

**Biosynthetische Produktion von  
humanidentischer Polysialinsäure in  
*Escherichia coli* K1**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat-  
genehmigte

**Dissertation**

von

**Dipl.-Chem. Bastian Rode**

geboren am 27. 04. 1978, in Langenhagen

Hannover, im August 2008

**Referent:** Prof. Dr. Thomas Scheper

**Korreferent:** Prof. Dr. Bernd Hitzmann

**Tag der Prüfung:** 22. 08. 2008

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, August 2008



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2004 bis Januar 2008 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm danke ich besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und Hilfe bei allen Fragen rund um die Bioinformatik.

Beim gesamten Arbeitskreis und allen Angestellten des Instituts für Technische Chemie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und drei tolle gemeinsame Jahre bedanken. Es sind in dieser Zeit viele neue Freundschaften entstanden und ich hoffe, dass man sich nicht so schnell aus den Augen verliert.

Mein spezieller Dank gilt:

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung, und Frau Prof. Dr. Gerardy-Schahn für die Leitung des Projekts „PolySia - Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizieller Gewebe“, die mir dadurch die Arbeit an diesem Thema ermöglicht haben.

Christian Endres, Chen Ran und Friederike Sempf für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplom-, Promotions- und Schwerpunktarbeiten.

Yvonne Stark, Kai Bechstein, Sebastian Galuska, Dieter Albert, Christin Menneking, Friedrich Freiberger, David Schwarzer und Ulrike Assmann für die gute Zusammenarbeit vor allem bei der Produktanalytik.

Martina Weiß und Martin Pähler, ohne die der Institustalltag niemals so unkompliziert und problemlos ablaufen könnte.

Sascha Beutel und Conny Kasper für die vielen Gespräche, Anregungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

allen Mitarbeitern der Mechanik- und Elektronikwerkstatt für die vielen kleinen Hilfen bei so manchen Problemen.

meiner Familie und meiner Freundin Julia Lietz, die mir während der ganzen Zeit zur Seite standen und mich immer wieder aufgebaut haben wenn es mal wieder nicht so lief wie es sollte.

... und zu guter Letzt noch allen, die ich vergessen habe.

# Zusammenfassung

Bastian Rode

## **Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1**

Polysialinsäure ( $\alpha$ 2,8-verknüpfte poly-5-N-Acetylneuraminsäure, polySia) ist im menschlichen Gehirn an wichtigen Prozessen während der Embryonalentwicklung beteiligt, da sie das Migrations- und Proliferationsvermögen der Nervenzellen erhält. Sie ist daher ein möglicherweise sehr guter geeigneter Werkstoff zur Erstellung von Matrices für die in-vitro Regeneration von Nervengewebe. Die Darstellung von polySia kann durch die Isolierung aus bestimmten Bakterienarten, wie *Escherichia coli* K1, erfolgen, die auf ihrer Oberfläche strukturidentische Polysaccharide ausbilden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Produktionsprozesses von humanidentischer Polysialinsäure aus *E.coli* K1. Auf dem klassischen mikrobiologischen Weg wurden durch Screeningversuche verschiedene K1-Stämme auf ihre polySia-Produktivität untersucht und das Wachstumsmedium optimiert. Durch ein scale-up vom Schüttelkolben bis hin zum 10-L-Bioreaktormaßstab und die Entwicklung einer fed-batch-Strategie, konnte die Produktivität um 96 % von 0,28 g/L auf 0,55 g/L gesteigert werden.

Der anschließende Downstreamprozess umfasste eine Zellseparation durch kontinuierliche Zentrifugation, ein Konzentrierungsschritt durch cross-flow Ultrafiltration und eine Vorreinigung des Produkts durch eine Sequenz von aufeinander abgestimmten Präzipitationsschritten. Ein Produktpolishing durch Größenausschlusschromatographie und Dialyse und die Produktabscheidung durch Gefriertrocknung komplettierten den Downstreamprozess. Die Aufarbeitung einer 10-L-Kultur lieferte nach der beschriebenen Methode 0,8-2 g Polysialinsäure mit einer Ausbeute von 17-37 %.

Das fertige Produkt wurde durch verschiedene Analysemethoden hinsichtlich der Reinheit und Kettenlängenverteilung charakterisiert. Die Polysialinsäure konnte in guter Reinheit mit einer Kettenlänge von >130 Einheiten isoliert werden.

Stichworte: Polysialinsäure, *Escherichia coli* K1, biosynthetischer Produktionsprozess

# Abstract

Bastian Rode

## **Biosynthetic production of human-identical polysialic acid in *Escherichia coli* K1**

During the embryonic development polysialic acid ( $\alpha$ 2,8-linked poly-5-N-Acetylneuraminic acid, polySia) is essential in the human brain as it conserves the nerve cells ability for migration and proliferation. Thus, the polysaccharide might be a suitable substance for the application as a scaffold material in in-vitro nerve tissue regeneration. The preparation of polySia can be achieved by isolating the polysaccharide from some kinds of bacteria, like *Escherichia coli* K1, which are encapsulated by a similar polymer.

This work describes the development of a production process for human-identical polysialic acid from *E.coli* K1. Using classical microbiological methods different K1-strains and culture media were screened for their influence on the polySia-productivity. By a scale-up from shaking flask to 10-L-bioreactor scale and the development of a fed-batch strategy the productivity could be increased by 96 % from 0.28 to 0.55 g/L.

The following downstream process included the cell separation by continuous centrifugation, a concentration step by cross-flow ultrafiltration and a rough purification of the product by a series of concerted precipitations. A product polishing by size exclusion chromatography and dialysis completed the process. Finally the product was separated by lyophilisation. The described process yielded about 0.8-2 g (17-37 %) polysialic acid from a 10-L-culture of *E.coli* K1.

The isolated product was further investigated concerning contaminations and chain length. The analysis revealed a good purity and a maximal chain length of >130 residues.

keywords: polysialic acid, *Escherichia coli* K1, biosynthetic production process

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	<b>Theoretischer Teil</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Sialin- und Polysialinsäure</b>	<b>4</b>
2.1	Struktur	4
2.2	Polysialinsäure in Vertebraten	6
2.3	Oberflächenpolysaccharide von Bakterien	8
2.4	Biosynthese von Polysialinsäure	11
<b>3</b>	<b>Gewinnung von Polysacchariden</b>	<b>14</b>
	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Quantifizierung von (Poly-)Sialinsäuren</b>	<b>17</b>
4.1	TBA-Assay für Sialinsäuren	17
4.2	TBA-Assay für Polysialinsäuren	19
4.2.1	Einfluss der Hydrolysedauer	20
4.2.2	Einfluss der Säurekonzentration	21
4.2.3	Einfluss der chemischen Umgebung	23
4.3	Zusammenfassung und Diskussion	24
<b>5</b>	<b>Screeningversuche in Schüttelkolben</b>	<b>26</b>
5.1	Stammsscreening	26
5.2	Medienscreening	28
5.2.1	Puffersysteme	29
5.2.2	Substrat/N-Quelle	31
5.3	Zusammenfassung und Diskussion	34
<b>6</b>	<b>Prozessoptimierung im 2-L-Bioreaktor</b>	<b>38</b>
6.1	Batch-Kultivierung	39
6.1.1	Kultivierung in G/A(KPP)-Medium	39
6.1.2	Kultivierung in X/P(KPP)-Medium	43
6.2	Fed-batch Kultivierung	45
6.3	Zusammenfassung und Diskussion	49
<b>7</b>	<b>Polysia-Produktion im 10-L-Bioreaktor</b>	<b>52</b>
7.1	Batch-Produktion in G/A(KPP)-Medium	52
7.2	Zusammenfassung und Diskussion	55
<b>8</b>	<b>Downstreaming von Polysialinsäure</b>	<b>57</b>
8.1	PSA-Freisetzung aus den Zellen	58
8.1.1	Mechanischer Zellaufschluss	58
8.1.2	Chemischer Zellaufschluss	59



# **Inhaltsverzeichnis**

8.1.3	Kontrollierte chemische und enzymatische Freisetzung .....	61
8.1.4	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	63
<b>8.2</b>	<b>Zellernte und -separation .....</b>	<b>64</b>
8.2.1	Kontinuierliche Zentrifugation .....	64
8.2.2	Cross-flow Filtration .....	65
8.2.3	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	66
<b>8.3</b>	<b>Konzentration des Überstands .....</b>	<b>67</b>
8.3.1	Cross-flow Ultrafiltration .....	67
8.3.2	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	68
<b>8.4</b>	<b>Fällungsreaktionen .....</b>	<b>69</b>
8.4.1	Fällungsverhalten von Colominsäure .....	69
8.4.2	Fällungsverhalten von K1-Polysialinsäure .....	72
8.4.3	Entwicklung einer Fällungsstrategie .....	76
8.4.4	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	79
<b>8.5</b>	<b>Größenausschlusschromatographie .....</b>	<b>81</b>
8.5.1	Laufverhalten von Sialinsäure und Colominsäure .....	82
8.5.2	Laufverhalten von K1-polySia und Kontaminanten .....	83
8.5.3	Aufreinigung von K1-polySia .....	86
8.5.4	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	87
<b>8.6</b>	<b>Entsalzung .....</b>	<b>89</b>
8.6.1	Dialyse .....	89
8.6.2	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	90
<b>8.7</b>	<b>Produktabscheidung .....</b>	<b>90</b>
8.7.1	Lyophilisation .....	91
8.7.2	Sprühtrocknung .....	92
8.7.3	Diskussion und übernommener Prozessschritt .....	94
<b>8.8</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Produktbeschreibung .....</b>	<b>98</b>
<b>9.1</b>	<b>Produktreinheit .....</b>	<b>98</b>
9.1.1	IR-Spektroskopie .....	98
9.1.2	NMR-Spektroskopie .....	100
9.1.3	ICP-OES .....	102
9.1.4	DNA/RNA-Bestimmung .....	103
<b>9.2</b>	<b>Polymerisationsgrad .....</b>	<b>103</b>
9.2.1	Gelelektrophorese .....	103
9.2.2	DMB-HPLC .....	104
9.2.3	Osmometrie .....	105
<b>9.3</b>	<b>Diskussion und Zusammenfassung .....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>109</b>

# **Inhaltsverzeichnis**

---

<b>Anhang</b> .....	<b>115</b>
<b>11 Material und Methoden</b> .....	<b>115</b>
<b>11.1 <i>Escherichia coli</i> K1-Stämme</b> .....	<b>115</b>
11.1.1 Stammbeschreibung .....	115
11.1.2 Stammhaltung.....	116
<b>11.2 Kulturmedien</b> .....	<b>116</b>
11.2.1 Komplexmedien .....	116
11.2.2 Synthetische Medien .....	117
<b>11.3 Bioreaktoren und Komponenten</b> .....	<b>119</b>
11.3.1 Biostat B .....	119
11.3.2 Biostat C .....	120
11.3.3 Abgasanalytik und respiratorischer Quotient .....	121
11.3.4 Datenaufzeichnung.....	122
<b>11.4 Analytik</b> .....	<b>122</b>
11.4.1 Optische Dichte .....	123
11.4.2 Glucose.....	123
11.4.3 Ethanol.....	123
11.4.4 (Poly-)Sialinsäure (TBA-Assay) .....	123
11.4.5 Proteine (Bradford-Assay).....	126
11.4.6 Prolin .....	127
<b>11.5 Methoden</b> .....	<b>129</b>
11.5.1 Gelchromatographie .....	129
11.5.2 Dialyse.....	129
11.5.3 ICP-OES .....	130
11.5.4 DMB-HPLC-FD .....	130
11.5.5 Gelelektrophorese.....	132
11.5.6 Osmometrie-Messungen.....	135
<b>12 Abkürzungen</b> .....	<b>136</b>
<b>13 Literatur</b> .....	<b>138</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>145</b>
<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>146</b>

### 1 Einleitung

Polysaccharide übernehmen einige wichtige biochemische Schlüsselfunktionen des täglichen Lebens. Ob als Energiespeicher, Strukturbildner oder mit komplexeren Funktionen als Erkennungsmoleküle, sind sie in vielen Bereichen der Natur anzutreffen. Nicht selten ist Glucose dabei der zugrunde liegende Baustein der Polymere. Pflanzen können den Energielieferanten in Form von Stärke speichern, welche sich aus Amylose (poly- $\alpha$ 1,4-Glucose) und Amylopectin (verzweigte poly- $\alpha$ 1,4- $\alpha$ 1,6-Glucose) zusammensetzt. In einem einzigen Molekül Stärke können dabei bis zu 1.200 Einheiten Glucose enthalten sein. Bei steigendem Polymerisations- und Verzweigungsgrad (<100.000 Einheiten) spricht man schließlich von Glycogen, welches die bevorzugte Speicherform von Glucose in tierischen Zellen darstellt. Als Energiespeicher fungierende Polysaccharide werden allgemein hin auch als Kohlenhydrate bezeichnet.

Eine andere Form der Glucose, welcher eher ein mechanischer Nutzen zukommt, ist die Cellulose (poly- $\beta$ 1,4-Glucose). Das geradlinige wasserunlösliche Polysaccharid ist ein strukturgebender Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände und sehr widerstandsfähig gegen chemische und enzymatische Hydrolyse. Cellulose ist ein unverzichtbarer Rohstoff in der Papier- und Bekleidungsindustrie und wird außerdem als Nahrungsmittelzusatz (Ballaststoff) verwendet.

Jedoch nicht nur Glucose spielt eine Rolle beim Aufbau von Polysacchariden. Die in jüngster Zeit oft erwähnte Hyaluronsäure zum Beispiel setzt sich vielmehr aus einer Disaccharidkette bestehend aus D-Glucuronsäure und  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosamin zusammen. Hyaluronsäure besitzt eine sehr ausgeprägte Fähigkeit Wasser zu speichern und ist Hauptbestandteil des Glaskörpers im Auge und der Synovialflüssigkeit in Gelenken.

Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Polysacchariden am Aufbau und der Charakterisierung von Zellmembranen beteiligt. In Form von Glycoproteinen (bzw. Proteoglycanen) oder Glycolipiden sind sie für den Schutz der Zelle mitverantwortlich und dienen außerdem als Erkennungsmoleküle [SHAW C. et al., 2001].

## **1 Einleitung**

---

Eine spezielle Gruppe der zahlreichen Oberflächenpolysaccharide stellen die Polysialinsäuren (kurz polySia) dar. Polysialinsäure ist sowohl in den niedrigsten Lebensformen wie den Bakterien als auch im am höchsten entwickelten Organismus, dem Menschen, zu finden, jedoch nicht in Arthropoden und Pflanzen [TROY F.A., 1992]. Die genaue Zusammensetzung kann je nach Herkunftsart jedoch sehr unterschiedlich sein. In Wirbeltieren ist das Vorkommen nahezu auf das Nervengewebe beschränkt, wo sie als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) auftritt [HUSMANN M. et al., 1990]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Polysialinsäure an zahlreichen wichtigen Prozessen wie der Embryogenese, des neuronalen Zellwachstums und der Differentiation beteiligt ist [TROY F.A., 1992]. Darüber hinaus zeigt sie Agglomerationseigenschaften und besitzt ein hohes Potential für chemische Modifikationen. Das unter physiologischen Bedingungen stabile Polysaccharid kann außerdem gezielt durch den Einsatz spezieller Enzyme (Endosialidasen) abgebaut werden. All die genannten Eigenschaften führten zu der Annahme, dass Polysialinsäure ein möglicherweise ideales Gerüstmaterial für die biomedizinische Geweberegeneration darstellen könnte.

Für umfassende Studien zur Charakterisierung und Untersuchung des Materials ist eine ausreichende Verfügbarkeit notwendig. Die Isolierung aus menschlichem Gewebe gestaltet sich dabei aufgrund der geringen Verfügbarkeit und aus ethischen Gründen als schwierig. Die vollsynthetische Darstellung scheitert an der nicht steuerbaren glycosidischen Polymerisation der Monomere, wodurch ein unspezifisches Gemisch an verzweigten Heteropolymeren entstehen kann. Eine enzymatische in-vitro Darstellung ist im Moment in Entwicklung aber noch nicht im großen Maßstab einsatzbereit.

Eine klassische Methode für die Gewinnung von Polysialinsäure stellt die Isolierung aus Mikroorganismen dar. Manche Bakterien (*Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis* B) bilden Polysaccharide auf der Zelloberfläche aus, die absolut struktidentisch mit der im menschlichen Körper nachgewiesenen polySia ist. Durch gezielte Vermehrung dieser Bakterien und anschließende Aufarbeitung der Polysaccharide ist ein nahezu unbegrenzter Zugang zu dem gewünschten Material möglich.

## 1 Einleitung

---

Die vorliegende Arbeit behandelt daher die Entwicklung und Etablierung eines Herstellungsprozesses für humanidentische Polysialinsäure aus *E.coli* K1 Bakterien. Das Arbeitsfeld unterteilt sich dabei in drei Hauptbereiche:

- 1) **Produktion:** Im Bereich Produktion werden Experimente zusammengefasst, die sich mit der Kultivierung der Mikroorganismen beschäftigen. Zur Optimierung der Produktausbeute sollen verschiedene Screening-Versuche durchgeführt werden, die sich mit der Stamm- und Medienauswahl beschäftigen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen schließlich bis in den Produktionsmaßstab übertragen werden.
  
- 2) **Downstreaming:** Der Downstreambereich beschäftigt sich mit der Produktisolierung und -aufarbeitung. Es soll ein Protokoll für eine effektive Aufreinigung des Produkts erarbeitet werden. Das finale Produkt soll dabei einen möglichst hohen Polymerisationsgrad aufweisen und in hoher Reinheit vorliegen.
  
- 3) **Produktbeschreibung:** Die Produktbeschreibung umfasst eine detaillierte Analytik des reinen, fertigen Produkts. Im Vordergrund hierbei soll besonders die Bewertung der Produktqualität und -reinheit stehen. Eine gezielte Auswahl an Methoden soll zur Sicherstellung gleich bleibender Qualität getroffen werden.

## Theoretischer Teil

### 2 Sialin- und Polysialinsäure

Die Bezeichnung Sialinsäuren steht als Oberbegriff für eine Gruppe von Sacchariden mit bestimmten strukturellen Eigenschaften. In der Natur treten sie häufig als Teile biofunktioneller Polysaccharide auf. Im Folgenden wird der grundlegende Aufbau dieser (Poly-)Saccharide beschrieben und deren Vorkommen in der Natur und die jeweilige Funktionalität erläutert.

#### 2.1 Struktur

Allen Sialinsäuren ist ein Zuckergrundgerüst bestehend aus neun Kohlenstoffatomen gemein. Charakteristisch dabei ist eine Carboxylfunktion an Position eins, die in wässriger Umgebung für eine saure Reaktion ( $pK_s \sim 2,2$ ) der Verbindungen verantwortlich ist [TRAVING C. et al., 1998]. Die einfachste und für Derivate namensgebende Form wird durch die Neuraminsäure (Abbildung 2.1) beschrieben, die an Position fünf eine Aminogruppe trägt. Derivate entstehen hauptsächlich durch Substitutionen an der Amin- bzw. den Hydroxyfunktionen. Insgesamt sind über vierzig natürlich auftretende Sialinsäuren bekannt [SCHAUER R., 2000].

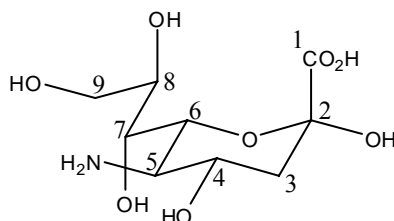
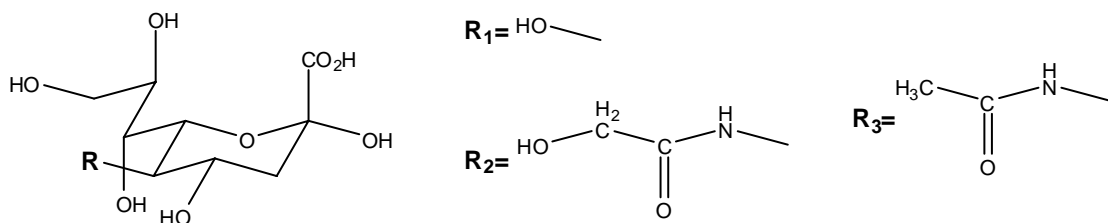


Abbildung 2.1: Struktur der Neuraminsäure.

Mögliche Substituenten am C<sub>5</sub> stellen N-Acetyl-, N-Glycolyl- oder einfach Hydroxyfunktionen dar. Die OH-Gruppen in den Positionen vier, sieben, acht und neun sind oft in acetylierter Form anzutreffen. An C<sub>8</sub> bzw. C<sub>9</sub> können darüber hinaus Hydroxymethyl, Sulfat- und Phosphatreste auftreten [TRAVING C. et al., 1998]. Wichtige, in der Natur häufig vorkommende, Vertreter sind die 5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure (Kdn), die 5-N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und die 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), zu sehen in Abbildung 2.2. Letztere stellt dabei mit Abstand die am weitesten verbreitete Form dar und wird daher oft irreführenderweise stellvertretend als „die Sialinsäure“ bezeichnet.

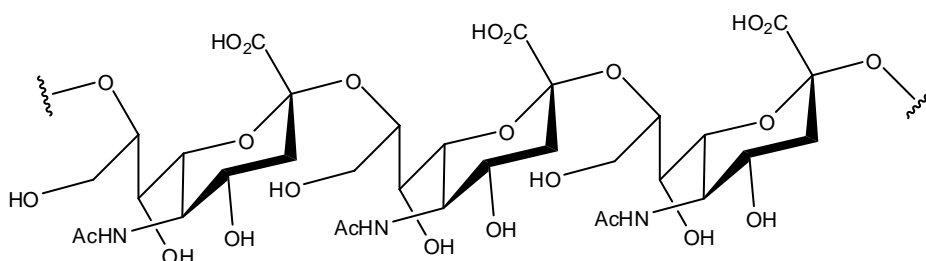


**Abbildung 2.2:** Strukturen von drei wichtigen Vertretern aus der Gruppe der natürlichen Sialinsäuren. R<sub>1</sub>: 5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure (Kdn); R<sub>2</sub>: 5-N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc); R<sub>3</sub>: 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac).

Treten Sialinsäuren als Teile natürlich vorkommender Polysaccharide auf, sind die einzelnen Bausteine über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Am häufigsten sind die Hydroxy-Gruppen in den Positionen zwei, acht und neun an der Polymerisation beteiligt, wobei sowohl homo- als auch hetero-Strukturen gebildet werden können. Kritisch für eine charakteristische Ausbildung einer Tertiärstruktur sind die negativen Ladungen der Carboxylfunktionen. Physiochemische Untersuchungen offenbarten einen Aufbau der Ketten aus helikalen Segmenten mit einer Größe von etwa neun Einheiten [HAYRINEN J. et al., 1995]. Die Tertiärstruktur spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Polysialinsäure mit verschiedenen Enzymen. So haben zum Beispiel spezifische monoklonale Antikörper keine Bindungsaffinität zu Oligomeren mit einer Kettenlänge unter neun Sialinsäureresten [FINNE J. et al., 1985] und auch das degradierende Enzym Endoneuraminidase N benötigt mindestens acht Reste für eine wirksame Katalyseleistung. Chemische Modifikationen an Polysialinsäure, die zu einer Substitution der Carboxylgruppe führten (z.B. Reduktion zum

primären Alkohol), zogen eine grundlegende Veränderung der Tertiärstruktur und damit der immunologischen Eigenschaften des Polysaccharids nach sich [PON R.A. et al., 1997].

Auch in der Polymerform bilden Neu5Ac, Neu5Gc und Kdn die Hauptbestandteile der natürlichen Verbindungen. Eine Sonderstellung innerhalb der Vielzahl der möglichen Polysialinsäuren stellt die  $\alpha$ 2,8-verknüpfte poly-5-N-Acetylneuraminsäure dar.



**Abbildung 2.3:** Struktur von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter poly-5-N-Acetylneuraminsäure.

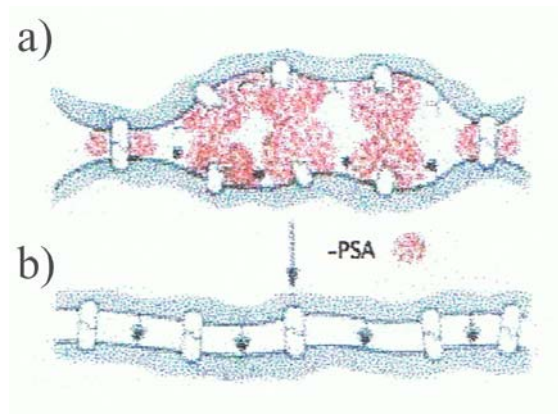
Nähere Informationen hierzu sind in den Kapiteln 2.2 und 2.3 zu finden. Wie auch schon beim Monomer steht der Name Polysialinsäure hier oft stellvertretend für diese eine bestimmte Form. Niedermolekulare  $\alpha$ 2,8-verknüpfte poly-5-N-Acetylneuraminsäure wird auch als Colominsäure bezeichnet [MCGUIRE E.J. et al., 1964]. Für die genaue Grenze der Kettenlänge gibt es jedoch keine feste Übereinkunft.

## 2.2 Polysialinsäure in Vertebraten

In Wirbeltieren kann Polysialinsäure in nahezu allen Gewebeteilen nachgewiesen werden. Die größte strukturelle Vielfalt findet sich dabei unter den Fischen [REGLERO A. et al., 1993]. In Säugetieren hingegen treten ausschließlich homopolymere Strukturen bestehend aus überwiegend Neu5Ac und Kdn auf [MUHLENHOFF M. et al., 1998]. Im Menschen, und nur dort, wird die in Kapitel 2.1 beschriebene homopolymere Form der  $\alpha$ 2,8-verknüpften poly-5-N-Acetylneuraminsäure gebildet. Die räumliche Verteilung der Polysialinsäure im Körper ist jedoch nicht einheitlich. Die höchsten Konzentrationen finden sich im zentralen Nervensystem. Das Polysaccharid tritt dabei auf der Zelloberfläche als posttranslationale Modifikation des



neuralem Zelladhäsionsmolekül (NCAM) auf. Durch die Blockade der Adhäsionsproteine verhindert das voluminöse Makromolekül den Zell-Zell-Kontakt und ermöglicht der isolierten Zelle somit die Fähigkeit zur Teilung, zum Wachstum und zur Wanderung [HUSMANN M. et al., 1990].



**Abbildung 2.4:** a) Mit Polysialinsäure besetzte NCAM sind blockiert. Das voluminöse Polysaccharid fungiert als Spacer zwischen den Zellen. b) Ohne Polysialinsäure adhären die Zellen durch koppelnde NCAM und es bilden sich Zellagglomerate (Gewebe) [RUTISHAUSER U., 1996].

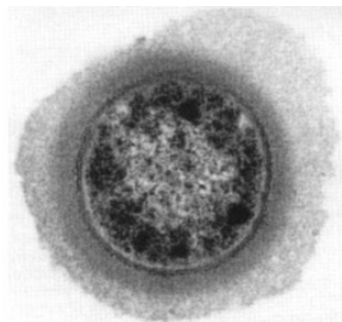
Auch die zeitliche Verteilung ist nicht konstant und weist ein Maximum während der Embryonalentwicklung, besonders in der perinatalen Phase auf. Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) ist Polysialinsäure in viele wichtige Prozesse wie der Zellmigration, des Neuritenwachstums und der Synapsenbildung involviert [KLEENE R. et al., 2004]. Untersuchungen in Mäusen zeigten, dass Polysialinsäure als eine Art wachstumsunterstützende Matrix im sich entwickelnden Gehirn angesehen werden kann. In Knockout-Experimenten kam es in polysialinsäurefreien Versuchstieren zu einer drastischen Fehlbildung im ZNS [WEINHOLD B. et al., 2005], die Tiere waren nicht überlebensfähig. Kürzliche Studien zeigten darüber hinaus, dass die Reaktivierung der Polysialinsäuresynthese im ausgewachsenen Gehirn neuronale Regeneration auslösen und unterstützen kann [EL MAAROUF A. et al., 2005; EL MAAROUF A. et al., 2006].

Höhere Mengen an Sialinsäure konnten ebenfalls in der Niere [TROY F.A., 1992] und in verschiedenen Körperflüssigkeiten, besonders aber in der Muttermilch, nachgewiesen werden. Hier liegt sie meist endständig an heterogenen Polysacchariden vor.

Wang und Brand-Miller stellten aufgrund von Studien, die den Zusammenhang von Brusternährung und Intelligenzquotient verschiedener Probanden untersuchten, die Theorie auf, dass auch die äußere Zuführung von Sialinsäure einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns hat [WANG B. et al., 2003].

### 2.3 Oberflächenpolysaccharide von Bakterien

Polysialinsäure kommt jedoch nicht nur im Reich der Wirbeltiere vor. Die mit Abstand größte Vielfalt ist unter den Bakterien anzutreffen. Hier bilden sie jedoch wiederum nur einen geringen Anteil an einem breiten Spektrum möglicher Polysaccharide. Im Allgemeinen befinden sich Polysaccharide bei den Einzellern ebenfalls auf der Zelloberfläche. Sie sind jedoch im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen nicht über Proteine sondern vielmehr über Lipide gebunden. Oberflächenpolysaccharide fungieren als Antigene und bestimmen somit den Serotyp von Bakterien.



**Abbildung 2.5:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Bakteriums mit hydratisierter kapselartiger Polysaccharidhülle (Quelle unbekannt).

Bei der Bakterienart *Escherichia coli* werden zwei Hauptgruppen von Antigenen unterschieden; der O-Typ und der K-Typ. Alleine hier sind insgesamt über 170 verschiedene O-Serotypen und mehr als 80 verschiedene K-Serotypen bekannt [WHITFIELD C., 2006]. Charakteristisch für die O-Antigene, auch Lipopolysaccharide (LPS) genannt, ist die Bindung an einen Lipid A-Anker. Lipid A, auch bekannt als Endotoxin, wird bei der Bakterienlyse freigesetzt und ist verantwortlich für die

Auslösung schwerer Sepsis bei einem infizierten Wirt [ORSKOV I. et al., 1977]. Die Bezeichnung K-Antigen stammt aus dem deutschen Wort für „Kapsel“ [BLISS J. et al., 1996] und bezeichnet die typische dichte Struktur an Polysacchariden, durch die das Bakterium regelrecht „eingekapselt“ wird. Durch die zusätzliche Ausbildung einer Hydrathülle wirkt die Kapsel außerdem als Schutzhülle in einer unwirtlichen Umgebung [VIMR E. et al., 1995; GRIFFITHS G. et al., 1999]. Die K-Antigene wurden von Whitfield in vier Gruppen nach genetischen und biochemischen Kriterien eingeteilt [WHITFIELD C., 2006]. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften gibt die Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1:** Einteilung der serologischen K-Antigentypen bei *Escherichia coli* nach Whitfield [WHITFIELD C. et al., 1999]. Die grau unterlegte Gruppe 2 beinhaltet sialinsäurehaltige Polysaccharide.

<b>Gruppe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
ehemalige Einteilung	IA	II	I, II oder III	IB
Thermostabilität	o	-	-	o
thermoregulierende Expression	-	o	-	-
Bindung an den Lipidanker	LPS Lipid A Kernregion	( $\alpha$ -Glycerophosphat)	( $\alpha$ -Glycerophosphat)	LPS Lipid A Kernregion
Polymerisationsrichtung	reduzierendes Ende	nichtreduzierendes Ende	nichtreduzierendes Ende	reduzierendes Ende
Modellsystem	K30	K1, K5, K92	K10, K54	K40, O111
strukturgleiches Vorkommen	<i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	nicht bekannt

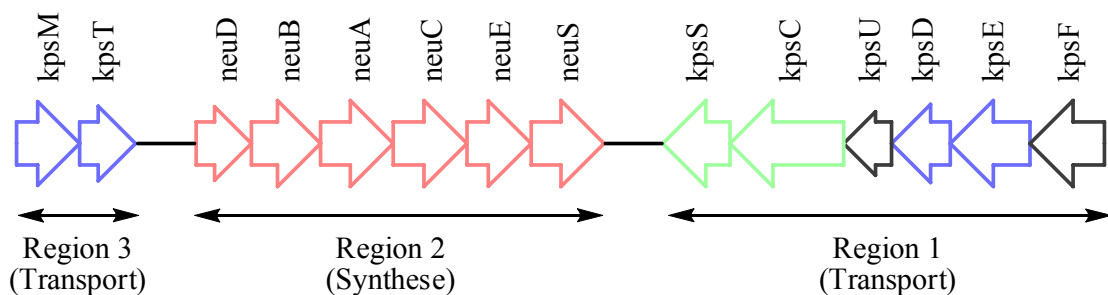
Da besonders Polysaccharide der Gruppe 1 und 4 oft mit O-Antigenen coexprimiert werden und eine ähnliche Bindungsbrücke zu ihrem Lipidanker besitzen (Lipid A Kernregion bestehend aus Ketodesoxyoctulosonsäure (KDO) und einer variierenden Heptose [ZAMZE S.E. et al., 1987]) ist eine genaue Einteilung wegen Verwechslungsgefahr hier schwierig. Die Bindung der Gruppe 2 und 3 Polysaccharide an den Lipidanker ist in vielen Fällen noch nicht eindeutig geklärt [WHITFIELD C., 2006]. Es gibt allerdings viele Hinweise darauf, dass die Kernregion durch eine  $\alpha$ -Glycerophosphatbrücke gebildet wird. Der Lipidanker selbst besteht schließlich meistens aus

zwei veresterten Fettsäureresten (C16:0, C18:2 u. A.) [GOTSCHLICH E.C. et al., 1981; TZENG Y. et al., 2005]. Untersuchungen zeigten, dass aufgrund der instabilen Phosphatbindung anscheinend nur 20-50 % des Kapselpolysaccharids tatsächlich über einen Lipidanker an der Bakterienoberfläche gebunden ist. Der restliche Anteil scheint vielmehr über ionische und andere Wechselwirkungen mit der Kapsel verbunden zu sein [WHITFIELD C., 2006]. Einzig und allein bei den Polysacchariden der Gruppe 2 wurde eine thermoregulierte Expression beobachtet. Das Optimum wurde dabei auf 37 °C bestimmt. Unterhalb von 22-25 °C und oberhalb von 43 °C kam die Ausbildung vollständig zum Erliegen [ORSKOV F. et al., 1984; MERKER R.I. et al., 1990; VIMR E. et al., 1995].

Sialinsäurehaltige Polysaccharide sind innerhalb der Gruppe 2 zu finden. Das Antigen K92 besteht beispielsweise aus einem Neu5Ac-Polymer mit alternierenden  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9-Bindungen. *Escherichia coli* K1 hingegen bildet eine humanidentische  $\alpha$ 2,8-verknüpfte poly-5-N-Acetylneuraminsäure aus. Dieses spezielle in Bakterien gebildete Homopolymer mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 150 Einheiten [TROY F.A., 1979] wird auch als Colominsäure bezeichnet (vgl. Kapitel 2.1). In der Natur wurden außerdem (unspezifisch) O-acetylierte Formen des Polymers nachgewiesen. Colominsäure wurde erstmalig von Barry und Goebel aus *E.coli* K-235 isoliert [BARRY G.T. et al., 1957; KUNDIG F.D. et al., 1971] und von McGuire strukturell entschlüsselt [MCGUIRE E.J. et al., 1964]. Weitere Produzenten von Colominsäure sind *Neisseria meningitidis* B [LIU T.Y. et al., 1971; FROSCH M. et al., 1993] und *Pasteurella haemolytica* A2 [PUENTE-POLLEDO L. et al., 1998]. Alle genannten Mikroorganismen gehören zu der Gruppe der potentiellen Erreger von bakterieller Meningitis beim Menschen. Da die Oberflächenstruktur der Bakterien der körpereigenen Zellen, vor allem im Gehirn, sehr ähnlich ist, hat das Immunsystem Schwierigkeiten, die Infektion als solche zu erkennen [VIMR E. et al., 1995]. Außerdem werden mögliche weitere bakterienspezifische Antigene von dem voluminösen Polysaccharid maskiert [GRIFFITHS G. et al., 1999]. Da bei Ungeborenen und Säuglingen die Polysialinsäurekonzentration am höchsten und das Immunsystem am schwächsten ist, sind sie besonders gefährdet. Das Risiko beim erwachsenen Menschen ist dagegen verschwindend gering.

## 2.4 Biosynthese von Polysialinsäure

Verantwortlich für die Expremierung von Gruppe-2-Polysacchariden in *Escherichia coli* ist ein Genkomplex bestehend aus drei funktionellen Regionen. Die Regionen 1 und 3 beinhalten die Codierungen für den Polysaccharidtransport und sind bei allen Gruppe 2-Polysacchariden identisch. In der variablen Region 2 ist die genaue Zusammensetzung des Polymers codiert [DAINES D. et al., 2000]. Die Genkarte für die Expremierung von K1-Polysialinsäure in *Escherichia coli* ist in Abbildung 2.6 dargestellt.



**Abbildung 2.6:** Genkarte für die Ausbildung der Polysialinsäurekapsel in *Escherichia coli* K1. Der Farbcode symbolisiert Gene verantwortlich für die Polysaccharid-Biosynthese (rot), den Transport (blau) und die Übertragung des Polysaccharids auf den Phospholipidanker (grün) [TZENG Y. et al., 2005]. Über den Pfeilen angegeben ist jeweils das zugehörige Enzym.

Das Edukt für die Biosynthese von 5-N-Acetylneuraminsäure in der Zelle ist N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Steht Glucose als Energiequelle zur Verfügung wird das GlcNAc über Fruktose-6-Phosphat (Fru-6-P) und Glucosamin (GlcNH<sub>2</sub>) gebildet. GlcNAc wird mit Hilfe des Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase (NeuC) in N-Acetylmannosamin (ManNAc) umgewandelt. Neu5Ac-Synthetase (NeuB) katalysiert die Reaktion von ManNAc und einem Molekül Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von 5-N-Acetylneuraminsäure [FERRERO M. et al., 1996]. Einige *E.coli* K1 Typen besitzen ein zusätzliches Gen welches für eine O-Acetyltransferase (NeuO) codiert ist. Hierdurch können O-Acetylierungen in den Positionen 7 und 9 herbeigeführt werden [STEENBERGEN S.M. et al., 2006]. Die Funktion des Proteins NeuD ist noch nicht vollständig geklärt. Das Enzym zeigt ebenfalls Eigenschaften einer O-Acetyltransferase, ist jedoch auch für die Bildung von nicht-O-acetylierter Sialinsäure essentiell

[DAINES D. et al., 2000; LEWIS A.L. et al., 2006]. Für die anschließende Polymerisation muss die Neu5Ac zunächst durch ein Molekül CTP „aktiviert“ werden. Vermittelnd wirkt hier CMP-Neu5Ac-Synthetase (NeuA). Die Polymerisation selbst wird in Richtung des nichtreduzierenden Endes durch das Enzym poly- $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase (NeuS) katalysiert. NeuE ist ebenfalls in den Polymerisationsvorgang involviert. Die genaue Funktion ist jedoch auch hier noch nicht geklärt [ANDREISHCHEVA E.N. et al., 2006]. Die mittlere Kettenlänge der gebildeten Colominsäure liegt bei ca. 150 Einheiten. Welche Faktoren regulierend in die Kettenverlängerung und -termination eingreifen ist ebenfalls noch nicht bekannt [WHITFIELD C., 2006]. Der komplette Syntheseweg von Glucose bis zur Colominsäure mit allen wichtigen Intermediaten ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Die Ausschleusung des fertigen Polysaccharids auf die Zelloberfläche wird durch einen sogenannten ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette) realisiert. ABC-Transportersysteme ermöglichen einen aktiven ATP-vermittelten Stofftransport und bestehen aus einer transmembranen (TMD) und einer ATP-bindenden (ABD) Domäne [BERG J.M. et al., 2007]. In *E.coli* K1 wird der Polysialinsäuretransporter durch kpsM (TMD) und kpsT (ABD) gebildet [BLISS J. et al., 1996]. Essentiell für den Transmembrantransport ist die Bindung der Polysialinsäure an den Diacylglycerophosphatrest [WEISGERBER C. et al., 1990]. Verantwortlich für die Kopplung scheint dabei kpsSC zu sein [KRONCKE K.D. et al., 1990; BRONNER D. et al., 1993]. Bei der Translokation des Polysaccharids durch das Periplasma und auf der Zelloberfläche spielt weiterhin kpsDE eine wichtige Rolle [SILVER R.P. et al., 1987; PAZZANI C. et al., 1993]. Die Funktion von kpsUF beim Kapseltransport ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Funktion in Verbindung mit der Bildung des Lipidankers ist jedoch wahrscheinlich [ROSENOW C. et al., 1995; MEREDITH T.C. et al., 2003]. Essentiell für die Bildung der Polysaccharidkapsel sind die Proteine jedoch nachweislich nicht [WHITFIELD C., 2006].

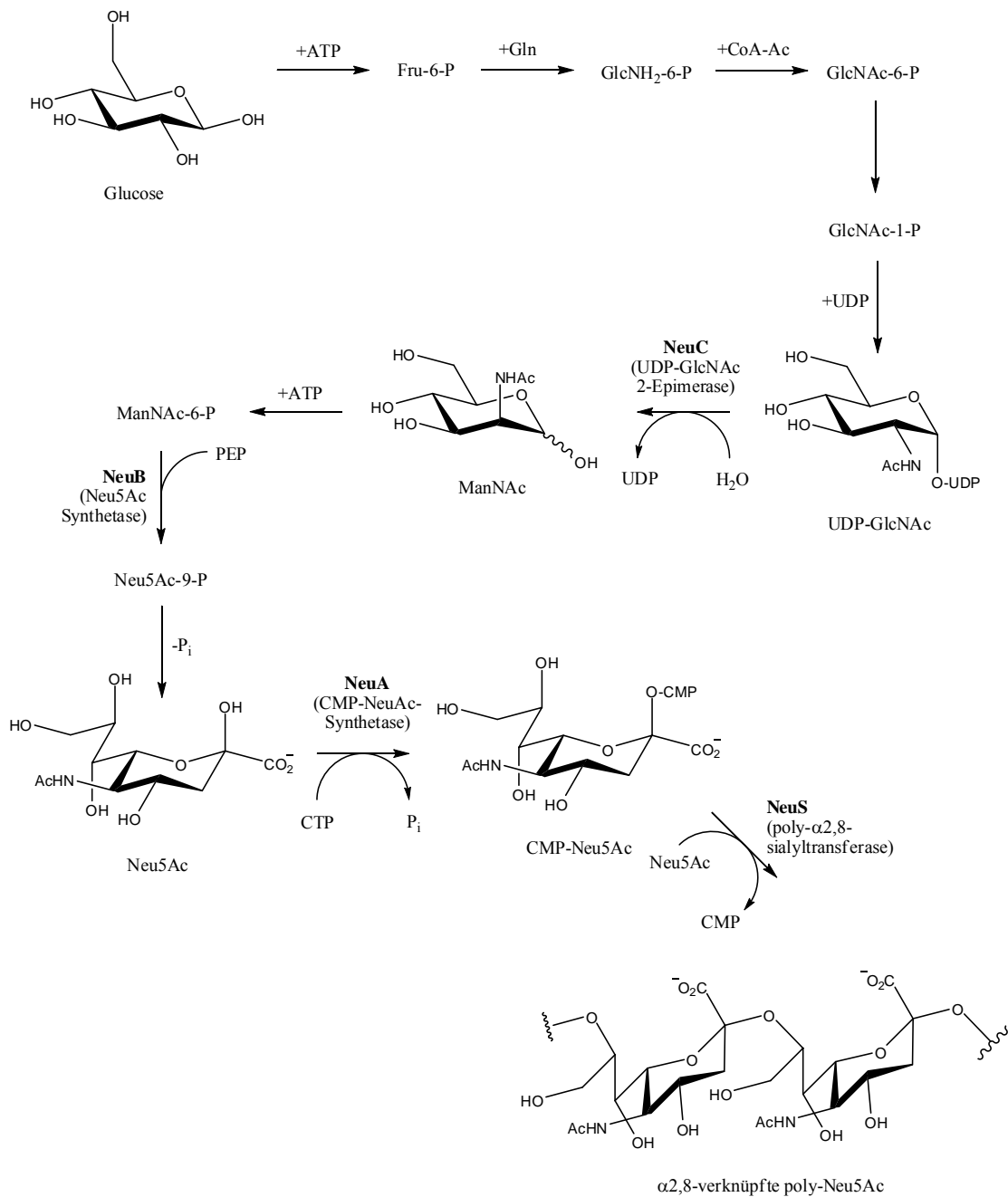


Abbildung 2.7: Biosyntheseweg von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter poly-N-Acetylneuraminsäure (Colominic acid) ausgehend von Glucose.

