bei der Proteinproduktion in Hochzelldichtekulturen ist die Wahl der Induktionsdichte ein entscheidender Prozessparameter. Um eine stressbedingte Acetatproduktion zu vermeiden und eine möglichst hohe Proteinausbeute zu erhalten sollte und musste der Induktionszeitpunkt genau gesteuert werden können. Die Acetatproduktion ist neben der Glucosekonzentration auch von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig. Die Proliferation sollte unterhalb der kritischen Geschwindigkeit geregelt werden. Bei *Fed-Batch*-Kultivierungen kann durch \dot{V}_{Feed} die Glucosekonzentration gezielt limitiert und somit die Wachstumsgeschwindigkeit gesteuert werden. Dadurch wird die Acetatproduktion minimiert.

In der Literatur wird eine *Batch*-Startkonzentration von 20 g L^{-1} Glucose als sicher für *E. coli* beschrieben (FUCHS *et al.*, 2002). D.h. es werden bei dieser Konzentration nur geringe Acetatkonzentrationen erreicht. Aus diesem Grunde wurde diese Konzentration für die *Batch*-Kultivierungsphase gewählt um eine gute Basis für die *Fed-Batch*-Kultivierungsphase zu schaffen. Die Zusammensetzung des *Feed*-Mediums wurde bis auf die Glucosekonzentration identisch zum *Batch*-Medium beibehalten. Es wurde eine Glucosekonzentration von 400 g L^{-1} gewählt.

Es wurde experimentell festgestellt, dass eine Zelldichte von $OD = 200$ rel. AU nicht gut reproduzierbar war. Meist setzte vorher – bei einer Biotrockenmasse von ca. 45 g L^{-1} – eine Zellyse ein.

Die Zusammensetzung und Konzentrationen der für das verwendete *Feed*-Medium eingesetzten Spurenelemente wurde mit der Literatur verglichen. Der Literatur wurde entnommen, dass deutlich höhere Magnesiumsulfatkonzentrationen eingesetzt werden sollten (Tabelle 33).

Tabelle 33: Vergleich der Magnesiumkonzentration von ZYP-Medium und ausgewählten Beispielen der Literatur.

	ZYP-Medium	LINDEN & SINGH (2008)	KLEMAN <i>et al.</i> (1991)
MgSO ₄ (<i>Batch</i>)	10 mM	5,94 mM	2,48 mM
MgSO ₄ (<i>Feed</i>)	10 mM	90,37 mM	3,84 bis 40 mM

Die MgSO₄-Konzentrationen der *Batch*- und *Feed*-Medien wurden auf 20 mM verdoppelt. Dadurch wurden die verwendeten Medien erfolgreich optimiert, sodass ohne Lyserscheinungen reproduzierbar optische Dichten von 200 rel. AU erreicht werden konnten.

Diskussion

Durch Änderungen und Ergänzungen am Reaktorsystem, die Etablierung der Sauerstoffanreicherung, sowie die Optimierung ihrer Regelparameterisierung wurde erfolgreich ein Reaktorsystem geschaffen in dem ein angemessener Sauerstoffeintrag gewährleistet werden konnte. Darüber hinaus konnte die Zusammensetzung der *Batch*- und *Feed*-Medien erfolgreich optimiert werden, sodass reproduzierbar die angestrebte optische Zelldichte von 200 rel. AU erreicht werden konnte. D. h. dass in dem verwendeten Reaktorsystem die Grenze dessen erreicht werden konnte, was technisch mit *E. coli* ohne den Einsatz von Perfusionstechniken erreichbar ist. Eine Durchführung des geplanten Prozesses war somit möglich.

Die bisherigen Arbeiten wurden mit einer rein manuellen Steuerung des *Feed*-Volumenstroms \dot{V}_{Feed} durchgeführt. Diese Möglichkeit ist aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands (>35 h) und der zwingend erforderlichen Präsenz des Experimentators über den gesamten Versuchszeitraum nicht mit dem erforderlichen Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführbar gewesen, welcher für die Entwicklung eines vergleichbaren biotechnologischen Prozesses angestrebt werden sollte.

8.3 Untersuchung eines stufenförmigen *Feed*-Profils

8.4 Untersuchung verschiedener Induktionsstrategien

Sollen Proteine in Hochzelldichtekulturen produziert werden, ist die Wahl des Induktionszeitpunkts von besonderer Wichtigkeit. Eine zu frühe Induktion führt durch die erzwungene Überproduktion über einen längeren Kultivierungszeitraum zu Stress, wodurch verstärkt Acetat produziert werden kann. Dies kann die Proliferation und die

Proteinausbeute negativ beeinträchtigen. Um diesen Effekt abzuschwächen wird für gewöhnlich bei Erreichen von 50 % bis 100 % der angestrebten maximalen Zelldichte induziert.

Es sollte untersucht werden wie sich verschiedene Induktionsstrategien auf die Proteinproduktion mit dem Produktionsstamm *E. coli* SE1 CHI_sERed auswirken. Auf Basis des etablierten dreiphasigen Hochzelldichtekultivierungsprotokolls wurden hierfür zwei Strategien getestet. Die erste Strategie sah eine Induktion nach Erreichen von $OD_{600} = 100$ rel. AU vor. Bei der zweiten Strategie wurde induziert sobald $OD_{600} = 200$ rel. AU erreicht war.

Nach 18,0h Kultivierungszeit wurde in diesem Versuch die angestrebte optische Dichte von 100 rel. AU erreicht. Es wurde mit 5 g L^{-1} Laktose induziert. Die Wachstumsgeschwindigkeit blieb mit ca. $0,11 \text{ h}^{-1}$ für die nächsten 8,0h der Produktionsphase relativ konstant. Die Laktosekonzentration nahm in diesem Zeitraum mit linearem Verhalten von $3,24 \text{ g L}^{-1}$ bis $1,96 \text{ g L}^{-1}$ um etwa $1,26 \text{ g L}^{-1}$ ab. Die Acetatkonzentration wurde erfolgreich unterhalb von $0,35 \text{ g L}^{-1}$ gehalten. Nachdem eine optische Dichte von 192 rel. AU erreicht war, wurde in der Kultur Lysis beobachtet und der Versuch wurde beendet. Anschließend wurde die Biomasse geerntet und es wurden damit Biotransformationsexperimente durchgeführt.

Es wurde eine Phloretinkonzentration von $1,03 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, was einer Ausbeute von 21 % entsprach. Die Proteinproduktion wurde via SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung untersucht, es konnte jedoch weder in den löslichen noch in den unlöslichen Fraktionen eine Proteinproduktion nachgewiesen werden.

Die aufgezeichneten Verlaufsdaten des zweiten Telexperiments wurden in Abbildung ... zusammengefasst. Die Wachstumsgeschwindigkeit im Hauptteil der *Fed-Batch*-Phase betrug ca. $0,10 \text{ h}^{-1}$. Nach 26,0h Kultivierungszeit wurde die angestrebte optische Dichte von 200 rel. AU erreicht und es wurde mit 5 g L^{-1} Laktose induziert. Die Produktionsphase erstreckte sich über die folgenden 7,0h in denen kein weiteres Wachstum mehr statt fand. Die Laktosekonzentration nahm mit linearem Verhalten von $5,07 \text{ g L}^{-1}$ zu $4,19 \text{ g L}^{-1}$ um etwa $0,87 \text{ g L}^{-1}$ ab. Die Acetatkonzentration wurde erfolgreich unterhalb von $0,70 \text{ g L}^{-1}$ gehalten. Nachdem in der Kultur Lysis und eine Überfütterung beobachtet wurden wurde der Versuch beendet. Die Biomasse wurde geerntet und es wurden damit Biotransformationsexperimente durchgeführt.

