

Aufbau eines modularen Mikro-
Hohlfaserreaktorsystems zum Screening von
Verfahrensparametern im Bereich der
mikrobiellen Produktion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Lina Meyer

geboren am 23. März 1980 in Gehrden

2008

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 10.07.2008

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, Juli 2008

Lina Meyer

**Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits zum Teil
veröffentlicht worden.**

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

L. Villain, L. Meyer, S. Kroll, S. Beutel, T. Scheper. Development of a Novel Membrane Aerated Hollow-Fiber Microbioreactor. *Biotechnology Progress* 2008, 24, 367-371.

S. Kroll, L. Meyer, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes for use in micro-reactor systems. *Journal of Membrane Science* 299 (2007) 181–189.

Vorträge

L. Meyer, S. Kroll, L. Villain, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Hollow fiber micro-bioreactors for different applications in cultivation and downstreaming. *European BioPerspectives*, Köln, 30.05.2007 – 01.06.2007.

S. Kroll, L. Meyer, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and application to integrated downstream processes. 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 26.09.2006 – 28.09.2006.

L. Meyer, S. Kroll, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Applications for novel hollow fiber micro-bioreactor in cultivation and downstreaming. 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES), Salzburg, 27.08.2006 – 30.08.2006.

Posterpräsentationen

S. Kroll, L. Meyer, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Application of novel hollow fiber micro-bioreactor to integrated downstream processes. European BioPerspectives, Köln, 30.05.2007 – 01.06.2007.

L. Meyer, S. Kroll, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Processing of a hollow fiber micro-bioreactor for applications in cultivation and downstreaming. 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 26.09.2006 – 28.09.2006.

S. Kroll, L. Meyer, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper. Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and the utilization of affinity membranes in purification processes. 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES), Salzburg, 27.08.2006 – 30.08.2006.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Hiermit möchte ich mich für die interessante Aufgabenstellung und freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Koreferats, sowie für seine Hilfe bei der Lösung mathematischer Problemstellungen, die durch Anwendung seiner berüchtigten „Dreizeiler“ immer optimal gelöst werden konnten.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Sascha Beutel, der immer „mal eben“ Zeit hatte, um Problemstellungen zu besprechen und Anregungen für weitere Arbeiten zu geben. Außerdem möchte ich ihm für das kurzfristige Korrekturlesen diverser Abstracts, Vorträge und natürlich dieser Arbeit danken.

Louis Villain danke ich für seine Ideen und seinen Einsatz zum Thema Sauerstoffversorgung. Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Feinmechanik-Werkstatt des TCI bedanken, die mir beim Aufbau des Reaktors immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Frau Martina Weiss danke ich für die Zusammenarbeit bei der HPLC-Analytik sowie für all die Bestellungen, die sie für uns getätigt hat. Yvonne Stark möchte ich für die Aufnahme der REM-Bilder danken.

Stephen Kroll danke ich für die intensive Zusammenarbeit und Freundschaft während der vergangenen Jahre und die Möglichkeit immer allen „Müll“ abzuladen. Daneben möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreis Scheper für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Der Kaffeeklatsch im Sozialraum TCI-Altbau war immer eine Pause wert.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir wie selbstverständlich das Studium ermöglicht haben und auch sonst immer für mich da waren und sind.

Zum Schluss möchte ich Gordon Ziehm für seine liebevolle Unterstützung danken.

Zusammenfassung

Die Entwicklung von neuartigen Bioreaktoren und die Zusammenfassung verschiedener Prozessschritte begünstigt eine selektive und effiziente Herstellung neuer Produkte. Ein zukunftsweisender Ansatz ist die Entwicklung eines flexibel einsetzbaren, modularen Mikro-Hohlfaserreaktorsystems. Derartige Reaktoren bieten ein großes Potenzial für die Kultivierung von Mikroorganismen und für die Realisierung eines integrierten Downstreamings. Besonders die Option eines integrierten Downstreamings verspricht ökonomische und ökologische Vorteile.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung des Reaktorsystems, die Charakterisierung und Modellierung des Reaktors, sowie die praktische Anwendung bei der Kultivierung von Modellorganismen realisiert. Zusätzlich wurden Downstreamingprozesse in den Produktionsschritt integriert.

Der Mikro-Hohlfaserreaktor wird aus Plexiglas gefertigt, mit integrierten Fasern aus Polyethersulfon. Die Charakterisierung und Modellierung kann durch die Aufnahme von Verweilzeitexperimenten realisiert und die Modellierung der erhaltenen Daten über das Kaskadenmodell erreicht werden. Im Bereich der Kultivierung ist die Desinfektion des Reaktors sowie die Optimierung in Bezug auf Nährstoff- und Sauerstoffversorgung essentiell. Außerdem muss die Prozessanalytik an den kleinen Maßstab des Mikro-Hohlfaserreaktors angepasst werden. Anschließend können mit *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum* verschiedene Modellorganismen erfolgreich für die Kultivierung eingesetzt werden.

Für ein integriertes Downstreaming wurde die Produktion und Isolierung von His-tag Proteinen über Affinitätshohlfasern realisiert. Die Aufreinigung niedermolekularer Stoffe, wie zum Beispiel der Aminosäure Serin, kann hingegen durch die Ausschwemmung des Produkts über die Hohlfasern erreicht werden. Im Gegensatz zum integrierten Downstreaming können auch mehrere verschiedene Module parallel für verschiedene Anwendungsbereiche genutzt werden (z.B. Feed-Module, Downstreaming-Modul, Sauerstoff-Modul).

Zusammenfassend wurde der Aufbau des neuartigen Reaktors realisiert und das breite Anwendungsgebiet in Mikro-Hohlfaserreaktoren untersucht.

Keywords: Mikrobioreaktor, Hohlfaser, Integrated Downstreaming

Abstract

The development of alternative bioreactors and the integration of process steps leads to selective and efficient fabrication of new products in biotechnology. A forward-looking approach is the novel hollow fiber micro-bioreactor for flexible applications and with modular design. This reactor type promises high potential for cultivation of microorganism and for integration of downstreaming in the production step. Especially the possibility for an integrated downstreaming promises an economic and time saving process.

Salient conception points of this work are the development of the reactor system, the characterization and modelling of the bioreactor and the practical application in cultivation of model microorganisms. Furthermore the integration of downstreaming steps in the production step was accomplished.

The miniaturized hollow fiber micro-bioreactor system is developed of acrylic glass with fibers of polyethersulfone. Characterization and modelling can be achieved by determining the residence time distribution and modelling with the tanks in series model. For the application in cell cultivation several factors are important as the establishment of a disinfection method and the optimization of the supply with feed media and oxygen. Furthermore the analytics must be adapted to the small scale of the reactor. For cell cultivation different microorganisms can be inserted for a successful application in the reactor like *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* and *Corynebacterium glutamicum*.

For integrated downstreaming the production and isolation of his-tagged proteins can be achieved by using affinity hollow fibers. The purification of small molecules like the amino acid serine could be accomplished by flushing out through the hollow fibers. In contrast to the integrated downstreaming the hollow fiber micro-bioreactor can also be used in a stack system with different reactor setups (e.g. feed-module, downstream-module, aeration-module).

To conclude the assembly of the reactor and testing of the various application areas for hollow fiber micro-bioreactors could be examined.

Keywords: microbioreactor, hollow fiber, integrated downstreaming

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Theoretischer Hintergrund	9
2.1.	Membranreaktoren in der Biotechnologie	9
2.1.1.	Mikro-Hohlfaserreaktoren	10
2.1.2.	Membranmaterialien	12
2.1.3.	Einsatz von Hohlfasermodulen in industriellen Prozessen	13
2.1.4.	Modellierung von Hohlfasermembranreaktoren	14
2.2.	Integrierte Produktaufarbeitung mit Hohlfasermembranreaktoren	15
2.2.1.	Aufreinigung von Biomolekülen durch Membranverfahren	16
2.2.2.	Immobilisierte-Metall-Chelat-Chromatographie (IMAC)	17
2.2.3.	Modifikation von Polyethersulfon-Hohlfasern	18
3.	Mikro-Hohlfaserreaktorbasissystem	20
3.1.	Aufbau der Mikro-Hohlfaserreaktoren	20
3.2.	Reaktionstechnische Charakterisierung	21
3.2.1.	Bestimmung des Verweilzeitverhaltens	22
3.2.2.	Modellierung der Mikro-Hohlfaserreaktoren	23
3.3.	Desinfektion und Sterilisation der Mikro-Hohlfaserreaktoren	26
3.3.1.	Sterilisation	27
3.3.2.	Chemische Desinfektion	28
3.4.	Biofouling von Hohlfasermembranen	30
3.5.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	32

3.5.1.	Kultivierung im Schüttelkolben	32
3.5.2.	Kultivierung im Mikro-Hohlfaserreaktor	35
3.6.	Zusammenfassung	36
4.	Aufbau eines neuartigen Mikro-Hohlfaserreaktorsystems	38
4.1.	Aufbau der Mikro-Hohlfaserreaktoren	38
4.2.	Reaktionstechnische Charakterisierung	40
4.3.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im Mikro-Hohlfaserreaktor	44
4.4.	Zusammenfassung	45
5.	Entwicklung einer Begasungsstrategie für das Mikro-Hohlfaserreaktor-system	47
5.1.	Aufbau von Hohlfaserreaktoren mit verschiedenen Sauerstoffmembranen	47
5.2.	Bewertung des Sauerstoffeintrags durch Messung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten (k_{La})	50
5.2.1.	Versuchsaufbau bei indirekter Begasung	50
5.2.2.	Versuchsaufbau bei Membranbegasung	52
5.2.3.	Bewertung der ermittelten Sauerstoffeintragsraten (OTR) und des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten (k_{La})	53
5.2.4.	Membranbegasung mit reinem Sauerstoff	54
5.3.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> unter den verschiedenen Begasungsstrategien	56
5.4.	Reaktionstechnische Charakterisierung	58
5.5.	Zusammenfassung	59
6.	Entwicklung eines Screeningsystems für Mikro-Hohlfaserreaktoren	61
6.1.	Aufbau des Mikro-Hohlfaserreaktor-Screeningsystems	61

6.2.	Kultivierung von verschiedenen mikrobiellen Testorganismen	62
6.2.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	63
6.2.1.	Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	73
6.2.2.	Kultivierung von <i>Bacillus megaterium</i>	74
6.3.	Zusammenfassung	83
7.	Integrierte Produktaufarbeitung von His-tag Proteinen im Mikro-Hohlfaserreaktor	86
7.1.	Strategien zur Oberflächenmodifikation von Polysulfon- und Polyethersulfon- Hohlfasern	87
7.2.	Aufreinigung von β -Glucanase durch Affinitätshohlfasern	88
7.3.	Kultivierung und integrierte Produktaufarbeitung am Beispiel von <i>Bacillus megaterium</i>	90
7.4.	Zusammenfassung	91
8.	Zusammenfassung und Fazit	93
	Anhang	96
A	Materialien und Abkürzungen	96
A.1	Chemikalien	96
A.2	Geräte	96
A.3	Abkürzungsverzeichnis	97
B	Versuchsprotokolle und Lösungen	98
B.1	Medienzusammensetzung	98

B.2	Pufferlösungen	99
B.3	Bradford Test	100
B.4	Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns	101
B.5	GFP-Fluoreszenzmessung	102
B.6	Optischer Sauerstoff: Sensor Messprinzip und Kalibration	103
B.7	DNS Test	104
B.8	β -Glucanase Aktivitätstest	105
B.9	HPLC-Analytik	105
B.10	Levansucrase Aktivitätstest	106
B.11	Generierung von IMAC-Hohlfasern	107
C	Technische Zeichnungen der Mikro-Hohlfaserreaktoren	108
	Literaturverzeichnis	117

Kapitel 1

Einleitung

Komplexe biotechnologische Abläufe können häufig nicht in den klassischen Reaktortypen realisiert werden. Daher können biotechnologische Prozesse durch den Einsatz alternativer Verfahrenselemente optimiert werden. Insbesondere die Integration von Prozessschritten ermöglicht die gezielte, effiziente sowie ökonomisch und ökologisch sinnvolle Herstellung neuer Produkte.

Ein Beispiel ist das Konzept der Kombination von Reaktion und Membrantrennverfahren für biologische Prozesse, das seit den sechziger Jahren Anwendung gefunden hat. Solche sogenannten Membranbioreaktoren wurden bisher intensiv untersucht und werden heutzutage in der Biotechnologie weltweit eingesetzt. Die Membranbioreaktoren können sowohl im Bereich des Downstreamings zur Abtrennung von Produkten, als auch im Bereich der Kultivierung und Reaktion zur Rückhaltung von Zellen oder immobilisierten Biokatalysatoren eingesetzt werden. So können integrierte Produktionsabläufe aufgebaut werden, deren ökonomische und ökologische Bilanz durch Ressourcenschonung, durch Verringerung der Produktkontamination, durch Energieeinsparung und durch Minderung der Reststofffrachten im Vergleich zu herkömmlichen Produktionsprozessen erheblich verbessert wird. Besonders der kostenintensive Bereich des Downstream processings soll durch die Entwicklung solcher integrierter Prozessabläufe entlastet werden.

Die Einbindung von Hohlfasermembranmodulen in den Produktionsprozess ist dabei ein besonders erfolgversprechender Ansatz. Hohlfasersysteme empfehlen sich aufgrund ihres Aufbaus für die kontinuierliche Entfernung von qualitätsmindernden Metaboliten und Störkomponenten sowie für die kontinuierliche Isolierung bzw. Aufreinigung von Wertstoffkomponenten.

In dieser Arbeit soll die Entwicklung eines anwendungsfertigen, flexiblen Mikro-Hohlfaserreaktorsystems realisiert und im praktischen Einsatz erprobt werden. Hierbei sollen die

Vorteile der Mikroreaktionstechnik mit den vielfältigen Möglichkeiten von Hohlfasernmodulen kombiniert werden. Die Ziele der vorliegenden Dissertation können wie folgt beschrieben werden:

- Der Aufbau des Mikro-Hohlfaserreaktors (MHFR) umfasst die Integration ausgewählter Hohlfasern in ein Reaktormodul sowie die Realisierung eines passenden Anschlussystems.
- Durch eine reaktionstechnische Charakterisierung und Modellierung des MHFR können Strömungscharakteristika ermittelt und bewertet werden.
- Die Optimierung des Reaktorsystems für die Kultivierung von Mikroorganismen sowie die Integration geeigneter analytischer Systeme ist essentiell für den erfolgreichen Einsatz des MHFR in der Biotechnologie.
- Durch den Einsatz des MHFR als Screeningsystem kann die Kultivierung von verschiedenen Testorganismen als Mehrfachbestimmung durchgeführt werden und das Screening von Verfahrensparametern realisiert werden.
- Die Produktabtrennung im MHFR soll durch ISPR (in-situ product removal bzw. recovery) realisiert werden. Dabei können die Produkte über die Poren der Hohlfasern aus dem Reaktor ausgeschwemmt werden oder durch den Einsatz von Affinitätshohlfasern an die Fasern gebunden werden.

Zusammenfassend zielt das Vorhaben darauf ab, neue biotechnologische Wege zu erarbeiten, die die Effizienz der biotechnologischen Produktion erhöhen.

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Forschungsprojekts „Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in der Zellkulturtechnik“ erstellt. Unter dem Aktenzeichen 13120 wurde die Förderung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt realisiert. Innerhalb dieses Forschungsprojekts wurde eine weitere Dissertation erarbeitet [1], die sich im Schwerpunkt mit der Entwicklung von Affinitätshohlfasern und der Nutzung der Mikro-Hohlfaserreaktoren als Affinitätsmodule zur Primärseparation der Wertstoffe befasst. Da sich die Forschungsschwerpunkte im Bereich des integrierten Downstreamings überschneiden, sind die erhaltenen Ergebnisse in Kooperation mit dieser Arbeit entstanden.

Kapitel 2

Theoretischer Hintergrund

2.1. Membranreaktoren in der Biotechnologie

Die Definition eines Membranreaktors ist die Kombination von chemischen Reaktionen mit einem Membranverfahren, wobei beide Prozesse integral miteinander gekoppelt sind [2]. Membranreaktoren verfügen über ein großes Potential in der modernen Biotechnologie. Insbesondere beim Aufbau kontinuierlicher Produktionssysteme zur gezielten, effizienten und ökonomisch wie ökologisch sinnvollen Herstellung neuer Produkte sind sie klassischen Verfahrenselementen wie Rührkessel-, Festbett- oder Plattenreaktoren häufig überlegen. Sie ermöglichen auf einfache Weise eine kontinuierliche Abtrennung der Produkte von anderen Verfahrensbestandteilen wie Zellen oder immobilisierten Biokatalysatoren. Zusätzlich finden Membrantrennprozesse meist bei Raumtemperatur ohne Phasenübergänge statt, was sie besonders attraktiv für biotechnologische Anwendungen von thermisch empfindlichen Stoffen macht [3]. Gezielt funktionalisierte Membranen lassen sich außerdem für die hochaffine Bindung von Metaboliten nutzen, was zur Isolierung von Wertstoffkomponenten, zur Entfernung qualitätsmindernder Bestandteile und zur Aufreinigung von Rohprodukten genutzt werden kann.

So können integrierte Produktionsabläufe aufgebaut werden. Durch die Integration von Verfahrensschritten können die Produktionsprozesse vereinfacht und verkürzt werden. Insbesondere das zeit- und kostenintensive Downstreaming kann wesentlich entlastet werden, da nach integrierter Vorreinigung, Zellabtrennung oder Abreicherung von Störkomponenten wesentlich höherwertige Rohprodukte zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil liegt in den milden Bedingungen (z.B. niedrige Temperatur- und Druckbereiche), unter denen die Prozesse in Membranreaktoren ablaufen können. Mittlerweile erstreckt sich die Anwendung

von Membranreaktoren auf die Gebiete der Chemie-, Pharma- und Lebensmittelindustrie sowie Umwelttechnik und Medizin.

Der Einsatz von Membranen in Membranreaktoren lässt sich theoretisch in drei Grundoperationen einteilen [4]:

- Extraktor-Prinzip: Selektive Entfernung von Produkten aus dem Reaktionsgemisch
- Distributor-Prinzip: Kontrollierte Zugabe von Edukten zum Reaktionsgemisch
- Kontaktor-Prinzip: Intensivierung des Kontaktes der Edukte

In der Praxis existiert eine Vielzahl von Mischformen und Kombinationen der drei Prinzipien. Dies vermittelt eine Vorstellung der vielseitigen Anwendungsgebiete, die sich aus dem Einsatz von Membranreaktoren ergeben.

2.1.1. Mikro-Hohlfaserreaktoren

Herkömmliche Membransysteme, wie sie in vielen biotechnologischen Prozessen eingesetzt werden - beispielsweise zur Abtrennung von Wertstoffkomponenten - bieten nicht die vielfältigen Vorteile der Hohlfasermodule, wie etwa die hohen Durchsätze und den kontinuierlichen Betrieb. Allerdings konnten derartige Hohlfasermodule bisher erst im Verlauf des Up-Scalings in die Prozesse integriert werden, da sie als Kleinreaktoren nicht zu verwirklichen waren und erst ab dem Technikumsmaßstab zur Verfügung standen. Ihr Potential in der Bioverfahrensentwicklung konnte somit nicht ausgeschöpft werden, da der Aufwand für ein Screening von Prozessparametern für einen neuen Verfahrensablauf im Technikumsmaßstab extrem hoch ist. Hohlfasermembranmodule mit kleinen Oberflächen für die Separation und Dialyse sind auf dem Markt nur mit einer sehr begrenzten Auswahl an Hohlfasermaterialien, Porositäten und Oberflächen erhältlich. Die verfügbaren Module (z.B. aus Cellulose, Polypropylen, Polyvinylidendifluorid oder Polyethersulfon) sind aufgrund ihrer Materialeigenschaften und Porositäten nicht für alle Anwendungen geeignet. Andere Materialien sind nach dem Stand der Technik zwar realisierbar, werden jedoch im Allgemeinen in diesem Marktsegment nicht kommerziell angeboten.

Die Maßstabsverkleinerung der Hohlfasermodule bietet abgesehen von dem Einsatz im Bereich des Screenings von Prozessparametern weitere Vorteile. So hat die Maßstabsverkleinerung bei gleichen Temperatur- und Konzentrationsunterschieden eine entsprechende

Erhöhung der Gradienten zur Folge, was zu einer wesentlich stärkeren Triebkraft für den Stoff- und Wärmetransport führt. Die Folge sind eine effektivere Temperaturkontrolle, sehr kurze Mischzeiten und damit eine verbesserte Reaktionskontrolle, wodurch Selektivität und Ausbeute gesteigert werden können [5, 6, 7]. Durch den geringen Rohstoff- und Energieverbrauch bringen Mikroreaktoren außerdem enorme ökonomische und ökologische Vorteile mit sich. Zudem können Reaktionsfolgen durch die Integration mehrerer Verfahrensschritte in einem Mikroreaktorsystem wesentlich vereinfacht und beschleunigt werden. Stark exotherme Umsetzungen oder Reaktionen mit explosiven oder giftigen Stoffen können in solchen Mikrosystemen oft gefahrlos durchgeführt werden.

Innerhalb dieser Arbeit sollen kassettenförmige Mikro-Hohlfaserreaktoren ähnlich des in Abbildung 1 gezeigten Reaktors entwickelt werden. Als Grundgerüst dient ein durchsichtiges Kunststoffgehäuse, in das die Hohlfasern integriert werden. Durch die Verwendung der Hohlfasermembranen entstehen zwei voneinander getrennte Reaktionsräume.

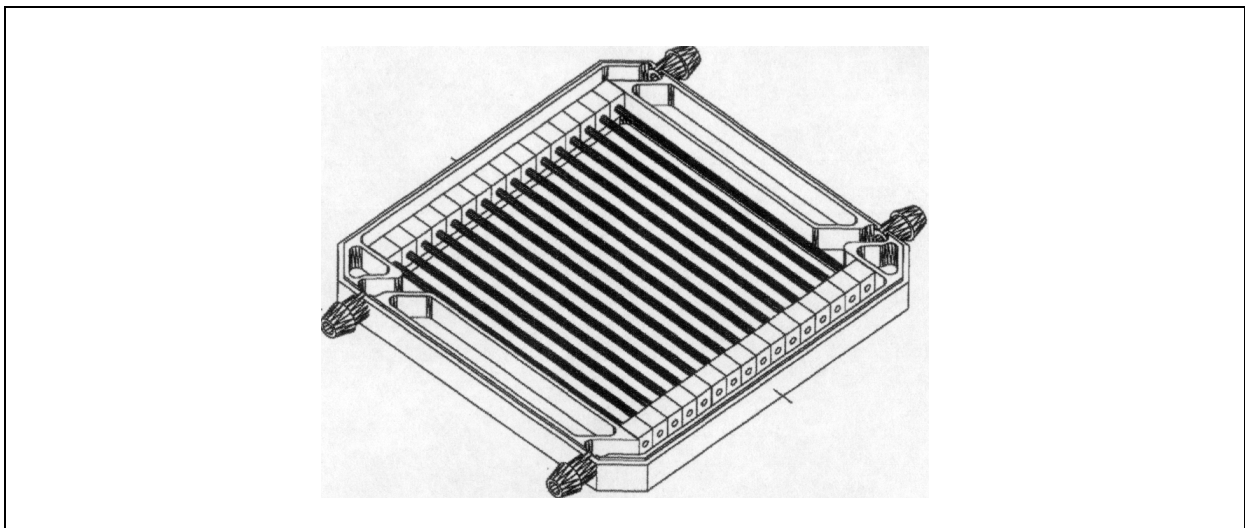


Abb.1: Grundkonzept der zu entwickelnden Hohlfasermodulkassette.

Die Module können im Bereich Kultivierung und zur Rückhaltung von Zellen eingesetzt werden. Die Kultivierung in einem solchen Hohlfasermodul erfolgt im extrakapillaren Bereich, während die Substratdosierung und / oder die Produktabtrennung im intrakapillaren Raum stattfinden. Die Hohlfasermembranen können diffusiv oder konvektiv betrieben werden. Im Diffusionsreaktor wird das Substrat durch die Membran geleitet und diffundiert durch die Membran in den extrakapillaren Bereich. Von dort aus kann das entstehende Produkt durch die Membran in den Ablauf diffundieren. Die Diffusion bietet Vorteile, wenn zum Beispiel scherpfindliche Zellen eingesetzt werden [8]. Der Nachteil des diffusiv betriebenen Moduls ist der zeitintensive Diffusionsprozess. In konvektiv betriebenen

Reaktoren hingegen kann Stofftrennung durch Filtration betrieben werden. Die treibende Kraft dabei ist der angelegte Druckgradient. Konvektiv betriebene Module werden meist zur Abtrennung von niedermolekularen Substanzen eingesetzt, doch auch die Abtrennung von Enzymen ist möglich.

2.1.1. Membranmaterialien

Entsprechend der Anwendungsgebiete existiert eine Vielzahl von verschiedenen Membranen zum Einsatz in Membranreaktoren. Grundsätzlich ist zwischen porösen und dichten Membranen sowie organischen und anorganischen Membranen zu unterscheiden. Flüssigmembranen werden im Folgenden vernachlässigt. Dichte anorganische Membranen bestehen aus Edelmetallen (wie z.B. Palladium, Platin und Silber) oder aus leitfähigen Keramiken (wie z.B. Perowskite, modifizierte Zirkoniumoxide). Sie zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und eine nahezu exklusive Durchlässigkeit für Wasserstoff oder Sauerstoff aus. Im Allgemeinen zeichnen sich anorganische Membranen durch höhere thermische Toleranz und chemische Resistenz aus, als dies bei organischen Membranen der Fall ist. Organische Membranen haben sich zur Anwendung bei niedrigen Temperaturen und vor allem in Membranbioreaktoren etabliert, da sie unter anderem wesentlich kostengünstiger als anorganische Membranen sind und dennoch den Anforderungen genügen. Poröse organische Membranen sind meist aus Polysulfon, Polyethersulfon, Polyacrylnitril, Polypropylen oder ähnlichem gefertigt. Dichte organische Membranen werden aus Silicon, Perfluorpolymer, Polyimid oder Polyamid hergestellt [9].

In dieser Arbeit wurden aufgrund von Materialeigenschaften und Verfügbarkeit Hohlfasern aus Polysulfon und Polyethersulfon verwendet. Polysulfon weist gegenüber vielen aggressiven Medien eine hohe Widerstandsfähigkeit auf. Es ist beständig gegenüber wasserhaltigen Mineralsäuren, Alkali und Salzlösungen. Seine Stabilität wird nicht durch aliphatische Kohlenwasserstoffe und Tenside beeinflusst. In polaren organischen Lösungsmitteln wird Polysulfon gequollen oder aufgelöst. Polysulfon zeigt eine hohe Temperaturstabilität (bis 150 °C); die Glasübergangstemperatur liegt bei 190 °C. Die Herstellung von Polysulfon wird durch Polykondensation von 4,4'-Dichlordiphenylsulfon mit dem Dinatriumsalz des Bisphenol A erreicht. Die Stabilität des Moleküls ist auf die hohe Oxidationsstufe des Schwefels zurückzuführen, der Elektronen aus den benachbarten Phenylgruppen zieht und damit deren Oxidationsbeständigkeit erhöht [10].

Im Vergleich zu Polysulfon ist das hydrophilere Polyethersulfon oxidativ und thermisch stabiler. Diese auf die Abwesenheit von aliphatischen Einheiten zurückzuführenden Eigenschaften vermindern jedoch nicht im geringsten die hervorragende Widerstandsfähigkeit gegen wasserhaltige Mineralsäuren, Alkali und Salzlösungen [11]. Des Weiteren ist Polyethersulfon beständig gegenüber aliphatischen Kohlenwasserstoffen und Tensiden. Die Glasübergangstemperatur liegt bei 223 °C und somit deutlich über der von Polysulfon. Die Herstellung erfolgt durch Polymerisation von 4,4'-Dichlordiphenylsulfon in Gegenwart von Natriumhydroxid bei hohen Temperaturen.

2.1.2. Einsatz von Hohlfasermodulen in industriellen Prozessen

Gezielte technische Anwendungen für Membranreaktoren gibt es erst seit dem 20. Jahrhundert. Herausragend sind die seit 1947 zur klinischen Routine zählende Blutwäsche (Hämodialyse, HD) und die seit Mitte der 60er Jahre angewandten Verfahren zur Meerwasserentsalzung [3].

Probleme bei der Versorgung mit Trinkwasser können über die Meerwasserentsalzung minimiert werden. So werden zum Beispiel in den Vereinigten Arabischen Emiraten pro Tag 3,8 Millionen Liter Trinkwasser durch Umkehrosmose über Ultrafiltrationsmembranen gewonnen [12]. Auch in anderen Bereichen der Wasseraufreinigung kommen Hohlfasermodule zum Einsatz, wie zum Beispiel bei der Grundwasseranreicherung, beim Abwasserrecycling zur indirekten Nutzung als Trinkwasser und der Herstellung von industriellem Prozesswasser [13].

In der Industrie finden Hohlfasermodule auch Anwendung bei Kultivierungsprozessen wie der Ethanol-Produktion aus Hefen [14] oder der Gewinnung von 1,3-Propandiol durch kontinuierliche Kultivierung von *Clostridium butyricum* [15], bei der Proteinsynthese [16, 17] oder zur online-Ultrafiltration beim Aminosäure-Monitoring [18]. Auch im Bereich der Tierzellkultivierung und des Tissue Engineering werden Hohlfasermembranen eingesetzt, zum Beispiel bei der Entwicklung künstlicher Organe [19, 20]. Vielfältige Einsatzgebiete für Hohlfasermodule bietet auch die Lebensmittelindustrie. So wird zum Beispiel die Hydrolyse von Milchproteinen für die Produktion von Babynahrung, die Hydrolyse von Raffinose und Cellulose, sowie die Hydrolyse von Sojabohnenöl in Hohlfasermodulen durchgeführt [21]. Die vielfältigen Anwendungen zeigen das große Potential für die Hohlfasermodule, wobei die Anwendung von Hohlfasermodulen jedoch bisher auf die Produktionsebene beschränkt ist.

Miniaturisierte Screeningsysteme im Labormaßstab existierten bisher nicht, was zu einem erheblichen Mehraufwand bei der Optimierung von Prozessparametern führt. Daraus ergeben sich die weitreichenden Einsatzmöglichkeiten für das geplante miniaturisierte Hohlfaserreaktorsystem.

2.1.3. Modellierung von Hohlfasermembranreaktoren

Die Modellierung von Hohlfaserreaktoren ist im Wesentlichen auf zwei Ziele ausgerichtet. Zum Einen sollen experimentelle Daten analysiert und mit Hilfe des Modells sicher interpretiert werden, zum Anderen kann eine Vergrößerung der Anlage in den technischen Maßstab nur anhand eines Modells erfolgen [22]. Die Modellierung von Hohlfasermembranmodulen, die als Filtrationsmodul genutzt werden, ist häufig in der Literatur beschrieben [2, 22, 23]. Dabei werden Modelle genutzt, die die laminare Strömung in der Faser und im Modul zusammen mit Diffusion und Michaelis-Menten-Kinetik berücksichtigen. Doch bei verunreinigten Lösungen, wie sie bei der Auslegung des Reaktors zur Kultivierung von Mikroorganismen vorliegen, ist ein Kreuzstrombetrieb im Gegensatz zum Dead-End-Modus von Vorteil. Dies ist auf die Ablösung von Deckschichten durch eine hohe Flussrate zurückzuführen, wodurch eine schnelle Verblockung der Hohlfaserporen vermieden werden kann. Doch beim Kreuzstrom strömt das Substrat im Lumen mit nahezu unvermindert hoher Geschwindigkeit und verlässt den Reaktor mit relativ geringer Konzentrationsabnahme [22]. Dies kompliziert eine Modellierung des Hohlfaserreaktorsystems. Zusätzlich weichen die Ergebnisse für den Kreuzstrombetrieb deutlich stärker vom Modell ab als im Dead-End-Modus.

Daher wird eine individuelle Modellberechnung aus experimentellen Daten angestrebt. Dafür werden Verweilzeitexperimente bei unterschiedlichen Strömungs- und Rührgeschwindigkeiten verwendet. Durch Modellierung der Daten der Verweilzeitexperimente können $E(t)$ - und $F(t)$ -Kurven für verschiedene Strömungs- und Rührgeschwindigkeiten simuliert werden. Somit können über die Modellierung die mittlere Verweilzeit (τ) berechnet und Aussagen über Strömungsdefizite bzw. Totzonen getroffen werden. Da der Kreuzstrombetrieb ein rührkesselähnliches Verhalten aufweist wurde das Verweilzeitverhalten durch eine doppelte Rührkesselkaskade modelliert.

2.2. Integrierte Produktaufarbeitung mit Hohlfasermembranreaktoren

Einen wichtigen Schritt bei der Etablierung von Mikro-Hohlfaserreaktoren stellt die gezielte Modifizierung und Funktionalisierung der Membranhohlfasern dar. Mit aus der Literatur bekannten Verfahren können kovalente Bindungsstellen an der Membranoberfläche generiert werden, um die Basis für die Kopplung mit hochaffinen Liganden zu schaffen. Diese wiederum sind in der Lage hochselektiv spezifische Targets aus dem Reaktionsmedium zu binden, wobei diese nicht nur auf Produkte, sondern ebenso auf abzureichernde, problematische Störkomponenten abzielen können.

Der Kostenanteil des Downstreamings für einen typischen Produktionsprozess für Proteine beläuft sich in der Regel auf 50 - 90 % der Gesamtprozesskosten [24]. Durch den Einsatz funktionalisierter Hohlfasermembranen kann eine integrierte Produktaufarbeitung realisiert werden. Dies bewirkt, dass der zeit- und kostenintensive Bereich des Downstreamings reduziert werden kann. Unter der integrierten Produktaufarbeitung (im Englischen: integrated downstream processing oder in-situ product removal (ISPR)) versteht man im Allgemeinen die Integration der Produktentfernung in den Bioprozess oder die zeitnahe Abtrennung des entstehenden Produkts vom Biokatalysator. Dies bietet eine Reihe von Vor- und Nachteilen gegenüber herkömmlichen Produktionsprozessen, die nachfolgend beschrieben werden [8].

Vorteile des ISPR:

- Erhöhung der Biokatalysatorkonzentration (Zelldichte) und dadurch bedingte Steigerung der Produktivität.
- Vermeidung der Produktinhibierung
- Eliminierung toxischer Komponenten
- Vermeidung von Produktabbau
- Verringerung der Aufarbeitungsschritte

Nachteile des ISPR:

- hohe Anlagenkomplexität und Investitionskosten
- erhöhte Kontaminationsgefahr

- potentielle sicherheitstechnische und entsorgungstechnische Probleme
- GMP Richtlinien

Die Anwendungsbereiche für ISPR liegen größtenteils in der Produktion organischer Lösungsmittel und Säuren, doch auch in der Produktion von Aromastoffen, Enzymen, Feinchemikalien, Sekundärmetaboliten und Steroiden kommen ISPR-Prozesse zum Einsatz. Zukünftig könnten nicht-natürliche Aminosäuren oder hochfunktionalisierte Aromaten Ziele der Stamm- und Prozessentwicklung sein. Für beide Substanzklassen gibt es starke Hinweise auf eine inhibitorische beziehungsweise zellschädigende Wirkung, weshalb ISPR-Ansätze dann vielleicht nicht mehr nur alternativ, sondern notwendigerweise untersucht und realisiert werden müssen [25]. Ein Beispiel, bei dem schon heute ISPR zur Vermeidung einer Produktinhibierung bei der mikrobiellen Produktion von Aminosäuren eingesetzt wird, ist die Produktion von L-Phenylalanin durch *Escherichia coli*. Dabei wird eine zweistufige Ultrafiltration für die Produktabtrennung eingesetzt [26].

2.2.1. Aufreinigung von Biomolekülen durch Membranverfahren

Die Trennung von Stoffgemischen zählt zu den wichtigsten verfahrenstechnischen Grundoperationen. Sie können in zwei Techniken eingeteilt werden, in Komponenten- und Phasentrennung. Das Trennprinzip der Komponententrennung beruht auf der Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts. Beispiele für solche Trennprozesse sind u.a. Destillation, Trocknung, Adsorption, Kristallisation und Ionenaustausch. Bei der Phasentrennung hingegen wird eine Komponententrennung durch physikalische Eigenschaften wie Dichte und Partikelgröße erreicht. Beispiele dafür sind Sedimentation, Filtration und Zentrifugation.

Membranbasierte Trennprozesse sind den konventionellen Trennprozessen in vielerlei Hinsicht überlegen. Vor allem geringere Investitionskosten, günstigere Energiebilanz sowie Ressourcenschonung machen sie besonders interessant für industrielle Anwendungen. Membranen werden sowohl für die Phasentrennung (Mikrofiltration und Ultrafiltration) als auch für die Komponententrennung (Dialyse, Umkehrosmose, Pervaporation) verbreitet eingesetzt. Seit den 80er Jahren werden Membranprozesse für die Abtrennung von Proteinen nach Größe und / oder Ladung eingesetzt [27].

Die Integration von chromatographischen Verfahren in die Membrantechnik stellt eine Erweiterung des Potentials der membranbasierten Trennprozesse dar. So sind säulenchromatographische Techniken oft limitiert durch einen hohen Druckabfall, langsame Porendiffusion und Channeling, welche hohe Prozesszeiten und ein verkompliziertes Scale-up bewirken [28]. Durch den Einsatz von Membranen für die chromatographische Aufreinigung können diese Probleme minimiert werden. Doch für die Integration chromatographischer Verfahren ist die Anpassung der Membran an das jeweilige Aufreinigungs- oder Umsetzungsproblem und somit eine Dekoration der Membran notwendig. Diese sogenannten Membranadsorber bestehen aus der Membranbasis, der Derivatisierung und der Dekoration, welche für die Bindung des Zielmoleküls ausgelegt ist [29]. Verschiedene chromatographische Verfahren können für membranbasierte Trennprozesse nutzbar gemacht werden. Die Übertragung des Affinitätsprinzips auf Porenmembranen ist dabei ein besonders vielversprechendes Forschungsvorhaben [11]. Durch die Affinitätschromatographie kann eine besonders schonende Behandlung sensibler Moleküle während der Isolierung gewährleistet werden. Als Liganden werden sowohl biologische Moleküle wie Rezeptoren, Hormone, Inhibitoren, Aktivatoren, Antigene, Antikörper, Substrate und Aminosäuren als auch hydrophobe Seitenketten, Triazinfarbstoffe und immobilisierte Metallionen eingesetzt.

2.2.2. Immobilisierte-Metall-Chelat-Chromatographie (IMAC)

Eine besonders für die Proteinreinigung interessante Variante der Affinitätschromatographie, die nicht auf biospezifischen Erkennungsmechanismen beruht, ist die von Porath eingeführte immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Dabei werden Membranen eingesetzt, die Iminodiessigsäure als chelatisierenden Liganden tragen und somit mit Metallionen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , oder Co^{2+} einen Komplex bilden können (Abb.2). IMAC zeichnet sich durch hohe Flexibilität und Einsatzbreite aus [11]. Das häufigste Einsatzgebiet der IMAC ist die schnelle Isolierung rekombinanter Proteine, bei denen ein Polyhistidin-Rest (His-Tag) eingeführt worden ist [30]. Dabei sind die Zugänglichkeit des His-Tags und die Auswahl des Metallions entscheidend für die Stärke der Bindung.

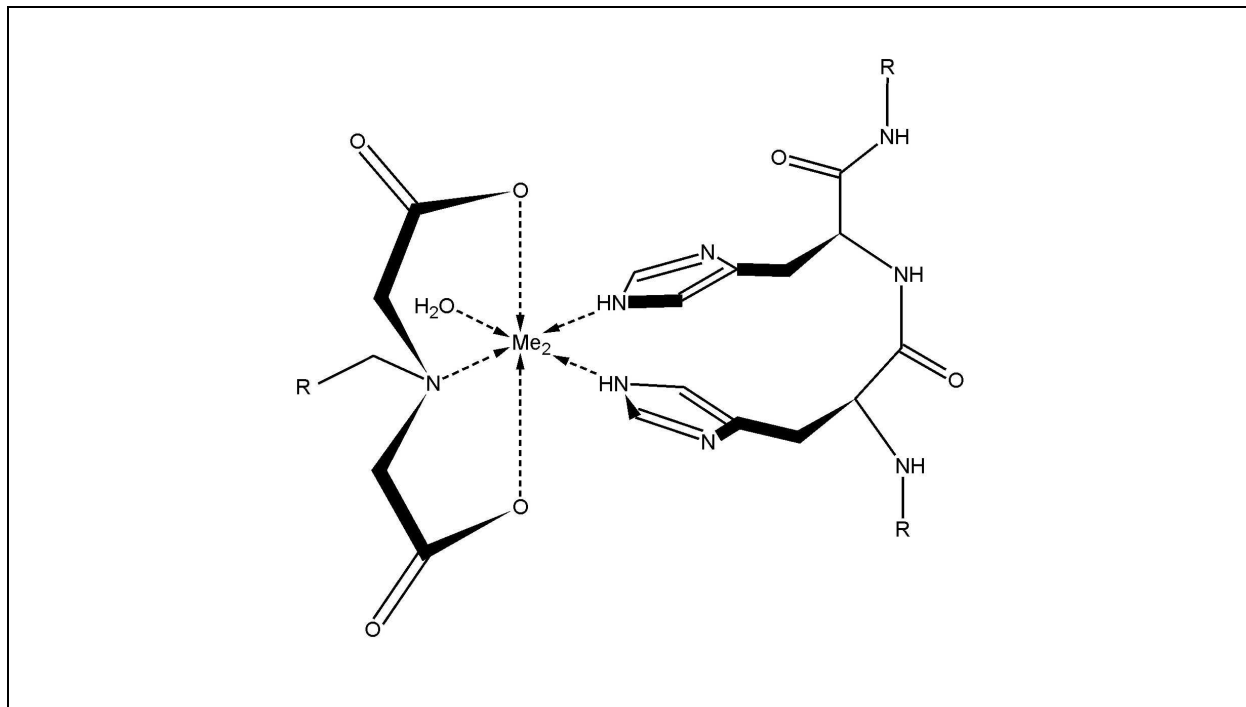


Abb. 2: Koordination der Bindung des IDA-Metallchelats mit einem His-Tag.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt über kompetitive Verdrängung, zum Beispiel mit Hilfe eines Imidazol Gradienten. Nach der erfolgreichen Aufreinigung des Zielproteins kann der His-Tag über eine spezifische Protease anschließend wieder vom Produkt abgetrennt werden [8].

Essentiell für den optimalen Einsatz der IMAC ist, dass alle Moleküle, die nach dem Affinitätsprinzip getrennt werden sollen, die Membranporen problemlos passieren können. Doch natürlich ließe sich der Siebeffekt der Membran auch zusätzlich nutzen, um beispielsweise Verunreinigungen abzutrennen [11]. Somit ist die individuelle Auswahl der Membran für die Aufreinigungsstrategie entscheidend.

