

**Optimierung der biosynthetischen Produktion
von Polysialinsäure und Oligosialinsäure
aus *Escherichia coli* K1**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Ismet Bice
geboren am 01.07.1982 in Besiri, Türkei.

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: PD. Dr. Ursula Rinas
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 26.03.2012

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Januar 2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ich möchte mich bei ihm herzlich für die freundliche Unterstützung, das stets angenehme Arbeitsklima und die gebotenen Möglichkeiten bedanken. Frau PD. Dr. Ursula Rinas danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves möchte ich mich für die Bereitschaft, meine Prüfung im Nebenfach abzunehmen, bedanken.

Ich bedanke mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung und bei Frau Prof. Dr. Gerardy-Schahn für die Leitung des Projekts „PolySia-Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifiziereller Gewebe“. Zudem danke ich den Mitgliedern der Forschergruppe für die gute Zusammenarbeit.

Mein spezieller Dank gilt:

Dr. Sascha Beutel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, das Korrekturlesen diverser Berichte, Paper und Poster.

Mehmet Ünal, Hilal Celik, Christoph Wolff, Christopher Wagner und Febri Marsa für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplom-, Master- und Schwerpunktarbeiten.

Dr. Miriam Lübbecke, Dr. Michael Büring und Dr. Johanna G. Walter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Dörte Solle für die vielen Hilfen bei der Auswertung der statistischen Versuchsplanung.

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

Allen Mitarbeitern des TCI für die sehr freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere dem Technikumsteam. Es sind in dieser Zeit viele neue Freundschaften entstanden und ich hoffe, dass man sich nicht so schnell aus den Augen verliert.

Ki-Duk Seo, der mich in den Schreibpausen aufmunterte und für die erforderliche Abwechslung gesorgt hat.

Die Mitarbeiter der Mechanik- und Elektronikwerkstatt insbesondere Thorsten Stempel für die vielen kleinen Hilfen bei so manchen Problemen.

Meiner Familie, die mir während der ganzen Zeit zur Seite stand und mich immer wieder aufgebaut hat, wenn es mal wieder nicht so lief, wie es sollte.

Und ein ganz besonders dickes Dankeschön geht an Nabila Chaker.

Zusammenfassung

Polysialinsäure (α 2,8-verknüpfte 5-N-Acetylneuraminsäure, polySia) ist ein Polysaccharid, welches eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Nervensystems und des Nervenwachstums in der embryonalen Entwicklung spielt. Zudem wird es bei dem Heilungsprozess von Verletzungen des peripheren Nervensystems gebildet. Daher bietet sich Polysialinsäure als Gerüstmaterial für die Regeneration von Nervenzellen an, sodass es seinen Einsatz im Tissue Engineering findet. Da in *E. coli* K1 hergestellte Polysialinsäure strukturidentisch zu der im menschlichen Organismus vorkommenden Polysialinsäure ist, wurde dieser Ansatz weiter verfolgt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Produktion sowie den Downstream-Prozess für die Polysialinsäure aus *E. coli* K1. Die Produktion und Untersuchung der Polysialinsäure erfolgte im 10 L Bioreaktor, sowohl im Batch- als auch im Fed-Batch-Modus. Durch Verwendung des Fed-Batch-Modus konnte die Produktivität von $0,37 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,3 \text{ g L}^{-1}$ erhöht werden. Anschließend erfolgte ein *Scale-up* auf den 24 L-Maßstab. Zudem wurden mittels statistischer Versuchsplanung verschiedene Parameter im Batch-Modus bezüglich ihres Einflusses auf die Produktivität sowie die erhaltenen Polysialinsäure-Polymerlängen untersucht. Im Fed-Batch-Modus erfolgten die Untersuchungen bezüglich der Produktivität und Polymerlänge von Polysialinsäure über die Einstellung unterschiedlicher Wachstumsraten. Die Ergebnisse wurden auf die 24 L Bioreaktorkultivierung übertragen. Dabei konnten die maximalen Polymerlängen im Batch-Modus um 3,5 DP (*degree of polymerization*) und Fed-Batch-Modus um 3 DP erhöht werden.