### **3 Gewinnung von Polysacchariden**

Die Gewinnung von Polysacchariden erfolgt überwiegend aus natürlichen Quellen. Die industriell wichtigsten Verfahren sind wohl die Isolierung von Cellulose und Stärke. Cellulose wird nach verschiedenen Verfahren überwiegend aus Holz (ca. 50 % Celluloseanteil) isoliert, wobei sie aus zerkleinerten Holzstückchen chemisch freigesetzt werden muss. Mögliche Techniken sind ein saurer Aufschluss mittels  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  oder Essigsäure oder eine alkalische Behandlung mit Natronlauge und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oder Methanol. Durch den Aufschluss werden Ether- und Wasserstoffbrückenbindungen in der Molekularstruktur des Holzes gebrochen und verunreinigende Holzbestandteile wie Harze und Lignin gehen in Lösung. Je nach Verfahren bleibt ein hoch- oder niederpolymerer Zellstoff in verschiedenen Qualitäten zurück, welcher hauptsächlich zu Papier weiterverarbeitet wird [KORDSACHIA O. et al., 1999; KUZNETSOV B.N. et al., 2002]. In jüngster Zeit wird Cellulose darüber hinaus auch immer wieder als Substrat für die Gewinnung von Bioethanol genannt. Als billiger nachwachsender Rohstoff ist er das ideale Edukt für die Veredlung zu einem wichtigen Energieträger [GALBE M. et al., 2002; DEMIRBAS A., 2005; GRAY K.A., 2007].

Die Darstellung von Stärke erfolgt überwiegend aus Kartoffeln (21 % Stärkeanteil), Weizen (58-64 % Stärkeanteil) und Reis (70-75 % Stärkeanteil) und lässt sich auf deutlich milderem Weg erreichen. Nach einem mechanischen Zellaufschluss kann die Stärke einfach durch Sedimentation oder Auswaschung von den übrigen Zellbestandteilen getrennt werden. Stärke wird fast ausschließlich in der Nahrungsmittelindustrie verwendet. Ein kleiner Teil geht jedoch auch in die Pharmazie und technische Industrie.

Das Gelingen der eben beschriebenen Verfahren wird begünstigt durch zwei Faktoren. Zum Einen durch den hohen Anteil des Produkts in den eingesetzten Rohstoffen und zum Anderen durch die chemische Stabilität der Polysaccharide. Für beide Produkte gibt es zudem einen enormen Bedarf, der die großtechnischen Prozesse rechtfertigt. Die weltweite Jahresproduktion an Cellulose zum Beispiel betrug 2003  $10^{11}$  t.



Global gesehen kommt einer großen Menge der natürlichen Polysaccharide kein vergleichbares wirtschaftliches Interesse zu. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Sparten und Nischenanwendungen und etliche Forschungsprojekte, in denen Polysaccharide im Mittelpunkt stehen. Hauptsächlich geht es dabei um medizinische und pharmazeutische Anwendungen, wie als Vaccine, Kosmetika oder in speziellen Therapien. Da eine vollsynthetische Darstellung, gerade von komplizierten Polysacchariden, oft nicht möglich ist, werden sie überwiegend aus tierischem Material oder, wie auch viele Proteine, aus (rekombinanten) Zellen oder Bakterien isoliert. Dies trifft zum Beispiel auf die bekannte Hyaluronsäure aber auch auf Polysialinsäure zu. Erschwerend bei der Aufreinigung sind in diesen Fällen der erhebliche Anteil an verschiedenen Kontaminanten und der hohe Anspruch an die Produktreinheit. Die Methoden zur Isolierung der Polysaccharide ähneln sich dabei sehr, egal ob es sich um eine großtechnische Darstellung oder den Labormaßstab handelt.

Soll das Polysaccharid aus Mikroorganismen gewonnen werden steht am Anfang des Produktionsprozesses die Kultivierung. Da es sich um ein Spezialprodukt handelt, wird dabei meistens der batch bzw. fed-batch Betrieb die Strategie der Wahl sein. Bakterielle Polysaccharide sind ausschließlich auf der Zelloberfläche zu finden und werden oft schon während der Kultivierung in großen Mengen an das Medium abgegeben. In diesem Fall können sie, ohne dass ein Zellaufschluss nötig ist, direkt aus dem Zellüberstand isoliert werden. Da der Anteil an Kontaminanten in der Regel sehr hoch ist, wird zunächst eine Grobreinigung durch eine Reihe von Präzipitations-schritten herbeigeführt. Für diesen Zweck wurden in der Literatur bereits eine Reihe von Fällungsreagenzien beschrieben. Oft kamen dabei in produktorientierten Aufarbeitungsschritten verschiedene Alkohole wie Ethanol [LEE L. et al., 1974; BAKER C. et al., 1976] oder Isopropanol zum Einsatz, in denen die Löslichkeit der langkettigen Zucker deutlich herabgesetzt wird. Eine Fällung kann außerdem durch die Bildung einer schwerlöslichen Verbindung herbeigeführt werden. Anionischen Polysacchariden können zum Beispiel komplexe quartäre Ammoniumsalze wie Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetavlon) zugesetzt werden [ORSKOV I. et al., 1977; JANN B. et al., 1985; FERRERO M. et al., 1991]. Zur Vorbehandlung können die Kontaminanten durch die Zugabe von Enzymen (Proteasen, RNAsen) teilweise abgebaut werden [BAINE H. et al., 1971]. Der Einsatz von immobilisierten Enzymen

ist dabei vorzuziehen, um eine spätere Abtrennung nicht zu verkomplizieren. Eine andere Vorgehensweise beinhaltet kontaminantenorientierte Fällungsschritte wie die Zugabe von Phenol [TARCSAY L. et al., 1971; BUNDLE D. et al., 1974; JANN B. et al., 1985], Aceton,  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$  oder Polyethylenglycol (PEG), die die Präzipitation des Hauptkontaminanten, der Proteine, herbeiführt. Manche Prozesse benutzen in einem nachgeschalteten Schritt Adsorptionsmittel, wie Aktivkohle oder Kieselgel, die eine zusätzliche Abreicherung der Kontaminanten ermöglichen.

Durch die beschriebenen Maßnahmen kann in vielen Fällen bereits eine Produktreinheit von >95 % erreicht werden. Zur Darstellung eines hochreinen Produkts ist jedoch eine chromatographische Aufreinigung unerlässlich.

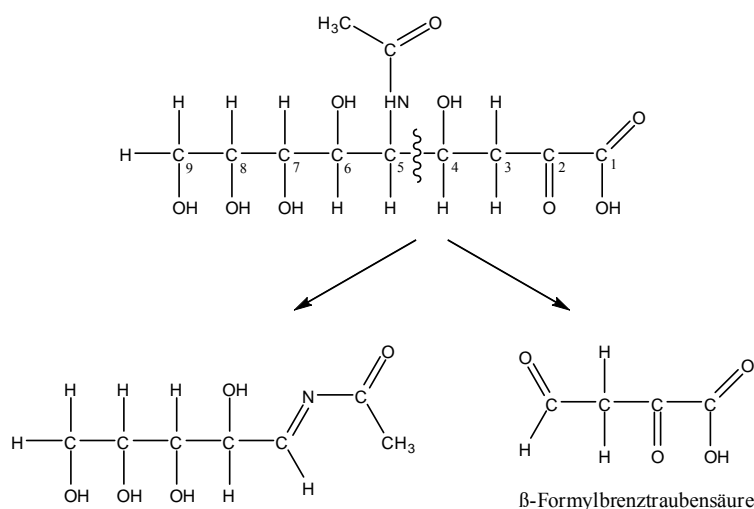
## **Experimenteller Teil**

### **4 Quantifizierung von (Poly-)Sialinsäuren**

Unerlässlich für die Entwicklung eines Produktionsprozesses ist die ständige Überwachung des Produkttiters. Die verwendete Methode sollte dabei möglichst spezifisch sein und hohe Durchsätze bei geringem Zeitaufwand erlauben. Eine chemische Methode für die Quantifizierung von freien Sialinsäuren mittels Thio-barbitursäure (TBA) wurde bereits um 1960 zeitgleich von Warren und Aminoff entwickelt [WARREN L., 1959; AMINOFF D., 1961]. Svennerholm hingegen benutzte Resorcinol für die chemische Quantifizierung freier und gebundener Sialinsäuren [SVENNERHOLM L., 1957]. Beide Assays beruhen auf der Bildung eines charakteristischen Farbstoffs, der am Ende fotometrisch detektiert werden kann. Aufgrund einer höheren Quantenausbeute ist der TBA-Test empfindlicher als die Resorcinol-Methode und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

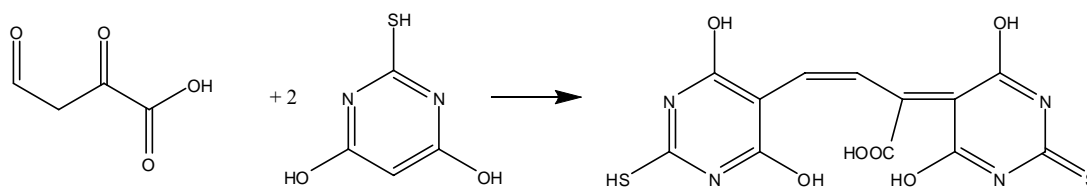
#### **4.1 TBA-Assay für Sialinsäuren**

Bei dem TBA-Assay handelt es sich um einen dreistufigen chemischen Test für die Quantifizierung von Sialinsäurederivaten. Mittels eines Oxidationsmittels (meistens Periodat) werden in einem ersten Schritt die Zuckermonomere an Glycolstellungen bzw. vicinalen Aminohydroxybindungen unter Bildung von Aldehyd- oder Iminresten gespalten. Handelt es sich bei dem eingesetzten Substrat um N-Acetylneuraminsäure so findet die entscheidende Spaltung des Moleküls zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> statt (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Oxidative Spaltung von 5-N-Acetylneuraminsäure durch Periodat.

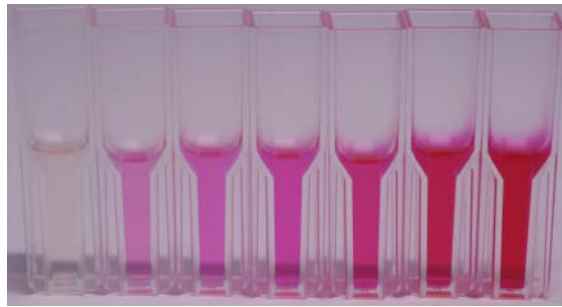
Als Reaktionspartner für den weiteren Verlauf des Assays dient die so gebildete  $\beta$ -Formylbrenztraubensäure. Überschüssiges Oxidationsmittel wird mit einem Reduktionsmittel (Meta-Arsenit oder Borhydrid) neutralisiert. Die Bildung des detektierbaren Chromophors wird durch die Reaktion der  $\beta$ -Formylbrenztraubensäure mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure herbeigeführt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Das Chromophor verdankt seine intensive Pinkfärbung seinem ausgeprägten konjugierten  $\pi$ -System [KUHN R. et al., 1963]. Prinzipiell eignen sich ab diesem Schritt alle 2-Keto-3-deoxy-zuckersäuren als Farbstoffbildner, die auch mögliche Störquellen des Tests darstellen.



**Abbildung 4.2:** Reaktion von  $\beta$ -Formylbrenztraubensäure mit Thiobarbitursäure. Das entstehende Chromophor weist aufgrund eines konjugierten  $\pi$ -Systems eine intensive Pinkfärbung auf.

Unter optimierten Bedingungen verläuft die Reaktion quantitativ. Das Absorptionsmaximum der aus  $\beta$ -Formylbrenztraubensäure gebildeten Verbindung liegt bei 549 nm. Für eine bessere Quantenausbeute während der Detektion kann der gebildete

Farbstoff nach der Reaktion mit Cyclohexanon extrahiert werden. Im Kalibrationsbereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktion und der Substratkonzentration (siehe Abbildung 4.3). Das genaue Protokoll für den Assay ist in Kapitel 11.4.4 zu finden.



**Abbildung 4.3:** Verdünnungsreihe einer mit dem TBA-Assay angefärbten Sialinsäurelösung.

## 4.2 TBA-Assay für Polysialinsäuren

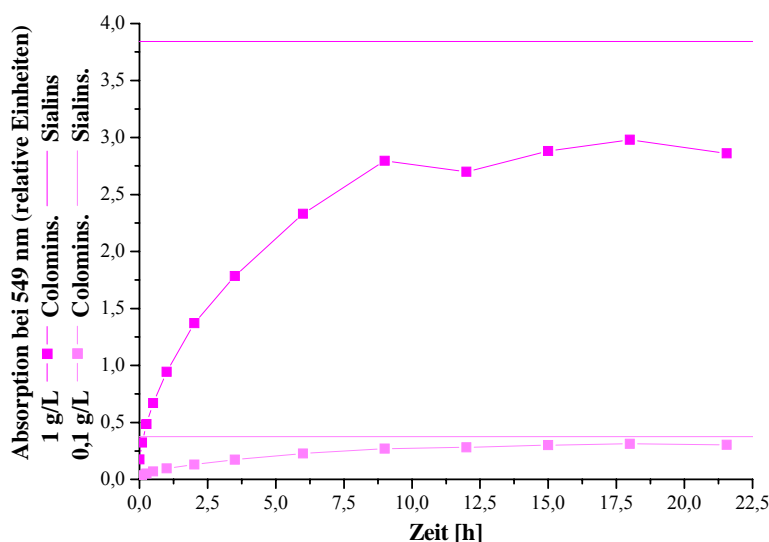
Für die Quantifizierung von Polysialinsäuren musste der Assay modifiziert und um einen weiteren Schritt erweitert werden. Essentiell für die fehlerfreie Quantifizierung der Polysaccharide ist eine vollständige Spaltung der glykosidischen Bindungen. Denkbare Methoden wären dabei sowohl eine enzymatische als auch eine saure Hydrolyse. Da bei der Analytik während der späteren Kultivierungs- und Downstreamexperimenten mit einem hohen Probendurchsatz zu rechnen ist, wurde aus Kostengründen die Entwicklung einer sauren Hydrolysemethode mit Phosphorsäure bevorzugt. Roy et al. berichteten von einer vollständigen Hydrolyse von Colominsäure durch den Einsatz von  $H_2SO_4$  bei einem pH-Wert von 2-3 und einer Hydrolysedauer von 180 min bei 70 °C [ROY R. et al., 1990]. Erste Vorversuche zur Reproduktion der Ergebnisse zeigten jedoch, dass eine hohe Sulfatkonzentration die spätere Farbstoffbildung erheblich störte und nach 180 min lediglich eine partielle Hydrolyse erreicht werden konnte. Für alle Versuche wurde kommerziell erhältliche Colominsäure (CA, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) verwendet. Die Färbung der unterschiedlich hydrolysierten CA-Lösungen wurde nach dem Protokoll in Kapitel 11.4.4 durchgeführt.

**4.2.1 Einfluss der Hydrolysedauer**

In einem ersten Experiment wurde die Absorption der eingesetzten Proben nach verschiedenen Hydrolysezeiten gemessen. Es wurden zwei verschiedene Versuchsreihen mit Colominsäurekonzentrationen von 0,1 bzw. 1 g/L durchgeführt. Die Hydrolysebedingungen können der Tabelle 4.1 entnommen werden.

**Tabelle 4.1:** Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Hydrolysedauer auf die Quantifizierung von Colominsäure.

<b>Versuchsbedingungen</b>	
Colominsäurelösung	50 µL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 µL 0,0033 mol/L
Temperatur	70 °C
Hydrolysedauer	variabel (0-21,5 h)



**Abbildung 4.4:** Verlauf der Signalintensität des TBA-Assays von Colominsäurelösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei variabler Hydrolysezeit. Das Signal einer 5-N-Acetylneuraminsäurelösung gleicher Konzentration wurde zum Vergleich ebenfalls mit eingetragen.

Beide Versuchsreihen zeigen eine Sättigung der Absorption nach einer Hydrolysedauer von ca. 18 h. Zum Vergleich wurde das Signal einer 5-N-Acetylneuraminsäurelösung gleicher Konzentration mit in das Diagramm eingetragen. Die Signalstärke der hydrolysierten Polymerlösung lag in beiden Fällen bei ca. 80 % bezogen auf die Lösung der Monomere.

#### 4.2.2 Einfluss der Säurekonzentration

Die durch die Säure katalysierte Hydrolyse der Zuckerpolymere steht in einer Konkurrenzreaktion zur Lactonisierung der Moleküle. Dabei kann, wie in Abbildung 4.5 dargestellt, die an C<sub>9</sub> gebundene Hydroxyfunktion eine Ringschlussreaktion mit der Carboxylgruppe des benachbarten Zuckergliedes eingehen. Diese Reaktion ist unter anderem erwünscht und wird bei mancher Analytik der Kettenlängenbestimmung herbeigeführt, um das Polymer zu stabilisieren [GALUSKA S.P. et al., 2007]. Während die Hydrolyse der glycosidischen Bindungen aber bevorzugt unter milden Bedingungen abläuft, tritt die Lactonisierung vor allem in stark saurem Milieu auf.

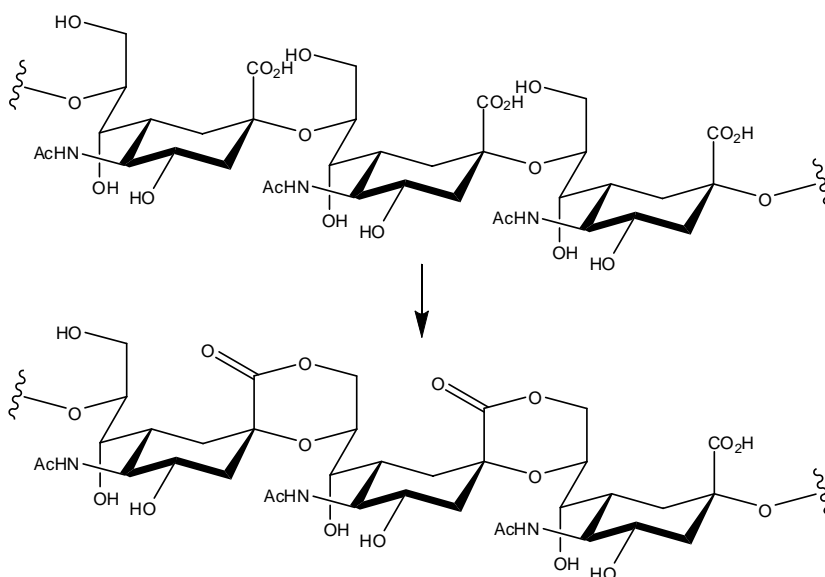
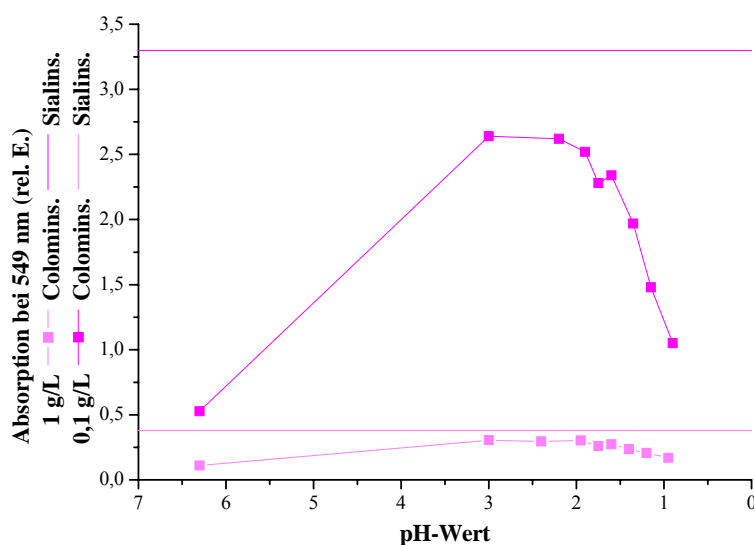


Abbildung 4.5: Lactonisierung von  $\alpha$ 2,8-verbundener Polysialinsäure bei niedrigem pH-Wert.

Zur Bestimmung der optimalen Säurekonzentration für die Hydrolyse von Polysialinsäure wurden Versuche bei unterschiedlichen H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentrationen durchgeführt. Der pH-Bereich lag dabei zwischen 6,3 und 1. Die weiteren Bedingungen für die Hydrolyse bei zwei verschiedenen Colominsäurekonzentrationen (0,1 und 1 g/L) können der Tabelle 4.2 entnommen werden.

**Tabelle 4.2:** Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Quantifizierung von Colominsäure.

<b>Versuchsbedingungen</b>	
Colominsäurelösung	50 µL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	variabel
Temperatur	70 °C
Hydrolysedauer	18 h



**Abbildung 4.6:** Verlauf der Signalintensität des TBA-Assays von Colominsäurelösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei variablem pH-Wert. Das Signal einer 5-N-Acetylneuraminsäurelösung gleicher Konzentration wurde zum Vergleich ebenfalls mit eingetragen.

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen, ist gibt es ein Absorptionsmaximum in einem pH-Bereich zwischen 2 und 3. Bei tieferen pH-Werten sinkt die Absorption aufgrund



einsetzender Laktonisierung rasch ab. Im neutralen Bereich reicht die Säurestärke für eine Hydrolyse nicht mehr aus.

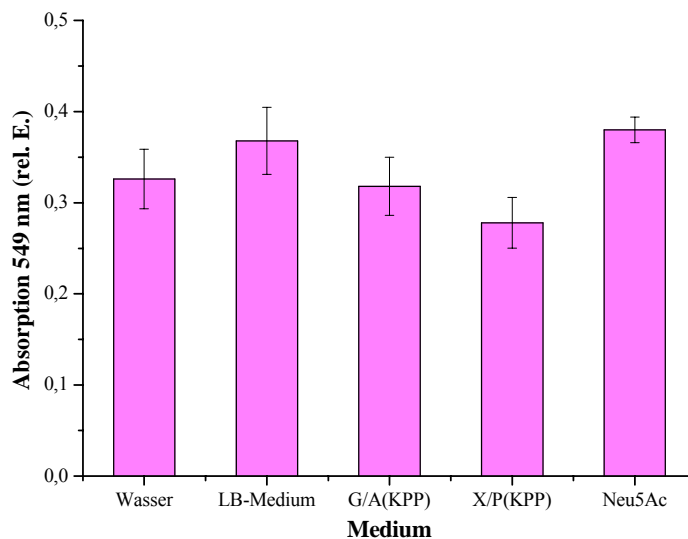
### 4.2.3 Einfluss der chemischen Umgebung

Unter Realbedingungen kann eine vollkommene Reinheit der zu quantifizierenden polysialinsäurehaltigen Lösung nicht immer gewährleistet werden. Um einen schnellen Überblick über die Produktausbeute während des Kultivierungs- und Downstreamprozesses zu erlangen, sollte der Assay deshalb auch bei der Verwendung komplexer wässriger Lösemittel, wie z. B. Kulturmedien, wirksam sein. Besonders die Durchführung des Assays in stark gepufferter Umgebung kann zu erheblichen Schwierigkeiten führen, wenn durch die eingesetzten Reagenzien keine pH-Änderung erreicht werden kann. Abbildung 4.7 zeigt den Einfluss verschiedener Medien, die bei der späteren Kultivierung zum Einsatz kamen (siehe Kapitel 11.2), auf die Signalintensität der verwendeten Colominsäureproben. Die Hydrolysebedingungen können der Tabelle 4.3 entnommen werden.

**Tabelle 4.3:** Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der chemischen Umgebung auf die Quantifizierung von Colominsäure.

<b>Versuchsbedingungen</b>	
Colominsäurelösung	50 µL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	200 µL 0,05 mol/L
Temperatur	70 °C
Hydrolysedauer	18 h

Die Konzentration der Phosphorsäure wurde so gewählt, dass bei Verwendung der Medien als Lösemittel, der pH-Wert bei der Hydrolyse stets in einem Bereich von 2-3 lag. Wie zu erkennen ist, liegt die Signalintensität der Colominsäureproben bei allen verwendeten Lösemitteln zwischen 75 und 95 % der Intensität von 5-N-Acetylneuraminsäure in Wasser. Genau im Durchschnitt mit 85 % Signalintensität liegt die in Wasser gelöste Colominsäureprobe.



**Abbildung 4.7:** Signalintensitäten des TBA-Assays von hydrolysiertes Colominsäure in verschiedenen chemischen Umgebungen (Medien). Zum Vergleich wurde das Signal einer 5-N-Acetylneuraminsäurelösung (in Wasser) gleicher Konzentration mit eingetragen.

### 4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Der für die Quantifizierung freier Sialinsäuren entwickelte TBA-Assay wurde durch Erweiterung um einen Hydrolyseschritt für Polysialinsäuren zugänglich gemacht. Die Hydrolyse wurde dabei säurekatalytisch mit Phosphorsäure durch Erhitzen auf 70 °C durchgeführt. Die Ermittlung der bestmöglichen Hydrolysebedingungen zeigten in Übereinstimmung mit den Experimenten von Roy et al. einen optimalen pH-Bereich von 2-3 [ROY R. et al., 1990]. Für eine vollständige Hydrolyse war jedoch eine Inkubationsdauer von 18 h statt 180 min nötig.

Da während des Produktionsprozesses das Zielprodukt nicht immer in reiner Form vorliegt, wurde außerdem der Einfluss der chemischen Umgebung auf den Test untersucht. Dazu wurde eine Colominsäureprobe in verschiedenen, in dieser Arbeit eingesetzten, Kulturmedien gelöst. Der Vergleich mit in Wasser gelöster Colominsäure zeigte eine Abweichung um  $\pm 10\%$ .

In allen Experimenten wurde als Referenz zur Quantifizierung der Colominsäureproben eine Lösung gleicher Massenkonzentration von 5-N-Acetylneuraminsäure

gewählt. Die Signalintensität dieser Referenzprobe wurde jedoch bei keinem Experiment erreicht. Die Berücksichtigung der Massendiskrepanz zwischen den beiden Verbindungen führte in den vorangegangenen Experimenten nur zu einem sehr geringen Fehler. Die verwendete Colominsäure wurde als Natriumsalz eingesetzt und besitzt eine „Kettengliedmolmasse“ von 291,25 g/mol. Zusammen mit einem Natriumion als Gegenkation ergibt sich eine Gesamtmolmasse von 314,25 g/mol. N-Acetylneuraminsäure hingegen hat eine Molmasse von 310,28 g/mol. Der Fehler ist in diesem Fall mit 1,3 % vernachlässigbar klein. Im Fall der Bestimmung einer unbekanntem Konzentration an Polysialinsäure kann kein Gegenkation berücksichtigt werden und der Fehler erhöht sich auf 5,8 %. Unter den gegebenen Umständen muss wohl davon ausgegangen werden, dass eine absolut vollständige Hydrolyse von Polysialinsäure nicht erreicht werden kann und die Verbindung sich am Ende in einem Gleichgewichtszustand mit niedermolekularen Oligomeren befindet. Die Signalintensität einer hydrolysierten Colominsäurelösung in Wasser liegt somit ca. 15 % unter der einer N-Acetylneuraminsäurelösung gleicher Massenkonzentration. Da die beschriebenen Fehler mit hoher Rate reproduzierbar sind, eignet sich der entwickelte Test zwar nur bedingt für eine absolute, aber sehr gut für eine relative, quantitative Analyse.

## 5 Screeningversuche in Schüttelkolben

Auf der Basis einer funktionierenden Produktanalytik wurden die ersten Kultivierungen der polySia-produzierenden *Escherichia coli* K1 Bakterien in Schüttelkolben durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche wurden unterschiedliche Nährmedien getestet und die polySia-Produktionsraten verschiedener *E.coli* K1-Stämme untersucht. Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Arten von Medien unterschieden. Zum Einen ein Komplexmedium mit dem Hauptbestandteil Hefeextrakt und zum Anderen die synthetischen Medien definierter Zusammensetzung mit variabler C- und N-Quelle und unterschiedlichen Puffern. Die im Folgenden genannten synthetischen Medien werden durch eine Buchstabenkombination bestehend aus [Substrat]/[N-Quelle]([Puffer]) benannt. G/A(KPP) steht dabei z.B. für ein synthetisches Medium mit Glucose (G) als Substrat und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A) als N-Quelle in Kaliumphosphatpuffer (KPP). Die genaue Zusammensetzung des Basismediums sowie die verwendeten Buchstabensymbole für Substrat, N-Quelle und Puffer können dem Kapitel 11.2.2 entnommen werden. Die optimalen Kultivierungsbedingungen für die Polysialinsäureproduktion werden in der Literatur übereinstimmend mit 37 °C und pH 7-8 bei ausreichender Sauerstoffversorgung angegeben [HUNGERER D. et al., 1967; UCHIDA Y. et al., 1973; RODRIGUEZ-APARICIO L.B. et al., 1988; VANN W.F. et al., 1994; PUENTE-POLLEDO L. et al., 1998]. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schüttelkolbenkultivierungen in 500 mL-Kolben mit zwei Schikanen durchgeführt. Das Medienvolumen betrug jeweils 100 mL. Angeimpft wurden die Kolben mit 1 mL einer in Komplexmedium (ohne Glucosezusatz) ausgewachsenen Kultur (37 °C, 120 min<sup>-1</sup>, 8-10 h).

### 5.1 Stammscreening

Insgesamt wurden neun *E.coli* K1-Wildstämme auf ihre polySia-Produktivität untersucht. Ein Stamm mit der Bezeichnung B2032/82 wurde bereits im kleinen Maßstab für die polySia-Darstellung benutzt [WEISGERBER C. et al., 1990]. Acht weitere Stämme mit der Kurzbezeichnung  $\delta$ [Nummer] wurden erstmals benutzt.

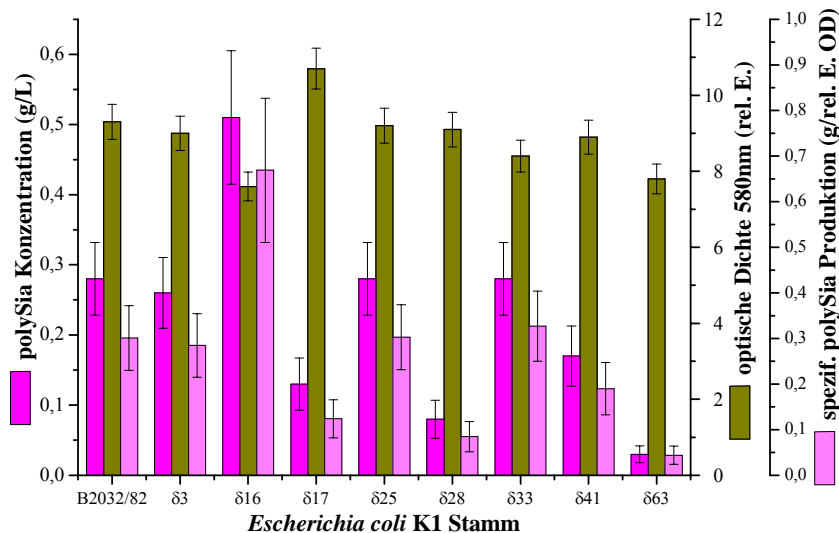
Nähere Informationen zu den Stämmen können der Tabelle 11.1 in Kapitel 11.1 entnommen werden.

Alle Kultivierungen wurden in G/A(KPP)-Medium durchgeführt. Weitere wichtige Parameter sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.1:** Kultivierungsbedingungen des *E.coli* K1-Stammscreening in Schüttelkolben.

G/A(KPP)-Medium			Parameter	
Substrat	Glucose	18,5 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L	Schüttelgeschw.	120 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M	pH (zu Beginn)	7

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (siehe Kapitel 11.4.1) überwacht. Alle Stämme zeigten ein Ende des exponentiellen Wachstums nach etwa 10-12 h. Die finale optische Dichte lag zwischen 7,6 (δ16) und 10,7 (δ17).



**Abbildung 5.1:** Maximale polySia-Konzentration, erreichte optische Dichte und die daraus berechnete spezifische polySia Produktionsrate für neun verschiedene *Escherichia coli* K1 Stämme.

Die Bestimmung der Konzentration gebildeter Polysialinsäure während und nach Abschluss des Bakterienwachstums wurde nach dem in Kapitel 11.4.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die entnommene Probe wurde vorher nicht von Zellen befreit, um eventuell noch an die Zellmembran gebundenes Polysaccharid mit zu erfassen. Die finale polySia-Konzentration und optische Dichte aller neun Kultivierungen sowie die spezifische Produktionsrate sind in Abbildung 5.1 aufgetragen. Der niedrigste Produkttiter von 0,03 g/L wurde bei Stamm  $\delta 63$  gemessen. B2032/82,  $\delta 33$ ,  $\delta 25$  und  $\delta 3$  wiesen allesamt gute Produktionsraten mit einer polySia-Konzentration von etwa 0,28 g/L auf. Der mit Abstand höchste Produkttiter mit 0,51 g/L wurde bei dem als Einzigen aus Cervix (Gebärmutterhals) isolierten Stamm  $\delta 16$  gemessen.

## 5.2 Medienscreening

Als Produktionsstamm für alle weiteren Arbeiten wurde B2032/82 gewählt, da dieser eine gute polySia-Produktionsrate auswies und wie erwähnt schon früher für die Darstellung von Polysialinsäure verwendet wurde. Zur Schaffung idealer Wachstumsbedingungen wurden verschiedene Kulturmedien getestet und hinsichtlich dreier Kriterien bewertet:

- 1) Einfluss auf die polySia-Produktion
- 2) Zusammensetzung
- 3) Kosten

Es wurde untersucht ob und inwiefern die bakterielle Bildung der Polysialinsäure durch das verwendete Kulturmedium beeinflussbar ist. Das Medium sollte dabei eine möglichst definierte Zusammensetzung haben und frei sein von komplexen Verbindungen und Stoffgemischen, um den späteren Aufarbeitungsprozess nicht zu erschweren. Da bei einer Anwendung im Produktionsmaßstab mit einem hohen Verbrauch an Nährmedium zu rechnen ist, sollte es zudem kostengünstig sein.

## 5.2.1 Puffersysteme

Ein kritischer Parameter bei allen Schüttelkolbenkulturen ist der verwendete Puffer. Da Komplexmedien durch ihre Inhaltsstoffe bedingt oft eine natürliche Pufferwirkung aufweisen, spielt die Wahl besonders bei synthetischen Medien eine wichtige Rolle. Üblicherweise wird Kaliumphosphat als Puffer in der Zellkultur eingesetzt, was den weiteren Vorteil mit sich bringt, da die Anwesenheit einer Phosphorquelle essentiell für das Wachstum von *Escherichia coli* K1 und die Produktion von Polysialinsäure ist. Die Konzentration an Phosphat kann dabei ebenfalls einen Einfluss auf die polySia-Produktion haben. Das Optimum wird in der Literatur mit 0,76 % Phosphat angegeben, was einer Konzentration von 0,08 mol/L entspricht [UCHIDA Y. et al., 1973]. Entsprechende Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine so geringe Pufferkonzentration nicht in der Lage ist, den bevorzugten pH-Wert von 7-8 aufrecht zu erhalten.

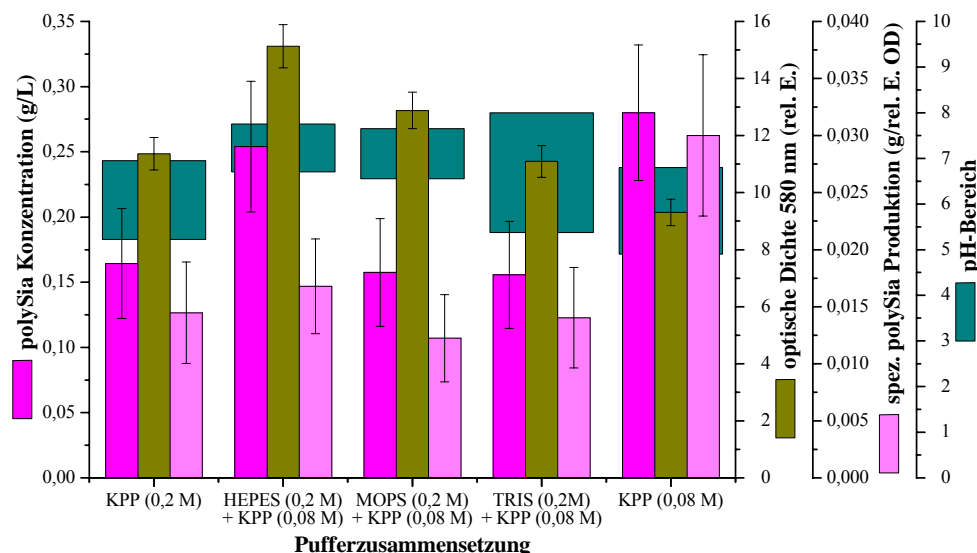
Zur Ermittlung der optimalen Pufferumgebung wurden Kultivierungen in G/A-Medium mit verschiedenen Arten und Konzentrationen von Puffern durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen für die folgenden Versuche sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

**Tabelle 5.2:** Mediumzusammensetzungen und Kultivierungsbedingungen des Pufferscreenings mit *E.coli* K1 B2032/82.

Synthetische Medium			Parameter	
Substrat	Glucose	18,5 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L	Schüttelgeschw.	120 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M bzw. 0,2 M	pH (zu Beginn)	7-8
	HEPES	0,2 M (+ 0,08 M KPP)		
	MOPS	0,2 M (+ 0,08 M KPP)		
	TRIS	0,2 M (+ 0,08 M KPP)		

Als Puffersubstanzen kamen Kaliumphosphat (KPP), 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), 3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) zum Einsatz. Die letzten drei wurden jeweils in einer Konzentration von 0,2 mol/L eingesetzt. Zusätzlich wurden für die

Versorgung der Bakterien mit Phosphat noch 0,08 mol/L  $K_2HPO_4$  zugesetzt. Die relevanten Messwerte aller Kultivierungen sind in Abbildung 5.2 aufgetragen. In allen Kolben lag der pH-Wert zu Beginn der Kultivierung zwischen 7 und 8. Während des Zellwachstums konnte eine generelle Abnahme des pH-Werts gemessen werden. Die beste Pufferwirkung wurde mit HEPES erzielt. Hier sank der pH-Wert auf minimal 6,7. Die finale Konzentration an polySia lag mit 0,25 g/L deutlich über den Kultivierungen mit MOPS, TRIS und KPP(0,2 M).



**Abbildung 5.2:** Maximale polySia-Konzentration, erreichte optische Dichte und die daraus berechnete spezifische polySia Produktionsrate von *Escherichia coli* K1 B2032/82 für fünf verschiedene Puffersysteme. Der angegebene pH-Bereich gibt den maximal und den minimal gemessenen pH-Wert während der Kultivierung an.

Trotz der sehr geringen Pufferkapazität und der starken Abnahme des pH-Werts von 6,8 auf 4,9, wurde der höchste Produkttiter mit 0,28 g/L bei der Kultivierung mit KPP(0,08 M) gemessen. Im Vergleich dazu lag die polySia-Konzentration beim Einsatz von KPP(0,2 M) und einer pH-Abnahme von 7 auf 5,2 bei lediglich 0,16 g/L.



## 5.2.2 Substrat/N-Quelle

In einem weiteren Screeningschritt wurden mit dem Substrat und der N-Quelle zwei weitere Hauptbestandteile des Mediums variiert. Alle Kultivierungen wurden sowohl mit KPP als auch mit HEPES als Puffer durchgeführt, wobei letzterem ebenfalls noch 0,08 mol/L  $K_2HPO_4$  zugefügt worden sind. Weitere Versuchsparameter sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

**Tabelle 5.3:** Kultivierungsbedingungen des Substrat/N-Quelle-Screening mit *E.coli* K1 B2032/82.

Synthetische Medien			Parameter	
Substrat	Glucose	18,5 g/L	Temperatur	37 °C
	Xylose	14 g/L	Schüttelgeschw.	120 min <sup>-1</sup>
	Sorbitol	17 g/L	pH (zu Beginn)	7-8
	Mannose	16,8 g/L		
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L		
	L-Prolin	8,8 bzw. 17,7 g/L		
	Na-Glutamat	14,4 bzw. 28,8 g/L		
Puffer	KPP	0,08 M		
	HEPES	0,25 M (+ 0,08 M KPP)		

Glucose und Ammoniumsulfat werden als in der Zellkultur übliche C- und N-Quellen eingesetzt. Sowohl mit Xylose und L-Prolin als auch mit Sorbitol wurden in früheren Versuchen gute Ergebnisse bei der polySia-Produktion erzielt [UCHIDA Y. et al., 1973; RODRIGUEZ-APARICIO L.B. et al., 1988].

N-Acetylmannosamin tritt bei der intrazellulären Biosynthese von 5-N-Acetylneuraminsäure als Zwischenprodukt auf (siehe Kapitel 2.4). Durch den Einsatz von Mannose als Substrat wurde versucht, einen „Quereinstieg“ in den Syntheseprozess zu finden, um so den Bakterien die Bildung der Sialinsäure zu vereinfachen.

Bei Glutaminsäure handelt es sich um ein Abbauprodukt des Prolin. Der Einsatz als Stickstoffquelle sollte als kostengünstige Alternative zu der teuren zyklischen Aminosäure getestet werden. In den Kultivierungen wurde die Substanz in Form ihres Natrium-Salzes verwendet.

Es wurden insgesamt 16 Kultivierungen in synthetischen Medien mit unterschiedlichen Kombinationen von Substrat und N-Quelle in zwei verschiedenen Pufferumgebungen durchgeführt. Für einen besseren Vergleich wurden die Konzentrationen so gewählt, dass die molaren Mengen der Zusätze in allen Versuchen übereinstimmen. Eine weitere Kultivierung wurde in Komplexmedium ohne Pufferzusatz durchgeführt. Die Ergebnisse der Kultivierungen mit KPP (0,08 M) und dem Komplexmedium sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Tabelle 5.4:** Ergebnisse der Kultivierungen in synthetischen Medien mit KPP (0,08 M) und in Komplexmedium. Angegeben sind die Art und Konzentration von Substrat und N-Quelle, die erreichte optische Dichte und Konzentration von Polysialinsäure am Ende der Kultivierung und die Kohlenstoffausbeute des Produkts, bezogen auf das eingesetzte Substrat.

<b>Synthetische Medien mit KPP</b>						
Substrat		N-Quelle		OD	polySia	$\frac{C_{\text{polySia}}}{C_{\text{Substrat}}}$
	[g/L]		[g/L]	(rel. E.)	Konz. [g/L]	
Glucose	18,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	9,3	0,28	1,8 %
Glucose	18,5	L-Prolin	17,7	4,3	0,04	0,3 %
Glucose	18,5	Glutamat	28,8	6,1	-	-
Xylose	14	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	0,1	-	-
Xylose	14	L-Prolin	17,7	9,4	0,95	7,2 %
Xylose	14	Glutamat	28,8	13	0,64	4,9 %
Sorbitol	17	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	0,6	-	-
Mannose	16.8	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	0,1	-	-
<b>Komplexmedium</b>				8,3	0,053	-

Bei Verwendung von Xylose, Sorbitol und Mannose in Kombination mit Ammoniumsulfat konnte auch nach 24 h kein Bakterienwachstum beobachtet werden. In den Medien G/P(KPP) und G/G(KPP) fand zwar ein Wachstum statt, jedoch konnte nahezu kein Produkt nachgewiesen werden. Mit 0,05 g/L lag die Produktkonzentration auch bei dem Komplexmedium im unteren Bereich. Eine gute Produktausbeute wurde, wie schon beschrieben, im G/A(KPP)-Medium mit 0,28 g/L erreicht. Besonders hier machte sich jedoch, wahrscheinlich durch die schlechte Sauerstoffversorgung, auch

ein hoher Anteil an Acetat (2,5 g/L) in der Kultur bemerkbar (vgl. Kapitel 6.2). 15 % des im Substrat enthaltenen Kohlenstoffs wurden somit zur Bildung von Acetat herangezogen. Die höchste Konzentration an Polysialinsäure mit 0,95 g/L konnte im X/P(KPP)-Medium gemessen werden. Der Ersatz von L-Prolin mit Na-Glutamat führte im X/G(KPP)-Medium ebenfalls zu einem guten Ergebnis von 0,64 g/L polySia.

Die Resultate der Kultivierungen mit HEPES (0,25 M) als Puffer zeigt die Tabelle 5.5. Auch hier zeigte sich bei der Verwendung von Xylose und Sorbitol in Kombination mit Ammoniumsulfat kein nennenswertes Wachstum der Bakterien.

**Tabelle 5.5:** Ergebnisse der Kultivierungen in synthetischen Medien mit HEPES (0,25 M) als Puffer (+0,08 mol/L  $K_2HPO_4$ ). Angegeben sind die Art und Konzentration von Substrat und N-Quelle, die erreichte optische Dichte und Konzentration von Polysialinsäure am Ende der Kultivierung und die Kohlenstoffausbeute des Produkts bezogen auf das eingesetzte Substrat.