Es wurde eine Phloretinkonzentration von $0,87 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, was einer Ausbeute von 16 % entsprach. Die Proteinproduktion wurde via SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung

untersucht, es konnte jedoch weder in den löslichen noch in den unlöslichen Fraktionen eine Proteinproduktion nachgewiesen werden.

Diskussion

Es wurde festgestellt, dass nicht die gesamte für die Induktion verwendete Laktose aufgenommen und umgesetzt wurde. Die Laktosekonzentration verringerte sich lediglich um ca. 1 g L^{-1} . In beiden Experimenten wurden weder von der Chalkonisomerase noch von der Enoatreduktase deutliche Überproduktionen nachgewiesen und es waren nur geringe Phloretinausbeuten zu verzeichnen. Es wurde vermutet, dass nur ein geringer Teil der angebotenen Laktose tatsächlich aufgenommen wurde und die Abnahme der Konzentration auf eine Verdünnung durch das *Feed*-Medium zurück zu führen war. Diese Inhibierung der Laktoseaufnahme ist durch einen Katabolitrepersionsmechanismus begründet. Die Laktoseaufnahme ist auch bei glucoselimitiertem Wachstum verringert (STÜLKE & HILLEN, 1999; BROWN, 2002).

8.5 Untersuchung des Wachstumsverhaltens auf alternativen Kohlenstoffquellen

Die rekombinante Proteinproduktion in Hochzelldichte war unter Verwendung von Glucose als primärer Kohlenstoffquelle und Laktose als Induktor nicht erfolgreich. Als Ursache wurde die Inhibition der Aufnahme von Laktose durch *E. coli* in Gegenwart von Glucose vermutet. Eine interessante, schnelle und kostengünstige Möglichkeit zur Lösung dieses Problems bot der Einsatz alternativer Kohlenstoffquellen, welche im Gegensatz zu Glucose die parallele Aufnahme von Laktose erlauben. Damit wäre eine Induktion durch Laktose in dem Hochzelldichteprozess möglich. In der Literatur finden sich als kosteneffiziente Optionen für derartige Anwendung Fructose (ARISTIDOU *et al.*, 1999) und Glycerin (MÄRKEL *et al.*, 1993).

Die Herangehensweise an die Experimente war analog zu den bisherigen Experimenten in der Prozessentwicklung. Zunächst wurden in *Batch*-Kultivierungen mit Glycerin und Fructose die zugehörigen $Y_{X/S}$ Ausbeutekoeffizienten bestimmt.

In Vorversuchen mit Glycerin als primärer Kohlenstoffquelle wurde beobachtet, dass die *lag*-Phase verlängert wurde. Die eingesetzten Konzentration von Glycerin verschlechterten offenbar den Eintrag von Sauerstoff in die Kulturbrühe. Da sich sonst anaerobe Bedingungen einstellen würden, wurde als eine entscheidende Abweichung bei der

Kultivierung mit Glycerin eine minimale Rührergeschwindigkeit von 400 Upm gewählt. Durch diese Einstellung wurde gewährleistet, dass zu Beginn der *Batch*-Kultivierung eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff erfolgte.

Die Startkonzentration an Glycerin betrug im beschriebenen Versuch $23,45 \text{ g L}^{-1}$. Innerhalb von 12,50 h wurde das Substrat zu $13,73 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse umgesetzt, wodurch sich ein Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ von 0,58 ergab. Während der Kultivierung wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,37 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Zu Beginn der Kultivierung wurde eine Acetatkonzentration von $0,09 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung sank diese Konzentration jedoch, sodass in den letzten sechs Stunden kein Acetat mehr nachgewiesen werden konnte.

Die *Batch*-Kultivierung mit Fructose als Kohlenstoffquelle wurde mit den gleichen Einstellungen durchgeführt, welche auch bei der Verwendung von Glucose vorgenommen wurden (minimale Rührergeschwindigkeit von 100 Upm). Die Startkonzentration an Fructose betrug $19,19 \text{ g L}^{-1}$. Innerhalb von 12,25 h wurde das Substrat zu $14,87 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse umgesetzt. Dies ergab einen $Y_{X/S}$ Ausbeutekoeffizienten von $0,77 \text{ g g}^{-1}$. Während der Kultivierung wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,86 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Zu Beginn der Kultivierung wurde eine Acetatkonzentration von $0,24 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung verblieb diese Konzentration im Mittel konstant und am Ende der Kultivierung wurden $0,26 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gemessen.

Diskussion

In den durchgeführten Versuchen konnten die aus der Literatur entnommenen Angaben bestätigt werden. Im Vergleich zu Glucose-basiertem Medium wurde mit *E. coli* bei Wachstum auf Glycerin ein um 34,9 % höherer Biomassenausbeutekoeffizient erhalten. Die Umsetzung von Fructose zu Biomasse erfolgte in den durchgeführten Experimenten am effizientesten. Es wurde ein Ausbeutekoeffizient erhalten, welcher um 79,0 % höher als der mit Glucose erhaltene Wert war.

Besonders interessant und vielversprechend war die beobachtete Metabolisierung von Acetat. Bei dem Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde das aus dem Inokulum stammende Acetat vollständig verbraucht. In der Kultivierung mit Fructose hingegen konnte keine derartige Metabolisierung beobachtet werden. Die Acetatkonzentration stieg während des Experiments aber auch nicht weiter an. Eine mögliche Begründung war über die Wachstumsgeschwindigkeit herzuleiten. Sie betrug in dem Glycerin-basierten Medium $0,37 \text{ h}^{-1}$. Dabei handelte es sich um den geringsten bei den Experimenten

erhaltenen Wert. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist durch die ineffiziente Aufnahme von Glycerin in die bakteriellen Zellen begründet. Daraus resultierte ein begünstigter Verbrauch des Acetats.

Die Aufnahme von Fructose hingegen ist sehr effizient. Fructose triggert, wie auch Glycerin, im Gegensatz zu Glucose die Acetatproduktion nicht direkt und so es ist möglich, dass Acetat parallel metabolisiert wird. Hierdurch erfolgte im Experiment keine weitere Akkumulation von Acetat. Dies liefert auch die Begründung dafür, dass bei Einsatz Fructose-basierter definierter Medien die höchsten Wachstumsraten erhalten wurden.

Beide Substrate stellten basierend auf den erhaltenen Ergebnissen geeignete Alternativen zu Glucose dar. Sie wurden für Hochzelldichtekultivierungen und Proteinproduktionsexperimente eingesetzt.