Der anschließende Downstream-Prozess wurde jeweils mit 10 L Kulturbrühe aus dem Batch- und Fed-Batch Prozess durchgeführt. Der Prozess umfasste die Zellseparation mittels Cross-flow-Mikrofiltration ($0,45 \mu\text{m}$), die Polysialinsäure-Abtrennung über die Anionenaustauscher-Membran, einen Konzentrierungs- und Entsalzungsschritt mit Hilfe der Cross-flow-Ultrafiltration (10 kDa) und eine darauffolgende Proteinadsorption durch Tonmineralien. Eine Dialyse (10 kDa) und die Produktabscheidung mittels Gefriertrocknung stellen die letzten beiden Entwicklungsprozesse der Aufreinigungsstrategie dar. Die Polysialinsäure-Ausbeute betrug 61 % für die Kulturbrühe aus dem Batch-Prozess und 40 % für den Fed-Batch-Prozess. Der Endotoxin-Gehalt lag bei 14 EU mg^{-1} und der DNA-Gehalt zwischen $11,5\text{-}14 \text{ ng mg}^{-1}$. Folglich weist die Polysialinsäure eine Reinheit von 97 bis 99 % auf.

Die Aufreinigung von Oligosialinsäure erfolgte zum einen aus der Ultrafiltration (Nebenprodukt der Polysialinsäure Herstellung), zum anderen durch die enzymatische Spaltung der langkettigen Polysialinsäure. Die Ausbeuten lagen bei der Ultrafiltration im Milligramm-Bereich und bei der enzymatischen Spaltung im Mikrogramm-Bereich.

Stichworte: Polysialinsäure, *Escherichia coli* K1, Membranadsorber, anorganische Tonmineralien

Abstract

Polysialic acid (α 2,8- linked 5-N-Acetylneuramic acid, polySia) is a polysaccharide playing an important role in the development of the nervous system and nerve growth during the embryonic development. It is also produced during the healing process of the injured peripheral nervous system. Therefore, polysialic acid can serve as scaffold material for the regeneration of nerve cells. The polysialic acid produced by *E. coli* K1 is structurally identical with the polysialic acid found in the human body and is therefore examined in this thesis.

This work describes the production as well as the downstream processing of the polysialic acid from *E. coli* K1. The production of polysialic acid was performed in 10 L bioreactor in batch and fed-batch mode, respectively. By using fed-batch process, the productivity was increased from 0.37 g L^{-1} to 1.3 g L^{-1} . Subsequently, the production were scaled up to 24 L. The parameters for the optimized polysialic acid productivity and chain length were gained from the batch-mode. In fed-batch mode, the polysialic acid productivity and chain length were investigated in dependence on the growth rate of *E. coli* K1. The results were transferred to 24 L bioreactor cultivation. The results showed that the chain length could be increased in the batch mode by 3.5 DP (*degree of polymerization*) and in the fed-batch mode by 3 DP.

The following downstream process was carried out utilizing 10 L cultivation broth originating from batch- and fed-batch processes. The downstream processing includes cell separation via cross-flow microfiltration ($0.45 \mu\text{m}$), polysialic acid separation utilizing an anion exchanger membrane, concentration and desalting step via cross-flow ultrafiltration (10 kDa) followed by protein adsorption with clay minerals (EX M 1753). After dialysis (10 kDa), the product separation was finished by freeze-drying. The polysialic acid yield for the batch broth was 61 % and for the fed-batch broth 40 %. The endotoxin content of the final product is 14 EU mg^{-1} and the DNA content between 11.5 to 14 ng mg^{-1} . The polysialic acid purity is 97-99 %.

Furthermore, the production and purification of oligosialic acid (oligoSia), the by-product of the polysialic acid production, was investigated. Thereby, the production of oligosialic acid during the ultrafiltration of the Polysialic acid production was compared with the production of oligosialic acid via an enzymatic cleavage of polysialic acid. The yield of ultrafiltration was displayed in mg range while the yield of enzymatic cleavage was in a μg range.