<b>Synthetische Medien mit HEPES</b>						
Substrat	[g/L]	N-Quelle	[g/L]	OD (rel. E.)	polySia Konz. [g/L]	$\frac{C_{polySia}}{C_{Substrat}}$
Glucose	18,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	9	0,23	1,4 %
Glucose	18,5	L-Prolin	8,8	7,5	0,2	1,4 %
Glucose	18,5	Glutamat	14,4	7,8	0,24	1,5 %
Xylose	14	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	1	-	-
Xylose	14	L-Prolin	8,8	7,8	0,34	2,6 %
Xylose	14	Glutamat	14,4	8	0,13	1 %
Sorbitol	17	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	0,4	-	-
Mannose	16,8	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	9,8	0,2	1,3 %

Die Produktivität des G/A(HEPES)-Mediums ist mit 0,23 g/L polySia ebenfalls vergleichbar mit G/A(KPP). Es zeigten sich zum Teil jedoch auch sehr große Unterschiede zu den Kultivierungen mit KPP (0,08 M). In den Medien G/P(HEPES), G/G(HEPES) und M/A(HEPES) fand nun ein deutliches Bakterienwachstum statt und es konnten Produkttiter von 0,2-0,24 g/L nachgewiesen werden. Die Kultivierung in X/P(HEPES) führte zwar immer noch zu der besten polySia-Ausbeute, jedoch war

diese mit 0,34 g/L deutlich niedriger als erwartet. Ebenso die Verwendung von X/G(HEPES)-Medium, in dem nur noch 0,13 g/L Polysialinsäure produziert wurden.

### **5.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Zur Ermittlung der besten Voraussetzungen für die polySia-Produktion wurden verschiedene Screening-Versuche durchgeführt.

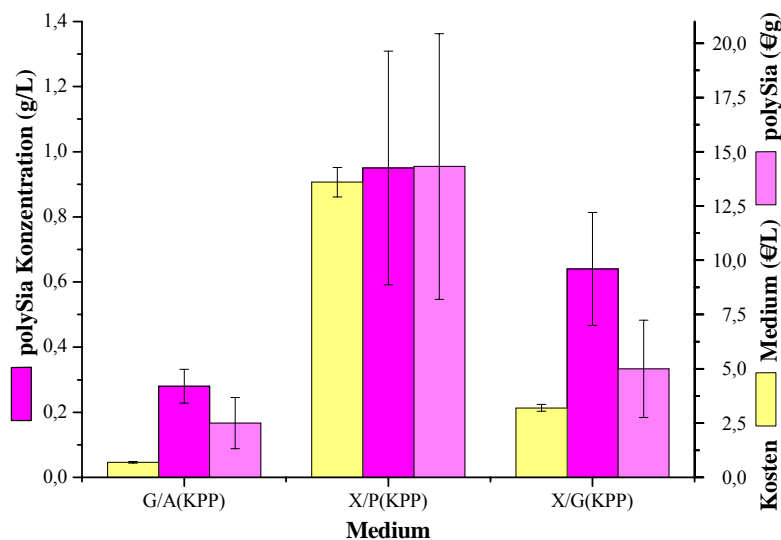
Das Screening der neun K1-Stämme ergab ein breites Spektrum an finalen polySia-Konzentrationen von 0,03-0,51 g/L. Stämme mit hohem Verwandtschaftsgrad zeigten bei der Untersuchung sehr ähnliche Produktionsraten. So produzierten die Stämme  $\delta 17$  und  $\delta 41$  beide ca. 0,15 g/L Polysialinsäure und  $\delta 25$  bzw.  $\delta 3$  jeweils 0,27 g/L. Für die weitere Prozessentwicklung wurde der mit einem Titer von 0,28 g/L polySia bereits etablierte Stamm B2032/82 gewählt.

Nachfolgende Screening-Versuche mit dem ausgewählten Stamm beinhalteten Variationen des Mediums hinsichtlich des Substrats, der N-Quelle und des eingesetzten Puffers.

Bei der üblichen Verwendung von Kaliumphosphat als Puffer für Bakterienkultivierungen stehen zwei Effekte einander gegenüber. Zum Einen sollte der Puffer so hoch konzentriert sein, dass er in der Lage ist, den optimalen pH-Wert von 7,5-8 während der gesamten Kultivierung aufrecht zu erhalten [RODRIGUEZ-APARICIO L.B. et al., 1988]. Zum Anderen kann sich jedoch eine zu hohe Phosphatkonzentration negativ auf die polySia-Produktion auswirken [UCHIDA Y. et al., 1973]. Die Kultivierungen in Phosphatpuffern verschiedener Konzentrationen und anderen komplexeren Puffern (HEPES, MOPS, TRIS) bestätigten die obige Aussage und zeigten, dass sowohl der pH-Wert als auch die Phosphatkonzentration Einfluss auf die polySia-Produktion haben. Gute Ergebnisse wurden in starken Puffern (0,2 M HEPES; pH 7,8-6,7) bei geringen Phosphatkonzentrationen (0,08 M) erzielt, wobei der Phosphatgehalt sich deutlich stärker auszuwirken scheint. So wurde trotz der geringen Pufferwirkung die beste Produktivität in 0,08 M KPP erreicht. Die Anwesenheit einer komplexeren Puffersubstanz wie HEPES, MOPS oder TRIS scheint sich zudem ebenfalls negativ auf die Produktbildung auszuwirken. Die Pufferkapazität war zwar insgesamt höher, die finale polySia-Konzentration jedoch

geringer. Komplexe Puffer sind zudem meistens unverhältnismäßig teuer und würden sich nur bei einer deutlichen Produktivitätssteigerung lohnen.

Weitere Screeningexperimente wurden in synthetischen Medien mit variablen Substrat/N-Quelle-Kombinationen unter Verwendung der beiden vielversprechendsten Puffer (0,2 M HEPES (+0,08 M KPP) und 0,08 M KPP) durchgeführt. Bei den Kultivierungen in HEPES-Puffer konnten insgesamt keine nennenswerten Ergebnisse erzielt werden. Trotz zum Teil guter Produktivität, beispielsweise bei der Verwendung des G/G(HEPES)-Mediums (0,24 g/L), sind die Medien für eine Anwendung im Produktionsmaßstab zu kostenintensiv und damit ungeeignet. Ebenfalls keine Rolle spielt das getestete Komplexmedium. Neben schwachen Produktausbeuten ist die nicht definierte Zusammensetzung des Mediums aufgrund erschwelter Downstreambedingungen ein Ausschlusskriterium.



**Abbildung 5.3:** Vergleich der Produktivität und der Medium- bzw. Produktkosten von drei verschiedenen Medien zur polySia-Produktion in *Escherichia coli* K1 B2032/82.

Bei den phosphatgepufferten Medien hingegen traten drei Kultivierungen in den Vordergrund, die noch einmal in Abbildung 5.3 zusammengestellt wurden. Die mit Abstand höchste polySia-Konzentration mit 0,95 g/L konnte im X/P(KPP)-Medium jedoch zu relativ hohen Kosten von 14 €/g erreicht werden. Die preisgünstigste

Darstellung mit nur 2,5 €/g gelang im G/A(KPP)-Medium mit einer akzeptablen Produktionsrate von 0,28 g/L polySia. Als Kompromiss kann die Verwendung des X/G(KPP)-Mediums angesehen werden, bei dem die Produktionskosten bei 5 €/g und die finale Produktkonzentration bei 0,64 g/L lag.

Die Ansätze zur Verbesserung des Produktionsmediums waren nur zum Teil erfolgreich. Die sehr guten Ausbeuten im X/P(KPP)-Medium, wie sie schon von Rodriguez-Aparicio et al. erzielt wurden, konnten erfolgreich reproduziert werden [RODRIGUEZ-APARICIO L.B. et al., 1988]. Die Substitution des teuren Prolins durch das metabolisch verwandte günstigere Na-Glutamat führte trotz einem Drittel Einbußen an Produkt immer noch zu einer überdurchschnittlichen Produktivität. Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache wäre der erleichterte Zugang der Bakterien zu Glutamin, welches im polySia-Syntheseweg für die Bildung des Glucosamins nötig ist (siehe Abbildung 2.7). Der versuchte „Quereinstieg“ in die polySia-Synthese durch den Einsatz von Mannose misslang. Offenbar besitzen die Bakterien keinen metabolischen Mechanismus für die Umwandlung von Mannose zu N-Acetylmannosamin. Abschließend betrachtet konnte bei der Gesamtheit aller Kultivierungen kein interpretierbares Muster erkannt werden. Es scheint, dass das Zusammenspiel der einzelnen untersuchten Komponenten sehr viel komplexer ist als angenommen und sich bei jeder Kombination anders auf das Wachstum und die polySia-Produktivität auswirkt.

Als Alternative zu den angewandten klassischen mikrobiologischen Screeningverfahren könnte eine moderne molekularbiologische Optimierung des Produktionsstammes in Betracht gezogen werden. Genmodifikationen, die zu einer Überexprimierung von Polysialinsäure führen, könnten die Ausbeute eventuell deutlich steigern. Erste Ansätze wurden bereits an *N.meningitidis* B durch Schaffung von *lipA* *lipB* Mutanten vorgenommen. Die Proteine *lipA* und *lipB* in NmB entsprechen *kpsS* und *kpsC* in *E.coli* K1 und sind verantwortlich für die Kopplung des Polysaccharids an den Glycerophosphatrest (siehe Kapitel 2.4) [TZENG Y. et al., 2005]. Durch die Abwesenheit des Lipidrests ist eine Verankerung in der äußeren Zellmembran ausgeschlossen, was zur sofortigen Freisetzung der Polysialinsäure führen würde. Gleichzeitig wurde durch die Entfernung des Lipidankers jedoch auch das Sekretierungsvermögen der Bakterien abgeschaltet, was zu einer intrazellularen Akkumulation

der polySia führte [TZENG Y. et al., 2005]. Eine Aussage über die Produktivität ist an dieser Stelle nicht zu finden. Trotzdem bleibt die gentechnische Veränderung der Bakterien eine viel versprechende Alternative, die bei richtigen Ansätzen das Potential zur deutlichen Produktionssteigerung hat.

## 6 Prozessoptimierung im 2-L-Bioreaktor

Die zwei viel versprechendsten Schüttelkolbenkultivierungen wurden auf den 2-L-Maßstab im Bioreaktor übertragen. Durch die integrierte Regelungstechnik ist bei der Verwendung von Bioreaktoren eine sehr viel bessere Steuerung bzw. Regelung vieler Kultivierungsparameter, wie der Durchmischung, der Sauerstoffversorgung oder des pH-Werts, möglich. Online-Messungen erlauben zudem eine detaillierte Überwachung und Analyse der Kultur.

Anhand von 2-L-batch-Kultivierungen sollte eine Optimierung der Rahmenbedingungen für die *E.coli* K1-Kultivierungen im Bioreaktor stattfinden. Hierbei kamen sowohl das G/A(KPP)- als auch das X/P(KPP)-Medium zum Einsatz. Der Schritt diente außerdem der Vorbereitung für die spätere Kultivierung im 10-L-Produktionsmaßstab.

Ebenfalls durchgeführt wurden fed-batch-Kultivierungen im 2-L-Maßstab in G/A(KPP)-Medium. Durch die Entwicklung einer Fütterungsstrategie sollte hier die Kohlenstoffausbeute des Produkts gesteigert werden.

Im Rahmen der Reaktorkultivierungen wurden respiratorische Parameter wie die Abgaszusammensetzung ( $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$ ) und die Sauerstoffsättigung automatisch online gemessen. Zusätzlich wurden bei allen Kultivierungen offline-Proben genommen und nach den bereits beschriebenen Methoden untersucht. Durch die automatische pH-Regelung kann bei Benutzung des Bioreaktors die Kultivierung bei optimaler Lage der Phosphatkonzentration und des pH-Werts stattfinden.

Bei der verwendeten Reaktoranlage handelte es sich um ein Biostat B-System (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, ehemals B. BRAUN Biotech International). Genaue Beschreibungen der Anlage und Messprinzipen sind im Kapitel 11.3.1 zu finden. Alle Durchläufe in den Bioreaktoren wurden mit 100 mL einer ausgewachsenen *E.coli* K1-Kultur ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $120\text{ min}^{-1}$ , 8-10 h) in Komplexmedium (ohne Glucosezusatz) inokuliert.



## 6.1 Batch-Kultivierung

Analog der Kultivierungen in Schüttelkolben wurden einfache batch-Kultivierungen im 2-L-Reaktor durchgeführt. Verwendet wurden dabei sowohl das kostengünstige G/A(KPP)-Medium als auch das produktionsstarke X/P(KPP)-Medium. Überwacht wurden online der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Anteil im Abgas, die Temperatur, der pH-Wert, der gelöstsauerstoff im Medium und die Rührgeschwindigkeit. Anhand von offline-Proben wurde die optische Dichte bestimmt und, je nach Bedingungen, der Gehalt der Kultur an Glucose, L-Prolin, Acetat und Polysialinsäure gemessen.

### 6.1.1 Kultivierung in G/A(KPP)-Medium

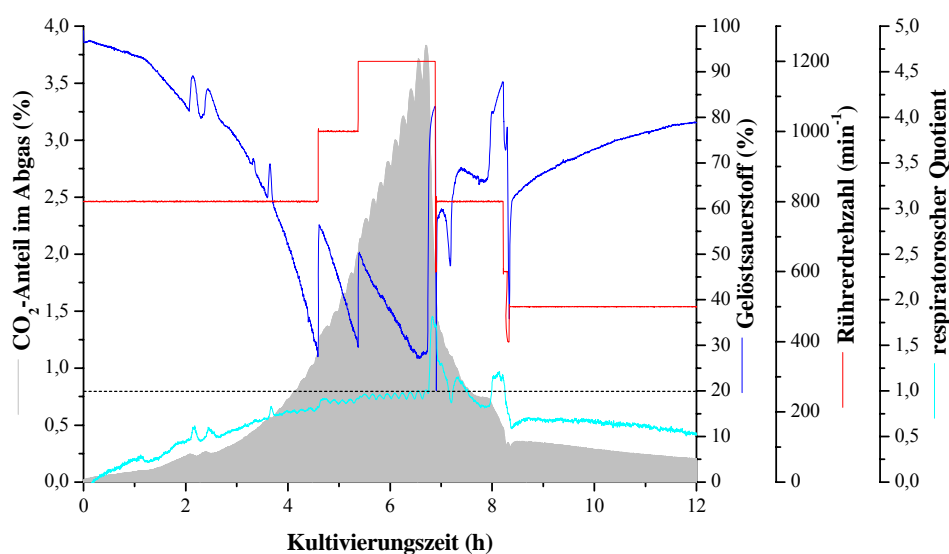
Die Rahmenbedingungen für die Kultivierung in G/A(KPP)-Medium können der Tabelle 6.1 entnommen werden.

**Tabelle 6.1:** Rahmenbedingungen der Kultivierung von *E.coli* K1 im 2-L-batch-Reaktor in G/A(KPP)-Medium.

G/A(KPP)-Medium			Parameter	
Substrat	Glucose	18,5 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L	Rührgeschw.	800-1.200 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M	pH	7,5
			Begasung (Luft)	2 L/min

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Sauerstoffversorgung wurden verschiedene Rührgeschwindigkeiten eingestellt. Die minimal während der Kultivierung zulässige Sauerstoffsättigung wurde auf 30 % festgelegt. Bei einem Unterschreiten dieses Wertes sollte der Sauerstoffeintrag durch Erhöhung der Rührerdrehzahl vergrößert werden. Abbildung 6.1 beinhaltet die Darstellung der respiratorischen Daten. Zum Kultivierungsbeginn wurde eine Begasungsrate von 2 L/min (1 vvm) und eine Rührerdrehzahl von 800 min<sup>-1</sup> gewählt. Zur Einhaltung der oben genannten Bedingungen musste die Rührerdrehzahl nach 4,5 h auf 1.000 min<sup>-1</sup> und nach 5,5 h ein weiteres Mal auf das Maximum von 1.200 min<sup>-1</sup> erhöht werden. Danach fiel die

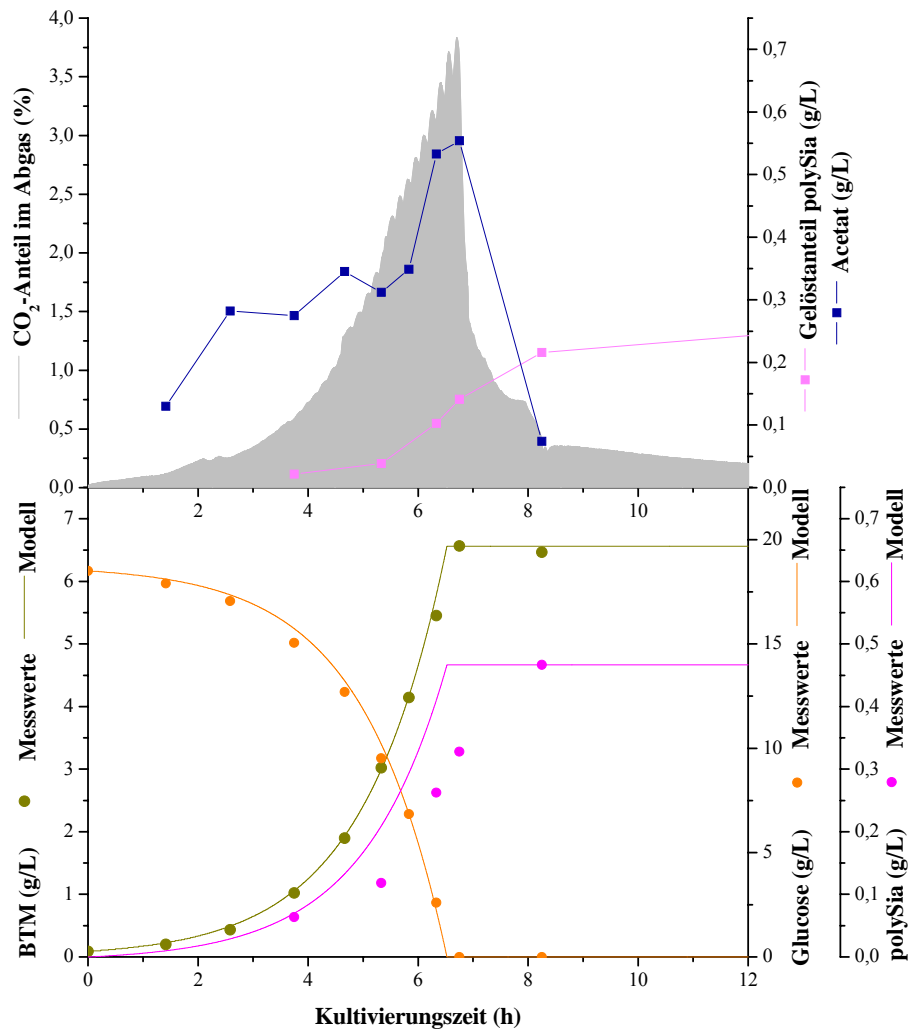
Sättigung mit Abschluss des Wachstums auf ein Minimum von 30 %. Mit der Verringerung der Stoffwechselaktivität, angezeigt durch den drastischen Rückgang der CO<sub>2</sub>-Produktion, wurde die Begasungsrate auf 0,5 L/min und die Rührerdrehzahl auf 500 min<sup>-1</sup> zurückgenommen um eine erhöhte Schaumproduktion zu verhindern. Die Sauerstoffsättigung pendelte sich unter diesen Bedingungen bei ca. 80 % ein. Der respiratorische Quotient stieg innerhalb der Wachstumszeit nach ca. 4 h auf einen Wert von 1 an und signalisierte so die erschöpfte Atmungskapazität der Bakterien.



**Abbildung 6.1:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im 2-L-Bioreaktor. Dargestellt sind der Gelöstsauerstoff, die Rührerdrehzahl und der respiratorische Quotient. Die gestrichelte Linie gibt den Übergang von rein aerobem zum fermentativ-gemischtem Stoffwechsel an (RQ>1). Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der CO<sub>2</sub>-Anteil im Abgas mit aufgetragen.

Abbildung 6.2 zeigt die Wachstumsdaten einer typischen *E.coli* K1-Kultivierung im 2-L-Reaktor. Die Wachstumsdauer bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose betrug ca. 7 h. Die maximale Biotrockenmasse wurde auf 6,6 g/L bestimmt, was einer optischen Dichte von ca. 24 Einheiten entspricht. Die Zelldichte war damit um den Faktor 2,6 höher als in den Schüttelkolbenkultivierungen unter ähnlichen Bedingungen. Die Gesamtmenge an produzierter polySia wurde in zellhaltigen Proben gemessen und betrug 0,46 g/L. Sie war damit fast doppelt so hoch wie im Schüttelkolbenexperiment. Der Gelöstanteil der gebildeten polySia wurde im Überstand

zentrifugierter offline-Proben bestimmt. Er betrug nach 7 h 0,22 g/L und stieg noch bis auf 0,32 g/L nach 23 h an, was einem Anteil von 69 % entspricht.



**Abbildung 6.2:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im 2-L-Bioreaktor. Das obere Diagramm zeigt den Gelöstanteil der produzierten polySia und die gemessene Acetatkonzentration. Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der CO<sub>2</sub>-Anteil im Abgas aufgetragen. Das untere Diagramm beinhaltet die Biotrockenmasse der Kultur, den Glucosegehalt und die Gesamtmenge an produzierter polySia. Die aufgenommenen Messwerte werden durch Punkte beschrieben. Die durchgezogenen Linien geben den Verlauf der erstellten Wachstumsmodelle an.

Während des Zellwachstums konnte außerdem eine kontinuierliche Anreicherung von Acetat bis zu einer hohen Konzentration von 0,55 g/L beobachtet werden. Nach dem

vollständigen Verbrauch der Glucose wurde das Acetat schließlich als Substrat verstoffwechselt, was auch durch ein kurzzeitiges Ansteigen des respiratorischen Quotienten ( $>1$ ) angezeigt wurde.

Zur Bestimmung der Wachstumsparameter wurde eine kinetische Analyse der Kultivierung vorgenommen. Für das Zellwachstum (BTM, X) und die Substrataufnahme (S) wurde ein einfaches exponentielles Modell für einen idealen Rührkesselreaktor benutzt (siehe Formel 1 und 2).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}}, \quad Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (2)$$

Für die Modellierung der Produktbildung (P) wurde eine lineare Korrelation mit dem Zellwachstum angenommen (Formel 3).

$$\frac{dP}{dt} = q_P X, \quad q_P = Y_{P/X} \mu, \quad Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (3)$$

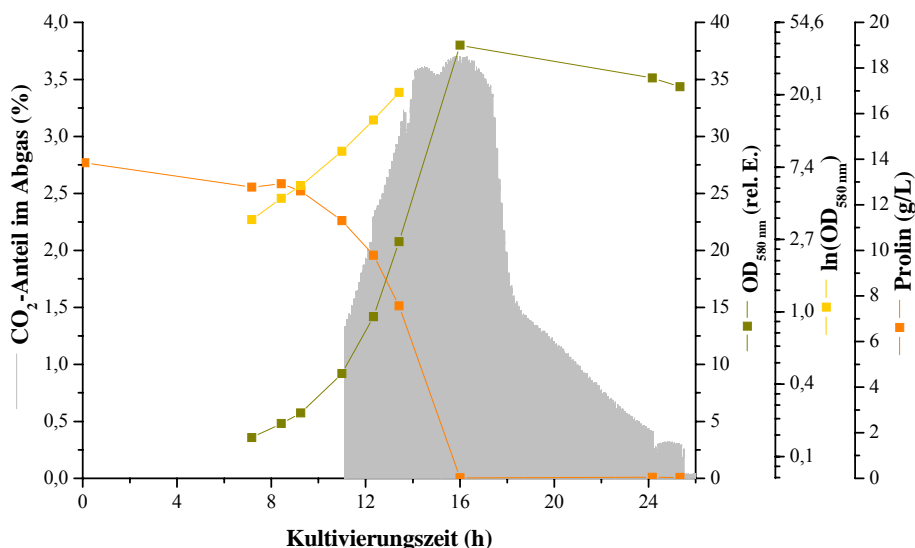
Die Ausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S}$  und  $Y_{P/X}$  wurden durch Differenzbildung der jeweiligen Anfangs- und Endwerte der beteiligten Größen berechnet. Die Differentialgleichungen wurden numerisch mit der Euler-Methode gelöst. Die Iterationsschrittweite der Zeit (t) wurde dabei auf 0,001 h festgelegt. Die simultane Lösung der Gleichungen ergab eine Wachstumskonstante ( $\mu$ ) von  $0,66 \text{ h}^{-1}$ , was einer Teilungszeit von 63 min entspricht. Für die Produktbildungsrate ( $q_P$ ) ergab sich ein Wert von  $0,047 \text{ h}^{-1}$ . Die erstellten Modelle sind in Abbildung 6.2 zusammen mit den Messdaten der Kultivierung dargestellt und beschreiben den Verlauf während des exponentiellen Wachstums gut. Größere Abweichungen treten nur in der Absterbephase der Kultivierung auf, welche jedoch nicht bei der Modellentwicklung berücksichtigt wurde.

## 6.1.2 Kultivierung in X/P(KPP)-Medium

Unter gleichen Bedingungen, wie in Tabelle 6.2 angeführt, wurden Kultivierungen in X/P(KPP)-Medium durchgeführt. Die Stoffmengenkonzentrationen für das Substrat und die N-Quelle waren identisch mit denen der Kultivierung in G/A(KPP)-Medium.

**Tabelle 6.2:** Rahmenbedingungen der Kultivierung von *E.coli* K1 im 2-L-batch-Reaktor in X/P(KPP)-Medium.

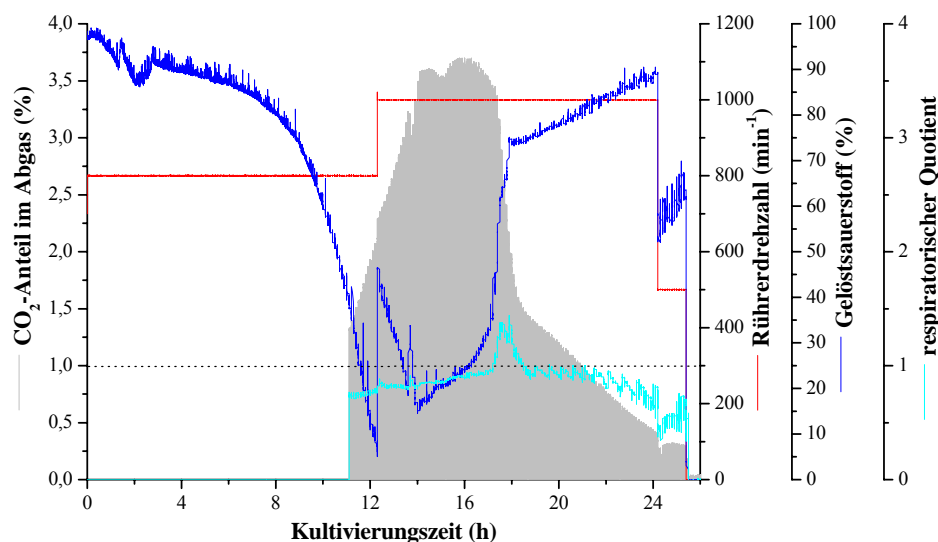
X/P(KPP)-Medium			Parameter	
Substrat	Xylose	14 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	L-Prolin	17,7 g/L	Rührgeschw.	800-1.000 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M	pH	7,5
			Begasung (Luft)	2 L/min



**Abbildung 6.3:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in X/P(KPP)-Medium im 2-L-Bioreaktor. Dargestellt sind der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas, die gemessene optische Dichte der Kultur und der Prolingehalt. Durch logarithmische Auftragung der optischen Dichte wurde die exponentielle Wachstumsphase identifiziert und die Wachstumskonstante bestimmt. Anlagenbedingt konnte mit der Aufzeichnung der respiratorischen Daten erst nach 11 h begonnen werden.

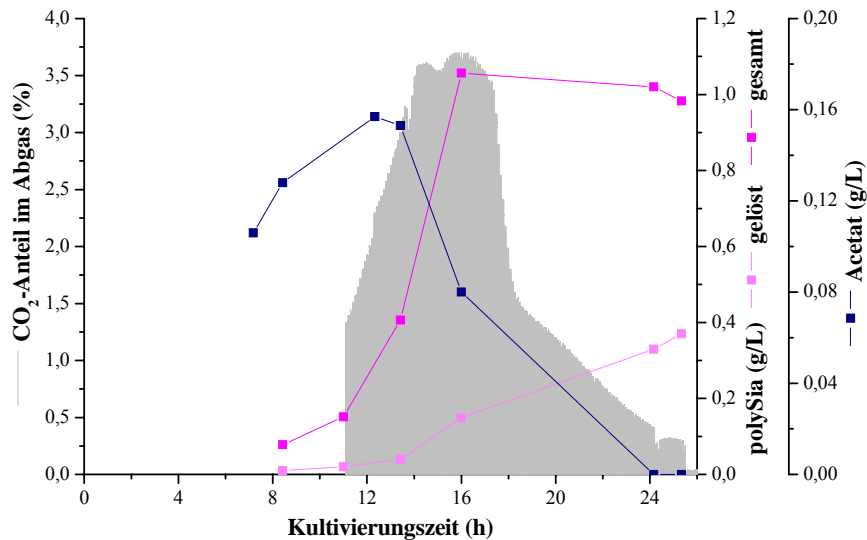
Die Wachstumszeit der Bakterien war bei der Verwendung von X/P(KPP) mit ca. 18 h erheblich länger (siehe Abbildung 6.3). Mit einer optischen Dichte von 38 Einheiten nach 16 h wurde jedoch eine deutlich höhere Zelldichte erreicht. Aus der logarithmischen Darstellung der OD-Werte wurde eine Wachstumskonstante von  $\mu=0,28 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die Teilungszeit der Bakterien betrug somit 215 min. Das eingesetzte Prolin war nach ca. 15 h vollständig abgebaut. Der maximale  $\text{CO}_2$ -Ausstoß lag mit 3,7 % im gleichen Bereich, wie bei der Kultivierung in G/A(KPP).

Zur Ermittlung der optimalen Sauerstoffversorgung wurde eine untere Sättigungsgrenze von 20 % gewählt, bei dessen Unterschreitung der Sauerstoffeintrag mittels des Rührers heraufgesetzt werden sollte. Diese Grenze wurde das erste Mal nach ca. 12 h erreicht und zog eine Erhöhung der Rührergeschwindigkeit von 800 auf  $1.000 \text{ min}^{-1}$  nach sich. Danach trat ein erneutes Minimum mit 15 % nach 14 h auf, welches ohne eine weitere Erhöhung der Rührergeschwindigkeit als akzeptabel eingestuft wurde. Eine Sauerstofflimitierung lag zu keiner Zeit vor.



**Abbildung 6.4:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in X/P(KPP)-Medium im 2-L-Bioreaktor. Dargestellt sind der Gelöstsauerstoff, die Rührerdrehzahl und der respiratorische Quotient. Die gestrichelte Linie gibt den Übergang von rein aerobem zum fermentativ-gemischtem Stoffwechsel an ( $\text{RQ}>1$ ). Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der  $\text{CO}_2$ -Anteil im Abgas mit aufgetragen.

Respiratorischen Daten stehen anlagenbedingt erst nach 11 h zur Verfügung. Der RQ zeigt bis auf einen kurzen Peak nach 18 h während der ganzen Kultivierung einen rein oxidativen Stoffwechsel an.



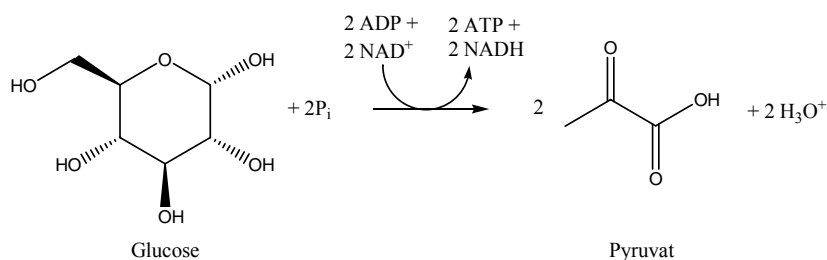
**Abbildung 6.5:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in X/P(KPP)-Medium im 2-L-Bioreaktor. Dargestellt sind die polySia-Konzentrationen im Überstand, die polySia-Gesamtkonzentration und die Acetatkonzentration. Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der CO<sub>2</sub>-Anteil im Abgas mit aufgetragen.

Am Ende der Kultivierung konnte eine maximale polySia-Konzentration von 1,05 g/L gemessen werden. Die Ausbeute war damit mehr als doppelt so hoch wie bei der Verwendung von G/A(KPP). Auch hier konnte eine fortschreitende Akkumulation des Produkts im Überstand nach Abschluss des Wachstums beobachtet werden. Der Anteil der freigesetzten polySia betrug nach 24 h ca. 40 %. Die Acetatproduktion fiel mit maximal 0,15 g/L nach 12 h deutlich geringer aus.

## 6.2 Fed-batch Kultivierung

Ein großes Problem aller batch-Kultivierungen, besonders bei der Verwendung des G/A(KPP)-Mediums, war die Bildung und Akkumulation von Acetat. Typischerweise

deutet das Auftreten von Acetat als Nebenprodukt bei der Kultivierung von Bakterien auf eine unökonomische Verstoffwechslung des Substrats hin. Der Grund hierfür ist in den meisten Fällen ein Sauerstoffmangel innerhalb der Zellen. Während der Glycolyse wird die Glucose, wie in Abbildung 6.6 dargestellt, über einen mehrstufigen Prozess unter Gewinnung von ATP und Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu Pyruvat abgebaut.



**Abbildung 6.6:** Nettoreaktion der Glycolyse.

Unter ausgewogenen aeroben Bedingungen kann das gebildete NADH anschließend mit Hilfe des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs reoxidiert werden. Bei nicht optimalen Bedingungen kann jedoch das Verhältnis des Glucoseabbaus zum vorhandenen Sauerstoff zu groß werden. Zum Einen durch eine Unterversorgung an Sauerstoff oder zum Anderen durch ein Überangebot an Glucose. Allein durch die Oxidation mit Sauerstoff kann das verbrauchte  $\text{NAD}^+$  nicht mehr zurückgewonnen werden. Einen Ausweg für das Bakterium bietet die gemischte Säuregärung, bei der durch die reduktive Bildung von Carbonsäuren (wie auch Acetat) das verbrauchte  $\text{NAD}^+$  regeneriert werden kann.

Um die überverhältnismäßige Produktion von Acetat durch ein zu großes Substrat/Sauerstoffverhältnis zurückzudrängen, wurde der batch-Betrieb des 2-L-Reaktors auf einen fed-batch-Betrieb umgestellt. Auf der Basis des Modells für die batch-Kultivierung wurden die Differentialgleichungen des Zellwachstums und des Substratverbrauchs um einen Term für die Beschreibung der Substratzufütterung erweitert. Der Wachstumsfaktor wurde außerdem durch einen Monod-Term ersetzt (siehe Formeln 4-6).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} SX}{K_M + S} - \frac{\dot{V}_{\text{feed}} X}{V_R} \quad (4)$$



$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{\max} SX}{K_M + S} \frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\dot{V}_{feed}(S_{feed} - S)}{V_R} \quad (5)$$

$$\frac{dV_R}{dt} = \dot{V}_{feed} \quad (6)$$

Zur Berechnung der Fütterungsrate ( $\dot{V}_{feed}$ ) mussten die Anfangskonzentrationen der Biomasse ( $X=0,25$  g/L, berechnet aus der Vorkultur) und der Glucose ( $S=5$  g/L) bekannt sein. Weitere Anfangsbedingungen waren das Startvolumen der Kultur ( $V_R=1$  L) und die Glucose-Konzentration im Feed-Medium ( $S_{feed}=300$  g/L). Durch Vortests in substratlimitierten Kulturen wurden die Monod-Konstante ( $K_M=0,5$  g/L), der Zellmasseausbeutekoeffizient ( $Y_{X/S}=0,562$  g/L) und der maximale Wachstumsfaktor ( $\mu_{\max}=0,4$  h<sup>-1</sup>) abgeschätzt. Für die Integration der Differentialgleichungen wurde erneut das Euler-Verfahren verwendet. Zur Berechnung der Fütterungsrate wurde eine konstante Glucose-Konzentration von 0,5 g/L angenommen. Das so erhaltene Modell wurde in ein Computerprogramm zur Steuerung einer Feed-Pumpe eingebunden. Die Kultivierungsbedingungen sind Tabelle 6.3 zusammengefasst.

**Tabelle 6.3:** Rahmenbedingungen der fed-batch-Kultivierung von *E.coli* K1 im 2-L-Reaktor in G/A(KPP)-Medium. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das in Vorlage- und Feed-Medium.

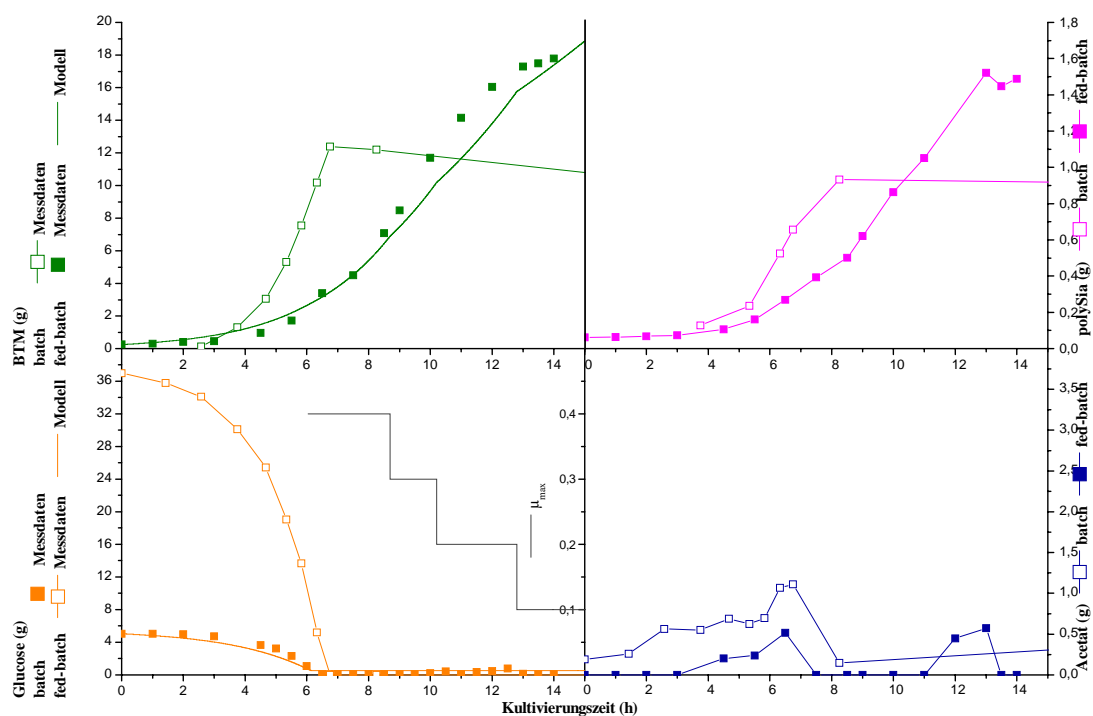
Synthetisches Medium (Vorlage/Feed)			Parameter	
Substrat	Glucose	5 g/L / 300 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L / 60 g/L	Rührgeschw.	1.200 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M / 0,08 M	pH	7,5
			Begasung (Luft)	1 vvm

Die Fütterung wurde direkt im Anschluss an die batch-Phase gestartet und über 8 h durchgeführt. Insgesamt wurden dabei 33,5 g Glucose in 110 mL Medium zugeführt. Die Gesamtmenge der umgesetzten Glucose (38,5 g) war somit nahezu identisch mit der in der Vergleichskultivierung (37 g). Während der gesamten Kultivierung wurde die Glucosekonzentration in geeigneten Abständen überwacht. Ungenauigkeiten im Modell führten mehrmals zu einer Akkumulation von Glucose über die angestrebte

Grenze von 0,5 g/L hinaus. Die Fütterungsrate wurde durch Änderung der maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,1 \text{ h}^{-1}$  stufenweise herabgesetzt.

Die Abbildung 6.7 zeigt den Vergleich der batch- und der fed-batch-Kultivierung unter identischen Bedingungen. Um die feedbedingte Volumendiskrepanz auszugleichen, sind anstatt der Konzentrationen die Absolutmengen der Messgrößen in den Diagrammen angegeben.

Die Vergleichskultivierung im reinen batch-Betrieb war nach 6,5 h mit dem vollständigen Verbrauch des Substrats und dem Erreichen einer Biomasse von 12,4 g abgeschlossen. Die produzierte Menge an Polysialinsäure betrug 0,93 g. Während der Kultivierung kam es zu einer Akkumulation von insgesamt 1,1 g Acetat.



**Abbildung 6.7:** Vergleich zweier Kultivierungen von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im reinen batch- und im fed-batch-Betrieb. In den Diagrammen für die Biotrockenmasse und die Glucose sind jeweils die Messdaten der Kultivierungen und zusätzlich die Modelle für die fed-batch-Kultivierung aufgetragen. Die Diagramme für die gebildete polySia und das Acetat enthalten nur Messdaten. Die Änderung der maximalen Wachstumskonstanten ( $\mu_{\max}$ ) ist unten links mit eingetragen.

Wie erwartet zeigte sich in der batch-Phase der Kultivierung mit 5 g Glucose zunächst ein geringeres Bakterienwachstum als bei der Vergleichskultivierung mit 37 g. Mit

Abschluss des Glucoseverbrauchs nach ca. 6,5 h weist die Kurve der produzierten Biomasse einen kleinen Knick auf, welcher auf eine kurzzeitige Substratabwesenheit zurückzuführen ist. In der sich anschließenden Fütterungsphase fand eine nahezu lineare Zunahme der Biomasse statt, welche bei ca. 18 g in einen Sättigungszustand überging. Die Gesamtmenge an produzierter Polysialinsäure betrug zum Ende der batch-Phase 0,27 g und konnte durch die Fütterung auf insgesamt 1,5 g gesteigert werden. Die Menge an gebildetem Acetat konnte hingegen leicht zurückgedrängt werden. Am Ende der batch-Phase trat eine kleine Spitze von 0,52 g Acetat auf. Ein zweiter Acetat-Peak von 0,57 g wurde nach ca. 12,5 h gemessen. Zu dieser Zeit befanden sich die Bakterien bereits in einer Übergangsphase zum stationären Zustand, was durch die Verlangsamung des Wachstums zu einer verringerten Glucoseaufnahme führte. Die daraus resultierende Anreicherung des Substrats hatte aus den oben beschriebenen Gründen wiederum die Bildung von Acetat zur Folge. Ein Vergleich des Modellverlaufs mit den tatsächlichen Messwerten der Zellmasse und Glucose zeigte bis auf kleinere Abweichungen eine gute Übereinstimmung. Offenbar eignet sich das aufgestellte Modell im Rahmen dieser Anwendung gut für die Beschreibung des Zellwachstums.

### **6.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Die zwei viel versprechendsten Schüttelkolbenkultivierungen in G/A(KPP)- und X/P(KPP)-Medium wurden auf den 2-L-Bioreaktormaßstab übertragen.

Die Wachstumszeit in 2 L G/A(KPP)-Medium betrug bei einer Substratkonzentration von 18,5 g/L ca. 7 h und führte zu einer Zelldichte (BTM) von 6,6 g/L. Die Produktausbeute betrug 0,46 g/L polySia. Im Vergleich mit der Schüttelkolbenkultivierung zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse. Bei gleicher Substratkonzentration wurde eine um den Faktor 2,6 höhere Zelldichte erreicht. Gleichzeitig erhöhte sich die Produktausbeute um den Faktor 1,6. Für eine kinetische Analyse der Kultivierung wurde ein einfaches exponentielles Wachstumsmodell zur Beschreibung des Verlaufs der Biomassenkonzentration, der Glucoseaufnahme und der Produktbildung aufgestellt. Durch simultane Lösung der aufgestellten Differentialgleichungen ergab sich eine Wachstumskonstante von  $0,66 \text{ h}^{-1}$ . Die Produktbildungsrate betrug

0,047 h<sup>-1</sup>. Trotz verbesserter Sauerstoffversorgung wurden immer noch 1,1 g Acetat während der Kultivierung gebildet. Der in Acetat überführte Anteil von Kohlenstoff, bezogen auf das eingesetzte Substrat, konnte aber von 15 % im Schüttelkolben auf 3,3 % im Bioreaktor zurückgedrängt werden. Eine weitere Optimierung der Sauerstoffversorgung im 2-L-Maßstab war aufgrund des erreichten Rührerdrehzahl-limits nur durch Erniedrigung der Substratkonzentration oder durch Umstellung der Kultivierungsstrategie erreichbar.