Literatur

- ANDERSEN, K.B., VON MEYENBURG, K.: Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? in: *Journal of Bacteriology* 144 (1980) (1), 114–123
- ANGOV, E., LEGLER, P.M., MEASE, R.M.: Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. in: *Methods in Molecular Biology* 705 (2011), 1–13
- ARISTIDOU, A.A., SAN, K.Y., BENNETT, G.N.: Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. in: *Biotechnology and Bioengineering* 44 (1994) (8), 944–951, ISSN 1097-0290
- ARISTIDOU, A.A., SAN, K.Y., BENNETT, G.N.: Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. in: *Biotechnology Progress* 15 (1999) (1), 140–145
- ARNOLD, C.N., MCELHANON, J., LEE, A., LEONHART, R., SIEGELE, D.A.: Global Analysis of *Escherichia coli* Gene Expression during the Acetate-induced Acid Tolerance Response. in: *Journal of Bacteriology* 183 (2001) (7), 2178–2186
- BABU, K.R., SWAMINATHAN, S., MARTEN, S., KHANNA, N., RINAS, U.: Production of interferon- α in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2000) (6), 655
- BALDWIN, I.T.: Interactions of plants with their environment. in: *Research Perspectives of the Max Planck Society* (2010), 22–23
- BANEYX, F.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. in: *Current Opinion in Biotechnology* 10 (1999), 411 – 421
- BAUER, K.A., BEN-BASSAT, A., DAWSON, M., DE LA PUENTE, V.T., NEWAY, J.O.: Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. in: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990) (5), 1296–1302
- BAUER, S., ZIV, E.: Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. in: *Biotechnology and Bioengineering* 18 (1976) (1), 81–94, ISSN 1097-0290
- BÖCK, A., SAWERS, G.: (1996); *Fermentation. In: Escherichia coli and Salmonella: Molecular and Cellular Biology*, Kap. 18, ASM Press, 262–282
- BELO, I., MOTA, M.: Batch and fed-batch cultures of *E. coli* TB1 at different oxygen transfer rates: Effect of stirring and oxygen partial pressures on cell growth and cytochrome b5 production. in: *Bioprocess Engineering* 18 (1998), 451–455
- BERMEJO, L., WELKER, N., PAPOUTSAKIS, E.: Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Genes in *Escherichia coli* for Acetone Production and Acetate Detoxification. in: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998) (3), 1079–1085
- BERRÍOS-RIVERA, S.J., BENNETT, G.N., SAN, K.Y.: Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase. in: *Metabolic Engineering* 4 (2002), 217–229
- BLANKENHORN, D., PHILLIPS, J., SLONCZEWSKI, J.L.: Acid- and Base-induced Proteins during Aerobic and ANaerobic Growth of *Escherichia coli* Revealed by Two-dimensional Gel Electrophoresis. in: *Journal of Bacteriology* 181 (1999) (7), 2209–2216
- BMEL, AID: (2015); Liste der Zusatzstoffe nach ihren E-Nummern, *on-line*
- BOWDEN, G.A., GEORGIU, G.: Folding and Aggregation of β -Lactamase in the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. in: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990) (28), 16.760–16.766

- BROSIUS, J., ERFLE, M., STORELLA, J.: Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. in: *Journal of Biological Chemistry* 260 (1985) (6), 3539–3541
- BROWN, T.A.: (2002); *Genomes*, Kap. 12: Regulation of Genome Activity, 2 Aufl., Oxford: Wiley-Liss
- BUCHNER, J., RUDOLPH, R.: Routes to active proteins from transformed microorganisms. in: *Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991) (4), 532 – 538, ISSN 0958-1669
- BUCHTA, K.: (1983); *Lactic Acid*. In: *Biotechnology*, Bd. 3, Verlag Chemie, 409–417
- CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., CHIGGERI, G., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L., TRIGHETTI, P.: Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. in: (2004) (25), 1327–1333
- CASALI, N., PRESTON, A.: (2003); *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*, Bd. 235, Humana Press
- CHALMERS, J.J., KIM, E., TELFORD, J.N., WONG, E.Y., TACON, W.C., SHULER, M.L., WOILSON, D.B.: Effects of Temperature on *Escherichia coli* Overproducing β -Lactamase or Human Epidermal Growth Factor. in: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990) (1), 104–111
- CHANG, C., RYU, D.D., PARK, C.S., KIM, J.Y., OGRYDZIAK, D.M.: Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1998) (5), 531–537
- CHAUHAN, R.P., WOODLEY, J.: Increasing the productivity of bioconversion processes. in: *ChemTech* 27 (1997) (6), 26–30
- CHEN, H.T., LIN, M.S., HOU, S.Y.: Multiple-copy-gene integration on chromosome of *Escherichia coli* for beta-galactosidase production. in: *Korean Journal of Chemical Engineering* 25 (2008) (5), 1082–1087, ISSN 0256-1115
- CHERRINGTON, C.A., HINTON, M., CHOPRA, I.: Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. in: *Journal of Applied Bacteriology* 68 (1990) (1), 69–74, ISSN 1365-2672
- CHMIEL, H.: (2011); *Bioprosesstechnik*, 3 Aufl., Springer Spektrum
- CHOI, J.H., JEONG, K.J., KIM, S.C., LEE, S.Y.: Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the Bacillus sp. endoxylanase signal sequence. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2000) (6), 640–645, ISSN 0175-7598
- CHOI, J.H., KEUM, K.C., LEE, S.Y.: Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. in: *Chemical Engineering Science* 61 (2006) (3), 876 – 885, ISSN 0009-2509. Biomolecular Engineering
- CHOI, S.J., PARK, D.H., JUNG, K.H.: Development and optimization of two-stage cyclic fed-batch culture for hG-CSF production using L-arabinose promoter of *Escherichia coli*. in: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (2001) (1), 51–58, ISSN 1615-7591
- CHOU, C.H., BENNETT, G.N., SAN, K.Y.: Effect of Modulated Glucose Uptake on High-Level Recombinant Protein Production in a Dense *Escherichia coli* Culture. in: *Biotechnology Progress* 10 (1994) (6), 644–647, ISSN 1520-6033
- CHRISTENSEN, L.P., BRANDT, K.: (2006); *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Kap. Acetylenes and Psoralenes, Blackwell Publishing, 137–164
- CLARK, B., HOLMS, W.H.: Control of the sequential utilization of glucose and fructose by *Escherichia coli*. in: *Journal of General Microbiology* 96 (1976) (2), 191–201
- CLARK, D.: Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: analysis by operon fusion. in: *Journal of Bacteriology* 148 (1981) (2), 521–526