2.2.4. Modifikation von Polyethersulfon-Hohlfasern

Die Modifikation von Hohlfasermembranen kann vor dem Membranspinprozess oder auch an der fertigen Membranen erfolgen. Aufgrund des hohen apparativen Aufwands beim Membranspinprozess wurde jedoch ausschließlich die nachträgliche Modifikation der fertigen Hohlfasern durchgeführt. Dabei sind prinzipiell folgende Techniken möglich:

- Pfropfpolymerisation (,Graft'-Polymerisation)
- Beschichtungstechnik (,Coating')
- Nasschemische Membran-Modifikation

Bei der Pfropfpolymerisation werden auf der Oberfläche hydrophober oder inerte Basismembranen bifunktionelle Moleküle oder Monomere aufgebracht. Anschließend wird durch Tieftemperatur-Plasma, UV- oder γ -Strahlung eine radikalische Polymerisation initiiert, bei der das Polymerisat kovalent an das Membrangrundgerüst gebunden wird. Beim ,Coating' werden amphiphile Polymere, sogenannte Funktionspolymere, auf der Oberfläche hydrophober Membranen adhäsiv gebunden. Dadurch lassen sich die günstigen, hydrophilen Eigenschaften des Funktionspolymers auf die Trägermembranen übertragen. Der Nachteil dieser ,Coating'-Technik ist jedoch, dass oberflächenaktive Substanzen die Bindung zwischen den Polymeren lösen können und ihrerseits an der Membran adsorbieren [31]. Die nasschemische Modifikation kann ein breites Spektrum organisch-synthetischer Reaktionen nutzen, um Membranen chemisch zu modifizieren. Den Ansatzpunkt bilden dabei die bei der Polymerkondensation entstehenden Endgruppen der Hohlfasermembran. Die Methode der Wahl ist hierbei die nasschemische Modifikation, da bei geringem apparativem Aufwand eine stabile Modifikation der Basismembran erreicht werden kann.

Der entscheidende Schritt bei der nasschemische Modifikation ist die Aktivierung der inerten Polysulfon- oder Polyethersulfon-Hohlfasern. Diese kann durch die Reaktion der terminalen Hydroxylgruppen mit einem Diepoxid, wie Ethylenglycoldimethylether (EGDME) erreicht werden [32]. Da jedoch nur wenige terminale Hydroxylgruppen auf der Hohlfaseroberfläche vorliegen, ist eine Vervielfältigung der generierten Epoxygruppen notwendig.

Die epoxyaktivierten Hohlfasermembranen ermöglichen aufgrund ihrer hohen Reaktivität zahlreiche Umsetzungen mit nucleophilen Agenzien. Somit besteht die Möglichkeit, terminale Ankergruppen in Form von z.B. Amin-, Hydrazid-, Carboxy- oder Sulfonsäuregruppen zu generieren. Auch IDA funktionalisierte Hohlfasern für IMAC lassen sich aus diesen modifizierten Hohlfasern herstellen [33]. Somit können je nach gewünschtem Anwendungsbereich entsprechende Ligandensysteme zur Affinitätsbindung entwickelt und getestet werden. Neben dem Einsatz von Affinitätshohlfasern können auch entsprechend funktionalisierte Hohlfasern als Ionenaustauscher (Kationen- bzw. Anionenaustauschermembranen) fungieren.

Kapitel 3

Mikro-Hohlfaserreaktorbasissystem

Die folgenden Abschnitte beschreiben den Aufbau des modularen MHFR-Basisreaktor-systems, mit dem grundlegende Untersuchungen für den Einsatz des Systems in den Anwendungsbereichen Kultivierung und Downstreaming durchgeführt wurden. Dazu gehören die reaktionstechnische Charakterisierung der Reaktoren und Untersuchungen zu Sterilisation, Desinfektion und Biofouling. Außerdem wurden erste Versuche im Bereich Kultivierung durchgeführt. Der Aufbau eines ansteuerbaren, prozesstauglichen Mikro-Hohlfaserreaktor-basissystems konnte in Kooperation mit dem Unternehmen Saxonia BioTec GmbH, Radeberg verwirklicht werden.

3.1. Aufbau der Mikro-Hohlfaserreaktoren

Der Projektpartner Saxonia BioTec GmbH, Radeberg lieferte die Mikro-Hohlfaserkassetten für den Aufbau des Reaktorsystems (Abb. 3A). Es wurden Kassetten mit verschiedenen Polysulfon- und Polyethersulfon Fasern hergestellt. Die Kenndaten der verschiedenen Hohlfasern sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab.1: Kenndaten der verschiedenen Hohlfasern

Bezeichnung	Polymer	Porengröße	Innerer / Äußerer Durchmesser [µm]
1. MikroPES	Polyethersulfon (PES)	0,2 µm	300 / 500
2. High Flux	Polysulfon (PS)	30 kDa	200 / 280
3. Low Flux	Polysulfon (PS)	5 kDa	200 / 280

*Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bubble Point Messung an Ultrafiltrationsmembranen (2-3) werden in der Regel Kennzahlen zum MWCO angegeben, um die Porengröße zu beschreiben.

Das Gehäuse der Hohlfaserkassetten besteht aus Plexiglas und die eingebrachten Hohlfasern wurden mit Polyurethan vergossen. Die Abmessung der Kassetten betragen 5,5 x 5,5 cm bei einer Höhe von 0,8 cm. Je nach Anwendungsbereich kann die Faseranzahl der Reaktoren variiert werden. Es konnten Faseranzahlen von 80 bis 300 Hohlfasern realisiert werden. Das Reaktorvolumen liegt je nach integrierter Faseranzahl zwischen 5 und 8 mL. Um eine Anströmung der Hohlfasern zu ermöglichen wurden die Mikro-Hohlfaserkassetten mit einem Anschlussystem ausgestattet (siehe Abb. 3B).

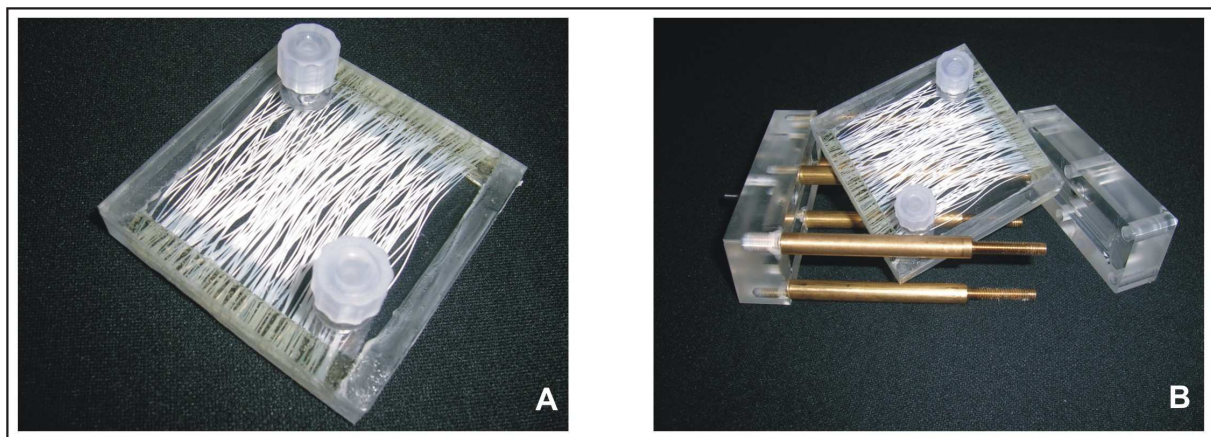


Abb. 3: Mikro-Hohlfaserkassette, Saxonia BioTec GmbH, Radeberg; A: Mikro-Hohlfaserkassette mit 140 Low Flux Hohlfasern, B: Mikro-Hohlfaserkassette mit Anschlussystem.

Die Plexiglasseitenteile mit eingelassenem Dichtungsring wurden mit sechs Verbindungswellen aus Messing verbunden, um eine optimale Abdichtung des Systems zu erreichen. Der Reaktor kann somit in zwei Reaktionsräume eingeteilt werden: den intrakapillaren Bereich und den extrakapillaren Bereich. Die Schlauchverbindungen für den intrakapillaren Zugang wurden über Standardschlauchanschlüsse aus Messing realisiert, die für den extrakapillaren Bereich hingegen über Luerverbindungsstücke.

3.2. Reaktionstechnische Charakterisierung

Um die Mikro-Hohlfaserreaktoren erfolgreich einsetzen zu können, ist eine reaktionstechnische Charakterisierung sinnvoll. Insbesondere die schrittweise Optimierung des Reaktorsystems soll überprüft und bewertet werden. Außerdem sollen grundlegende technische Daten erarbeitet werden. Dazu wurde die Verweilzeit bei verschiedenen Flussraten bestimmt und eine Modellierung des Reaktorsystems realisiert.

3.2.1. Bestimmung des Verweilzeitverhaltens

Der erste Schritt für eine Charakterisierung von Reaktoren ist die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens. Die Zeit, die ein Spurenstoff (Tracer) zum Durchlaufen des Reaktors benötigt, bezeichnet man im Allgemeinen als Verweilzeit. Da gleichzeitig gestartete Teilchen in realen Reaktoren unterschiedliche Wegstrecken vom Reaktoreingang bis zum Reaktorausgang zurücklegen, resultieren verschiedene Aufenthaltsdauern. Die Auswahl des Tracers ist dabei von entscheidender Bedeutung, da eine Diffusion von Tracermolekülen in oder durch die Membran die Messungen stark beeinflussen kann. Daher werden Standardproteinlösungen bzw. Zellsuspensionen genutzt, die durch die unterschiedlichen Membranen zurückgehalten werden und durch ihre Absorption bei 280 bzw. 600 nm nachgewiesen werden können. Somit kann die Verweilzeit des extrakapillaren Raumes innerhalb des Hohlfasermoduls bestimmt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Traceraufgabe, wobei die Impulsfunktion und die Sprungfunktion am häufigsten verwendet werden. Die Impulsfunktion, bei der der Tracer innerhalb kürzester Zeit in den Stoffstrom injiziert wird und die Sprungfunktion, bei der der Tracer ab einem Zeitpunkt t_0 kontinuierlich zugegeben wird. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Impulsfunktion, insbesondere durch den Druckanstieg im Schlauchsystem und den für die steile Antwortfunktion zu großen Messabständen bei der photometrischen Messung, wurden die Messungen mit Hilfe der Sprungfunktion durchgeführt.

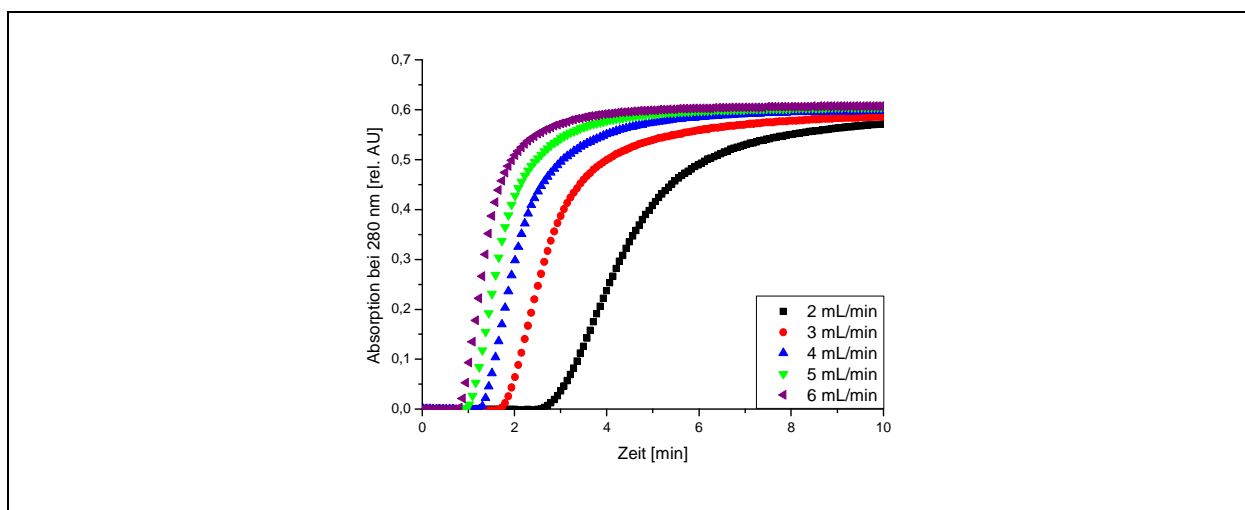


Abb. 4: Verweilzeitmessung durch Sprungfunktion; Reaktormodul: 5 kDa Low Flux Fasern, 140 Stück; Tracer: BSA; Flussraten: 2-6 mL/min.

Abbildung 4 zeigt die Verweilzeitkurven für einen Mikro-Hohlfaserreaktor mit 140 Low Flux Fasern bei Flussraten von 2 bis 6 mL/min. Eine Erhöhung der Flussrate bewirkt eine höhere Steigung bei der Antwortfunktion, und somit auch eine geringere mittlere Verweilzeit der Partikel im Reaktor. Doch über diese Antwortfunktionen ist eine Berechnung der Verweilzeit-Dichtefunktion und der Verweilzeit-Summenfunktion sowie der mittleren Verweilzeit erschwert. Besonders die Berechnung der Verweilzeit-Dichtefunktion erwies sich aufgrund starker Streuung der berechneten Messpunkte als nicht realisierbar. Außerdem konnte keine Aussage über eventuelle Strömungsdefizite oder Totzonen getroffen werden. Daher wurde eine Anpassung an die aufgenommenen Messdaten mit Hilfe des Kaskadenmodells angestrebt.

3.2.2. Modellierung der Mikro-Hohlfasereaktoren

Im weiteren Verlauf wurde eine Modellierung der Verweilzeit angestrebt, um die Verweilzeit-Dichtefunktion ($E(t)$) und Verweilzeit-Summenfunktion ($F(t)$) für verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten zu simulieren. Des Weiteren kann über die Modellierung die mittlere Verweilzeit (τ) berechnet werden und Aussagen über Strömungsdefizite bzw. Totzonen getroffen werden.

Der Reaktor müsste aufgrund seiner angestrebten diffusiven Einsatzweise ein rührkesselähnliches Verhalten aufweisen. Es wird eine individuelle Modellberechnung aus den experimentellen Daten angestrebt. Am besten eignet sich in diesem Fall das Kaskadenmodell. Doch Versuche zur Anpassung an die Versuchsdaten ergaben, dass dieses Modell für eine gute Anpassung mit einem geringen Fehler nicht ausreicht. Daher wurde das Kaskadenmodell erweitert. So wurde für die Modellierung dieser Daten ein doppeltes Kaskadenmodell genutzt, durch das das extrakapillare Volumen in zwei Kaskaden aufgeteilt wird. Zusätzlich wird auch das Schlauchvolumen vor dem Reaktoreingang bei der Modellierung berücksichtigt. Abbildung 5 zeigt die ermittelte Formel, die für alle weiteren Modellierungen genutzt wurde.

Die Formel des doppelten Kaskadenmodells wurde unter Angabe der Anzahl der Reaktoren in den einzelnen Kaskaden mit Hilfe des Computer-Algebra-Systems Maple gelöst. Die nun aufgelöste Formel wurde in ein Tabellenkalkulationsprogramm eingegeben und mit Hilfe des Solvers wurden V_n und \dot{V}_n sowie t_0 als veränderbare Zellen festgelegt und der Fehler minimiert.

Für $t > t_p$:

$$c(t) = \frac{1}{\dot{V}} \left[\dot{V}_n \left(c_0 - c_0 e^{-\frac{(t-t_p)\dot{V}_n}{V_n}} \sum_{i=1}^n \left(\frac{(t-t_p)\dot{V}_n}{V_n(i-1)!} \right)^{i-1} \right) + \dot{V}_m \left(c_0 - c_0 e^{-\frac{(t-t_p)\dot{V}_m}{V_m}} \sum_{i=1}^m \left(\frac{(t-t_p)\dot{V}_m}{V_m(i-1)!} \right)^{i-1} \right) \right]$$

$$\dot{V} = \dot{V}_n + \dot{V}_m$$

$$V = V_n + V_m$$

c	Konzentration	V	Volumen [mL]
c ₀	Konzentration bei Traceraufgabe	V _n	Volumen in Kaskade n [mL]
n	Kesselzahl in Kaskade n	V _m	Volumen in Kaskade m [mL]
m	Kesselzahl in Kaskade m	\dot{V}	Volumenfluss [mL/min]
t	Zeit [min]	\dot{V}_n	Volumenfluss in Kaskade n [mL/min]
t _p	Verweilzeit im Schlauchsystem	\dot{V}_m	Volumenfluss in Kaskade m [mL/min]

Abb. 5: Formel des doppelten Kaskadenmodells.

Anschließend müssen die Kesselzahlen für die beiden Kaskaden optimiert werden. Dazu werden verschiedene Kesselzahlkombination mit Maple gelöst und über die veränderbaren Zellen der Fehler minimiert. Der minimale Fehler konnte für diesen Reaktor bei der Kombination von $n=10$ und $m=1$ ermittelt werden. Die zugehörigen Fehlerquadratsummen der Simulationen für die einzelnen Flussraten liegen zwischen 0,03 rel. U und 0,06 rel. U und bieten somit eine gute Anpassung an die Messwerte.

Abbildung 6 zeigt die mit Hilfe des Modells erstellten Verweilzeit-Dichtefunktionen ($E(t)$) und Verweilzeit-Summenfunktionen ($F(t)$) für die in Abbildung 4 dargestellten Daten einer Verweilzeitmessung bei Flussraten von 2 - 6 mL/min.

Die Verweilzeit-Summenfunktion wurde dabei direkt aus den Messdaten abgeleitet. Aus der Verweilzeit-Summenfunktion wurde anschließend die Verweilzeit-Dichtefunktion mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (2.1)$$

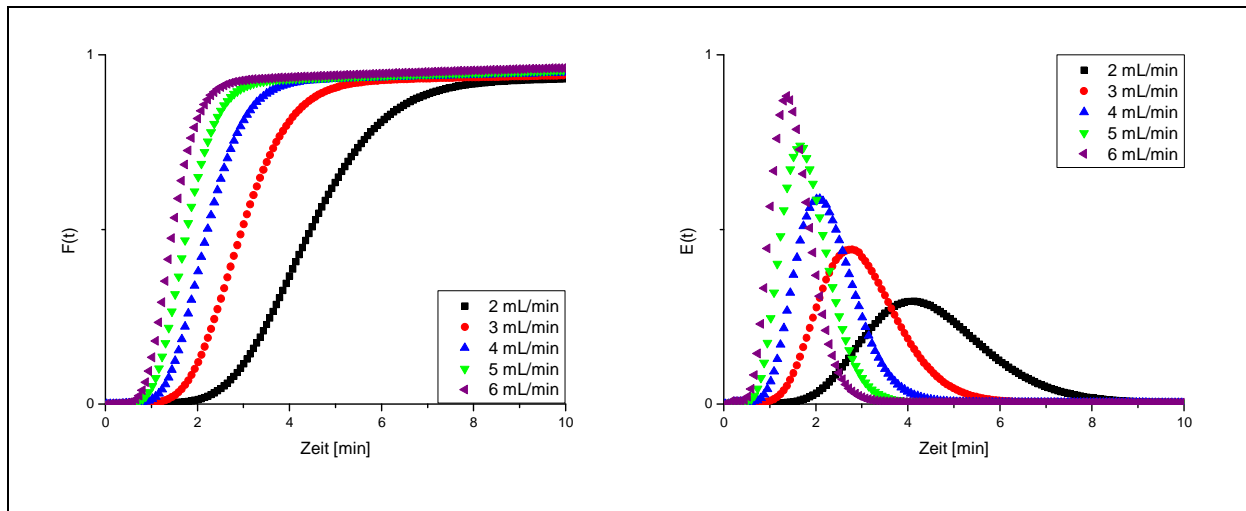


Abb. 6: Aus der Modellierung erstellte F(t)- und E(t)-Kurven; Reaktormodul: 5 kDa Low Flux Fasern, 140 Stück; Flussraten: 2-6 mL/min.

Mit Hilfe des Modells lassen sich die F(t)- und E(t)-Kurven für die verschiedenen Flussraten darstellen, aber auch die unterschiedlichen mittleren Verweilzeiten (τ) ermitteln. Die Berechnung der Daten wurde über die folgende Formel realisiert:

$$\tau = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (2.2)$$

Die errechneten mittleren Verweilzeiten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Mittlere Verweilzeiten (τ) für die unterschiedlichen Flussraten der Verweilzeitmessungen.

Flussrate [mL/min]	τ [s]
2	4,48
3	3,21
4	2,58
5	2,19
6	1,93

Die mittlere Verweilzeit (τ) verringert sich bei steigenden Flussraten, da durch die Erhöhung der Flussrate die Aufenthaltsdauer des Tracers im Reaktor abnimmt. Mit Hilfe einer Modellierung der in Tabelle 2 gezeigten Daten lassen sich die mittleren Verweilzeiten für alle Flussraten vorhersagen (siehe Abb. 7). Eine Erhöhung der Flussrate führt zwar zu geringeren mittleren Verweilzeiten, dies führt jedoch wahrscheinlich auch zu erhöhten Strömungsdefiziten. Außerdem bewirken hohe Flussraten auch einen Anstieg des Drucks im Schlauch-

system und starke Scherkräfte, die insbesondere bei der Kultivierung das Wachstum der Zellen negativ beeinflussen würden. Daher wurde für die weiteren Versuche eine Flussrate von 5 mL/min eingestellt, da hierbei eine möglichst geringe Flussrate bei einer relativ niedrigen mittleren Verweilzeit realisiert werden kann.

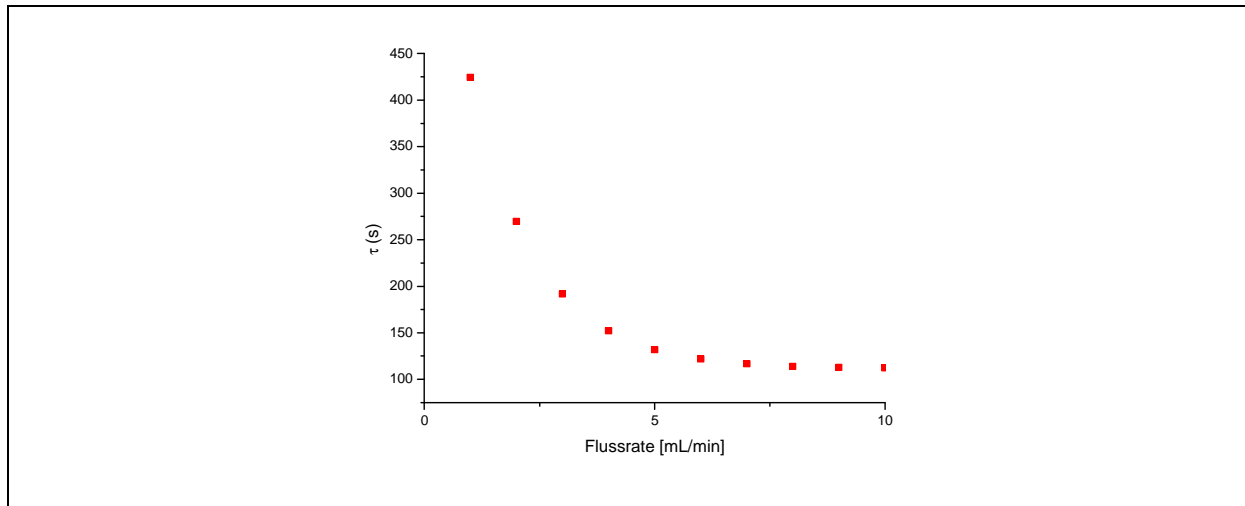


Abb. 7: Darstellung der mittleren Verweilzeit (τ) in Bezug zur angelegten Flussrate.

Des Weiteren können weitere Aussagen über die Reaktoreigenschaften in Bezug auf Strömungsdefizite bzw. Totzonen getroffen werden. Diese können aus den Ergebnissen für die Volumina und Flussgeschwindigkeiten der einzelnen Kaskaden ermittelt werden. Da in der Kaskade m (ein Kessel) der Anteil am Volumenstrom lediglich 9 % beträgt, kann das Volumen der Kaskade als Volumen mit starken Strömungsdefiziten oder auch als Totvolumen bezeichnet werden. Das Volumen der Kaskade beträgt 5,4 mL und somit sind 87 % des Reaktorvolumens starken Strömungsdefiziten unterworfen. Dies macht deutlich, dass der Mikro-Hohlfaserreaktor in Bezug auf die Durchmischung im Reaktorinnenraum optimiert werden muss.

3.3. Desinfektion und Sterilisation der Mikro-Hohlfaserreaktoren

Der Aspekt der Sterilität ist für die Kultivierung von Mikroorganismen essentiell. Dabei stellt die Stabilität des Membranmaterials ein Problem dar, denn die verschiedenen Methoden der Sterilisation und Desinfektion könnten zu einer Beeinträchtigung der Porenstruktur führen.

Prinzipiell kommen die verschiedenen in Tabelle 3 dargestellten Methoden der Sterilisation und Desinfektion in Frage.

Tab. 3: Methoden für Sterilisation und Desinfektion (kursiv: durchgeführte Methoden).

Sterilisation	Desinfektion
<i>Gammabestrahlung</i>	<i>Ethanol (70 %)</i>
Elektronenbestrahlung	<i>Glutaraldehyd (2 %)</i>
Ethylenoxid	<i>Hypochlorit (1 %)</i>
<i>Autoklavierung</i>	<i>Isopropanol (70 % und 30 %)</i>
Inline-Dampf	<i>Peressigsäure (3 %)</i>
	<i>Zitronensäure (50 %)</i>

Um eine Beeinträchtigung der Porenstruktur auszuschließen, wurden Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) von der Oberflächenstruktur von Mikro-PES-Flachmembranen durchgeführt, die entsprechend sterilisiert oder desinfiziert wurden. Die Aufnahmen wurden in folgenden Vergrößerungen aufgenommen: 1.000x, 2.000x, 3.000x, 5.000x und 10.000x.

3.3.1. Sterilisation

Die Möglichkeiten zur Sterilisation von Mikro-Hohlfaserreaktoren wurden durch Autoklavieren und Gammabestrahlung von Mikro-PES-Flachmembran-Stanzlingen getestet. Anschließend wurden REM-Aufnahmen der Membranoberfläche angefertigt, um eventuelle Auswirkungen der Sterilisation auf die Porenstruktur der Membran zu visualisieren.

In Abbildung 8 sind die REM-Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 3.000x dargestellt. Bild A zeigt die Porenstruktur der unbehandelten Membran. Im Gegensatz dazu ist die Porenstruktur der autoklavierten Membran deutlich verändert. Die Membranporen sind vermutlich durch die Hitzeeinwirkung beim Autoklavieren verschmolzen. Bei der Gamma-Bestrahlung hingegen ist keine Veränderung der Membranstruktur zu beobachten. Zur Sterilisation ist folglich nur die Gamma-Bestrahlung geeignet, diese Technik ist jedoch mit einem finanziell und apparativ hohem Aufwand verbunden und kann nur außer Haus durchgeführt werden. Daher wird eine Methode zu Desinfektion der Hohlfasern favorisiert.

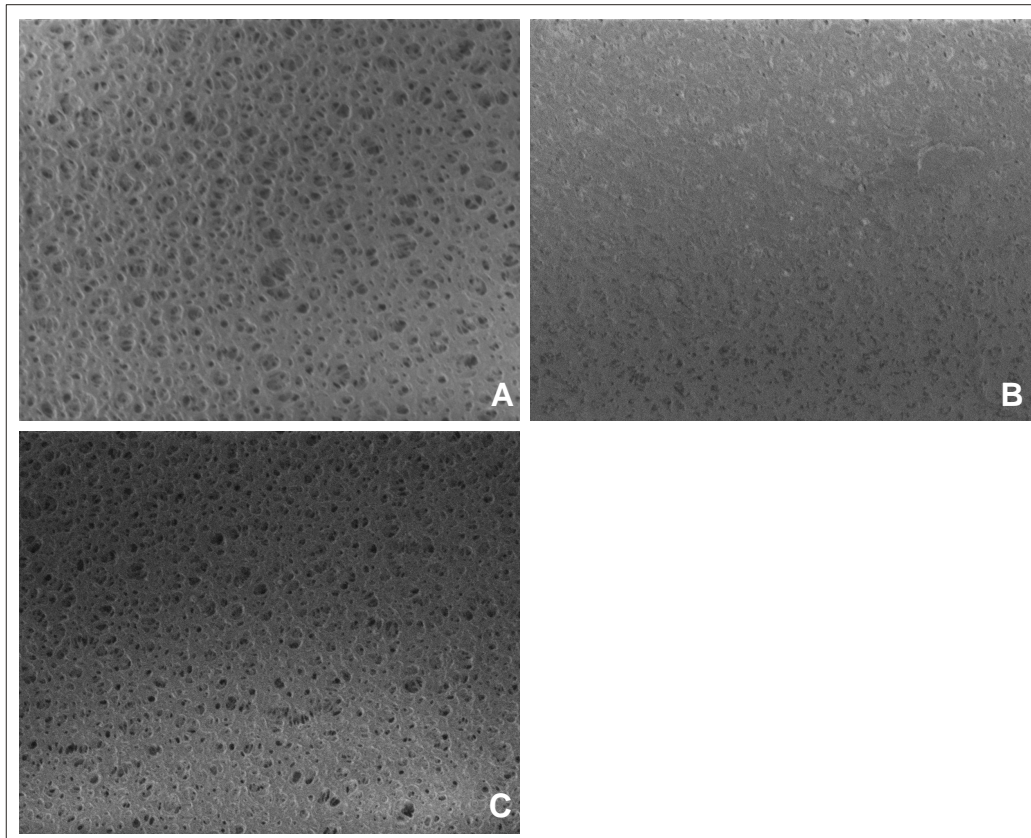


Abb. 8: REM-Aufnahmen von Mikro-PES-Flachmembranen; A: unbehandelt, B: autoklaviert, C: γ -Bestrahlung; Vergrößerung 3.000x.

3.3.2. Chemische Desinfektion

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Desinfektion [34, 35] wurden ebenfalls über REM-Aufnahmen auf ihre Auswirkungen auf die Porenstruktur der Membran überprüft. Abbildung 9 zeigt REM-Aufnahmen der unbehandelten Membran (A), sowie Aufnahmen von Membranstanzlingen nach der Desinfektion mit verschiedenen Desinfektionsmitteln (B-H). Die REM-Aufnahmen zeigen, dass die Desinfektion mit 70 % Isopropanol zu einem Aufquellen der Porenstruktur führt. Alle anderen Desinfektionsmittel haben keinen Einfluss auf die Porenstruktur und sind somit für die Desinfektion geeignet.

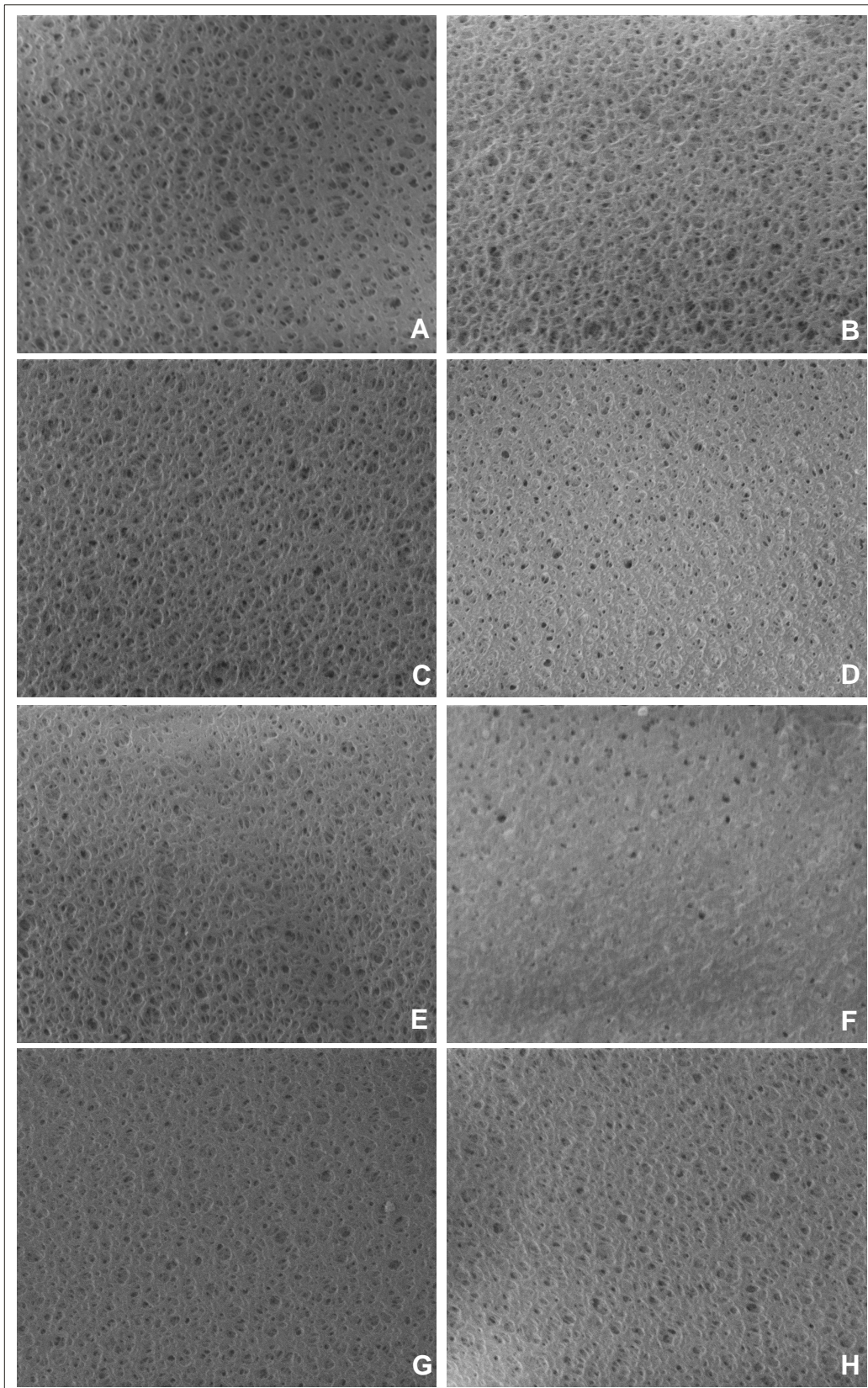


Abb. 9: REM-Aufnahmen von MicroPES-Flachmembranen; A: unbehandelt, B: 70 % Ethanol, C: 2 % Glutaraldehyd, D: 1 % Natriumhypochlorit, E: 30 % Isopropanol, F: 70 % Isopropanol, G: 3 % Peressigsäure, H: 50 % Zitronensäure; Vergrößerung 3.000x.

Folglich wurden die verschiedenen Desinfektionsmittel auf ihre Eignung zur Desinfektion der Hohlfasern überprüft. Dazu wurden die Hohlfasern mit einem Prüfkeim (*Escherichia coli*) für 24 Stunden bei 37 °C und 120 rpm im Schüttelkolben inkubiert und anschließend desinfiziert. Die desinfizierten Fasern wurden anschließend mit sterilem deionisiertem Wasser gewaschen und für 24 h in LB-Medium bei 37 °C und 120 rpm im Schüttelkolben inkubiert. Zellwachstum dient dabei als Indikator für eine unzureichende Desinfektion. Dies konnte jedoch nur bei 30 % Isopropanol und der Vergleichsprobe ohne Desinfektion nachgewiesen werden. Alle anderen Desinfektionsmittel bewirken eine ausreichende Desinfektion der Fasern.

Des Weiteren wurden die Kosten für die verschiedenen Desinfektionsmittel verglichen. Durch Natriumhypochlorit ist eine ausreichende Desinfektion bei minimalen Kosten möglich. Die Methode der Wahl ist folglich die Desinfektion durch Spülen mit 1 % Natriumhypochlorit für 1 h. Danach wird der Reaktor mit sterilem deionisiertem Wasser gespült, um das Desinfektionsmittel aus dem Reaktor zu waschen.

3.4. Biofouling von Hohlfasermembranen

Ein weiterer entscheidender Aspekt für den Einsatz von Hohlfaser Membranen im Bereich der mikrobiellen Produktion ist neben der Sterilisation bzw. Desinfektion der des Biofoulings. Dies ist besonders in Hinblick auf die Wiederverwertbarkeit der Mikro-Hohlfaserreaktoren zu untersuchen. Dabei kann das für die Desinfektion verwendete Natriumhypochlorit auch zur Reinigung der Hohlfasern verwendet werden [34].

Zur Bewertung des Biofoulings wurden UltraPES-Hohlfasern mit einer Porengröße von 70 kDa für 24 h im Schüttelkolben mit *Escherichia coli* kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Fasern mit Natriumhypochlorit gereinigt und REM-Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 7.500x durchgeführt. Die Reinigung erfolgt dabei bei 1.000 rpm für 30, 60 und 120 min. Außerdem wurde eine Faserprobe transmembran mit 50 mL 1 % Natriumhypochlorit bei einer Flussrate von 0,5 mL/min durchspült.

Abbildung 10 zeigt die aufgenommenen REM-Aufnahmen. Bild A zeigt die unbehandelte Faser und somit die Porenstruktur der Hohlfasermembran. Nach der Kultivierung (Abb. 10; Bild B) ist die Porenstruktur durch Biofouling deutlich verändert. Ein Großteil der Poren ist durch einen Biofilm blockiert, wodurch die Durchlässigkeit der Hohlfaser nicht mehr gewährleistet werden kann.

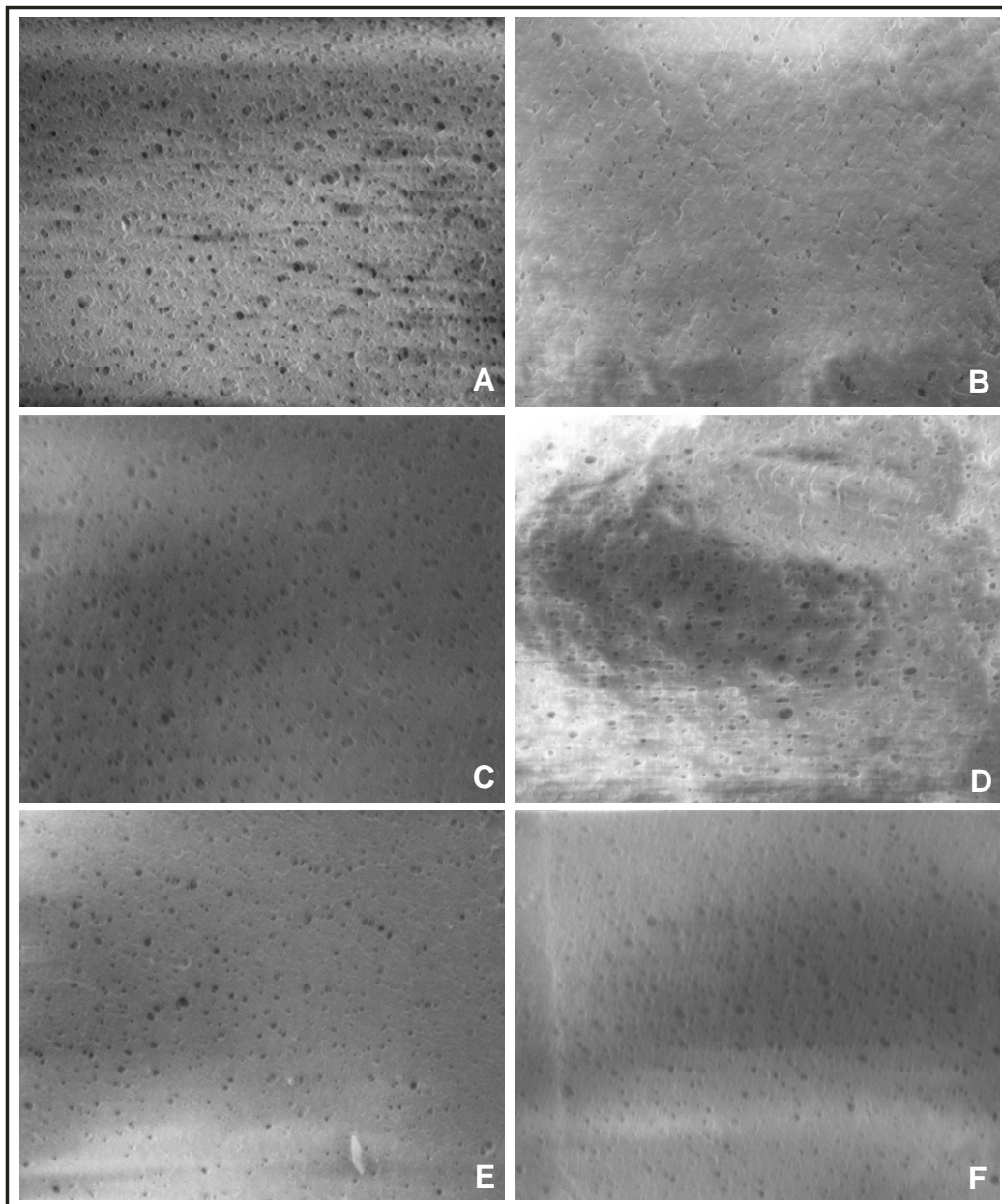


Abb. 10: REM-Aufnahmen zum Biofouling; Vergrößerung 7.500x; A: unbehandelt, B: nach Kultivierung, C: 30 min Natriumhypochlorit, D: 60 min Natriumhypochlorit, E: 120 min Natriumhypochlorit, F: Transmembranfluss von 50 mL Natriumhypochlorit, Flussrate 0,5 mL/min.

Die Bilder C bis F zeigen die verschiedenen Reinigungsstrategien mit 1 % Natriumhypochlorit. Der auf den Hohlfasern abgelagerte Biofilm konnte durch alle Reinigungsstrategien mit 1 % Natriumhypochlorit deutlich reduziert werden. Doch die 3D-Struktur der Poren ist besonders in der Tiefe der Hohlfasermembran nicht so klar ersichtlich, wie in der unbehandelten Vergleichsprobe. Dies könnte jedoch auch an der elektrostatischen Aufladung der Faserproben bei der REM-Aufnahme liegen, die dazu führt, dass die Bilder unscharf werden bzw. helle Bereiche auftreten.

Zusammenfassend kann die Reinigung der Hohlfasern durch Natriumhypochlorit nachgewiesen werden. Die vollständige Entfernung des Biofilms kann jedoch nicht gewährleistet werden. Daher werden die Mikro-Hohlfaserreaktoren für die Versuche im Bereich der Kultivierung immer mit neuen Hohlfasern ausgestattet.

3.5. Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von Mikroorganismen im Mikro-Hohlfaserreaktor wurde ein rekombinanter *E. coli* Stamm ausgewählt. Dieser Stamm bietet entscheidende Vorteile für den ersten Einsatz des Mikro-Hohlfaserreaktorsystems im Bereich Kultivierung. Besonders in Hinblick auf die notwendige Optimierung von Kultivierungsbedingungen und Reaktordesign ist ein minimaler Zeit- und Kostenaufwand für die Kultivierung entscheidend. Der *E. coli* Stamm JM109 pGFPx6His wird über einen Zeitraum von lediglich 24 h kultiviert und bietet auch in Bezug auf die Produktaufarbeitung einfache Methoden zum Nachweis der Produktkonzentration. Das Produkt Green fluorescent protein (GFP) kann über seine Fluoreszenz spektroskopisch nachgewiesen werden, so dass die Produktivität direkt in den Zellen durch Messung der relativer Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Die Aufreinigung des GFP erfolgt über ein Standardprotokoll für His-tag Proteine.

Die Kultivierung des Stammes wurde zunächst im Schüttelkolben durchgeführt, um Ergebnisse zum Vergleich mit dem Mikro-Hohlfaserreaktor zu erhalten. Für das Screening von Verfahrensparametern werden überwiegend Schüttelkolben eingesetzt [36], weshalb dieses System hier auch zum Vergleich herangezogen wurde.

3.5.1. Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung wird in LB-Medium (lysogeny broth) mit 100 µg/mL Ampicillin bei 120 rpm und 30 °C durchgeführt und die Produktbildung durch IPTG induziert. Während der Kultivierung wird die optische Dichte offline verfolgt. Zusätzlich wird die Fluoreszenz des intrazellulär vorliegenden GFP am 2D-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, Mannheim) nachgewiesen. Nach Beendigung der Kultivierung werden die Zellen von ihrem Flüssigmedium durch Zentrifugation abgetrennt. Der Zellaufschluss erfolgt durch Ultraschall. Nach einem

weiteren Zentrifugationsschritt kann der Überstand für Versuche im Bereich Downstreaming eingesetzt werden.