Konsequenterweise wurde die Bioreaktorkultivierung auf einen fed-batch-Betrieb (Startvolumen 1 L) umgestellt. Einer kurzen batch-Phase von 6,5 h mit 5 g/L Glucose folgte die Zufütterung von glucosehaltigem feed-Medium über einen Zeitraum von 8 h. Für die automatisierte Fütterung wurde ein Wachstumsmodell mit Monod-Kinetik aufgestellt. Das Modell sollte durch die Einstellung einer maximalen Wachstumsrate für ein geregeltes Zellwachstum unter Substratlimitierung sorgen. Während der fed-batch-Kultivierung wurden schließlich vier verschiedene Wachstumsraten eingestellt und das Modell mit den realen Messdaten verglichen. Trotz einiger Abweichungen wurden das Wachstum der Bakterien und der Substratverbrauch grundsätzlich richtig von dem Modell beschrieben. Durch die Umstellung auf den fed-batch-Betrieb konnte die Biomasseproduktion noch einmal um den Faktor 1,4 und die Produktausbeute sogar um das 1,6fache gesteigert werden. Der Anteil an Kohlenstoff, der zur Bildung von Acetat herangezogen wurde, muss im Rahmen des Messfehlers hingegen als nahezu konstant angesehen werden. Die Tabelle 6.4 zeigt einen Vergleich der Kohlenstoffausbeuten im Schüttelkolben und im Bioreaktor im batch- und fed-batch-Betrieb.

**Tabelle 6.4:** Vergleich der Kohlenstoffausbeuten von Polysialinsäure und Acetat in unterschiedlichen Kultivierungen nach der Aufnahme der angegebenen Menge Glucose.

<b>Kultivierung</b>	<b>verstoff- wechselte Glucose (g)</b>	$\frac{C_{\text{polySia}}}{C_{\text{Subs.}}}$	$\frac{C_{\text{Ac.}}}{C_{\text{Subs.}}}$
Schüttelkolben	1,85	1.8 %	15 %
Bioreaktor batch	37	2.9 %	3,3 %
Bioreaktor fed-batch (Ende)	38.5	4.6 %	3.1 %

Bei einer Betrachtung der Hauptzeitpunkte der Acetatbildung ergeben sich durchaus Ansätze für weitere Verbesserungen. Die Bildung des während der vorangegangenen batch-Phase akkumulierten Acetats ließe sich vermutlich durch eine Herabsetzung der anfänglichen Glucosekonzentration vermeiden. Am Ende der Fütterungsphase trat ein weiterer Peak auf, welcher auf eine unerwartete Akkumulation von Glucose zurückzuführen ist. Eine Verbesserung des benutzten Modells könnte sich hier positiv auswirken. Durchaus sinnvoll wäre zum Beispiel der Einsatz eines FIA-Systems, durch das eine deutlich bessere Überwachung der Substratkonzentration und Prozessregelung möglich wäre. Eine Übertragung der noch nicht ausgereiften fed-batch-Kultivierung auf den Produktionsmaßstab wurde in dieser Arbeit nicht vollzogen. Zudem würde, bedingt durch die hohen erwarteten Zelldichten, die Kapazität des Downstremprozesses überschritten werden. Weitere Informationen hierzu sind in Kapitel 8.2 zu finden.

Die Bioreaktorkultivierung in X/P(KPP)-Medium war nach ca. 20 h abgeschlossen. Mit einer OD von 38 Einheiten wurde eine deutlich höhere Zelldichte als im G/A(KPP)-Medium erreicht. Die Wachstumskonstante wurde aus der Steigung zu  $0,28 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die finale polySia-Konzentration betrug  $1,05 \text{ g/L}$  und lag damit im gleichen Bereich wie bei der Schüttelkolbenkultivierung. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung konnte bereits bei einer Rührgeschwindigkeit von  $1.000 \text{ min}^{-1}$  erreicht werden. Die Acetatproduktion spielte daher mit lediglich  $0,15 \text{ g/L}$  keine wesentliche Rolle bei der Kultivierung in X/P(KPP). Die Kultivierung unterlag ab 14,5 h einer Wachstumslimitierung, angezeigt durch einen nahezu konstanten  $\text{CO}_2$ -Ausstoß über 3,5 h, welche durch den vollständigen Verbrauch der Stickstoffquelle (Prolin) verursacht wurde. Trotz der immer noch überlegenden Ausbeuten, verglichen mit dem G/A(KPP)-Medium, sind die sehr hohen Investitionskosten ein starkes Gegenargument für eine Anwendung im Produktionsmaßstab. Eine Verbesserung der Ergebnisse könnte vielleicht durch eine parallele Applikation von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-Prolin erreicht werden, womit eine Stickstofflimitierung bei einem hohen Produktbildungsvermögen nahezu ausgeschlossen wäre. Ob diese Maßnahmen allerdings eine derartige Produktionssteigerung mit sich ziehen würden, um die nötigen Kosten zu decken, ist mehr als fragwürdig. Die bessere Alternative scheint in diesem Fall die kontrollierte fed-batch-Kultivierung im günstigeren G/A(KPP)-Medium zu sein.

## 7 Polysia-Produktion im 10-L-Bioreaktor

Für die Produktion fand ein weiteres Scale-up auf den 10-L-Maßstab statt. Als Produktionsstrategie wurde die batch-Kultivierung in G/A(KPP)-Medium gewählt. Die Gründe hierfür lagen hauptsächlich in einer praktikableren Durchführung der Kultivierung und den geringsten Kosten des Produktionsmediums. Die Zusammensetzung des Mediums und alle Kultivierungsparameter wurden übernommen oder im entsprechenden Verhältnis vergrößert. Eine Zusammenfassung gibt die Tabelle 7.1.

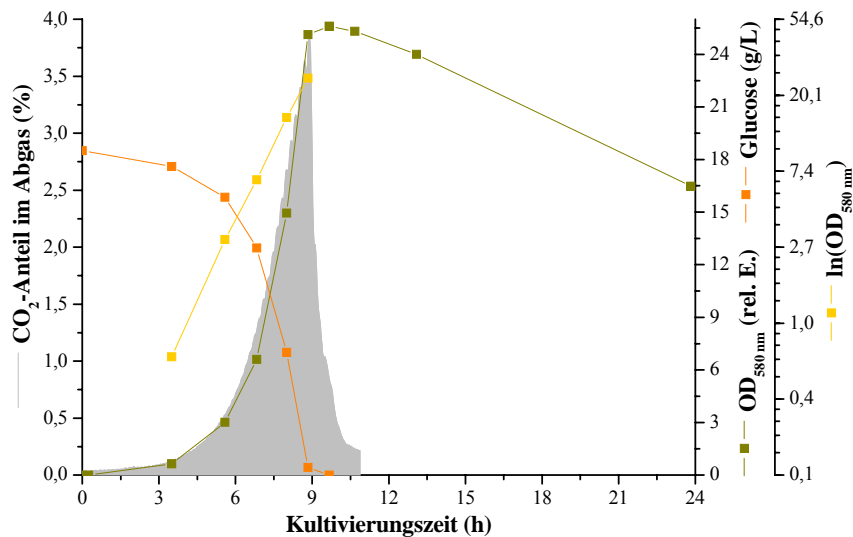
**Tabelle 7.1:** Rahmenbedingungen für die polySia-Produktion mittels *E.coli* K1 im 10-L-Reaktor im batch-Betrieb.

G/A(KPP)-Medium			Parameter	
Substrat	Glucose	18,5 g/L	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L	Rührgeschw.	1.000 min <sup>-1</sup>
Puffer	KPP	0,08 M	pH	7,5
			Begasung (Luft)	10 L/min

### 7.1 Batch-Produktion in G/A(KPP)-Medium

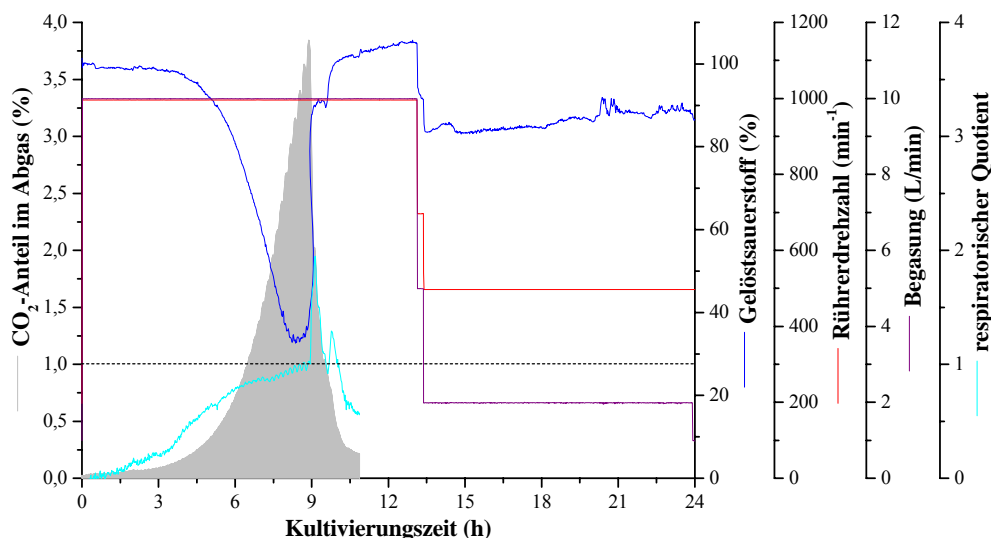
Die Abbildung 7.1 bis Abbildung 7.3 geben den typischen Verlauf einer *E.coli* K1-Kultivierung im 10-L-Maßstab wieder. Die Wachstumszeit der Kultur betrug ca. 9 h. Nach dieser Zeit war die eingesetzte Glucose komplett verbraucht und das Bakterienwachstum ging in den stationären Zustand über. Die erreichte maximale optische Dichte der Kultur lag bei 25,6 Einheiten. Die Stoffwechselektivität, gekennzeichnet durch den Kohlendioxydgehalt im Abgas, sank von 3,6 % bis auf einen Minimalwert ab. Die Datenaufzeichnung der Abgaswerte musste daraufhin abgebrochen werden. Anhand der logarithmischen Auftragung der Wachstumskurve lässt sich erkennen, dass sich die Bakterien bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose in einem exponentiellen Wachstum befanden. Es ist keine lineare Übergangsphase zu erkennen, die auf eine Wachstumslimitierung vor der stationären Phase schließen lassen würde.

Die aus der Steigung berechnete Wachstumskonstante beträgt  $0,69 \text{ h}^{-1}$ , woraus sich eine Generationenzeit von ca. 61 min ergibt.



**Abbildung 7.1:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im 10-L-Bioreaktor zur Produktion von Polysialinsäure. Dargestellt sind der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas, die gemessene optische Dichte der Kultur und der Glucosegehalt. Durch logarithmische Auftragung der optischen Dichte wurde die exponentielle Wachstumsphase identifiziert und die Wachstumskonstante bestimmt.

Die Kurve des Gelöstsauerstoffs verläuft genau gegensätzlich zur CO<sub>2</sub>-Produktion. Der Wert sank von einer anfänglichen Sättigung von 100 % auf minimal 32 % ab. Ein ausreichender Sauerstoffeintrag konnte im Vergleich zur 2-L-Kultivierung damit schon bei einer Rührgeschwindigkeit von  $1.000 \text{ min}^{-1}$  gewährleistet werden. Der respiratorische Quotient zeigte während der gesamten Wachstumszeit einen rein oxidativen Stoffwechsel an. Nach ca. 13,5 h wurde die Begasung auf 2 L/min und die Rührerdrehzahl auf  $500 \text{ min}^{-1}$  zurück geregelt, um eine zu hohe Schaumentwicklung und damit den Verlust von Kulturbrühe zu vermeiden. Das anschließende Absinken des Gelöstsauerstoffs zeigt eine immer noch vorhandene Reststoffwechselaktivität an.

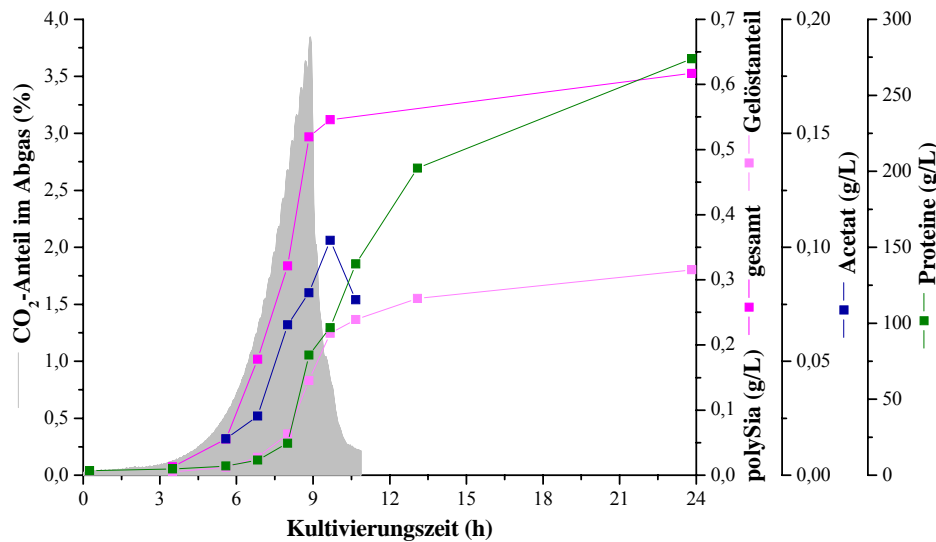


**Abbildung 7.2:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im 10-L-Bioreaktor zur Produktion von Polysialinsäure. Dargestellt sind der Gelöstsauerstoff, die Rührerdrehzahl, die Begasung und der respiratorische Quotient. Die gestrichelte Linie gibt den Übergang von rein aerobem zum fermentativ-gemischtem Stoffwechsel an ( $RQ > 1$ ). Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der  $CO_2$ -Anteil im Abgas mit aufgetragen.

Die Messung der Polysialinsäure-Konzentration wurde sowohl in zellhaltigen Proben zur Bestimmung des Gesamtgehalts durchgeführt, als auch im Zentrifugationsüberstand, um den Anteil an freigesetztem Produkt zu erfassen. Der Verlauf ist in Abbildung 7.3 dargestellt. Der Gesamtgehalt steigt bis zum Ende des exponentiellen Wachstums stetig an und erreicht ein Maximum von 0,55 g/L. Um eventuell spät auftretende Schwankungen der polySia-Konzentration zu bemerken, wurde die Kultivierung noch für 15 h weitergeführt. Tatsächlich konnte noch ein spätes Ansteigen der Gesamtkonzentration auf 0,62 g/L festgestellt werden. Die Konzentration der freien Polysialinsäure im Überstand betrug am Ende des exponentiellen Wachstums 0,22 g/L und erhöhte sich nach weiteren 3,5 h noch einmal auf 0,27 g/L. Die prozentual freigesetzte Menge lag in Durchschnitt bei 60 %. Die Bildung von Acetat spielte bei der 10-L-Kultivierung keine Rolle. Es wurden nur maximal 0,1 g/L Acetat freigesetzt. Zur Bestimmung von möglichen Verunreinigungen wurde außerdem die Konzentration gelöster Proteine im Überstand gemessen. Diese betrug zum



Ende des Wachstums ca. 100 mg/L und stieg bis zum Abbruch der Kultivierung nach 24 h durch lysierende Zellen noch auf 275 mg/L an.



**Abbildung 7.3:** Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* K1 in G/A(KPP)-Medium im 10-L-Bioreaktor zur Produktion von Polysialinsäure. Dargestellt sind die polySia-Konzentrationen im Überstand und die polySia-Gesamtkonzentration. Als Orientierungs- und Vergleichswert ist der CO<sub>2</sub>-Anteil im Abgas mit aufgetragen.

## 7.2 Zusammenfassung und Diskussion

Für die polySia-Produktion im 10-L-Bioreaktor wurde die Kultivierung mit G/A(KPP)-Medium im batch-Betrieb gewählt. Die Wachstumszeit der Bakterien bis zum vollständigen Glucoseverbrauch betrug ca. 9 h. Die erreichte Zelldichte war mit einer OD von 25,6 Einheiten nahezu identisch mit der Kultivierung im 2-L-Maßstab. Die Wachstumskonstante lag mit  $0,69 \text{ h}^{-1}$  ebenfalls in derselben Größenordnung. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung wurde bereits bei einer Rührgeschwindigkeit von  $1.000 \text{ min}^{-1}$  erreicht. Die polySia-Produktion konnte mit  $0,55 \text{ g/L}$  nach 9 h noch einmal leicht gesteigert werden. Zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts wurde die Kultivierung noch bis 24 h nach dem Animpfen weitergeführt. Während dieser Zeit konnte ein weiteres Ansteigen der polySia-Gesamtkonzentration auf

## **7 PolySia-Produktion im 10-L-Bioreaktor** **Experimenteller Teil**

0,62 g/L beobachtet werden, was mit einem fortschreitenden Zellwachstum erklärt werden kann. Bestätigt wird dieses auch durch den verminderten Gelöstsauerstoff zu dieser Zeit. Durch die fortschreitende Zelllyse werden Nährstoffe frei, die von noch lebenden Bakterien genutzt werden können. Auch der Gelöstanteil der produzierten polySia zeigt noch eine leichte Zunahme nach Abschluss des Wachstums, genau wie die Konzentration der gelösten, verunreinigenden Proteine. Der optimale Erntezeitpunkt, der einen guten Kompromiss zwischen hoher Produkt- und möglichst niedriger Proteinkonzentration darstellt, wurde auf 3-5 h nach Abschluss des Wachstums bestimmt.

Bei wiederholter Kultivierung zeigten sich, trotz gleicher Voraussetzungen, biologisch bedingte Schwankungen in der produzierten Menge an Polysialinsäure. Die Ausbeuten lagen dabei in einem Bereich von 0,4-0,55 g/L. Eine Zusammenfassung der Bedingungen und Ergebnisse für die biosynthetische Darstellung ist in Tabelle 7.2 zu finden.

**Tabelle 7.2:** Bedingungen und Ergebnisse der Produktion von K1-polySia im 10-L-Bioreaktormaßstab.

<b>Produktionsbedingungen</b>		<b>Ergebnisse</b>	
Maßstab	10 L	Ausbeute	4-5,5 g
Strategie	batch	Zeitaufwand	24 h
Medium	G/A(KPP)	Materialkosten	7 €

## 8 Downstreaming von Polysialinsäure

In der Bioverfahrensentwicklung folgt im Anschluss an die Kultivierung die Aufarbeitung des Produkts. Ziel des Downstream-Processing ist die möglichst verlustfreie Isolierung des Zielmoleküls von den Verunreinigungen. In der Regel wird dieses durch eine Verkettung von verschiedenen Trennschritten erreicht. Die einzelnen unit-operations sind dabei mehr oder weniger auf die Abtrennung spezieller Kontaminanten abgestimmt. Die Kenntnis der enthaltenen Verunreinigungen ist deshalb von großem Vorteil. Im Folgenden ist eine Auswahl an möglichen Kontaminanten aufgeführt:

- **Zellen/Zellfragmente:** Die Zellen stellen massenanteilig den größten Teil der unerwünschten Inhaltsstoffe dar. Auf Grund der Größe sollte sich eine Abtrennung durch Zentrifugation oder Filtration aber einfach gestalten.
- **DNA/RNA:** Eine Verunreinigung mit DNA bzw. RNA wäre durch die Ausschleusung von Plasmiden oder durch lysierte Zellen denkbar. Eine gezielte Untersuchung auf verunreinigendes Genmaterial fand am Ende des Prozesses statt.
- **Proteine:** Auf Grund ihrer Löslichkeit und vergleichbarer Größe mit den Polysacchariden stellt die Abtrennung der Proteine die größte Herausforderung im Downstreamprozess dar. Mögliche Methoden hierzu wurden bereits in Kapitel 3 beschrieben.
- **Salze:** Der Gehalt an Salzen wird hauptsächlich durch das verwendete Medium bestimmt und kann somit recht genau abgeschätzt werden. Die Abtrennung von Salzen sollte durch Chromatographie und Dialyse problemlos zu erreichen sein. In hohen Konzentrationen können Salze jedoch die Löslichkeitseigenschaften anderer Inhaltsstoffe verändern und somit den Aufarbeitungsprozess verkomplizieren.
- **Endotoxine:** Unter den vorliegenden Umständen war eine endotoxinfreie Arbeit nicht durchführbar. Zwar besitzen Kapselpolysaccharide der Gruppe 2 selbst keinen Lipid-A-Anker [WHITFIELD C., 2006], jedoch können Lipopoly-

saccharide coexprimiert oder durch die Verwendung von nicht gereinigtem Wasser eingetragen werden. Ein separater Schritt zur Abtrennung von Endotoxinen wurde nicht geplant.

- **Viren:** Viren wurden im entwickelten Downstreamprozess nicht berücksichtigt.
- **Wasser:** Wasser nimmt als „Kontaminant“ eine besondere Stellung ein, da es gleichzeitig ein notwendiges Arbeitsmedium ist. Eine spätere Abtrennung vom Produkt kann sehr einfach durch Trocknung erreicht werden.

Der folgende Aufarbeitungsprozess wurde auf der Grundlage der Isolierungsstrategien für Polysaccharide entwickelt, wie sie in Kapitel 3 beschrieben worden ist.

## **8.1 PSA-Freisetzung aus den Zellen**

Wie in Kapitel 7.1 gemessen, lag die prozentual im Kulturmedium gelöste Menge an Polysialinsäure bei ca. 60 %. Der überwiegende Teil des Produkts konnte also direkt aus dem Medium gewonnen werden. Zur Steigerung der Ausbeute wurde versucht den gebundenen Rest durch Zellaufschluss oder gezielte Freisetzung von den Zellen zu lösen.

Getestet wurden mechanische und chemische Zellaufschlussmethoden, welche jedoch den Nachteil haben, durch die vollständige oder teilweise Zerstörung der Zellwände, unerwünschte lösliche Verunreinigungen freizusetzen. Zur Vermeidung dieses Umstands wurden alternativ zusätzlich Methoden untersucht, die eine gezielte Ablösung des Antigens von der Zelloberfläche ermöglichen sollten.

### **8.1.1 Mechanischer Zellaufschluss**

Klassische Methoden zur mechanischen Zellyse sind der Aufschluss per Ultraschall, Homogenisator (Ultraturrax), Kugelmühle, French-Press oder einfach durch Einfrieren und Auftauen. Das Ziel ist es dabei stets, die Zellwand durch die Aussetzung einer mechanischen Überbelastung zu zerstören. Die getesteten Methoden unter den angegebenen Bedingungen sind in Tabelle 8.1 zusammengestellt. Eingesetzt

wurden jeweils 2-10 mL einer ausgewachsenen *E.coli* K1 Kultur mit einer polySia-Gesamtkonzentration von 0,28 g/L. Nach der Behandlung wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (3 min, 13.000 min<sup>-1</sup> bei 2 mL bzw. 20 min, 4.000 min<sup>-1</sup> bei 10 mL) abgetrennt und die polySia-Konzentration im Überstand gemessen.

**Tabelle 8.1:** Versuchsbedingungen für den chemischen Zellaufschluss von *Escherichia coli* K1 zur Freisetzung von Polysialinsäure.

<b>Zellaufschlussmethoden</b>	
Ultraschall	2× 1 min bei 24.000 min <sup>-1</sup>
Ultraturrax	3× 30 s bei 80 W
Kugelmühle	10 min bei 8.000 min <sup>-1</sup>
einfrieren	-80 °C

Das Ergebnis zeigte, dass bei keiner der untersuchten Methoden eine signifikante Erhöhung der polySia-Konzentration im Zellüberstand gemessen werden konnte.

### 8.1.2 Chemischer Zellaufschluss

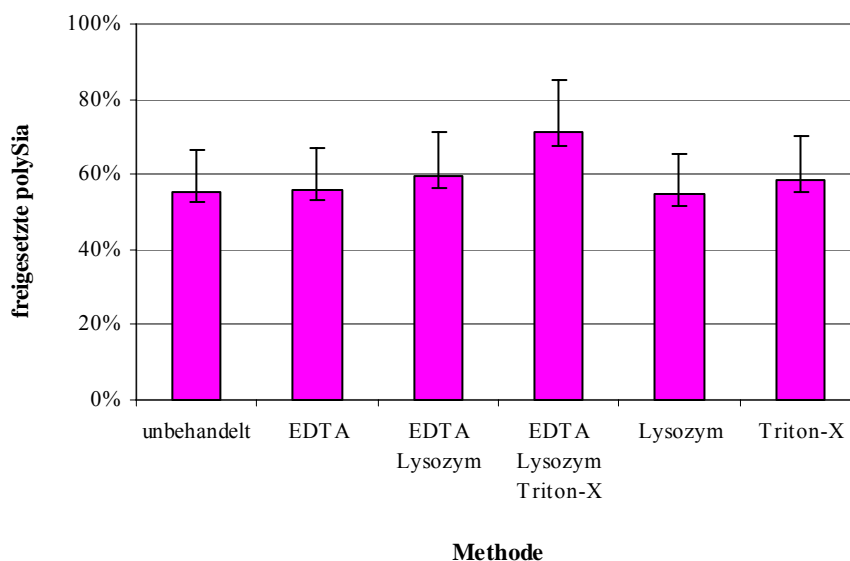
Der chemische Zellaufschluss kann durch die Zerstörung der Zellwände mit Hilfe von Enzymen oder Detergenzien erreicht werden. Übliche Reagenzien sind hierbei Lysozym und Triton-X. Während Lysozym den Abbau der Peptidoglycanhülle des Bakteriums katalysiert, wirkt Triton-X direkt zerstörend auf die Zellmembran. Bei Gram-negativen Bakterien kann die Zelllyse durch den Einsatz von EDTA unterstützt werden. Die Stabilität der Polysaccharidhülle beruht zum Teil auf ionischen Wechselwirkungen mit Kationen, wie z.B. Ca<sup>2+</sup>. Durch Ionenkomplexierung kann das EDTA für einen Aufbruch dieser Struktur sorgen.

Für die Freisetzung wurde eine ausgewachsene *E.coli* K1 Kultur mit einer polySia-Gesamtkonzentration von 0,28 g/L verwendet. In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 10 mL der Zellsuspension entsprechend der Tabelle 8.2 behandelt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 4.000 min<sup>-1</sup>) wurde die polySia-Konzentration im Zellüberstand gemessen.

**Tabelle 8.2:** Versuchsbedingungen für den chemischen Zellaufschluss von *Escherichia coli* K1 zur Freisetzung von Polysialinsäure.

	<b>EDTA</b>	<b>EDTA Lysozym</b>	<b>EDTA Lysozym Triton-X</b>	<b>Lysozym</b>	<b>Triton-X</b>
EDTA	1 g/L	1 g/L	1 g/L	-	-
Lysozym	-	1 g/L	1 g/L	1 g/L	-
Triton-X	-	-	1 g/L	-	1 g/L
Temperatur	alle 37 °C				
Inkubationsdauer	alle 1,5 h				

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 8.1, zusammen mit einer unbehandelten Probe, dargestellt.



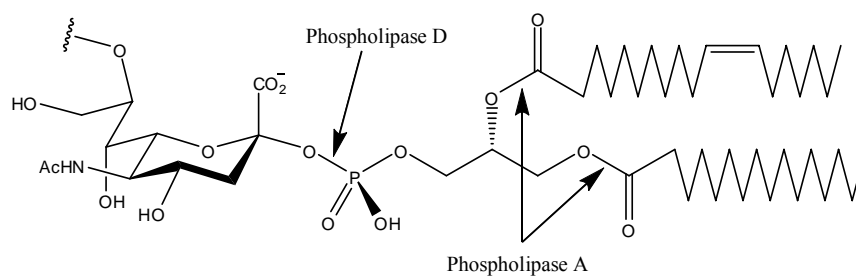
**Abbildung 8.1:** Freisetzung von Polysialinsäure durch Behandlung von *E.coli* K1 mit chemischen Zellaufschlussreagenzien.

In der Vergleichsprobe waren nach der Inkubation 55 % des Produkts freigesetzt. Die gleiche Menge konnte im Überstand der Proben mit EDTA und Lysozym festgestellt werden. Der Aufschluss war somit wirkungslos. Eine 5 %ige Steigerung der Ausbeute konnte mit EDTA/Lysozym und Triton-X erreicht werden. Der gemeinsame Einsatz

von allen drei Reagenzien führte schließlich zu einem Konzentrationsanstieg der polySia von 15 % im Überstand.

### 8.1.3 Kontrollierte chemische und enzymatische Freisetzung

Die bevorzugte Methode zur Freisetzung der polySia von der Zelloberfläche bestand in einer gezielten Lösung der chemischen Bindung zur Zellwand. Antigene der Gruppe 2 wie in *N.meningitidis* B oder *E.coli* K1 sind über eine  $\alpha$ -Glycerophosphat-Brücke mit zwei Lipidresten verbunden und so in der Zellwand verankert, dargestellt in Abbildung 8.2 [GOTSCHLICH E.C. et al., 1981; TZENG Y. et al., 2005; WHITFIELD C., 2006]. Das Konstrukt weist zum Einen mit der Phosphatgruppe und zum Anderen mit den Fettsäureestern zwei mögliche Angriffspunkte für eine Spaltung auf. Phosphatbindungen sind anfällig für eine saure Hydrolyse, während Esterbindungen durch alkalische Hydrolyse irreversibel gespalten werden können. Weiterhin existieren mit den Phospholipasen Enzyme, durch die die Spaltung katalysiert werden kann. Die Wirkungsweise zweier ausgewählter Phospholipasen A und D ist ebenfalls in Abbildung 8.2 dargestellt.



**Abbildung 8.2:** Aufbau des Lipidankers von Antigenen der Gruppe 2. Das Polysaccharid ist über eine  $\alpha$ -Glycerophosphatgruppe mit zwei Fettsäureresten (hier C16:0 und C18:2) verestert.

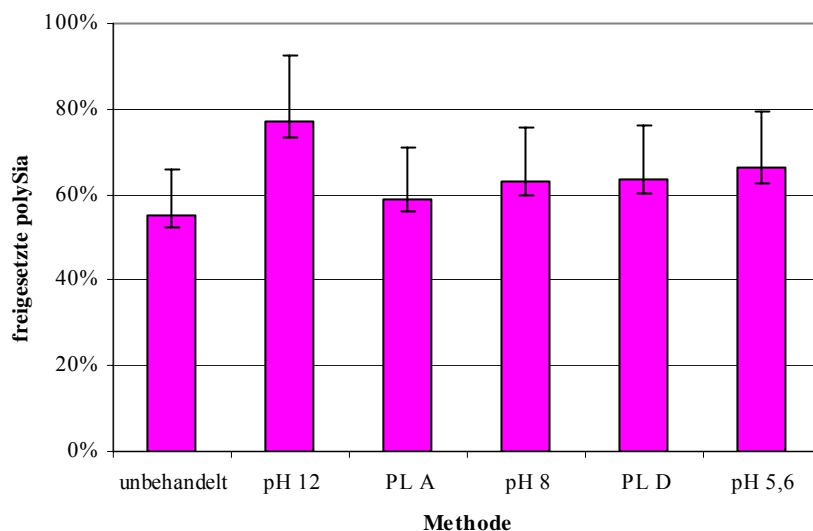
Zur gezielten Freisetzung der Polysialinsäure wurde eine saure und basische Hydrolyse, jeweils mit und ohne Zusatz von Phospholipase, durchgeführt. Die Versuche wurden in einem Maßstab von je zweimal 30 mL mit einer ausgewachsenen zellhaltigen *E.coli* K1-Kultur durchgeführt. Das Enzym wurde dabei im Überschuss

eingesetzt. Die Versuchsbedingungen wurden auf das jeweilige Enzym abgestimmt und sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

**Tabelle 8.3:** Versuchsbedingungen für die gezielte chemische und enzymatische Freisetzung von Polysialinsäure aus *Escherichia coli* K1.

	<b>alkalisch (pH 12)</b>	<b>alkalisch (pH 8)</b>	<b>Phospho- lipase A2</b>	<b>sauer (pH 5,6)</b>	<b>Phospho- lipase D</b>
Enzym	-	-	0,6 U	-	0,35 U
pH	12	8	8	5,6	5,6
Temperatur	37 °C	37 °C	37 °C	30 °C	30 °C
Inkubationsdauer	1,5 h	1,5 h	1,5 h	1,5 h	1,5 h

Die Untersuchung einer unbehandelten Probe ergab einen Anteil von 55 % der polySia-Gesamtmenge im Überstand. Zur Bestimmung der freigesetzten Menge an Polysialinsäure wurde die jeweilige Probe zentrifugiert und erneut die polySia-Konzentration im Überstand gemessen.



**Abbildung 8.3:** Gezielte Freisetzung von Polysialinsäure durch Behandlung von *E.coli* K1 mit Phospholipasen und unter sauren und basischen Bedingungen.



Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.3 zusammengefasst. Durch die alkalische Behandlung bei pH 12 konnte der größte Konzentrationsanstieg um 20 % herbeigeführt werden. Die Probe wies jedoch nach der Behandlung eine hohe Viskosität durch denaturierte Proteine auf, die auch nach Neutralisation und einer verlängerten Zentrifugationsdauer irreversibel war. Die alkalische Behandlung bei pH 8 führte zu einem Anstieg von ca. 5 % während die saure Behandlung bei pH 5,6 ca. 10 % mehr Produkt freisetzte. Der Einsatz der Phospholipasen brachte nicht den gewünschten Erfolg. Da kaum ein Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Enzym zu sehen war, kann die leichte Erhöhung der polySia-Konzentration im Überstand hierbei eher auf den eingestellten pH-Wert als auf die Enzyme zurückgeführt werden.

#### **8.1.4 Diskussion und übernommener Prozessschritt**

Abschließend betrachtet eignete sich keine der getesteten Methoden für eine Applikation im Downstreamprozess. Der mechanische Zellaufschluss führt zwar zu einer Zerstörung der Zelle, jedoch dringen dadurch hauptsächlich innere Zellbestandteile nach außen. Da die Polysialinsäure jedoch in der äußeren Zellwand verankert ist, bleibt sie wahrscheinlich auch mit den entstandenen Zellhüllenfragmenten verbunden und wird weiterhin durch die Zentrifugation abgetrennt.

Der chemische Zellaufschluss führte nur bei einer gemeinsamen Anwendung von EDTA, Lysozym und Triton-X zu einer signifikanten Erhöhung der polySia-Konzentration von 15 % im Überstand. Durch die Behandlung würden jedoch drei neue Verunreinigungen in hohen Konzentrationen eingetragen werden.

Die gezielte enzymatische Freisetzung brachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Offenbar ist die sterische Hinderung auf der Zelloberfläche zu groß, um eine effektive Wirkung der Phospholipasen zu ermöglichen. Die rein alkalische Behandlung bei pH 12 führte zwar zu einer deutlichen Erhöhung der gelösten polySia um 20 %, jedoch auch zu einer irreversiblen Viskositätssteigerung, welche eine Anwendung im Produktionsmaßstab unmöglich macht.

## **8.2 Zellernte und -separation**

Für die Aufarbeitung des gelösten Anteils der Polysialinsäure bestand der erste Schritt im Downstreamprozess aus der Separation von Zellen und Kulturflüssigkeit. Zur Abtrennung der Zellen wurden zwei unterschiedliche Verfahren getestet und miteinander verglichen, die kontinuierliche Zentrifugation und die Cross-flow Mikrofiltration.

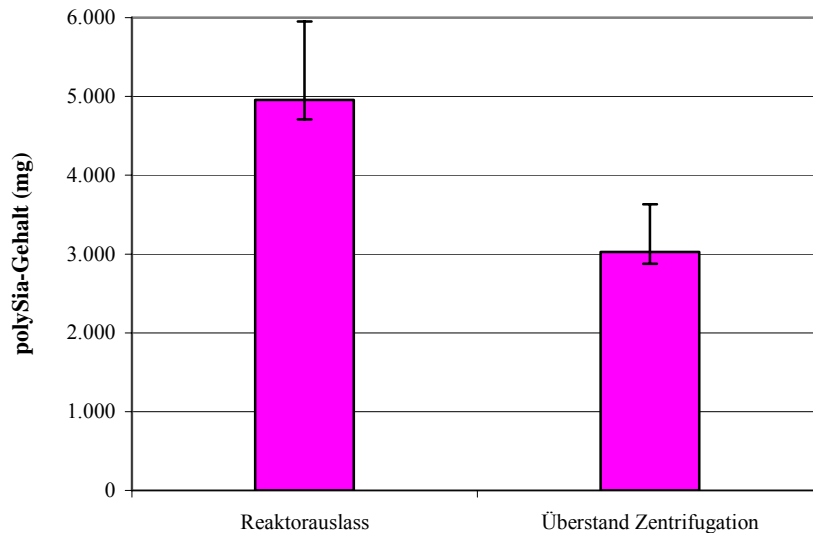
### **8.2.1 Kontinuierliche Zentrifugation**

Bedingt durch das hohe Volumen des Reaktorinhalts gestaltet sich eine batch-Zentrifugation als schwierig. Für größere Volumina (ca. 1 L) ausgelegte Laborzentrifugen arbeiten mit einer maximalen RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung) bis  $6.000 \times g$ , womit keine saubere und schnelle Abtrennung von Bakterien mit einer Größe von ca.  $1 \mu m$  erreicht werden kann. Eine Alternative stellt die kontinuierliche Zentrifugation dar. Kontinuierlich betriebene Laborzentrifugen können bis zu einer RZK von  $25.000 \times g$  beschleunigt und mit hohen Durchsätzen von über 30 L/h betrieben werden.

Die verwendete Zentrifuge war eine Sorvall® Contifuge Stratos® Continuous Flow Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit Titan-Durchflussrotor. Die Zellsuspension konnte ohne eine vorangehende Ernte direkt aus dem Reaktor in die Zentrifuge gepumpt werden. Die Separation wurde bei der maximalen Geschwindigkeit von  $17.000 \text{ min}^{-1}$  ( $25.000 \times g$ ) durchgeführt. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 80-100 mL/h entsprach die optische Dichte des Zentrifugationsüberstands mit 0,15 Einheiten der einer batch-Zentrifugation bei  $13.200 \text{ min}^{-1}$  für 5 min. Der Klärgrad betrug 99,99 %. Unter dem Lichtmikroskop konnten ebenfalls keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Die Zentrifugationstemperatur hatte einen zusätzlichen Einfluss auf die Ausbeute dieses Schritts. Es stellte sich heraus, dass bei einer Temperatur von  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  die polySia-Konzentration im Überstand um bis zu 10 % höher war als bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Unter den beschriebenen Bedingungen betrug der im Zentrifugationsüberstand verbliebenen polySia-Anteil 61 %. Aus einer *E.coli* K1-Kultur mit einem polySia-

Gehalt von 5 g könnten somit 3 g in den weiteren Aufarbeitungsprozess einfließen (siehe Abbildung 8.4).



**Abbildung 8.4:** PolySia-Gehalt einer 10-L-Bioreaktorkultivierung vor und nach der Zellseparation durch kontinuierliche Zentrifugation.

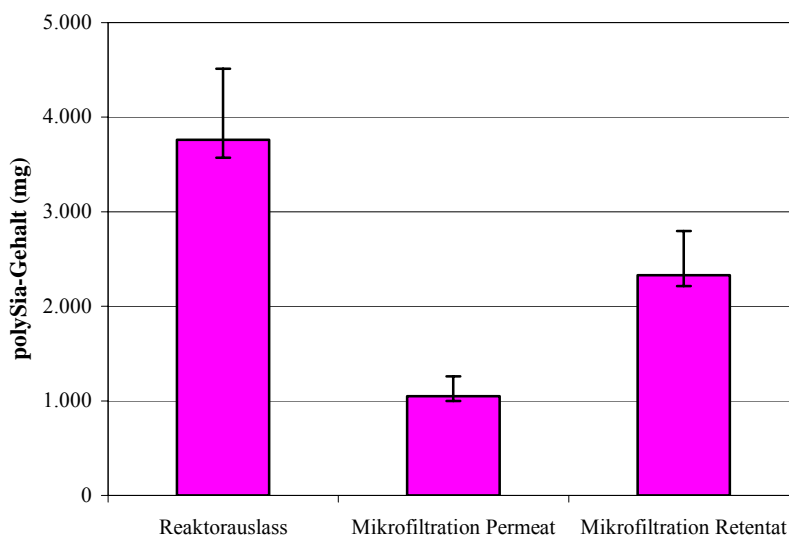
### 8.2.2 Cross-flow Filtration

Als mögliche Alternative zur kontinuierlichen Zentrifugation wurde die cross-flow Mikrofiltration untersucht. Cross-flow Filtrationen eignen sich zur Anwendung besonders bei partikelreichen Suspensionen wie zellhaltigen Kulturbrühen, da durch die tangentialen Anströmung des Filters, dieser nicht verblocken kann. Im Gegensatz zur Zentrifugation können in einem Lauf höhere Durchsätze erreicht werden, da kein zwischenzeitliches Entleeren des Rotors (oder Filters) nötig ist.

Für die Abtrennung der Zellen wurde ein Filter aus regenerierter Cellulose (Hydrosart, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  benutzt. Der eingestellte Druckabfall über den Filter betrug 3 bar. Die im Kulturmedium gelöste Polysialinsäure sollte nach der Prozedur im Permeat wieder zu finden sein, während die Zellen im Retentat verbleiben sollten.

Aufgrund der stetig ansteigenden Viskosität des Retentats durch die Aufkonzentrierung der Bakterien, musste die Filtration bei einem Retentatsvolumen von 1 L

abgebrochen werden. Die abschließend in Retentat und Permeat gemessenen polySia-Mengen sind in Abbildung 8.5 dargestellt.



**Abbildung 8.5:** PolySia-Gehalt einer 10-L-Bioreaktorkultivierung nach und vor der Zellseparation durch Cross-flow Mikrofiltration.

Die anfängliche polySia-Gesamtmenge vor der Filtration lag bei 3,7 g. Bei Abbruch der Prozedur enthielt das Permeat lediglich 1,1 g polySia. Im Retentat wurden 2,4 g Produkt nachgewiesen. Der Verlust an Polysialinsäure bei dieser Methode betrug 70 %.

### 8.2.3 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Der Vergleich der kontinuierlichen Zentrifugation und Cross-flow Mikrofiltration zur Zellseparation ergab klare Vorteile auf der Seite der Zentrifugation. Der polySia-Anteil im Zentrifugationsüberstand betrug 60 % und entspricht damit genau dem in Kapitel 7 gemessenen Gelöstanteil des gebildeten Kapselpolysaccharids.

Das Permeat der Mikrofiltration enthielt hingegen nur einen polySia-Anteil von 30 %. Trotz einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$ , die für eine vollständige Durchlässigkeit der polySia reichen sollte, konnten die anderen 70 % im zellhaltigen Retentat nach-

gewiesen werden. Der Medienverlust der Filtration war mit 1 L zudem doppelt so hoch wie der Rückstand im Zentrifugationsrotor.

Der übernommene Prozessschritt für die Zellseparation ist somit die kontinuierliche Zentrifugation. Wiederholte Anwendungen zeigten eine Schwankung in der Ausbeute zwischen 50 und 70 %. Die Bedingungen zur Durchführung sowie die Ergebnisse sind abschließend noch einmal in Tabelle 8.4 zusammengefasst.

**Tabelle 8.4:** Unit-operation zur Zellseparation durch kontinuierliche Zentrifugation im Downstreamprozess der Aufarbeitung von Polysialinsäure aus *Escherichia coli* K1.

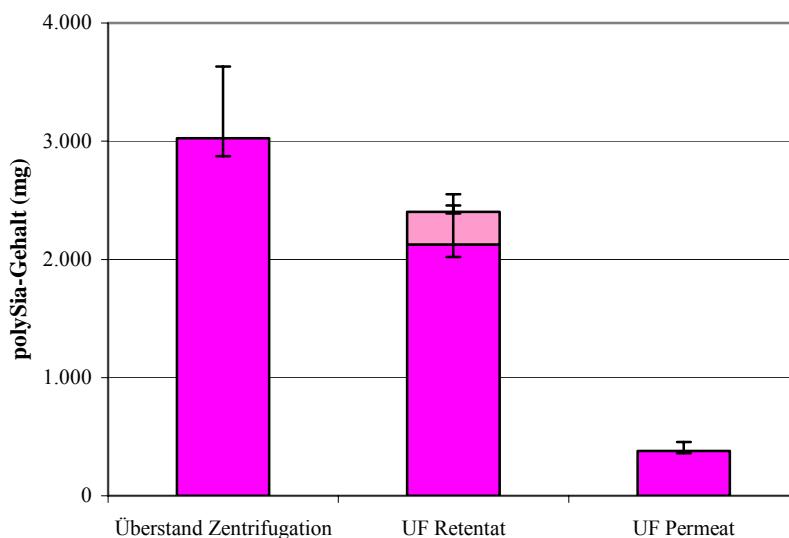
<b>Versuchsbedingungen</b>		<b>Ergebnisse</b>	
Zentrifugationsgeschw.	17.000 min <sup>-1</sup>	Ausbeute	50-70 %
Pumpgeschwindigkeit	80 mL/min	Zeitaufwand	2 h
Temperatur	15 °C	Materialkosten	-

### 8.3 Konzentration des Überstands

Für eine bessere Handhabung während des weiteren Aufarbeitungsprozesses sollte das Volumen des polySia-haltigen Zellüberstands aufkonzentriert werden. Eine übliche unit-operation für diesen Schritt ist die cross-flow Ultrafiltration.