- COOK, N., SAMMAN, S.: Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. in: *The Journal of nutritional biochemistry* 7 (1996) (2), 66–76
- COOPER, T.F., HEINEMANN, J.A.: Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 97 (2000) (23), 12.643–12.648
- CRANENBURGH, R.M., HANAK, J.A., WILLIAMS, S.G., SHERRAT, D.J.: *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. in: *Nucleic Acid Research* 29 (2001) (5), 1–6
- CROZIER, A., JAGANATH, I.B., CLIFFORD, M.N.: (2006); *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Kap. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, Blackwell Publishing, 1–22
- CYSEWSKI, G.R., WILKE, C.R.: Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. in: *Biotechnology and Bioengineering* 19 (1977) (8), 1125–1143
- DAFOE, J.T., DAUGULIS, A.J.: In situ product removal in fermentation systems: improved process performance and rational extractant selection. in: *Biotechnology Letters* 36 (2014), 443–460
- DARWISH, W.S., ELDALY, E.A., EL-ABBASY, M.T., IKENAKA, Y., NAKAYAMA, S., ISHIZUKA, M.: Antibiotic residues in food: the African scenario. in: *Japanese Journal of Veterinary Research* 61 (2013), 13–22
- DÍAZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M.A., GARCÍA, J.L.: Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. in: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2001) (4), 523–569
- DE BERNANDEZ CLARK, E.: Refolding of recombinant proteins. in: *Current Opinion in Biotechnology* 9 (1998), 157–163
- DEMME, W., FABER, R., HÖRL, H.H., VILLAIN, L.: (2011); Verfahren zur Gewinnung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe unter Verwendung einer Membran mit kationenaustauschenden Gruppen
- DERMAN, A., PRINZ, W., BELIN, D., BECKWITH, J.: Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. in: *Science* 262 (1993) (5140), 1744–1747
- DIAZ-RICCI, J.C., REGAN, L., BAILEY, J.E.: Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. in: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991) (11), 1318–1324, ISSN 1097-0290
- DOELLE, H.W., EWINGS, K.N., HOLLYWOOD, N.W.: (1982); Regulation of glucose metabolism in bacterial systems, in: *Microbial Reactions*, Bd. 23 von *Advances in Biochemical Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-540-11698-1, 1–35
- DOHERTY, A.J., CONNOLLY, B.A., WORRALL, A.F.: Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNase I, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. in: *Gene* 136 (1993) (1&2), 337 – 340, ISSN 0378-1119
- DÖRING, W.: Flavonoide - Chemischer Aufbau, Eigenschaften. in: *Fortbildung: Pharmazeutische Wissenschaft* (2010), 8–13
- DURANY, O., BASSETT, P., WEISS, A.M.E., CRANENBURGH, R.M., FERRER, P., LÓPEZ-SANTÍN, J., DE MAS, C., HANK, J.A.J.: Production of Fuculose-1-Phosphate Aldolase Using Operator-Repressor Titration for Plasmid Maintenance in High Cell Density *Escherichia coli* Fermentations. in: *Wiley InterScience* (2005), 460–467
- EINSELE, A.: Scaling-up bioreactors. in: *Process Biochemistry* 7 (1978), 13–14
- EL-MANSI, BRYCE, DAHOU, SANCHEZ, DEMAIN, ALLMAN: (2011); *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, CRC Press

- EL-MANSI, E., HOLMS, W.: Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures. in: *Journal of General Microbiology* 135 (1989), 2875–2883
- FARMER, W., LIAO, J.: Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. in: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997) (8), 3205–3210
- FAULKNER, E., BARRETT, M., OKOR, S., KIERAN, P., CASEY, E., PARADISI, F., ENGEL, P., GLENNON, B.: Use of Fed-Batch Cultivation for Achieving High Cell Densities for the Pilot-Scale Production of a Recombinant Protein (Phenylalanine Dehydrogenase) in *Escherichia coli*. in: *Biotechnology Progress* 22 (2006) (3), 889–897, ISSN 1520-6033
- FERNÁNDEZ-CASTANÉ, A., VINE, C.E., CAMINAL, G., LÓPEZ-SANTÍN, J.: Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. in: *Journal of Biotechnology* 157 (2012) (3), 391 – 398, ISSN 0168-1656
- FIESCHKO, J.C.: (1989); *Fermentation Technology Using Recombinant Microorganisms*. In: *Biotechnology*, Kap. 7b, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 117–140
- FIGGE, J., WRIGHT, C., COLLINS, C., ROBERTS, T.M., LIVINGSTON, D.M.: Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli* lac repressor in monkey cells. in: (1988) (52), 713 – 722
- FREEMAN, A., WOODLEY, J.M., LILLY, M.D.: In situ product removal as a tool for bioprocessing. in: *Biotechnology* 11 (1993) (9), 1007–1012
- FRIEDMAN, M.R., GADEN JR., E.L.: Growth and acid production by *Lactobacillus (L) delbrueckii* in a dialysis culture system. in: *Biotechnology and Bioengineering* 12 (1970) (6), 961–974
- FUCHS, C., KÖSTER, D., WIEBUSCH, S., MAHR, K., EISBRENNER, G., MÄRKL, H.: Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. in: *Journal of Biotechnology* 93 (2002) (3), 243 – 251, ISSN 0168-1656
- GALL, M., THOMSEN, M., PETERS, C., PAVLIDIS, I.V., JONCZYK, P., GRÜNERT, P.P., BEUTEL, S., SCHEPER, T., GROSS, E., BACKES, M., GEISSLER, T., LEY, J.P., HILMER, J.M., KRAMMER, G., PALM, G.J., HINRICHS, W., BORNSCHEUER, U.T.: Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase. in: *Angewandte Chemie* 126 (2014) (5), 1463–1466, ISSN 1521-3757
- GEHLAWAT, J.K.: New technology for invert sugar and high fructose syrups from sugarcane. in: *Indian Journal of Chemical Technology* 8 (2001), 28–32
- GERDES, K., RASMUSSEN, P.B., MOLIN, S.: Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 83 (1986) (10), 3116–3120
- GERHARDT, P., GALLUP, D.M.: Dialysis flask for concentrated culture of microorganisms. in: *Journal of Bacteriology* 86 (1963) (5), 919–929
- GERIGK, M., BUJNICKI, R., GANPO-NKWENKWA, E., BONGAERTS, J., SPRENGER, G., TAKORS, R.: Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. in: *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002) (7), 746–754, ISSN 1097-0290
- GILL, R.T., VALDES, J.J., BENTLEY, W.E.: A Comparative Study of Global Stress Gene Regulation in Response to Overexpression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. in: *Metabolic Engineering* 2 (2000) (3), 178 – 189, ISSN 1096-7176
- GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N., GARCÍA-FRUITÓS, E., VILLAVERDE, A.: Recombinant protein-solubility - does more mean better? in: *Nature Biotechnology* 25 (2007), 718–720
- GOTTESMANN, S.: Proteases and their targets in *Escherichia coli*. in: *Annual Review of Genetics* 30 (1996), 465–506