Die Aufarbeitung erfolgt über Vivapure miniprep MC Spin Columns (Sartorius AG, Göttingen). Dabei kann die angewendete Metallchelate-Chromatographie mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen durchgeführt werden. Kupfer-, Nickel-, Cobalt- und Zinkionen werden für die Aufarbeitung eingesetzt und auf ihre Eignung für die Aufarbeitung von GFP-His überprüft. Die Analyse der verschiedenen Schritte der Aufarbeitung erfolgte über die Fluoreszenz des GFP und über SDS-Page.

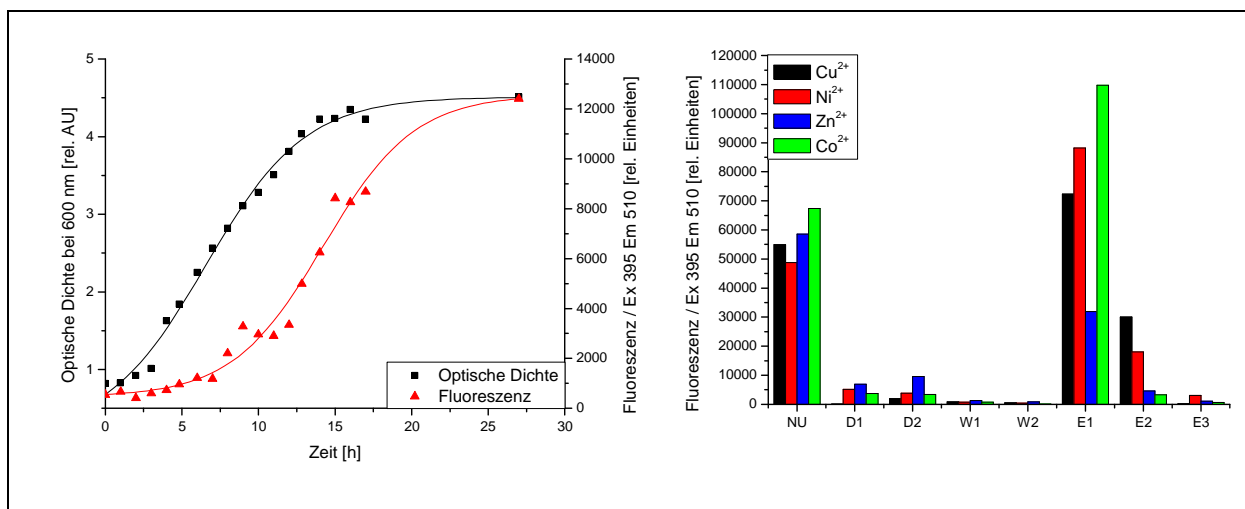


Abb. 11: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im Schüttelkolben. Links: Verlauf der optischen Dichte und der intrazellulären GFP-Fluoreszenz. Rechts: GFP-Fluoreszenz während der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns (NU = nach Ultraschall, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Elution).

Abbildung 11 links zeigt den Verlauf der optischen Dichte und der intrazellulären GFP-Fluoreszenz von *E. coli* JM109 pGFPx6His. Der für eine Wachstumskurve typische Verlauf endet nach 24 h bei einer optischen Dichte von 4,5 rel. AU. Die GFP-Fluoreszenz steigt mit zunehmender Zelldichte auf eine Intensität von 12.000 rel. Fluoreszenzeinheiten. Abbildung 11 rechts zeigt die verschiedenen Schritte während der Aufarbeitung von GFP mittels Vivapure miniprep MC Spin Columns. Der Produktnachweis erfolgte durch fluoreszenzspektroskopische Messungen. Nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall liegt eine hohe GFP-Konzentration vor. Im Durchlauf und in den Waschfraktionen hingegen ist kaum GFP nachzuweisen. Das bedeutet, dass GFP quantitativ an der Membran bindet. Während der Elution wird das GFP von den Membranen herunter gewaschen. Dabei ist zu beobachten, dass die Durchführung mit Cobalt die besten Ergebnisse liefert, gefolgt von Nickel und Kupfer. Die im Vergleich zur Elution geringeren Fluoreszenzintensitäten nach durchgeführtem

Zellaufschluss (Ultraschall) lassen sich auf einen Konzentrationsschritt bei der ersten Elution zurückführen, bei dem im Vergleich zur aufgegebenen Probe 50 % weniger Elutionspuffer eingesetzt wurde. Außerdem können Streulichteffekte im Zellysate nicht ausgeschlossen werden. In der zweiten Elutionsfraktion sind die GFP-Konzentrationen deutlich niedriger, wobei die Versuchsreihe mit Cobalt wiederum die besten Ergebnisse liefert, da hier im Vergleich zur ersten Elution 96 % weniger GFP vorliegt. Bei der dritten Fraktion liegen die Werte unter 4 % der Ausgangskonzentration. Der Vorteil der Aufarbeitung mit Cobalt liegt also darin, dass die höchste GFP-Konzentration erreicht wird und dass nach der ersten Elution das His-tag-Protein fast vollständig von der Membran eluiert werden kann.

Die Aufreinigung des GFP konnte auch durch SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 12).

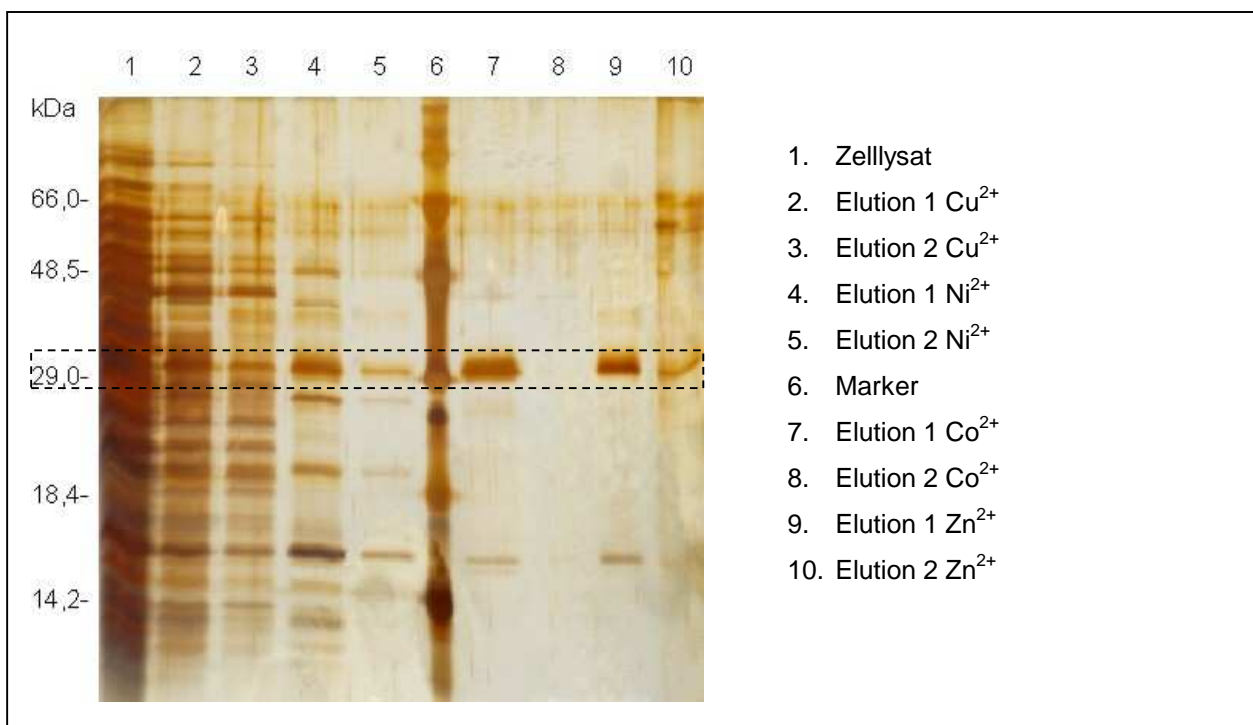


Abb. 12: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Aufreinigung der Kulturbrühe über zweiwertige Metallionen mit Vivapure miniprep MC Spin Columns. Färbemethode: Silberfärbung.

Spur 1 mit dem Zellysate zeigt ein Gemisch aus diversen Proteinen. Nach der Aufreinigung konnte das His-tag-Protein in allen Spuren bei etwa 29 kDa nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass das Produkt bei der Aufreinigung mit Kupfer durch zahlreiche andere Proteine verunreinigt ist. Dies liegt vermutlich an der wenig selektiven Bindung an Cu^{2+} -Ionen. Die Aufreinigung mit Co^{2+} -Ionen liefert die besten Ergebnisse, da die Verunreinigung durch andere Proteine hier am geringsten ist.

3.5.2. Kultivierung im Mikro-Hohlfaserreaktor

Die Kultivierung im Mikro-Hohlfaserreaktor wurde mit Hilfe des in Abbildung 13 dargestellten Versuchsaufbaus durchgeführt. Somit ergeben sich zwei über den Stofftransport durch die Hohlfasern verbundene Kreisläufe. Im intrakapillaren Kreislauf wird sauerstoff- und nährstoffreiches Medium durch die Hohlfasern geleitet. Im extrakapillaren Kreislauf werden die Zellen im Kulturmedium kultiviert. Um trotz des geringen Reaktorvolumens eine gute Überwachung des Wachstumsverlaufs und der Produktion von GFP zu gewährleisten sind in diesen Kreislauf ein Photometer und ein Probenahmegefäß für die offline-Probennahme integriert. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Reaktor soll über die Flussgeschwindigkeit im extrakapillaren Kreislauf geregelt werden. Die Desinfektion für den gesamten Versuchsaufbau wurde wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben mit Natriumhypochlorit realisiert und die Befüllung mit Medium sowie die Zellzugabe unter der Clean bench durchgeführt.

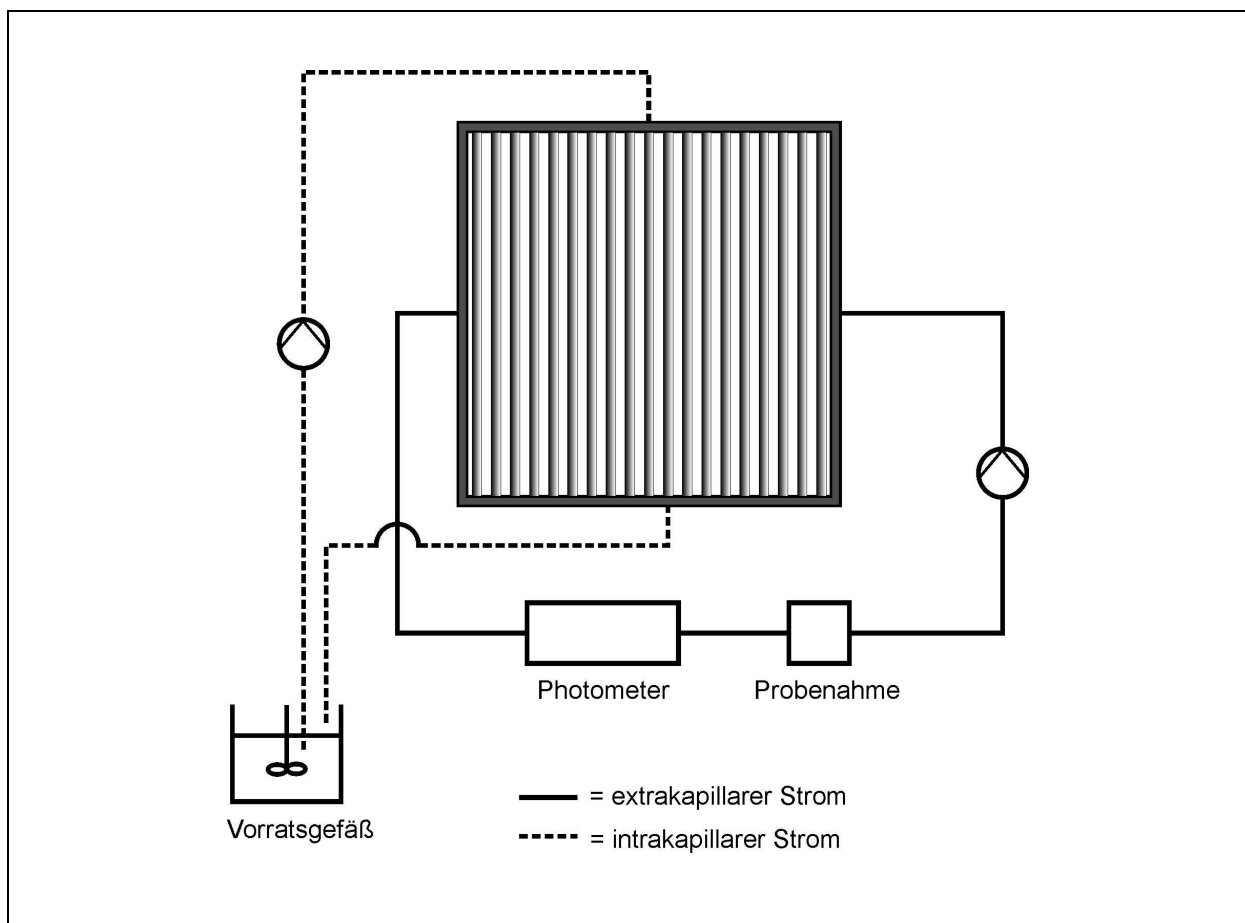


Abb. 13: Aufbau des Mikro-Hohlfaserreaktors zur Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His.

Die Kultivierung wurde in einem Mikro-Hohlfaserreaktor mit 140 Low Flux Fasern bei einer Flussrate von 5 mL/min durchgeführt. Die online aufgenommene Wachstumskurve ist in Abbildung 14 dargestellt. Die maximal erreichte optische Dichte in der stationären Phase der Kultivierung liegt bei 1,0 rel. AU und somit deutlich unter den in der Schüttelkolbenkultivierung erreichten Werten. Unter diesen Bedingungen wurde auf die Induktion der Produktformation durch IPTG sowie auf eine weitere Aufarbeitung des produzierten GFP verzichtet.

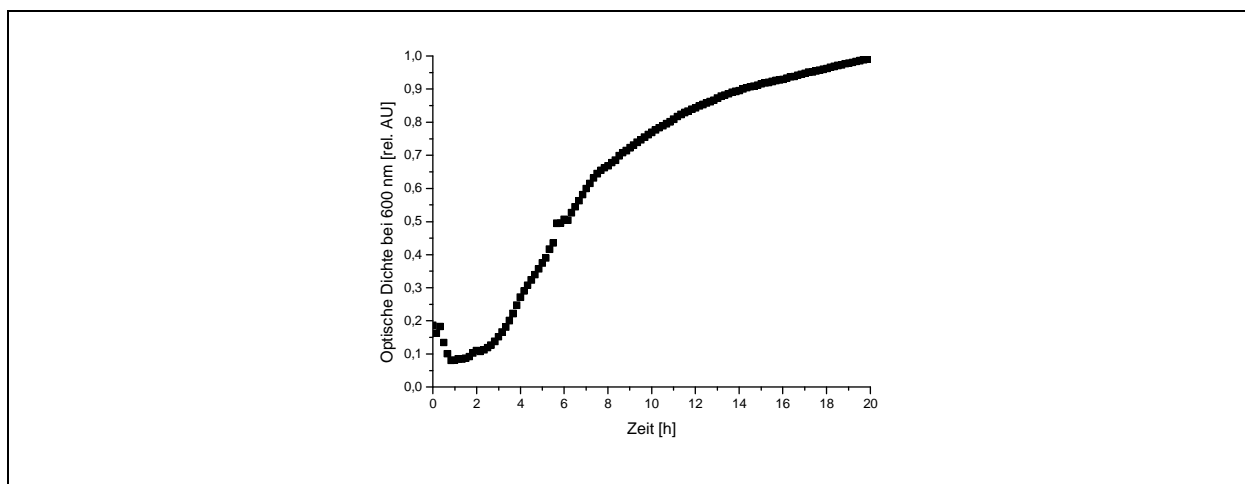


Abb. 14: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im MHFR mit 140 Low Flux Fasern; Flussrate extrakapillar: 5 mL/min; Flussrate intrakapillar: 9 mL/min.

Weder durch die Variation von Faserart und Faseranzahl noch durch Änderung der Kultivierungsbedingungen, insbesondere der Flussrate, konnte eine signifikante Verbesserung der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His erreicht werden. Somit ist eine Optimierung des Reaktoraufbaus zur Etablierung für den Bereich Kultivierung essentiell.

3.6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse im Bereich Kultivierung zeigen, dass der Reaktor im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung deutliche Defizite aufweist. Es konnten lediglich 22 % der optischen Dichte im Schüttelkolben erreicht werden. Das geringe Wachstum im Mikro-Hohlfaserreaktor kann verschiedene Ursachen haben. So konnte beobachtet werden, dass sich Zellen am Grund des Reaktors sammeln und somit keine ausreichende Durchmischung des Reaktorvolumens im derzeitigen Design gewährleistet werden kann. Des Weiteren ist

fraglich, ob der Sauerstoffeintrag für eine Kultivierung von Mikroorganismen ausreicht. Somit sind umfangreiche Veränderungen im Reaktordesign notwendig, um den Mikro-Hohlfaserreaktor im Bereich der mikrobiellen Produktion einsetzen zu können.

Jedoch konnten umfangreiche Arbeiten im Bereich der reaktionstechnischen Charakterisierung der Reaktoren sowie in den Bereichen Sterilisation, Desinfektion und Biofouling durchgeführt werden. Das Mikro-Hohlfaserreaktorsystem wurde während der Arbeiten in Bezug auf das Verweilzeit- und Strömungsverhalten reaktionstechnisch charakterisiert, um grundlegende technische Daten zu erarbeiten. Dabei wurde eine erfolgreiche Modellierung von Verweilzeitexperimenten realisiert, über die das Strömungsverhalten bewertet werden konnte. Der Einsatz des Mikro-Hohlfaserreaktorbasissystems für den Bereich Kultivierung war aufgrund der starken Strömungsdefizite bereits an diesem Punkt fraglich. Trotzdem wurden weitere Versuche mit dem Basissystem durchgeführt, um die Entwicklung und Etablierung weiterer allgemeiner Protokolle zu erarbeiten. Die Möglichkeiten von Desinfektion und Sterilisation wurden ausführlich erarbeitet. So musste das Autoklavieren aufgrund von Veränderungen in der Porenstruktur der Hohlfasern verworfen werden. Die Sterilisation durch γ -Strahlen ist prinzipiell möglich, jedoch technisch nicht einfach realisierbar. Daher ist die Methode der Wahl ein Desinfektionsprotokoll mit Natriumhypochlorit. Das Biofouling der Hohlfasern während der Kultivierung wurde optisch mit Hilfe von REM-Bildern überprüft. Dabei wurde wiederum Natriumhypochlorit für die Reinigung der Fasern eingesetzt. Es konnte eine deutliche Reinigung der Faserstruktur nachgewiesen werden. Da diese Entfernung des Biofilms jedoch nicht vollständig war, muss der Einsatz des Mikro-Hohlfaserreaktors als Einwegprodukt realisiert werden.

Essentiell für den weiteren Einsatz des Mikro-Hohlfaserreaktors ist die Optimierung des Reaktors für die Kultivierung von Mikroorganismen. Doch die bisher durchgeführten Arbeiten und Methoden können auch nach der Optimierung des Reaktordesigns eingesetzt werden.

Kapitel 4

Aufbau eines neuartigen Mikro-Hohlfaserreaktor-systems

Um einen erfolgreichen Einsatz des Reaktorsystems im Bereich Kultivierung zu ermöglichen, musste im Verlauf der Arbeiten eine vollständige Neukonstruktion des Mikro-Hohlfaserreaktors verwirklicht werden. Diese war für die Etablierung des Systems in der Biotechnologie unerlässlich. So konnte durch den Partner Saxonia BioTec GmbH, Radeberg kein definiertes Reaktorvolumen und keine definierte Faseroberfläche gewährleistet werden, welche für wissenschaftliche Arbeiten unerlässlich sind. Diese Abweichungen im Reaktorvolumen wurden durch Probleme bei der Verklebung der Hohlfasern durch den Polyurethan Kleber verursacht. Die Klebermasse war in vielen Fällen ungleichmäßig verteilt und unterschiedlich dick. Dadurch entstanden Abweichungen im Reaktorvolumen von bis zu 19 %.

Des Weiteren konnte keine Vereinzelung der Hohlfasern ermöglicht werden, was zur Blockierung von Membranoberfläche und zur Bildung von Strömungstotzonen führt. Im neu entwickelten Hohlfaserreaktor sollen diese Defizite behoben werden. Zudem sollen weitere Modifikationen, wie ein Magnetrührstäbchen zur besseren Durchmischung des Reaktorvolumens integriert werden.

4.1. Aufbau der Mikro-Hohlfaserreaktoren

Abbildung 15 zeigt einen neuentwickelten Reaktor-Rohling, in den genau 43 Hohlfasern definierter Länge eingebaut werden können. Dabei wurden Polyethersulfon-Hohlfasern von

Membrana, Wuppertal eingesetzt. Diese Hohlfasern sind aufgrund ihres Durchmessers von 1 mm besser zu verarbeiten. Die Kenndaten der Hohlfasern sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Kenndaten der für die Neukonstruktion des MHFR eingesetzten Hohlfasern.

Bezeichnung	Polymer	Porengröße	Innerer / Äußerer Durchmesser [μm]
UltraPES	Polyethersulfon (PES)	70 kDa	700 / 1000

Die Abmaße des Reaktormoduls betragen 6,6 x 6,6 cm bei einer Dicke von 2 cm und das Reaktorvolumen beträgt 30 mL. Die genauen Maße sind den im Anhang C aufgeführten technischen Zeichnungen zu entnehmen. Das Gehäuse besteht aus Polymethylmethacrylat (PMMA), welches eine ausreichende Stabilität gegenüber Natriumhypochlorit und dem unter der Sicherheitswerkbank verwendeten Isopropanol aufweist.

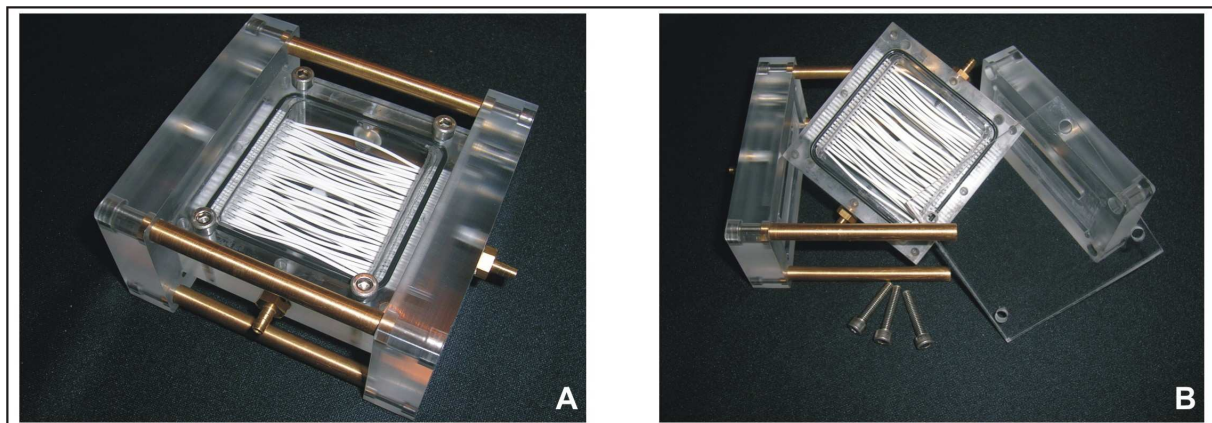


Abb. 15: Mikro-Hohlfaserreaktor mit 43 UltraPES-Hohlfasern und integriertem Magnetrührerstäbchen; A: vollständig zusammengesetzter Reaktor, B: Reaktor in Einzelteile zerlegt.

Die Fasern wurden mit einer Pinzette in vorgebohrte Löcher im Reaktormodul eingefädelt und mit einem Zwei-Komponenten-Silikon verklebt. Die Auswahl des Klebers erwies sich als sehr schwierig, da das Material viskos genug für eine gute Verarbeitung sein musste, jedoch nicht zu flüssig, da es sonst in die Faser hineinläuft und diese verstopft. Zusätzlich musste der Kleber beständig gegenüber dem zur Desinfektion genutzten Natriumhypochlorit sein. Verschiedene Epoxydharze konnten aufgrund ihrer geringen Viskosität nicht verwendet werden. Das verwendete Zwei-Komponenten-Silikon der Firma Wacker, Ottobrunn (Elastosil RT 601 A) ist so viskos, dass 100 % der verklebten Fasern frei zugänglich sind. Die Verarbeitung mittels Einwegspritzen ist trotz der relativ hohen Viskosität möglich.

Die durch die definierte Position der einzelnen Hohlfasern erreichte Vereinzelung der Fasern im MHFR führt zur Gewährleistung frei zugänglicher Hohlfasern. Außerdem kann die im Basissystem auftretende Bildung von Strömungstotzonen durch Bündelbildung der statistisch verteilten Fasern minimiert werden. Zusätzlich wurde in den Reaktor ein Magnetührstäbchen integriert, da eine homogene Verteilung der Substrate ebenso wie der kultivierten Organismen für eine erfolgreiche Zellkultivierung unerlässlich ist. Das Magnetührstäbchen wurde im Mittelpunkt des Reaktors durch eine Aussparung im Reaktorboden fixiert.

Für die Anströmung des intrakapillaren Bereichs wurde das Reaktormodul wie im Basissystem mit Seitenteilen mit eingelassenem Dichtungsring und vier Verbindungswellen aus Messing versehen. Die Schlauchverbindungen für den intrakapillaren Zugang wurden über Standard Schlauchanschlüsse aus Messing realisiert.

4.2. Reaktionstechnische Charakterisierung

Die reaktionstechnische Charakterisierung des neu entwickelten MHFR basiert auf der Bestimmung des Verweilzeitverhaltens und der Modellierung der erhaltenen Daten mit dem in Abschnitt 3.1 erstellten doppelten Kaskadenmodell. Besonders die Veränderung der Volumenströme und Strömungsdefizite bzw. Totzonen des MHFR durch die Integration des Magnetührstäbchens sollen dabei bewertet werden.

Die Verweilzeit wurde wie in Abschnitt 3.1 beschrieben mit BSA als Tracer bestimmt. Die Aufgabe der Tracer-Lösung wurde als Sprungfunktion realisiert und bei einer Flussrate von 5 mL/min wurde die Drehzahl des Magnetührstäbchens von 0 bis 500 rpm variiert. Nachfolgend wurde die Modellierung der erhaltenen Daten durchgeführt. Abbildung 16 zeigt sowohl die ermittelten Daten aus den Verweilzeitexperimenten als auch das aus den Daten erstellte Modell.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Steigung der Antwortfunktion mit zunehmender Drehzahl des Magnetührstäbchens abnimmt. Dies ist auf eine Verwirbelung der Tracermoleküle im extrakapillaren Bereich des Reaktors zurückzuführen. Die Abnahme der Steigung weist somit auf eine bessere Verteilung der Tracermoleküle hin. Während bei den Drehzahlen von 0 bis 300 rpm eine deutliche Abnahme der Steigung zu erkennen ist, kann die Antwortfunktion für 500 rpm als nahezu deckungsgleich mit der Funktion bei 300 rpm beschrieben werden. Die Erhöhung der Drehzahl auf 500 rpm bewirkt somit keine Verbesserung für die gleichmäßige Verteilung der Tracermoleküle im Reaktorinnenraum.

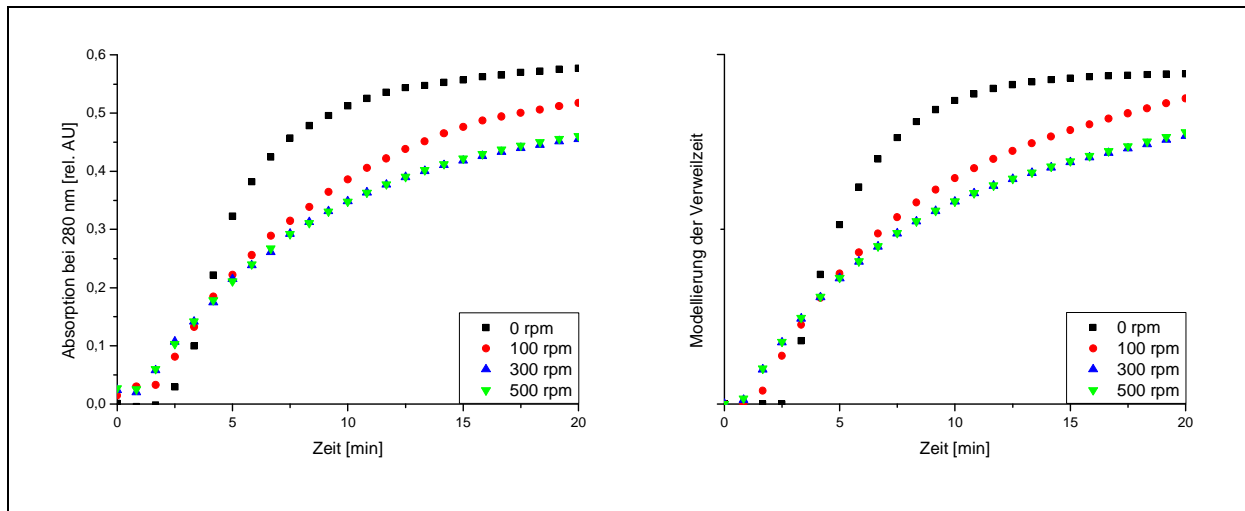


Abb. 16: Links: Verweilzeitmessung bei verschiedenen Rührerdrehzahlen durch Sprungfunktion, Reaktormodul mit 43 UltraPES Fasern und Magnetrührer, Tracer: BSA, Rührerdrehzahlen: 0 - 500 rpm; Rechts: Mit Hilfe des doppelten Kaskadenmodells aufgestellte Modellierung der links dargestellten Messdaten.

Nach der Aufnahme der Messdaten müssen nach dem in Abschnitt 3.1 erstellten doppelten Kaskadenmodell die Kesselzahlen für die beiden Kaskaden optimiert werden. Dazu werden verschiedene Kesselzahlkombination mit Maple gelöst und anschließend wird über die veränderbaren Zellen der Fehler minimiert.

Der minimale Fehler konnte für diesen Reaktor bei der Kombinationen von $n=11$ und $m=1$ ermittelt werden. Dieses Modell wurde anschließend für die Berechnung der mittleren Verweilzeit und der Strömungsparameter eingesetzt. Die aus der Modellierung der Messdaten ermittelten Daten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zur Bewertung der Anpassung des Modells an die Messwerte wurden die Fehlerquadratsummen bestimmt. Die zugehörige Fehlerquadratsummen der Simulationen für die einzelnen Drehzahlen des Magnetrührstäbchens liegen zwischen 0,0011 rel. U und 0,0019 rel. U und bieten somit eine optimale Anpassung an die Messwerte.

Tab. 5: Reaktionstechnische Daten für ein Reaktormodul mit 43 UltraPES-Fasern und Magnetrührer, Rührerdrehzahlen: 0-500 rpm.

Rührerdrehzahl [rpm]	Volumen Kaskade m [mL]	Volumen Kaskade n [mL]	Anteil des Volmenstroms in Kaskade m [%]	Anteil des Volmenstroms in Kaskade n [%]	Summe der quadratischen Abweichung [rel. U]	τ [min]
0	13,46	16,67	92	8	0,0019	5,13
100	28,67	1,46	86	14	0,0016	6,16
300	27,02	3,12	77	23	0,0011	5,08
500	27,22	2,91	77	23	0,0013	5,22

Die mittlere Verweilzeit des MHFR liegt bei allen getesteten Rührerdrehzahlen im Bereich von fünf bis sechs Minuten. Im Vergleich mit den übrigen mittleren Verweilzeiten ist die bei einer Drehzahl von 100 rpm deutlich erhöht. Vermutlich werden die einströmenden Tracermoleküle erst durch den Magnetrührer in Randbereiche des MHFR verteilt, die auf Grund der geringen Drehzahl Strömungsdefizite aufweisen. Der Abtransport der Tracermoleküle aus diesen Bereichen ist somit limitiert, wodurch sich eine erhöhte mittlere Verweilzeit ergibt.

Obwohl die Verteilung der Tracermoleküle im Reaktor bei einer Drehzahl von 300 oder 500 rpm deutlich besser sein sollte, ist im Vergleich mit den Werten bei 0 rpm keine signifikante Veränderung der mittleren Verweilzeit festzustellen. Dies ist auf die unterschiedlichen Strömungscharakteristika bei unterschiedlicher Drehzahl zurückzuführen. So können bei unterschiedlichen Drehzahlen, aufgrund der unterschiedlich großen Totzonen im Reaktorinnenraum, ähnliche mittlere Verweilzeiten ermittelt werden. Die Beurteilung der Strömungscharakteristika erfolgt über die ermittelten Volumina und Volumenströme für die einzelnen Kaskaden des doppelten Kaskadenmodells. In Abbildung 17 wurden die in Tabelle 5 dargestellten Daten für die Volumen- und die Volumenstromanteile der einzelnen Kaskaden mittels Säulendiagrammen visualisiert.

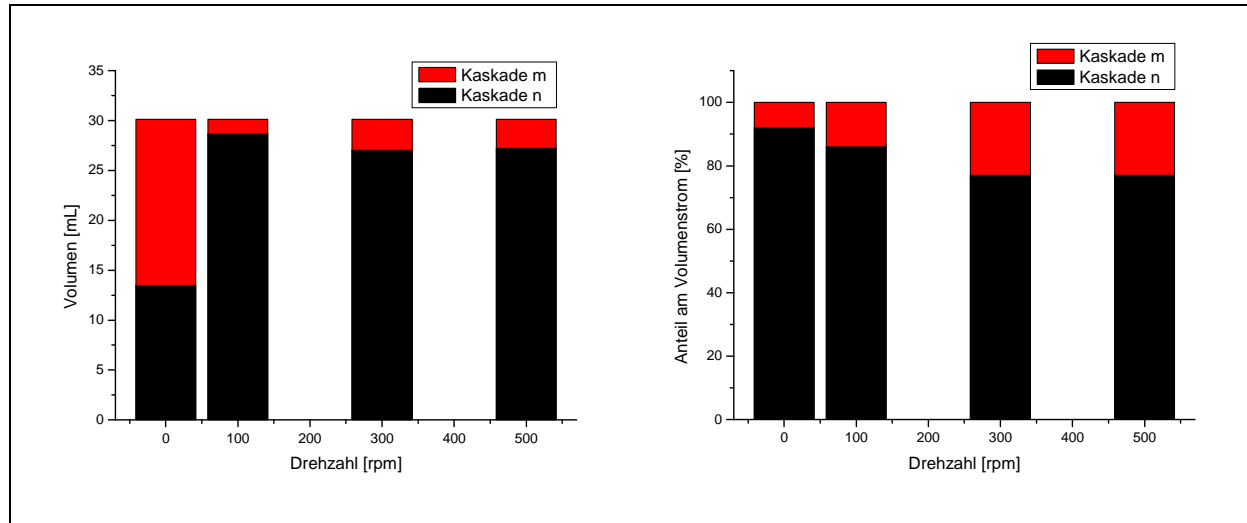


Abb. 17: Volumen- und Volumenstromanteile für die einzelnen Kaskaden des doppelten Kaskadenmodells bei unterschiedlichen Drehzahlen des Magnetrührstäbchens.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der Volumenanteil von Kaskade m durch den Einsatz des Magnetrührstäbchens verkleinert. Das bedeutet, dass ein geringeres Volumen eventuellen Strömungsdefiziten ausgesetzt ist. Die Bewertung in Bezug auf Strömungsdefizite bzw. Totzonen ist jedoch nur unter Berücksichtigung der Volumenströme für die einzelnen Volumina möglich. Der Volumenstrom für Kaskade n nimmt durch den Einsatz des

Magnetrührstäbchens mit steigender Drehzahl zu. Eine Zunahme des Volumenstroms ist hier positiv zu bewerten, da ein geringer Volumenstrom in einer Kaskade bedeutet, dass das Volumen der Kaskade mehr oder weniger starken Strömungsdefiziten ausgesetzt ist. Optimal wäre hier ein gleichmäßiger Volumenstrom für beide Kaskadenvolumina.

Ohne den Einsatz des Magnetrührstäbchens (0 rpm) wird das Volumen von Kaskade n mit einem Volumenstromanteil von 8 % bewegt. Dieser geringe Volumenstrom weist darauf hin, dass dieses Volumen starken Strömungsdefiziten unterliegt. Der Anteil dieses minimal durchströmten Volumens in Bezug auf das gesamte Reaktorvolumen beträgt 45 %. Obwohl nahezu die Hälfte des Reaktorvolumens nicht optimal durchströmt wird, ist eine deutliche Verbesserung im Vergleich zum MHFR-Basissystem festzustellen, bei dem 87 % des Reaktorvolumens massiven Strömungsdefiziten ausgesetzt ist. Dies lässt sich auf das Reaktordesign mit abgerundeten Innenecken im Reaktor und die Vereinzelnung der Hohlfasern zurückführen.

Bei einer Drehzahl von 100 rpm erhöht sich der Volumenstromanteil in Kaskade n auf 14 %. Gleichzeitig sinkt das Volumen von Kaskade n auf 1,46 mL und hat somit nur noch einen Anteil von 5 % am gesamten Reaktorvolumen. Somit wird durch die geringe Drehzahl von 100 rpm bereits eine enorme Verringerung des Volumens mit Strömungsdefiziten erreicht. Zusätzlich wird der Volumenstrom der geringer durchströmten Kaskade erhöht. Die Erhöhung der Drehzahl auf 300 bzw. 500 rpm liefert nahezu übereinstimmende Werte. Dabei steigt das Volumen der geringer durchströmten Kaskade wieder leicht an und erreicht 10 % des Gesamtvolumens. In Bezug auf den Volumenstrom ist durch die Erhöhung der Drehzahl jedoch eine deutliche Verbesserung der Durchströmung der strömungslimitierten Kaskade n zu beobachten. Der Volumenstromanteil erreicht einen Wert von 23 %. Dies entspricht einer Erhöhung des Volumenstroms um das Dreifache in Bezug auf die ermittelten Werte ohne Einsatz des Magnetrührstäbchens. Somit kann die Steigerung der Drehzahl trotz der Verdoppelung des strömungslimitierten Volumens als Verbesserung der Strömungscharakteristika bewertet werden. Da durch die Erhöhung auf 500 rpm keine Veränderung des Strömungsverhaltens erreicht werden konnte, ist die ideale Durchmischung bei 300 rpm erreicht.

Für die Kultivierung von Mikroorganismen ist jedoch die homogene Verteilung von bakteriellen Zellen notwendig. Diese haben deutlich größere Ausmaße als die als Tracer eingesetzten Proteinmoleküle. Somit wird für die Kultivierung eine Rührerdrehzahl von 500 rpm eingesetzt, die eine gute Verteilung der Zellen gewährleistet und trotzdem möglichst geringe Scherkräfte bewirkt, durch die Zellen zerstört werden können.

4.3. Kultivierung von *Escherichia coli* im Mikro-Hohlfaserreaktor

Die Kultivierung im Mikro-Hohlfaserreaktor wurde, wie zuvor im MHFR-Basissystem, mit Hilfe des in Abschnitt 3.6.2 dargestellten Versuchsaufbaus durchgeführt. Im intrakapillaren Kreislauf wird mit einer Flussrate von 9 mL/min sauerstoff- und nährstoffreiches Medium im Kreislauf durch die Hohlfasern gepumpt. Im extrakapillaren Kreislauf werden die Zellen im Kulturmedium kultiviert. Abermals wurde die Überwachung des Wachstumsverlaufs durch das in diesen Kreislauf integrierte Photometer und ein Probenahmegefäß realisiert. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Reaktor soll über das Magnetrührstäbchen bei einer Drehzahl von 500 rpm und die Flussgeschwindigkeit im extrakapillaren Kreislauf von 5 mL/min gewährleistet werden. Die Desinfektion für den gesamten Versuchsaufbau wurde wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben mit Natriumhypochlorit realisiert und die Befüllung mit Medium sowie die Zellzugabe unter der Clean bench durchgeführt.

Die Onlinemessung der optischen Dichte erfolgte photometrisch, wobei eine Durchflussküvette als Probenzelle eingesetzt wurde. Die aufgenommene Wachstumskurve ist in Abbildung 18 dargestellt. Es ist eine lag-Phase und anschließend ein nahezu linearer Anstieg der optischen Dichte zu beobachten, jedoch keine ausgeprägte exponentielle Phase. Nach 12 h und einer optische Dichte von 0,62 rel. AU wurde der Versuch aufgrund des geringen Wachstums abgebrochen.

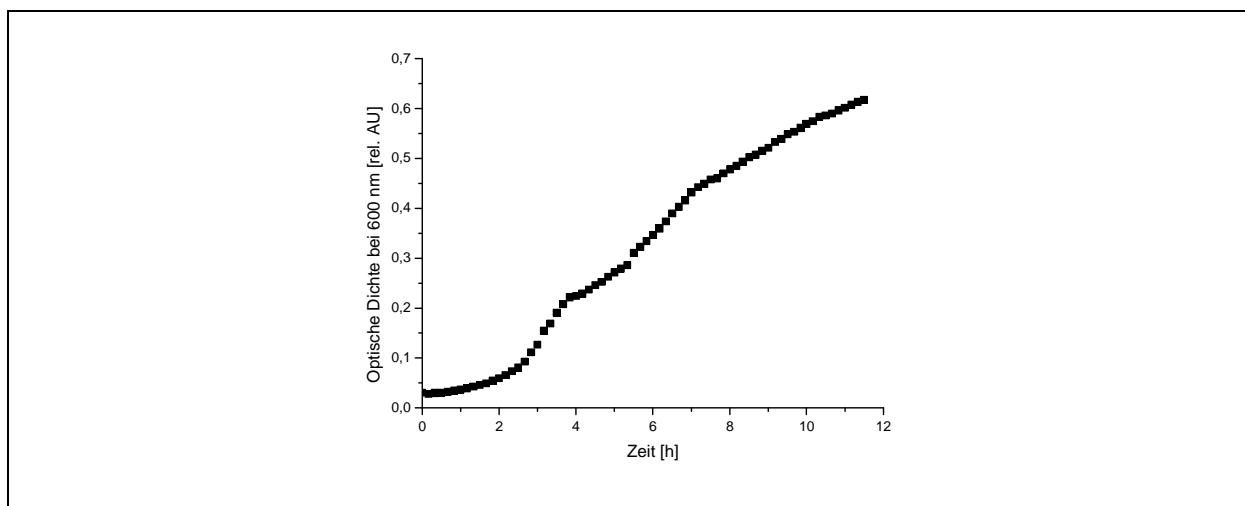


Abb. 18: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im MHFR mit 43 UltraPES Fasern; Rührerdrehzahl: 500 rpm; Flussrate extrakapillar: 5 mL/min; Flussrate intrakapillar: 9 mL/min.

Auch bei diesem Versuch wurde keine Induktion der GFP-Produktion mit IPTG durchgeführt. Diese wird in der Regel ab einer optischen Dichte von 0,9 rel. AU vorgenommen, die hier nie erreicht wurde. Somit ist eine Verbesserung des Reaktordesigns in Bezug auf die Kultivierung wiederum essentiell.