Keywords: Polysialic acid, *Escherichia coli* K1, membrane adsorber, inorganic clay minerals

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
Theoretische Grundlagen	4
2. Polysaccharide	4
2.1 Vorkommen und biologische Bedeutung.....	4
2.1.1 Stärke	6
2.1.2 Glykogen.....	7
2.1.3 Polysaccharid-Verbindungen (Glykokonjugate).....	7
2.2 Polysialinsäure	8
2.2.1 Struktur der Polysialinsäure	8
2.2.2 Vorkommen der Polysialinsäure	9
2.2.3 Enzymatische und Biotechnologische Produktion der Polysialinsäure	11
3. Design of Experiments	15
3.1 Vollständiger Versuchsplan	16
3.2 Unvollständiger Versuchsplan	16
3.3 Auswertung von Faktorplänen.....	18
Ergebnisse und Diskussion	19
4 Produktion von Polysialinsäure	19
4.1 Biostat C.....	20
4.1.1 10 L Batch-Kultivierung	20
4.1.2 10 L Fed-Batch-Kultivierung	22
4.1.3 Fazit.....	25
4.2 Untersuchungen der polySia-Produktion und Polymerlänge.....	27
4.2.1 Polymerisationsgrad der polySia.....	27
4.2.2 Wahl der Faktoren für die statistische Versuchsplanung im Batch-Betrieb	30
4.2.2.1 Fazit	35
4.2.3 Einfluss der Wachstumsrate auf polySia-Produktion und polySia-Polymerlänge im Fed-Batch-Modus	38
4.2.3.1 Fazit	40
4.3 Scale-up im Biostat UD	41
4.3.1 24 L Batch-Kultivierung	41
4.3.2 29 L Fed-Batch-Kultivierung	42
4.3.3 Fazit.....	45
5. Downstreaming von Polysialinsäure.....	48
5.1 Gewinnung der Polysialinsäure mittels Fällungsmethode	49

5.2	Zellseparation.....	50
5.2.1	Fazit.....	54
5.3	Übertragung der Zellseparation auf die Fällungsmethode	54
5.3.1	Fazit.....	56
5.4	Downstream-Prozess auf Basis der Membranadsorbertechnik und anorganischer Tonmineralien	57
5.4.1	Separation und Aufkonzentration.....	57
5.4.2	Aufreinigung von polySia mit Hilfe der Membranadsorbertechnik	59
5.4.2.1	Aufreinigung von polySia im Labormaßstab.....	59
5.4.2.2	Fazit	64
5.4.3	Aufreinigung des polySia-Überstands aus dem Fed-Batch-Betrieb mit der Q-100 Membran	65
5.4.4	Aufreinigung von polySia mit Tonmineralien.....	66
5.4.4.1	Wahl der Tonminerale	67
5.4.4.2	Fazit	69
5.4.4.3	Charakterisierung von EX M 1753	70
5.4.4.4	pH –Wert-Abhängigkeit von EX M 1753.....	71
5.4.4.5	Fazit	74
5.5	Kombination von Q-Membran und EX M 1753	74
5.5.1	Polymerlängen-Bestimmung für den Labormaßstab	77
5.5.2	Fazit.....	78
5.6	Scale-up: Technikumsmaßstab	78
5.6.1	Polymerlängen-Bestimmung für den Technikumsmaßstab	84
5.6.2	Bestimmung des Endotoxin- und DNA-Gehalts	84
5.6.3	Fazit.....	85
6.	Aufreinigung von Oligosialinsäure	87
6.1	Aufarbeitung von Oligosialinsäure mittels Ultrafiltration	87
6.1.1	Aufreinigung der OligoSia-Konzentrate	91
6.1.2	Fazit.....	95
6.2	OligoSia-Produktion durch Endosialidase	96
6.2.1	Enzymatischer Verdau der polySia bei 37 °C	96
6.2.2	Enzymatischer Verdau der polySia bei 30 und 27 °C	97
6.2.3	Fazit.....	100
7.	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Anhang	106
8.	Material und Methoden	106
8.1	Mikrobiologische Techniken	106
8.1.1	Stammhaltung	106
8.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 im Schüttelkolben	106