- GRÜNERT, P.P.: (2012); *Entwicklung eines Bioprozesses zur Flavonoid-Transformation*, Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
- GRODBERG, J., DUNN, J.: ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. in: *Journal of Bacteriology* 170 (1988) (3), 1245–1253
- GRONENBORN, B.: Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. in: *Molecular and General Genetics* 148 (1976) (3), 243–250
- GRÄSLUND, NORDLUND, WEIGELT, BRAY, GILEADI, KNAPP, OPPERMANN, ARROWSMITH, HUI, MING, DHE PAGANON, PARK, SAVCHENKO, YEE, EDWARDS, VINCENTELLI, CABBILLAU, KIM, KIM, RAO, SHI, TERWILLIGER, KIM, HUNG, WALDO, PELE, ALBECK, UNGER, DYM, PRILUSKY, SUSSMAN, STEVENS, LESLEY, WILSON, JOACHIMIAK, COLLART, DEMENTIEVA, DONNELLY, ESCHENFELDT, KIM, STOLS, WU, ZHOU, BURLEY, EMTAGE, SAUDER, THOMPSON, BAIN, LUZ, GHEYI, ZHANG, ATWELL, ALMO, BONANNO, FISER, SWAMINATHAN, STUDIER, CHANCE, SALI, ACTON, XIAO, ZHAO, MA, HUNT, TONG, CUNNINGHAM, INOUYE, ANDERSON, JANJUA, SHASTRY, HO, WANG, WANG, JIANG, MONTELIONE, STUART, OWENS, DAENKE, SCHÜTZ, HEINEMANN, YOKOYAMA, BÜSSOW, GUNSALUS: Protein production and purification. in: *Nature Methods* 5 (2008) (2), 135–146
- GUNSALUS, I.C., STANIER, R.Y.: The Bacteria, vol. 1, Structure. in: *Science* 133 (1960) (3455), 750–751
- GUSTAFSSON, C., GOVINDARAJAN, S., MINSHULL, J.: Codon Bias and Heterologous Protein Expression. in: *Trends in Biotechnology* 22 (2004) (7), 346–353
- HAHM, D., KIM, S., PAN, J., RHEE, J.: Maximum Yield of Foreign Lipase in *Escherichia coli* HB101 Limited by Duration of Protein Expression. in: *Journal of fermentation and bioengineering* 79 (1995) (3), 236–241, ISSN 0922338X
- HAN, J., ZHONG, J.J.: Effects of oxygen partial pressure on cell growth and ginsenoside and polysaccharide production in high density cell cultures of *Panax notoginseng*. in: *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) (3-4), 498 – 503, ISSN 0141-0229
- HAN, K., HONG, J., LIM, H.C.: Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentation. in: *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993) (3), 316–324, ISSN 1097-0290
- HAN, K., LIM, H.C., HONG, J.: Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. in: *Biotechnology and Bioengineering* 39 (1992) (6), 663–671, ISSN 1097-0290
- HAN, L.: (2004); *Genetically Modified Microorganisms*, Kap. 2, 29 – 51
- HANDA, N., KOBAYASHI, I.: Post-segregational killing by restriction modification gene complexes: observations of individual cell deaths. in: *Biochimie* 81 (1999) (8-9), 931–938
- HANNIG, G., MAKRIDES, S.C.: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. in: *Trends in Biotechnology* 16 (1998) (2), 54 – 60, ISSN 0167-7799
- HARBORNE, J.: (1988); *The Flavonoids - Advances in Research Since 1980*, 1 Aufl., Chapman and Hall
- HARBORNE, J., BAXTER, H.: (2001); *The Handbook of Natural Flavonoids*, Bd. 1-2, John Wiley and son (New York)
- HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBLIYA, D.J.: Flavonoids antioxidants - Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. in: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (2002), 572–584
- HEINRICH, C., BECKMANN, T., BÜNTEMEYER, H., NOLL, T.: Utilization of multifrequency permittivity measurements in addition to biomass monitoring. in: *BMC Proceedings* 5 (2011), 1–2. Supplement 8
- HELLMUTH, K., KORZ, D.J., SANDERS, E.A., DECKWER, W.D.: Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmid during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. in: *Journal of Biotechnology* 32 (1994), 289–298

- HERLES, C., BRAUNE, A., BLAUT, M.: First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*. in: *Archives Of Microbiology* 181 (2004) (6), 428–434
- HÄGG, P., DE POHL, J.W., ABDULKARIM, F., ISAKSSON, L.A.: A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. in: *Journal of Biotechnology* 111 (2004) (1), 17–30
- HILMER, J.M., GROSS, E., KRAMMER, G., LEY, J.P., GALL, M., BORNSCHEUER, U., THOMSEN, M., PETERS, C., JONCZYK, P., BEUTEL, S., SCHEPER, T.: (2012); Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Dihydrochalkonen
- HOBBS, L.: (2009); *Starch: Chemistry and Technology*, Kap. 21: Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses, Elsevier Inc., 797–832
- HOCKNEY, R.C.: Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. in: *Trends in Biotechnology* 12 (1994) (11), 456 – 463, ISSN 0167-7799
- HOLMS, H.: Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. in: *FEMS Microbiology Reviews* 19 (1996) (2), 85–116
- HOSSEINZADEH, M., ALIZADEH, M., RANJBAR, M.: Optimization of Re solvent extraction from molybdenite roasting dust leaching solution and the performance evaluation of extraction in a multi-stage mixer-settler. in: 130 (), 88–94
- HOTTA, H., NAGANO, S., UEDA, M., TSUJINO, Y., KOYAMA, J., OSAKAI, T.: Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. in: *Biochimica et Biophysica Acta* 1572 (2002) (1), 123–132
- HUMPHREY, A.J., BEALE, M.H.: (2006); *Plant Secondary Metabolites*, Kap. Terpenes, Blackwell Publishing, 47–94
- JAHIC, M., WALLBERG, F., BOLLOK, M., GARCIA, P., ENFORS, S.O.: Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. in: *Microbial Cell Factories* 2 (2003) (6), 1–11
- JENSEN, E.B., CARLSEN, S.: Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. in: *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990) (1), 1–11, ISSN 1097-0290
- JEONG, K.J., CHOI, J.H., YOO, W.M., KEUM, K.C., YOO, N.C., LEE, S.Y., SUNG, M.H.: Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant *rpoS*⁻ *Escherichia coli*. in: *Protein Expression and Purification* 36 (2004) (1), 150 – 156, ISSN 1046-5928
- JEONG, K.J., LEE, S.Y.: High-Level Production of Human Leptin by Fed-batch Cultivation of Recombinant *E. coli* and its Purification. in: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) (7), 3027–3032
- JONCZYK, P., SCHMIDT, A., BICE, I., GALL, M., GROSS, E., HILMER, J.M., BORNSCHEUER, U., BEUTEL, S., SCHEPER, T.: Strictly Anaerobic Batch Cultivation of *Eubacterium ramulus* in a Novel Disposable Bag Reactor System. in: *Chemie Ingenieur Technik* 83 (2011) (12), 2147–2152
- JONCZYK, P., TAKENBERG, M., HARTWIG, S., BEUTEL, S., BERGER, R.G., SCHEPER, T.: Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. in: *Journal of Biotechnology* 167 (2013) (4), 370–376
- JUNG, G., DENÈFLE, P., BECQUART, J., MAYAUX, J.F.: High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1 β . in: *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 139 (1988) (1), 129–146
- JUNKER, B.H.: Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. in: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (2004) (6), 347–64

- KANE, J.F., HARTLEY, D.L.: Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. in: *Trends in Biotechnology* 6 (1988) (5), 95–101
- KING, HAASE-PETTINGELL, ROBINSON, SPEED, MITRAKI: Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. in: *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (1996) (1), 57–66
- KLEMAN, G.L., CHALMERS, J.J., LULI, G.W., STROHL, W.R.: Glucose-Stat, a Glucose-Controlled Continuous Culture. in: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991) (4), 918–923
- KONSTANTINOV, K.B., NISHIO, N., SEKI, T., YOSHIDA, T.: Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production. in: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71 (1991) (5), 350 – 355, ISSN 0922-338X
- KORNBERG, H.L.: Fructose transport by *Escherichia coli*. in: *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 326 (1990) (1236), 505–513
- KORNBERG, H.L., BEEVERS, H.: The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. in: *Biochimica et Biophysica Acta* 26 (1957) (3), 531–537
- KORNBERG, H.L., KREBS, H.A.: Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle. in: *Nature* 179 (1957), 988 – 991
- KORZ, D., RINAS, U., HELLMUTH, K., SANDERS, E., DECKWER, W.D.: Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. in: *Journal of Biotechnology* 39 (1995) (1), 59 – 65, ISSN 0168-1656
- KRACKE-HELM, H.A., RINAS, U., HITZMANN, B., SCHÜGERL, K.: Cultivation of recombinant *E. coli* and production of fusion protein in 60-1 bubble column and airlift tower loop reactors. in: *Enzyme and Microbial Technology* 13 (1991) (7), 554–564
- KRÄMER, J.: (2011); *Lebensmittelmikrobiologie*, Bd. 6, Kap. 3.3. Beeinflussung des Lebensmittelverderbs: a_W -Wert, Ulmer - UTB, 140–143
- KURLAND, C., GALLANT, J.: Errors of heterologous protein expression. in: *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996) (5), 489 – 493, ISSN 0958-1669
- LEE, S.Y.: High cell-density culture of *Escherichia coli*. in: *Trends in Biotechnology* 14 (1996) (3), 98 – 105, ISSN 0167-7799
- LEY, J., GROSS, E., KRAMMER, G., GALL, M., BORNSCHEUER, U., THOMSEN, M., PETERS, C., BEUTEL, S., SCHEPER, T.: (2015); Verfahren zur Umsetzung von Flavanonglykosiden
- LI, Y., CHEN, J., YING MAO, Y., YI LUN, S., MO KOO, Y.: Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. in: *Process Biochemistry* 33 (1998) (7), 709 – 714, ISSN 1359-5113
- LIAO, Y.D., JENG, J.C., WANG, C.F., WANG, S.C., CHANG, S.T.: Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. in: *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13 (2004) (7), 1802–1810
- LINDEN, A., SINGH, R.: (2008); *High cell-density fermentation of E. coli*
- LOPES, M., MOTA, M., BELO, I.: Oxygen Mass Transfer Rate in a Pressurized Lab-Scale Stirred Bioreactor. in: *Chemical Engineering and Technology* 36 (2013) (10), 1779–1784, ISSN 1521-4125
- LUKE, J., CARNES, A.E., HODGSON, C.P., WILLIAMS, J.A.: Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system. in: *Vaccine* 27 (2009) (46), 6454–6459
- LYE, G.J., WOODLEY, J.: Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. in: *Trends in Biotechnology* 17 (1999) (10), 395–402