#### 8.3.1 Cross-flow Ultrafiltration

Der gewählte MWCO des verwendeten Filters aus regenerierter Cellulose (Hydrosart, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) betrug 10 kDa. Während der Prozedur wurde ein Druckabfall von 3 bar über den Filter eingestellt. Anlagenbedingt konnte die Aufkonzentrierung bis zu einem Retentatsvolumen von 325 mL ( $\pm 25$  mL) durchgeführt werden. Die Anlage wurde im Anschluss mit 250 mL Wasser gespült, um die Reste des Retentats aus dem Schlauchsystem auszuwaschen. Einen Überblick über die Ausbeute dieses Schritts gibt die Abbildung 8.6.



**Abbildung 8.6:** PolySia-Gehalt im Downstreamprozess vor und nach der Aufkonzentrierung per Cross-flow Ultrafiltration.

Die unfiltrierte Lösung (der Überstand der kontinuierlichen Zentrifugation) enthielt eine Gesamtmenge von 3 g polySia. Nach der Filtration konnten im Retentat 2,1 g Produkt nachgewiesen werden. Durch das Spülen der Anlage konnte dieser Wert noch einmal auf 2,4 g erhöht werden. Im Permeat wurde eine polySia-Menge von 0,4 g gemessen.

### 8.3.2 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Die Filterausschlussgröße von 10 kDa entsprach einer polySia-Kettenlänge von etwa 35 Einheiten. Die Filtration zog so eine Abreicherung von oligoSia-Molekülen mit sich, deren Anteil ca. 20 % betrug. Da der Aufarbeitungsprozess ohnehin auf langkettige Produktpolymere abzielen sollte, ist dieser Schritt kaum verbesserungsfähig.

Die cross-flow Ultrafiltration wurde somit als Schritt zur Aufkonzentrierung des polySia-haltigen Zellüberstands in den Downstreamprozess aufgenommen. Die wiederholte Anwendung bei der polySia-Aufarbeitung zeigte Schwankungen der Ausbeute im Bereich von 74-80 %. Die Bedingungen zur Durchführung sowie die Ergebnisse sind abschließend noch einmal in Tabelle 8.5 zusammengefasst.

**Tabelle 8.5:** Unit-operation zur Aufkonzentrierung des Zellüberstands durch Cross-flow Ultrafiltration im Downstreamprozess der Aufarbeitung von Polysialinsäure aus *Escherichia coli* K1.

<b>Versuchsbedingungen</b>		<b>Ergebnisse</b>	
MWCO des Filters	10 kDa	Ausbeute	74-80 %
Anströmdruck	3 bar	Zeitaufwand	2 h
		Materialkosten	-

## 8.4 Fällungsreaktionen

Mit dem Produkt in konzentrierter gelöster Form wurde der Aufreinigungsprozess begonnen. Die übliche Vorgehensweise bei Polysacchariden besteht dabei in wiederholten Fällungen aus der wässrigen Phase, wie sie bereits in Kapitel 3 beschrieben wurden. Die Entwicklung einer solchen Sequenz aus Präzipitationen ist Thema dieses Kapitels.

Als Alternative zu der beschriebenen Methode wurde eine direkte Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie in Betracht gezogen. Die nötige vorausgehende Filtration führte jedoch zu einem großen Produktverlust. Zudem überschneidet sich der Produktpeak im Chromatogramm der Gelfiltration mit Verunreinigungen. Weitere Ergebnisse hierzu können dem Kapitel 8.5.2 entnommen werden. Eine vorangestellte Grobreinigung durch gezielte Fällungen wurde somit unumgänglich.

### 8.4.1 Fällungsverhalten von Colominsäure

Als Vorbereitung für die Entwicklung der eigentlichen Fällungsstrategie wurde das Präzipitationsverhalten von Colominsäure aus wässriger Lösung im Maßstab von 200  $\mu\text{L}$  untersucht. Als Fällungreagenzien wurden dabei Ethanol, Cetyltrimethylammoniumbromid (Cetavlon), Aceton, Ammoniumsulfat und Polyethylenglycol (PEG) eingesetzt. Nach Zugabe des Fällungsmittels wurden die Proben für 5 min bei 7 °C geschüttelt und anschließend 3 min bei 17.000  $\times g$  zentrifugiert. Trat ein Niederschlag auf, so wurde dieser nach der Separation in 200  $\mu\text{L}$  wässrigem

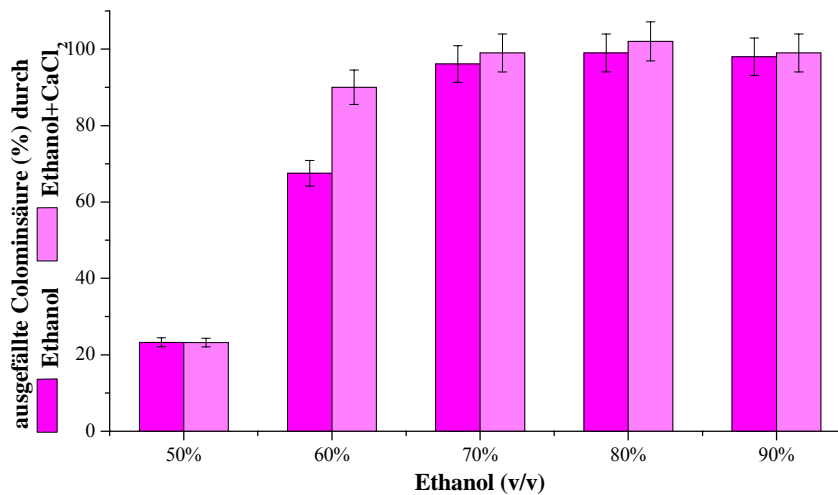
Lösemittel wieder aufgenommen. Die Konzentrationen der resolvatisierten polySia in allen Lösungen wurden anschließend mittels des TBA-Assays bestimmt. Die weiteren Versuchsbedingungen für die einzelnen Experimente sind in Tabelle 8.6 zusammengefasst.

**Tabelle 8.6:** Versuchsbedingungen für die Fällung von Colominsäure aus wässriger Umgebung mit verschiedenen Präzipitationsmitteln.

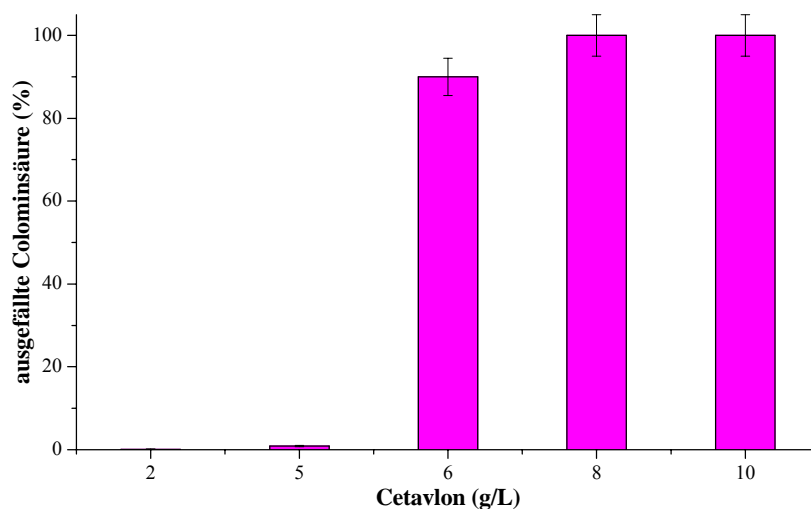
	Ethanol	Cetavlon	Aceton	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	PEG
Konz. CA			alle 10 g/L		
Lösemittel			0,1 M KPP (pH 7)		
Fällungsreagenz	50-90 % (v/v)	2-10 g/L	45-75 % (v/v)	300-700 g/L	100-500 g/L

Die Ergebnisse für die Fällung mit Ethanol sind in Abbildung 8.7 dargestellt. Unter den eingestellten Bedingungen wurden bei einer Konzentration von 50 % (v/v) Ethanol etwa 20 % der gelösten Colominsäure ausgefällt, und bei 60 % (v/v) Ethanol stieg der Anteil auf fast 70 % an. Ab 70 % (v/v) Ethanol kann die Fällung der Colominsäure dann mit über 95 % als praktisch vollständig angesehen werden. In einem weiteren Experiment wurde den Proben zusätzlich zu dem Fällungsmittel Ethanol noch 20 µL einer Calciumchloridlösung (10 g/L) zugesetzt (Endkonzentration 0,91 g/L). Es wurde berichtet, dass Calciumionen eine hohe Affinität zu Polysialinsäuren besitzen und somit durch Komplexierung stark die Löslichkeit des Polysaccharids beeinflussen können [LONG C. et al., 1971; BEHR J.P. et al., 1972; SHIMODA Y. et al., 1994]. Dieser Effekt zeigt sich deutlich bei einer eingestellten Ethanolkonzentration von 60 % (v/v), bei der im Gegensatz zu der calciumfreien Probe bereits über 90 % der Colominsäure ausgefällt wurden. Das resultierende Pellet zeigte außerdem eine stark verminderte Löslichkeit in Wasser, die durch Zugabe von NaCl jedoch reversibel ist. Durch die Anwesenheit von Natriumionen wird die Ionenstärke in der Lösung erhöht und die Bindungskonstante der Calcium-Komplexe herabgesetzt, was zu einer Dissoziation der Verbindung führt [SHIMODA Y. et al., 1994].





**Abbildung 8.7:** Ergebnisse der Präzipitationsversuche von Colominensäure aus wässriger Umgebung mit Ethanol (+CaCl<sub>2</sub>) in verschiedenen Konzentrationen.



**Abbildung 8.8:** Ergebnisse der Präzipitationsversuche von Colominensäure aus wässriger Umgebung mit Cetavlon in verschiedenen Konzentrationen.

Die Wirkung von Cetavlon als Fällungsreagenz ist auf die Bildung einer schwer löslichen Verbindung aus dem anionischen Polysaccharid und den amphiphilen Kationen des Fällungsmittels zurückzuführen. Die in Abbildung 8.8 angegebenen Konzentrationen wurden durch Zugabe einer Cetavlon-Stammlösung (100 g/L)

eingestellt. Ab einer Konzentration von 5 g/L konnten die ersten Spuren von präzipitierter Polysialinsäure festgestellt werden. Mit 6 g/L Cetavlon lag der Fällungsanteil bereits bei 90 % und ab 8 g/L war die Fällung vollständig. Das Präzipitat wies eine gute Löslichkeit in Wasser auf.

Bei der Verwendung von Aceton, Ammoniumsulfat und PEG als Fällungsmittel konnte bei keiner der eingestellten Konzentrationen ein Niederschlag beobachtet werden. Die Colominsäure war unter allen Bedingungen vollständig löslich. Alle drei Reagenzien werden jedoch zur erfolgreichen Denaturierung oder Fällung von Proteinen eingesetzt und eignen sich demnach eventuell für einen kontaminantenorientierten Aufarbeitungsschritt [RISSING J.P. et al., 1978; MAHADEVAN H. et al., 1992]. Untersuchungen hierzu sind im folgenden Kapitel 8.4.2 nachzulesen.

**8.4.2 Fällungsverhalten von K1-Polysialinsäure**

Die in Kapitel 8.4.1 gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die Isolierung der in *E.coli* hergestellten K1-polySia übertragen. Als Ausgangslösung diente das nach Kapitel 8.3 hergestellte polySia-Konzentrat mit einer Konzentration von ca. 4 g/L. Das Probenvolumen in allen Versuchen betrug 10 mL. In den Proben wurden durch langsame Zugabe des Fällungsmittels die in Tabelle 8.7 angegebenen Konzentrationen eingestellt. Die Fällungszeit betrug ca. 12 h bei 4 °C.

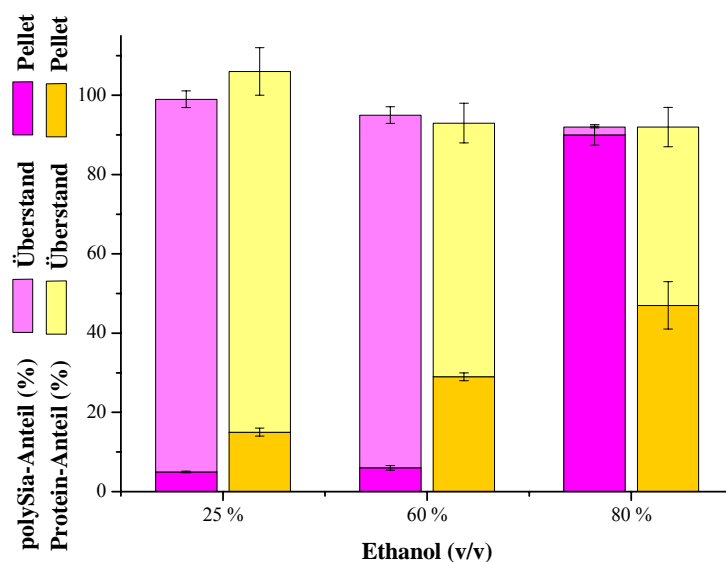
**Tabelle 8.7:** Versuchsbedingungen für die Fällung von K1-polySia aus G/A(KPP)-Medium mit verschiedenen Präzipitationsmitteln.

	<b>Ethanol</b>	<b>Cetavlon</b>	<b>Aceton</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>PEG</b>
Konz. K1-PSA	alle 4 g/L				
Lösemittel	G/A(KPP)-Medium				
Fällungsreagenz	25-80 % (v/v)	2-10 g/L	45-75 % (v/v)	300-700 g/L	100-500 g/L

Alle Proben wurden anschließend bei 3.345 ×g und 7 °C 20 min zentrifugiert und der pelletierte Niederschlag in wässriger Lösung wieder aufgenommen. Alle Lösungen, sowohl die Zentrifugationsüberstände als auch die Resolvationen, wurden mittels

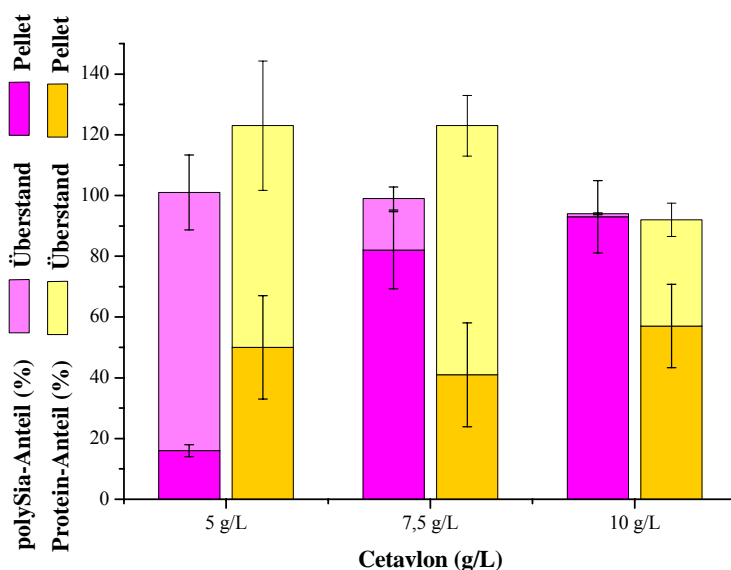
TBA-Assay auf den polySia-Gehalt und mittels Bradford-Assay auf den Proteingehalt hin untersucht.

Die Ergebnisse für die Fällungen mit Ethanol sind in Abbildung 8.9 dargestellt. Durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Calciumchloridlösung (10 g/L) wurde die Konzentration im Medium auf 0,21 g/L erhöht. Abweichungen im Präzipitationsverhalten im Vergleich zur Colominsäure können durch die veränderte chemische Umgebung, die geringere Konzentration an Polysialinsäure und eine eventuelle Abweichung in der Kettenlängenverteilung des Produkts erklärt werden. Bei einer Ethanolkonzentration von 25 % (v/v) wurden etwa 5 % der Polysialinsäure und 15 % der Proteine ausgefällt. Der Anteil stieg bei 60 % (v/v) Ethanol auf knapp 10 % polySia und 30 % Proteine. Durch die Einstellung einer Ethanolkonzentration von 80 % (v/v) konnten schließlich über 90 % der Polysialinsäure präzipitiert werden. Die Proteinkonzentration nahm dabei um etwa die Hälfte ab. Die Fällung mit 80 % Ethanol eignet sich somit zu einem produktorientierten Aufarbeitungsschritt. Das pelletierte Präzipitat hat eine grau-weiße Färbung.



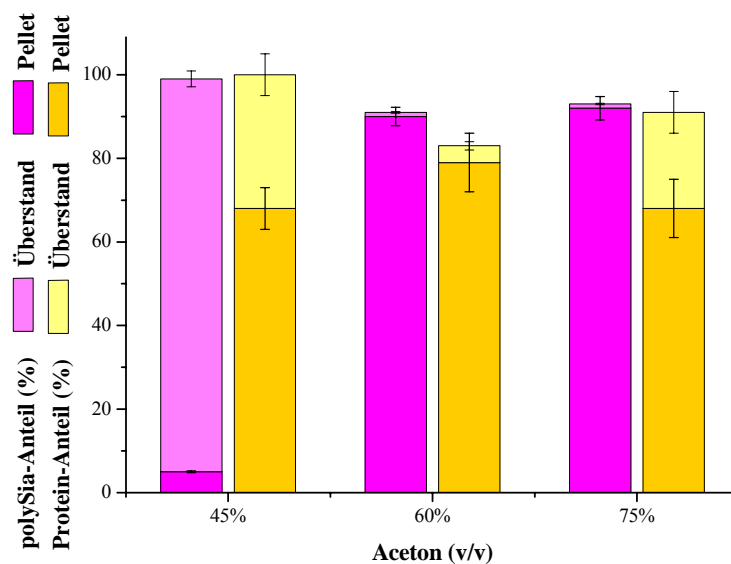
**Abbildung 8.9:** Ergebnisse der Präzipitationsversuche von K 1-polySia aus G/A(KPP)-Medium mit Ethanol in verschiedenen Konzentrationen. Der dunkle untere Teil der Balken gibt den Anteil des Produkts bzw. der Proteine im Präzipitat, der helle obere Teil im Überstand an. Die Summe der beiden sollte im Idealfall jeweils 100 % betragen. Etwaige Abweichungen sind durch Fehler im Rahmen der Messgenauigkeit begründet.

Abbildung 8.10 zeigt die polySia- und Proteinverteilung bei der Fällung mit Cetavlon. Die angegebenen Konzentrationen wurden durch Zugabe einer Cetavlon-Stamm-lösung (100 g/L) eingestellt. Die Ergebnisse sind ähnlich denen der vorangegangenen Colominsäure-Fällungen. 5 g/L des Fällungsmittels führten zu einer polySia-Präzipitation von knapp 20 %. Dieser Wert wurde bei 7,5 g/L auf 80 % erhöht und mit 10 g/L Cetavlon war die Fällung schließlich vollständig. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durch die Anwesenheit des Ammoniumsalzes sehr stark gestört. In der Summe wurden zum Teil große Abweichungen von der Gesamtkonzentration bis zu 120 % erreicht. Tendenziell zeigte sich eine Verteilung der Proteine auf Pellet und Überstand zu je 50 %. Die Fällung mit 10 g/L Cetavlon kann somit ebenfalls als ein produktorientierter Aufarbeitungsschritt angewandt werden. Das pelletierte Präzipitat ist voluminös und weiß bis leicht gelblich. Durch seine tensidischen Eigenschaften bewirkt Cetavlon zudem die Zerstörung von Zellmembranen und somit die Lysierung von Bakterienresten [JANN K. et al., 1980].



**Abbildung 8.10:** Ergebnisse der Präzipitationsversuche von K 1-polySia aus G/A(KPP)-Medium mit Cetavlon in verschiedenen Konzentrationen. Der dunkle untere Teil der Balken gibt den Anteil des Produkts bzw. der Proteine im Präzipitat, der helle obere Teil im Überstand an. Die Summe der beiden sollte im Idealfall jeweils 100 % betragen. Etwaige Abweichungen sind durch Fehler im Rahmen der Messgenauigkeit begründet.

Große Abweichungen im Präzipitationsverhalten im Vergleich zur Colominsäure zeigte die K1-polySia bei der Verwendung von Aceton als Fällungsreagenz, dargestellt in Abbildung 8.11. War die Colominsäure noch bis zu einem Anteil von 75 % Aceton löslich, so präzipitierten ca. 5 % der K1-polySia bereits in 45 % Aceton. Ab 60 % Aceton war die Fällung des Polysaccharids vollständig. Der abgeschiedene Anteil der Proteine lag in allen Fällen über 60 %. Das voluminöse Protein-Pellet hatte eine gelb bis braune Färbung. PolySia und Proteine im Überstand wurden nach partieller Entfernung (ca. 90 %) des Acetons durch Vakuum-Destillation bei 100 mbar und 36 °C gemessen. Eine exakte Bestimmung der Konzentrationen war auch hier schwierig, da die Reste des Fällungsmittels die Tests störten. Trotz des kleinen Anteils an präzipitierter polySia kann die Fällung mit 45 % Aceton als ein kontaminantenorientierter Aufarbeitungsschritt angewandt werden. Durch einen nicht abdestillierbaren zurückbleibenden Anteil an Aceton muss mit diesem Schritt jedoch statt einer Volumenreduktion sogar eine kleine Volumenzunahme in Kauf genommen werden.

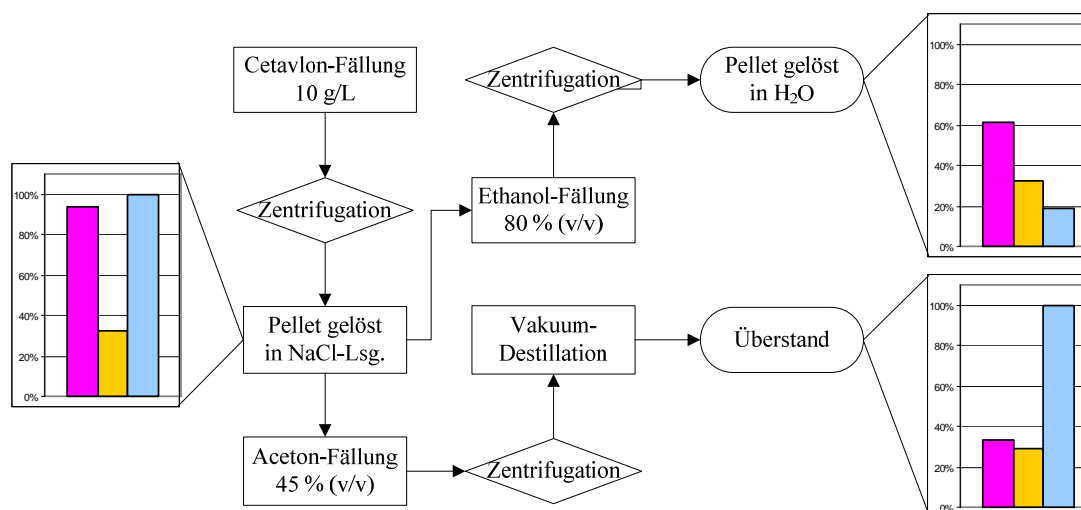


**Abbildung 8.11:** Ergebnisse der Präzipitationsversuche von K 1-polySia aus G/A(KPP)-Medium mit Aceton in verschiedenen Konzentrationen. Der dunkle untere Teil der Balken gibt den Anteil des Produkts bzw. der Proteine im Präzipitat, der helle obere Teil im Überstand an. Die Summe der beiden sollte im Idealfall jeweils 100 % betragen. Etwaige Abweichungen sind durch Fehler im Rahmen der Messgenauigkeit begründet.

Bei der Verwendung von Ammoniumsulfat und PEG als Fällungsmittel zeigten sich dieselben Ergebnisse wie schon bei der Colominsäure. Um das Volumen klein zu halten, wurden die Reagenzien direkt als Feststoff zu den vorbereiteten Proben gegeben und durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht. Jedoch selbst eine Kühlung im Eisbad führte zu keiner Niederschlagsbildung.

### 8.4.3 Entwicklung einer Fällungsstrategie

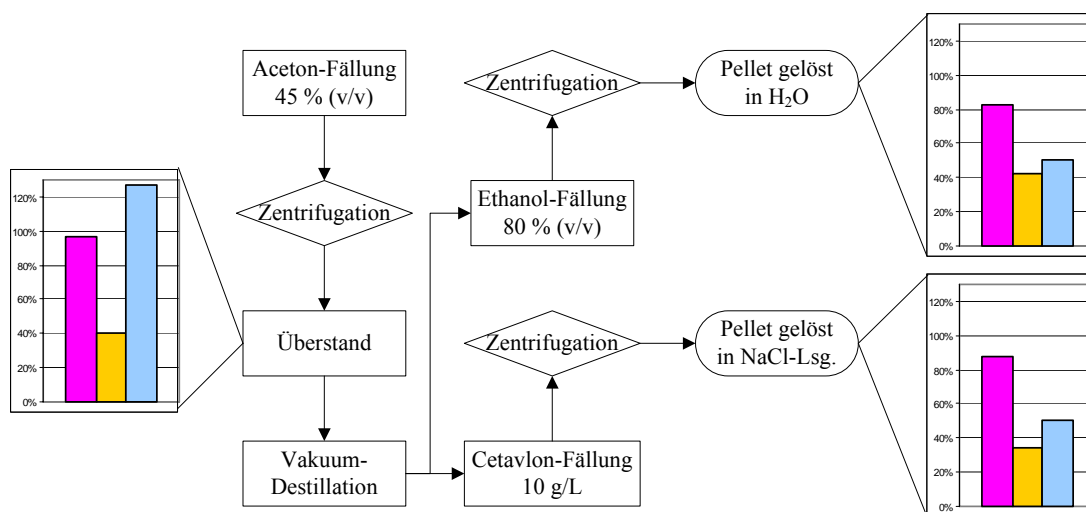
Durch verschiedene Kombinationen der viel versprechendsten Präzipitationsschritte sollte eine Fällungsstrategie entwickelt werden, aus der ein möglichst reines Produkt bei niedrigem Chemikalien- und Zeitaufwand und einer deutlichen Volumenreduktion resultiert. Da das Präzipitationsverhalten, aufgrund der zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen in den vorangegangenen Kapiteln 8.4.1 und 8.4.2, stark von der Zusammensetzung des Lösemittels abhängt, wurde vermutet, dass die Reihenfolge der Fällungsschritte eine entscheidende Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser These wurden Fällungssequenzen aus zunächst zwei Schritten durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden wiederum Proben des nach Kapitel 8.3 hergestellten polySia-Konzentrats im Maßstab von 10 mL eingesetzt.



**Abbildung 8.12:** Aufarbeitungsschema für die Fällungssequenzen „Cetavlon → Ethanol/Aceton“. Die Balken geben die prozentuale Änderung der polySia-Konzentration (pink), der Proteinkonzentration (gelb) und des Volumens der Lösung (blau) bezogen auf das eingesetzte polySia-Konzentrat an.

Die ersten beiden Sequenzen bestanden aus einer Kombination „Cetavlon → Ethanol“ bzw. „Cetavlon → Aceton“. Das Schema der Fällungen und die dazugehörige Ausbeute an Produkt und Protein-Kontamination sind in Abbildung 8.12 dargestellt. Beide Wege führten zu einer eher geringen Ausbeute an Polysialinsäure von nur 60 bzw. 30 % bei keiner weiteren Proteinabreicherung. Beide Wege wurden für einen möglichen Ausarbeitungsprozess verworfen.

Zwei weitere Sequenzen bestanden aus den Kombinationen „Aceton → Ethanol“ und „Aceton → Cetavlon“. Auf dem ersten Weg betrug die Ausbeute an Polysialinsäure knapp 85 %. Eine weitere Abreicherung der Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem weist die Sequenz praktikable Schwierigkeiten auf. Durch die Volumenzunahme nach der Aceton-Fällung muss im Falle der praktischen Anwendung bei einer nachfolgenden Ethanol-Fällung mit einem steigenden Verbrauch des Fällungsmittels (ca. 3 L) und somit hohen Kosten gerechnet werden. Dieser Weg wird daher ebenfalls als nicht anwendbar angesehen.



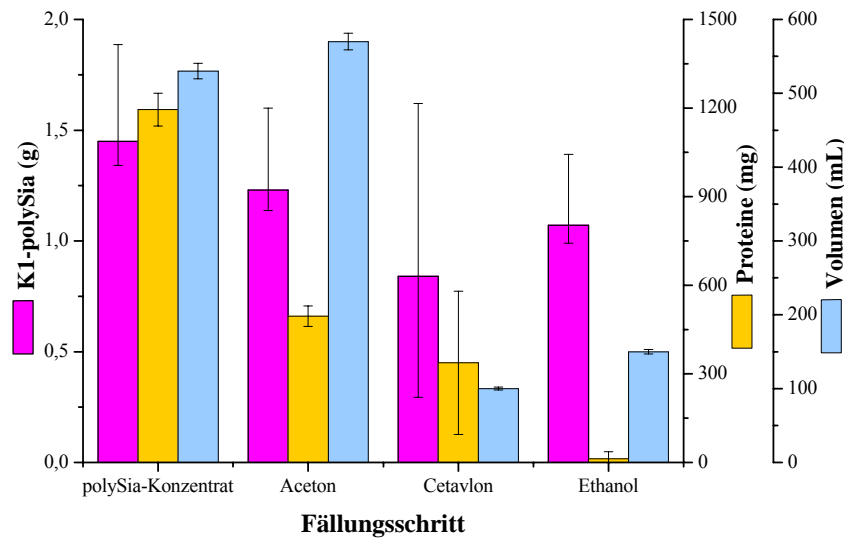
**Abbildung 8.13:** Aufarbeitungsschema für die Fällungssequenzen „Aceton → Ethanol/Cetavlon“. Die Balken geben die prozentuale Änderung der polySia-Konzentration (pink), der Proteinkonzentration (gelb) und des Volumens der Lösung (blau) bezogen auf das eingesetzte polySia-Konzentrat an.

Eine weitere geringe Proteinabreicherung von 5 % konnte nur auf dem zweiten Weg („Aceton → Cetavlon“) erreicht werden. Der Wert ist jedoch aufgrund der Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung in Gegenwart von Cetavlon mit einem großen

Fehler versehen. Der pelletierte Niederschlag der Cetavlon-Fällung agglomerierte nach der Zentrifugation zu einer hochviskosen durchscheinenden braunen Masse welche sich gut in 3 mL einer 1 M NaCl-Lösung aufnehmen ließ und fast 90 % der Polysialinsäure enthielt. Diese Sequenz erfüllte als einzige die gestellten Anforderungen. Es wurde eine deutliche Proteinanreicherung von über 65 % erreicht. Die Produktausbeute betrug ca. 90 % bei einer klaren Reduktion des Volumens um 70 %. Die Kosten der Fällungsmittel blieben gering.

Die viel versprechende Fällungssequenz „Aceton → Cetavlon“ wurde zur Validierung auf den Produktionsmaßstab übertragen. Ausgangsmaterial waren hierbei 530 mL nach Kapitel 8.3 dargestelltes polySia-Konzentrat mit einem Produktgehalt von 1,4 g und 1,2 g verunreinigenden Proteinen. Nach Zugabe des Fällungsmittels wurde die entstandene Suspension jeweils für 4-12 h bei 4 °C gerührt. Die Ergebnisse der Vorversuche konnten mit leichten Abweichungen erfolgreich reproduziert werden. Die Aceton-Fällung führte bei einer polySia-Ausbeute von 1,23 g (85 %) zu einer Proteinanreicherung von ca. 700 mg (60 %). Wie in den Vorversuchen konnte das Aceton bis auf einen Restgehalt von <10 % durch Vakuum-Destillation bei 100 mbar und 36 °C entfernt werden. Die Messergebnisse der anschließenden Cetavlon-Fällung sind stark fehlerbehaftet. Tendenziell zeigt sich jedoch auch hier eine weitere Anreicherung von Proteinen bei leichtem Produktverlust. Das hochviskose Pellet konnte in 100 mL 1 M NaCl-Lsg. vollständig gelöst werden und ergab eine bräunliche Flüssigkeit, welche nach zwei verschiedenen Methoden weiterverarbeitet werden konnte. Zum Einen war nun durch eine verlustfreie Filtration der Lösung und mit dem stark verminderten Volumen eine säulenchromatographische Aufreinigung möglich, wie sie in Kapitel 8.5 beschrieben wird. Zum Anderen konnte das Produkt auch bereits mit hoher Reinheit durch eine weitere Fällung mit Ethanol als hellweißer Niederschlag aus der bräunlichen Lösung abgeschieden werden. Ein anschließender Waschschrift mit 96 % Ethanol und die Resolvatisierung in 150 mL Wasser führten zu einer Produktausbeute von 1,07 g bei einer Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze (<10 mg). Der gesamte Fällungsprozess inklusive der Ethanolfällung ist in Abbildung 8.14 dargestellt.





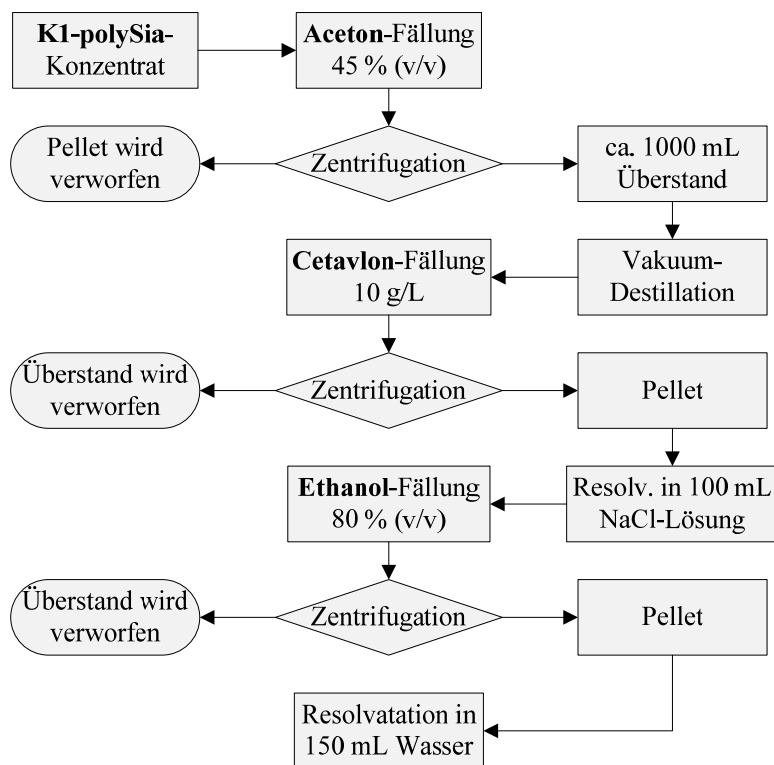
**Abbildung 8.14:** Ergebnisse der entwickelten Fällungssequenz zur Aufreinigung von K1-polySia aus G/A(KPP)-Medium.

#### 8.4.4 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Auf der Basis von Vorversuchen mit Colominsäure wurde das Präzipitationsverhalten von K1-polySia aus G/A(KPP)-Medium mit verschiedenen Fällungsreagenzien (Ethanol, Cetavlon, Aceton,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und PEG) untersucht. Als Qualitätsmerkmal der jeweiligen Fällungen galten eine hohe Produktausbeute sowie eine starke Proteinanreicherung. Gute Ergebnisse konnten durch die Anwendung von 45 % (v/v) Aceton, 10 g/L Cetavlon und 80 % (v/v) Ethanol erreicht werden. Im ersten Fall konnten ca. 65 % der Proteine bei nur 5 % Produktverlust abgeschieden werden. Die anderen beiden Methoden führten zu einer ca. 95 % Fällung der K1-polySia bei einer Proteinanreicherung von etwa 50 %. Die beiden Fällungsmittel  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und PEG führten im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner Trennung von Produkt und Kontaminant.

Durch eine sinnvolle Verknüpfung der geeigneten Präzipitationsmethoden wurde eine Fällungssequenz erarbeitet, die zu einem minimalen Produktverlust bei hoher Proteinanreicherung und Volumenreduzierung führen sollte. Die Kombination „Aceton → Cetavlon → Ethanol“, unter den oben beschriebenen Bedingungen, erfüllte schließlich

die Anforderungen am besten. Die Anwendung auf das nach Kapitel 8.3 dargestellte polySia-Konzentrat (1,4 g polySia, 1,2 g Protein, 530 mL) führte zu einer Ausbeute von 1,07 g Produkt (65 %) bei einem Proteinrestgehalt von <10 mg und einer Volumenreduktion auf 150 mL. Die Materialkosten der eingesetzten Fällungsreagenzien belaufen sich auf ca. 10 € für die Aufarbeitung einer 10-L-Kultur.



**Abbildung 8.15:** Fällungssequenz zur Aufreinigung von K1-polySia aus dem Produktkonzentrat des Überstands einer 10-L-Kultivierung von *E.coli* K1.

Durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen an Cetavlon wurden die Tests zur Bestimmung der polySia- und Proteinkonzentration stark gestört. Es wurde hier deshalb in stark verdünnten Lösungen gearbeitet, was allerdings zu einem hohen Fehler im Messwert und damit auch in der Ausbeuteberechnung führte. Die Wirksamkeit dieses Schritts für sich betrachtet konnte somit nicht eindeutig bewiesen werden. In der Fällungssequenz als Ganzes betrachtet ist der Schritt jedoch notwendig, da er die nötigen Ausgangsbedingungen für das Gelingen der weiteren Aufarbeitungsmaßnahmen schafft.

Bei wiederholter Anwendung der Fällungssequenz wurden auch hier Schwankungen in der Produktausbeute festgestellt, die von 55-70 % reichten. Details zur Fällungssequenz enthält das Fließschema in Abbildung 8.15, ein Überblick über die zusammengefassten Ergebnisse aller drei Fällungsschritte ist in Tabelle 8.8 zu finden.

**Tabelle 8.8:** Ergebnisse der Fällungssequenz von K1-polySia im Downstreamprozess der Aufarbeitung von Polysialinsäure aus *Escherichia coli* K1.

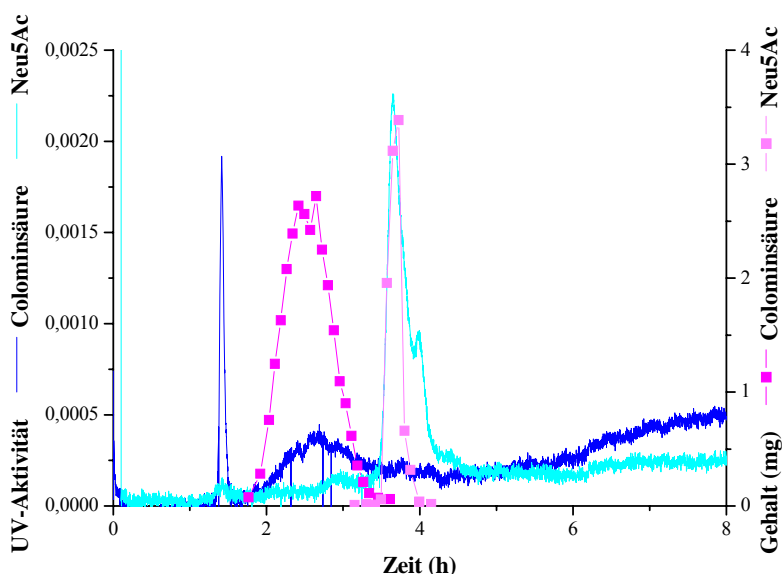
<b>Fällungssequenz</b>		<b>Ergebnisse</b>	
Aceton	45 % (v/v)	Ausbeute	55-70 %
Cetavlon	10 g/L	Zeitaufwand	48 h
Ethanol	80 % (v/v)	Materialkosten	15 €

### **8.5 Größenausschlusschromatographie**

Für die Darstellung eines hochreinen Produkts als Alternative oder Erweiterung zur Produktabscheidung durch die Ethanol-fällung (siehe Kapitel 8.4.3) wurde ein chromatographischer Schritt in den Downstreamprozess integriert. Die weitere Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie sollte in erster Linie der Abtrennung von Rückständen der Fällungsreagenzien dienen. Da im Vorfeld bereits eine starke Abreicherung von vor allem hochmolekularen Proteinen erreicht wurde, sollte im Trennungprofil keine Überschneidung mit dem Produkt auftreten. Verwendet für die folgenden Experimente wurde eine Sephacryl S-300 Säule (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) [WEISGERBER C. et al., 1990] an einer BioRad FPLC-Anlage (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Als Laufmittel wurde 0,5 M Natriumphosphatlösung (NaPP) verwendet. Während der Läufe wurden am Säulenausgang kontinuierlich die Leitfähigkeit und die UV-Aktivität bei 280 nm gemessen. Außerdem wurden Fraktionen zu je 6 mL gesammelt. Nähere Informationen zum Protokoll, der FPLC-Anlage und der Säule sind in Kapitel 11.5.1 zu finden.

## 8.5.1 Laufverhalten von Sialinsäure und Colominsäure

Um das Laufverhalten der K1-polySia abschätzen zu können, wurden zunächst die Retentionszeiten der kommerziell erhältlichen Colominsäure und der 5-N-Acetylneuraminsäure bestimmt. Da Sialinsäuren keine nennenswerte UV-Aktivität besitzen, wurde der Gehalt in den gesammelten Fraktionen mittels des TBA-Assays gemessen. Aufgegeben wurden je 3 mL einer Lösung mit 10 mg Sialinsäure (3,33 g/L) bzw. 30 mg Colominsäure (10 g/L). Abbildung 8.16 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen. Die Sialinsäure wurde unter den eingestellten Bedingungen nach einer Retentionszeit von 3,7 h aus der Säule gespült und wies eine Peakbreite von 30 min auf. Die UV-Aktivität zeigte relativ zum Laufmittel nur einen sehr geringen Anstieg. Die Leitfähigkeit zeigte keine Schwankungen. Insgesamt konnten 9,6 mg Sialinsäure in allen Fraktionen wieder gefunden werden.



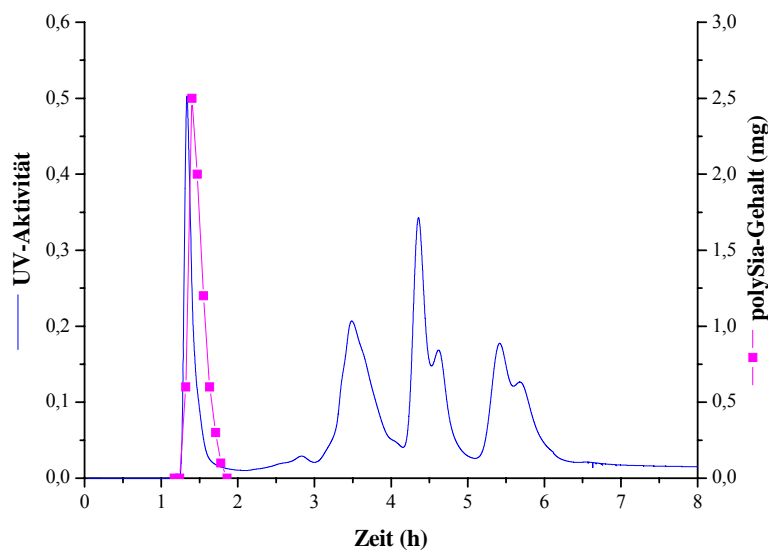
**Abbildung 8.16:** Vergleich der Chromatogramme von kommerziell erhältlicher Colomin- und 5-N-Acetylneuraminsäure auf einer Sephacryl S-300 Säule.

Das Signal der Colominsäure war mit 100 min deutlich breiter, zeigte aber nur eine minimale Überschneidung mit der Sialinsäure. Die Retentionszeit kann mit 1,8-3,5 h angegeben werden. Die UV-Aktivität war auch hier vernachlässigbar gering. Ein

weiterer Peak bei 1,45 h konnte nicht identifiziert werden. Die Summe der Colomin-säuremengen in allen Fraktionen betrug 27,9 mg.

### 8.5.2 Laufverhalten von K1-polySia und Kontaminanten

Um ein Profil der zu erwartenden Verunreinigungen aufzunehmen, wurde zunächst eine Probe des nach Kapitel 8.3 hergestellten polySia-Konzentrats chromatographisch untersucht. Die Filtration der Probelösung führte zu einem deutlichen Absinken der polySia-Konzentration von 4 auf 2,5 g/L. Aufgegeben wurden 3 mL mit einem polySia-Gehalt von 7,5 mg. Das Chromatogramm, dargestellt in Abbildung 8.17, zeigt vier, nicht näher untersuchte, UV-aktive Peaks, die auf verschiedene Kontaminanten schließen lassen.