4.4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse im Bereich Kultivierung zeigen, dass auch dieser Reaktor im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung deutliche Defizite aufweist. Es konnten trotz der Optimierung des Strömungsverhaltens im extrakapillaren Bereich nur 13 % der optischen Dichte im Schüttelkolben erreicht werden. Verschiedenste Faktoren können Einfluss auf die Kultivierung nehmen. Die Optimierung des Strömungsverhalten führte nicht zu einer Verbesserung der Kultivierungsergebnisse. Außerdem sollte die Nährstoffversorgung vorerst durch das im extrakapillaren Bereich vorliegende Medium gewährleistet sein. Ein weiterer entscheidender Faktor für die Kultivierung von Mikroorganismen ist die Sauerstoffversorgung. Die langsame und lineare Erhöhung der Biomasse im Reaktor könnte auf einen durch Diffusion limitierten Sauerstofftransfer hinweisen. Somit sind weitere Veränderungen im Reaktordesign notwendig, um den Mikro-Hohlfaserreaktor im Bereich der mikrobiellen Produktion einsetzen zu können.

Dennoch konnten innovative Entwicklungen des MHFR realisiert werden. So konnte die komplette Neukonstruktion des Reaktorsystems verwirklicht werden. Trotz zahlreicher technischer Probleme in Bezug auf die Integration und Verklebung der Fasern, der Auswahl eines passenden Reaktormaterials und der Integration passender Dichtungen und Verschraubungen konnte ein funktioneller MHFR entwickelt werden. Außerdem konnten die bisher verwendeten Hohlfasern aufgrund ihres geringen Durchmessers nicht für den neu entwickelten MHFR eingesetzt werden. Daher wurden Hohlfasern mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Porengröße von 70 kDa von Membrana, Wuppertal bezogen, die sich für die manuelle Integration in den Reaktor eignen.

Des Weiteren konnte die Optimierung des MHFR-Systems in Bezug auf das Strömungsverhalten im Reaktorinnenraum vorangetrieben werden. Durch den Einsatz eines Magnetrührstäbchens konnte das Strömungsverhalten entscheidend verbessert werden. Die Optimierung der Rührerdrehzahl zeigt, dass eine Drehzahl von nicht weniger als 300 rpm für eine gute Verteilung notwendig ist. Eine weitere Erhöhung der Drehzahl bewirkt keine

Verbesserung der Verteilung des Protein-Tracers, könnte jedoch bei der Kultivierung für die Verteilung von viskosem, zellhaltigem Medium von Vorteil sein. Daher wird für die weiteren Kultivierungsversuche eine Drehzahl von 500 rpm eingesetzt. Das Ziel der folgenden Arbeiten ist die weitere Optimierung der neu entwickelten Reaktorsystems, wobei insbesondere der Sauerstoffeintrag in den extrakapillaren Bereich untersucht wird.

Kapitel 5

Entwicklung einer Begasungsstrategie für das Mikro-Hohlfaserreaktorsystem

Durch das Mikro-Hohlfaserreaktorbasissystem konnte eine ausreichende Versorgung der eingesetzten Mikroorganismen nicht gewährleistet werden. Der in Kapitel 4 neu entwickelte und in Bezug auf die Durchmischung des extrakapillaren Bereichs optimierte Reaktor konnte den Ansprüchen aerober Mikroorganismen ebenfalls nicht genügen. Daher wurden Hohlfaserreaktoren entwickelt, die durch verschiedene Strategien und Gasarten begast werden können [37]. Dabei wurde die Eignung der verschiedenen Strategien durch Messung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten k_{LA} und der Sauerstoffeintragsrate (OTR) bewertet.

5.1. Aufbau von Hohlfaserreaktoren mit verschiedenen Sauerstoffmembranen

Für die Optimierung der Sauerstoffversorgung im MHFR-System kommen prinzipiell verschiedene Begasungssysteme in Betracht. Eine direkte Begasung kommt jedoch nicht in Frage, da die eingebrachten Luftblasen sich im Reaktorraum sammeln würden und ein störungsfreier Betrieb des Reaktorsystems nicht möglich wäre. Bei einer externen Begasung wird das Medium aus dem Reaktor abgepumpt, in einem externen Konditionierungsgefäß mit direkter Begasung oder in einem externen Membranmodul mit Sauerstoff angereichert und in den Bioreaktor zurückgeführt. Dabei wird der gesamte Reaktorinhalt während der Kultivierung mehrmals umgepumpt und dadurch ein Zellrückhaltesystem benötigt. Dies führt

jedoch zu einer unverhältnismäßigen Vergrößerung des Reaktorvolumens und ist somit für das MHFR-System ebenfalls ungeeignet.

Folgende Begasungsstrategien wurden schließlich untersucht:

- **indirekte Begasung**
- **Membranbegasung**

Bei der indirekten Begasung wird das Medium getrennt vom Reaktionsraum durch Blasenbegasung mit Sauerstoff angereichert. Die Trennung zwischen dem mit Sauerstoff angereicherten Medium und dem sauerstoffarmen Medium im Reaktionsraum erfolgt durch die Hohlfasern.

Bei der Membranbegasung erfolgt der Gaseintrag in den Reaktor diffusiv über gasdurchlässige hydrophobe Silikonschläuche oder Hohlfasermembranen. Bewährt haben sich Schläuche aus porenfreiem Silikonkautschuk oder Membranen aus Polypropylen. Eingesetzt wurden verschiedene Hohlfasern, die speziell für die Membranbegasung entwickelt wurden. Die Kenndaten der verschiedenen Hohlfasern sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Kenndaten der verschiedenen Hohlfasern zur Membranbegasung

Bezeichnung	Polymer	Innerer / äußerer Durchmesser
Accurel	Polypropylen	1800 / 2700
Toyobo	Polyvinylidifluorid	680 / 1240

Die Accurel-Membran besteht aus Polypropylen (PP). Der innere Durchmesser beträgt 1800 μm , der äußere 2700 μm . Um den Einbau von solchen Membranen in den Reaktor mit relativ großen Durchmessern ohne großen Aufwand zu realisieren, wurde eine einzelne Membran spiralförmig befestigt. Dadurch sollte außerdem die Durchmischung im Reaktor kaum beeinträchtigt werden. Aufgrund des begrenzten Volumens ließ sich die Membran nur einmal aufwickeln (siehe Abb. 19 B). Die Gesamtlänge der Membran betrug 22 cm, was einer äußeren Austauschfläche von 18,7 cm^2 entspricht. Dieses Reaktormodul konnte direkt für $k_L a$ -Bestimmungen verwendet werden. Für die vorgesehene Kultivierung wurde das bereits beschriebene Reaktormodul mit 43 PES-Hohlfasern ausgestattet (siehe Abb. 19 A).

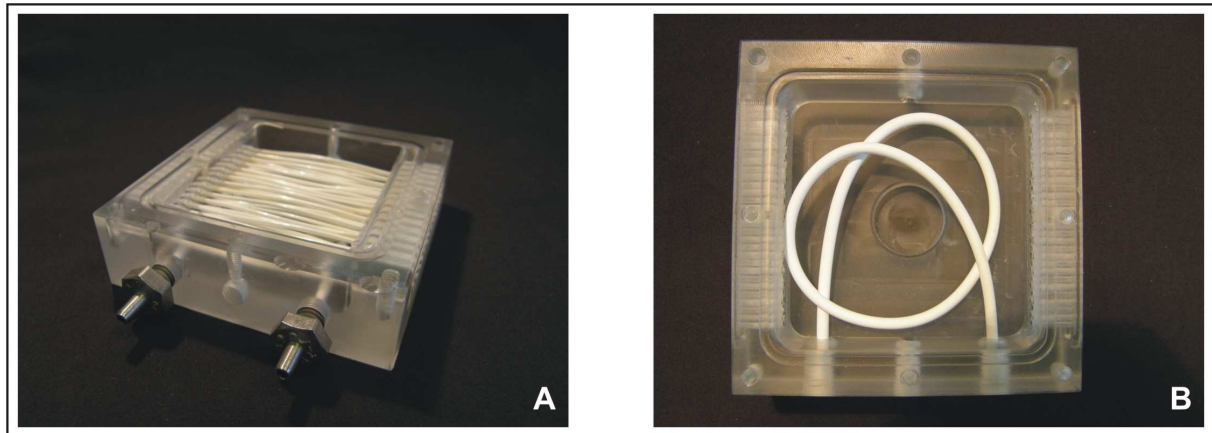


Abb. 19: A: Reaktor mit einer einzelnen Accurel-Membran und mit 43 PES-Fasern für die Kultivierung.
 B: Reaktor mit einer einzelnen Accurel-Membran; Länge: 22 cm; äußere Fläche; 18,7 cm².

Die Toyobo-Membran besteht aus Polyvinylidendifluorid (PVDF). Der innere Durchmesser beträgt 680 μm , der äußere 1240 μm . Der Aufbau des Reaktors konnte nicht durch eine spiralförmig eingelegte Membran realisiert werden, da der Gaseingangsdruck für die deutlich dünnere Membran zu groß war. Doch die Toyobo-Membran und die PES-Faser besitzen nahezu den selben Durchmesser, folglich konnte dadurch ein Reaktormodul mit 43 eingebauten Toyobo-Fasern verwirklicht und für k_{La} -Bestimmungen verwendet werden. Die Fixierung mit Silikon erfolgte wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Um die kontinuierliche Substratversorgung bei der vorgesehenen Kultivierung zu ermöglichen, wurde ein weiteres Reaktormodul gebaut, das sowohl 43 Toyobo-Fasern zur Sauerstoffversorgung als auch 43 PES-Fasern für die Substratdosierung enthält. Die daraus resultierende Volumenzunahme betrug 33 %. Dieser modifizierte Hohlfasereaktor ist in Abbildung 20 zu erkennen. Die technischen Zeichnungen zu dem neu entwickelten Reaktor sowie eine Explosionszeichnung befinden sich im Anhang Abschnitt C.

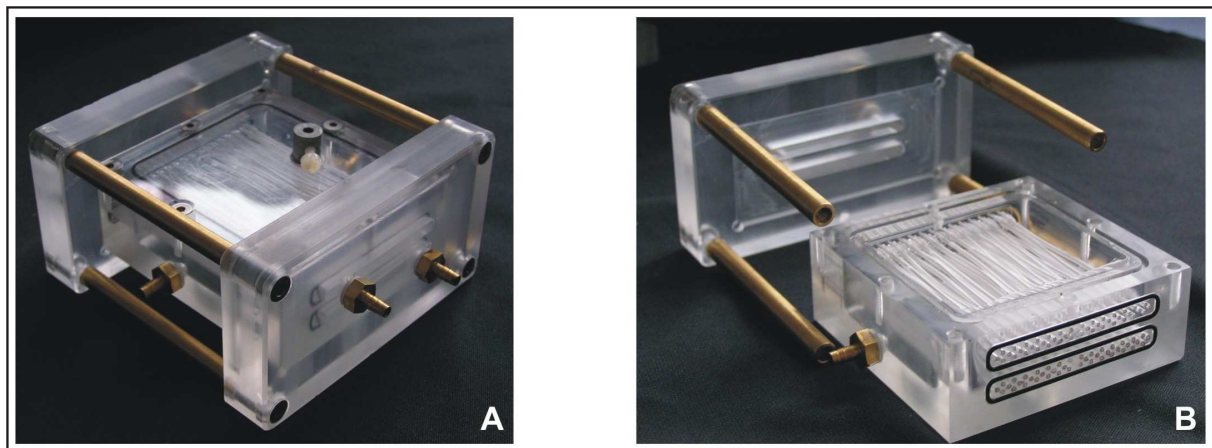


Abb. 20: A: Reaktormodul mit 43 Toyobo-Membranen (äußere Fläche; 75,5 cm²) und 43 PES Fasern.
 B: Hohlfasereaktor mit 43 Toyobo-Membranen und 43 PES-Fasern auseinandergelöst.

Die Detektion der Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung wurde durch die in Abbildung 21 B dargestellten Planar Oxygen Sensor spots der Firma PreSens, Regensburg realisiert. Der Sensor spot wurde unter die Deckplatte des Reaktors geklebt und die Detektion erfolgte über eine Glasfaser an der Oberseite der Deckplatte. Für den Anschluss der Glasfaser an die Deckplatte wurde eine Aluminiumtülle mit Feststellschraube gefertigt (siehe Abb. 21 A). Das Messprinzip beruht darauf, dass Sauerstoff die Fluoreszenz einiger im Silikon eingebetteten Fluorophore wie z.B. Ruthenium(II)-[tris(4,7-diphenyl-1,10-phenantrolin)-dichlorid] quencht. Nähere Informationen zum Messprinzip, sowie zur Kalibration des Sensor spots sind im Anhang B.6. dargestellt.

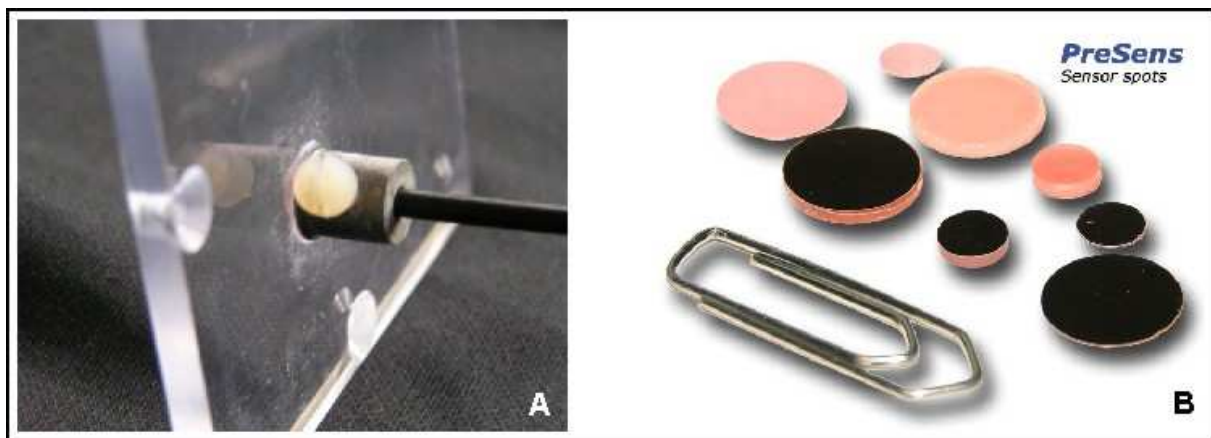


Abb. 21: A: Mikro-Hohlfaserreaktor-Deckplatte mit Aluminiumtülle und angeschlossener Glasfaser.
B: Planar Oxygen Sensor spots der Firma PreSens, Regensburg.

5.2. Bewertung des Sauerstoffeintrags durch Messung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten ($k_L a$)

5.2.1. Versuchsaufbau bei indirekter Begasung

Um die Effizienz des Sauerstofftransports bei indirekter Begasung zu bewerten, wurde der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient $k_L a$ durch die dynamische Sulfit-Methode bestimmt. Die dynamische Sulfitmethode bedient sich der katalysierten Sulfitoxidation zum Entfernen des in der Flüssigphase gelösten Sauerstoffs. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 22 dargestellt.

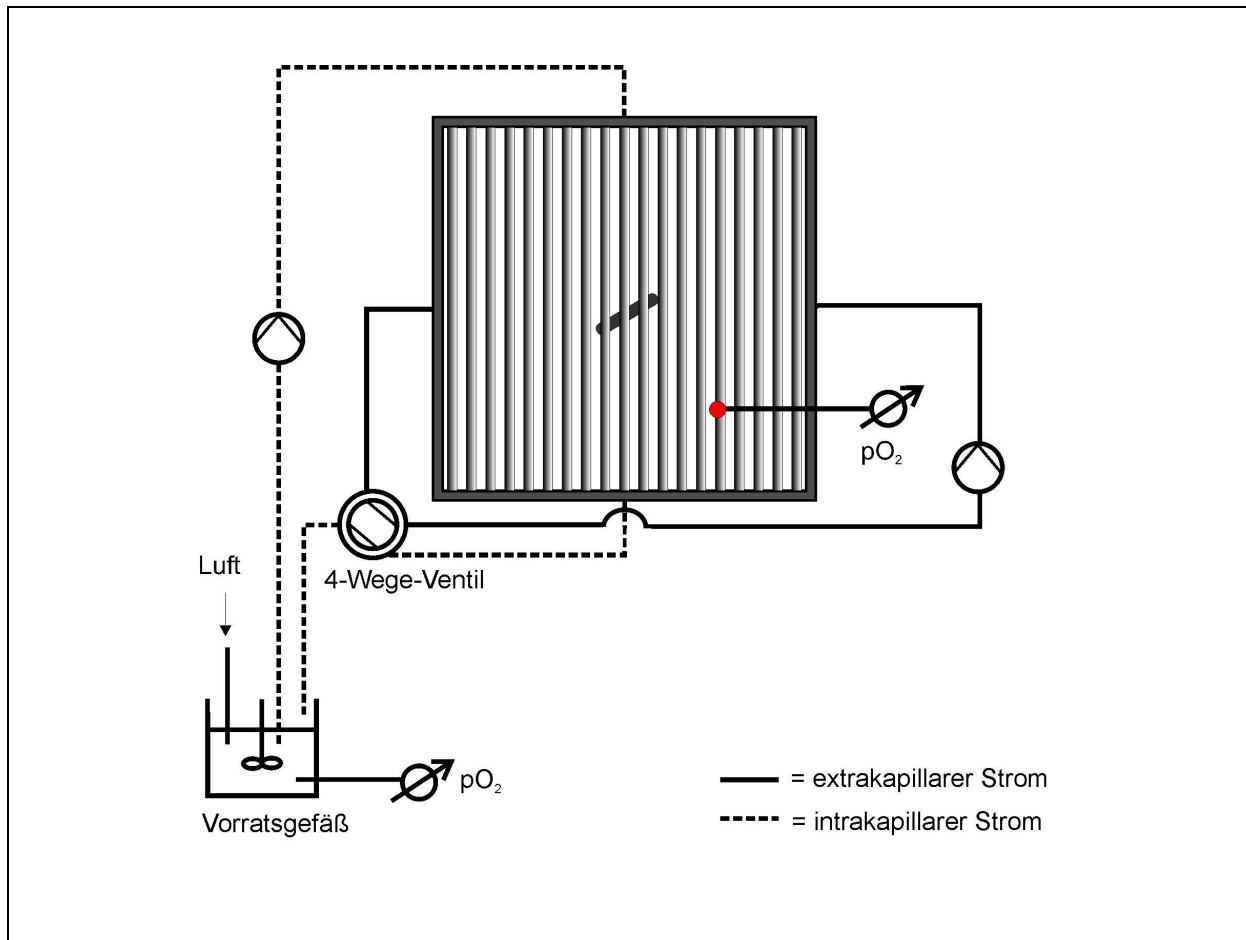


Abb. 22: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus bei der $k_L a$ -Wert-Bestimmung in einem indirekt begasteten Hohlfaserreaktor. Temperatur: 30°C; Gasvolumenstrom: 2,5 L/min; Geschwindigkeit Pumpe 1 und 2: 9,3 mL/min; Rührgeschwindigkeit im Reaktor: 600 rpm; Rührgeschwindigkeit im Vorratsgefäß: 600 rpm; Anzahl an PES-Fasern: 43.

Hier wurde das Model-Medium, eine 5 g/L Na_2SO_3 -Lösung in 12 mM KPP, $2 \cdot 10^{-5}$ M $CoSO_4$, pH 8,0, in einem vom Reaktionsraum getrennten Vorratsgefäß durch Blasenbegasung mit Sauerstoff angereichert und durch Hohlfasern aus Polyethersulfon gepumpt. Der Reaktor wurde mit derselben Lösung befüllt. Damit eine Sauerstoffsättigung des Mediums am Eingang und Ausgang der Hohlfasern erreicht wird, wurde das Medium sehr stark belüftet (2,5 L/min) und bei maximaler Pumpenleistung (9,3 mL/min) durch die Kapillaren gepumpt. Die zeitliche Änderung der Sauerstoffsättigung wurde im Vorratsgefäß durch eine pO_2 -Elektrode sowie im extrakapillaren Bereich durch einen Sensor spot erfasst. Da das Sulfit im Vorratsgefäß viel schneller oxidiert wird als im extrakapillaren Bereich, könnten Diffusionsprozesse zwischen intra- und extrakapillaren Bereich auftreten und die Messung stören. Aus diesem Grund wurde der $k_L a$ -Wert nicht aus der Sauerstoffeintragsrate (OTR) bzw. der Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Begasung und dem Anstieg des gelösten Sauerstoffs ermittelt, sondern grafisch aus dem Anstieg des gelösten Sauerstoffs nach

vollständiger Oxidation des Sulfits. Durch ein 4-Wege-Ventil konnte der im extrakapillaren Raum langsamere Sulfitverbrauch beschleunigt werden. Die Rückführung des extrakapillaren Mediums wurde berücksichtigt, da diese für die online Messung der optischen Dichte und für regelmäßige Probenahmen während der Kultivierung vorgesehen ist.

5.2.2. Versuchsaufbau bei Membranbegasung

Um die Effizienz des Sauerstofftransports bei der Membranbegasung zu bewerten, wurde der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient $k_L a$ ebenfalls durch die dynamische Sulfit-Methode bestimmt. Dafür wurden ausschließlich Reaktormodule mit Accurel- bzw. Toyobo-Membranen ohne PES-Fasern verwendet. Als Modellmedium galt dieselbe Sulfit-Lösung und Katalysator-Konzentration wie in Abschnitt 5.2.1. Die zeitliche Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in den jeweiligen Modulen wurde durch einen Sensor spot erfasst. Der $k_L a$ -Wert wurde grafisch aus dem Anstieg der Luftsättigung durch Anpassung einer theoretischen Funktion erster Ordnung mit der Software OriginPro[®] 7.5 ermittelt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 23 dargestellt.

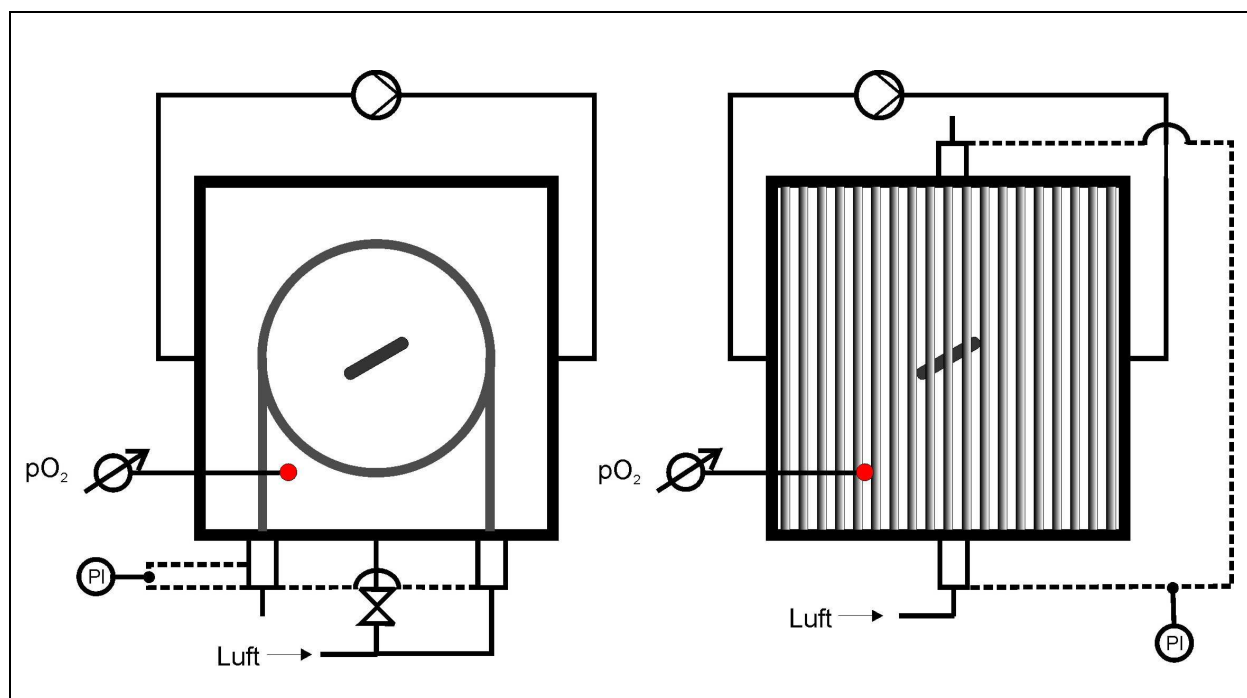


Abb. 23: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus bei der $k_L a$ -Wert-Bestimmung in membranbegasenen Reaktoren. Temperatur: 30°C; Flussrate der Pumpe: 9,3 mL/min; Rührgeschwindigkeit im Reaktor: 600 rpm; PI (Pressure Indicator): Manometer; Membranart: Accurel (links); Toyobo (rechts).

5.2.3. Bewertung des ermittelten volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten ($k_L a$)

In Abbildung 24 ist die Luftsättigung im extrakapillaren Bereich nach vollständiger Oxidation des Sulfits gegen die Zeit für die unterschiedlichen Begasungsstrategien dargestellt. 100 % Luftsättigung für die indirekte Begasung wurde nach 5,8 h erreicht. Eine gute Anpassung wurde durch eine Funktion erster Ordnung mit einem Regressionskoeffizient von 0,9925 erhalten. Durch die Anpassung der Funktion erster Ordnung (siehe Gl. 5.1) konnte der $k_L a$ Wert ermittelt werden:

$$f_{1,0}(t) = O_{2,1}^* \cdot (1 - e^{-k_L a \cdot (t-t_0)}) \quad (5.1)$$

Durch die indirekte Begasung wurde ein $k_L a$ -Wert von $1,16 \text{ h}^{-1}$ ermittelt.

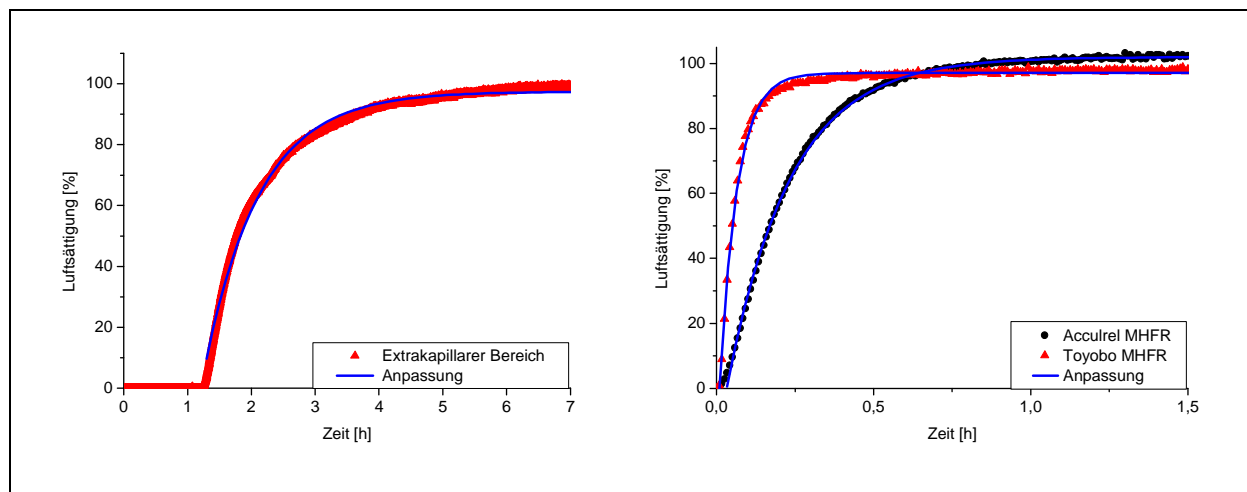


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der Luftsättigung. Links: Verlauf im extrakapillaren Bereich bei indirekter Begasung. Rechts: Reaktormodul mit Accurel-Membran und Reaktormodul mit Toyobo-Membranen. Anpassung: Anzahl der Iterationen bei der theoretischen Anpassung: 100; Software: OriginPro® 7.5.

Durch die Begasung mit Toyobo-Membranen, wurde die maximale Sättigung nach 0,25 h erhalten und bei der Accurel-Membran erst nach 1 h (siehe Abb. 24). Wie bei der indirekten Begasung wurde die Anpassung mit Hilfe einer theoretischen Funktion erster Ordnung vorgenommen. Die Regressionskoeffizienten liegen bei 0,9929 für Toyobo-Membranen und 0,9989 für die Accurel-Membranen. Bei einem Gasvolumenstrom von $0,6 \text{ L/h}$ konnten $k_L a$ -Werte von $17,15 \text{ h}^{-1}$ und $4,85 \text{ h}^{-1}$ mit den Toyobo-Membranen bzw. mit einer Accurel-

Membran erzielt werden. Dabei ist der um den Faktor 3,5 geringere k_{La} -Wert bei Accurel-Membranen durch die um den Faktor 4 größere Faseroberfläche der Toyobo-Fasern zu erklären. Das bedeutet, dass der Sauerstoffübergang durch die Accurel-Membran höher ist als bei den Toyobo-Membranen, doch aufgrund der Reaktorgeometrie ist der Einbau von mehreren Accurel-Membranen nicht möglich.

Bei der Membranbegasung wurden für jeden MHFR verschiedene Gasvolumenströme getestet, um eine optimale Sauerstoffversorgung bei minimalem Volumenstrom zu erreichen. Daher wurde der Einfluss der verschiedenen Gasvolumenströme auf den k_{La} -Wert überprüft. Bereits bei dem niedrigsten getesteten Gasvolumenstrom (0,6 L/h) wurde ein maximaler k_{La} -Wert für den MHFR mit Toyobo-Membranen erhalten. Die Erhöhung des Gasvolumenstroms über 6 L/h wurde nicht durchgeführt. Volumenströme unter 0,6 L/h konnten mit dem zur Verfügung stehenden Gasdurchflussmesser ohne Schwankungen nicht konstant gehalten werden. Bei dem MHFR mit der Accurel-Membran wurde der maximale k_{La} -Wert von $5,19 \text{ h}^{-1}$ erst bei einem Gasvolumenstrom von 3 L/h erhalten. Bei einem niedrigeren Volumenstrom (0,6 L/h) hatte die Accurel-Membran mit 93 % fast ihre maximale Sauerstoff-Transferleistung erreicht. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Einfluss verschiedener Gasvolumenströme auf den k_{La} -Wert.

Gasvolumenstrom [L/h]	k_{La}-Wert Accurel MHFR [h^{-1}]	k_{La}-Wert Toyobo MHFR [h^{-1}]
0,6	4,85	17,15
3	5,19	16,27
6	5,18	17,04

Für eine optimale Sauerstoffversorgung wurde in allen folgenden Untersuchungen ein Gasvolumenstrom von 0,6 L/h eingesetzt.

5.2.4. Membranbegasung mit reinem Sauerstoff

Neben der Erhöhung des k_{La} -Werts stellt die Erhöhung der maximalen Sauerstoffsättigungskonzentration eine Möglichkeit dar, den Sauerstofftransfer im Reaktor zu verbessern. Es wurde bereits erwähnt, dass der einzustellende Gasvolumenstrom von 0,6 L/h bei einer Membranbegasung relativ gering ist. Aus diesem Grund ist der Einsatz von reinem

Sauerstoff zur Begasung der Reaktormodule ökonomisch denkbar. Da sich theoretisch bei dem Einsatz von reinem Sauerstoff nur die maximale Sättigungskonzentration und nicht der $k_L a$ -Wert ändert, kann die daraus resultierende Erhöhung des Sauerstofftransfers nur durch Messung der Sauerstoffeintragsrate (OTR) erfasst werden. Die OTR lässt sich mit Gleichung 5.2 aus der Zeitdifferenz Δt zwischen dem Beginn der Begasung und dem Anstieg des gelösten Sauerstoffs ermitteln.

$$\text{OTR} [\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{C_{\text{Na}_2\text{SO}_3} [\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] \cdot M_{\text{O}_2} [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]}{2 \cdot M_{\text{Na}_2\text{SO}_3} [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot \Delta t [\text{h}]} \quad (5.2)$$

$C_{\text{Na}_2\text{SO}_3}$: Konzentration der Natriumsulfit-Lösung

M_{O_2} : Molare Masse von Sauerstoff

$M_{\text{Na}_2\text{SO}_3}$: Molare Masse von Natriumsulfit

Um die Sauerstoffeintragsraten für die verschiedenen Reaktoren zu berechnen wurde die dynamische Sulfitmethode ohne den Einsatz von Cobaltsulfat als Katalysator durchgeführt, da eine zu hoch gewählte Katalysatorkonzentrationen zu einer chemischen Reaktionsbeschleunigung führen kann. Dadurch bliebe der Sauerstoffverbrauch nicht auf die Kernphase der Lösung begrenzt, sondern fände auch im Grenzfilm statt und würde zu einer höheren Sauerstoffeintragsrate führen. Außerdem war die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Cobalt schnell genug, um den eingeführten Sauerstoff vollständig zu verbrauchen. Die ermittelten Sauerstoffeintragsraten, sowie die Erhöhung der OTR in % sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Dabei ist eine deutliche Erhöhung der OTR durch den Einsatz von reinem Sauerstoff zu beobachten.

Tab. 8: Zusammenfassung der berechneten Sauerstoffeintragsraten (OTR) für beide Gasarten, Luft und reiner Sauerstoff, und beide Membranarten Toyobo und Accurel.

Reaktor	Sauerstoffeintragsrate [mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]		Erhöhung der OTR [%]
	Luft	O ₂	
Accurel	79	268	339
Toyobo	395	1.456	369

Theoretisch unterscheiden sich die maximalen Sättigungskonzentrationen mit Luft und reinem Sauerstoff und die entsprechenden Sauerstoffeintragsraten um einen Faktor von 5.

Durch den Einsatz von reinem Sauerstoff anstatt von Luft wurde die OTR um einen Faktor von 3,4 in dem Reaktormodul mit Accurel- bzw. 3,7 in dem Modul mit Toyobo-Membranen erhöht. Es ist zu beobachten, dass das MHFR-Modul mit Toyobo-Membranen insgesamt die besten Ergebnisse liefert. Im Folgenden werden Kultivierungen mit *Escherichia coli* unter den verschiedenen Begasungsstrategien durchgeführt, welche in Bezug auf Wachstum und Produktformation bewertet werden sollen.

5.3. Kultivierung von *Escherichia coli* unter den verschiedenen Begasungsstrategien

Anschließend an die Untersuchungen zur Sauerstoffversorgung in den verschiedenen neu entwickelten Reaktoren wurde die Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, durchgeführt. Die Membranbegasung wurde mit einem Gasvolumenstrom von 0,6 L/min durchgeführt und bei indirekter Begasung wurde ein Gasvolumenstrom von 2,5 L/min angelegt. Während der Kultivierung wurden die optische Dichte und die Luft- oder Sauerstoffsättigung im Medium über 12 h beobachtet.

Abbildung 25 zeigt die aufgenommenen Daten zur optische Dichte und zur Luft- oder Sauerstoffsättigung.

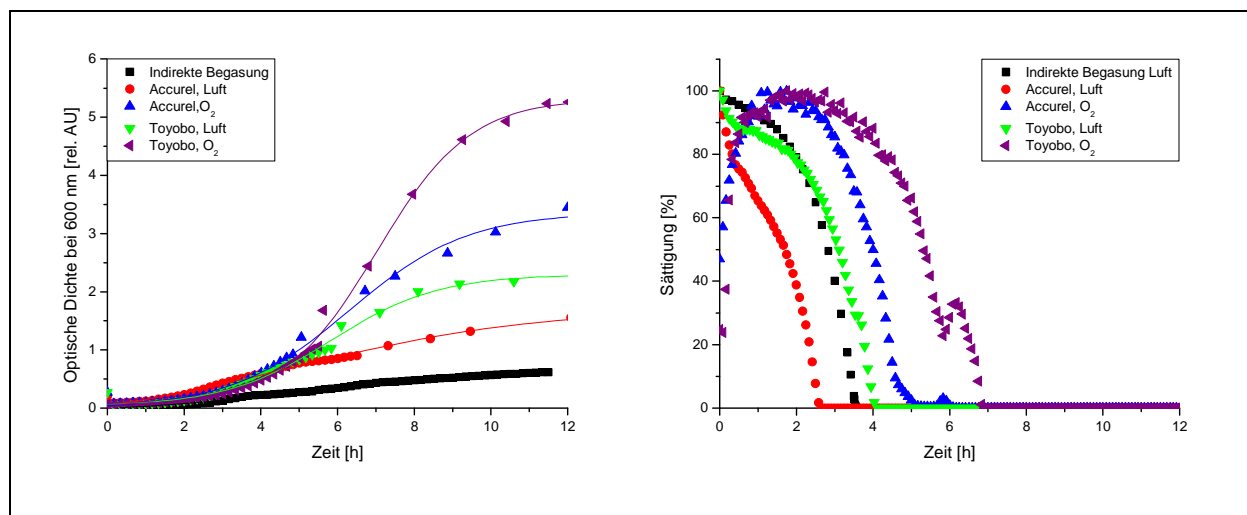


Abb. 25: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im MHFR unter verschiedenen Begasungsstrategien. Links: Verlauf der optischen Dichte. Rechts: Darstellung der Sättigung [%].

Es sind deutliche Unterschiede in Bezug auf Wachstum und Sauerstoffversorgung zu beobachten. Mit einer optischen Dichte von 0,6 rel. AU nach 12 h liefert der Reaktor mit indirekter Begasung die schlechtesten Ergebnisse. Eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte konnte durch den Einsatz von Membranbegasung sichergestellt werden. Dabei ist zu beobachten, dass der Reaktor mit Toyobo-Membranen mit einer optischen Dichte von 2,3 rel. AU deutlich höheres Wachstum aufweist, als der mit Accurel-Membranen (OD = 1,6).

Außerdem ist durch den Einsatz von reinem Sauerstoff wiederum eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte zu erkennen. Auch mit reinem Sauerstoff weist wieder der Reaktor mit Toyobo-Membranen die höhere optische Dichte auf. Mit einer optischen Dichte von 5,3 rel. AU liefert der Reaktor mit Toyobo-Membranen und bei Begasung mit reinem Sauerstoff die besten Ergebnisse. Im Vergleich zur Kultivierung im indirekt begasten Hohlfaser konnte die optische Dichte um den Faktor 8,8 erhöht werden.

Die Luft- oder Sauerstoffsättigung während der Kultivierung spiegelt die Ergebnisse für die optische Dichte wider. Bei allen Reaktortypen sinkt die Luft- oder Sauerstoffsättigung während der exponentiellen Wachstumsphase von anfangs 100 % auf 0 % ab. Dabei ist zu beobachten, dass beim Reaktor mit Toyobo-Membranen und der Begasung mit reinem Sauerstoff die Sauerstoffsättigung erst nach 7 h 0 % erreicht. Lediglich bei der indirekten Begasung weichen die Ergebnisse für die Luftsättigung von den beim Zellwachstum beobachteten Ergebnissen ab. Die Ergebnisse für die Luftsättigung sind deutlich besser, als die für den mit der Accurel-Membran begasten Reaktor. Vermutlich ist dies auf einen Messfehler bzw. eine fehlerhafte Kalibration des Planar Oxygen Sensor spot zurückzuführen. Abschließend kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Kultivierung im mit Toyobo-Membranen und in dem mit reinem Sauerstoff begasten Reaktor im Vergleich zu den anderen eingesetzten Reaktoren und Begasungsstrategien die besten Ergebnisse liefert.

5.4. Reaktionstechnische Charakterisierung

Im Anschluss an die Optimierung der Sauerstoffversorgung im MHFR und der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His wurde die bereits in Abschnitt 4.2 durchgeführte reaktionstechnische Charakterisierung erneut beurteilt. Die Integration der Sauerstofffasern und die dadurch resultierende Vergrößerung des extrakapillaren Bereichs auf 35 mL könnten zu einer Veränderung des Strömungsverhaltens führen. Daher wurde die Verweilzeitmessung

unter Rührerdrehzahlen von 0 - 700 rpm getestet und wie in Abschnitt 4.2. beschrieben modelliert. Die Modellierung mit dem in Abschnitt 3.2.2. erstellten doppelten Kaskaden Modell ergab wie im Reaktor ohne Toyobo-Fasern ein Verhältnis der Kessel in den einzelnen Kaskaden von m:n=1:11. Ein optimales Verhältnis von Kaskadenvolumen zu Volumenstrom in den einzelnen Kaskaden konnte bei 500 rpm ermittelt werden. Tabelle 9 zeigt die errechneten Daten im Vergleich zu denen aus Abschnitt 4.2. im MHFR ohne Toyobo-Fasern.

Tab. 9: Reaktionstechnische Daten für ein Reaktormodul mit 43 UltraPES-Fasern bei 300 rpm und ein Reaktormodul mit 43 UltraPES-Fasern und 43 Toyobo-Fasern bei 500 rpm, Flussrate 5 mL/min.

	MHFR mit 43 UltraPES-Fasern	MHFR mit 43 UltraPES-Fasern und 43 Toyobo-Fasern
Reaktorvolumen [mL]	30,13	35,36
Volumen Kaskade m [mL]	27,02	35,11
Volumen Kaskade n [mL]	3,12	0,25
Anteil Kaskade m [%]	90	99
Anteil des Volmenstroms in Kaskade m [%]	77	97
Anteil des Volmenstroms in Kaskade n [%]	23	3
Summe der quadratischen Abweichung [rel. U]	1,11E-03	4,61E-04
τ [min]	5,08	9,26

Es konnte eine gute Anpassung des Modells an die Messdaten realisiert werden. Die Summe der quadratischen Abweichung ist mit 4,61E-04 rel. U sogar noch geringer als im MHFR ohne Toyobo-Fasern. Im Vergleich der Volumina der einzelnen Kaskaden zeigt sich, dass im MHFR mit Toyobo-Fasern mit 99 % ein deutlich höherer Anteil des Volumens in Kaskade m vorliegt. Außerdem ist der Volumenstrom in Kaskade m um 20 % höher als im Reaktor ohne Toyobo-Fasern. Optimal wäre eine gleichmäßige Verteilung der Volumina und Volumenströme auf die einzelnen Kaskaden. Doch da der Volumenstrom in Kaskade n sehr gering ist, ist ein geringes Volumen in dieser Kaskade von Vorteil. Somit ist das Volumen, das Strömungsdefizite aufweist, geringer. Insgesamt bedeutet dies eine Verbesserung des Strömungsverhaltens im Reaktor mit Sauerstofffasern. Die Veränderungen des MHFR umfassen die Integration von 43 Toyobo-Fasern und somit die Bildung von zwei Faserlagen, wodurch das Medium im extrakapillaren Raum eventuell besser zirkulieren kann. Durch die bessere Verteilung der Tracermoleküle im MHFR erhöht sich die mittlere Verweilzeit von

5,08 min auf 9,26 min. Aufgrund der errechneten Daten können die bisherigen Bedingungen für die Kultivierung beibehalten werden.

5.5. Zusammenfassung

Da die Kultivierung in Kapitel 4 nicht erfolgreich verlief, mussten weitere Optimierungen am MHFR vorgenommen werden. Das Strömungsverhalten wurde bereits optimiert und die Nährstoffversorgung als limitierender Faktor ist aufgrund des extrakapillar vorliegenden Mediums auszuschließen. Ein weiterer entscheidender Aspekt bei der Optimierung von Bioreaktoren ist die Realisierung eines ausreichenden Sauerstoffeintrags.