- MACALONEY, G., DRAPER, I., PRESTON, J., ANDERSON, K., ROLLINS, M., THOMPSON, B., HALL, J., MCNEIL, B.: At-Line Control and Fault Analysis In an Industrial High Cell Density *Escherichia coli* Fermentation, Using NIR Spectroscopy. in: *Food and Bioproducts Processing* 74 (1996) (4), 212–220
- MAJEWSKI, R.A., DOMACH, M.M.: Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. in: *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990) (7), 732–738, ISSN 1097-0290
- MAKRIDES, S.C.: Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. in: *Microbiological Reviews* 60 (1996) (3), 512–538
- MARR, A.G.: Growth Rate of *Escherichia coli*. in: *Microbiological Reviews* 55 (1991) (2), 316–333
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, K., FLORES, N., CASTANEDA, H.M., MARTÍNEZ-BATALLAR, G., HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, G., RAMÍREZ, O.T., GOSSET, G., ENCARNACIÓN, S., BOLIVAR, F.: New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. in: *Microbial Cell Factories* 11 (2012) (46), 1–21
- MAZID, M., KHAN, T.A., MOHAMMAD, F.: Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. in: *Biology and Medicine* 3 (2011) (2), 232–249
- MEYER, H.P., LEIST, C., FIECHTER, A.: Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. in: *Journal of Biotechnology* 1 (1984) (5-6), 355 – 358, ISSN 0168-1656
- MIJTS, B.N., SCHMIDT-DANNERT, C.: Engineering of secondary metabolite pathways. in: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003) (6), 597 – 602, ISSN 0958-1669
- MOFFATT, B.A., STUDIER, F.: T7-lysozyme inhibits transcription by T7-RNA-polymerase. in: *Cell* 49 (1987) (2), 221 – 227, ISSN 0092-8674
- MÄRKL, H., ZENNECK, C., DUBACH, A., OGBONNA, J.: Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (1993) (1), 48–52, ISSN 0175-7598
- NAKAJIMA, J.I., TANAKA, Y., YAMAZAKI, M., SAITO, K.: Reaction Mechanism from Leucoanthocyanidin to Anthocyanidin 3-Glucoside, a Key Reaction for Coloring in Anthocyanin Biosynthesis. in: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) (28), 25.797–25.803
- NAKANO, K., RISCHKE, M., SATO, S., MÄRKL, H.: Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (1997) (5), 597–601, ISSN 0175-7598
- NAKAYAMA, T.: Enzymology of aurone biosynthesis. in: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (2002) (6), 487 – 491, ISSN 1389-1723
- NAMDEV, P.K., IRWIN, N., THOMPSON, B.G., GRAY, M.R.: Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. in: *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993) (6), 666–670, ISSN 1097-0290
- NELSON, S.O., WRIGHT, J.K., POSTMA, P.W.: The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. in: *EMBO Journal* 2 (1983) (5), 715–720
- NILSSON, J., STÅHL, S., LUNDEBERG, J., UHLEN, M., NYGREN, P.A.: Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification and Immobilization of Recombinant Proteins. in: *Protein Expression and Purification* 11 (1997), 1 – 16
- NORDHEIM, A., KNIPPERS, R.: (2015); *Molekulare Genetik*, 10 Aufl., Thieme
- NORONHA, S.B., YEH, H.J.C., SPANDE, T.F., SHILOACH, J.: Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using ¹³C-NMR/MS. in: *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2000) (3), 316–327, ISSN 1097-0290

- OH, M.K., ROHLIN, L., KAO, L.C., LIAO, J.C.: Global Expression Profiling of Acetate-grown *Escherichia coli*. in: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), 13.175–13.183
- ONKEN, U., LIEFKE, E.: (1989); Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes, in: *Bioprocesses and Engineering*, Bd. 40 von *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-540-51446-6, 137–169
- O'PREY, J., BROWN, J., FLEMING, J., HARRISON, P.R.: Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. in: *Biochemical Pharmacology* 66 (2003), 2075–2088
- OW, D.S.W., NISSOM, P., PHILP, R., KAH, S., OH, W., GEK, M., YAP, S.: Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. in: *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) (3), 391–398
- PAALME, T., ELKEN, R., KAHRU, A., VANATALU, K., VILU, R.: the growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. in: *Antonie Van Leeuwenhoek* 71 (1997) (3), 217–230
- PAALME, T., KAHRU, A., ELKEN, R., VANATALU, K., TIISMA, K.: The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat). in: *Journal of Microbiological Methods* 24 (1995), 145–153
- PAALME, T., TIISMA, K., KAHRU, A., VANATALU, K., VILU, R.: Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. in: *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990) (3), 312–319, ISSN 1097-0290
- PALOMARES, L., ESTRADA-MONCADA, S., RAMÍREZ, O.: (2004); Production of Recombinant Proteins, in: *Recombinant Gene Expression*, Bd. 267 von *Methods in Molecular Biology* (P. Balbás, A. Lorence, Hg.), Humana Press, ISBN 978-1-58829-262-9, 15–51
- PAN, J.G., RHEE, J.S., LEBEAULT, J.M.: Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. in: *Biotechnology Letters* 9 (1987) (2), 89–94, ISSN 0141-5492
- PAPANEOPHYTOU, C.P., KONTOPIDIS, G.: Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. in: *Protein Expression and Purification* 94 (2014), 22–32
- PARK, C.H., GENG, Q.: Simultaneous Fermentation and Separation in the Ethanol and Abe Fermentation. in: *Separation and Purification Reviews* 21 (1992) (2), 127–174
- PEUBEZ, I., CHAUDET, N., MIGNON, C., HILD, G., HUSSON, S., COURTOIS, V., DE LUCA, K., SPECK, D., SODOYER, R.: Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production. in: *Microbial Cell Factories* 9 (2010) (65), 1–10
- PFAFFENZELLER, I., MAIRHOFER, J., STRIEDNER, G., BAYER, K., GRABHERR, R.: Using COLE1-derived RNA I for suppression of a bacterially encoded gene: implication for a novel plasmid addiction system. in: *Biotechnology Journal* 1 (2006) (6), 675–681
- PHUE, J.N., SHILOACH, J.: Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). in: *Journal of Biotechnology* 109 (2004) (1-2), 21–30
- POO, H., SONG, J., HONG, S.P., CHOI, Y.H., YUN, S., KIM, J.H., LEE, S., LEE, S.G., SUNG, M.: Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor- α . in: *Biotechnology Letters* 24 (2002) (14), 1185–1189, ISSN 0141-5492
- PÖRTNER, R., MÄRKEL, H.: Dialysis cultures. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1998) (4), 403–414, ISSN 0175-7598