**Abbildung 8.17:** Chromatogramm einer nach Kapitel 8.3 dargestellten K1-polySia-Probe auf einer Sephacryl S-300 Säule.

Polysialinsäure wurde in sieben Fraktionen (42 mL) zwischen 1,3 und 1,8 h nachgewiesen. Die Summe betrug 7,3 mg. Die Laufzeit der polySia überschneidet sich damit exakt mit dem ersten Peak der Verunreinigungen. Eine gelchromatographische Reinigung direkt im Anschluss an die Ultrafiltration war somit aufgrund einer

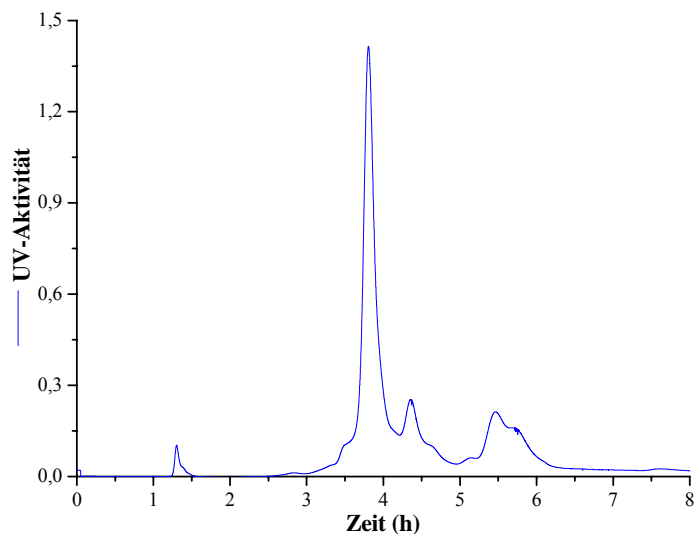
Produkt/Kontaminanten-Überschneidung nach der hier benutzten Methode nicht durchführbar. Die in Kapitel 8.4 beschriebene Fällungssequenz blieb damit unverzichtbar.

Durch den Einsatz der verschiedenen Fällungsmittel während der Präzipitationsserie war mit dem Auftreten neuer Kontaminanten, in den chromatographisch aufzureinigenden Proben zu rechnen. Es wurde daher das Laufverhalten von Aceton, Cetavlon, Ethanol und salzfreiem Wasser untersucht, um eine spätere Identifizierung möglich zu machen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.9 zusammengefasst. Die Laufzeiten aller Fällungsmittel liegen in einem Bereich von 2,2 bis 4,5 h und weisen somit keine Überschneidung mit dem Produkt auf. Aceton und bedingt auch Cetavlon lassen sich über eine gesteigerte UV-Aktivität nachweisen, Ethanol und vor allem das salzfreie Wasser machen sich hingegen durch ein starkes Absinken der Leitfähigkeit bemerkbar.

**Tabelle 8.9:** Lage und Intensität der UV-Signale möglicher Kontaminanten (Fällungsmittel) im Chromatogramm von K1-polySia auf einer Sephacryl S-300 Säule.

<b>Kontaminant</b>	<b>Peak</b>	<b>Peakspitze</b>	<b>rel. UV-Aktivität (280 nm)</b>
Aceton	3,6-4,2 h	3,8 h	+++
Cetavlon	2,2-3,6 h	2,7 h (2,9 h)	+
Ethanol	3,6-4,5 h	3,9 h	0
salzfreies Wasser	3,35-3,8 h	3,5 h	0

Nach der Fällung mit Aceton war erstmals eine nahezu verlustfreie Filtration der polySia-Lösung möglich. Das Chromatogramm des Destillationsrückstands (3 mL) zeigt eine deutliche Abnahme des UV-aktiven Peaks bei 1,4 h von 0,5 auf 0,1 Einheiten. Die anderen Verunreinigungen blieben von der Behandlung unberührt. Zusätzlich trat ein weiterer intensiver Peak bei 3,8 h auf, welcher als nicht abgetrenntes Aceton identifiziert werden konnte.

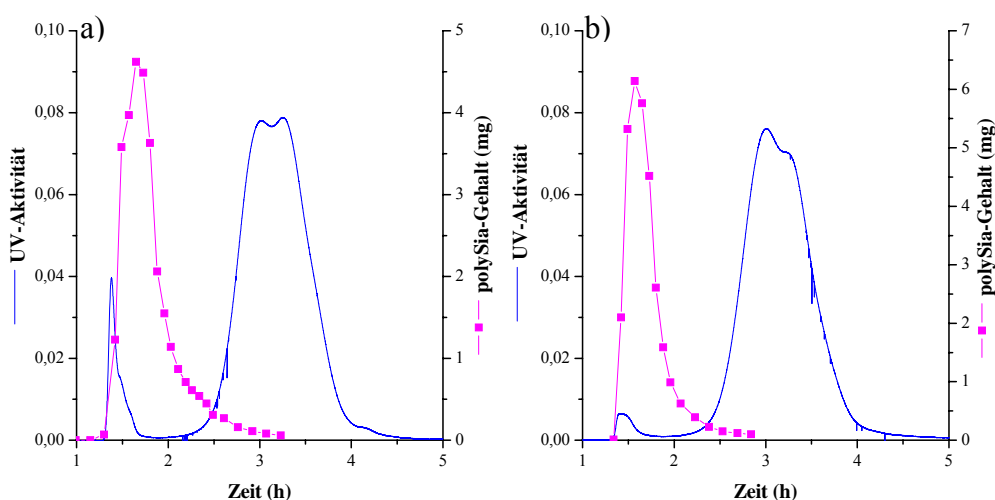


**Abbildung 8.18:** Chromatogramm einer K1-polySia-Probe nach der in Kapitel 8.4.3 beschriebenen Aceton-Fällung auf einer Sephacryl S-300 Säule.

Nach Abschluss der Fällungssequenz („Aceton → Cetavlon → Ethanol“) wurde erneut eine gelchromatographische Aufreinigung durchgeführt. Aufgegeben wurden wiederum 3 mL einer nach Kapitel 8.4 dargestellten polySia-Lösung mit einem Produkt-Gehalt von 10 g/L. Die Filtration konnte ohne Verluste durchgeführt werden. Das Chromatogramm (Abbildung 8.19a) zeigte eine weitere Abnahme des ersten UV-aktiven Peaks auf 0,04 Einheiten. Bei der in den gesammelten Fraktionen nachgewiesenen polySia zeigte sich nun ein leichter Tailingeffekt, der trotz schonender Bedingungen auf eine teilweise Hydrolyse des Produkts schließen lässt. Die Summe der polySia-Inhalte aller Fraktionen belief sich auf 30,5 mg. Der zwischen 2,5 und 4 h auftretende Doppelpeak konnte als Cetavlon-Rückstände identifiziert werden und zeigt aufgrund des Tailingeffekts eine leichte Überschneidung mit dem Produkt. Eine Probe (4 mL) der nach Kapitel 8.4 dargestellten polySia-Lösung wurde weiterhin einer Behandlung mit Phospholipasen unterzogen. Die dabei verwendeten Enzyme und Versuchsbedingungen sind in Tabelle 8.10 zusammengestellt.

**Tabelle 8.10:** Bedingungen für die Behandlung einer nach Kapitel 8.4.3 dargestellten K1-polySia-Probe mit Phospholipase A2 und D.

	Phospholipase A2	Phospholipase D
Menge	je 1 U	
Temperatur	37 °C	30 °C
pH-Wert	7	
Inkubationsdauer	2× 10 min	



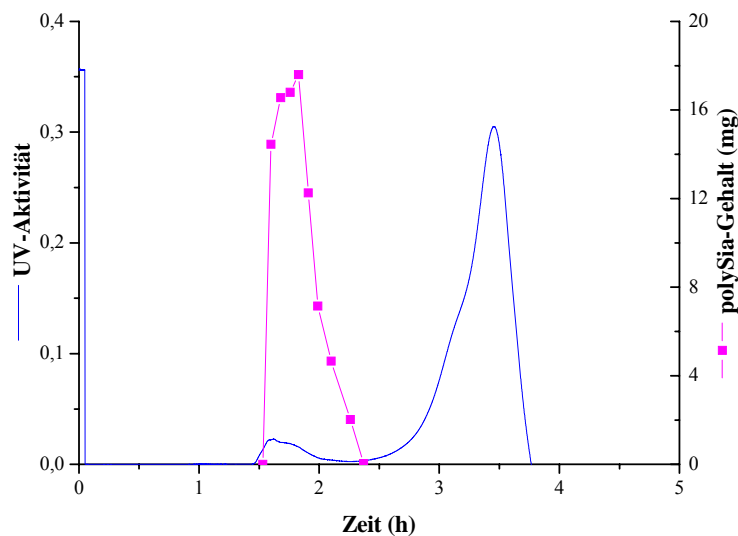
**Abbildung 8.19:** Chromatogramm einer nach Kapitel 8.4.3 dargestellten K1-polySia-Probe auf einer Sephacryl S-300 Säule (a) vor und (b) nach der Behandlung mit Phospholipase.

Die anschließende chromatographische Aufreinigung (Probenvolumen 3 mL) zeigte eine weitere Abnahme des ersten UV-aktiven Peaks auf 0,006 Einheiten (Abbildung 8.19b). Das Laufverhalten der Polysialinsäure blieb weitgehend unbeeinflusst.

### 8.5.3 Aufreinigung von K1-polySia

Für eine präparative Darstellung wurde die Säule mit der vollen Kapazität beladen. Pro Lauf konnten 12,5 mL des nach Kapitel 8.4 dargestellten polySia-Konzentrats mit einem Gehalt von 89 mg (7,1 mg/mL) chromatographisch aufgereinigt werden.





**Abbildung 8.20:** Chromatographische Aufreinigung von 12,5 mL polySia-Konzentrat auf einer Sephacryl S-300 Säule.

Auch bei voller Beladungskapazität konnte eine gute Trennung des Produkts von den Rückständen des Cetavlons erreicht werden. Zwischen 1,5 und 2 h zeigte sich allerdings auch hier noch leichte UV-aktive Verunreinigungen, welche mit der vorliegenden Methode nicht abgetrennt werden konnten.

Die aufgebene Polysialinsäure konnte auf 8 Fraktionen verteilt in einem Gesamtvolumen von 48 mL wieder gefunden werden. Die Summe der einzelnen, in den Fraktionen gemessenen, polySia-Mengen betrug 91,5 mg und war damit im Rahmen des Messfehlers identisch zu der aufgegebenen Menge.

#### 8.5.4 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Auf einer Sephacryl S-300 Säule wurde das Laufverhalten von 5-N-Acetylneuraminsäure, kommerziell erhältlicher Colominsäure und K1-polySia untersucht und miteinander verglichen. In den Chromatogrammen zeigten sich dabei deutliche Unterschiede in den Laufzeiten der Colominsäure (2-3,2 h) und der K1-polySia (1,3-2,5 h). Das Ergebnis lässt erste Schlüsse auf eine unterschiedliche Zusammensetzung bezüglich des Polymerisationsgrades zu. Die mittlere Molmasse der K1-polySia scheint

aufgrund der kürzeren Laufzeit größer zu sein. Der Monomerenanteil mit einer Laufzeit von 3,8 h sollte in beiden Stoffen nur minimal sein.

Die Untersuchung einer unbehandelten Probe K1-polySia-Konzentrat aus Kapitel 8.3 ergab eine Überschneidung mit einem nicht näher bestimmten Kontaminanten im Chromatogramm zwischen 1,3 und 1,8 h. Da eine Filtration der polySia-Lösung an dieser Stelle zusätzlich zu einem Produktverlust von >40 % führte, war die Entwicklung der in Kapitel 8.4 beschriebenen Fällungssequenz unerlässlich. Der Produktverlust ist auf einen zu diesem Zeitpunkt unlöslichen Anteil an polySia zurückzuführen, der durch die Aufkonzentrierung des Zellüberstandes verursacht wurde.

Nach Abschluss der entwickelten Fällungssequenz war eine verlustfreie Filtration der polySia-Lösung möglich. Restanteile der verwendeten Fällungsmittel, besonders des Cetavlons, konnten unter leichten Produktverlusten, wegen einer geringfügigen Überschneidung mit dem Produktpeak, vollständig abgetrennt werden. Durch die Fällungen konnte zwar eine deutliche Abreicherung der UV-aktiven Verunreinigung zwischen 1,3 und 1,8 h erzielt werden, ein Restanteil blieb jedoch.

Die Behandlung mit Phospholipasen führte weiterhin zu einer klaren Verkleinerung des Peaks. Offenbar rührte das gemessene UV-Signal von vereinzelt noch vorhandenen  $\alpha$ -Glycerophosphatresten, die durch die Behandlung mit den Enzymen abgespalten wurden.

Im präparativen Maßstab bei voller Beladungskapazität konnten die Ergebnisse gut reproduziert werden. Die Produktausbeute betrug 95-100 % bei vollständiger Abtrennung der Fällungsmittelreste. Die Chromatographiebedingungen und eine Zusammenfassung der Ergebnisse sind in Tabelle 8.11 zu finden.

**Tabelle 8.11:** Unit-operation zur gelchromatographischen Reinigung von K1-polySia auf einer Sephacryl S-300 Säule.

<b>Gelchromatographie</b>		<b>Ergebnisse</b>	
Säule	Sephacryl S-300	Ausbeute	95-100 %
Laufmittel	0,5 M NaPP	Zeitaufwand	8 h (pro Lauf)
		Materialkosten	3 € (pro Lauf)

Mit der vorliegenden Säule konnte die präparative Aufreinigung von K1-polySia im Labormaßstab etabliert werden. Das gesamte Volumen der vorliegenden polySia-Lösung (150 mL) überstieg die Kapazität der Säule (12,5 mL) jedoch bei weitem. Angesichts der langen Laufzeiten von ca. 8 h für einen Chromatographielauf (inklusive Regeneration der Säule) ist die präparative Darstellung mit der verwendeten Säule in dem angestrebten Maßstab nicht praktikabel. Eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit dieses Schritts könnte durch die Verwendung einer Säule mit größerer Querschnittsfläche erreicht werden. Das scale-up überstieg jedoch hier den Rahmen dieser Arbeit.

## **8.6 Entsalzung**

Der letzte Reinigungsschritt im Downstreamprozess musste die Entfernung von Fremdionen des Laufmittels und/oder Resten der Fällungsmittel beinhalten. Ein etabliertes Verfahren dazu ist die osmotisch getriebene Dialyse.

### **8.6.1 Dialyse**

Das Ausschlussvolumen der für die Dialyse verwendeten Celluloseacetat-Schläuche (Visking, Carl Roth, Karlsruhe) betrug 14 kDa und war damit ähnlich zu den benutzten Ultrafiltrationsmembranen zur Aufkonzentrierung des Zellüberstands in Kapitel 8.3. Im Fall der Produktabscheidung durch Ethanol-fällung ging der Dialyse eine Sterilfiltration (0,2 µm) voraus. Die Produktkonzentration blieb hiervon unbeeinflusst. Insgesamt wurden drei Dialyseschritte durchgeführt. Einmal gegen 2 M NaCl-Lösung und zweimal gegen dest. Wasser. Um einer Hydrolyse der Polysaccharide vorzubeugen, wurden alle Dialysegänge in leicht alkalischer Umgebung durchgeführt. Ein genaues Protokoll für die Vorbereitung der Dialyseschläuche und die Durchführung kann dem Kapitel 11.5.2 entnommen werden.

Trotz der milden Bedingungen während der Dialyse und des übrigen Ausarbeitungsprozesses kam es während der Entsalzung zu einem weiteren Produktverlust. Dieser betrug bei der durch Ethanol-fällung gewonnenen polySia bis zu 18 %. Eine chromatographische Analyse nach Kapitel 8.5 ergab zudem einen nicht quantifizierten

Restanteil von Cetavlon in der Probe, der nicht durch die Dialyse entfernt werden konnte.

Bei der zuvor chromatographisch aufgereinigten K1-polySia betrug der Verlust bei der Dialyse lediglich maximal 5 %. Reste zurückgebliebener Fällungsmittel wurden hier bereits durch die fraktionierte Sammlung abgetrennt.

### 8.6.2 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Der Aufarbeitungsprozess wurde durch eine Entsalzung der Produktlösung abgeschlossen. Begleitend fand eine Abreicherung von hydrolysierten oligoSia-Molekülen statt. In Tabelle 8.12 sind die Bedingungen und Ergebnisse dieses Schritts noch einmal zusammengefasst.

**Tabelle 8.12:** Unit-operation zur Entsalzung der aufgereinigten K1-polySia-Lösung durch Dialyse.

<b>Dialyse</b>		<b>Ergebnisse</b>	
Membranmaterial	Cellulose-Acetat	Ausbeute	82-95 %
MWCO	14 kDa	Zeitaufwand	72 h
pH-Wert	9	Materialkosten	14 €/L

### 8.7 Produktabscheidung

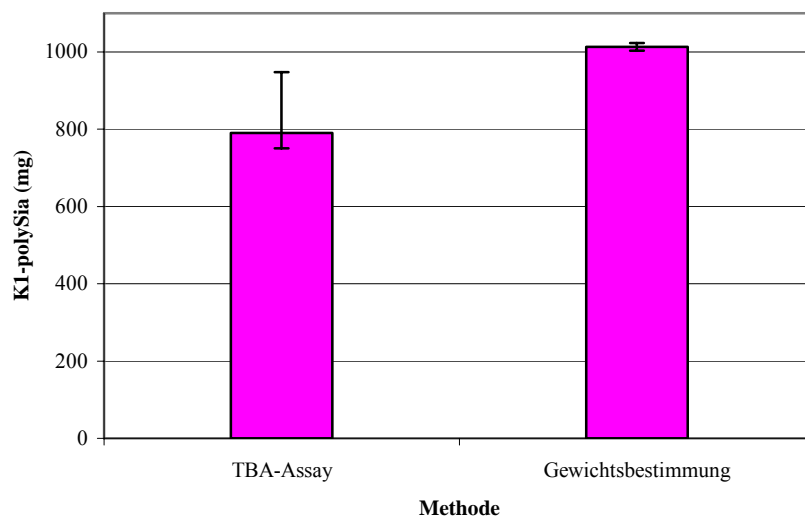
Für eine haltbare Lagerung sollte das Produkt am Ende des Prozesses in fester Form vorliegen. Zur Abscheidung der Polysialinsäure aus der wässrigen Phase wurden zwei verschiedene Trocknungsverfahren, die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung, getestet.

Die Gefriertrocknung oder Lyophilisation ist ein schonendes Verfahren, bei dem der Probe durch Anlegen eines Vakuums das gefrorene Lösemittel (meistens Wasser) durch Sublimation entzogen wird. Das Verfahren ist seit langem vor allem in der Pharmaindustrie zur Trocknung pharmakologischer Wirkstoffe etabliert.

Bei der Sprühtrocknung wird die Produktlösung über eine beheizte Zerstäuberdüse in einen Zyklonabscheider eingespritzt. Bedingt durch die hohe Temperatur an der Düse verdampft das Lösemittel innerhalb weniger Sekundenbruchteile und wird im Zyklonabscheider von dem abgeschiedenen Feststoff getrennt.

### 8.7.1 Lyophilisation

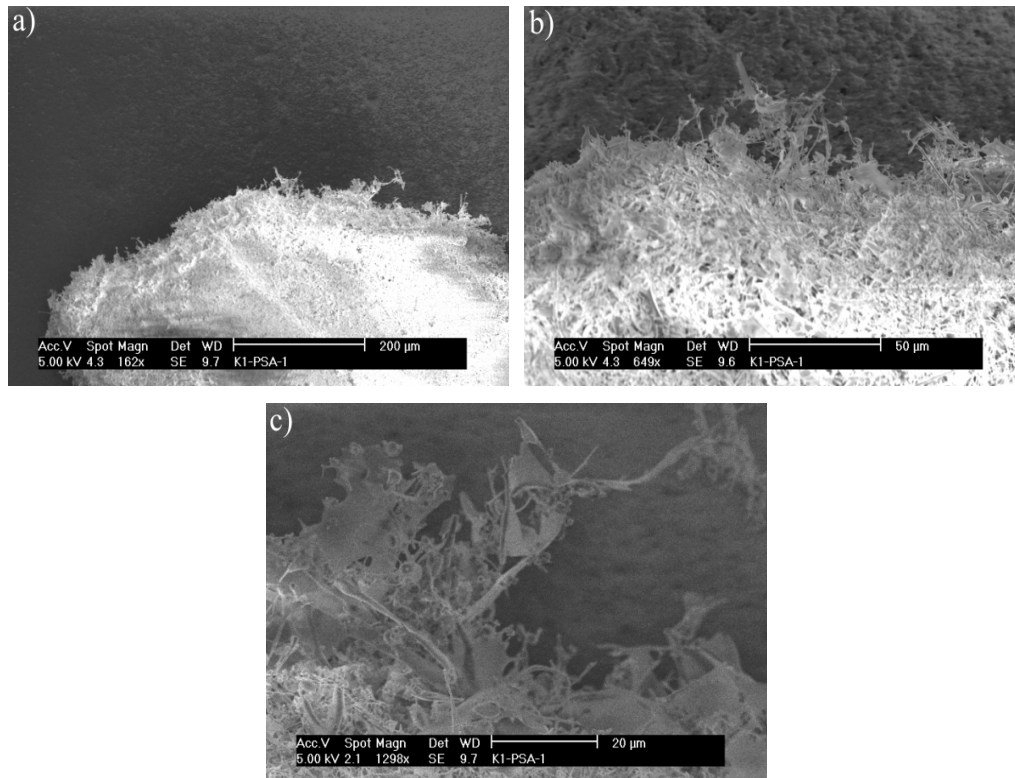
Zur Vorbereitung für die Gefriertrocknung wurde die polySia-Lösung in flache breite Kristallierschalen überführt (Flüssigkeitshöhe <1 cm), um während des Trocknungsvorgangs eine möglichst große Oberfläche für die Verdampfung auszunutzen. Die Lösung wurde in diesen Schalen bei -80 °C vollständig eingefroren und anschließend in der Lyophille (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz), bei 1 mbar getrocknet. Der Wasserentzug war nach ca. 36 h vollständig abgeschlossen.



**Abbildung 8.21:** Vergleich der gemessenen K1-polySia-Menge durch Quantifizierung mittels des TBA-Assays und durch Gewichtsbestimmung.

Das gewonnene Produkt war, unabhängig von einer chromatographischen Aufreinigung, von hellweißer Farbe und einer watteähnlichen Konsistenz. Die tatsächliche Ausbeute einer nicht chromatographisch aufgereinigten Charge wurde durch

Gewichtsbestimmung ermittelt und in Abbildung 8.21 mit den Ergebnissen der quantitativen chemischen Analyse (TBA-Assay) der dialysierten polySia-Lösung verglichen. Während der TBA-Assay eine Produktmenge von 790 mg angezeigt wurden durch die Gewichtsbestimmung 1 g an Produkt eingewogen.



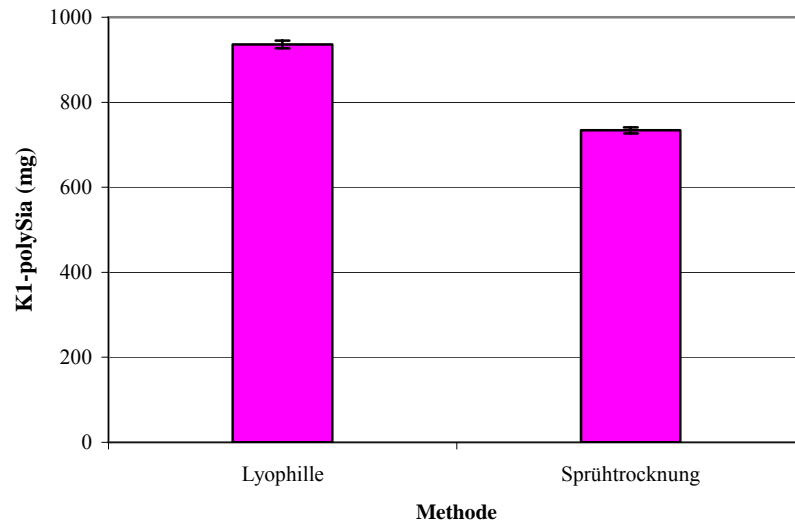
**Abbildung 8.22:** REM-Aufnahmen gefriergetrockneter K1-polySia. Die Vergrößerungen betragen 160× (a), 650× (b) und 1.300× (c).

Von dem fertig getrockneten Produkt wurden Aufnahmen mit einem Raster-elektronenmikroskop (JSM-6700F, Jeol Ltd., Tokyo, Japan) angefertigt. Bei hoher Vergrößerung zeigte sich eine faserartige Struktur der K1-polySia.

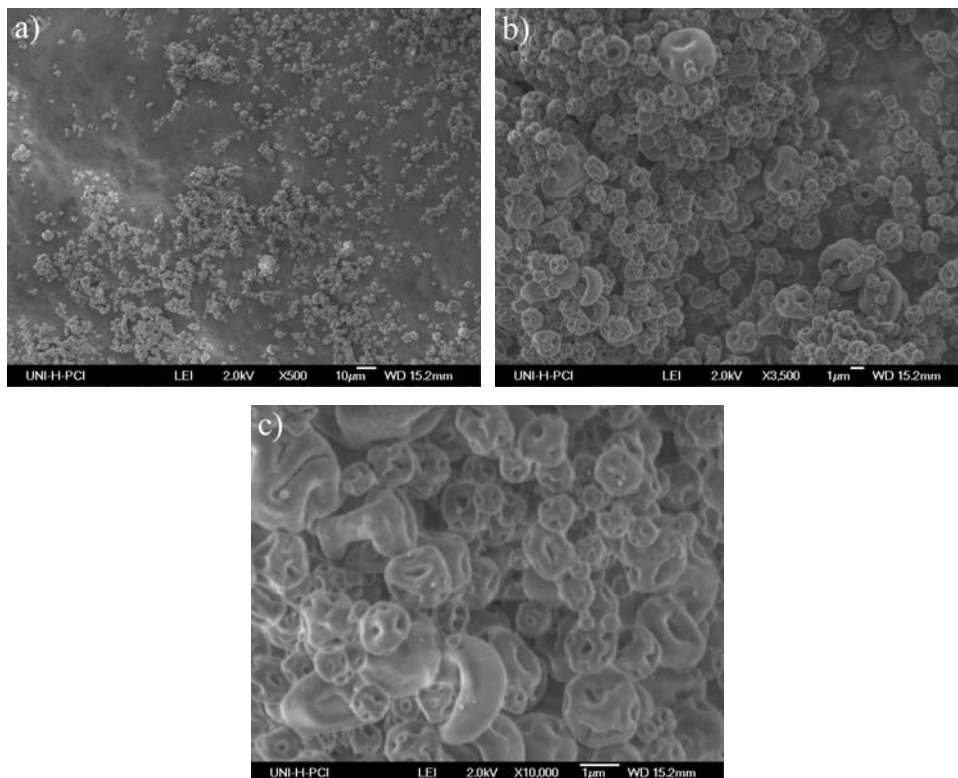
### 8.7.2 Sprühtrocknung

Für die Sprühtrocknung (Mini Spray Dryer B-290, BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen) war keine weitere Probenvorbereitung notwendig. Anlagenbedingt musste ein

Mindestvolumen von 200 mL eingesetzt werden. Die Verdampfungstemperatur wurde auf 80 °C eingestellt, die Pumpgeschwindigkeit auf 2 mL/min.



**Abbildung 8.23:** Vergleich der Ausbeute von K1-polySia nach Abscheidung aus der flüssigen Phase durch Gefriertrocknung und Sprühtrocknung.



**Abbildung 8.24:** REM-Aufnahmen sprühtrockneter K1-polySia. Die Vergrößerungen betragen 500× (a), 3.500× (b) und 10.000× (c).

Das Produkt wurde als feinpulvriger weißer Feststoff abgeschieden. Aus den eingesetzten 200 mL konnten 734 mg Produkt gewonnen werden. Der Vergleich mit der Ausbeute in der Lyophilie bei gleichem Volumen in Abbildung 8.23 ergab eine Differenz von ca. 200 mg (22 %).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die Zusammensetzung des Produkts aus Mikropartikeln mit einer Größe zwischen 1-5  $\mu\text{m}$ .

### 8.7.3 Diskussion und übernommener Prozessschritt

Der Vergleich der beiden Trocknungsmethoden zeigte hinsichtlich der Produktausbeute eindeutige Vorteile auf Seite der Lyophilisation. Während der Sprühtrocknung gingen insgesamt 200 mg Produkt in der Anlage verloren. Der Verlust ist vermutlich auf eine Austragung des Produkts mit dem Luftstrom aufgrund einer zu geringen Partikelgröße zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass sich der Verlust bei größeren Volumina oder höheren Produktkonzentrationen relativieren würde, im vorliegenden Maßstab jedoch ist die Lyophilisation der Sprühtrocknung vorzuziehen. Tabelle 8.13 zeigt den in den Downstreamprozess übernommenen Schritt der Trocknung der K1-polySia.

**Tabelle 8.13:** Unit-operation zur Trocknung der aufgereinigten K1-polySia-Lösung im Downstreamprozess der Aufarbeitung von Polysialinsäure aus *Escherichia coli* K1.

Lyophilisation		Ergebnisse	
Druck	1 mbar	Ausbeute	100 %
Temperatur	-65 °C	Zeitaufwand	36 h
		Materialkosten	-

Eine Berechnung der Produktreinheit der nicht chromatographisch aufgereinigten K1-polySia, durch Vergleich der quantitativen Analyse per TBA-Assay mit der Gewichtsbestimmung des lyophilisierten Produkts, ist an dieser Stelle nur unter Angabe eines großen Fehlers möglich. Aufgrund der Messergebnisse würde sich eine Produktreinheit von 78 % ergeben. Wie in Kapitel 4.2 gezeigt, eignet sich der



entwickelte TBA-Assay jedoch nur bedingt für eine absolute Quantifizierung, da die Signalintensität von hydrolysierte Polysialinsäure stets 10-20 % unter den Kalibrierungswerten der verwendeten 5-N-Acetylneuraminsäure liegt. Unter Berücksichtigung dieses Fehlers kann die tatsächliche Reinheit mit >90 % angegeben werden.

### **8.8 Zusammenfassung und Diskussion**

Durch eine Kombination verschiedener unit-operations wurde ein Downstreamprozess für die in *Escherichia coli* K1 produzierte Polysialinsäure entwickelt. Am Anfang der Aufarbeitung stand dabei eine ausgewachsene 10-L-Bioreaktorkultur von *E.coli* K1 mit einem Gesamtgehalt von 4,5-5,5 g polySia.

Der entwickelte Downstreamprozess umfasste eine Zellseparation durch kontinuierliche Zentrifugation mit anschließender Aufkonzentration des Zellüberstands mittels cross-flow Ultrafiltration. Durch eine speziell angepasste Präzipitationssequenz konnte das Produkt bereits mit hoher Reinheit (>90 %) von den übrigen Kontaminanten abgetrennt werden. Ein abschließendes Polishing per Größenausschlusschromatographie und die Entsalzung der Produktlösung durch Dialyse komplettierten den Aufreinigungsprozess.

Am Ende wurde die K1-polySia durch Lyophilisation als weißer Feststoff aus der Lösung abgeschieden. Das Fließschema in Abbildung 8.25 gibt eine Übersicht des gesamten Produktionsprozesses, von den *E.coli* K1-Bakterien bis zur fertigen Polysialinsäure.

Auch ohne die chromatographische Feinreinigung konnte bereits ein qualitativ gutes Produkt mit einer Reinheit von ca. 90 % dargestellt werden. Die Hauptverunreinigung bestand in diesem Fall aus dem Fällungsmittel Cetavlon, welches nicht durch die nachfolgende Dialyse abgetrennt werden konnte.

Die Nettozeit des entwickelten Downstreamprozesses, berechnet aus der Summe der Zeiten der einzelnen unit-operations, beträgt genau sieben Tage. Darin enthalten ist jedoch nur ein Chromatographielauf. Je drei weitere Läufe würden dabei eine Verlängerung von einem Tag bedeuten. Unter Berücksichtigung von Arbeitszeiten kann die Bruttozeit für die Aufarbeitung bis zu 150 % der Nettozeit betragen.

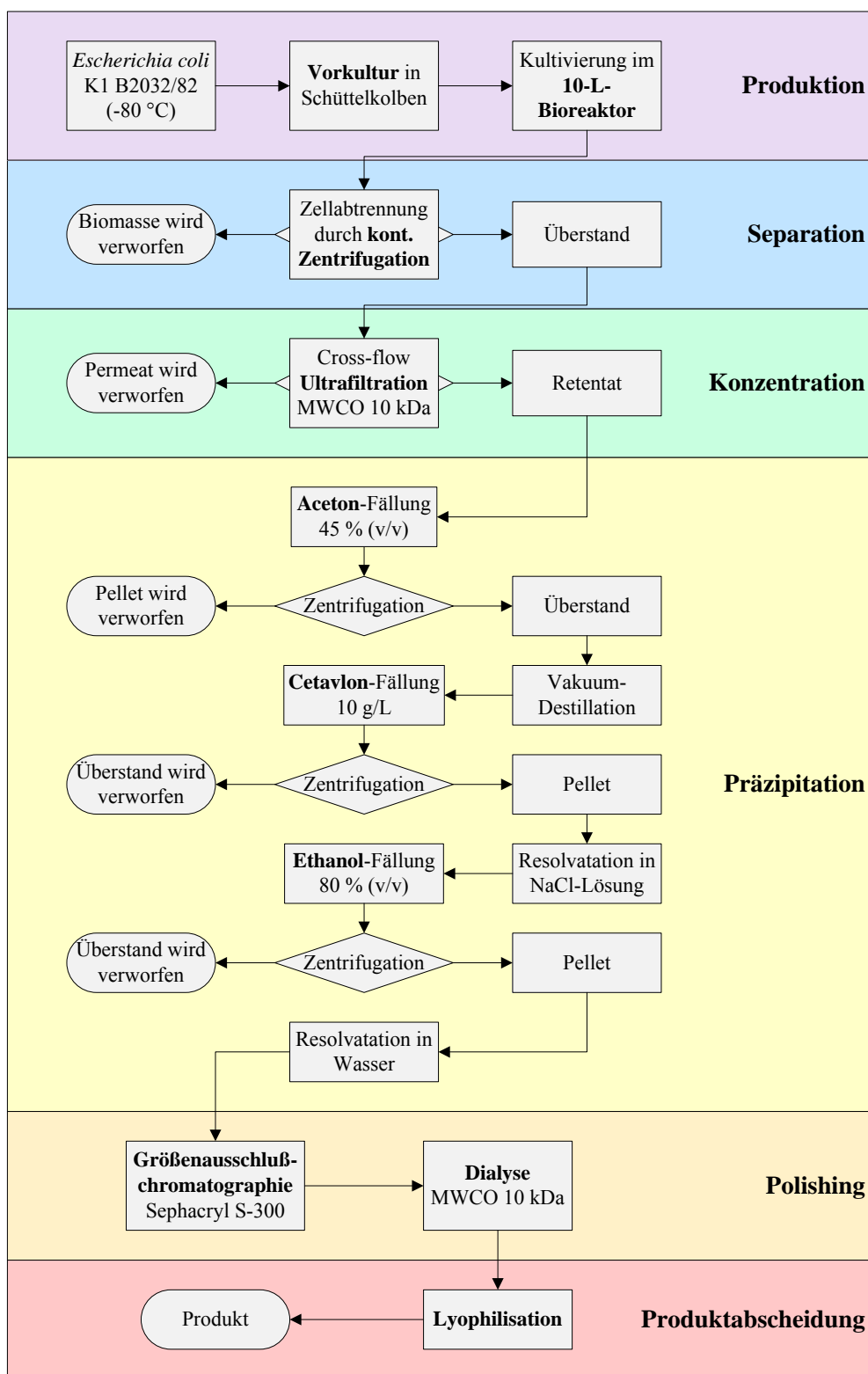


Abbildung 8.25: Fließschema des Produktionsprozesses von Polysialinsäure inklusive biosynthetischer Produktion in *Escherichia coli* K1 im 10-L-Bioreaktormaßstab und dem entwickelten Downstreamprozess.

Die Kosten für Chemikalien und Verbrauchsmaterial (exklusive Wasser-, Energie, Personal- und Investitionskosten) belaufen sich auf ca. 20 €. Pro Chromatographielauf kann mit einer weiteren Erhöhung um 3 € gerechnet werden.

Auf Basis der Ausbeuten der einzelnen Aufarbeitungsschritte ergibt sich ein Gesamtertragsgrad von 17-37 %. Bei einer Ausgangsmenge von 4,5-5,5 g Polysialinsäure in einem 10-L-Ansatz lassen sich somit 0,8-2 g aufgereinigtes Produkt gewinnen.

Eine grundlegende Verbesserung der Produktausbeute kann durch die Entwicklung einer praktikablen Methode zur Freisetzung der zellgebundenen polySia erreicht werden, da hier die höchsten Verluste (30-50 %) auftraten. Denkbar wäre hier zum Beispiel eine Kombination aus chemischer Zellzerstörung und gezielter enzymatischer Freisetzung durch Phospholipasen. Wie schon zuvor erwähnt ist jedoch nicht abzusehen, wie der folgende Aufarbeitungsprozess eine weitere drastische Verbreiterung und Vertiefung des Kontaminantenspektrums reagieren würde.

Eine weiterführende Optimierung des Downstreamprozesses ist vor allem im Bereich der Fällungen und chromatographischen Aufreinigung möglich. Eine mögliche Alternative wäre hier zum Beispiel die Adsorptionstechnologie. Durch den Einsatz einer geeigneten Ionenaustauschersäule oder speziellen Membranadsorbern könnten eine gezielte Bindung des Produkts und die Abtrennung von Kontaminanten gelingen. Erschwerend wirkt hierbei jedoch die nicht einheitliche Zusammensetzung der Polysialinsäure, da die verschiedenen langen Polyanionen unterschiedlich auf äußere physikalische und chemische Eigenschaften reagieren könnten. Die Umstellung in diesem zentralen Bereich des entwickelten Downstreamprozesses käme jedoch einer fast kompletten Neuentwicklung nahe.

## **9 Produktbeschreibung**

Während des Darstellungs- und Aufreinigungsprozesses beschränkte sich die Analyse des Produkts hauptsächlich auf Quantitätsmessungen zur Bestimmung der jeweiligen Wirkungsgrade der einzelnen Produktionsschritte. Zusätzlich wurde im Downstreambereich auf einige ausgewählte Kontaminanten wie z.B. Proteine getestet. Das finale nach Kapitel 8 aufgereinigte Produkt wurde zur qualitativen Bewertung einer ausführlicheren Analyse unterzogen. Dabei standen als Qualitätsmerkmale die Produktreinheit und die Kettenlänge des Polysaccharids primär im Vordergrund.

### **9.1 Produktreinheit**

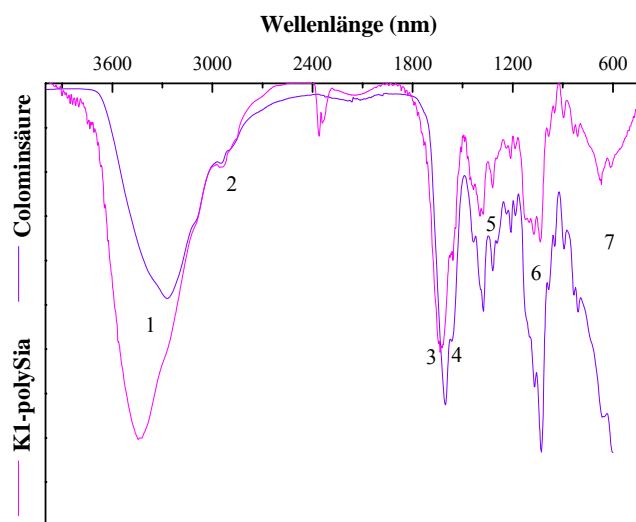
Die Produktreinheit wurde auf zwei unterschiedliche Arten bewertet. Zum Einen wurden allgemeine Verfahren zur Produktidentifizierung angewandt. Das Produkt wurde dabei mittels IR- und NMR-Spektroskopie untersucht. Die aufgenommenen Spektren wurden anschließend mit Literaturdaten verglichen und auf Verunreinigungen durchsucht.

Weiterhin wurden gezielte Analysen auf mögliche fremde Inhaltsstoffe des aufgereinigten Produkts durchgeführt. Dazu gehörten der Bradford-Assay zur Bestimmung des Proteingehalts, die ICP-OES Analyse zur Identifizierung der salzbildenden Kationen, der Nachweis von DNA/RNA-Rückständen mittels fotometrischer Messung bei 260 nm und die Untersuchung der Probe auf Endotoxine.

#### **9.1.1 IR-Spektroskopie**

Die Aufnahme der IR-Spektren wurde durch diffuse Reflexionsmessungen (DRIFTS) an festen Proben mit einem Tensor 27 IR-Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) am Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover vorgenommen. Neben der K1-polySia wurden zu Vergleichszwecken zusätzlich Spektren von kommerziell erworbener Colominsäure erstellt. Die beiden Spektren

sind in Abbildung 9.1 einander gegenüber gestellt. Bis auf eine methodenbedingte Verschiebung der Bandenintensitäten ist eine detaillierte Übereinstimmung zu erkennen. Das Produkt konnte somit eindeutig identifiziert werden.



**Abbildung 9.1:** Vergleich der IR-Spektren von K1-polySia und Colominsäure.

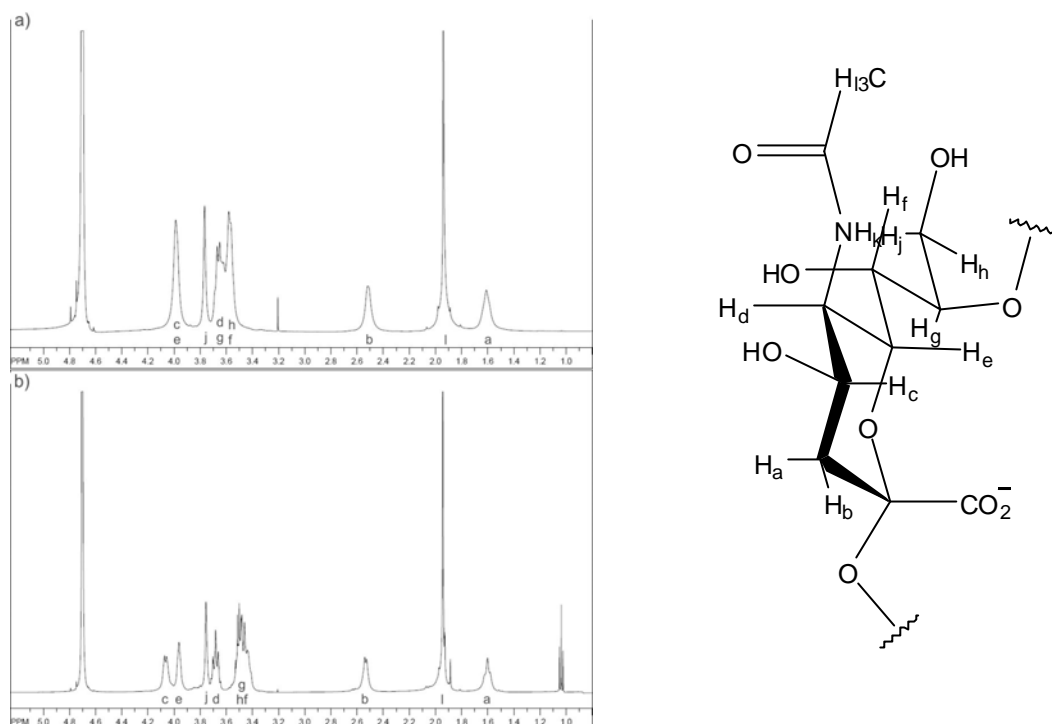
**Tabelle 9.1:** Zuordnung der IR-Absorptionsbanden des Polysialinsäure-Spektrums.

Peak Nr.	Absorptionsbereich (nm)	Zuordnung
1a	2.700-3.700	O-H Streckschwingung
1b	2.800-3.000 (Schulter)	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH Streckschwingungen
2a	1.650	Carboxyl C=O Streckschwingung
2b	1.550 (Schulter)	Amid C=O Streckschwingung (Überschneidung mit Amid N-H Biegeschwingung)
5	1.300-1.500	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH Deformationsschwingung O-H Biegeschwingung
6	100-1.150	C-O Streckschwingung
7	500-900	Fingerprintbereich

Bei der Interpretation der Spektren konnte allen IR-aktiven Molekülschwingungen eine entsprechende Absorptionsbande zugeordnet werden (siehe Tabelle 9.1).