Verschiedene Methoden wurden für die Verbesserung des Sauerstoffeintrags getestet. Sowohl die indirekte Begasung, als auch die Begasung mit speziellen Membranen wurden erprobt. Eine direkte Begasung im MHFR ist nicht möglich, da durch die Reaktorgeometrie Gasblasen im Reaktor zurückbleiben würden und somit ein konstantes Volumen und der Einsatz des Reaktordeckels für analytische Zwecke nicht gewährleistet werden könnte. Bei der indirekten Begasung über das Feed-Medium erwies sich der Sauerstoffeintrag als zu gering. Durch den Einsatz von Membranen für die Sauerstoffversorgung konnte der Sauerstoffeintrag im Vergleich zur indirekten Begasung um den Faktor 15 erhöht werden. Besonders gut eigneten sich Toyobo-Hohlfasern, die optimal in den MHFR integriert werden konnten und die höchsten $k_L a$ -Werte lieferten. Zusätzlich konnte die Sauerstoffversorgung durch den Einsatz von reinem Sauerstoff zur Begasung nochmals um mehr als das Dreifache gesteigert werden. Der Einsatz von reinem Sauerstoff ist allerdings nur durch den geringen Gasvolumenstrom von 0,6 L/h ökonomisch zu vertreten.

Die Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His zeigt ebenfalls eine deutliche Verbesserung in Bezug auf das Zellwachstum. Die maximal erzielte optische Dichte bei indirekter Begasung lag bei 0,6 rel. AU. Durch die Begasung mit Toyobo-Hohlfasern konnte die maximale optische Dichte auf 2,3 rel. AU erhöht werden. Der Einsatz von reinem Sauerstoff für die Begasung ergab wiederum eine Erhöhung auf 5,3 rel. AU. Dies entspricht einer Erhöhung der optischen Dichte um den Faktor 9. Der Einsatz der Accurel-Hohlfasern für die Begasung lieferte deutlich niedrigere Werte in Bezug auf das Zellwachstum. Dies ist jedoch auf die geringere Faseroberfläche zurückzuführen. Denn aufgrund des großen Durchmessers von 2,7 mm konnte nur eine Hohlfaser schlaufenförmig in den Reaktor integriert werden. Folglich wird der Einsatz des mit Toyobo-Hohlfasern ausgestatteten MHFR für weitere

Versuche favorisiert. Die Optimierung der Sauerstoffversorgung erwies sich somit als entscheidender Faktor für die Kultivierung der aeroben Mikroorganismen.

Für den optimierten Reaktor wurde auch das Strömungsverhalten bewertet. Durch eine weitere reaktionstechnische Charakterisierung konnte trotz der Volumenzunahme von 15 % eine Verbesserung der Strömungscharakteristika erreicht werden. Zusätzlich konnten die bisher als optimal ermittelten Bedingungen (siehe Kapitel 4.2.) für Flussrate und Rührerdrehzahl bestätigt werden.

Insgesamt konnte eine erfolgreiche Optimierung des MHFR für die Kultivierung von Mikroorganismen verwirklicht werden. Anschließend an diese Optimierung kann der parallele Einsatz mehrerer MHFR als Screeningsystem realisiert werden.

Kapitel 6

Entwicklung eines Screeningsystems für Mikro-Hohlfaserreaktoren

Nach der erfolgreichen Optimierung des Mikro-Hohlfaserreaktorsystems für die Kultivierung wurde ein Screeningsystem entwickelt, durch das der parallele Betrieb von mehreren Reaktoren ermöglicht werden soll. Für den Aufbau des Screeningsystems mussten weitere Modifikationen des Reaktors durchgeführt werden, um besonders in Bezug auf die Probenahme einen minimalen apparativen Aufwand zu gewährleisten. Des Weiteren wurden zusätzlich zu *E. coli* JM109 pGFPx6His verschiedene Testorganismen für die Kultivierung ausgewählt, die auch für eine integrierte Produktaufarbeitung (ISPR) eingesetzt werden können.

6.1. Aufbau des MHFR-Screeningsystems

Das Mikro-Hohlfaserreaktor-Screeningsystem wurde für vier Reaktoren konzipiert. Die Reaktoren wurden flächig angeordnet, da durch eine Stapelung die Reaktordeckplatte zur Integration von Sensoren nicht mehr genutzt werden könnte (siehe Abb. 26 B). Um den apparativen Aufwand zu minimieren wurde auf den extrakapillaren Kreislauf verzichtet. Dieser ist nicht mehr notwendig, da die Verteilung der Zellen im Reaktor auch über das Magnetührstäbchen gewährleistet werden kann. Ohne den extrakapillaren Kreislauf kann jedoch auch die Probenahme für die Bestimmung der Zelldichte und die Produktanalytik nicht mehr realisiert werden. Daher wurde der Reaktor erneut modifiziert und zur offline Probenahme ein Septum in den Deckel der Mikro-Hohlfaserreaktoren integriert. Das in Abbildung

26 A dargestellte Septum wurde mit einem Epoxydharz mit der Deckplatte verklebt. Damit die Temperierung des Reaktors weiter im Wasserbad vorgenommen werden kann, wurde ein Aufsatz von 5 cm auf das Septum aufgeschraubt. Durch diesen Aufsatz kann mit einer Standard-Einwegspritze (1 mL) und einer Kanüle eine Probe aus dem extracapillaren Raum entnommen werden. Die Probenahme erfolgt dann aufgrund der Reaktorgeometrie mittig über den Hohlfasern.

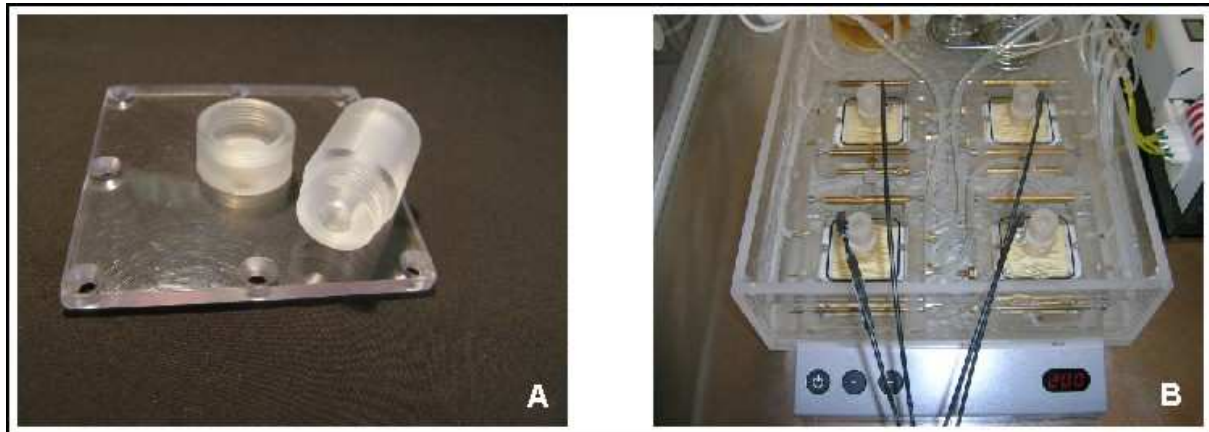


Abb. 26: A: Mikro-Hohlfaserreaktor-Deckplatte mit integriertem Septum zu Probenahme. B: Screeningssystem mit vier parallelen Mikro-Hohlfaserreaktoren.

Für dieses Screeningsystem war der Einsatz von einfachen Magnetrührern aufgrund des engen flächigen Aufbaus nicht möglich. Daher wurde ein Mehrstellen-Magnetrührer eingesetzt. Dieser Mehrstellen-Magnetrührer wurde auch als Basis für den individuell an den Magnetrührer angepassten Thermostaten genutzt. In diesem Thermostat wurden Aussparungen für die vier einzusetzenden Mikro-Hohlfaserreaktoren integriert, um eine Position der Reaktoren mittig über der Rührstelle zu gewährleisten. Der verbleibende Platz im Thermostat reicht für die Temperierung des Feed-Mediums aus. Hier kann eine Schottflasche von bis zu 1 L für alle Reaktoren temperiert werden, oder auch vier 100 mL Schottflaschen für individuelle Feedprofile oder die Produktanreicherung. Die Analytik der Sauerstoffsättigung für alle vier Reaktoren wird durch ein Vierkanal Sauerstoffmessgerät realisiert.

6.2. Kultivierung von verschiedenen mikrobiellen Testorganismen

Die Etablierung des neuen MHFR-Screeningsystems im Bereich Zellkultivierung soll anhand der Kultivierung einer Auswahl verschiedener Produktionsorganismen durchgeführt und der

klassischen batch-Kultivierung im Schüttelkolben gegenübergestellt werden. Die Auswahl der verwendeten Mikroorganismen erfolgte anhand der spezifisch produzierten Produkte, die für verschiedene Untersuchungen als ideale Modellsysteme vorlagen. Zusätzlich zu dem schon in den vorherigen Versuchen genutzten *E. coli* JM109 pGFPx6His wurden drei weitere mikrobielle Testorganismen ausgewählt.

Ein weiterer *Escherichia coli* Stamm wurde eingesetzt, um die Enzymproduktion im MHFR zu untersuchen. Der Stamm *E. coli* JM109 pET-bgl-his produziert intrazellulär das Enzym β -Glucanase. Für das angestrebte integrierte Downstreaming ist jedoch der Einsatz von Mikroorganismen, die das Produkt sekretieren, von Vorteil. Daher wurde ein *Corynebacterium glutamicum* Stamm ausgewählt, der Serin produziert und sekretiert. Die genaue Stammbezeichnung lautet ATCC13032 Δ sdaA::pK18mob-glyA' pEC-T18mob2-serA^{fb}rCB. Des Weiteren wurde *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His eingesetzt, der das Enzym Levansucrase sekretiert.

Die Kultivierung im MHFR-Screeningsystem wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die in den vorangehenden Kapiteln optimierten Reaktoreinstellungen verwendet. Dies entspricht einer Rührerdrehzahl von 500 rpm und einem Gasvolumenstrom von 0,6 L/h bei Zufuhr von reinem Sauerstoff. Der vierte Reaktor wurde ohne Begasung eingesetzt, um nochmals die Bedeutung der Sauerstofflimitierung im MHFR zu verdeutlichen. Parallel wurde eine Kultivierung im Schüttelkolben durchgeführt. Diese Kultivierung wurde im 500 mL Schüttelkolben durchgeführt. Um mit den Kultivierungen im MHFR vergleichbare Werte zu erhalten wurde das Volumen der Schüttelkolbenkultivierung ebenfalls auf 35 mL festgelegt. Zusätzlich wurde für beide Kultivierungen dieselbe Gefrierkultur und Vorkultur verwendet, um ein unterschiedliches Anwachsen der Gefrierkultur als Fehlerquelle auszuschließen.

6.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung beider *Escherichia coli* Stämme wurde in LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin bei 30 °C durchgeführt und die Produktbildung durch IPTG induziert. Die Drehzahl für die Schüttelkolbenkultivierung wurde auf 120 rpm festgelegt. Während der Kultivierung wurde die optische Dichte offline verfolgt. Eine zusätzliche Analyse der Produktformation während der Kultivierung war hier nicht möglich, da die geringe Probenmenge von 0,1 mL, die durch das Septum entnommen wird, für diese Analysen nicht

ausreicht. Um eine Beeinflussung der Kultivierung im MHFR durch eventuell gebildete Nebenprodukte zu vermeiden, wurde die Versorgung der Zellen mit Feed-Medium im Durchfluss und nicht im Kreislauf durchgeführt. Ein geringerer Volumenstrom ist dabei notwendig, da ein hoher Verbrauch an Medium als unökonomisch zu bewerten wäre. Der Volumenstrom für das Feed-Medium wurde auf 0,5 mL/min festgelegt.

Nach Beendigung der Kultivierung werden die Zellen von ihrem Flüssigmedium durch Zentrifugation abgetrennt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte der Überstand für Versuche im Bereich Downstreaming eingesetzt werden. Während des Downstreamings wurden die Produktkonzentrationen ermittelt und die Aufreinigung mit Spin-Modulen vorgenommen. Die Aufreinigung erfolgte dabei mit Hilfe des in Abschnitt 3.6.1. dargestellten Standardprotokolls für die eingesetzten Vivapure miniprep MC Spin Columns, Sartorius AG, Göttingen. Die Bewertung der Aufreinigung erfolgt über SDS-Page.

Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His

Das Wachstum von *E. coli* JM109 pGFPx6His und die Sauerstoffversorgung im MHFR wurden über einen Zeitraum von 24 h beobachtet. Die ermittelten Daten sind in Abb. 27 dargestellt.

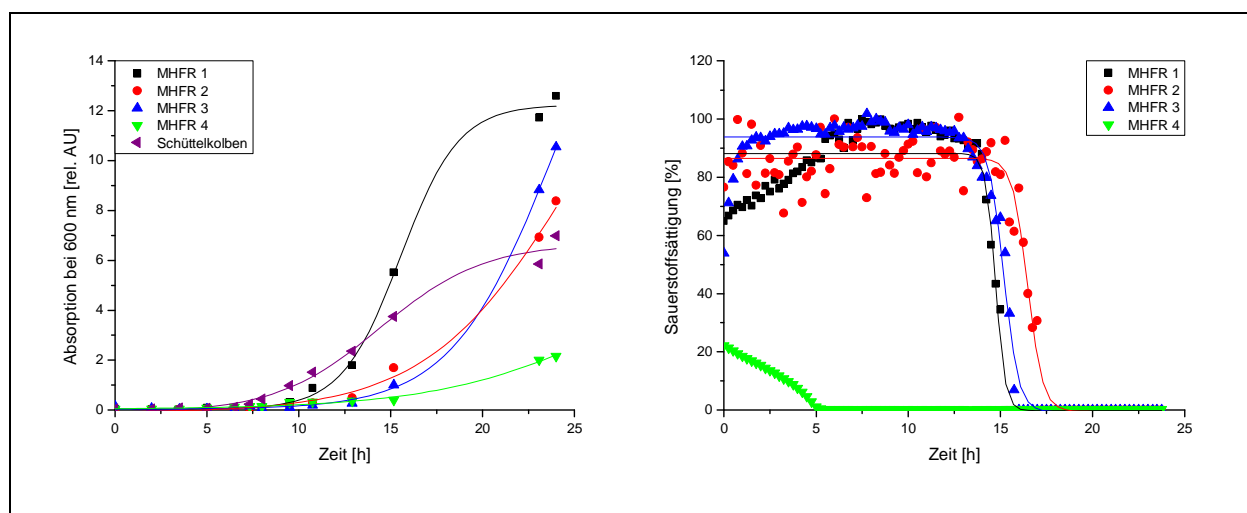


Abb. 27: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben. Links: Verlauf der optischen Dichte. Rechts: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%].

Auffallend ist die ausgeprägte lag-Phase von bis zu 15 h. Bei der Kultivierung in MHFR 4 ohne Sauerstoffversorgung ist im Vergleich zu den anderen Kultivierungen ein deutlich geringeres Wachstum von maximal 2,1 rel. AU zu beobachten. Die Ausbildung einer exponentiellen Wachstumsphase ist ebenfalls gering. Dies ist durch eine Sauerstofflimitierung zu erklären, denn die Sauerstoffsättigung liegt schon zu Beginn des Experiments durch die mangelnde Begasung bei nur 20 %. Bereits nach 5 h ist die Sauerstoffsättigung auf 0 % abgesunken. Bei den Kultivierungen mit Begasung liegt die Sauerstoffsättigung vorerst um 90 %. Das Absinken der Sauerstoffsättigung ist erst nach 15 bis 17 h zu beobachten. Die Kurven sind für alle drei MHFR sehr ähnlich, lediglich leichte Abweichungen sind zu beobachten.

Die Wachstumskurve für MHFR 1 zeigt eine lag-Phase von 10 h und daran anschließend eine ausgeprägte exponentielle Phase. Die maximal erreichte optische Dichte nach 24 h beträgt 12,6 rel. AU. Im Gegensatz zu MHFR 1 ist die exponentielle Phase von MHFR 2 und MHFR 3 um 5 h verschoben. Die maximal erreichten optischen Dichten nach 24 h liegen bei 8,4 und 10,5 rel. AU. Die Unterschiede in den Wachstumskurven spiegeln sich auch in den Graphen für die Sauerstoffsättigung wider. Durch das starke Zellwachstum in MHFR 1 sinkt die Sauerstoffsättigung zuerst auf 0 % ab. Bei MHFR 2 und 3 sinkt die Sauerstoffsättigung erst nach 17 h bzw. 16 h auf 0 % ab. MHFR 2 zeigt aufgrund des geringeren Zellwachstums die besten Werte für die Sauerstoffsättigung.

Die Kultivierung im Schüttelkolben erreicht trotz einer wesentlich geringeren lag-Phase nicht die im MHFR erreichten Werte. Die maximal erreichte optische Dichte nach 24 h liegt hier bei 7 rel. AU. Somit liefern alle drei MHFR mit Begasung nach 24 h höhere optische Dichten als der Schüttelkolben. Während der Kultivierung konnte in den drei begasteten Reaktoren die Ablagerung von Zellen im MHFR beobachtet werden. Folglich ist die Entnahme von Proben über das Septum im oberen Bereich des Reaktors eventuell nicht optimal. Eine Probenahme mittig im Reaktor ist jedoch aufgrund der Hohlfaseranordnung nicht realisierbar. Um trotzdem die im Reaktor sedimentierten Zellen zu berücksichtigen wurde die Kulturbrühe nach der Kultivierung abgepumpt und erneut die optische Dichte gemessen. Diese Werte wurden anschließend mit den Werten für die Probenahme nach 24 h über das Septum verglichen. Die ermittelten Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Zwischen der optischen Dichte im Reaktor und der optischen Dichte, die anhand der Probenahme über das Septum entnommen wurde, gibt es gravierende Unterschiede. Die Probenahme liefert deutlich geringere Werte für die optische Dichte. So wurde die optische Dichte für MHFR 2 um 35 % unterschätzt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Unterschiede in Bezug auf die

optische Dichte erst mit steigender Zellzahl immer größer werden. Somit liefern die über die Probenahme durch das Septum ermittelten Werte dennoch gute Anhaltspunkte in Bezug auf die einzelnen Phasen der zu bewertenden Wachstumskurve. Außerdem ist zu beobachten, dass die Zunahme der optischen Dichte nach dem Abpumpen der Kulturbrühe gegenläufig zu den bei den Probenahme über das Septum ermittelten Werten ist. In MHFR 2 zum Beispiel, in dem die geringste optische Dichte über die Probenahme durch das Septum nachgewiesen wurde, konnte die größte Zunahme der optischen Dichte nach dem Abpumpen ermittelt werden. Somit relativieren sich die Abweichungen im Zellwachstum in den einzelnen MHFR.

Tab. 10: Vergleichende Darstellung der optischen Dichte über das Septum und nach Abpumpen der Kulturbrühe aus dem MHFR.

	Optische Dichte [rel. AU]		Zunahme der optischen Dichte [%]
	Probenahme nach 24 h über das Septum	Probenahme nach dem Abpumpen aus dem MHFR	
MHFR 1	12,60	16,33	29,6
MHFR 2	8,38	11,32	35,1
MHFR 3	10,55	12,09	14,6

Im Vergleich zu der Kultivierung im Schüttelkolben wird der Unterschied im Zellwachstum folglich durch die unterschätzten Werte für die optische Dichte im MHFR noch größer.

Die Kultivierung soll nicht nur in Bezug auf das Zellwachstum, sondern auch in Bezug auf die Produktformation beurteilt werden. Der Produktnachweis wird über die Fluoreszenz des vorliegenden GFP am 2D-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi) vorgenommen. Zusätzlich wird die Proteinkonzentration nach dem Zellaufschluss bestimmt, die ebenfalls als Anhaltspunkt für die Produktkonzentration bewertet werden kann, da das Zielprotein im Überschuss produziert wird. Der im Anhang (B.3) beschriebene Bradford-Test wird für die Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Auffallend bei der Beurteilung der Messwerte sind die niedrigen Protein- und Produktkonzentrationen für den MHFR 1. Diese erreichen im Vergleich zu MHFR 2 und MHFR 3 lediglich 60 % der Proteinkonzentration bzw. 9 % der GFP-Konzentration. Auch in Bezug auf die abweichenden Messwerte für die optische Dichte kann hier eine Fremdinfection nicht ausgeschlossen werden. Das Sterilisationsprotokoll wurde ausreichend beurteilt und die Kultivierung unter der Clean bench durchgeführt. Doch das Einbringen von Fremdkeimen insbesondere durch eine möglicherweise unsachgemäße Probenahme über das

Septum kann nicht ausgeschlossen werden. Daher wird dieser Reaktor für die Beurteilung der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His nicht berücksichtigt.

Infolge des geringen Wachstums ohne Begasung konnten in MHFR 4 nur geringe Werte für die Protein- und Produktkonzentration ermittelt werden. In Bezug auf die Proteinkonzentration können noch 50 % der in MHFR 2 und MHFR 3 erreichten Werte erreicht werden, doch in Bezug auf die GFP-Konzentration werden nicht mehr als 8 % erreicht.

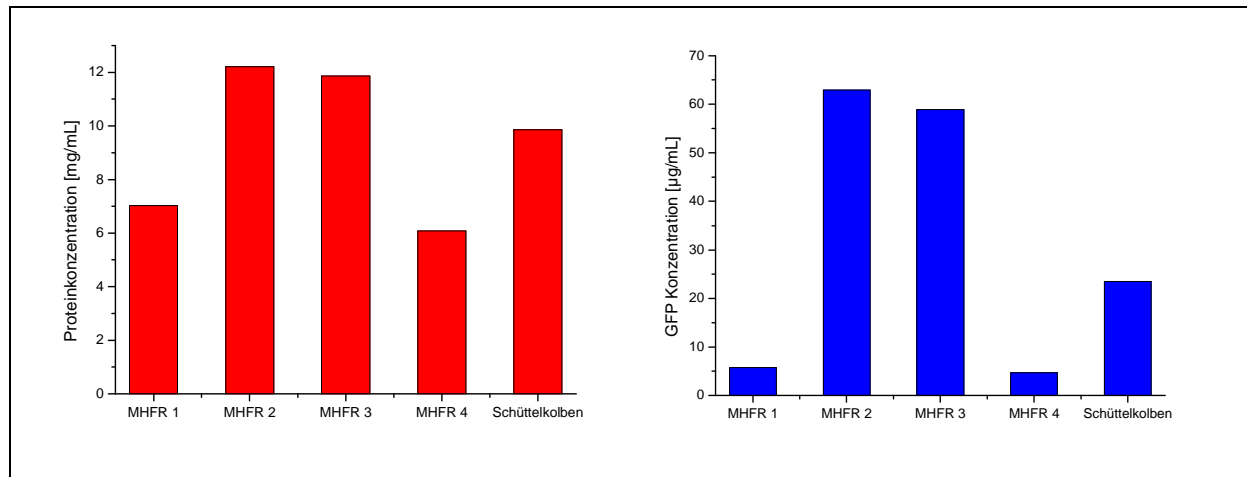


Abb. 28: Darstellung der Proteinkonzentration und der GFP-Konzentration nach Zellaufschluss für die Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His.

Im MHFR 2 werden mit einer Proteinkonzentration von 13 mg/mL und einer GFP Konzentration von 63 µg/mL die höchsten Messwerte erreicht. Die für MHFR 3 erhaltenen Messwerte weichen kaum von den Messwerten für MHFR 2 ab. Es können 97 % der Proteinkonzentration und 94 % der GFP-Konzentration erzielt werden. Im Vergleich zu MHFR 2 und 3 sind die Werte für die Kultivierung im Schüttelkolben mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/mL und einer GFP-Konzentration von 23 µg/mL deutlich geringer. Abschließend werden die Proben des Zellysats und die Elutionsproben der Standardaufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns mittels SDS-Page aufgetrennt und die Aufreinigung bewertet.

Abbildung 29 zeigt die SDS-Page der aufgeführten Proben nach der Färbung der enthaltenen Proteine mittels Silberfärbung. Als Marker wurde der auf Spur 1 aufgetragene Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (#SM0661) von Fermentas, Ontario, Kanda eingesetzt. Ein GFP Standard wurde auf Spur 2 aufgetragen, um das 27,6 kDa große Protein genau zu lokalisieren. Auf die Spuren 3 bis 7 wurden die Proben für das Zellysats aus den verschiedenen Reaktoren aufgetragen. In allen fünf Spuren ist eine Vielfalt an detektierten Proteinen zu erkennen. Eine

Aussage in Bezug auf das Produkt GFP kann aufgrund der starken Färbung anderer detektierter Proteine nicht getroffen werden.

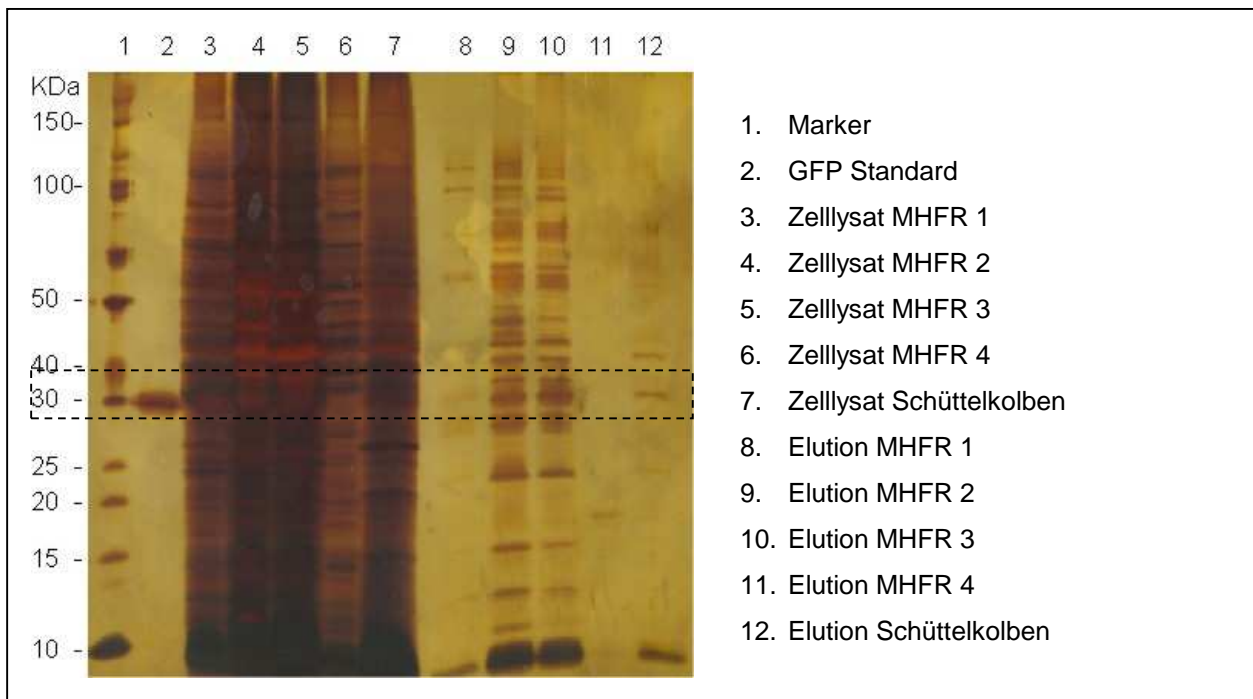


Abb. 29: SDS-Page für die Proben aus Zellysat und der Elution aus der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns, Färbemethode: Silberfärbung.

Die Spuren 8 bis 12 zeigen die Elutionsproben für die verschiedenen Reaktoren. Obwohl noch einige Verunreinigungen zu erkennen sind, ist eine deutliche Aufreinigung der Ausgangsprobe erzielt worden. Die vorhandenen Produktbanden spiegeln die für die GFP Messung am Fluoreszenzspektrometer ermittelten Werte wider. So ist für MHFR 1 nur eine leichte Bande ersichtlich. Die GFP-Konzentration aus der Elutionsprobe für MHFR 4 liegt unter der Detektionsgrenze. Deutliche Banden sind in den Spuren für MHFR 2 und MHFR 3 zu erkennen, sowie eine etwas schwächere Bande für die Elutionsprobe aus der Schüttelkolbenkultivierung.

Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his

Die Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his wurde analog zu der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His durchgeführt. Das Wachstum von *E. coli* JM109 pET-bgl-his und die Sauerstoffversorgung im MHFR wurden über einen Zeitraum von 24 h beobachtet.

Abbildung 30 zeigt die erhaltenen Graphen für die optische Dichte und die Sauerstoffsättigung. Auffallend ist abermals die ausgeprägte lag-Phase von bis zu 10 h. Die Kultivierung in MHFR 4 zeigt aufgrund der mangelnden Begasung niedrige Wachstumswerte mit einer maximalen optischen Dichte von 3,4 rel. AU. Die Sauerstoffsättigung sinkt bereits nach 6 h auf 0 % ab. Die Sauerstoffsättigung der anderen MHFR verlaufen annähernd gleich. Erst nach 10 h sinkt die Sauerstoffsättigung steil ab und erreicht nach 13 h 0 %. Dieses Absinken der Sauerstoffsättigung im Medium verläuft parallel zur exponentiellen Phase der Wachstumskurven.

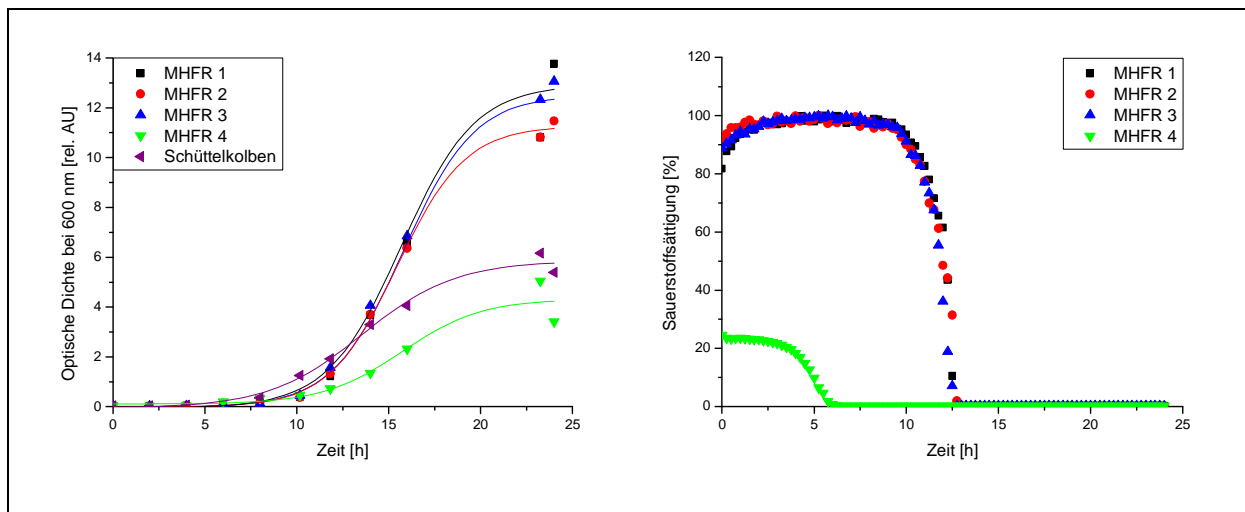


Abb. 30: Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben.

Links: Verlauf der optischen Dichte. Rechts: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%].

Die Wachstumskurven für MHFR 1 bis 3 verlaufen ebenfalls annähernd gleich und zeigen im Bereich zwischen 12 und 17 h eine stark ausgeprägte exponentielle Phase. Die maximal im MHFR erreichte optische Dichte nach 24 h liegt bei 14 rel. AU. Die in den zwei anderen parallel betriebenen MHFR erreichten Werte weichen mit 11 und 13 rel. AU nur geringfügig vom Maximalwert ab.

Die Kultivierung im Schüttelkolben zeigt hingegen eine deutlich niedrigere Wachstumskurve. Obwohl die Wachstumskurve früher in die exponentielle Phase übergeht, ist der Anstieg der optischen Dichte weniger steil. Die maximal erreichte optische Dichte liegt bei 5,4 rel. AU und somit konnte durch die Kultivierung im Schüttelkolben lediglich 40 % der im MHFR erzielten Werte erreicht werden.

Während der Kultivierung konnte in den drei begasten Reaktoren ebenfalls die Ablagerung von Zellen im MHFR beobachtet werden. Die Kulturbrühe wurde erneut nach der Kultivierung abgepumpt und die optische Dichte gemessen, um die im Reaktor sedimentierten

Zellen zu berücksichtigen. Die ermittelten Daten sind zusammen mit den Daten für die Probenahme über das Septum nach 24 h in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Vergleichende Darstellung der optischen Dichte über das Septum und nach Abpumpen der Kulturbrühe aus dem MHFR.

	Optische Dichte [rel. AU]		Zunahme der optischen Dichte [%]
	Probenahme nach 24 h über das Septum	Probenahme nach dem Abpumpen aus dem MHFR	
MHFR 1	13,78	16,22	17,7
MHFR 2	11,47	17,33	51,1
MHFR 3	13,06	16,64	27,4

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen wieder eine unterschätzte optische Dichte für die Probenahme über das Septum. Die optische Dichte nach dem Abpumpen der Kulturbrühe liefert um 18 bis 51 % höhere Werte. Trotzdem können durch die über die Probenahme durch das Septum ermittelten Werte gute Anhaltspunkte in Bezug auf die einzelnen Phasen der zu bewertenden Wachstumskurve ermittelt werden. Wie bei der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His ist die Zunahme der optischen Dichte nach dem Abpumpen der Kulturbrühe gegenläufig zu den bei der Probenahme über das Septum ermittelten Werten, wodurch sich die Abweichungen im Zellwachstum in den einzelnen MHFR relativieren. Im Vergleich zu der Kultivierung im Schüttelkolben wird der Unterschied im Zellwachstum durch die unterschätzten Werte für die optische Dichte im MHFR somit noch größer.

Nach der Aufnahme von Wachstumskurve und Sauerstoffsättigung soll auch die Produktformation in den Zellen nachgewiesen werden. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wird der Gesamtproteingehalt in den Zellen mittels Bradfordtest nachgewiesen. Dieser kann zur Beurteilung der Produktkonzentration herangezogen werden, da das Zielprotein im Überschuss produziert wird. Zusätzlich zu dieser unspezifischen Nachweismethode wird spezifisch für das gebildete Enzym β -Glucanase ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Dabei wird β -D-Glucan als Substrat genutzt und durch das Enzym gespalten. Anschließend werden die freigesetzten Glukosemoleküle durch den DNS-Test nachgewiesen. Die genauen Versuchsbeschreibungen sind in Anhang B.7 und B.8 dargestellt.

Die erhaltenen Messwerte für den Bradford-Test und den β -Glucanase-Aktivitätstest sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

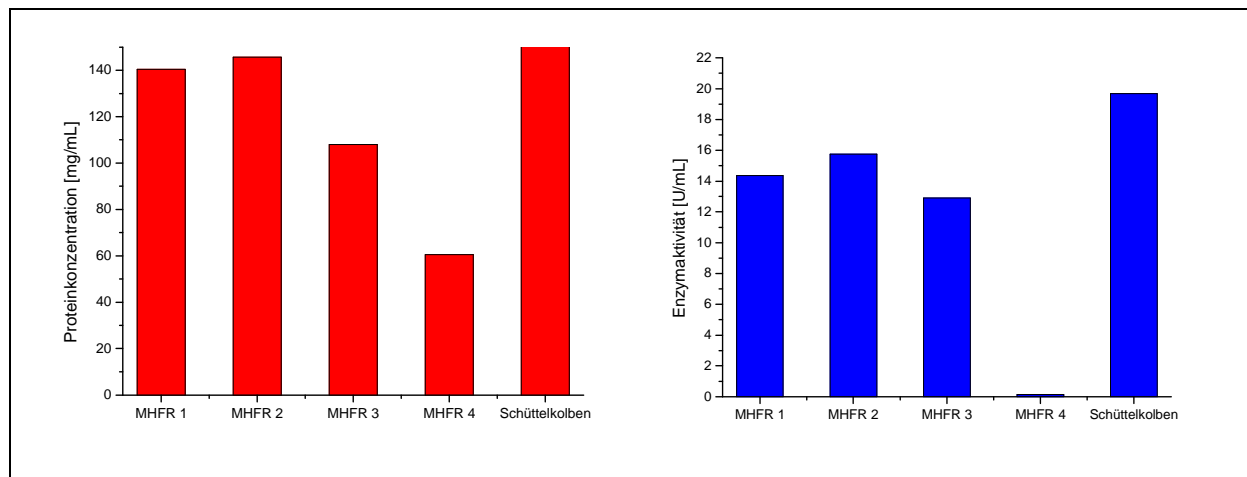


Abb. 31: Darstellung der Proteinkonzentration und der Aktivität der β -Glucanase nach Zellaufschluss für die Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his.

Aufgrund des niedrigen Zellwachstums ist die intrazelluläre Proteinkonzentration in MHFR 4 mit 60 mg/mL geringer als in den anderen Reaktoren. Noch deutlicher wird dies anhand der Bestimmung der Enzymaktivität. Die Enzymaktivität liegt für MHFR 4 bei 0,15 U/mL und somit sind in MHFR 4 nur geringe Mengen Enzym durch die Zellen produziert worden.

Das Zellwachstum in den übrigen Reaktoren war im Vergleich zu MHFR 4 deutlich höher. Auch die Proteinkonzentrationen liegen mit 108 bis 146 mg/mL um bis zu 60 % höher als in MHFR 4. Noch deutlicher wird der Unterschied anhand der Daten für die Enzymaktivität. Für die Reaktoren mit Begasung konnten 13 bis 16 U/mL erreicht werden. Dies entspricht einer Erhöhung der Aktivität um den Faktor 108. Die Proteinkonzentration für die Proben aus dem Schüttelkolben liegt bei 117 mg/mL. Dies ist in Bezug auf die deutlich geringere Zelldichte, die im Schüttelkolben erreicht wurde sehr hoch. Die Enzymaktivität liegt mit 20 U/mL sogar über den im MHFR erzielten Werten. Dies könnte durch stärkere Verunreinigungen der Proben aus den Mikro-Hohlfaserreaktoren aufgrund der höheren Zelldichte erklärt werden. Alternativ könnte die hohe Enzymaktivität auch als höhere intrazelluläre Produktkonzentration gedeutet werden.

Nähere Informationen über die Zusammensetzung der Proben liefert die SDS-Page. Zusätzlich wurden die Proben des Zelllysats mittels Vivapure miniprep MC Spin Columns aufgereinigt. Diese Proben wurden ebenfalls mittels SDS-Page aufgetrennt und die Aufreinigung bewertet. Abbildung 32 zeigt die SDS-Page der aufgeführten Proben nach der Färbung der enthaltenen Proteine mittels Silberfärbung.

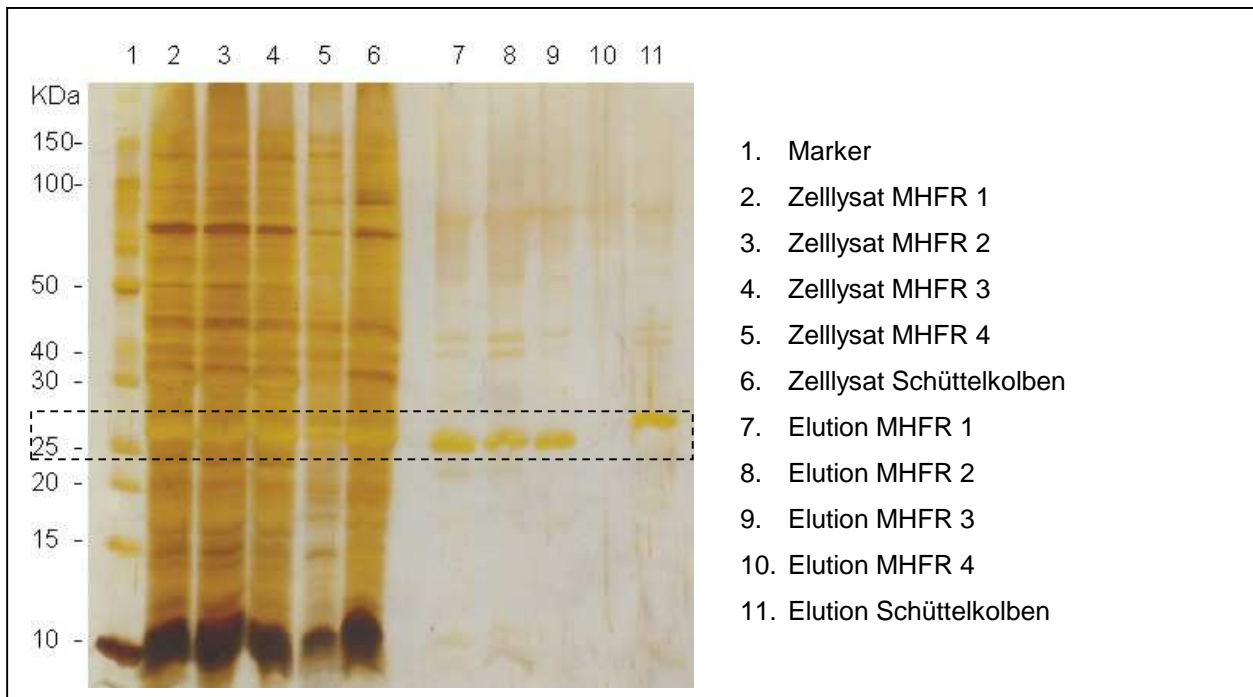


Abb. 32: SDS-Page für die Proben aus Zellysat und der Elution aus der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns, Färbemethode: Silberfärbung.

Als Marker wurde der auf Spur 1 aufgetragene Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (#SM0661) von Fermentas, Ontario, Kanada eingesetzt. Auf die Spuren 2 bis 6 wurden die Proben für das Zellysat aus den verschiedenen Reaktoren aufgetragen. In allen fünf Spuren ist eine Vielfalt an detektierten Proteinen zu erkennen. Die Masse des Enzyms β -Glucanase liegt bei 26,7 kDa und somit müsste die Produktbande etwas oberhalb der 25 kDa Bande des Markers liegen. Eine Aussage in Bezug auf die Lokalisation des Produkts β -Glucanase kann jedoch aufgrund der starken Färbung anderer detektierter Proteine nicht getroffen werden.

Die Spuren 7 bis 11 zeigen die Elutionsproben für die verschiedenen Reaktoren. Obwohl noch einige leichte Verunreinigungen zu erkennen sind, ist eine deutliche Aufreinigung der Ausgangsprobe erzielt worden. Die vorhandenen Produktbanden spiegeln die Werte für den β -Glucanase Aktivitätstest wider. Für die Mikro-Hohlfaserreaktoren 1 bis 3 sind deutliche Produktbanden zu erkennen, wobei die Intensität der Produktbanden für alle drei Reaktoren sehr ähnlich ist. In der Elutionsprobe für den MHFR 4 hingegen ist keine Produktbande nachzuweisen. Die Enzymkonzentration liegt folglich unter der Detektionsgrenze. Auf die letzte Spur wurde die Elutionsprobe aus dem Schüttelkolben aufgetragen. Die Produktbande für das Enzym β -Glucanase ist deutlich erkennbar, wobei die Intensität der Bande denen der Mikro-Hohlfaserreaktoren mit Begasung gleicht.

6.2.2. Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

Die Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* wurde im MHFR-Screeningsystem und parallel im Schüttelkolben durchgeführt. Der *Corynebacterium glutamicum* Stamm produziert Serin, das aus den Zellen sekretiert wird. Die Analytik des produzierten Serins wird mittels HPLC durchgeführt (siehe Anhang B.9). Durch die Entnahme von offline Proben kann die optische Dichte während der Kultivierung verfolgt werden. Eine zusätzliche Analyse der Produktformation während der Kultivierung ist hier möglich, da eine geringe Probenmenge für die HPLC-Analyse ausreicht. Außerdem soll die Glucosekonzentration im synthetischen Medium während der Kultivierung mittels DNS-Test nachgewiesen werden.