- PUGSLEY, A.P.: The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. in: *Microbiological Reviews* 57 (1993) (1), 50–108
- PUZISS, M., HEDÉN, C.G.: Toxin production by *Clostridium tetani* in biphasic liquid cultures. in: *Biotechnology and Bioengineering* 7 (1965) (3), 355–366
- QIU, J., SWARTZ, J.R., GEORGIU, G.: Expression of Active Human Tissue-Type Plasminogen Activator in *Escherichia coli*. in: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998) (12), 4891–4896
- RARAN-KURUSSI, S., WAUGH, D.S.: The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated. in: *PLoS ONE* 7 (2012) (11), 1–10
- RIESENBERG, D.: High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. in: *Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991) (3), 380 – 384, ISSN 0958-1669
- RIESENBERG, D., GUTHKE, R.: High-cell-density cultivation of microorganisms. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (1999) (4), 422–430, ISSN 0175-7598
- RIESENBERG, D., MENZEL, K., SCHULZ, V., SCHUMANN, K., VEITH, G., ZUBER, G., KNORRE, W.: High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon $\alpha 1$. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 (1990) (1), 77–82, ISSN 0175-7598
- RIESENBERG, L.H., SCHILLING, E.E.: Floral flavonoids and ultraviolet patterns in *Viguiera* (composite). in: *American Journal of Botany* 72 (1985) (7), 999–1004
- RIJKE, E.D., OUT, P., NIESSEN, W.M.A., ARIESE, F., GOOJER, C., BRINKMAN, U.A.T.: Analytical separation and detection methods for flavonoids. in: *Journal of Chromatography* (2006), 31–63
- ROSANO, CECCARELLI: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. in: *Frontiers in Microbiology* 5 (2014), 1–17
- ROSENTHAL, G.A.: The biochemical basis for the deleterious effects of l-canavanine. in: *Phytochemistry* 30 (1991) (4), 1055–1058
- SAHM, H., ANTRANIKIAN, G., STAHMANN, K.P., TAKORS, R.: (2012); *Industrielle Mikrobiologie*, Springer Spektrum
- SAHU, S., GRAY, G.: Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. in: *Cancer Letters* 104 (1996) (2), 193–196
- SANDHAR, H.K., KUMAR, B., PRASHER, S., TIWARI, P., SALHAN, M., SHARMA, P.: A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. in: *Internationale Pharmaceutica Sciencie* 1 (2011) (1), 25–41
- SCHAFFER, H., WINK, M.: Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. in: *Biotechnology Journal* 4 (2009) (12), 1684–1703
- SCHEIN, C.H.: Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. in: *Nature Biotechnology* 7 (1989), 1141–1149
- SCHMIDT, A., BEUTEL, S., GROSS, E., HILMER, J.M., SCHEPER, T.: Biocatalytic formation of a bioactive dihydrochalcone by *Eubacterium ramulus*. in: *Journal of Biotechnology, Supplement* 150 (2010), 307
- SCHNEIDER, H., BLAUT, M.: Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. in: *Archives of Microbiology* 173 (2000) (1), 71–75
- SCHWARTZ, R., MCCOY, C.J.: Epoxidation of 1,7-Octadiene by *Pseudomonas oleovorans*: Fermentation in the Presence of Cyclohexane. in: *Applied And Environmental Microbiology* 34 (1977) (1), 47–49

- SEVASTSYANOVICH, Y., ALFASI, S., OVERTON, T., HALL, R., JONES, J., HEWITT, C., COLE, J.: Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. in: *FEMS Microbiology Letters* 299 (2009) (1), 86–94
- SHILOACH, J., BAUER, S.: High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. in: *Biotechnology and Bioengineering* 17 (1975) (2), 227–239, ISSN 1097-0290
- SHILOACH, J., FASS, R.: Growing *E. coli* to high cell density: A historical perspective on method development. in: *Biotechnology Advances* 23 (2005) (5), 345 – 357, ISSN 0734-9750
- SHILOACH, J., KAUFMAN, J., GUILLARD, A.S., FASS, R.: Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. in: *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996) (4), 421–428, ISSN 1097-0290
- SHOJAOSADATI, S.A., KOLAEI, S.M.V., BABAEIPOUR, V., FARNOUD, A.M.: Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. in: *Iranian Journal of Biotechnology* 6 (2008) (2), 63–84
- SLEIGHT, S.C., BARTLEY, B.A., LIEVIANT, J.A., SAURO, H.M.: Designing and engineering evolutionary robust genetic circuits. in: *Journal of Biological Engineering* 4 (2010) (12), 1–20
- SLETTA, H., NEDAL, A., AUNE, T.E.V., HELLEBUST, H., HAKVÅG, S., AUNE, R., E.T.E., VALLA, S., BRAUTASET, T.: Broad-Host-Range Plasmid pJB658 Can Be Used for Industrial-Level Production of a Secreted Host-Toxic Single-Chain Antibody Fragment in *Escherichia coli*. in: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) (12), 7033–7039
- SOINI, J., UKKONEN, K., NEUBAUER, P.: High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations – consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. in: *Microbial Cell Factories* 7 (2008) (26), 1–11
- SØRENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K.: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. in: *Journal of Biotechnology* 115 (2005), 113–128
- SØRENSEN, H.P., SPERLING-PETERSEN, H.U., MORTENSEN, K.K.: Production of recombinant thermo-stable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. in: *Journal of Chromatography B* 786 (2003) (1&2), 207–214, ISSN 1570-0232. European Contest for Young Scientists on Protein Purification: From Gene to Functional Protein
- STARK, D., VON STOCKAR, U.: (2003); *Process Integration in Biochemical Engineering*, Nr. 80 in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg
- STEWART, E.J., ASLUND, F., BECKWITH, J.: Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. in: *EMBO Journal* 17 (1998) (19), 5543–5550
- STÜLKE, J., HILLEN, W.: Carbon catabolite repression in bacteria. in: *Current Opinion in Biotechnology* 2 (1999) (2), 195–201
- STORHAS, W.: (2013); *Bioverfahrensentwicklung*, 2 Aufl., Wiley-VCH
- STRANDBERG, L., ENFORS, S.: Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. in: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991) (6), 1669–1674
- STUDIER, F., MOFFATT, B.A.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. in: *Journal of Molecular Biology* 189 (1986) (1), 113 – 130, ISSN 0022-2836
- STUDIER, W.F.: Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. in: *Protein Expression and Purification* 41 (2005) (1), 207–234
- SUMMERS, D.K., BETON, C.W., WITHERS, H.L.: Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. in: *Molecular Microbiology* 8 (1993) (6), 1031–1038