## 9.1.2 NMR-Spektroskopie

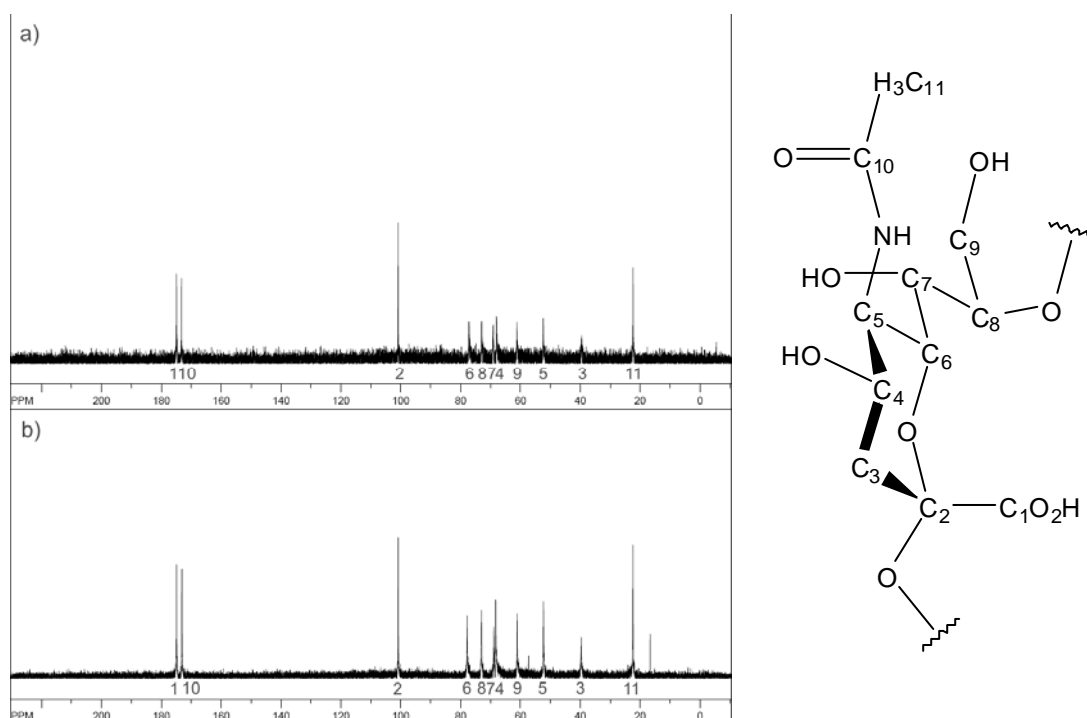
Für eine weitere allgemeine Charakterisierung wurden sowohl  $^1\text{H}$ -NMR- als auch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von der K1-polySia und zu Vergleichszwecken von der kommerziell erhältlichen Colominsäure angefertigt. Alle NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX-500 Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) aufgenommen. Zur Vorbereitung wurden die gemessenen Proben in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Die chemische Verschiebung wurde relativ zu Tetramethylsilan gemessen. Die Aufnahme der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erfolgte breitbandentkoppelt. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren sind in Abbildung 9.2 dargestellt.



**Abbildung 9.2:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von K1-polySia (a) und Colominsäure (b). Eine Zuordnung der Absorptionsbanden kann anhand der Buchstaben durch Vergleich mit dem polySia-Baustein (c) erkannt werden.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren stimmen im Bereich von 1,5-3 ppm vollkommen überein. Bei höheren chemischen Verschiebungen ab 3 ppm sind dann jedoch Abweichungen im Aufspaltungsmuster zu erkennen, welche durch unterschiedliche strukturelle Eigenschaften (Kettenlänge, vermittelnde Kationen) zu erklären sind. Die Integration über

alle Peaks ergab in beiden Fällen die erwartete Anzahl an NMR-aktiven Wasserstoffatomen, wobei zu berücksichtigen ist, dass das an die Amid-Funktion gebundene Wasserstoffatom H<sub>k</sub>, außerhalb des dargestellten Bereichs liegt (ca. 8 ppm). Im Spektrum der kommerziellen Colominsäure trat bei einer chemischen Verschiebung von 1 ppm ein weiteres Triplet auf, welches entweder einen Restanteil von Acetat in der Probe anzeigt oder weitere unspezifische O-Acetylierungen des Produkts belegt, wie sie bei Colominsäure auftreten können (vgl. Kapitel 2.3). Eine genaue Zuordnung der einzelnen Signale aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren ist durch den Vergleich mit dem polySia-Baustein in Abbildung 9.2 gegeben. Die Aufspaltung der Signalpeaks ist aufgrund der polymeren Probenbeschaffenheit in diesem Spektrum zum größten Teil nicht aussagekräftig und lässt keine Rückschlüsse auf die Protonenkopplungen zu. Der nicht aufgeführte Peak bei 4,7 ppm stammt aus dem Lösemittel durch Austausch von Deuterium mit Protonen aus der Probe.



**Abbildung 9.3:** Vergleich der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von K1-polySia (a) und Colominsäure (b). Eine Zuordnung der Absorptionsbanden kann anhand der Buchstaben durch Vergleich mit dem polySia-Baustein (c) erkannt werden.

Auch in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren in Abbildung 9.3 stimmten alle produktrelevanten Peaks der beiden Spektren vollkommen überein und es konnten alle elf chemisch unterschiedlichen Kohlenstoffatome der Polysialinsäure eindeutig identifiziert werden. Im Spektrum der Colominsäure zeigte sich erneut bei einer chemischen Verschiebung von 17 und 48 ppm die Verunreinigung durch Acetat oder die beschriebenen O-Acetylierungen. Eine genaue Zuordnung der einzelnen Signale aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren ist wiederum durch den Vergleich mit dem polySia-Baustein in Abbildung 9.3 gegeben.

### 9.1.3 ICP-OES

Durch ICP-OES Messungen (Inductive Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy) wurde das Produkt gezielt auf den Gehalt an verschiedenen Metallkationen untersucht. Die Messung diente zum Einen dem Nachweis des Gegenkations zum anionischen Polysaccharid und zum Anderen der Bestimmung von metallhaltigen salzbildenden Verunreinigungen.

Bei der ICP-OES wird die untersuchte Metallsalzlösung mittels eines Zerstäubers als feines Aerosol in die Probenkammer eingeführt und dort die Außenelektronen der Metallatome mit Hilfe eines Plasmabrenners angeregt. Die elektromagnetischen Emissionen können mit einem Photomultiplier detektiert werden. Die Intensität der emittierten Strahlung ist dabei der Konzentration der zu bestimmenden Kationen proportional.

Die nach Kapitel 8 dargestellte K1-polySia wurde auf den Gehalt an Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen und Kupfer untersucht. Alle genannten Metalle kamen während des Produktionsprozesses entweder im Kulturmedium oder bei der Aufarbeitung zum Einsatz. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

**Tabelle 9.2:** Metallionengehalt der dargestellten K1-polySia (BG=Bestimmungsgrenze).

<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>
5,81 %	<BG	0,11 %	0,01 %	0,06 %	<BG



Die Untersuchung zeigte Natrium als Hauptionenbestandteil der Probe mit 5,8 %. Calcium konnte als Nebenbestandteil mit 0,11 % nachgewiesen werden. Magnesium und Eisen traten lediglich in Spuren auf. Kalium und Kupfer waren nicht enthalten.

#### **9.1.4 DNA/RNA-Bestimmung**

Zur Untersuchung der Probe auf verunreinigende DNA wurde ein Absorptionsspektrum von 200-350 nm aufgenommen. Eine deutliche Absorptionsbande bei 260 nm zeigte eine Verunreinigung durch DNA an. Eine genaue Quantifizierung war aufgrund der enthaltenen Polysialinsäure nicht möglich.

## **9.2 Polymerisationsgrad**

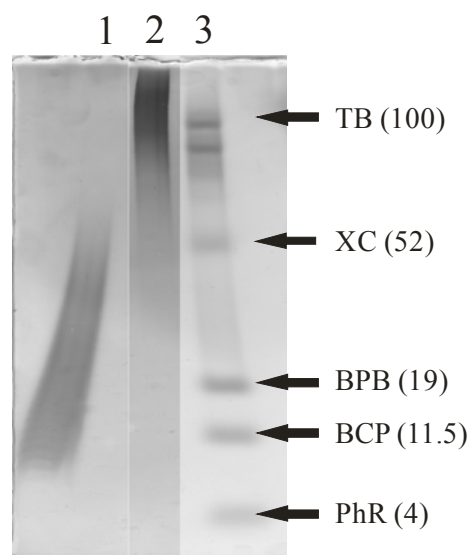
Als zweites Qualitätsmerkmal wurde die (durchschnittliche) Kettenlänge des Polysaccharids untersucht. Auch hier wurden unterschiedliche Verfahren benutzt, die zum Teil eine direkte und zum Teil eine relative Bestimmung der durchschnittlichen mittleren Kettenlänge bzw. der Kettenlängenverteilung ermöglichten. Hierzu gehörten Gelelektrophorese, (DMB-)HPLC Untersuchungen und Osmose-Messungen.

### **9.2.1 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese wurde nach [PELKONEN S. et al., 1988] in einem 25 % Polyacrylamidgel durchgeführt. Das Polysaccharid wurde anschließend durch eine kombinierte Alcianblau-/Silberfärbung sichtbar gemacht [MIN H. et al., 1986]. Eine genaue Beschreibung der Durchführung ist in Kapitel 11.5.5 zu finden. Der verwendete Marker bestand aus einem Farbstoffgemisch, wobei jeder Farbstoff ein eigenes Laufverhalten aufweist und somit einem bestimmten Polymerisationsgrad der Polysialinsäure zugeordnet werden kann [PELKONEN S. et al., 1988].

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 9.4 zu sehen. Aufgetragen wurde auf Bahn 1 zu Vergleichszwecken die kommerziell erhältliche Colominsäure, auf Bahn 2 die aufgereinigte K1-polySia und auf Bahn 3 der Marker. Wie zu erkennen ist liegt

der Hauptanteil der Colominsäure in einem Kettenlängenbereich zwischen 10 und 50 Einheiten. Die mittlere Kettenlänge der K1-polySia hingegen bewegt sich in einem Bereich von über 100 Einheiten. Eine genauere Angabe ist wegen der geringen Auflösung in diesem Bereich mit der vorliegenden Methode nicht möglich.



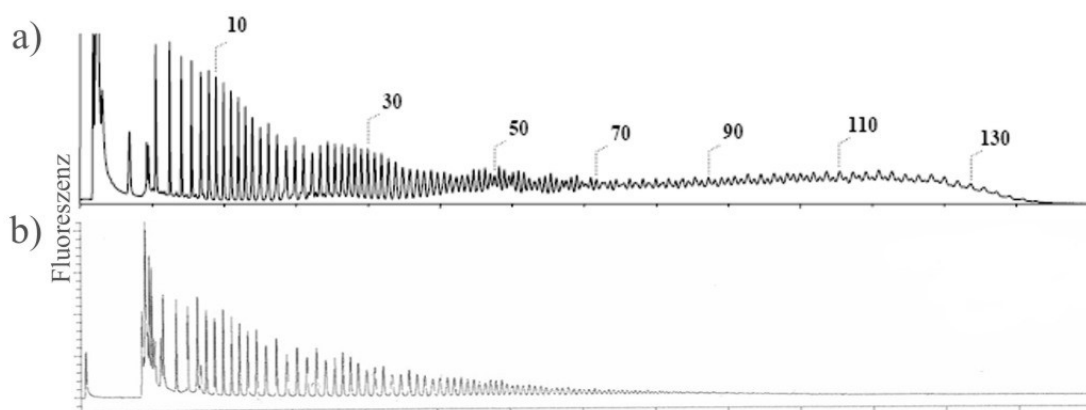
**Abbildung 9.4:** Gelelektrophorese von Polysialinsäure in einem 25 %igen Polyacrylamidgel. Bahn 1: kommerzielle Colominsäure; Bahn 2: K1-polySia; Bahn 3: Farbstoffmarker bestehend aus Phenolrot (PhR, DP 4), Bromcresolpurpur (BCP, DP 11,5), Bromphenolblau (BPB, DP 19), Xylencyanol (XC, DP 52) und Trypthanblau (TB, DP 100).

### 9.2.2 DMB-HPLC

Die Untersuchung per HPLC erlaubte die detaillierteste Beschreibung der Zusammensetzung der Polysialinsäure. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde die polySia mit einem Fluoreszenzfarbstoff (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol, DMB) markiert [INOUE S. et al., 2001; GALUSKA S.P. et al., 2007]. Die Trennung erfolgte auf einer DNAPac PA-100 Säule (Dionex, Idstein, Germany). Genaue Beschreibungen der Fluoreszenzmarkierung und Durchführung der Trennungsläufe sind in Kapitel 11.5.4 zu finden.

Die Analyse der kommerziellen Colominsäure zeigte einen Kettenlängenabbruch bei ca. siebzig bis achtzig Sialinsäureresten. Bei der aufgereinigten K1-polySia könnten hingegen Polymerketten von über 130 Einheiten nachgewiesen werden. Danach wurde

das Auflösungsvermögen der Methode erreicht. Eine quantitative Auswertung der einzelnen Peaks und somit eine genaue Bestimmung der Zusammensetzung der beiden Polysialinsäuren konnte mit den vorliegenden Messungen nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 9.5:** Vergleich der Kettenlängenzusammensetzung von K1-polySia (a) und kommerzieller Colominsäure (b) bestimmt per DMB-HPLC-FD.

### 9.2.3 Osmometrie

Durch Messung des osmotischen Potentials an einer semipermeablen Membran ist die Bestimmung der mittleren molaren Masse gelöster Makromoleküle möglich, da ein direkter Zusammenhang zwischen dem osmotischen Druck und den kolligativen Eigenschaften einer Lösung besteht. Eine Absolutmessung der Teilchengröße setzt dabei das Vorhandensein einer Kalibrationsreihe gleichartiger verdünnter Lösungen voraus. Relativmessungen sind auch ohne eine solche möglich.

An einem Membran-Osmometer (OSMOMAT<sup>®</sup> 090, GONOTEC GmbH, Berlin) wurden die osmotischen Drücke einer Colominsäure- und einer K1-polySia-Lösung gleicher Massenkonzentration an einer 5 kDa-Membran bestimmt. Der Quotient der gemessenen Werte lag bei  $\frac{p_{\text{Osm. (K1-polySia)}}}{p_{\text{Osm. (CA)}}}=3,5$ , woraus sich durch direkte Proportionalität eine um den Faktor 3,5 höhere mittlere Molmasse der dargestellten K1-polySia errechnet.

### 9.3 Diskussion und Zusammenfassung

Durch den Vergleich des isolierten Produkts mit der kommerziell erhältlichen Colominsäure im IR-Spektrum konnte die Probe als Polymer der 5-N-Acetylneuraminsäure identifiziert werden. Alle relevanten Absorptionsbanden wurden erkannt und konnten den funktionellen Gruppen der Verbindungen zugeordnet werden. Eine Aussage über potentielle Verunreinigungen konnte anhand der Spektren nicht getroffen werden, da durch mögliche Bandenüberlappungen keine entsprechenden Signale ausgemacht werden konnten.

Die Analyse per NMR-Spektroskopie ließ detailliertere Aussagen über das Produkt zu. Es wurden sowohl  $^1\text{H}$ -NMR- als auch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren angefertigt. Mit beiden Methoden konnte das Produkt durch den Vergleich mit der kommerziellen Colominsäure eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich konnten Aussagen über potentielle Verunreinigungen des Produkts getroffen werden, da kohlen- und wasserstoffhaltige Kontaminanten als zusätzliche Signale in den Spektren sichtbar werden würden. Eine Überlappung wie bei der IR-Spektroskopie ist aufgrund einer hohen Bandenschärfe, vor allem in den  $^{13}\text{C}$ -Spektren, höchst unwahrscheinlich. Alle Signale in den angefertigten Spektren konnten zweifelsfrei den in der Polysialinsäure enthaltenen Kohlen- und Wasserstoffatomen zugeordnet werden. Zusätzliche Signale konnten in den Spektren der K1-polySia nicht beobachtet werden. Die Verunreinigung durch organische Verbindungen lag damit unter der Nachweisgrenze des Spektrometers.

Mittels ICP-OES wurde die K1-polySia auf den Gehalt metallionischer Komponenten untersucht. Ziel des Aufarbeitungsprozesses war die Isolierung der Polysialinsäure als Natriumsalz (Colominsäure). Die Berechnung des Natriumanteils einer reinen Probe Colominsäure ergab einen Wert von 7,92 % (m/m). Im Vergleich mit den Ergebnissen der ICP-OES-Analyse wurde hier lediglich ein Anteil von 5,81 % (m/m) Natrium gemessen. Zusätzlich konnten noch 0,11 % (m/m) Calcium festgestellt werden. Das Produkt konnte durch den beschriebenen Aufarbeitungsprozess somit nicht als reines Natriumsalz isoliert werden. Ein signifikanter Anteil an weiteren Metallkationen konnte durch die Analyse ausgeschlossen werden. Möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich, ist die Vorlage des Produkts in seiner Säureform, da während der abschließenden Dialyse unter basischen Bedingungen gearbeitet wurde. Eine andere

Erklärung wäre, dass trotz der chromatographischen Trennung ein Teil des Cetavlon als Gegenkation von der Polysialinsäure mitgeschleppt wurde und auch durch die Dialyse nicht entfernt werden konnte.

Zusätzlich zu den allgemeinen Analysen wurde die dargestellte K1-polySia gesondert auf spezielle Verunreinigungen untersucht. Bereits in Kapitel 8.4 konnte gezeigt werden, dass durch die entwickelte Fällungssequenz die Proteinkonzentration in der Probe bis unter die Nachweisgrenze (<1 %) gesenkt werden konnte. Auch in den chromatographisch aufgereinigten Proben konnten im Bradford-Assay keine Proteine nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf DNA-Bestandteile ergab jedoch ein positives Ergebnis. Mittels fotometrischer Bestimmung bei 260 nm konnte ein Restanteil verunreinigende DNA selbst noch in der chromatographisch aufgereinigten K1-polySia festgestellt werden. Da es sich bei DNA, wie bei polySia, um ein hochmolekulares Makromolekül handelt, ist es wahrscheinlich, dass es Überschneidungen im Präzipitationsverhalten der beiden Verbindungen gibt. Eine übliche Separationsmethode für DNA ist zum Beispiel die Fällung mit 70 % Ethanol in Gegenwart von monovalenten Kationen [LOTTSPREICH F. et al., 2006]. Eine Verdauung und Abtrennung der DNA sollte durch den Zusatz einer katalytischen Menge DNase, entweder direkt zum Zellkulturüberstand oder aber vor der Ethanolfällung, erreicht werden. Den Beleg hierfür müssen weitere Untersuchungen zeigen.

K1-polySia, die nicht zusätzlich per Gelchromatographie aufgereinigt wurde, enthielt darüber hinaus einen Restanteil an Cetavlon, wie bereits in Kapitel 8.6.1 festgestellt wurde.

**Tabelle 9.3:** Vergleich der Ergebnisse der Kettenlängenbestimmung von kommerziell erhältlicher Colominsäure und K1-polySia mittels verschiedener Methoden. (DP=Polymerisationsgrad)

<b>Methode</b>	$\frac{\phi DP_{K1-polySia}}{\phi DP_{CA}}$	<b>max. DP<sub>K1-polySia</sub></b>	<b>max. DP<sub>CA</sub></b>
Gelelektrophorese	3-4	>100	60-70
Osmometrie	3,5	n.b.	n.b.
DMB-HPLC-FD	-	>130	70-80

Aussagen zur Kettenlängenzusammensetzung der K1-polySia konnten auf der Basis von drei verschiedenen Analysemethoden getroffen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 9.3 zusammengestellt. Mittels Osmometrie-Messungen war eine Bestimmung der relativen mittleren molaren Massen der kommerziell erhältlichen Colominsäure und der K1-polySia möglich, wobei sich zeigte, dass der Polymerisationsgrad der K1-polySia im Mittel um den Faktor 3,5 über der Colominsäure lag.

Durch die gelelektrophoretische Untersuchung konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Der Versuch erlaubte zwar keine hochaufgelöste Trennung der einzelnen Molekülketten, jedoch konnte ein Spektrum der Kettenlängenverteilung erkannt werden. Bei Annahme einer Gaussverteilung der unterschiedlichen Polymerisationsgrade ergab sich eine um den Faktor 3-4 höhere Kettenlänge für die K1-polySia. Der Vergleich mit einem speziellen Farbstoffmarkergemisch ließ darüber hinaus eine Absolutbestimmung der Kettenlängen zu. Während in der Colominsäure Polymere bis zu einer maximalen Länge von 60-70 Einheiten nachgewiesen wurden, enthielt die K1-polySia noch Moleküle mit mehr als 100 Einheiten. Das Auflösungsvermögen verhinderte hier genauere Aussagen.

Die detailliertesten Ergebnisse konnten durch eine chromatographische Trennung per HPLC erhalten werden. Die Methode erlaubte eine Auflösung der verschiedenen Polymere bis zu einer Kettenlänge von ca. 130 Einheiten. Die K1-polySia zeigte den Gehalt von Polymeren im gesamten Auflösungsbereich, während die Colominsäure Moleküle bis zu einer maximalen Länge von 70-80 Einheiten enthielt. Ein noch höheres Auflösungsvermögen verspricht die Analyse per MALDI-TOF [GALUSKA S.P. et al., 2007], welche hier jedoch nicht angewandt werden konnte.

## **10 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Entwicklung von biologischen Produktionsprozessen ist ein vielschichtiges Verfahren. Es vereint Themengebiete wie die Mikrobiologie, Biochemie, Zellkulturtechnik, Verfahrenstechnik, Bioinformatik und Analytik. Industrielle Prozessentwicklungen sind zudem stets auf individuelle behördliche Zulassungen angewiesen, was ein zusätzliches Arbeitsfeld schafft. „Universitäre“ Prozesse sind in mancher Hinsicht einfacher zu realisieren, da beispielsweise die Einhaltung von GMP-Richtlinien, wie es in der Industrie ein Muss ist, nicht zwingend vorgeschrieben und oft technisch auch nicht möglich ist. Durch die begrenzten Möglichkeiten hinsichtlich finanzieller oder materieller Aspekte kann sich eine freie Prozessauslegung jedoch auch als schwierig gestalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein „universitärer“ Herstellungsprozess zur Darstellung eines Polysaccharids, der humanidentischen Polysialinsäure (kurz polySia), vorgestellt. Polysialinsäure ist in menschlichen Nervenzellen mitverantwortlich für die Erhaltung des Migrations- und Proliferationsvermögen und wird deshalb als ein mögliches Gerüstmaterial für die in-vitro Kultivierung von Nervengewebe angesehen. Die Gewinnung dieser speziellen Polysialinsäure kann durch die Isolierung der strukturidentischen Oberflächenpolysaccharide von speziellen Bakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli* K1, erfolgen.

Der Prozessentwicklung voraus ging die Etablierung eines chemischen Tests zur quantitativen Analyse des Produkts. Dabei wurde ein bestehender Assay für die Bestimmung freier Sialinsäuren adaptiert und durch einen vorangestellten Hydrolyseschritt für die Polymerform modifiziert. Der entwickelte Test war gut geeignet für die relative Quantifizierung in verschiedenen realen chemischen Umgebungen (Kulturmedien). Eine absolute Produktbestimmung gestaltete sich jedoch als schwierig, da eine Diskrepanz zwischen den Polymermesswerten und der auf Sialinsäure basierenden Kalibrationsreihe bestand.

Im Rahmen der Prozessentwicklung wurden in Schüttelkolbenkultivierungen zunächst neun verschiedene *E.coli* K1 Wildtypen auf ihr polySia-Produktionsvermögen getes-

tet. Mit *E.coli* K1 B2032/82 wurde der für die Produktion scheinbar am besten geeignete Stamm ausgewählt.

Die Optimierung der polySia-Produktivität wurde klassisch auf dem mikrobiologischen Weg durch das Screening verschiedener Kultivierungsbedingungen in Schüttelkolbenkultivierungen vollzogen. Variiert wurden dabei vor allem das Substrat, die N-Quelle und der verwendete Puffer in einem ansonsten konstant zusammengesetzten synthetischen Wachstumsmedium. Qualitätsmerkmale des Mediums sollten dabei die Förderung der Produktbildung, eine möglichst einfache Zusammensetzung und Minimierung der Investitionskosten sein. Insgesamt wurden zwanzig Medien unterschiedlicher Zusammensetzung getestet und hinsichtlich der Kriterien bewertet. Herausragend war zum Einen das X/P(KPP)-Medium, welches die mit Abstand beste Produktausbeute, bei jedoch sehr hohen Kosten, erbrachte. Zum Anderen konnte die Polysialinsäure mit immer noch guten Ausbeuten sehr kostengünstig in G/A(KPP)-Medium produziert werden. Ein großes Problem der meisten Schüttelkolbenkultivierungen stellte die übermäßige Acetatproduktion aufgrund mangelhafter Sauerstoffversorgung dar.

Für weitergehende Untersuchungen wurden die Kultivierungen mit den zwei genannten Medien in den 2-L-Bioreaktormaßstab übertragen. Die Kultivierung in X/P(KPP)-Medium zeigt dabei ähnliche Ergebnisse wie zuvor im Schüttelkolben. Aufgrund des verbesserten Sauerstoffeintrags konnte die polySia-Produktion im G/A(KPP)-Medium gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben um 64 % gesteigert werden. Die Sauerstoffversorgung war trotzdem vor allem gegen Ende der Kultivierung nicht ausreichend und führte weiterhin zu einer Akkumulation von Acetat in der Kultur.

Da eine Erhöhung des Sauerstoffeintrags in der batch-Kultivierung technisch nicht möglich war, wurde für einen weiteren Optimierungsversuch die Kultivierungsstrategie umgestellt und eine Fermentation im fed-batch-Betrieb unter substratlimitierten Bedingungen durchgeführt. Die automatische Zufütterung des Nährmediums erfolgte hierbei durch eine computergesteuerte Feed-Pumpe. Grundlage des Steuerungsprogramms war ein einfaches, auf einer Monod-Kinetik basierendes Modell für das Bakterienwachstum, welches um einen Feed-Term erweitert wurde. Das Modell wurde durch die Einstellung verschiedener Wachstumsraten während der



Kultivierung validiert und ermöglichte eine zufrieden stellende Steuerung der Bakterienvermehrung. Durch die Substratlimitierung konnte aufgrund von Ungenauigkeiten in der Steuerung in diesem ersten Versuch zwar nicht die Acetatproduktion zurückgedrängt, aber die Produktion noch einmal um 61 % gesteigert werden. Eine bessere Umsetzung der Fed-batch-Strategie versprechen eine Optimierung des Wachstumsmodells und der Einsatz einer FIA-Anlage zur kontinuierlichen Überwachung der Substratkonzentration. Durch die erreichte Produktivitätssteigerung und die immer noch niedrigen Kosten wurde das G/A(KPP) dem X/P(KPP)-Medium im weiteren Verlauf vorgezogen.

Für die Produktion der Polysialinsäure wurde die *E.coli* K1-Kultivierung in G/A(KPP)-Medium auf den 10-L-Bioreaktormaßstab übertragen. Es zeigten sich dabei grundsätzlich ähnliche Ergebnisse wie im 2-L-Reaktor. Eine Akkumulation von Acetat konnte hier nicht beobachtet werden. In wiederholten Kultivierungen wurden typische Produktkonzentrationen zwischen 0,45 und 0,55 g/l erreicht. Durch Messung der polySia-Konzentration im Zentrifugationsüberstand konnte gezeigt werden, dass nach Abschluss des Bakterienwachstums bereits ca. 60 % des gebildeten Polysaccharids abgetrennt von den Zellen in Lösung vorlag.

Die Entwicklung des Downstreamprozesses erfolgte auf der Grundlage von existierenden Protokollen für die Aufarbeitung verschiedener Polysaccharide. Der Ausgangspunkt waren dabei die 10 Liter ausgewachsene *E.coli* K1-Kulturbrühe mit einem Gesamtgehalt von ca. 5 g polySia. Durch chemische und mechanische Zellaufschlussverfahren sowie Methoden zur gezielten enzymatischen Ablösung des Polysaccharids wurde versucht, den zellgebundenen Restanteil der Polysialinsäure freizusetzen. Bis auf zwei Ausnahmen blieben die Maßnahmen jedoch ohne Erfolg. Eine signifikante Erhöhung der polySia-Konzentration konnte lediglich bei der kombinierten Applikation von EDTA, Lysozym und Triton-X und nach einer basischen Hydrolyse bei pH 12 festgestellt werden. Der Ausbeutesteigerung stand jedoch der Eintrag von drei neuen Kontaminanten bzw. eine Viskositätssteigerung durch denaturierte Proteine gegenüber, die eine weitere Aufarbeitung erheblich erschwerten. Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten wurde auf eine Freisetzung des zellgebundenen Anteils der Polysialinsäure im Aufarbeitungsprozess verzichtet.

Für die Zellseparation wurden die Verfahren der kontinuierlichen Zentrifugation und der cross-flow Mikrofiltration miteinander verglichen. Durch die Zentrifugation gelang die vollständige Abtrennung der Bakterien bei nahezu verlustfreier Anreicherung des Produkts im Zellüberstand. Die cross-flow Filtration hingegen führte zu einer Akkumulation der Polysialinsäure im zellhaltigen Retentat. Die kontinuierliche Zentrifugation wurde als erster Schritt mit einer Produktausbeute von 50-70 % in den Downstreamprozess aufgenommen.

Für eine bessere Handhabung wurde der produktthaltige Kulturüberstand durch cross-flow Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Volumenverringerung ging einher mit einer unvermeidbaren Abreicherung von oligoSia-Molekülen. Typische Ausbeuten dieses Schritts lagen in einem Bereich von 74-80 %.

Eine gelchromatographische Aufreinigung des polySia-Konzentrats war an dieser Stelle noch nicht möglich, da eine Filtration zu einem hohen Produktverlust führte und sich im Chromatogramm Überschneidungen mit Kontaminanten zeigten. Auf der Basis von Vorversuchen mit Colominsäure wurde daher eine Fällungssequenz unter Verwendung verschiedener Präzipitationsmittel entwickelt, die zu einer Separation von Produkt und den enthaltenen Verunreinigungen führen sollte. Eine Sequenz, die eine nahezu vollständige Abreicherung kontaminierender Proteine bei einem Produkterhalt von 55-70 % ermöglichte, war die schrittweise Behandlung mit Aceton, Cetavlon und Ethanol. Begleitend konnte eine weitere Volumenreduktion erreicht werden.

Als Erweiterung zur Produktaufreinigung wurde ein gelchromatographischer Schritt mit in den Downstreamprozess aufgenommen. Dieser diente vor allem der Entfernung von Rückständen der Fällungsmittel, besonders des Cetavlons. Die Polysialinsäure wurde in fast vollem Umfang (95-100 %) wiedergewonnen. Wie das Chromatogramm zeigte, konnte ein kleiner Rest von Kontaminanten mit identischer Laufzeit wie das Produkt, trotz aller Maßnahmen nicht entfernt werden. Spätere Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um Reste des Lipidankers, sowie DNA handelte. Während gezeigt werden konnte, dass der Lipidanker labil für eine Behandlung mit Phospholipase war, wurde kein entsprechender Versuch für die Entfernung der DNA durchgeführt.

Am Ende des Downstreamprozesses stand eine Entsalzung der polySia-Lösung durch Dialyse. Gleichzeitig fand eine weitere Abreicherung von oligoSia-Molekülen um 5-18 % statt. Für eine Entfernung von Cetavlonresten war die Methode nicht geeignet. Die Polysialinsäure konnte anschließend durch Gefriertrocknung vollständig als weißer watteartiger Feststoff aus der Lösung abgeschieden werden. REM-Aufnahmen zeigten eine faserförmige Mikrostruktur des Produkts.

Mit dem vorgestellten Produktionsprozess war eine Darstellung von 0,8-2 g Polysialinsäure möglich. Die Gesamtausbeute am Ende der Aufreinigung betrug 17-37 %. Das fertige polySia in fester Form wurde nach Abschluss des Downstreamprozesses durch verschiedene Methoden charakterisiert. Qualitätsmerkmale waren dabei eine hohe Produktreinheit und ein hoher Polymerisationsgrad. Das Produkt konnte im IR-, sowie im  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum, durch den Vergleich mit kommerziell erhältlicher Colominsäure eindeutig als Polymer der 5-N-Acetylneuraminsäure identifiziert werden. Die Abwesenheit zusätzlicher Banden in den NMR-Spektren belegt eine hohe Produktreinheit bezüglich kohlen- und wasserstoffhaltigen Verbindungen. Die Bestimmung der ionischen Zusammensetzung der K1-polySia ergab, dass das Produkt nicht wie erwartet als reines Natriumsalz nach der Aufarbeitung vorlag. Neben einem kleinen Anteil von Calcium ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des Cetavlons (Cetyltrimethylammonium) mit durch den Aufarbeitungsprozess geschleppt wurde.

Durch eine gezielte Analytik wurde das Produkt auf verunreinigende Proteine und DNA untersucht. Während die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests lag, konnte durch eine fotometrische Analyse eindeutig ein unerwünschter Restanteil von DNA in der Probe nachgewiesen werden.

Für die Beurteilung der Kettenlängenverteilung wurden drei verschiedene Verfahren herangezogen. Alle drei Methoden ergänzten sich zu einer einheitlichen Aussage. Durch elektrophoretische Aufspaltung in einem Polyacrylamidgel konnten polySia-Ketten im Produkt bis zu einer Länge von über 100 Einheiten nachgewiesen werden. Eine spezielle HPLC-Analytik mit Fluoreszenzdetektion erlaubte eine hohe Auflösung bis zu einer Kettenlänge von 130 Einheiten. Bestandteile der isolierten K1-polySia konnten dabei im gesamten Spektrum nachgewiesen werden. Durch osmometrische Messungen konnte ein relativer Vergleich der mittleren Kettenlänge zu der

kommerziell erhältlichen Colominsäure vollzogen werden. Der Faktor lag bei 3,5 zugunsten der K1-polySia.

Als mögliche Optimierungsansätze und Erweiterungen des erarbeiteten Produktionsprozesses können folgende Punkte in zukünftigen Arbeiten in Erwägung gezogen werden. Als Alternative zum mikrobiologischen Screening wäre eine Produktivitätssteigerung auf dem modernen molekularbiologischen Weg durch gentechnische Modifizierung der Bakterien möglich. Bei der biosynthetischen Produktion selbst verspricht besonders eine konsequente Weiterentwicklung der fed-batch-Strategie Erfolge in der Prozessoptimierung. Der Downstreamprozess kann in erster Linie durch die Entwicklung einer praktikablen Methode zur gezielten Freisetzung der zellgebundenen Polysialinsäure optimiert werden. Weiteres Potential bietet die Anwendung der Membranadsorbertechnologie bei der Aufreinigung des Produkts. Grundlegend muss der Aufarbeitungsprozess aber um einen Schritt zum DNA-Abbau erweitert werden, da diese mit den beschriebenen Methoden nicht rückstandsfrei abgereichert werden konnte.

# Anhang

## 11 Material und Methoden

Das folgende Kapitel beinhaltet eine Übersicht und Beschreibung von allen in der vorliegenden Arbeit benutzten Geräten, Materialien und Methoden.

### 11.1 *Escherichia coli* K1-Stämme

Informationen zu den verwendeten Stämme und ihrer Lagerung sind im nächsten Abschnitt zu finden.

#### 11.1.1 Stammbeschreibung

Bei den verwendeten neun *Escherichia coli* K1 Stämmen handelte es sich ausschließlich um klinisch isolierte Wildtypen.

Acht in der Tabelle 11.1 aufgeführte Stämme mit der Bezeichnung  $\delta$ [Nummer] stammten aus der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg. Bei allen Stämmen wurde eine so genannte Multilokus Sequenztypisierung durchgeführt. Hierbei wurden die Sequenzunterschiede in sieben *house keeping* Genen (*adk*, *fumC*, *GyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA*) bestimmt, um darüber Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Stämmen machen zu können. Stämme mit dem gleichen Sequenztyp (ST) sind dabei eng verwandt.

Über den neunten Stamm mit der Bezeichnung B2032/82 sind keine weiteren Einzelheiten bekannt.

**Tabelle 11.1:** Liste verschiedener *E.coli* K1-Stämme und deren Verwandtschaftsbeziehung durch Sequenztypisierung (ST) von sieben *house keeping* Genen. Angegeben ist außerdem die Isolierungsquelle.

Stamm	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST	Quelle
δ 63	10	11	4	8	8	8	2	10	Stuhl
δ 17	27	32	24	29	26	19	22	59	Stuhl
δ 41	27	32	24	29	26	19	22	59	Urin
δ 33	28	33	25	29	7	11	24	62	Stuhl
δ 16	13	24	19	14	23	1	10	80	Cervix
δ 25	13	52	10	14	17	25	17	141	Urin
δ 3	13	52	10	14	17	25	17	141	Stuhl
δ 28	13	43	9	36	30	44	25	144	Urin

### 11.1.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung aller verwendeten *Escherichia coli* K1-Stämme erfolgte in Kryokulturen bei -80 °C. Die Bakterien wurden in einem Schüttelkolben mit LB-Medium (ohne Glucosezusatz) bis zum Ende des exponentiellen Wachstums kultiviert und für die Lagerung mit Glycerin in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

## 11.2 Kulturmedien

Die im Folgenden beschriebenen Medien kamen während aller Kultivierungen im Schüttelkolben und im Bioreaktor zum Einsatz.

### 11.2.1 Komplexmedien

Das benutzte Komplexmedium war ein Standard-LB-Medium zur Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien (Tabelle 11.2).

**Tabelle 11.2:** Zusammensetzung des verwendeten Komplexmediums.

<b>LB-Medium</b>	
Hefeextrakt	10 g/L
Trypton	10 g/L
NaCl	1 g/L
Glucose	variabel

### 11.2.2 Synthetische Medien

Die synthetischen Medien setzen sich aus vier Komponenten zusammen. Einem identischen Basismedium, welches Salze und Spurenelemente enthielt (Tabelle 11.3) und drei Zusätzen in Form von verschiedenen Puffern (Tabelle 11.4), Substraten (Tabelle 11.5) und N-Quellen (Tabelle 11.6).

**Tabelle 11.3:** Basiszusammensetzung der synthetischen Medien.

<b>Basismedium</b>			
Salze		Spurenelemente	
NaCl	1,2 g/L	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,15 g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,1 g/L	FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,001 g/L
		CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,001 g/L
		CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,013 g/L

Tabelle 11.4: Verschiedene Pufferzusätze der synthetischen Medien.

<b>Puffer</b>		
	Abk.	Konz.
$K_2HPO_4/KH_2PO_4$	(KPP)	variabel
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure/NaOH	(HEPES)	variabel
3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure/NaOH	(MOPS)	variabel
HCl/Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	(TRIS)	variabel

Tabelle 11.5: Verschiedene Substratzusätze der synthetischen Medien.

<b>Substrat</b>		
	Abk.	Konz.
Glucose•H <sub>2</sub> O	(G)	variabel
Xylose	(X)	variabel
Sorbitol	(S)	17 g/L
Mannose	(M)	16,8 g/L

Tabelle 11.6: Verschiedene Zusätze von N-Quellen der synthetischen Medien.

<b>Stickstoffquelle</b>		
	Abk.	Konz.
$(NH_4)_2SO_4$	(A)	10 g/L
L-Prolin	(P)	variabel
Na-Glutamat	(G)	28,8 g/L



### **11.3 Bioreaktoren und Komponenten**

Die verwendeten Bioreaktorsysteme setzen sich aus dem Reaktorkessel mit eigener angebundener Steuereinheit, einem Abgasanalysator sowie einem Computerterminal zur Datenaufzeichnung zusammen.

#### **11.3.1 Biostat B**

Der Biostat B ist ein System bestehend aus 2-L-Edelstahlreaktor (Arbeitsvolumen) mit Steuereinheit (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, ehemals B. BRAUN Biotech International). Der Kessel ist mittels eines äußeren Mantels temperierbar und besitzt drei Standard-25-mm-Ports für den Anschluss externer Geräte. Im Deckel eingelassen sind sechs Zu- bzw. Ableitungen für Korrekturmittelflüssigkeiten, Feed, Begasung und Probenahme. Weiterhin sind zwei Standard-13,5-mm-Ports für die Installation von Messsonden wie pH-Einstabmesskette, Gelöstsauerstoffelektrode und Thermoelement vorhanden. Die Begasung findet am Reaktorboden durch einen Verteilerring statt. Das Rührwerk besteht aus drei an der Achse übereinander angebrachten Blattrührern. Die Abluft wird über einen am Deckel montierten Kühler abgeleitet. Der Reaktor ist in einem Autoklaven vollständig sterilisierbar.



**Abbildung 11.1:** Bioreaktorsystem Biostat B (Kessel und Steuereinheit).

Die Steuereinheit verarbeitet die Eingangssignale der Messsonden und regelt danach den pH-Wert (Pumpwerk mit Korrekturmittelflaschen), den Gelöstsauerstoff (Änderung der Rührgeschwindigkeit) und die Temperatur (integriertes Thermostat) vollautomatisch. Alle Messdaten werden darüber hinaus zur Aufzeichnung an ein Computersystem (RISP) weitergegeben (siehe Kapitel 11.3.4).

Ein Bild des Reaktorsystems ist in Abbildung 11.1 zu finden.

### **11.3.2 Biostat C**

Der Biostat C ist ein System bestehend aus 10-L-Edelstahlreaktor (Arbeitsvolumen) mit Steuereinheit (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, ehemals B. BRAUN Biotech International). Der Kessel ist mittels eines äußeren Mantels temperierbar und besitzt acht Standard-25-mm-Ports für den Anschluss externer Geräte und Messsonden wie pH-Einstabmesskette, Gelöstsauerstoffelektrode und Thermoelement. Im Deckel eingelassen sind drei Standard-19-mm-Ports für den Anschluss von Zu- bzw. Ableitungen (z.B. Korrekturmittelflüssigkeiten). Die Begasung findet am Reaktorboden durch einen Verteilerring statt. Das Rührwerk besteht aus drei an der Achse übereinander angebrachten Blattrührern. Die Abluft wird über einen am Deckel montierten Kühler abgeleitet. Die Probenahme kann mittels eines sterilisierbaren Ventils am Reaktorboden vorgenommen werden. Der fest installierte Reaktor ist vollständig in-place-sterilisierbar.

Die Steuereinheit verarbeitet die Eingangssignale der Messsonden und regelt danach den pH-Wert (Pumpwerk mit Korrekturmittelflaschen), den Gelöstsauerstoff (Änderung der Rührgeschwindigkeit) und die Temperatur (integriertes Thermostat) vollautomatisch. Alle Messdaten werden darüber hinaus zur Aufzeichnung an ein Computersystem (RISP) weitergegeben (siehe Kapitel 11.3.4).

Ein Bild des Reaktors ist in Abbildung 11.2 zu finden.



Abbildung 11.2: Bioreaktorsystem Biostat C (Kessel und Steuereinheit).

### 11.3.3 Abgasanalytik und respiratorischer Quotient

Der verwendete Abgasanalysator war vom Typ S 710 Modular System (Sick Maihak, Waldkirch). Gemessen wurde der prozentuale Anteil an Sauerstoff und Kohlendioxid im Reaktorabgas. Die Messung des Sauerstoffs erfolgte mittels einer elektrochemischen Zelle. Das Kohlendioxid wurde spektroskopisch durch IR-Absorption charakteristischer Wellenlängen detektiert.

Aus den Abgaswerten der Kultivierungen wurde unter Einbeziehung der Begasungsrate und des Arbeitsvolumens der respiratorische Quotient (RQ) berechnet:

$$RQ = \frac{CPR}{OUR}$$

$$OUR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{O_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{O_2}^A \right\}$$

$$CPR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{CO_2}^A \cdot \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} - x_{CO_2}^E \right\}$$

OUR: Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen uptake rate)

CPR: Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (carbon dioxide production rate)

$f_E$ : Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]

$V_M$ : Molvolumen des idealen Gases (22,41 L/mol)

$V_R$ : Arbeitsvolumen [L]

$x_{O_2}^E$ : Molenbruch von O<sub>2</sub> im Gaseintritt

$x_{O_2}^A$ : Molenbruch von O<sub>2</sub> im Gasaustritt

$x_{CO_2}^E$ : Molenbruch von CO<sub>2</sub> im Gaseintritt

$x_{CO_2}^A$ : Molenbruch von CO<sub>2</sub> im Gasaustritt

### 11.3.4 Datenaufzeichnung

Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mittels der hauseigenen Software RISP (realtime integrating software platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover). Aufgenommen wurden die Reaktortemperatur, der pH-Wert, die Rührerdrehzahl, der pO<sub>2</sub>-Wert und der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas.

## 11.4 Analytik

Folgende Protokolle wurden zur Analyse und Quantifizierung der angegebenen Parameter verwendet.

**11.4.1 Optische Dichte**

Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde an einem Zweistrahlphotometer (UVICON 922, Kontron Instruments, heute Tresser Instruments, Groß-Zimmern) bei 580 nm gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung gemessen. Bei Bedarf wurde die Probe mit der Referenzlösung in geeigneten Verhältnissen verdünnt.

**11.4.2 Glucose**

Die Glucosebestimmungen erfolgten am YSI-Analysator (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA) durch enzymatische Spaltung mit Glucoseoxidase und anschließender potentiometrischer Detektion.