Der MHFR soll bei der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* nicht nur für die Kultivierung der Zellen, sondern auch für die integrierte Produktabtrennung eingesetzt werden. Da das produzierte Serin durch die Fasern des Reaktors diffundieren kann, soll es durch das intrakapillare Medium ausgeschwemmt werden. Der Aufbau des MHFR-Screeningsystems wurde daher im Vergleich zu der Kultivierung von *E. coli* leicht verändert. Es wurden vier 100 mL Schottflaschen für das Feed-Medium integriert, um eine individuelle Bestimmung der Glucose- und Serinkonzentrationen für die einzelnen Reaktoren zu erreichen. Außerdem wurde das Feed-Medium im Kreislauf gepumpt, um Serin im intrakapillaren Medium anzureichern. Der Volumenstrom für das Feed-Medium von 0,5 mL/min wurde beibehalten.

Für die Kultivierung sind verschiedene Vorkulturen notwendig, da eine Überführung von einem Komplexmedium in ein synthetisches Medium notwendig ist. Das in den Vorkulturen enthaltene IPTG dient in diesem Fall nicht der Induktion der Produktformation, sondern induziert den Abbau von produziertem Serin zu Pyruvat. IPTG hemmt somit die Produktbildung, da entstehendes Serin direkt zu Pyruvat abgebaut werden kann, und muss für die Hauptkultur durch Zentrifugations- und Waschschrte entfernt werden. Die Zellen werden aus einer Gefrierkultur auf eine BHI (Brain Heart Infusion) -Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird ein Abstrich mit einer Impföse in BHI-Komplexmedium überimpft und 12 h bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wird die zweite Vorkultur angeimpft, so dass eine optische Dichte von 1,0 rel. AU erreicht wurde. Die zweite Vorkultur wurde in Minimalmedium mit 4 % Glucose und 10 µM IPTG durchgeführt. Nach 20 h Wachstum bei 30 °C und 150 rpm werden die Zellen schließlich nach zweimaligem Waschen mit steriler 0,9 % iger NaCl Lösung in die Hauptkultur überimpft. Diese wird in Minimalmedium mit 4 % Glucose ohne IPTG und ebenfalls bei 30 °C inkubiert. Die

Kultivierungsdauer für die Hauptkultur beträgt 120 h. Alle Kulturmedien wurden mit 5 mg/L Tetracyclin und 15 mg/L Kanamycin versetzt. In Abbildung 33 sind die ermittelten Daten für die optische Dichte und die Sauerstoffsättigung dargestellt.

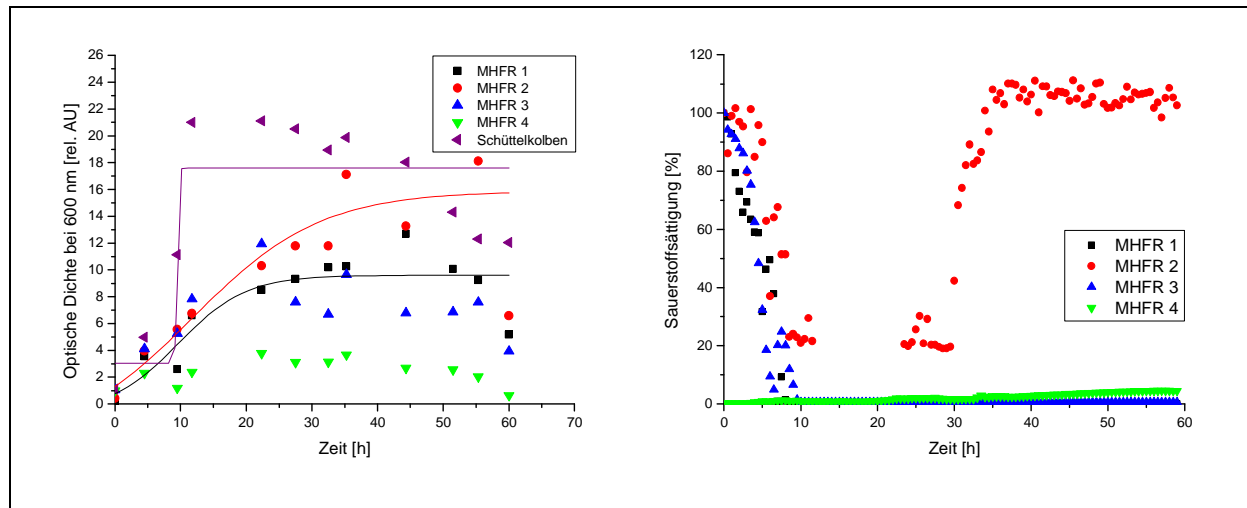


Abb. 33: Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben. Links: Verlauf der optischen Dichte. Rechts: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%].

Die Werte für die optische Dichte streuen stark und es ist keine typische Wachstumskurve zu beobachten. Dies liegt vermutlich daran, dass die Zellen sedimentieren und die optische Dichte, die über die Probenahme im oberen Teil des Reaktors bestimmt wurde, nicht die tatsächlich im Reaktor vorliegende Zelldichte repräsentiert. Bei den bisher durchgeführten Kultivierungen mit *Escherichia coli* lag die optische Dichte bei maximal 17 rel. AU, wodurch sich dieser Effekt weniger auf die Probenahme auswirkte. Bei der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* hingegen werden optische Dichten von bis zu 41 rel. AU erreicht. Die nach dem Abpumpen der Kulturbrühe ermittelten Werte sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tab. 12: Vergleichende Darstellung der optischen Dichte über das Septum und nach Abpumpen der Kulturbrühe aus dem MHFR.

	Optische Dichte [rel. AU]		Zunahme der optischen Dichte [%]
	Probenahme nach 60 h über das Septum	Probenahme nach dem Abpumpen aus dem MHFR	
MHFR 1	5,18	39,41	660
MHFR 2	6,58	41,02	523
MHFR 3	3,95	39,46	899

Die tatsächliche optische Dichte im Reaktor wurde durch die Probenahme über das Septum um bis zu 899 % unterschätzt. Trotz dieser stark unterschätzten optischen Dichte wird durch die in Abbildung 33 dargestellten Wachstumskurven ein deutlicher Unterschied zwischen den begasten Mikro-Hohlfaserreaktoren und dem unbegasten Reaktor deutlich. In den Reaktoren 1 bis 3 steigt die optische Dichte während der Kultivierung an, in MHFR 4 hingegen schwanken die Werte für die optische Dichte während der gesamten Kultivierung um 2 rel. AU.

Für alle vier Reaktoren ist eine starke Sauerstofflimitierung zu beobachten (siehe Abb. 33 rechts). Die Sauerstoffsättigung von MHFR 1 bis 3 sinkt innerhalb von 5 h exponentiell auf 0 % ab. Bei der Kurve für MHFR 2 steigt die Sauerstoffsättigung nach 23 h wieder auf 100 % an. Dies ist jedoch durch eine Ansammlung von Gasblasen im Reaktor zu erklären, die sich direkt unter dem Sensor spot sammeln und somit das Ergebnis verfälschten. Diese Ansammlung von Gasblasen ist vermutlich auf einen Defekt der Toyobo-Hohlfasern zurückzuführen. In MHFR 4 hingegen ist die Sauerstoffkonzentration schon zu Beginn der Kultivierung bei 0 %. Dies ist vermutlich durch einen Defekt des Sauerstoffsensors zu erklären, da aufgrund des geringen Wachstums eine Sauerstoffsättigung von 0 % nicht realistisch wäre.

Während der Kultivierung wurde auch die Glucosekonzentration im Medium bestimmt. Die Bestimmung der Konzentrationen wurde über den in Anhang B.7 dargestellten DNS-Test vorgenommen, da dieser in einer Mikotiterplatte durchführbar und somit nur ein Probenvolumen von 20 μ L notwendig ist.

Abbildung 34 zeigt die ermittelten Werte für die Glucosekonzentration in den verschiedenen Reaktoren. Die linke Abbildung zeigt die Glucosekonzentration im Schüttelkolben. Die Konzentration nimmt exponentiell ab und erreicht bereits nach 22 h 0 g/L. In den MHFR 1 bis 3 hingegen sinkt die Glucosekonzentration deutlich langsamer, da die Glucose aus den 100 mL Feed-Medium während der Kultivierung über Diffusion in den extrakapillaren Bereich transportiert wird. Erst nach 44 h ist die Glucose im MHFR verbraucht. Die Abnahme der Glucosekonzentration im intrakapillaren Bereich ist in Abbildung 34 rechts dargestellt. Ebenfalls nach 44 h ist die Glucose im intrakapillaren Bereich der MHFR 1 bis 3 komplett verbraucht. Die Glucosekonzentration in MHFR 4 sinkt aufgrund des geringen Zellwachstums und des daraus resultierenden niedrigen Glucoseverbrauchs nicht bis auf 0 g/L ab. Die Messwerte schwanken jedoch sowohl für den extrakapillaren Bereich als auch für den intrakapillaren Bereich stark. Diese Schwankungen sind darauf zurückzuführen, dass die Messung aufgrund der geringen Probemenge nur als Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

Alternativ können die Schwankungen durch die Wechselwirkungen von Stoffwechselprodukten aus den Zellen mit den Testlösungen erklärt werden.

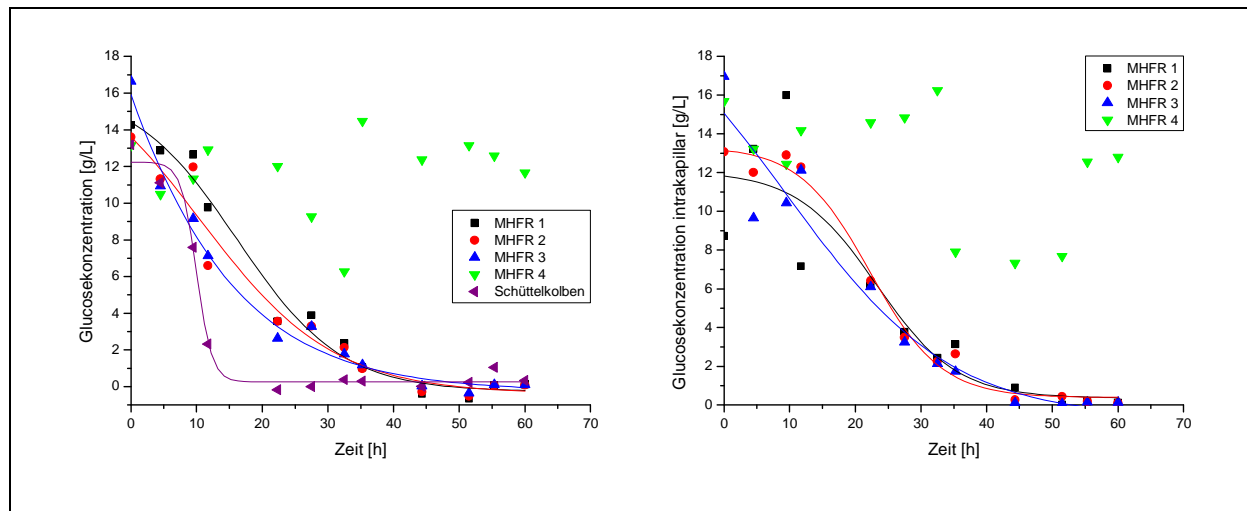


Abb. 34: Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben. Links: Verlauf der Glucosekonzentration im Medium. Rechts: Darstellung der intrakapillaren Glucosekonzentration.

Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurekonzentration wurde reversed phase HPLC angewandt. Vor der chromatographischen Auftrennung erfolgte eine Derivatisierung der Aminosäuren mit den Reagenzien o-Phthaldialdehyd (OPA) und β -Mercaptoethanol, durch die die Detektion der Aminosäuren durch einen Fluoreszenz-Detektor ermöglicht wurde. Die eingesetzte Probenmenge betrug 10 μ L, wodurch die Analytik auch mit den während der Kultivierung entnommenen Proben durchgeführt werden konnte. Weitere Informationen zur Durchführung der HPLC sind in Anhang B.9 aufgeführt. Die ermittelten Werte für die Serinkonzentrationen in den verschiedenen Mikro-Hohlfaserreaktoren und im Schüttelkolben sind in Abbildung 35 dargestellt.

Der Graph in Abbildung 35 oben rechts zeigt die Serinkonzentration im extrakapillaren Bereich der Mikro-Hohlfaserreaktoren und im Schüttelkolben. Die Serinkonzentrationen in den MHFR 1 bis 3 steigt während der Kultivierung auf durchschnittlich 1,1 g/L. Im Schüttelkolben liegt die Serinkonzentration deutlich über den im MHFR erreichten Werten. Die maximal erreichte Serinkonzentration liegt bei 2 g/L. Doch im MHFR wird das Serin durch Diffusion über die Hohlfasern in den intrakapillaren Bereich transportiert. Daher wurden Proben aus dem intrakapillaren Bereich ebenfalls analysiert. In den 100 mL Feed-Medium konnten durchschnittlich ebenfalls 1,1 g/L Serin nachgewiesen werden. Dies, und die

Tatsache, dass die Kurven im extrakapillaren und intrakapillaren Bereich sehr ähnlich verlaufen, zeigt, dass sich Serin gut über die Hohlfasern abführen lässt.

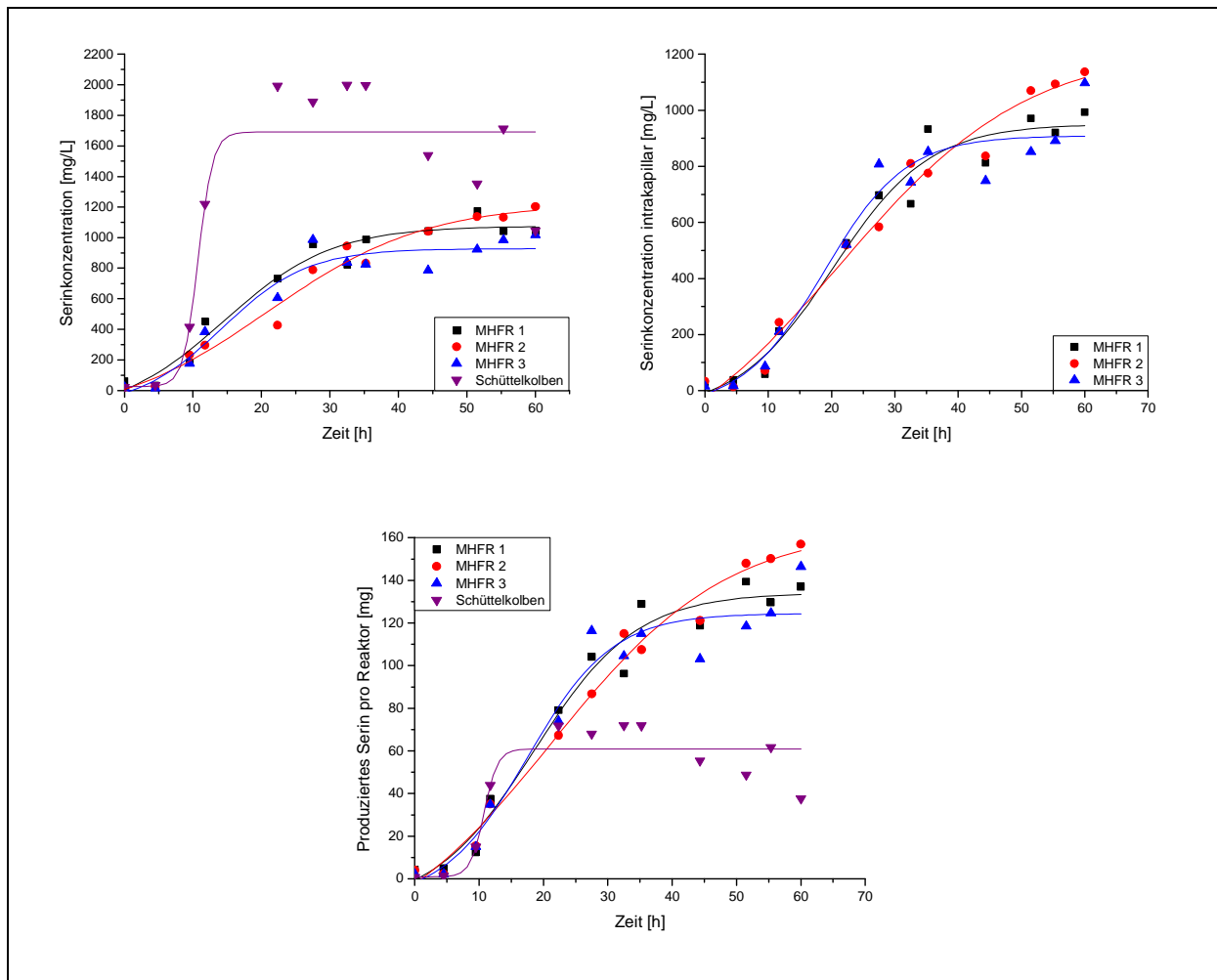


Abb. 35: Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben. Links: Verlauf der Serinkonzentration im Medium. Rechts: Darstellung der intrakapillaren Serinkonzentration. Unten: Serinkonzentration pro Reaktor.

Aufgrund des durch das Feed-Medium größeren Volumens im MHFR, in dem das Serin frei vorliegt, sind die Serinkonzentrationen im Schüttelkolben und im MHFR nicht direkt vergleichbar. Daher wurde das insgesamt durch die Zellen produzierte Serin berechnet und in Abbildung 35 unten dargestellt. In dieser Darstellung zeigt sich, dass im MHFR insgesamt deutlich mehr Serin produziert wird als im Schüttelkolben. So konnten im MHFR maximal 157 mg Serin produziert werden, während im Schüttelkolben mit 71 mg Serin nur 45 % der im MHFR ermittelten Werte erreicht werden konnten.

Die HPLC-Analytik für die Proben aus MHFR 4 wurde nicht durchgeführt, da durch die Bestimmung des Zellwachstums und der Glucosekonzentration unzureichende Wachstums-

bedingungen für die Zellen festgestellt wurden. Die Produktion von Serin durch *Corynebacterium glutamicum* kann in diesem Reaktor als sehr gering eingeschätzt werden. Daher wurde auch aufgrund der großen Probenanzahl und der aufwendigen HPLC-Analytik auf die Analytik dieser Proben verzichtet.

6.2.3. Kultivierung von *Bacillus megaterium*

Der Stamm *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His produziert das His-getagte Enzym Levansucrase und sekretiert dieses in das extrazellulär vorliegende Medium. Die Kultivierung wurde in LB-Medium bei 34 °C und mit 10 mg/L Tetracyclin durchgeführt. Die Induktion der Produktion von Levansucrase erfolgte über die Zugabe von 0,5 % Xylose. Die weiteren Kultivierungsbedingungen werden wie in Abschnitt 6.2. beschrieben eingestellt, wobei die Kultivierung im Screeningsystem bei 300 rpm und die Kultivierung im Schüttelkolben bei 100 rpm durchgeführt wird. Während diverser Vorversuche zur Optimierung der Drehzahlen konnte festgestellt werden, dass die mit 1 mm außergewöhnlich großen Zellen empfindlich auf Scherkräfte reagieren. Daher wurden die Drehzahlen erniedrigt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Produktkonzentration an aktiver Levansucrase bereits nach 12 h ihr Maximum erreicht. Daher wurde die Kultivierung bereits nach 12 h in der exponentiellen Phase der Kultivierung abgebrochen.

Während der Kultivierung wird die optische Dichte offline verfolgt. Eine zusätzliche Analyse der Produktformation während der Kultivierung ist hier wie schon bei der Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme nicht möglich, da die geringe Probenmenge von 0,1 mL, die durch das Septum entnommen wird, für diese Analyse nicht ausreicht. Im Gegensatz zu der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* wird das extrazellulär vorliegende Produkt aufgrund seiner Größe von 110 kDa durch die Hohlfasern zurückgehalten. Das Feed-Medium und der Volumenstrom für das Feed Medium wurden analog zur Kultivierung von *Escherichia coli* auf 1 L und 0,5 mL/min festgesetzt. Abbildung 36 zeigt die Wachstumskurven für die verschiedenen Mikro-Hohlfaserreaktoren und die Schüttelkolben Kultivierung, sowie die Sauerstoffsättigung in den MHFR während der Kultivierung.

In Abbildung 36 links sind die Wachstumskurven für die verschiedenen Reaktoren dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ohne Membranbegasung kein optimales Zellwachstum erreicht wurde. Die optische Dichte nach 12 h Kultivierung liegt bei 0,94 rel. AU. In den anderen MHFR mit Membranbegasung liegen die erreichten Werte für die optische Dichte

nach 12 h deutlich höher. So wurden in diesen MHFR nach 12 h optische Dichten zwischen 4,4 und 6,9 rel. AU erreicht. Die Unterschiede in den einzelnen Reaktoren sind darauf zurückzuführen, dass die Kultivierung während der exponentiellen Wachstumsphase abgebrochen wurde. Allerdings könnten auch Abweichungen in der Durchlässigkeit der zur Begasung genutzten Hohlfasern oder Unregelmäßigkeiten bei der Verklebung der Hohlfasern zu diesem Effekt geführt haben.

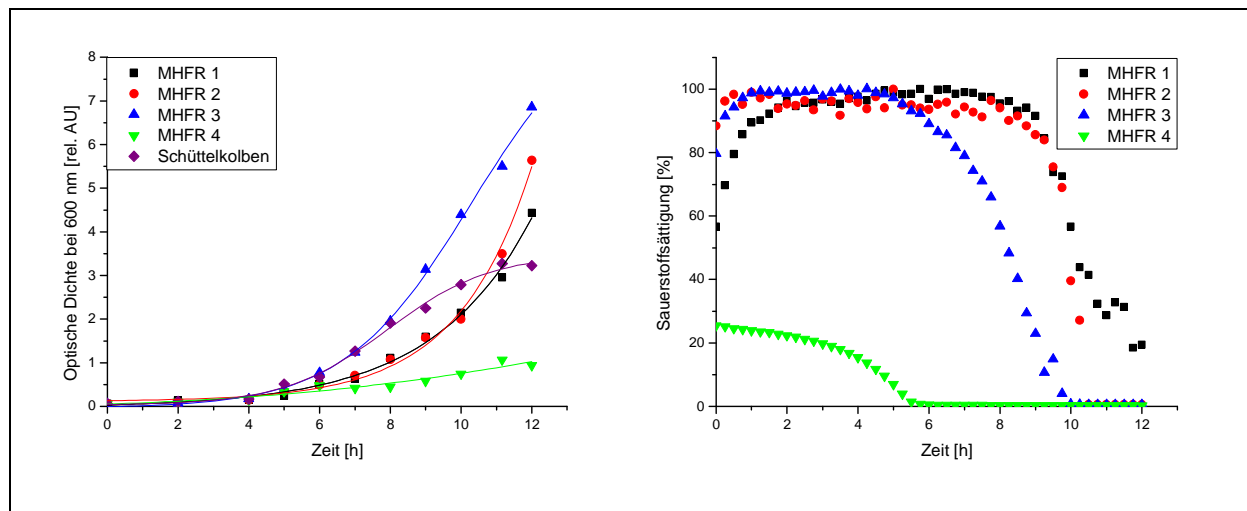


Abb. 36: Kultivierung von *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His im MHFR-Screeningsystem und im Schüttelkolben. Links: Verlauf der optischen Dichte. Rechts: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%].

Der in Abbildung 36 rechts dargestellte Graph für die Sauerstoffsättigung zeigt die nicht ausreichende Sauerstoffversorgung ohne Membranbegasung im MHFR 4. Bereits zu Beginn der Kultivierung liegt die Sauerstoffsättigung unter 30 % und bereits nach 5,5 h ist der Sauerstoff im Medium komplett verbraucht. Bei der Kultivierung in den MHFR 1 bis 3 hingegen liegt die Sauerstoffsättigung zu Beginn der Kultivierung bei 100 %. Sobald das Zellwachstum in die exponentielle Phase übergeht sinkt die Sauerstoffsättigung durch den steigenden Sauerstoffverbrauch der Zellen stark ab.

Die Kultivierung im Schüttelkolben wird nach 12 h in der stationären Phase bei einer optischen Dichte von 3,2 rel. AU abgebrochen. Somit können im Schüttelkolben nur 50-70 % der im MHFR ermittelten Werte erreicht werden. Während der Kultivierung konnte in den drei begasteten Reaktoren, wie schon bei den Kultivierungen von *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*, die Ablagerung von Zellen im MHFR beobachtet werden. Die Kulturbühe wurde erneut nach der Kultivierung abgepumpt und die optische Dichte gemessen, um die im Reaktor sedimentierten Zellen zu berücksichtigen. Die ermittelten Daten sind

zusammen mit den Daten für die Probenahme über das Septum nach 12 h in Tabelle 13 dargestellt.

Die in Tabelle 13 zusammengestellten Daten zeigen, dass der Effekt der Sedimentation von Zellen im MHFR bei der Kultivierung von *Bacillus megaterium* trotz der Auswahl einer geringeren Drehzahl des Magnetrührers geringer ist, als bei den bisher durchgeführten Kultivierungen. Die Abweichungen zwischen den durch das Septum aus dem MHFR gezogenen Proben und den nach Abpumpen entnommenen Probe liegen bei den MHFR 2 und 3 um 11 %. In MHFR 1 wurde die optische Dichte im MHFR sogar durch die Probenahme über das Septum um 6 % überschätzt. Diese geringe Sedimentation von Zellen ist auf die geringere Zelldichte bei der Kultivierung von *Bacillus megaterium* zurückzuführen, wobei die maximal erreichte optische Dichte bei 7,6 rel. AU liegt.

Tab. 13: Vergleichende Darstellung der optischen Dichte über das Septum und nach Abpumpen der Kulturbrühe aus dem MHFR.

	Optische Dichte [rel. AU]		Zunahme der optischen Dichte [%]
	Probenahme nach 12 h über das Septum	Probenahme nach dem Abpumpen aus dem MHFR	
MHFR 1	4,43	4,15	-6,3
MHFR 2	5,64	6,24	10,6
MHFR 3	6,86	7,62	11,1

Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen von ihrem Fermentationsmedium durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 3.345 g) abgetrennt. Der Zellüberstand wurde dann für die Produktanalytik und Versuche im Bereich Downstreaming eingesetzt. Die Proteinkonzentration im Zellüberstand wurde mit dem Bradford-Test bestimmt und die Aktivität der Levansucrase wurde über den in Anhang B.10 dargestellten Enzymtest ermittelt. Die Daten für Proteinkonzentration und Enzymaktivität sind in Abbildung 37 zusammengestellt.

Die Proteinkonzentration im Zellüberstand der verschiedenen Kultivierungen liegt zwischen 50 und 80 µg/mL, wobei MHFR 4 mit 50 µg/mL die niedrigste Proteinkonzentration aufweist. Im Vergleich zwischen der Schüttelkolbenkultivierung und der im membranbegasten MHFR durchgeführten Kultivierungen liegen die Proteinkonzentrationen im MHFR um 12 bis 34 % höher als im Schüttelkolben. Doch die Messung der Proteinkonzentration liefert keinen spezifischen Nachweis der Produktkonzentration. Auch andere extrazelluläre Proteine sowie Proteine, die im Komplexmedium enthalten sind werden durch den Bradford-Test nachgewiesen.

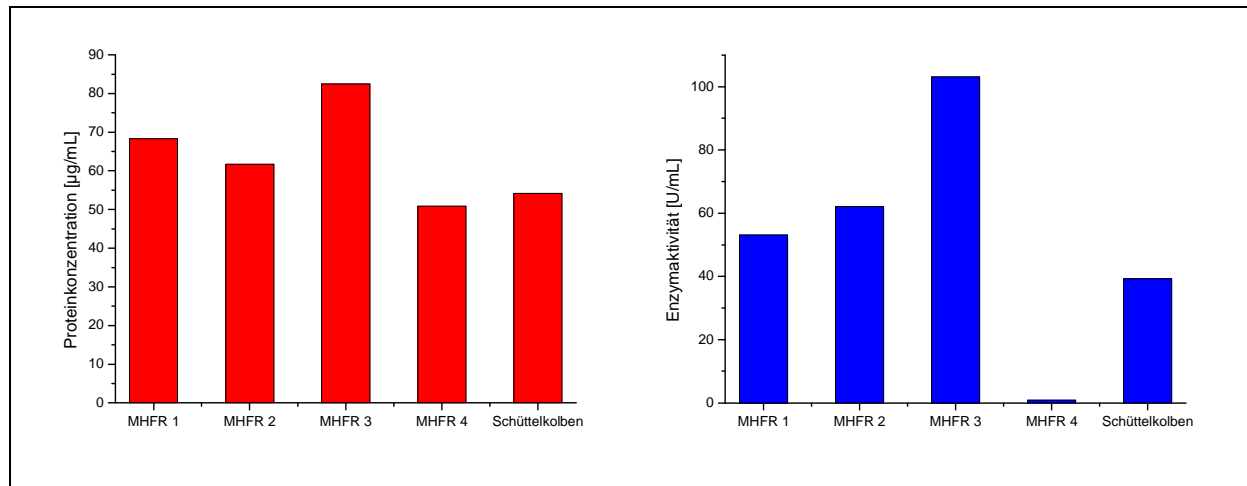


Abb. 37: Darstellung der Proteinkonzentration und der Aktivität der Levansucrase nach Abtrennung der Zellen für die Kultivierung von *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His.

Der spezifische Nachweis der Levansucrase erfolgte über einen Enzymaktivitätstest [U/ml]. Abbildung 37 rechts zeigt die Enzymaktivität der verschiedenen Kultivierungen nach 12 h. In der Probe aus MHFR 4 konnte wie erwartet eine sehr geringe Aktivität von 0,9 U/mL ermittelt werden. In den anderen Kultivierungen konnten deutlich höhere Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Die größte Aktivität wird mit 103 U/mL in MHFR 3 erreicht. Im Schüttelkolben hingegen liegt die Aktivität um 60 % niedriger als im Mikro-Hohlfaserreaktor. Nähere Informationen über die Zusammensetzung der Proben liefert die SDS-Page. Doch da die Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den bei den *Escherichia coli* Kultivierungen erreichten Werten sehr niedrig sind, wurden die Proben für eine bessere Detektion durch die SDS-Page um den Faktor 10 aufkonzentriert. Die Aufkonzentrierung erfolgte in Vivaspin Modulen der Sartorius AG, Göttingen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa.

Anschließend wurden die Proben des Zellysats mittels Vivapure miniprep MC Spin Columns aufgereinigt. Die aufkonzentrierten Proben und die Elutionsproben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und die Aufreinigung bewertet. Abbildung 38 zeigt die SDS-Page der aufgeführten Proben nach der Färbung der enthaltenen Proteine mittels Silberfärbung.

Das nachzuweisende Enzym Levansucrase besitzt eine Masse von 110 kDa und kann in etwa auf der Höhe der 100 kDa Bande des Markers nachgewiesen werden. Für die aufkonzentrierten Zellüberstände sind die Produktbanden minimal über der 100 kDa Bande des Markers erkennbar. Die Intensität der Produktbanden korreliert mit den für den Enzymtest ermittelten Aktivitäten. So ist die Produktbande für die Probe aus MHFR 3 am stärksten ausgeprägt. Die Bande für den Zellüberstand aus MHFR 4 hingegen ist kaum zu erkennen. Hier zeigt sich auch der Vorteil des extrazellulär vorliegenden Produkts, denn die Verunreinigung der Probe durch Fremdproteine ist deutlich geringer, als in den Versuchen

mit intrazellulär vorliegendem Produkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass andere intrazellulär vorliegende Proteine durch Zentrifugation direkt mit den Zellen abgetrennt werden können.

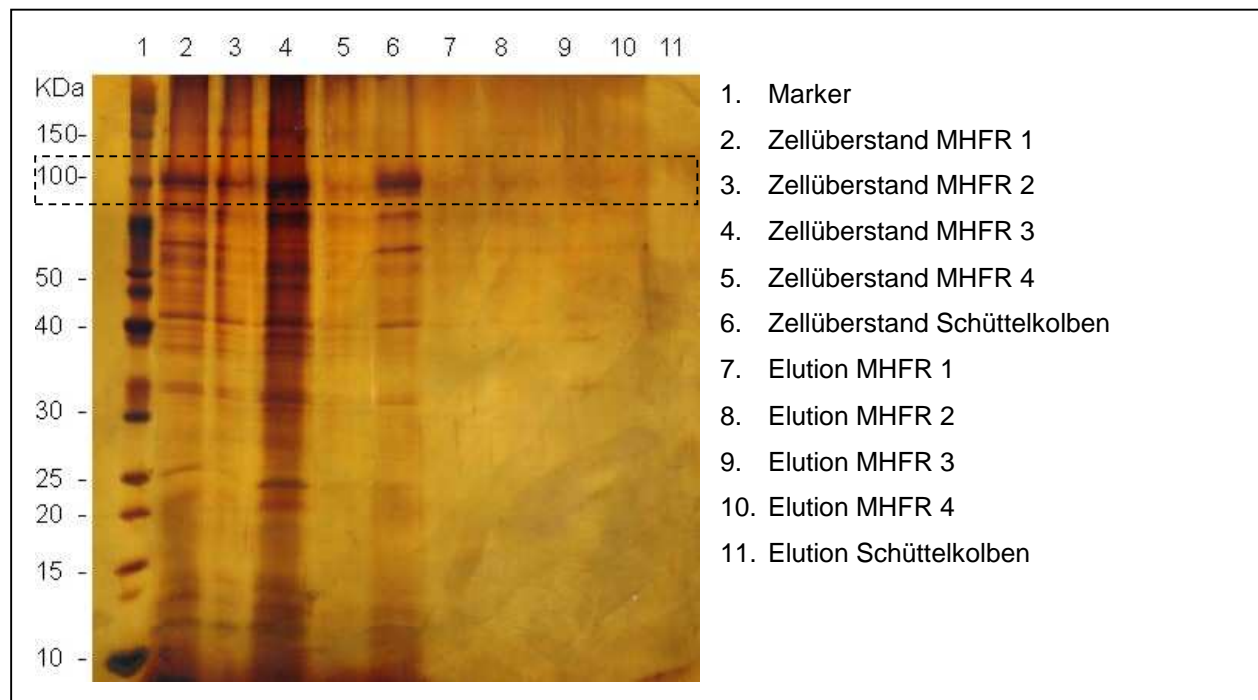


Abb. 38: SDS-Page für die Proben aus aufkonzentriertem Zellüberstand (10 fach) und der Elution aus der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns, Färbemethode: Silberfärbung.

Auf die Spuren 7 bis 11 wurden die Elutionsproben der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns aufgetragen. Trotz der sehr sensitiven Silberfärbung des Gels sind keine deutlichen Banden zu erkennen. Weder die Produktbande noch die Fremdproteinbanden finden sich in den auf das Gel aufgetragenen Elutionsproben wieder. Dies lässt darauf schließen, dass die vorliegenden Proteine nicht an die Membran der Spin Columns gebunden haben, oder die Elution der Proteine von der Membran nicht erfolgreich war. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurden für alle Proben der Aufreinigung mittels Bradford-Test die Proteinkonzentration bestimmt.

Abbildung 39 zeigt die Proteinkonzentrationen der Proben für die Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinkonzentrationen für den Durchfluss nahezu identisch sind mit dem Zellüberstand. Das heißt, dass nur geringe Mengen des im Zellüberstand vorliegenden Proteins an die Membran binden. Zusätzlich ist keine erhöhte Proteinkonzentration in der Elutionsfraktion nachzuweisen. Das bedeutet, die geringe Proteinmenge, die an die Membran gebunden hat, wird nicht selektiv durch die Aufgabe des Elutionspuffers von der Membran gelöst.

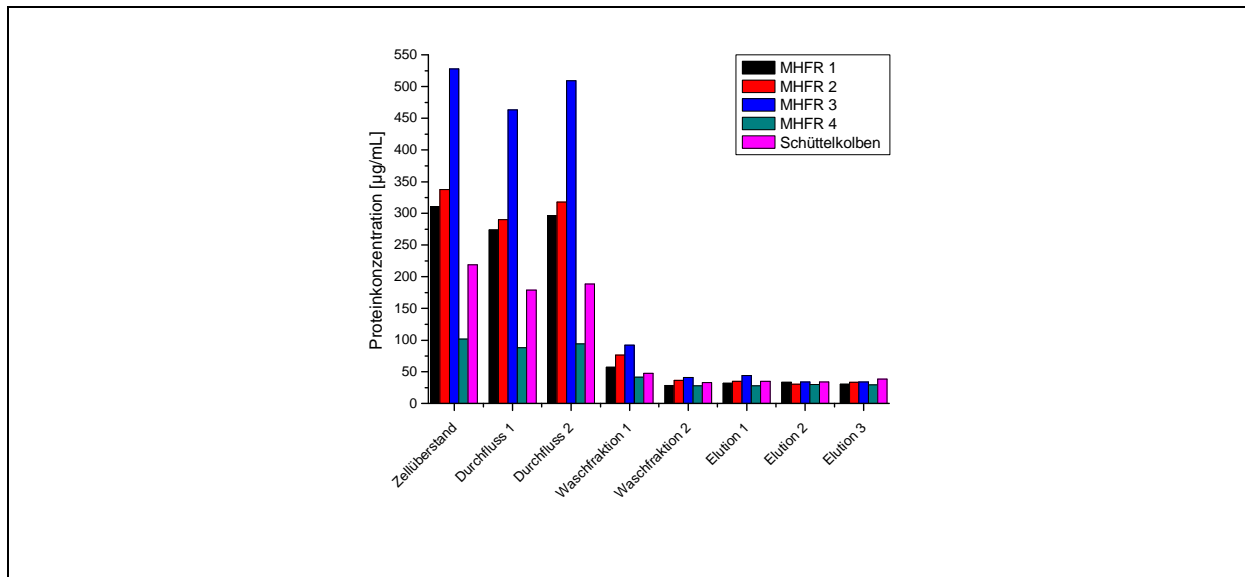


Abb. 39: Proteinkonzentration der einzelnen Proben der Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns.

Doch für die Bewertung und den Vergleich der Kultivierungen im MHFR und im Schüttelkolben sind die aus den Zellüberständen ermittelten Werte ausreichend. Daher wurde auf eine Optimierung des Aufreinigungsprotokolls verzichtet.

6.3. Zusammenfassung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde zusätzlich zur Konstruktion der Reaktoren die Entwicklung des MHFR in Bezug auf die Minimierung von Strömungsdefiziten und die Optimierung der Sauerstoffsättigung vorangetrieben. In diesem Kapitel hingegen wurde der optimierte MHFR für den Aufbau eines Parallelreaktor-Screeningsystems bestehend aus vier Reaktoren eingesetzt. Außerdem wurde der Einsatz des MHFR für die Kultivierung verschiedener Testorganismen realisiert.

Für den Aufbau des Screeningsystems mussten Modifikationen am bisherigen Reaktoraufbau vorgenommen werden. So wurde auf den extrakapillaren Kreislauf verzichtet, um den apparativen Aufwand des Screeningsystems möglichst gering zu halten. Zusätzlich wurde für die Entnahme von offline Proben ein Septum in den Deckel des Reaktors integriert. Der Aufbau des Screeningsystems wurde als flächiger Aufbau realisiert. Dies bietet im Gegensatz zum stapelförmigen Aufbau den Vorteil, dass die einzelnen Reaktoren über die transparente Deckplatte besser einsehbar sind. Außerdem kann die Deckplatte des Reaktors so für die

Analytik der Sauerstoffsättigung und für die Entnahme von offline Proben genutzt werden. Eine Erweiterung des Screeningsystems auf mehr als vier Reaktoren ist durch den Mehrstellen-Magnetrührer und den darauf angepassten Thermostat limitiert. Dennoch könnte das kompakte Screeningsystem bei Bedarf auch mehrfach aufgebaut werden.

Nach dem erfolgreichen Aufbau des Screeningsystems wurde die Kultivierung verschiedener Testorganismen vorangetrieben. Als Testorganismen wurden zwei *Escherichia coli* Stämme ausgewählt, sowie *Corynebacterium glutamicum* und *Bacillus megaterium*. Bei allen Testorganismen wurden das Zellwachstum und die Produktformation bewertet. Zum Vergleich wurde mit allen Testorganismen im gleichen Maßstab eine Schüttelkolbenkultivierung durchgeführt und beurteilt. Zusätzlich wurde ein Reaktor im Screeningsystem ohne Membranbegasung betrieben, wodurch die Sauerstoffversorgung im MHFR als essentieller und limitierender Faktor für den Betrieb des MHFR bei der Kultivierung von aeroben Mikroorganismen bestätigt werden konnte.

Die Kultivierung der beiden *Escherichia coli* Stämme zeichnet sich durch die Produktion eines intrazellulär vorliegenden Produkts aus. Bei der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His konnten im MHFR höhere Zelldichten, als im Schüttelkolben ermittelt werden. Außerdem konnten im MHFR höhere Produktkonzentrationen nachgewiesen werden. So erreicht die intrazelluläre GFP-Konzentration im Schüttelkolben nur 40 % der im MHFR ermittelten Werte. Trotzdem ist die Produktausbeute im MHFR nicht optimal. Da bei der Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFPx6His im MHFR der Abbruch der Kultivierung bereits in der exponentiellen Phase erfolgte, ist eine weitere Optimierung der Produktausbeute durch eine Verlängerung der Kultivierungszeit denkbar.

Bei der Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his konnte ebenfalls eine deutlich höhere Zelldichte im MHFR ermittelt werden. Im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung konnte eine Erhöhung der Zelldichte um das dreifache nachgewiesen werden. Der Nachweis des produzierten Enzyms β -Glucanase zeigt jedoch im MHFR um 20 % niedrigere Enzymaktivitäten, als im Schüttelkolben. Dies kann vermutlich auf die stärkeren Verunreinigungen der Proben aus den Mikro-Hohlfaserreaktoren aufgrund der höheren Zelldichte zurückgeführt werden. Insbesondere da durch den Nachweis nur die Enzymaktivität bestimmt wird und eventuell inaktiv vorliegendes Enzym nicht berücksichtigt wird.

Die Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* ist besonders durch die Möglichkeit des ISPR, aufgrund des extrazellulär produzierten Serins, interessant. Im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung konnten um den Faktor 3,5 höhere Zelldichten und um den Faktor 2,2 höhere Serinkonzentrationen nachgewiesen werden. Das produzierte Serin diffundiert durch

die Hohlfasern in den intrakapillaren Bereich des Reaktors und könnte hier auch direkt abgeführt werden. Zusätzlich konnte aufgrund des eingesetzten synthetischen Mediums der Nährstoffverbrauch der Zellen anhand der Glucosekonzentration beurteilt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Glucose aus dem Feed-Medium durch die Hohlfasern in den extrakapillaren Bereich diffundiert und dort von den Zellen verstoffwechselt wird.

Bei der Kultivierung von *Bacillus megaterium* konnte eine Erhöhung der Zelldichte und der Enzymaktivität der Levansucrase um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung nachgewiesen werden. Zusätzlich bietet die Kultivierung von *Bacillus megaterium* durch die extrazelluläre Produktion des Enzyms Levansucrase ebenfalls die Möglichkeit des ISPR. Doch die Masse des Enzyms von 110 kDa verhindert die Diffusion des Enzyms durch die Hohlfasern. Um trotzdem ein ISPR zu ermöglichen ist die Verwendung von Hohlfasern mit einer größeren Ausschlussgrenze denkbar. Außerdem kann das Produkt über den His-tag gebunden werden. Die Möglichkeiten zum ISPR der Levansucrase werden in Kapitel 7 näher beschrieben.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass alle Testorganismen erfolgreich im MHFR kultiviert werden konnten. Insbesondere der Aspekt des ISPR bei der Produktion von Serin in *Corynebacterium glutamicum* zeigt das große Potential der Mikro-Hohlfaserreaktoren.