- SUMMERS, D.K., SHERRATT, D.J.: Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. in: *Cell* 36 (1984) (4), 1097–1103
- SVENSSON, M., HAN, L., SILFVERSPARRE, G., HÄGGSTRÖM, L., ENFORS, S.: Control of endotoxin release in *Escherichia coli* fed-batch cultures. in: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27 (2005) (2), 91–97
- SZPIRER, C.Y., MILINKOVITCH, M.C.: Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. in: *Biotechniques* 38 (2005) (5), 775–781
- TAKAHASHI, M., NORDÉN, B.: Structure of RecA-DNA complex and mechanism of DNA strand exchange reaction in homologous recombination. in: *Advances in Biophysics* 30 (1994), 1–35
- TAKORS, R.: (2014); *Kommentierte Formelsammlung Bioverfahrenstechnik*, Springer Spektrum
- TAPAS, A.R., SAKARKAR, D.M., KAKDE, R.B.: Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. in: *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (2008) (3), 1089–1099
- TEGEL, H., OTTOSSON, J., HOBER, S.: Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. in: *The FEBS Journal* 278 (2011) (5), 729–739
- TERPE, K.: Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2006) (2), 211–222
- THOMSEN, M., TUUKKANEN, A., DICKERHOFF, J., PALM, G.J., KRATZAT, H., SVERGUN, D.I., WEISZ, K., BORNSCHEUER, U.T., HINRICHS, W.: Structure and catalytic mechanism of the evolutionarily unique bacterial chalcone isomerase. in: *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 71 (2015) (4), 907–917
- TONE, H., KITAI, A., OZAKI, A.: A new method for removal of inhibitory fermentation products. in: *Biotechnology and Bioengineering* 10 (1968) (5), 689–692
- TRIPOLI, E., GUARDIA, M.L., GIAMMANCO, S., MAJO, D.D., GIAMMANCO, M.: Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. in: *Food Chemistry* 104 (2007), 466–479
- VARMA, A., PALSSON, B.O.: Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. in: *Applied And Environmental Microbiology* 60 (1994) (10), 3724–3731
- VEMURI, G.N., EITEMAN, M.A., ALTMAN, E.: Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. in: *Biotechnology and Bioengineering* 94 (2006) (3), 538–542
- VETHANAYAGAM, J., FLOWER, A.: Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase. in: *Microbial Cell Factories* 4 (2005) (1), 3, ISSN 1475-2859
- WAEGEMAN, H., SOETAERT, W.: Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. in: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38 (2011) (12), 1891–1910, ISSN 1367-5435
- WALL, J.G., PLÜCKTHUN, A.: Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. in: *Current Opinion in Biotechnology* 6 (1995) (5), 507–516, ISSN 0958-1669
- VAN DE WALLE, M., SHILOACH, J.: Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. in: *Biotechnology and Bioengineering* 57 (1998) (1), 71–78
- WANNER, B.L., KODAIRA, R., NEIDHARDT, F.C.: Physiological regulation of a decontrolled lac operon. in: *Journal of Bacteriology* 130 (1977) (1), 212–222

- WARNES, A., STPHENSEN, J.R., FOOKS, A.R., MELLING, J., BROWN, M.R.: Expression of recombinant protein A from the lac promoter in *Escherichia coli* JM83 is not subject to catabolite repression when grown under specific conditions of continuous culture. in: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991) (9), 1050–1058
- WEISSENBORN, D.L., WITTEKINDT, N., LARSON, T.J.: Structure and regulation of the glpFK operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. in: *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) (9), 6122–6131
- WILLIAMS, C.A., GRAYER, R.J.: Anthocyanins and other flavonoids. in: *Nat. Prod. Rep.* 21 (2004), 539–573
- WILLIAMS, C.A., HARBOURNE, J.B.: (1994); *The Flavonoids. Advances in research since 1986*, Chapman & Hall (London), 337–385
- WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C.: Flavonoids and isoflavonones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. in: *Free Radical Biology and Medicine* 36 (2004), 838–849
- WILLIAMS, S.G., CRANENBURGH, R.M., WEISS, A.M., WRIGHTON, C.J., SHERRAT, D.J., HANK, J.A.: Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. in: *Nucleic Acid Research* 26 (1998) (9), 2120–2124
- WINTER, J., MOORE, L.H., DOWELL, V.R.J., BOKKENHEUSER, V.D.: C-ring Cleavage of Flavonoids by Human Intestinal Bacteria. in: *Applied And Environmental Microbiology* 55 (1989) (5), 1203–1208
- WINZER, K., HARDIE, K.R., WILLIAMS, P.: Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch! in: *Current Opinion in Microbiology* 5 (2002) (2), 216–222, ISSN 1369-5274
- WOLF, K.H.: (1994); *Aufgaben zur Bioreaktionstechnik*, Springer
- WONG, W.K.R., ALI, A.B., MA, M.C.: Cloning, expression, and characterization of diuretic hormone Manduca diuresin from *Manduca sexta* in *Escherichia coli*. in: *Protein Expression and Purification* 29 (2003) (1), 51–57, ISSN 1046-5928
- YANG, Q., XU, J., LI, M., LEI, X., AN, L.: High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosedobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. in: *Biotechnology Letters* 25 (2003) (8), 607–610, ISSN 0141-5492
- YILDIR, C., ÖNSAN, Z.İ., KIRDAR, B.: Optimization of Starting Time and Period of Induction and Inducer Concentration in the Production of the Restriction Enzyme EcoRI from Recombinant *Escherichia coli* 294. in: *Turkish Journal of Chemistry* 22 (1998), 221–226
- YIM, S., JEONG, K., CHANG, H., LEE, S.: High-level secretory production of human granulocyte-colony stimulating factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. in: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (2001) (4), 249–254, ISSN 1615-7591
- YOON, S.H., KIM, S.K., KIM, J.F.: Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. in: *Recent Patents in Biotechnology* 4 (2010) (1), 23–29
- ZABRISKIE, D.W., HUMPHREY, A.E.: Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence. in: *Applied And Environmental Microbiology* 35 (1978) (2), 337–343
- ZHANG, D., WEI, P., FAN, L., LIAN, J., HUANG, L., CAI, J., XU, Z.: High-level soluble expression of hIGF-1 fusion protein in recombinant *Escherichia coli*. in: *Process Biochemistry* 45 (2010), 1401–1405
- ZHAO, J., WEI, D., TONG, W.Y.: Identification of *Escherichia coli* host cell for high plasmid stability and improved production of antihuman ovarian carcinoma x antihuman CD3 single-chain bispecific antibody. in: *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (2007) (4), 795–800
- ZULAK, K.B., LISCOMBE, D.K., ASHIHARA, H., FACCHINI, P.J.: (2006); *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Kap. Alkaloids, Blackwell Publishing, 102–131

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Philipp Paul Grünert
Geburtsdatum und Ort	07.03.1987 in Elsterwerda
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung:

11/2012 – 06/2015	Anfertigung der Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover Thema: vorliegende Arbeit
11/2012 – 06/2015	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
2012	Masterarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, Thema: „Entwicklung eines Bioprozesses zur Flavonoid-Transformation“
09/2010 – 11/2012	Masterstudium Life Sciences an der Leibniz Universität Hannover
09/2009 – 04/2010	Bachelorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der technischen Universität Dresden, Thema: „Zytologische und toxikologische Charakterisierung neuer Akto-Myosin-Inhibitoren „
03/2006 – 04/2010	Bachelorstudium Biotechnologie an der Fachhochschule Lausitz
06/2006	Abitur , Echtermeyer Gymnasium, Bad Liebenwerda

„The beautiful thing about learning is that nobody can take it away from you.“

B. B. KING