**11.4.3 Ethanol**

Die Messung des Ethanolgehalts erfolgte am Gaschromatographen GC-14 b (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit einer Chromosorb 101-Säule (Advanced Minerals Corporation, Santa Barbara, USA) und Flammanionisationsdetektor. Als interner Standard wurden 8 g/L n-Propanol zugesetzt. Die Laufzeit betrug 10 min bei einem Einspritzvolumen von 0,5 µL.

**11.4.4 (Poly-)Sialinsäure (TBA-Assay)**

Der im Folgenden beschriebene TBA-Assay zur Quantifizierung von Sialinsäurederivaten ist gültig innerhalb der Nachweisgrenzen von 10 mg/L bis 1 g/L 5-N-Acetylneuraminsäure. Tabelle 11.7 zeigt das Protokoll für die Färbung von (poly-)sialinhaltigen Lösungen in Mikroreaktionsgefäßen. Die Schritte „Hydrolyse“ und „Neutralisation“ entfallen bei Vorlage von reinen Monomerlösungen.

**Tabelle 11.7:** Protokoll des TBA-Assays zur Quantifizierung von (Poly-)Sialinsäuren.

<b>TBA-Assay</b>				
Schritt	Lösung/Behandlung	Volumen	Temperatur	Dauer
	Probe	50 µL (0,01-1 g/L Neu5Ac)		
Hydrolyse	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	200 µL	70 °C	18 h
Neutralis.	NaOH	100 µL	RT	-
Oxidation	Oxidationslsg.	100 µL	37 °C	30 min
Reduktion	Reduktionslsg.	500 µL	RT	bis zur Auflösung der Braunfärbung
Färbung	TBA-Lösung	500 µL	95 °C	15 min
Kühlung	Wasserbad		ca. 20 °C	5 min

Die angefärbten Lösungen wurden zur Erhöhung der Quantenausbeute am Ende des Protokolls mit Cyclohexanon extrahiert (700 µL Cyclohexanon für 400 µL wässrige Farbstofflösung). Die Messung der Extinktion wurde am Fotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Labsystems, Waltham, USA) bei 549 nm gegen reines Cyclohexanon durchgeführt.

Die Zusammensetzungen und Konzentrationen der verwendeten Lösungen und Reagenzien sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 11.8:** Konzentrationen der verwendeten Reagenzien zur Hydrolyse von Polysialinsäure bei verschiedenen Puffermolaritäten.

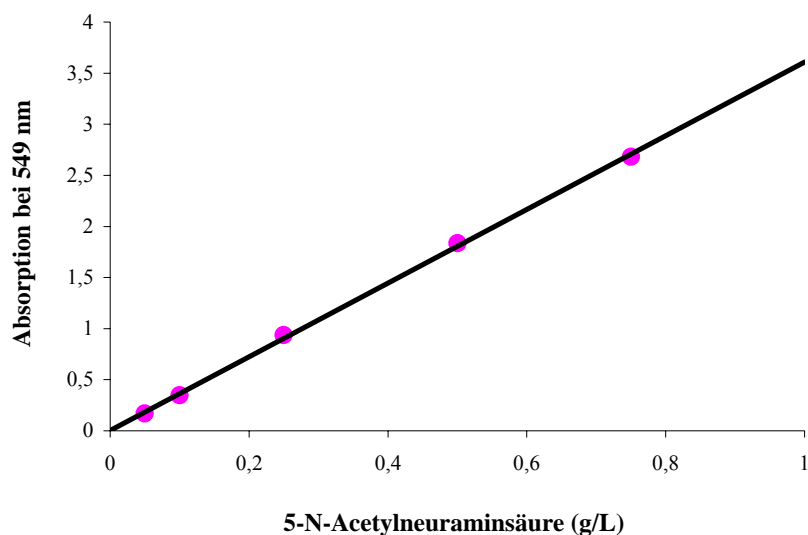
<b>Hydrolyse und Neutralisation</b>		
Pufferkonz.	0-0,1 M	0,1-1 M
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 mol/L	0,3 mol/L
NaOH	0,1 mol/L	0,6 mol/L

**Tabelle 11.9:** Zusammensetzung der Oxidations- und Reduktionslösung für den TBA-Assay.

Oxidationslösung		Reduktionslösung	
Periodsäure	0,2 mol/L	Natrium(meta)arsenit	0,385 mol/L
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,051 mol/L	Natriumsulfat	0,5 mol/L
gelöst in Wasser		Schwefelsäure	0,2 mol/L
		gelöst in Wasser	

**Tabelle 11.10:** Zusammensetzung der TBA-Lösung für den TBA-Assay.

TBA-Lösung	
2-Thiobarbitursäure	0,208 mol/L
Natriumhydroxid	0,3 mol/L
gelöst in Wasser	

**Abbildung 11.3:** Kalibrationsgerade von 0,05-0,75 g/L 5-N-Acetylneuraminsäure zur Bestimmung von (Poly-)Sialinsäurekonzentrationen.

Die Quantifizierung der untersuchten Proben wurde durch Vergleich mit einer auf 5-N-Acetylneuraminsäure basierenden Kalibrationsgeraden im Konzentrationsbereich von 0,05-0,75 g/L erreicht (Abbildung 11.3). Bei der Anwendung auf Polysialinsäuren

muss die bei der Hydrolyse auftretende Massenänderung des Substrats sowie die Masse der salzbildenden Kationen berücksichtigt werden.

#### 11.4.5 Proteine (Bradford-Assay)

Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit photometrisch nach Bradford bestimmt [BRADFORD M.M., 1976]. Das in Tabelle 11.11 angegebene Protokoll ist ausgelegt für 350  $\mu\text{L}$  Mikrotiterplatten.

**Tabelle 11.11:** Bradford-Assay zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen.

<b>Bradford-Assay</b>				
Schritt	Lösung/Behandlung	Volumen	Temperatur	Dauer
	Probe	10 $\mu\text{L}$ (10-1.000 mg/L Protein)		
Färbung	Bradford-Reagenz	300 $\mu\text{L}$	RT	10 min

Die anschließende Absorptionsmessung bei 595 nm erfolgte am Fotometer.

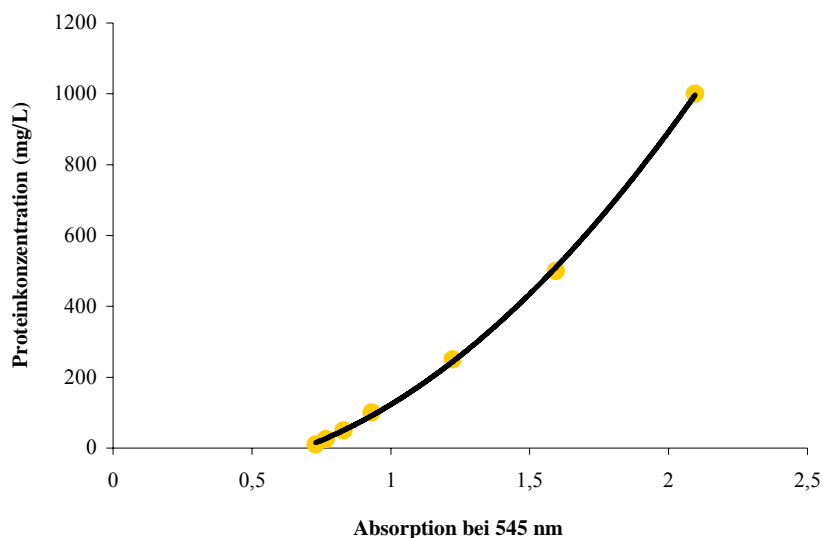
Die Zusammensetzung des Bradford-Reagenz ist in Tabelle 11.12 angegeben.

**Tabelle 11.12:** Zusammensetzung des Bradford-Reagenz.

<b>Bradford-Reagenz</b>	
Coomassie-Brillant-Blau	0,1 g/L
Ethanol (95 %)	50 mL/L
Phosphorsäure (85 %)	100 mL/L
gelöst in Wasser	

Zur Quantifizierung wurden die Messergebnisse mit einer Kalibrationsreihe basierend auf BSA im Bereich von 10-1.000 mg/L verglichen.





**Abbildung 11.4:** Kalibrationsreihe von 10-1.000 mg/L BSA zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen.

#### 11.4.6 Prolin

Prolin wurde durch die Bildung eines farbigen Komplexes mit Ninhydrin detektiert [IFU, 1983]. Das in Tabelle 11.13 angegebene Protokoll für Mikroreaktionsgefäße ist gültig in einem Bereich von 10-100 mg/L Prolin.

**Tabelle 11.13:** Assay zur Bestimmung von Prolinkonzentrationen.

<b>TBA-Assay</b>				
Schritt	Lösung/Behandlung	Volumen	Temperatur	Dauer
	Probe	100 $\mu$ L (10-100 mg/L Prolin)		
ansäuern	Ameisensäure	100 $\mu$ L	RT	-
Färbung	Ninhydrin-Lsg.	200 $\mu$ L	99 $^{\circ}$ C	15 min
Kühlung	Wasserbad		ca. 20 $^{\circ}$ C	8 min

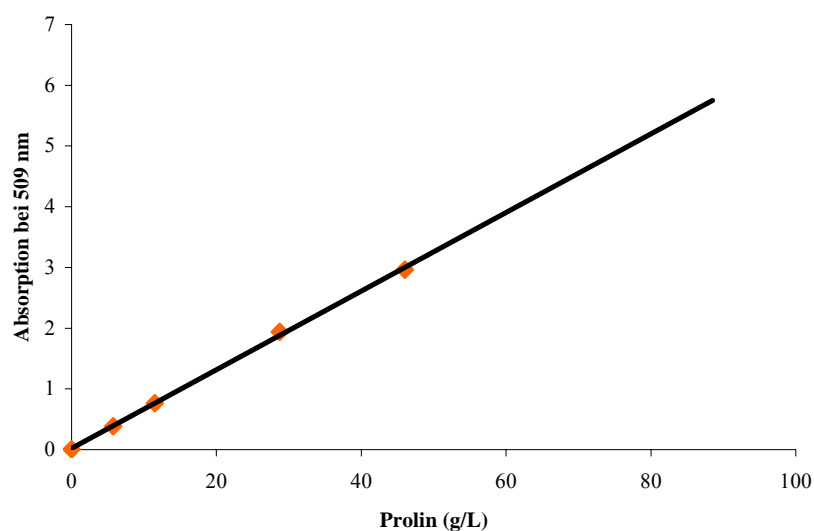
Der gebildete rote Farbstoff wurde im Anschluss an die Reaktion mit 1 mL n-Butylacetat extrahiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 509 nm am Photometer gegen reines n-Butylacetat.

Die Zusammensetzung der verwendeten Ninhydrin-Lösung ist in Tabelle 11.14 angegeben.

**Tabelle 11.14:** Zusammensetzung der Ninhydrin-Lösung zur Prolinbestimmung.

Ninhydrin-Lösung	
Ninhydrin	30 g/L
gelöst in 2-Methoxyethanol	

Zur Quantifizierung wurden die Ergebnisse mit einer Prolin-Kalibrationsreihe im Bereich von 0-57,5 mg/L verglichen (Abbildung 11.5).



**Abbildung 11.5:** Kalibrationsgerade von 0-57,5 mg/L Prolin zur Bestimmung von Prolinkonzentrationen.

## 11.5 Methoden

Im nachfolgenden Kapitel werden Methoden skizziert die während des Downstream processing und der Produktbeschreibung zum Einsatz kamen.

### 11.5.1 Gelchromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine HiPrep™ 26/60 Sephacryl S-300 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) an einer BioLogic FPLC-Anlage Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verwendet. Die Säule besitzt ein Auflösungsvermögen bei Dextranen von  $2 \times 10^3$ - $4 \times 10^5$  Da (zum Vergleich: polySia<sub>(DP 150)</sub>  $\approx 4 \times 10^4$  Da). Vor dem Lauf wurde die Säule mit einem Säulenvolumen (320 mL) Laufpuffer (0,5 M NaPP) equilibriert. Nach der Produktaufgabe (<13 mL) wurden die Läufe bei einer Flussrate von 1,3 mL/min durchgeführt. Fraktionen wurden im Bereich von 1-3,5 h gesammelt.

### 11.5.2 Dialyse

Die Dialyse wurde in Celluloseacetat-Schlauchmembranen „Visking“ (Carl Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Zur Vorbereitung und Reinigung wurden die Schläuche geeigneter Länge je zweimal 10 min in 2 % NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (+ 1 mM Na-EDTA) gekocht und anschließend gründlich gespült.

**Tabelle 11.15:** Dialyse zur Entsalzung von aufgereinigter K1-polySia.

<b>Dialyse</b>			
Gang	Dialyse gegen	pH	Dauer
1	2 M NaCl-Lsg.	9	24 h
2 + 3	dest. Wasser	9	24 h

Das Dialysevolumen betrug 5 L und war damit um den Faktor 50 größer als das Probenvolumen. Der gesamte Dialysevorgang, bestehend aus drei Gängen, ist in

Tabelle 11.15 beschrieben. Der pH-Wert von 9 wurde durch Zugabe von 20  $\mu$ L 10 % NaOH-Lösung eingestellt.

### 11.5.3 ICP-OES

Die Bestimmung der Metallkationenkonzentrationen wurde am Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Für die ICP-OES-Messungen wurden etwa 30-40 mg der Proben mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,1$  mg eingewogen und rückstandsfrei in 60 mL 2 % salpetersaurem Reinstwasser gelöst. Am ICP-Autoemissionsspektrometer (Spectro, Analytical Instruments GmbH & Co. KG, Kleve) wurden zunächst passende Linien der zu untersuchenden Elemente bestimmt, welche in Tabelle 11.16 zusammengestellt sind.

**Tabelle 11.16:** Analytlinien der untersuchten Metallionen in aufgereinigter K1-polySia.

<b>Analyt</b>	<b>1. Analytlinie (nm)</b>	<b>2. Analytlinie (nm)</b>
Na	589,95	-
Ca	315,89	396,85
K	766,49	-
Kg	280,27	285,21
Fe	259,94	-
Cu	324,75	327,4

Die Quantifizierung der einzelnen Metalle wurde durch Vergleich mit verschiedenen Kalibrationsgeraden im jeweiligen geschätzten Konzentrationsbereich erreicht.

### 11.5.4 DMB-HPLC-FD

Die Kettenlängenbestimmungen per DMB-HPLC wurden am Institut für Biochemie der Universität Gießen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die polySia-Proben

nach dem Protokoll in Tabelle 11.17 mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol markiert.

**Tabelle 11.17:** Protokoll zur DMB-Markierung von polySia.

<b>DMB-Markierung von polySia</b>				
Schritt	Lösung/Behandlung	Volumen	Temperatur	Dauer
	Probe		50 µg polySia	
Färbung	DMB-Reagenz	80 µL	4 °C	24 h
Abbruch	1M NaOH.	20 µL	-	-

Die Zusammensetzung des DMB-Reagenz ist in Tabelle 11.18 zu finden.

**Tabelle 11.18:** DMB-Reagenz zur Markierung von polySia für die HPLC-FD-Analyse.

<b>DMB-Reagenz</b>	
DMB	2,7 mol/L
NaHSO <sub>3</sub>	9 mmol/L
β-Mercaptoethanol	0,5 mol/L
gelöst in Wasser	

Die Trennung wurde mit einem Aliquot DMB-polySia (25 µg) auf einer DNAPac PA-100 Säule (Dionex, Idstein) mit einer LKB HPLC-Anlage (Pfizer Pharma GmbH (ehemals Pharmacia), Karlsruhe) durchgeführt. Als Laufmittel wurden MilliQ-Wasser (Millipore, Eschborn) und 4 M Ammoniumacetat-Lsg. benutzt bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min benutzt [NAKATA D. et al., 2005]. Der Fluoreszenzdetektor (Jasco FP-1520, Groß-Umstadt) wurde auf eine Wellenlängenkombination von ex/em 372/456 nm eingestellt. Das gefahrene Gradientenprofil ist in Tabelle 11.19 zu finden.

**Tabelle 11.19:** Gradientenprofil für die DMB-HPLC-FD-Analyse von Polysialinsäure auf einer DNAPac PA-100 Säule.

Zeit	MilliQ-Wasser (v/v)	1 M NH <sub>4</sub> Ac-Lsg. (v/v)
0 min	100 %	0 %
5 min	100 %	0 %
15 min	90 %	10 %
20 min	87 %	13 %
35 min	83 %	17 %
55 min	80 %	20 %
100 min	74 %	26 %
180 min	70 %	30 %

### 11.5.5 Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretischen Untersuchungen der Polysialinsäure wurde ein 25 % Polyacrylamidgel mit einem vorgelagerten 6 % Sammelgel verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele kann der Tabelle 11.20 entnommen werden. Die Elektrophorese selber wurde mit einem Vertical Gel Caster (Amersham Biosciences, heute GE Healthcare, München) in TBE-Puffer (siehe Tabelle 11.21) nach der Methode von Pelkonen et al. durchgeführt [PELKONEN S. et al., 1988].

Die aufzugebenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Auftragspuffer (2 mol/L Sucrose in 10× TBE-Puffer) gemischt und jeweils 10 µL in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Vorlaufzeit betrug 1 h bei 30 V (12 V/cm), die eigentliche Elektrophoresedauer anschließend 75-90 min bei 210 V (35 V/cm).

Tabelle 11.20: Zusammensetzung der PAA-Gele für die Polysaccharid-Gelelektrophorese.

<b>Gelzusammensetzung</b>		
	Sammelgel (6 %)	Trenngel (25 %)
Acrylamid (40 %)	14,9 %	62 %
Bisacrylamid (2 %)	2,4 %	10 %
TBE-Puffer (10×)	10 %	10 %
Wasser	72,7 %	18 %
Start der Polymerisation durch	62,5 µL 10 % APS-Lsg. 12,5 µL TEMED	

Tabelle 11.21: Zusammensetzung des TBE-Puffers (10× konzentriert).

<b>TBE-Puffer (10×)</b>	
TRIS	118,7 g/L
Borsäure	60,6 g/L
Na-EDTA · 2H <sub>2</sub> O	7,4 g/L
gelöst in Wasser	

Die Visualisierung der Polysaccharide wurde nach Min und Cowman durch eine kombinierte Alcianblau-/Silberfärbung erreicht [MIN H. et al., 1986]. Das Protokoll hierzu ist in Tabelle 11.22 angeführt.

**Tabelle 11.22:** Protokoll zur kombinierten Alcianblau-/Silberfärbung von Polysacchariden in Elektrophoresegelelen.

<b>Färbeprotokoll</b>		
Behandlung	Dauer	Wiederholungen
<b>Alcianblaufixierung</b>		
Alcianblau	30 min	
Waschschrift	30 min	3×
Fixierlösung	45 min	
<b>Silberfärbung</b>		
Periodsäurelösung	5 min	
Waschschrift	15 min	3×
Silbernitratlösung	10 min	
Waschschrift	10 min	3×
Entwicklerlösung	1-3 min	
Essigsäure	5 min	
Trocknerlösung	zur Lagerung	

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in den folgenden Tabellen zu finden.

**Tabelle 11.23:** Zusammensetzung der Lösungen für die Alcianblaufixierung von Polysacchariden in Elektrophoresegelelen.

<b>Lösungen für Alcianblaufixierung</b>			
Alcianblaulösung		Fixierlösung	
Alcianblau	5 g/L	Ethanol	400 g/L
gelöst in Wasser		Essigsäure	50 g/L
		gelöst in Wasser	



**Tabelle 11.24:** Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung von Polysacchariden in Elektrophoresegelelen (Teil I).

<b>Lösungen für Silberfärbung (I)</b>			
Periodsäurelösung		Silbernitratlösung	
Periodsäure	7 g/L	Silbernitrat	6 g/L
gelöst in Fixierlösung		Ammoniak (25 %)	50 g/L
		NaOH	0,02 mol/L
		gelöst in Wasser	

**Tabelle 11.25:** Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung von Polysacchariden in Elektrophoresegelelen (Teil II).

<b>Lösungen für Silberfärbung (II)</b>			
Entwicklerlösung		Trocknerlösung	
Zitronensäure	7 g/L	Glycerin	6 g/L
Formaldehyd (37 %)	1,35 mL/L	Ethanol	50 g/L
gelöst in Wasser		gelöst in Wasser	

### 11.5.6 Osmometrie-Messungen

Die Bestimmung der mittleren molekularen Masse der dargestellten K1-polySia wurde am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. (DIK) durchgeführt.

## 12 Abkürzungen

$\mu$	Wachstumsrate	FPLC	Fast protein liquid chromatography
$\mu_{\max}$	maximale Wachstumsrate		
A	Ammoniumsulfat (im Medium)	Fru-6-P	Fructose-6-Phosphat
ABC	ATP-binding cassette	G	Glucose bzw. Glutamat (im Medium)
ABD	ATP-bindende Domäne	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Ac.	Acetat	GlcNH <sub>2</sub>	Glucosamin
APS	Ammoniumpersulfat	Gln	Glutamin
ATP	Adenosintriphosphat	GMP	good manufacturing practice
BG	Bestimmungsgrenze	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin	HPLC	High performance liquid chromatography
BTM	Biotrockenmasse		
CA	Colominsäure	ICP-OES	Inductive coupled plasma - optical emission spectroscopy
Cetavlon	Hexadecyltrimethylammoniumbromid	IR	Infrarot
CMP	Cytidinmonophosphat	K1-polySia	polySia isoliert aus <i>E.coli</i> K1
CoA	Coenzym A	Kdn	5-Deamino-3,5-dideoxyneuraminsäure
CPR	Kohlenstoffproduktionsrate	KDO	Ketodesoxyoctulosonsäure
CTP	Cytidintriphosphat	K <sub>M</sub>	Monod-Konstante
DIK	Deutsches Institut für Kautschuktechnologie	KPP	Kaliumphosphatpuffer
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol	LPS	Lipopolysaccharid
DNA	Desoxyribonucleinsäure	M	Mannose (im Medium)
DP	Polymerisationsgrad	MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight
DRIFT	diffuse Reflexionsmessung		
E.	Einheiten	ManNAc	N-Acetylmannosamin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MOPS	3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MWCO	molecular weight cut-off
em	Emission	n.b.	nicht bestimmbar
ex	Extinktion	NAD <sup>+</sup>	Nicotinamin-Adenin-Dinucleotid
FD	Fluoreszenzdetektion		
f <sub>E</sub>	Volumenstrom des eintretenden Gases		
FIA	Fließinjektionsanalyse		

NADH	Nicotinamin-Adenin- Dinucleotid (reduzierte Form)	SA	Sialinsäure
		Sia	Sialinsäure
		ST	Sequenztyp
NaPP	Natriumphosphatpuffer	Subs.	Substrat
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül	TBA	Thiobarbitursäure
		TBE-Puffer	Puffer aus TRIS, Borsäure und EDTA
Neu5Ac	5-N-Acetylneuraminsäure		
Neu5Gc	5-N-Glycolylneuraminsäure	TEMED	Tetramethylethyldiamin
NmB	<i>Neisseria meningitidis</i> B	TMD	Transmembrane Domäne
NMR	Kernspinresonanz	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
OD	optische Dichte		
oligoSia	Oligosialinsäure	UDP	Uridindiphosphat
OUR	Sauerstoffaufnahme	UV	Ultraviolett
P	L-Prolin (im Medium) Produkt (in Formel)	$V_{\text{feed}}$	Fütterungsrate
		$V_M$	Molvolumen des idealen Gases
PAA	Polyacrylamid		
PEG	Polyethylenglycol	VR	Arbeitsvolumen
PEP	Phosphoenolpyruvat	X	Xylose (im Medium)
$P_1$	Phosphat		Biomasse (in Formel)
PLA	Phospholipase A2	$x_{\text{O}_2/\text{CO}_2}^A$	Molenbruch von $\text{O}_2/\text{CO}_2$ im Gasaustritt
PLD	Phospholipase D		
polySia	Polysialinsäure	$x_{\text{O}_2/\text{CO}_2}^E$	Molenbruch von $\text{O}_2/\text{CO}_2$ im Gaseintritt
ppm	parts per million		
$q_p$	spezifische Produktbildungsrate	$Y_{P/X}$	Produktausbeutekoeffizient
		$Y_{X/S}$	Zellmassenausbeute- koeffizient
rel.	relativ		
REM	Rasterelektronenmikroskop	ZNS	zentrales Nervensystem
RISP	Realtime integrating software platform		
RNA	Ribonucleinsäure		
RQ	respiratorischer Quotient		
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung		
S	Sorbitol (im Medium) Substrat (in Formel)		

## 13 Literatur

Aminoff, D. (1961) Methods for Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic Acid and Their Application to Hydrolysates of Sialomucoids. *BIOCHEM J* 81(2), 384-&.

Andreishcheva, E.N. and Vann, W.F. (2006) Gene Products Required for De Novo Synthesis of Polysialic Acid in Escherichia Coli K1. *J BACTERIOL* 188(5), 1786-1797.

Baine, H. and Cherniak, R. (1971) Capsular Polysaccharides of Clostridium-Perfringens Hobbs 5. *BIOCHEMISTRY-US* 10(15), 2948-&.

Baker, C., Kasper, D. and Davis, C. (1976) Immunochemical Characterization of Native Type-3 Polysaccharide of Group-B Streptococcus. *J EXP MED* 143(2), 258-270.

Barry, G.T. and Goebel, W.F. (1957) Colominic Acid, a Substance of Bacterial Origin Related to Sialic Acid. *NATURE* 179(4552), 206-206.

Behr, J.P. and Lehn, J.M. (1972) Stability-Constants for Complexation of Alkali and Alkaline-Earth Cations by N-Acetyl-Neuraminic Acid. *Febs Letters* 22(2), 178-&.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2007) *Biochemie*. München, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.

Bliss, J. and Silver, R. (1996) Coating the Surface: A Model for Expression of Capsular Polysialic Acid in Escherichia Coli K1. *MOL MICROBIOL* 21(2), 221-231.

Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *ANAL BIOCHEM* 72(1-2), 248-254.

Bronner, D., Sieberth, V., Pazzani, C., Roberts, I.S., Boulnois, G.J., Jann, B. and Jann, K. (1993) Expression of the Capsular K5 Polysaccharide of Escherichia-Coli - Biochemical and Electron-Microscopic Analyses of Mutants with Defects in Region-1 of the K5 Gene-Cluster. *J BACTERIOL* 175(18), 5984-5992.

Bundle, D., Jennings, H. and Kenny, C. (1974) Studies on Group-Specific Polysaccharide of Neisseria-Meningitidis Serogroup X and an Improved Procedure for Its Isolation. *J BIOL CHEM* 249(15), 4797-4801.

Daines, D., Wright, L., Chaffin, D., Rubens, C. and Silver, R. (2000) Neud Plays a Role in the Synthesis of Sialic Acid in Escherichia Coli K1. *FEMS MICROBIOL LETT* 189(2), 281-284.

Demirbas, A. (2005) Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources* 27(4), 327-337.

El Maarouf, A., Kolesnikov, Y., Pasternak, G. and Rutishauser, U. (2005) Polysialic Acid-Induced Plasticity Reduces Neuropathic Insult to the Central Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(32), 11516-11520.

El Maarouf, A., Petridis, A.K. and Rutishauser, U. (2006) Use of Polysialic Acid in Repair of the Central Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(45), 16989-16994.

Ferrero, M., Luengo, J. and Reglero, A. (1991) Hplc of Oligo(Sialic Acids) - Application to the Determination of the Minimal Chain-Length Serving as Exogenous Acceptor in the Enzymatic-Synthesis of Colominic Acid. *BIOCHEM J* 280, 575-579.

Ferrero, M., Reglero, A., Fernandez-Lopez, M., Ordas, R. and Rodriguez-Aparicio, L. (1996) N-Acetyl-D-Neuraminic Acid Lyase Generates the Sialic Acid for Colominic Acid Biosynthesis in *Escherichia Coli* K1. *BIOCHEM J* 317, 157-165.

Finne, J. and Makela, P.H. (1985) Cleavage of the Polysialosyl Units of Brain Glycoproteins by a Bacteriophage Endosialidase - Involvement of a Long Oligosaccharide Segment in Molecular-Interactions of Polysialic Acid. *J BIOL CHEM* 260(2), 1265-1270.

Frosch, M. and Muller, A. (1993) Phospholipid Substitution of Capsular Polysaccharides and Mechanisms of Capsule Formation in *Neisseria Meningitidis*. *MOL MICROBIOL* 8(3), 483-493.

Galbe, M. and Zacchi, G. (2002) A Review of the Production of Ethanol from Softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(6), 618-628.

Galuska, S.P., Geyer, R., Muhlenhoff, M. and Geyer, H. (2007) Characterization of Oligo- and Polysialic Acids by Maldi-Tof-Mis. *Analytical Chemistry* 79(18), 7161-7169.

Gotschlich, E.C., Fraser, B.A., Nishimura, O., Robbins, J.B. and Liu, T.Y. (1981) Lipid on Capsular Polysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *J BIOL CHEM* 256(17), 8915-8921.

Gray, K.A. (2007) Cellulosic Ethanol - State of the Technology. *International Sugar Journal* 109(1299), 145-+.

Griffiths, G., Barrett, B., Cook, N. and Roberts, I. (1999) Biosynthesis of the *Escherichia Coli* K5 Capsular Polysaccharide. *BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS* 27(4), 507-512.

Hayrinen, J., Jennings, H., Raff, H.V., Rougon, G., Hanai, N., Gerardyschahn, R. and Finne, J. (1995) Antibodies to Polysialic Acid and Its N-Propyl Derivative - Finding Properties and Interaction with Human Embryonal Brain Glycopeptides. *Journal of Infectious Diseases* 171(6), 1481-1490.

Hungerer, D., Jann, K., Jann, B., Orskov, F. and Orskov, I. (1967) Immunochemistry of K Antigens of Escherichia Coli .4. K Antigen of E Coli O9 - K30 - H12. *EUR J BIOCHEM* 2(1), 115-&.

Husmann, M., Roth, J., Kabat, E.A., Weisgerber, C., Frosch, M. and Bitter-Suermann, D. (1990) Immunohistochemical Localization of Polysialic Acid in Tissue Sections: Differential Binding to Polynucleotides and DNA of a Murine Igg and a Human Igm Monoclonal Antibody. *J Histochem Cytochem* 38(2), 209-215.

International Federation of Fruit Juice Producers (1983) Determination of Proline IFFJP-Analyses No 49

Inoue, S., Lin, S., Lee, Y. and Inoue, Y. (2001) An Ultrasensitive Chemical Method for Polysialic Acid Analysis. *GLYCOBIOLOGY* 11(9), 759-767.

Jann, B., Dengler, T. and Jann, K. (1985) The Capsular (K51) Antigen of Escherichia-Coli O1-K51-H-, an O-Acetylated Poly-N-Acetylglucosamine Phosphate. *FEMS MICROBIOL LETT* 29(3), 257-261.

Jann, K., Jann, B., Schmidt, M.A. and Vann, W.F. (1980) Structure of the Escherichia-Coli-K2 Capsular Antigen, a Teichoic Acid-Like Polymer. *J BACTERIOL* 143(3), 1108-1115.

Kleene, R. and Schachner, M. (2004) Glycans and Neural Cell Interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 5(3), 195-208.

Kordsachia, O., Patt, R. and Sixta, H. (1999) Cellulose Isolation from Different Raw Materials. *Papier* 53(2), 96-108.

Kroncke, K.D., Boulnois, G., Roberts, I., Bittersuermann, D., Golecki, J.R., Jann, B. and Jann, K. (1990) Expression of the Escherichia-Coli K5 Capsular Antigen - Immunoelectron Microscopic and Biochemical-Studies with Recombinant Escherichia-Coli. *J BACTERIOL* 172(2), 1085-1091.

Kuhn, R. and Lutz, P. (1963) Uber Formyl-Brenztraubensaure Und Den Farbstoff Der Warren-Reaktion. *Biochemische Zeitschrift* 338, 554-&.

Kundig, F.D., Aminoff, D. and Roseman, S. (1971) Sialic Acids .12. Synthesis of Colominic Acid by a Sialyltransferase from Escherichia-Coli K-235. *J BIOL CHEM* 246(8), 2543-&.

Kuznetsov, B.N., Kuznetsova, S.A., Danilov, V.G., Kozlov, I.A., Taraban'ko, V.E., Ivanchenko, N.M. and Alexandrova, N.B. (2002) New Catalytic Processes for a

Sustainable Chemistry of Cellulose Production from Wood Biomass. *Catalysis Today* 75(1-4), 211-217.

Lee, L. and Cherniak, R. (1974) Capsular Polysaccharide of *Clostridium-Perfringens* Hobbs-10. *INFECT IMMUN* 9(2), 318-322.

Lewis, A.L., Hensler, M.E., Varki, A. and Nizet, V. (2006) The Group B Streptococcal Sialic Acid O-Acetyltransferase Is Encoded by Neud, a Conserved Component of Bacterial Sialic Acid Biosynthetic Gene Clusters. *J BIOL CHEM* 281(16), 11186-11192.

Liu, T.Y., C., G.E., Dunne, F.T. and Jonssen, E.K. (1971) Studies on Meningococcal Polysaccharides .2. Composition and Chemical Properties of Group-B and Group-C Polysaccharide. *J BIOL CHEM* 246(15), 4703-&.

Long, C. and Mouat, B. (1971) Binding of Calcium Ions by Erythrocytes and Ghost-Cell Membranes. *BIOCHEM J* 123(5), 829-&.

Lottspeich, F. and Engels, J.W. (2006) *Bioanalytik*. München, Spektrum Akademischer Verlag.

Mahadevan, H. and Hall, C.K. (1992) Experimental-Analysis of Protein Precipitation by Polyethylene-Glycol and Comparison with Theory. *Fluid Phase Equilibria* 78, 297-321.

Mcguire, E.J. and Binkley, S.B. (1964) Structure + Chemistry of Colominic Acid. *BIOCHEMISTRY-US* 3(2), 247-&.

Meredith, T.C. and Woodard, R.W. (2003) *Escherichia Coli* Yrbh Is a D-Arabinose 5-Phosphate Isomerase. *J BIOL CHEM* 278(35), 32771-32777.

Merker, R.I. and Troy, F.A. (1990) Biosynthesis of the Polysialic Acid Capsule in *Escherichia Coli* K1. Cold Inactivation of Sialic Acid Synthase Regulates Capsule Expression Below 20 Degrees C. *GLYCOBIOLOGY* 1(1), 93-100.

Min, H. and Cowman, M.K. (1986) Combined Alcian Blue and Silver Staining of Glycosaminoglycans in Polyacrylamide Gels - Application to Electrophoretic Analysis of Molecular-Weight Distribution. *ANAL BIOCHEM* 155(2), 275-285.

Muhlenhoff, M., Eckhardt, M. and Gerardy-Schahn, R. (1998) Polysialic Acid: Three-Dimensional Structure, Biosynthesis and Function. *CURR OPIN STRUC BIOL* 8(5), 558-564.

Nakata, D. and Troy, F.A. (2005) Degree of Polymerization (Dp) of Polysialic Acid (Polysia) on Neural Cell Adhesion Molecules (N-Cams) - Development and Application of a New Strategy to Accurately Determine the Dp of Polysia Chains on N-Cams. *J BIOL CHEM* 280(46), 38305-38316.

Orskov, F., Sharma, V. and Orskov, I. (1984) Influence of Growth Temperature on the Development of Escherichia-Coli Polysaccharide K-Antigens. J GEN MICROBIOL 130(OCT), 2681-2684.

Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. and Jann, K. (1977) Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of Escherichia-Coli. BACTERIOL REV 41(3), 667-710.

Pazzani, C., Rosenow, C., Boulnois, G.J., Bronner, D., Jann, K. and Roberts, I.S. (1993) Molecular Analysis of Region-1 of the Escherichia-Coli K5 Antigen Gene-Cluster - a Region Encoding Proteins Involved in Cell-Surface Expression of Capsular Polysaccharide. J BACTERIOL 175(18), 5978-5983.

Pelkonen, S., Hayrinen, J. and Finne, J. (1988) Polyacrylamide-Gel Electrophoresis of the Capsular Polysaccharides of Escherichia-Coli-K1 and Other Bacteria. J BACTERIOL 170(6), 2646-2653.

Pon, R.A., Lussier, M., Yang, Q.L. and Jennings, H.J. (1997) N-Propionylated Group B Meningococcal Polysaccharide Mimics a Unique Bactericidal Capsular Epitope in Group B Neisseria Meningitidis. J EXP MED 185(11), 1929-1938.

Puente-Polledo, L., Reglero, A., Gonzalez-Clemente, C., Rodriguez-Aparicio, L. and Ferrero, M. (1998) Biochemical Conditions for the Production of Polysialic Acid by Pasteurella Haemolytica A2. GLYCOCONJUGATE J 15(9), 855-861.

Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L.B. and Luengo, J.M. (1993) Polysialic Acids. Int J Biochem 25(11), 1517-1527.

Rissing, J.P., Buxton, T.B., Crockett, J.K., Talledo, R.A. and Moore, W.L. (1978) Protein Precipitation by Acetone and Polyethylene-Glycol (Peg) Analysis in Intestinal Perfusates. Clinical Research 26(6), A761-A761.

Rodriguez-Aparicio, L.B., Reglero, A., Ortiz, A.I. and Luengo, J.M. (1988) Effect of Physical and Chemical Conditions on the Production of Colominic Acid by Escherichia-Coli in a Defined Medium. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 27(5-6), 474-483.

Rosenow, C., Roberts, I.S. and Jann, K. (1995) Isolation from Recombinant Escherichia-Coli and Characterization of Cmp-Kdo Synthetase, Involved in the Expression of the Capsular K5 Polysaccharide (K-Cks). FEMS MICROBIOL LETT 125(2-3), 159-164.

Roy, R. and Pon, R.A. (1990) Efficient Synthesis of Alpha(2-8)-Linked N-Acetyl and N-Glycolylneuraminic Acid Disaccharides from Colominic Acid. GLYCOCONJUGATE J 7(1), 3-12.

Rutishauser, U. (1996) Polysialic Acid and the Regulation of Cell Interactions. Current Opinion in Cell Biology 8(5), 679-684.



Schauer, R. (2000) Achievements and Challenges of Sialic Acid Research. *Glycoconj J* 17(7-9), 485-499.

Shaw, C., Chao, H. and Xiao, B. (2001) Determination of Sialic Acids by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J CHROMATOGR A* 913(1-2), 365-370.

Shimoda, Y., Kitajima, K., Inoue, S. and Inoue, Y. (1994) Calcium-Ion Binding of 3 Different Types of Oligo/Polysialic Acids as Studied by Equilibrium Dialysis and Circular Dichroic Methods. *BIOCHEMISTRY-US* 33(5), 1202-1208.

Silver, R.P., Aaronson, W. and Vann, W.F. (1987) Translocation of Capsular Polysaccharides in Pathogenic Strains of Escherichia-Coli Requires a 60-Kilodalton Periplasmic Protein. *J BACTERIOL* 169(12), 5489-5495.

Steenbergen, S.M., Lee, Y.C., Vann, W.F., Vionnet, J., Wright, L.F. and Vimr, E.R. (2006) Separate Pathways for O Acetylation of Polymeric and Monomeric Sialic Acids and Identification of Sialyl O-Acetyl Esterase in Escherichia Coli K1. *J BACTERIOL* 188(17), 6195-6206.

Svennerholm, L. (1957) Quantitative Estimation of Sialic Acids .2. A Colorimetric Resorcinol-Hydrochloric Acid Method. *Biochimica Et Biophysica Acta* 24(3), 604-611.

Tarcsay, L., Jann, B. and Jann, K. (1971) Immunochemistry of K Antigens of Escherichia-Coli - K87 Antigen from Escherichia-Coli O8-K87(Bquestionable)-H19. *EUR J BIOCHEM* 23(3), 505-&.

Traving, C. and Schauer, R. (1998) Structure, Function and Metabolism of Sialic Acids. *Cell Mol Life Sci* 54(12), 1330-1349.

Troy, F.A. (1979) Chemistry and Biosynthesis of Selected Bacterial Capsular Polymers. *ANNU REV MICROBIOL* 33, 519-560.

Troy, F.A. (1992) Polysialylation - from Bacteria to Brains. *GLYCOBIOLOGY* 2(1), 5-23.

Tzeng, Y., Datta, A., Strole, C., Lobritz, M., Carlson, R. and Stephens, D. (2005) Translocation and Surface Expression of Lipidated Serogroup B Capsular Polysaccharide in Neisseria Meningitidis. *INFECT IMMUN* 73(3), 1491-1505.

Uchida, Y., Tsukada, Y. and Sugimori, T. (1973) Studies on Sialic-Acid and Related Substances .1. Improved Microbial Production of Colominic Acid, a Homopolymer of N-Acetylneuraminic Acid. *AGR BIOL CHEM TOKYO* 37(9), 2105-2110.

Vann, W.F. and Freese, S.J. (1994) Purification of Escherichia-Coli K-Antigens. *BACTERIAL PATHOGENESIS, PT A* 235, 304-311.

- Vimr, E., Steenbergen, S. and Cieslewicz, M. (1995) Biosynthesis of the Polysialic Acid Capsule in Escherichia-Coli K1. *J IND MICROBIOL* 15(4), 352-360.
- Wang, B. and Brand-Miller, J. (2003) The Role and Potential of Sialic Acid in Human Nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 57(11), 1351-1369.
- Warren, L. (1959) Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. *J BIOL CHEM* 234(8), 1971-1975.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Rockle, I., Muhlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J.D., Gerardy-Schann, R. and Hildebrandt, H. (2005) Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule. *J BIOL CHEM* 280(52), 42971-42977.
- Weisgerber, C. and Troy, F.A. (1990) Biosynthesis of the Polysialic Acid Capsule in Escherichia Coli K1. The Endogenous Acceptor of Polysialic Acid Is a Membrane Protein of 20 Kda. *J BIOL CHEM* 265(3), 1578-1587.
- Whitfield, C. (2006) Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia Coli. *ANNU REV BIOCHEM* 75, 39-68.
- Whitfield, C. and Roberts, I. (1999) Structure, Assembly and Regulation of Expression of Capsules in Escherichia Coli. *MOL MICROBIOL* 31(5), 1307-1319.
- Zamze, S.E., Ferguson, M.A.J., Moxon, E.R., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1987) Identification of Phosphorylated 3-Deoxy-Manno-Octulosonic Acid as a Component of Haemophilus-Influenzae Lipopolysaccharide. *BIOCHEM J* 245(2), 583-587.

**Bastian Rode****Persönliche Informationen**

Geburtstag: 27.04.1978  
Geburtsort: Langenhagen  
Familienstand: unverheiratet

**Studium und berufliche Ausbildung**

Dez 2004 - Jan 2008 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Promotionsarbeit im Bereich Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Nov 2003 Abschluss des Studiums als Diplom-Chemiker

Jun 2003 - Nov 2003 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover mit dem Thema „Kultivierung und Analyse oszillierender Hefen mit dem Schwerpunkt Durchflusszytometrie und Aufbau eines neuen Reaktorsystems“ unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Juni 2001 - Mai 2003 Hauptstudium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover

Mai 2001 Vordiplomsprüfung

Okt 1998 - Mai 2001 Grundstudium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover

**Ersatzdienst**

Sep 1997 – Sep 1998 Pflegetätigkeiten am Kreiskrankenhaus Großburgwedel

**Schulische Ausbildung**

Jul 1997 Schulabschluss mit Abitur

Aug 1990 – Jul 1997 Gymnasium Mellendorf

Aug 1988 – Jul 1990 Orientierungsstufe Wedemark

Aug 1984 – Jul 1988 Grundschule Brelingen

**Artikel**

Rode B., Endres C., Ran C., Stahl F., Beutel S., Kasper C., Galuska S., Geyer R., Muhlenhoff M., Gerardy-Schahn R. and Scheper T. (2008) *Large-Scale Production and Homogenous Purification of Long Chain Polysialic Acids from E-Coli K1*. Journal of Biotechnology 135(2), 202-209.

Rode B., Endres C., Beutel S., Kasper C., Galuska S. P., Geyer H., Assmann U., Schuster R. H., Gerardy-Schahn R., Scheper T.: *Chain Length Determination of Polysialic Acid Produced from Escherichia coli K1*. (in preparation)

**Poster**

Rode B., Endres C., Beutel S., Kasper C., Gerardy-Schahn R., Scheper T.: *Large scale purification of bacterial polysialic acid*; Bioperspectives 2007, Köln

Rode B., Endres C., Beutel S., Kasper C., Gerardy-Schahn R., Scheper T.: *Large scale purification of bacterial polysialic acid*; polySia-Tagung 2007, Bad Lauterberg

Rode B., Kasper C., Gerardy-Schahn R., Scheper T.: *Biosynthesis and Isolation of Polysialic acid from E.coli K1*; Biomaterials - Synthesis, Processing and Biological Evaluation, März 2006, Hannover

Rode B., Kasper C., Beutel S., Gerardy-Schahn R., Scheper T.: *Biosynthesis of polysialic acid for the preparation of artificial scaffold materials*; GVC/DECHEMA Jahrestagung, September 2006, Wiesbaden