Kapitel 7

Integrierte Produktaufarbeitung von His-tag-Proteinen im Mikro-Hohlfaserreaktor

Ein angestrebtes Ziel bei der Entwicklung des Mikro-Hohlfaserreaktors ist die Entwicklung einer integrierten Produktaufarbeitung oder in-situ product removal (ISPR). Die Produktaufarbeitung kann wie bei der Reinigung von Serin aus *Corynebacterium glutamicum* über die Ausschlussgrenze der Hohlfaser realisiert werden. Eine andere Strategie ist die Bindung des Produkts an die Hohlfaser. Dazu wurden Hohlfasern nachträglich chemisch modifiziert, so dass Affinitätshohlfasern entwickelt werden konnten. Besonders interessant dabei ist der Einsatz von Metallionen für ihre Verwendung als Affinitätsliganden. An IDA-Membranen können 2-fach positiv geladene Metallionen terminal komplexiert werden. Durch die Anwendung von Hohlfasern, die mit Metallionen dekoriert worden sind, besteht die Möglichkeit, diverse His-tag Proteine aufzureinigen.

Die Arbeiten zur integrierten Produktaufarbeitung von His-tag Proteinen wurden in Kooperation mit der zweiten im Rahmen des DBU-Projektes „Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in der Zellkulturtechnik“ (Az. 13120) erarbeiteten Dissertation durchgeführt. Die Möglichkeiten zur integrierten Aufreinigung der im Reaktor produzierten His-tag Proteine soll im Folgenden kurz dargestellt werden. Weitere Resultate zum Einsatz von Hohlfasermodulen zu ISPR oder als Affinitätsmodule sind in der Dissertation „Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing“ von Kroll nachzulesen [1].

7.1. Strategien zur Oberflächenmodifikation von Polysulfon- und Polyethersulfon-Hohlfasern

Als Angriffspunkt für die chemische Modifizierung der Hohlfasern können ausschließlich die terminalen Hydroxylgruppen des Polyethersulfons genutzt werden. In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Herstellung von Affinitätsmembranen auf Basis dieser terminalen Hydroxylgruppen beschrieben [30, 31, 32]. Besonders vielversprechend für die Aufreinigung der produzierten His-Tag-Proteine ist der Einsatz von IMAC-Affinitätsmembranen. Daher wurde eine Strategie zur Herstellung von IMAC-Hohlfasern entwickelt.

An die terminalen Hydroxylgruppen der Basismembran wird mit Ethylenglycoldimethylether (EGDME) ein Epoxid-Linker gekoppelt, um die Membran für weitere Reaktionen zu aktivieren. Anschließend wird mit Hydroxyethylcellulose (HEC) ein Cellulosederivat angekoppelt, um die Anzahl der bestehenden terminalen Hydroxylgruppen zu vervielfältigen. Nach Anbindung des Polysaccharids werden die entstandenen Hydroxylendgruppen erneut epoxidiert. Ausgehend von der epoxidierten Hohlfasermembran erfolgt die Bindung von Iminodiessigsäure (IDA), gefolgt von einer Komplexierung von 2-fach positiv geladenen Metallionen (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}).

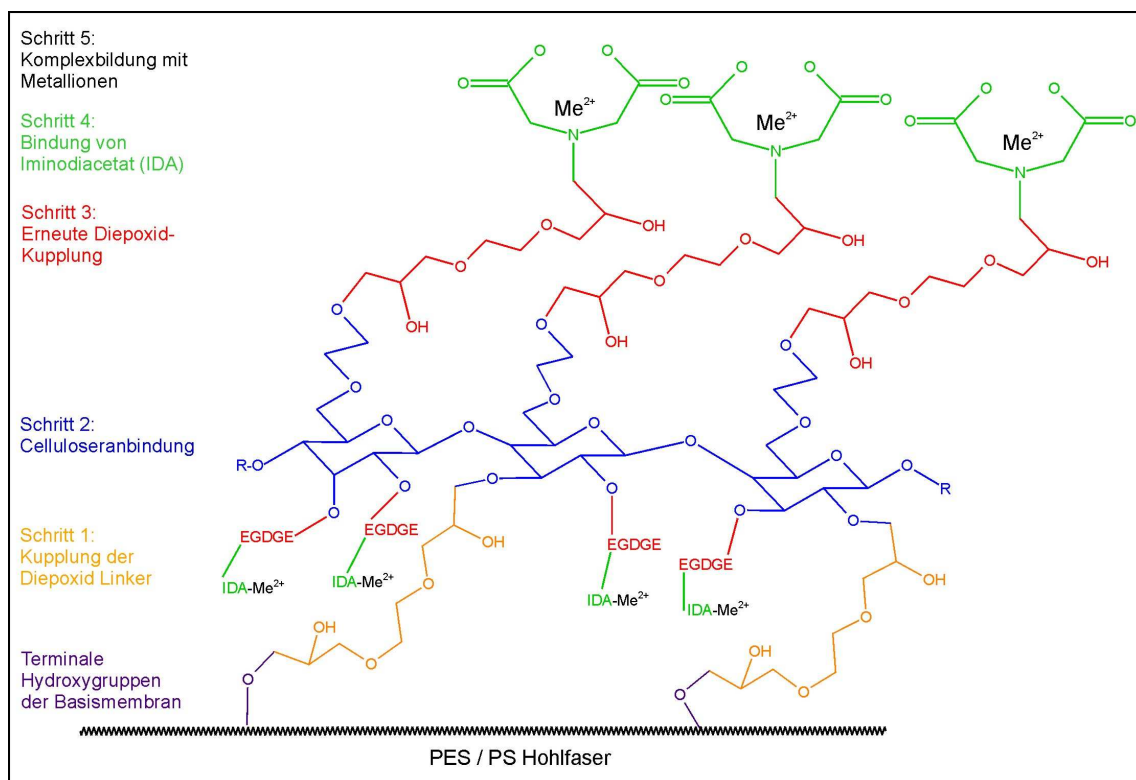


Abb. 40: Schema zu Generierung einer IMAC-funktionalisierten Hohlfaser.

Abbildung 40 visualisiert diese Strategie zur Herstellung der IMAC-Hohlfasern. Die genauen Versuchsbedingungen sind im Anhang B.11 beschrieben. Der Nachweis der Beladungsdichten nach den einzelnen Funktionalisierungsstufen erfolgt über photometrische Messmethoden sowie mittels Titrationsanalysen. Für die Bestimmung der Beladungsdichten nach dem jeweiligen Funktionalisierungsschritt wird der Acid-Orange-Assay angewendet. Zusätzlich wird die Beladungsdichte des Cellulosederivates mittels Phenol-Schwefelsäure-Assay überprüft [1].

Solch generierte IMAC-Hohlfasermembranen können im Folgenden eingesetzt werden, um die produzierten His-tag-Proteine aufzureinigen.

7.2. Aufreinigung von β -Glucanase durch Affinitätshohlfasern

Ausgehend von der Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his im MHFR-Screeningsystem (Kapitel 6.2.1.) wurde der Einsatz der IMAC-Affinitätshohlfasern für die Aufreinigung der His-getagten β -Glucanase untersucht. Da das Produkt in geringen Mengen auch sekretiert wird, kann der aufkonzentrierte Zellüberstand aus den Kultivierungen der MHFR 1 bis 3 verwendet werden.

Für die Aufreinigung wird ein Affinitätsmodul benutzt, das heißt, ein mit 43 modifizierten UltraPES-Hohlfasern versehenes Reaktormodul. Die Fasern wurden in diesem Fall nach dem in Kapitel 7.1. beschriebenen Schema funktionalisiert und die hergestellten IMAC-Hohlfasern wurden mit Cobaltionen komplexiert. Die Aufreinigung wurde analog zu den verwendeten Vivapure miniprep MC Spin Columns durchgeführt, wobei hier die Testlösung nicht durch die Membranen zentrifugiert, sondern mit Hilfe einer Peristaltikpumpe durch die Hohlfasern des Affinitätsmoduls geleitet wurde.

Die aus der Kultivierung im MHFR-Screeningsystem erhaltenen Zellüberstände wurden mit Hilfe von Vivaspin Modulen der Sartorius AG, Göttingen mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa um den Faktor 10 aufkonzentriert. Anschließend wurde das Affinitätsmodul mit 9 mL der erhaltenen Inkubationslösung beladen. Die Inkubationslösung wurde dabei für 1 h mit einer Flussrate von 5 mL/min durch die Hohlfasern gepumpt. Anschließend wurde die Inkubationslösung abgepumpt und das Affinitätsmodul 3 x mit je 10 mL Waschpuffer gespült. Die Waschschrte wurden für jeweils 10 min bei einer Flussrate von 5 mL/min durchgeführt. Für die Elution wurde das Modul für je 15 min mit jeweils 5 mL Elutionspuffer gespült. Die einzelnen Schritte des Aufreinigungsprotokolls wurden durch die Bestimmung

von Proteinkonzentration und Enzymaktivität bewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 zusammengestellt.

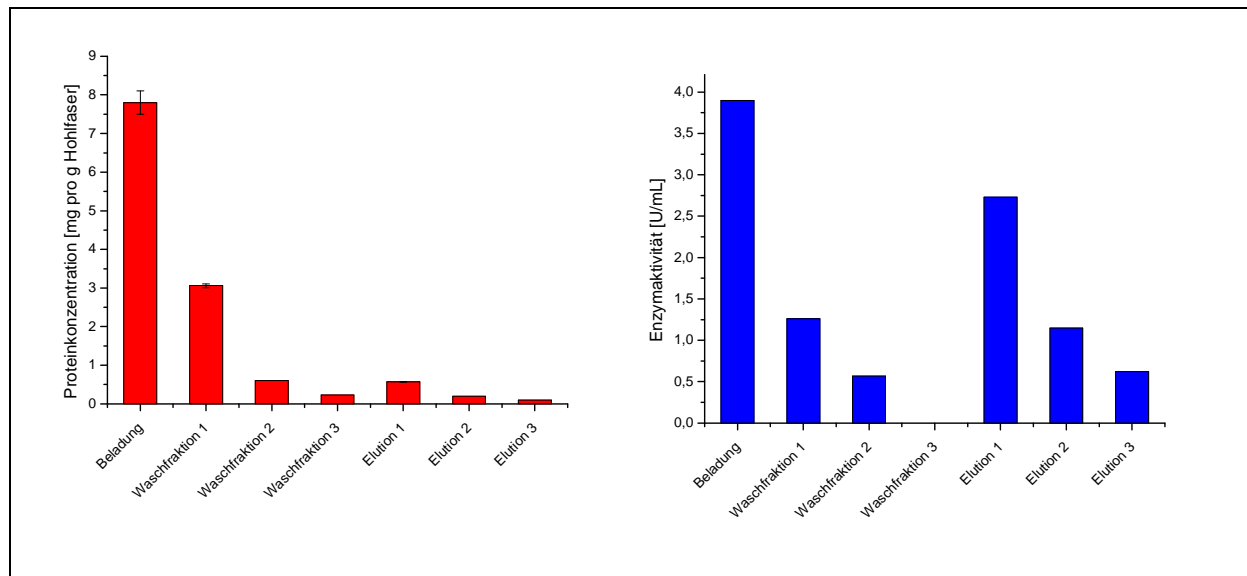


Abb. 41: Darstellung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität während der Aufreinigung von β -Glucanase aus dem Zellüberstand der Kultivierung von *E. coli* JM109 pET-bgl-his [1].

Die Proteinkonzentration während der einzelnen Schritte der Kultivierung zeigt, dass während der Beladung eine Proteinkonzentration von 7,8 mg/g Hohlfaser auf die Membranen aufgebracht werden konnte. Durch die Waschschrte werden nicht gebundene Proteine von der Membran gewaschen, dieser Anteil liegt bei 50 % der durch die Beladung aufgetrachten Proteine. Anschließend erfolgte die Elution, wobei 0,9 mg Protein von den Hohlfasern eluiert werden konnten. Da durch den zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführten Bradford-Test die Konzentration aller im Zellüberstand vorliegenden Proteine nachgewiesen wird, wurde ein spezifischer Produktnachweis über den Enzymaktivitätstest realisiert (Anhang B.8). In den Waschfraktionen 1 und 2 sind Enzymaktivitäten von 1,3 U/mL und 0,6 U/mL ermittelt worden. Dies zeigt, dass das Produkt nicht vollständig an die Fasern gebunden werden konnte. Entweder reicht die Beladungskapazität der Hohlfasern nicht für die aufgetrachten Enzymkonzentration aus oder es handelt sich um Auswascheffekte. Dabei wird die über die Metallionen realisierte Komplexbindung zum His-tag gelöst. Dennoch konnten für die Elutionsfraktionen hohe Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. So erreichte die Enzymaktivität in der ersten Elution 70 % der aus der Beladung nachgewiesener Aktivität. Die folgenden Elutionsfraktionen zeigen sinkende Enzymaktivitäten.

Folglich konnte das Zielprotein analog zur Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns erfolgreich an die IMAC-Hohlfaser gebunden und wieder eluiert werden.

7.3. Kultivierung und integrierte Produktaufarbeitung am Beispiel von *Bacillus megaterium*

Ausgehend von der Kultivierung von *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His im MHFR-Screeningsystem (Kapitel 6.2.3.) wurde der Einsatz der IMAC-Affinitätshohlfasern für die Aufreinigung der His-getagten Levansucrase untersucht. Da das Produkt sekretiert wird, jedoch durch die Hohlfasern im extrakapillaren Bereich zurückgehalten wird, soll die Levansucrase direkt während der Kultivierung an IMAC-funktionalisierte Hohlfasern gebunden werden.

Für die Kultivierung wird folglich ein MHFR benutzt, der mit 43 modifizierten UltraPES-Hohlfasern versehen wurde. Die Fasern wurden in diesem Fall nach dem in Kapitel 7.1. beschriebenen Schema funktionalisiert und die hergestellten IMAC-Hohlfasern wurden mit Cobaltionen komplexiert. Nach der Kultivierung wird die Zellbrühe abgepumpt. Anschließend wird nur ein Waschschritt durchgeführt, um eventuelle Auswascheffekte zu minimieren. Die Elution des Produkts wird mit je 5 mL Elutionspuffer durchgeführt, der für 15 min bei einer Flussrate von 5 mL/min durch die Hohlfasern gepumpt wird. Abbildung 42 zeigt die Proteinkonzentrationen für die durchgeführten Elutionsschritte.

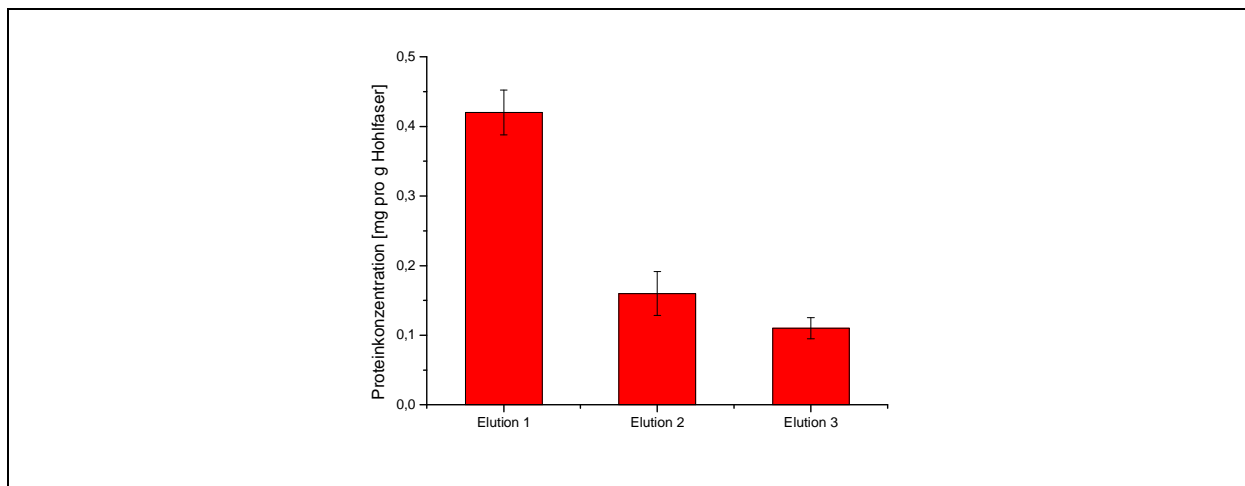


Abb. 42: Darstellung der Proteinkonzentration während der Elution von Levansucrase aus der Kultivierung von *Bacillus megaterium* pRBBm15, Lev 773His [1].

Durch die Elution konnten Proteine von der Membran eluiert werden. Die Elutionsproben zeigen sinkende Proteinkonzentrationen. 40 % des von den Hohlfasern eluierten Proteins konnte bereits mit der ersten Elution von der Hohlfaser gelöst werden.

Die erhaltenen Elutionsproben wurden auch mit Hilfe des Enzymaktivitätstests (Anhang B.7) auf die Aktivität der Levansucrase untersucht. Trotz einer hohen Aktivität von 103 U/mL in dem eingesetzten Zellüberstand konnte in den Elutionsproben keine Aktivität nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen für die nicht nachweisbare Enzymaktivität sind Biofouling der Membranen während der Kultivierung, wobei sich diverse bei der Kultivierung vorliegende organische Bestandteile auf den Hohlfasern ablagern, oder eine Hemmung der Enzymaktivität durch bei der Kultivierung oder bei der Aufreinigung vorliegende Inhibitoren. Letzteres konnte jedoch durch die Durchführung einer SDS-Page mit den erhaltenen Proben widerlegt werden, da auch hier das Enzym bei 110 kDa nicht nachzuweisen war (SDS-Page nicht dargestellt).

7.4. Zusammenfassung

Für die integrierte Produktaufarbeitung von His-tag Proteinen konnte der Aufbau von IMAC-Hohlfasern realisiert werden. Nach der Komplexierung mit Metallionen können die produzierten His-tag Proteine an die Membran gebunden werden.

Die Aufreinigung von His-getagter β -Glucanase aus *E. coli* JM109 pET-bgl-his konnte mit diesen Hohlfasern erfolgreich durchgeführt werden. Doch da das Produkt extrazellulär in geringer Konzentration vorliegt, ist ein Aufkonzentrationsschritt des Zellüberstands notwendig und somit keine direkt in die Kultivierung integrierte Produktaufarbeitung möglich.

Die integrierte Aufreinigung von Levansucrase direkt während der Kultivierung von *Bacillus megaterium* konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Die Oberfläche der funktionalisierten Hohlfasern wird durch Biofouling blockiert, bevor das Produkt an die Fasern binden kann. Für eine erfolgreiche Aufreinigung der Levansucrase könnten verschiedenen Strategien getestet werden. Die Kultivierung könnte separat durchgeführt werden, wobei ein Affinitätsmodul direkt an das Kultivierungsmodul gekoppelt werden kann. Nach Abschluss der Kultivierung könnte dann die Kulturbrühe direkt in das Affinitätsmodul geleitet werden. Alternativ könnte die in das Kultivierungsmodul integrierte Aufreinigung durch den Einsatz synthetischer Medien realisiert werden, denn das verwendete Komplexmedium beinhaltet bereits diverse Proteine, welche für die Blockierung der funktionalisierten Hohlfasern verantwortlich sein könnten. Durch den Einsatz eines definierten synthetischen Medium könnte dieser Effekt minimiert werden.

Somit konnte der Aufbau von Affinitätshohlfasern und die Aufreinigung von His-tag Proteinen über diese Hohlfasern für spezielle Problemstellungen verwirklicht werden. Zusätzlich bieten sich verschiedene Optimierungsmöglichkeiten der Bedingungen für Kultivierung und Aufreinigung an, um das große Potential von MHFR im Bereich der integrierten Produktaufarbeitung voll auszuschöpfen.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung eines neuartigen Mikro-Hohlfaserreaktors realisiert. Diese Kombination eines Bioreaktors mit einem Membranverfahren, wobei beide Prozesse integral miteinander gekoppelt sind, verspricht entscheidende Vorteile. Der Mikro-Hohlfaserreaktor kann bei der Durchführung komplexer biotechnologischer Abläufe eingesetzt werden, die in klassischen Reaktortypen nicht realisierbar sind. So kann die gezielte, effiziente sowie ökonomisch und ökologisch sinnvolle Herstellung neuer Produkte erreicht werden. Dabei soll der Mikro-Hohlfaserreaktor für die mikrobielle Produktion und ein integriertes Downstreaming eingesetzt werden.

In Kapitel 3 wurde die Realisierung dieses Projekts mit Mikro-Hohlfaserkassetten des Projektpartners Saxonia BioTec GmbH, Radeberg angestrebt. Doch verschiedene Faktoren beeinträchtigten den erfolgreichen Einsatz der Reaktorbasismodule in der Kultivierung. So konnte mit diesem Reaktor keine ausreichende Durchmischung des Reaktorvolumens im vorliegenden Design gewährleistet werden. Des Weiteren war fraglich, ob der Sauerstoffeintrag für eine Kultivierung von Mikroorganismen ausreicht. Außerdem konnte durch den Partner Saxonia BioTec GmbH, Radeberg kein definiertes Reaktorvolumen und keine definierte Faseroberfläche gewährleistet werden, welche für wissenschaftliche Arbeiten unerlässlich sind. Somit waren umfangreiche Veränderungen im Reaktoraufbau notwendig, um den Mikro-Hohlfaserreaktor im Bereich der mikrobiellen Produktion einsetzen zu können. Dennoch konnten mit Hilfe der Basismodule verschiedene Standardarbeitsanweisungen für den Einsatz der Mikro-Hohlfaserreaktoren der Biotechnologie erarbeitet werden. So konnten für den aus verschiedenen Materialien gefertigten Reaktor Desinfektions- und Sterilisationsbedingungen erarbeitet werden, die den Reaktoraufbau, insbesondere die Verklebungen und die Porenstruktur der Hohlfasern, nicht beeinträchtigen. Für die

Desinfektion wurde ein Protokoll mit Natriumhypochlorit erstellt, die Sterilisation kann aber ebenso durch γ -Strahlen ermöglicht werden. Außerdem konnte die Modellierung des Strömungsverhaltens im extrakapillaren Bereich des Mikro-Hohlfaserreaktors verwirklicht werden, die für die Optimierung der Strömungscharakteristika notwendig ist.

Im Folgenden wurde eine vollständige Neukonstruktion des Reaktors realisiert und eine Optimierung des Reaktors in Bezug auf das Strömungsverhalten im Reaktor und auf den Sauerstoffeintrag durchgeführt. Trotz zahlreicher technischer Probleme bei der Integration und Verklebung der Fasern, der Auswahl eines passenden Reaktormaterials und der Integration passender Dichtungen und Verschraubungen konnte ein funktioneller Mikro-Hohlfaserreaktor entwickelt werden. Durch die Integration eines Magnetrührstäbchens in den Reaktor konnte das Strömungsverhalten entscheidend verbessert werden. Für die Optimierung des Sauerstoffeintrags in den Reaktor wurde die Integration einer zweiten Lage Hohlfasern in den Reaktor realisiert. Dabei handelt es sich um Hohlfasern der Firma Toyobo, Japan die aus Polyvinylidifluorid bestehen und speziell für die Membranbegasung entwickelt wurden. Zusätzlich wurde der Sauerstoffeintrag durch die Begasung mit reinem Sauerstoff erhöht. Insgesamt konnte der Sauerstoffeintrag in den Reaktor um den Faktor 18 erhöht werden.

Die verschiedenen Optimierungen des Reaktors führten zu einer deutlichen Verbesserung im Bereich der Kultivierung. Dabei konnte die optische Dichte der Testkultivierung im Mikro-Hohlfaserreaktor um den Faktor 9 erhöht werden.

Der in Kapitel 6 beschriebene Aufbau eines Screeningsystems wurde nach der erfolgreichen Optimierung des Reaktorsystems vorgenommen. Dabei wurden vier Mikro-Hohlfaserreaktoren in flächigem, parallelen Aufbau angeordnet, wobei eine Anpassung des Reaktorsystems und der Analytik an die Vierfachbestimmung vorgenommen werden musste.

Im Screeningsystem wurden anschließend verschiedene Testorganismen kultiviert, wobei parallel immer eine Schüttelkolbenkultivierung als Vergleich durchgeführt wurde. Als Testorganismen wurden zwei *Escherichia coli* Stämme ausgewählt, sowie *Corynebacterium glutamicum* und *Bacillus megaterium*. Bei allen Testkultivierungen konnten in den Mikro-Hohlfaserreaktoren höhere optische Dichten erreicht sowie ein erfolgreicher Produktnachweis geführt werden. Die Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* ist durch die Möglichkeit des ISPR aufgrund des extrazellulär produzierten Serins besonders interessant für die Anwendung im Mikro-Hohlfaserreaktor. Im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung konnten um den Faktor 3,5 höhere Zelldichten und um den Faktor 2,2 höhere Serinkonzentrationen nachgewiesen werden. Das produzierte Serin diffundiert durch die

Hohlfasern in den intrakapillaren Bereich des Reaktors und könnte hier auch direkt abgeführt werden.

Für die integrierte Produktaufarbeitung von His-tag Proteinen konnte der Aufbau von IMAC-Hohlfasern realisiert werden. Die produzierten His-tag Proteine können an die mit Metallionen komplexierte Membran gebunden werden. Die Aufreinigung von His-getagter β -Glucanase aus *E. coli* JM109 pET-bgl-his konnte mit diesen Hohlfasern erfolgreich durchgeführt werden. Doch die integrierte Produktaufreinigung der durch *Bacillus megaterium* produzierten Levansucrase direkt während der Kultivierung konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Vermutlich wird die generierte Oberfläche der funktionalisierten Hohlfasern durch Biofouling blockiert, bevor das Zielprotein an die Membran binden kann.

Zusammenfassend konnte der Aufbau eines funktionellen, flexiblen Mikro-Hohlfaserreaktors realisiert werden. Trotzdem bieten sich verschiedene Optimierungsmöglichkeiten der Bedingungen für Kultivierung und Aufreinigung, um das große Potential des Mikro-Hohlfaserreaktors besonders im Bereich der integrierten Produktaufarbeitung voll auszuschöpfen. So kann zum Beispiel die Produktabführung des in *Corynebacterium glutamicum* produzierten Serin (Kapitel 6.2.2.) weiter optimiert werden.

Ein weiter Aspekt für den erfolgreichen Einsatz des Mikro-Hohlfaserreaktors ist der des Biofoulings. Zum Einen muss für den zukünftigen Einsatz untersucht werden, ob der Mikro-Hohlfaserreaktor als Einwegprodukt eingesetzt werden kann. Dazu muss die Kostenbilanz für die Herstellung optimiert werden. Alternativ könnte durch eine vollständige Entfernung des bei der Kultivierung entstehenden Biofilm eine Mehrfachverwendung verwirklicht werden. Zum Anderen muss untersucht werden, ob trotz Biofouling eine integrierte Produktaufreinigung durch die Bindung von His-tag Proteinen an IMAC-Hohlfasern während der Kultivierung möglich ist.

Zusätzlich sind weitere Modifikationen des flexiblen Reaktors für spezielle Anwendungsgebiete denkbar. So können Hohlfasern aus unterschiedlichen Materialien mit verschiedenen Porengrößen eingesetzt werden. Außerdem können diverse funktionelle Gruppen auf die Hohlfasern aufgebracht werden, um das Produkt selektiv abzutrennen.

Ein weiterer möglicher Einsatzbereich für den Mikro-Hohlfaserreaktor ist die Kultivierung von Säugerzellen. Die komplexen Kultivierungsbedingungen, wie die kontinuierliche Nährstoffversorgung sowie die notwendige blasenfreie Begasung der Zellen können durch den Mikro-Hohlfaserreaktor realisiert werden.

Anhang

A Materialien und Abkürzungen

A.1 Chemikalien und Reagenzien

Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Ausburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Ausburg
Coomassie® Brilliant Blue R 250	Serva elektrophoresis, Heidelberg
Epoxidkleber	R&G, Waldenbuch
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhypochlorit	Fluka Chemie AG, Buchs
Silikonkleber „Elastosil RT 601“	Wacker Silicone, Ottobrunn

Alle nicht gesondert angegebenen Feinchemikalien wurden von Sigma Aldrich bezogen.

A.2 Geräte

Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav „U150“	Systemec GmbH, Wettenberg
Digital-Manometer	Mannix, Lynbrook USA
Fluoreszenzspektrometer F-4500	Hitachi High Technology Europe GmbH, Mannheim
Gelelektrophorese	Bio-Rad, München
HPLC	Techlab, Erkerode

Multimixer	Variomag Poly 15, Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Photospektrometer Multiscan	Thermolabsystems, Langenselbold
Sauerstoffmessgerät	Oxy-4 micro, PreSens, Regensburg
Schüttelschrank „Certomat HK“	Sartorius AG, Göttingen
Sterilbank „LaminAir“	Holten, Allerød, Dänmark
Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf
Tischzentrifuge BioFuge Pico	Heraeus, Hanau
Ultraschallsonde	Sartorius AG, Göttingen
UV-Vis-Spektrometer	Cary 50, Varian
Vortex Mixer „Raex top“	Heidolph, Kelheim
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Julabo UC, Seelbach
Zentrifuge „IEC CL30“	Heraeus, Hanau

A.3 Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorption unit
BHI	Brain heart infusion
BSA	bovine Serum Albumin
cm	Zentimeter
DNS	Dinitrosalicylsäure
HEC	Hydroxyethylcellulose
EGDME	Ethylenglycoldimethylether
Em	Emissionswellenlänge
Ex	Excitationwellenlänge
g	Gramm
GFP	Green fluorescent Protein
h	Stunde
HD	Hämodialyse
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IDA	Iminodiessigsäure
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISPR	In-situ product removal
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar
mg	Miligramm
MHFR	Mikro-Hohlfaserreaktor
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimol
nm	Nanometer
OTR	Oxygen Transfer Rate
OPA	o-Phthaldialdehyd
PES	Polyethersulfon
PS	Polysulfon
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	rounds per minute
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
U	Unit
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

B Versuchsprotokolle und Lösungen

B.1 Medienzusammensetzung

LB-Medium:

Hefeextrakt 5 g/L

NaCl	10 g/L
Trypton	10 g/L

(Für die Kultivierung von *Bacillus megaterium* wird ein Medium mit 5 g/L NaCl verwendet.)

BHI-Medium:

BHI Bouillon	37 g/L
--------------	--------

Synthetisches Medium (CgXII):

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L
Harnstoff	2,5 g/L
K ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	10,71 g/L
KH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	5,24 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g/L
Biotin	0,2 mg/L
Thiamin-HCl	5 mg/L
CaCl ₂	0,1 g/L
Protocatechusäure	30 mg/L
CgXII Spurensalze	1 mL
Glukose	4 %

CgXII Spurensalze:

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	0,1 g/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg/L
CuSO ₄	2 mg/L
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 mg/L

B.2 Pufferlösungen

Vivapure miniprep MC Spin Columns

“Pre-Wet”-Puffer:

NaCl	0,1 M
------	-------

Equilibrationspuffer :

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH	8

Waschpuffer:

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
pH	8

Elutionspuffer:

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH	8

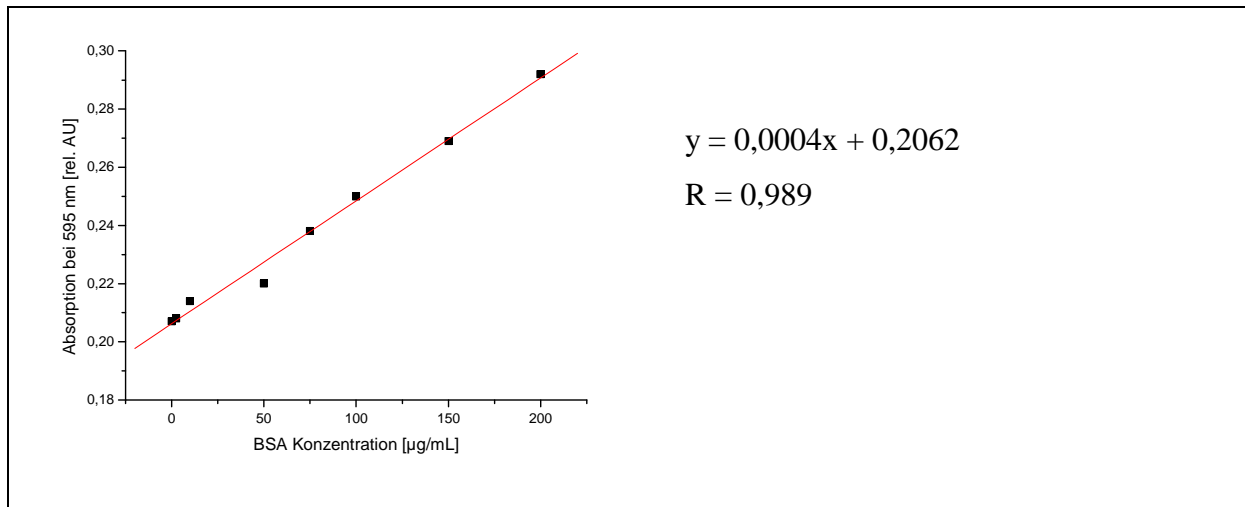
B.3 Bradford-Test

Zur Proteinbestimmung wird der Bradford Test eingesetzt. Dazu werden 900 µl Bradford-Reagenz vorgelegt, 100 µl Probe dazugegeben und gut durchmischt. Die Probe wird 5 min bei RT inkubiert und danach erneut gut gemischt. Anschließend wird die Absorption bei $\lambda_{\text{max}}=595$ nm gemessen. Alternativ wurde der Test auch im Mikrolitermaßstab in einer Mikrotiter Platte durchgeführt. Dabei wurden 90 µL Bradford Reagenz und 10 µL Probe verwendet.

Zusammensetzung des Bradford Reagenz pro Liter:

Coomassie Blue G250	0,1 g
Ethanol 95 %	50 mL
Phosphorsäure 85 %	100 mL
+ deionisiertes Wasser	

Kalibration:



B.4 Aufreinigung mit Vivapure miniprep MC Spin Columns

Die Aufreinigung der produzierten His-tag Proteine erfolgt über Vivapure miniprep MC Spin Columns, Sartorius AG, Göttingen. Für die Aufreinigung kommen verschiedene Metall-salzlösungen in Frage. Dazu gehören Cobalt, Kupfer, Nickel und Zink.

Schritt	Lösung	Aufgabemenge [µL]	Zentrifugations-	
			geschwindigkeit [rpm]	dauer [min]
Membranbeladung mit Metallionen	"Pre Wet"-Puffer	400	7.300	1
	0,5 M Metallionen Lösung	2 x 400	7.300	1
	"Pre Wet"-Puffer	2 x 400	7.300	1
Membran Equilibrierung	Equilibrations- puffer	2 x 400	5.700	1
Membranbeladung mit Proteinlösung	Probe	2 x 400	5.700	3
Waschschritt	Waschpuffer	2 x 400	5.700	3
Elution der gebundenen Proteine	Elutions- Puffer	1 x 200	4.000	3
		2 x 400	4.000	3

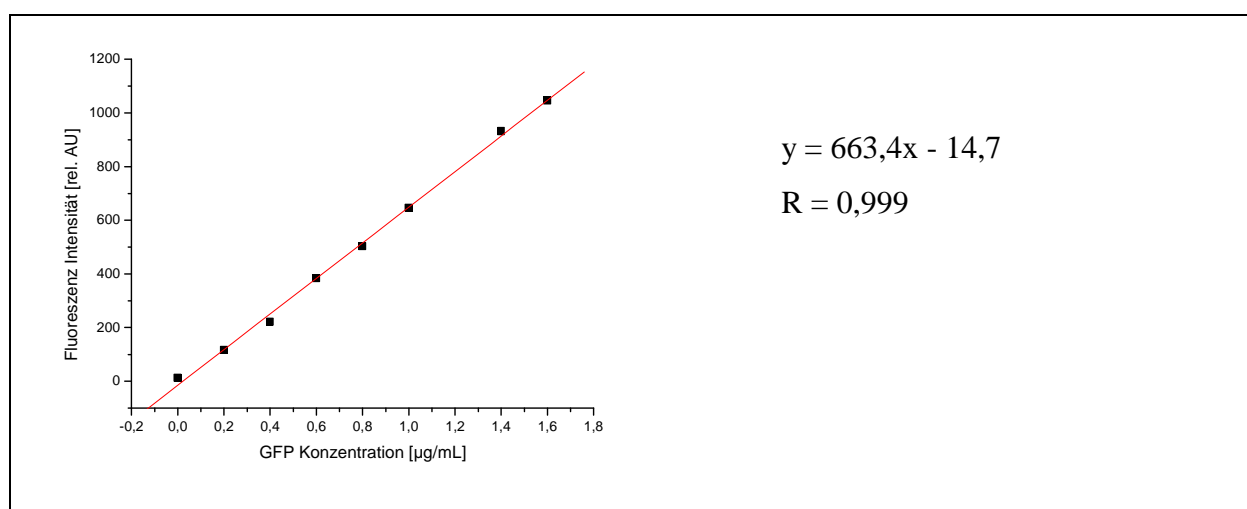
B.5 GFP-Fluoreszenzmessung

Zur Bestimmung der Fluoreszenz des GFPs werden Messungen mit dem Fluoreszenzspektrometer Hitachi F-4500 durchgeführt. Dabei kann die Messung mit aufgearbeitetem GFP in Lösung durchgeführt werden oder direkt in den *E. coli* Zellen gemessen werden. Für die intrazelluläre Messung müssen die Zellen abzentrifugiert und zwei Mal mit 0,9 % NaCl gewaschen werden, da Medienbestandteile die Messung beeinflussen können.

Einstellungen Hitachi F-4500:

Messbereich	Ex: 350 - 450 nm Em: 450 – 550 nm Intervall: 5 nm
Contour Intervall	50
SlitEx	10
SlitEm	20
PMT Voltage	700

Kalibration:



B.6 Optischer Sauerstoff Sensor: Messprinzip und Kalibration

Eingesetzt wurden Sensor spots der Firma PreSens GmbH. Das Messprinzip beruht darauf, dass Sauerstoff die Fluoreszenz einiger im Silikon eingebetteter Fluorophore wie z.B. Ruthenium(II)-[tris(4,7-diphenyl-1,10-phenantrolin)dichlorid] quencht. Dieses zeigt eine hohe Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm. In Anwesenheit von Sauerstoff verringert sich die Intensität sowie die Lebensdauer der Fluoreszenz. Dies lässt sich mathematisch durch die Stern-Volmer-Gleichung beschreiben:

$$\frac{I_0}{I_{[O_2]}} = \frac{\tau_0}{\tau_{[O_2]}} = 1 + K_{SV} \cdot [O_2]$$

I_0 : Intensität der Fluoreszenz in Abwesenheit von Sauerstoff

$I_{[O_2]}$: Intensität der Fluoreszenz in Anwesenheit von Sauerstoff

K_{SV} : Stern-Volmer-Konstante

τ_0 : Lebensdauer der Fluoreszenz in Abwesenheit von Sauerstoff

$\tau_{[O_2]}$: Lebensdauer der Fluoreszenz in Anwesenheit von Sauerstoff

Durch eine Glasfaser wird sowohl das Anregungslicht (480 nm) zum Fluorophor als auch das emittierte Fluoreszenzlicht (520 nm) verlustfrei zum Detektor geleitet. Durch einen dichroitischen Spiegel wird das emittierte Licht vom Anregungslicht getrennt. Das Fluorophor ist im Silikon eingebettet und lässt sich dadurch sterilisieren, ohne dabei geschädigt zu werden. Da ausschließlich gasförmiger Sauerstoff ins Silikon gelangen kann, wird der Sauerstoffpartialdruck pO_2 durch den Sensor erfasst. Der Sensor spot wird durch Elastosil, ein Zweikomponenten Silikon der Firma Wacker, unter die Deckplatte des MHFR geklebt.

Kalibration des Sensor spots:

Es wird bei Versuchstemperatur eine Zweipunktkalibration durchgeführt. Für die Kalibration von 0 % pO_2 werden 50 mL einer 5 g/L $NaSO_3$ Lösung in 12 mM KPP, pH 8 vorgelegt. Der Sensor spot wird eingetaucht und 1 mL einer Co^{2+} Lösung (10^{-3} M/L) dazugeben. Der Spot wird in der Lösung geschwenkt bis der angezeigte Wert konstant ist.

Für die Kalibration von 100% pO_2 werden 50 mL dest. H_2O vorgelegt und mit Hilfe von Druckluft mit Sauerstoff gesättigt. Den Spot wird in der Lösung geschwenkt bis der angezeigte Wert konstant ist.

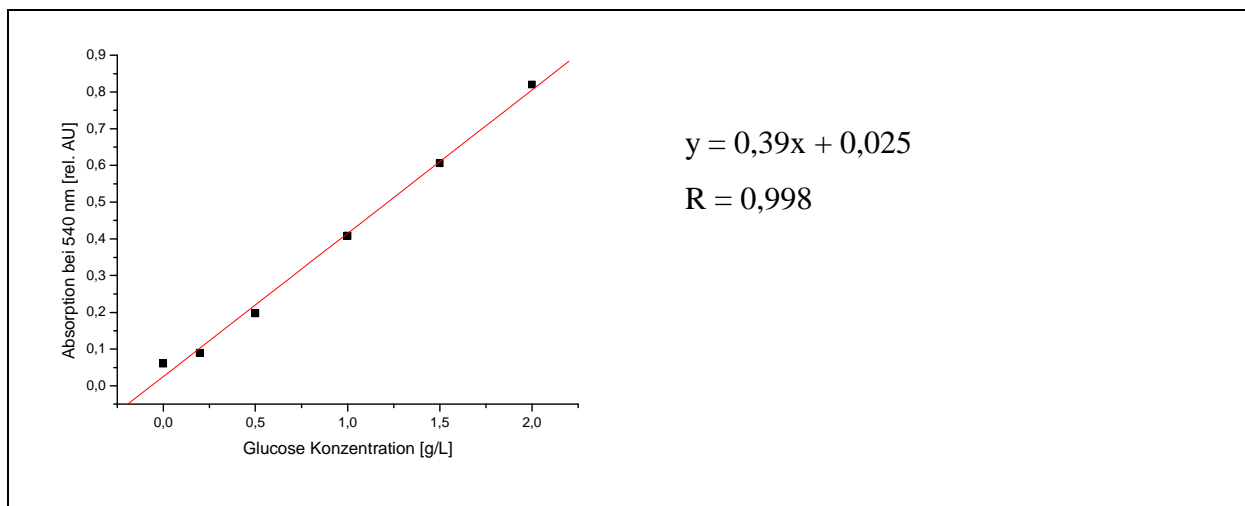
B.7 DNS Test

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration wird der DNS Test [38] verwendet. Dazu werden 100 μL Testlösung mit 100 μL DNS Reagenz versetzt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Danach wird die Probe auf Eis bis auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 1 mL deionisiertem Wasser gemischt und bei 540 nm photometrisch vermessen. Alternativ kann der DNS Test auch im Mikrolitermaßstab durchgeführt werden. Dazu werden 35 μL Testlösung mit 35 μL DNS Reagenz versetzt, die Mikrotiterplatte verschweißt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Dann wird die Probe mit 140 μL deionisiertem Wasser gemischt und bei 540 nm photometrisch vermessen.

Zusammensetzung des DNS Reagenz pro Liter:

3,5-Dinitrosalicylsäure	10 g
Kaliumnatriumtatar	300 g
Natriumhydroxid	16 g
+ deionisiertes Wasser	

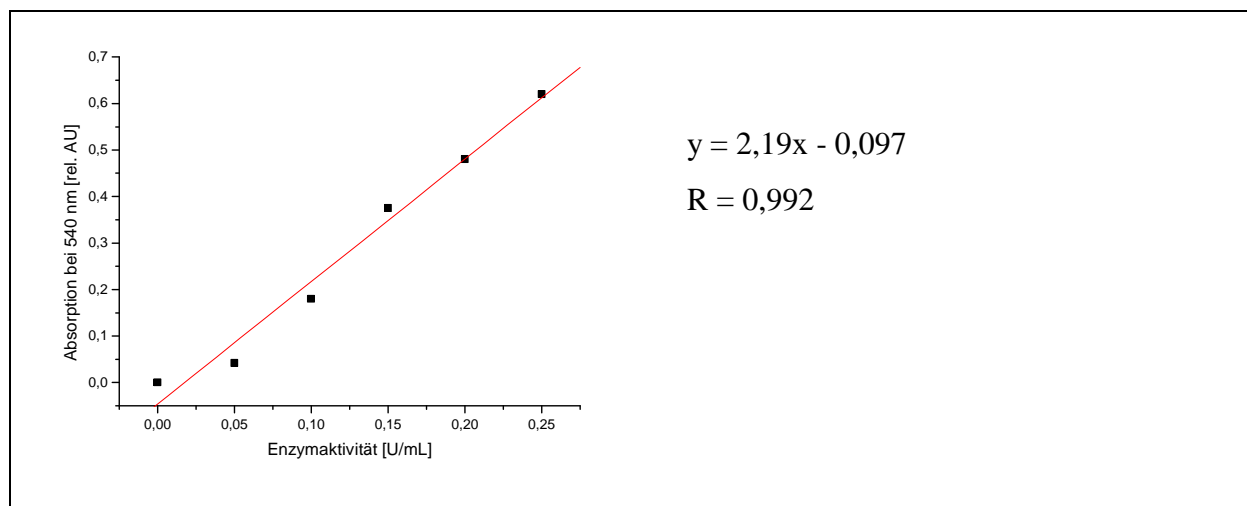
Kalibration:



B.8 β -Glucanase Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Aktivität der produzierten β -Glucanase wird β -D-Glucan als Substrat genutzt [39]. Das Enzym setzt aus dem Substrat Glukose Moleküle frei, die mit dem DNS Test nachgewiesen werden können. 720 μ L Substratlösung (1 mg/mL β -D-Glucan in 0,05 M Citrat Puffer, pH 6) werden vorgelegt und im Thermomixer auf 55 °C temperiert. Danach werden 80 μ L Probe zugegeben und bei 55 °C und 1000 rpm für 10 min im Thermomixer inkubiert. Anschließend werden 1200 μ L DNS Reagenz zugegeben und der DNS Test durchgeführt. Über eine Kalibration mit einem Enzymstandard kann die Enzymaktivität in Units berechnet werden.

Kalibration:



B.9 HPLC-Analytik von Serin

Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurekonzentration wird die reversed phase HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) angewandt. Die eingesetzte Probenmenge beträgt 10 μ L des entnommenen Zellüberstand. Die Probe wird mit 90 μ L Boratpuffer und 400 μ L Methanol versetzt. Diese Lösung wird mindestens für 24 h bei -20 °C gelagert, um die im Überstand vorhandenen Proteine zu fällen. Im Anschluss an die Proteinfällung wird die Probe zentrifugiert. 10 μ L des Überstands werden entnommen und mit Boratpuffer verdünnt. So

werden die Proben insgesamt um den Faktor 500 bis 5000 verdünnt. Nach der Verdünnung mit Boratpuffer wird die Probe für die HPLC-Messung bereitgestellt.

Vor der chromatographischen Auftrennung erfolgt eine Derivatvisierung der Aminosäuren mit den Reagenzien o-Phthaldialdehyd (OPA) und β -Mercaptoethanol, wodurch die Detektion der Aminosäuren durch einen Fluoreszenz Detektor ermöglicht wird. Dieser letzte Reaktionsschritt wird von einem Autosampler durchgeführt. Hierzu werden 15 μ l der Probe mit 50 μ l OPA-Reagenz versetzt und gemischt. Nach 1,5 min Inkubationszeit werden 10 μ l davon auf die Säule gegeben. Sobald die Injektion vollzogen ist, beginnt die Aufzeichnung der Werte des Fluoreszenzdetektors bei 420 nm (Anregungswellenlänge: 330 nm).

B.10 Levansucrase Aktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität der produzierten Levansucrase wird mit dem DNS-Aktivitätstest durchgeführt. Die Levansucrase katalysiert die Bildung des Polymers Levan. Das Enzym spaltet Saccharose in Fruktose, die in das wachsende Fruktan eingebaut wird, und in Glucose, die ins Medium freigesetzt wird. Außerdem besitzt das Enzym hydrolytische Aktivität, so dass es auch beide Monomere aus der Saccharosespaltung freisetzen kann. Die im Medium befindlichen reduzierenden Zucker (Glukose und Fruktose) können über eine Farbreaktion mit DNS Reagenz nachgewiesen und photometrisch quantifiziert werden. Aus der, in μ mol/L*min angegebenen Steigung der ermittelten Konzentrationswerte über den jeweiligen Messzeitraum kann dann die Aktivität der Levansucrase determiniert werden. Die so ermittelte Enzymaktivität beschreibt die freigesetzte Menge an Fruktose und Glukose pro Minute. Um einen Vergleich zu Literaturwerten zuzulassen wird mit einem Faktor von 0,56 multipliziert, um so eine Unit Definition zu erhalten, die die freigesetzte Menge an Glukose in μ mol pro Minute beschreibt [40,41].

Für den Aktivitätstest werden 1,35 mL Reaktionslösung mit 150 μ L Probe versetzt und bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Im Abstand von 5 bis 30 min werden je 100 μ L Probe entnommen und die Glukosekonzentration in der Testlösung mittels DNS Test (siehe Anhang B.7.) bestimmt. Alternativ kann der Test auch im Mikrolitermaßstab durchgeführt werden. Dazu werden 180 μ L Reaktionslösung mit 20 μ L Probe versetzt und bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Für die Bestimmung der Glukosekonzentration werden Proben von 35 μ L entnommen.

Zusammensetzung der Reaktionslösung:

Natriumacetat	100 mM	375 μ L
Saccharoselösung	50 % (w/v)	102,7 μ L
CaCl ₂ -Lösung	5 g/L	44,1 μ L
Natriumazid-Lösung	10 g/L	4,5 μ L
deionisiertes Wasser		823,7 μ L

B.11 Generierung von IMAC-Hohlfasern

Folgende Reaktionsschritte müssen für die Generierung von IMAC-Hohlfasern durchgeführt werden:

1. Kupplung des Diepoxids EGDGE an die Basismembran
2. Präparation der hydroxyaktivierten Matrixmembran
3. Herstellung der epoxyaktivierten Matrixmembran
4. Kupplung von Iminodiessigsäure
5. Immobilisierung von Schwermetallionen

Nachfolgend wird die Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte für eine Hohlfasermenge von 0,5 g beschrieben. Nach jedem Reaktionsschritt wird das Membranmaterial fünfmal mit je 30 mL deionisiertem Wasser gewaschen.

Für die Kupplung des Diepoxids EGDME an die Basismembran werden 50 mL einer 0,3 M EGDME-Lösung (in 2-Propanol-Wasser-Azeotrop) sowie 50 μ L 1 M Kalilauge als Katalysator auf die Hohlfasern gegeben und 15 h bei Raumtemperatur und 700 rpm im Thermomixer inkubiert.

Die Präparation der hydroxyaktivierten Matrixmembran wird mit 50 mL wässriger Hydroxyethylcellulose-Lösung (0,611 %) und 750 μ L 1 M Kalilauge als Katalysator bei 50 °C realisiert. Die Inkubationsdauer beträgt 13 h.

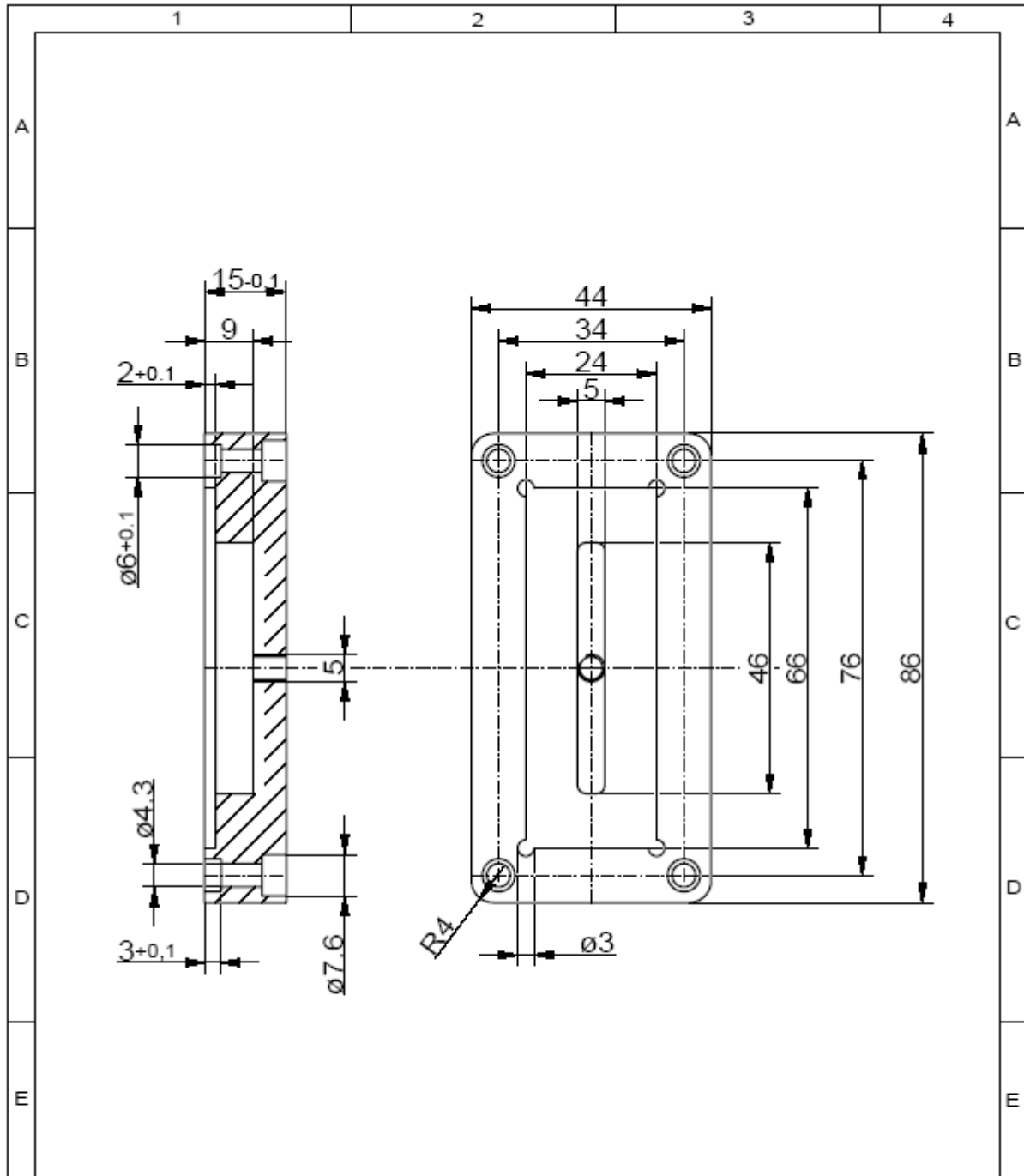
Für die Herstellung der epoxyaktivierten Matrixmembran wird eine wässrige Lösung von 8 mL EGDME, 8 mL 0,4 M NaOH und 32 mg NaBH₄ auf die Fasern aufgegeben. Natriumborhydrid verhindert dabei die Oxidation der Epoxidgruppen. Die Inkubation erfolgt bei 50 °C für 1 h.

Die Kupplung von Iminodiessigsäure wird durch Zugabe einer Reaktionslösung aus 4,7 g Natriumhydroxid in 23 mL deionisiertem Wasser, 8,7 g Iminodiessigsäure und 11 mL Methanol realisiert. Die Hohlfasern werden für 24 h bei 85 °C mit der Reaktionslösung inkubiert.

Bei der Immobilisierung von Schwermetallionen werden die Hohlfasern mit 50 mL 0,5 M Metallsulfat-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur im Thermomixer bei 700 rpm für 24 h inkubiert.

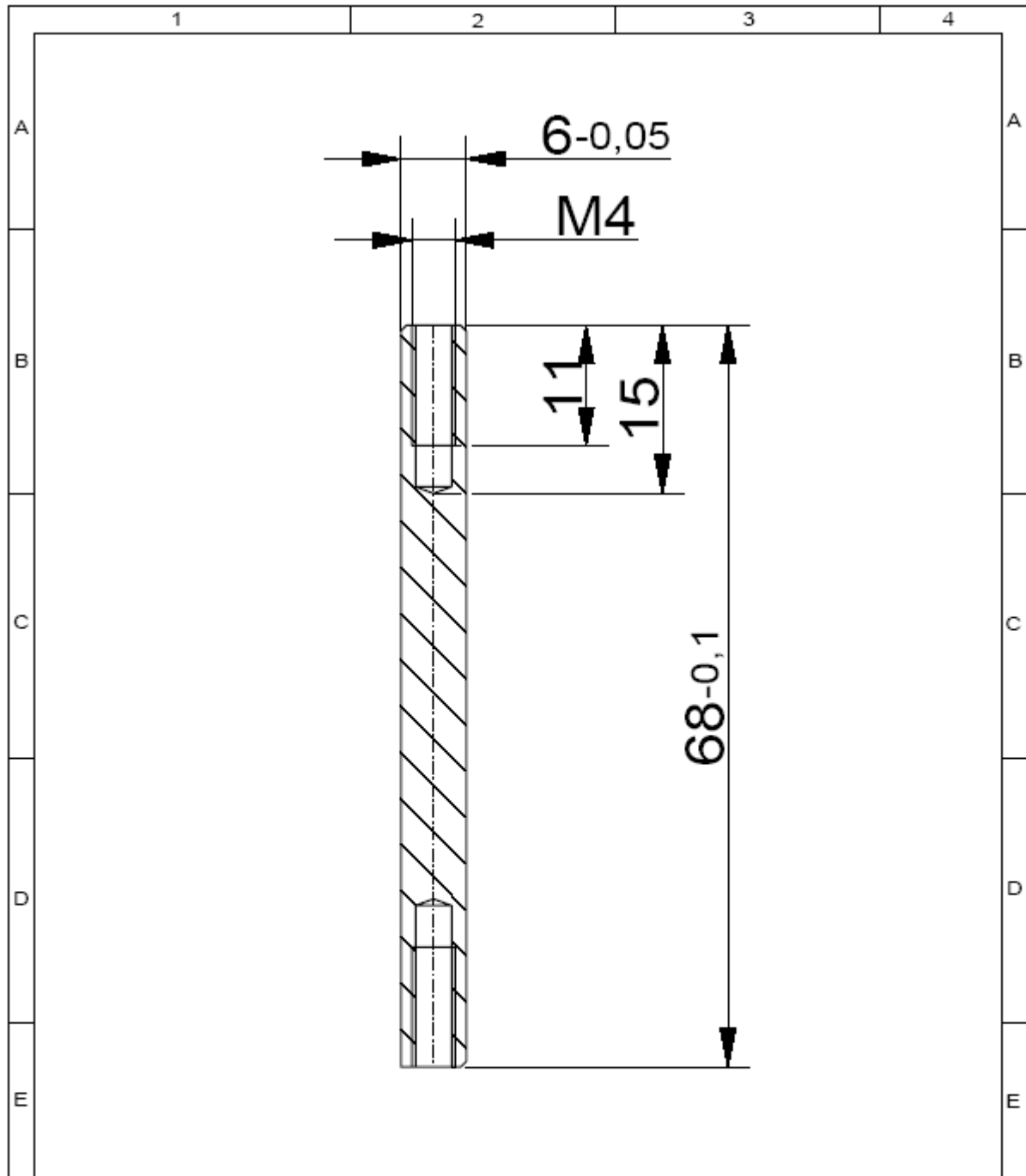
C Technische Zeichnungen der Mikro-Hohlfaserreaktoren

Intrakapillarer Anschluss für den Mikro-Hohlfaserreaktor-Grundkörper mit 43 UltraPES-Fasern



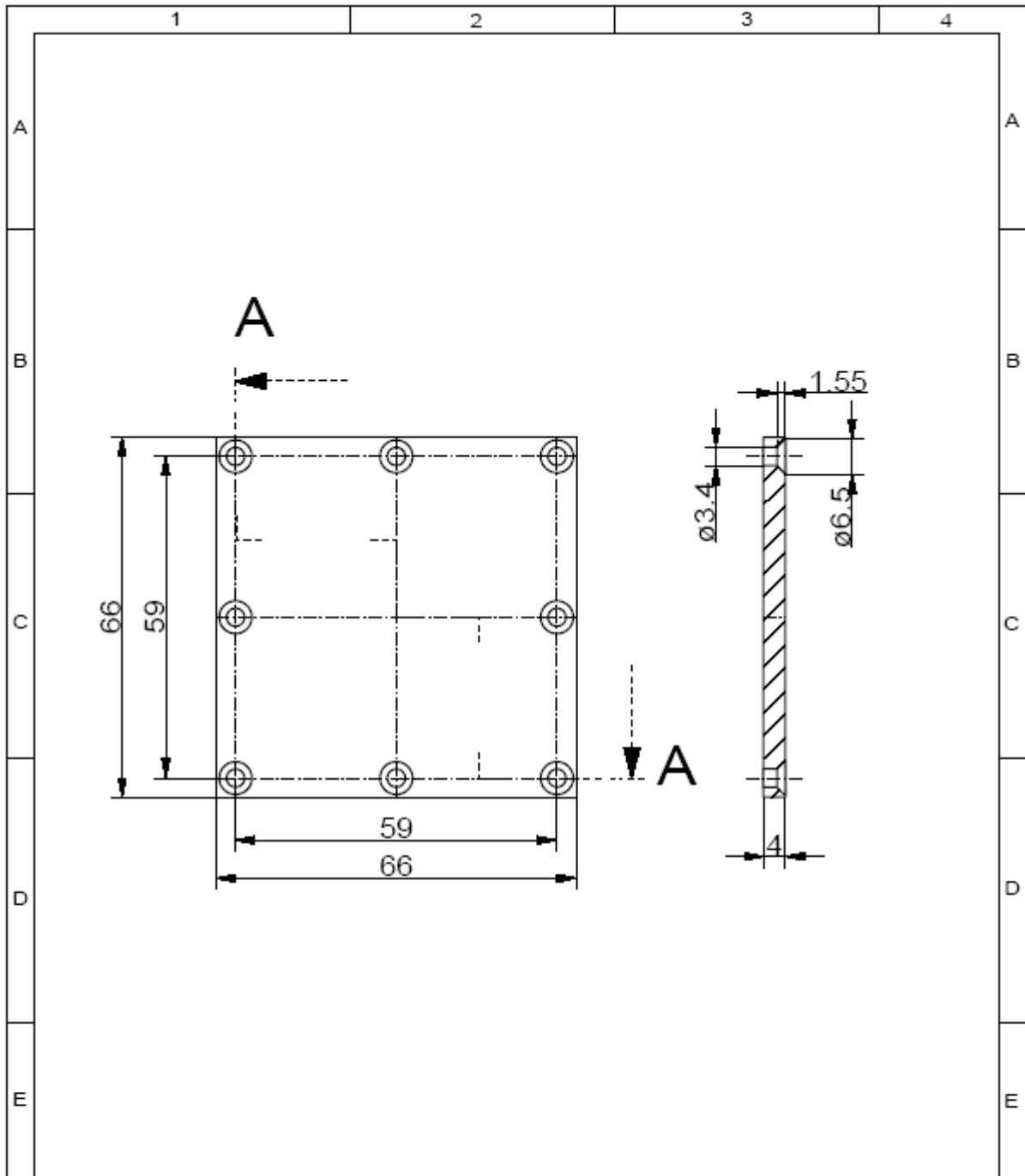
		Maße in mm Dimensions in millimeters	Zul. Abw. f. Maße ohne Toleranzang. General tolerances	Fertigzustand finished condition	Maßstab Scale 1:1	Menge Quantity 2
			Rohstoff/Raw material Rohteil-Nr./Raw piece No. PMMA Werkzeug-Nr./Tool No.			
			Benennung/Designation Seitenteil einfach			
			Datum Date Name Name Bearb. Drawn 06.08.07 Lina Meyer Gepr. Checked Norm Approved		Sachnummer/Part-No.	
			Institut für technische Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover		Blatt Sheet von of	
Ausg. Issue	Änderung Modification	Datum Date	Name Name	prt/Zeichnungen/Lina		

Verbindungswelle für den intrakapillaren Anschluss des Mikro-Hohlfaserreaktors



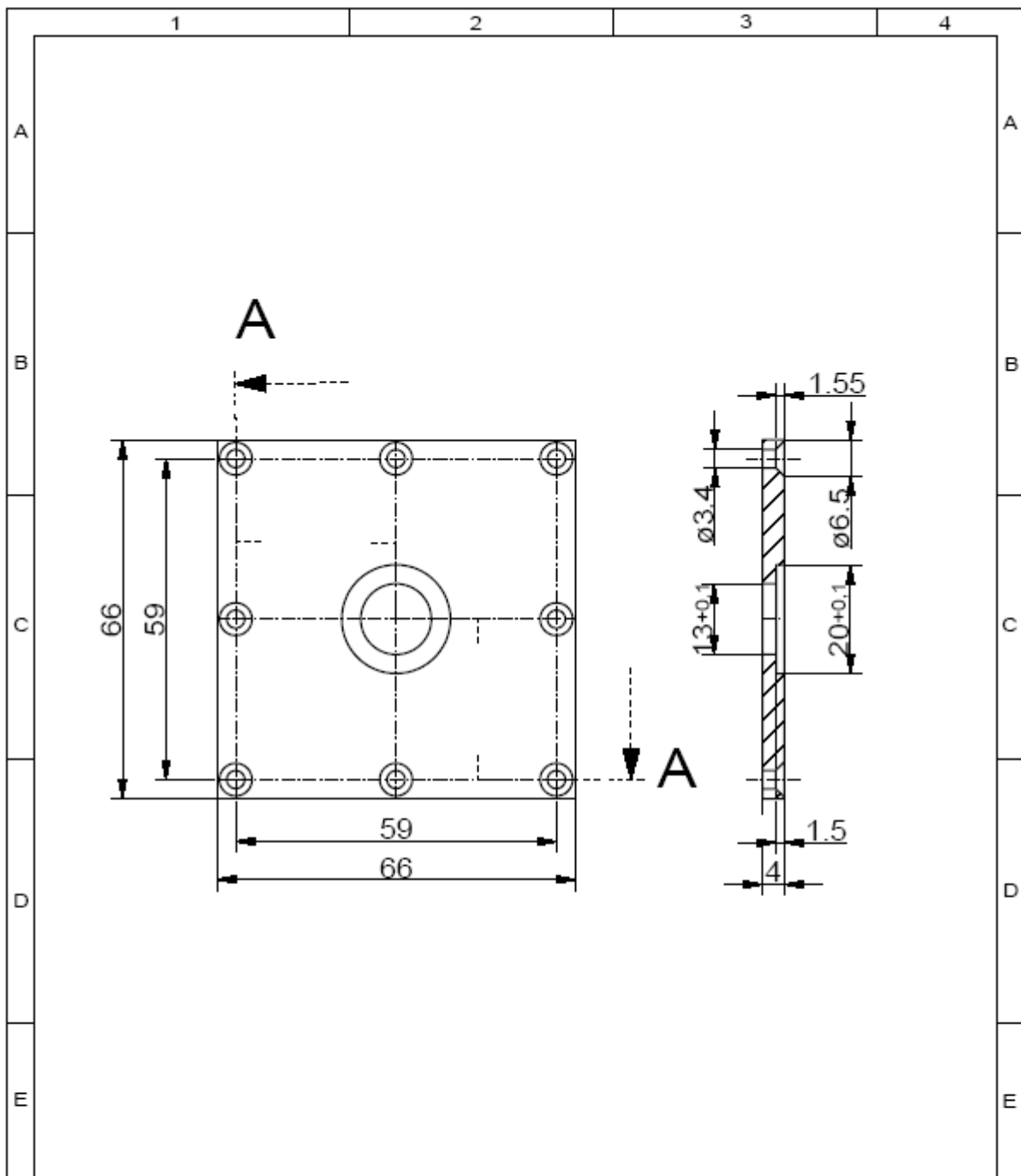
		Maße in mm Dimensions in millimeters	Zul. Abw. f. Maße ohne Toleranzang. General tolerances	Fertigzustand finished condition	Maßstab Scale 1:2	Menge Quantity 2
			Rohstoff/Raw material Rohteil-Nr./Raw piece No. Messing Werkzeug-Nr./Tool No.			
			Benennung/Designation Verbindungswelle			
			Datum Date 06.08.07		Name Name L.Meyer	
			Bearb. Drawn			
			Gepr. Checked			
			Norm Approved			
			Institut für technische Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover			Sachnummer/Part-No.
						Blatt Sheet von of
Ausg. Issue	Änderung Modification	Datum Date	Name Name	prt/Zeichnungen/Lina		

Deckplatte für den Mikro-Hohlfaser-Grundkörper



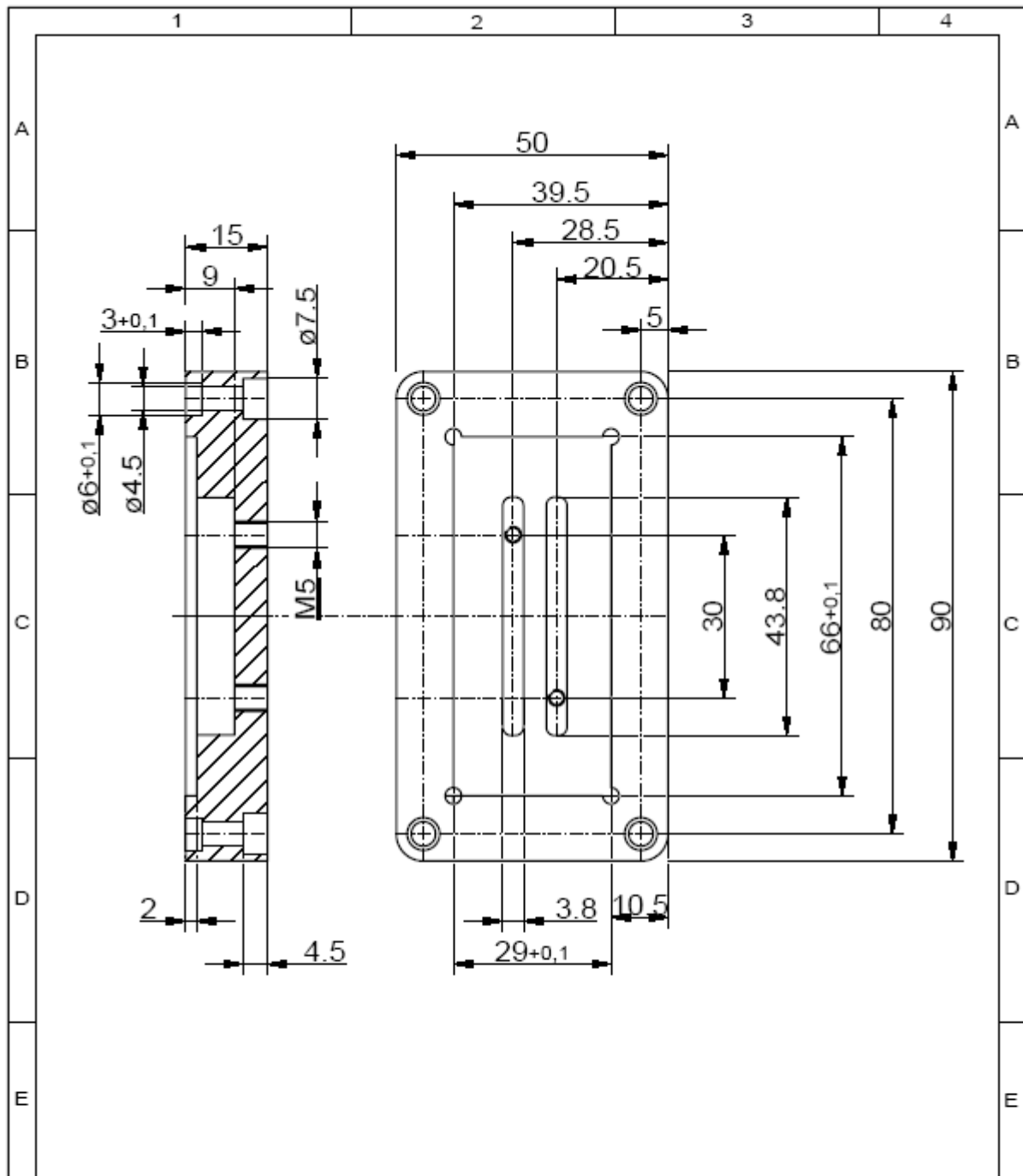
		Maße in mm Dimensions in millimeters	Zul. Abw. f. Maße ohne Toleranzangaben General tolerances	Fertigzustand finished condition	Maßstab Scale 1:1	Menge Quantity 1
				Rohstoff/Raw material Rohteil-Nr./Raw piece No. PMMA Werkzeug-Nr./Tool No.		
				Benennung/Designation Deckel		
				Sachnummer/Part-No.		Blatt Sheet
						von of
Ausg. Issue	Änderung Modification	Datum Date	Name Name	Dateiname Dateiname	Ursprung Source prt/Zeichnungen/lina	
				Bearb. Drawn 06.08.07	Name Name Lina Meyer	
				Gepr. Checked		
				Norm. Approved		
				Institut für technische Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover		

Deckplatte für den Mikro-Hohlfaser-Grundkörper mit Probenahme



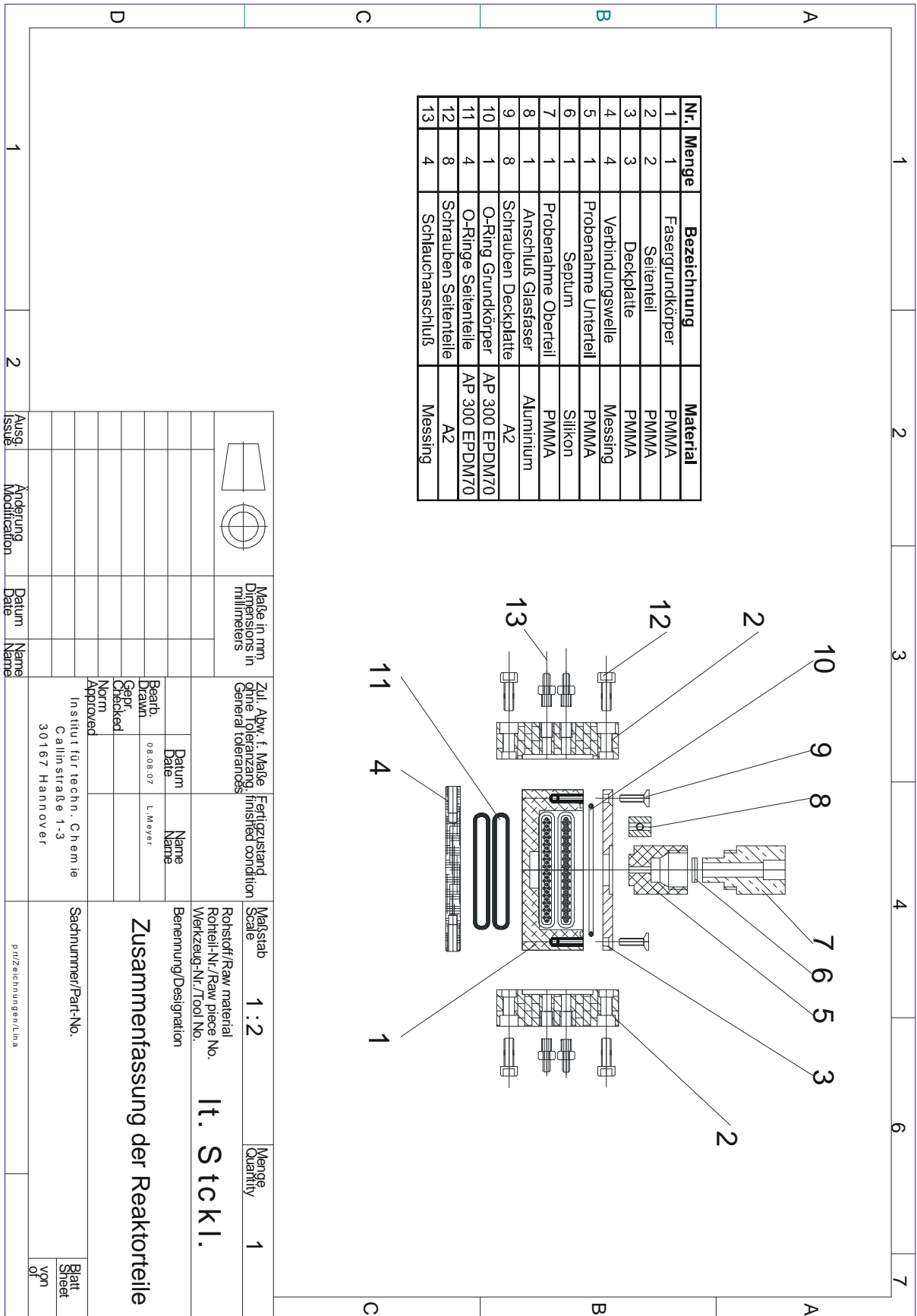
		Maße in mm Dimensions in millimeters	Zul. Abw. f. Maße ohne Toleranzang. General tolerances	Fertigzustand finished condition	Maßstab Scale 1:1	Menge Quantity 1
					Rohstoff/Raw material Rohtteil-Nr./Raw piece No. PMMA Werkzeug-Nr./Tool No.	
					Benennung/Designation	
					Deckel mit Probennahme	
					Sachnummer/Part-No.	
					Blatt Sheet von of	
Ausg. Issue	Änderung Modification	Datum Date	Name Name	Datum Date	Name Name	Ursprung Source prt/Zeichnungen/lina
				Bearb. Drawn 06.08.07	Lina Meyer	
				Gepr. Checked		
				Norm Approved		
Institut für technische Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover						

Intrakapillarer Anschluss für den Mikro-Hohlfaserreaktor-Grundkörper mit 43 UltraPES-Fasern



		Maße in mm Dimensions in millimeters		Zul. Abw. f. Maße ohne Toleranzang. General tolerances		Fertigzustand finished condition		Maßstab Scale 1:1		Menge Quantity 1	
								Rohstoff/Raw material Rohteil-Nr./Raw piece No. Plexiglas Werkzeug-Nr./Tool No.			
				Datum Date				Name Name			
				Benennung/Designation				Seitenteil doppelt			
				Institut für technische Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover				Sachnummer/Part-No.			
								Blatt Sheet von of			
Ausg. Issue		Änderung Modification		Datum Date		Name Name		prt/Zeichnungen/Lina			

Expositionszeichnung des Mikro-Hohlfaserreaktors mit 43 UltraPES-Fasern und 43 Toyobo-Fasern



Nr.	Menge	Bezeichnung	Material
1	1	Fasergrundkörper	PMMA
2	2	Seitenteil	PMMA
3	3	Deckplatte	PMMA
4	4	Verbindungswelle	Messing
5	1	Probenahme Unterteil	PMMA
6	1	Septum	Silikon
7	1	Probenahme Oberenteil	PMMA
8	1	Anschluß Glasfaser	Aluminium
9	8	Schrauben Deckplatte	A2
10	1	O-Ring Grundkörper	AP 300 EPDM70
11	4	O-Ringe Seitenteile	AP 300 EPDM70
12	8	Schrauben Seitenteile	A2
13	4	Schlauchanschluß	Messing

		Maße in mm Dimensions in millimeters	
Zül. Abw. f. Maße ohne Toleranzang. General tolerances		Fertigungsstand Finished condition	
Bearb. Datum 08.08.07 Gepr. L. Meyer Checked	Norm Approved	Maßstab 1:2 Rohstoff-/Raw material Rohteil-Nr./Raw piece No. Werkzeug-Nr./Tool No. Benennung/Designation	Menge 1 Quantity
Institut für techn. Chemie Callinstraße 1-3 30167 Hannover		Sachnummer/Part-No.	
Blatt 1 Sheet of 1		pr Zeichnungen/Lin a	

lt. Stckl.
Zusammenfassung der Reaktorteile

Literaturverzeichnis

1. Kroll, S., Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing, Dissertation, 2008.
2. Sanchez Marcano, J.G. and T.T. Tsotsis, Catalytic Membranes and Membrane Reactors, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003.
3. Möckel, D., Ultrafiltrationsmembranen aus hydrophilisiertem Polysulfon – Verminderung der Foulingneigung? Universität Gesamthochschule Essen, Dissertation, 1998.
4. Julbe, A., D. Farrusseng, and C. Guizard, Porous ceramic membranes for catalytic reactors - overview and new ideas, Journal of Membrane Science, 181(1): p. 3-20, 2001.
5. Ehrfeld, W., Hessel, V., Lehr, H., Microreactors for chemical synthesis and biotechnology - Current developments and future applications, Microsystem Technology in Chemistry and Life Science – Topics in Current Chemistry, 194, 233-252, 1998.
6. Haswell, S.J., Watts, P., Green chemistry: synthesis in micro reactors, Green Chemistry, 5 (2), 240-249, 2003.
7. Klemm, E., Rudek, M., Markowz, G., Schütte, R., Mikroverfahrenstechnik, Weinacker/ Kückler, Chemische Technik: Prozesse und Produkte 2: Neue Technologien, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004.
8. Chmiel, H., Bioprozesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.

9. Westermann, T. and Melin, T., Membranreaktoren, Chemie Ingenieur Technik, 2 (77): p. 1655-1668, 2005.
10. Kotzelski, J., Kinetische Untersuchungen an synthetischen Enzymmembranen aus reaktivem Polysulfon, Universität Gesamthochschule Essen, Dissertation, 1991.
11. Rodemann, K., Synthese und Charakterisierung von Affinitätsmembranen auf Basis von Polysulfon, Universität Gesamthochschule Essen, Dissertation, 1994.
12. Xu, J., Ruan, G., Gao, X., Pan, X., Sue, B., Gao, C., Pilot study of inside-out and outside-in hollow fiber UF modules as direct pretreatment of seawater at low temperature for reverse osmosis, Desalination, 219, 179-189, 2008.
13. Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., De Wilde, D., De Koning, W., van der Graaf, D., Wintgens, T., Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse, Desalination 187, 271–282, 2006.
14. Inloes, D.S., Michaels, A.S., Robertson, C.R., Matin, A., Ethanol-production by nitrogen-deficient yeast-cells immobilized in a hollow-fiber membrane bioreactor, Applied Microbiology and Biotechnology, 23 (2), 85-91, 1985.
15. Reimann, A., Biebl, H., Deckwer, W.D., Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling, Applied Microbiology and Biotechnology, 49 (4): 359-363, 1998.
16. Inloes, D.S., Smith, W.J., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S., Robertson, C.R., Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *escherichia-coli* for protein-synthesis, Biotechnology and Bioengineering, 25 (11), 2653-2681, 1983.
17. Smiley, K.L., Hensley, D.E., Gasdorf, H.J., Alpha-galactosidase production and use in a hollow-fiber reactor, Applied and Environmental Microbiology, 31 (4), 615-617, 1976.

18. Vandemerbel, N.C., Zuur, P., Frijlink, M., Holthuis, J.J.M., Lingeman, H., Brinkman, U.A.T., Automated monitoring of amino-acids during fermentation processes using online ultrafiltration and column liquid-chromatography – application to fermentation medium improvement, *Analytica Chimica Acta*, 303 (2-3), 175-185, 1995.
19. Buntmeyer, H., Bohme, C., Lehmann, J., Evaluation of membranes for use in online cell-separation during mammalian-cell perfusion processes, *Cytotechnology* 15 (1-3), 243-251, 1994.
20. Fey-Lamprecht, F., Albrecht, W., Groth, T., Weigel, T., Gross, U., Morphological studies on the culture of kidney epithelial cells in a fiber-in-fiber bioreactor design with hollow fiber membranes, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 65A (2), 144-157, 2003.
21. Giorno, L., Drioli, E., Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, *TIBTECH*, August 2008.
22. Oertzen, G.A., Entwicklung und Modellierung eines Enzym-Hohlfaserreaktors mit immobilisierter Invertase, VDI-Verlag GmbH, 1992.
23. Hilke, R., Das Doppelfiltermodul – ein Hohlfasermodulsystem mit integrierten Filtrations- und Refiltrationsabschnitten, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Dissertation, 1999.
24. Kawai, T., Saito, K., Lee, W., Protein binding to polymer brush, based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions. *Journal of Chromatographie B*, 790, 131-142, 2003.
25. Takors, R., Ganzzell-ISPR-Prozessentwicklung: Chancen und Risiken, *Chemie Ingenieur Technik*, 76, 12, 1857-1864, 2004.

26. Ruffer, N., Heidersdorf, U., Kretzers, I., Sprenger, G.A., Raeven, L., Takors, R., Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*, *Bioprocess Biosystem Engineering*, 26, 239–248, 2004.
27. Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C., Datta, S., Studies on the fraction of beta-lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography, *Journal of Membrane Science*, 275, 141-150, 2006.
28. Kökpinar, Ö., Harkensee, D., Kasper, C., Scheper, T., Zeidler, R., Reif, O.W., Ulber, R., Innovative Modular Membrane Adsorber System for High-Throughput Downstream Screening for Protein Purification, *Biotechnology Progress*, 22, 1215-1219, 2006.
29. Harkensee, D., Kökpinar, Ö., Walter, J., Kasper, C., Beutel, S., Reif, O.W., Scheper, T., Ulber, R., Fast Screening for the Purification of Proteins Using Membrane Adsorber Technology, *Engineering Life Science*, 7, No. 4, 388–394, 2007.
30. Lottspeich, F., Zorbas, H., Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
31. Henis, J.M., Tripodi, M.K., Stimpson, D.I., Modified polymeric surfaces and process for preparing same, US Pat. 4,794,002, 1998.
32. Klein, E., Eichholz, E., Yeager, D.H., Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers, *Journal of membrane science*, 90, 69-80, 1994.
33. Rodemann, K., Staude, E., Synthesis and characterisation of affinity membranes made from polysulfone, *Journal of membrane science*, 88, 271-278, 1994.
34. Penna, T.C.V., Mazzola, P.G., Martins, A.M.S., The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs, *BMC Infectious Diseases*, 1:16, 2001.

35. Koivunen, J., Heinonen-Tanski, H., Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments, *Water Research* 39, 1519-1526, 2005.
36. Weuster-Botz, D., Parallel Reactor Systems for Bioprocess Development, *Biochem Engin/Biotechnol*, 92: 125–143, 2005.
37. Villain, L., Meyer, L., Kroll, S., Beutel, S., Scheper, T., Development of a Novel Membrane Aerated Hollow-Fiber Microbioreactor, *Biotechnology Progress*, 24, 367-371, 2008,.
38. Miller, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, Vol. 31, No. 3, March 1959.
39. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry*, S. 266 ff., 1987.
40. van Hijum, SAFT, Bonting, K., van der Maarel, MJEC, et al., Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced, *FEMS Microbiology Letters*, 205, 2, 323-328, 2001.
41. Malten, M., Nahrstedt, H., Meinhardt, F., et al., Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941, *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 5, 616-621, 2005.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lina Meyer
Geburtsdatum	23.03.1980
Geburtsort	Gehrden
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1986 - 1990	Grundschule Gehrden
1990 - 1992	Orientierungsstufe Gehrden
1992 - 1999	Matthias Claudius Gymnasium Gehrden

Hochschulbildung

1999 - 2001	Grundstudium Biologie an der Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Vordiplom Biologie
2001 - 2002	Studium Life Science an der Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.)
2002 - 2004	Studium Life Science an der Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Master of Science (M.Sc.)
05/2004 – 11/2004	Masterarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover. Thema: <i>Innovative Aufarbeitung pflanzlicher Wirkstoffe.</i>
Seit 12/2004	Promotion am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover. Thema: <i>Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in der Zellkulturtechnik.</i>