8.2	Medien	106
8.2.1	LB-Medium.....	106
8.2.2	Synthetische Medien	107
8.3	Kultivierungssystem	107
8.3.1	Biostat C.....	107
8.3.2	Biostat UD.....	108
8.4	<i>Online</i> -Analytik	108
8.5	<i>Offline</i> -Analytik	109
8.5.1	Optische Dichte	109
8.5.2	Glucose-Messungen	109
8.5.3	TBA-Test zur Polysialinsäure-Bestimmung.....	109
8.5.4	Proteinnachweis nach Bradford.....	111
8.5.5	DMB-HPLC	112
8.5.6	Endotoxinnachweis mittels Endosafe [®] -PTS [™]	113
8.5.7	DNA-Bestimmung	114
8.5.8	Biotrockenmasse	114
8.5.9	Acetat	114
8.6	Arbeitsvorschriften für die Aufreinigung von polySia	114
8.6.1	Separation der Zellen	114
8.6.2	Aufkonzentration des zellfreien Kulturüberstands	115
8.6.3	Präzipitationsschritte (Fällungsmethode) und Adsorbertechnik.....	115
8.6.3.1	Fällungsreaktionen.....	115
8.6.3.2	Adsorbertechnik.....	116
8.6.4	Dialyse	119
8.6.5	Lyophilisation	120
8.7	Enzymatischer Verdau	120
8.8	Feed-Programm.....	121
8.9	Berechnungen der Respirationsdaten.....	121
8.10	Ergänzende Daten	122
9.	Literaturverzeichnis.....	123
10.	Geräte, Materialien und Chemikalien.....	130
	Lebenslauf.....	131
	Veröffentlichungen.....	132

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette	F ⁱⁿ	Volumenstrom des eintretenden Gases
ABD	ATP-bindende Domäne		
ATP	Adenosintriphosphat	FIA	Fließjektionsanalyse, <i>Flow Injection Analysis</i>
ADP	Adenosin-5-Diphosphat		
BSA	Bovines Serumalbumin	FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
BTM	Biotrockenmasse		
C-Quellen	Kohlenstoff-Quellen	Fru-6-P	Fucose-6-Phosphat
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propanolsulfonsäure	GlcNH ₂	Glucosamin
Cetavlon	Hexadecyltrimethylaminoiumbromid	GS	Glucosestartkonzentration
CMP	Cytidinmonophosphat	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
CoA	Coenzym A	HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
CPR	Kohlenstoffdioxidproduktion, <i>carbon production</i>	kDa	kilo Dalton
CTP	Cytidtriphosphat	Kdn	5-Deamino3,5-dideoxyneuraminsäure
DCU	<i>digital control unit</i>	K _M	Monod-Konstante
DMB	1,2-Diamino-4,5-methoxybenzol	LB	Luria-Bertani
DNA	Desoxyribonucleinsäure	LF-Isotherme	Langmuir-Freundlich Isotherme
DP	Polymerisationsgrad, <i>degree of polymerisation</i>	LPS	Lipopolysaccharid
DoE	<i>Design of Experiments</i>	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	N-Quelle	Stickstoff-Quelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NAD ⁻	Nicotinamin-Adenin-Dinucleotid
Em	Emission	NaPP	Natriumphosphatpuffer
EU	Endotoxin Unit	NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Ex	Extinction	Neu5Ac	5-N-Acetylneuraminsäure
EX M	Experimentelles Muster	<i>neuE</i>	Polysialinsäure Translokase
FaDH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid	<i>neuS</i>	Polysialylsynthetase
		Neu5Gc	5-N-Glycolyneuraminsäure

NmB	<i>Neisseria meningitidis</i> B	rpm oder min^{-1}	Umdrehungen pro Minute
NMK	Nukleosidmono- phosphat Kinase	RQ	Respirationskoeffizient
M	Mol	S	Substrat
Meq	milliequivalent	TBA	Thiobarbitursäure
MK	Myokinase	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
μ	Wachstumsrate	UV	Ultraviolett
μ_{max}	maximale Wachstumsrate	V_M	Molvolumen des idealen Gases
μ_{cal}	berechnete Wachstumsrate	v_{max}	maximale Reaktions- geschwindigkeit
μ_{set}	eingestellte Wachstumsrate	VE	voll entsalzt
PK	Pyruvatkinase	X	Biomasse
PP	Pyrophosphat	$x_{\text{O}_2/\text{CO}_2}^{\text{in}}$	Molenbruch von O_2/CO_2 im Gaseintritt
polySia oder PSA	Polysialinsäure	$x_{\text{O}_2/\text{CO}_2}^{\text{out}}$	Molenbruch von O_2/CO_2 im Gasaustritt
oligoSia	Oligosialinsäure	w/v	<i>weight per volume</i> (g L^{-1})
OD	Optische Dichte	$Y_{\text{S}/\text{X}}$	Ausbeutekoeffizient Substrat/Biomasse
OTR	Sauerstoffeintragsrate	$Y_{\text{X}/\text{S}}$	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat
PEP	Phosphoenolpyruvat	$Y_{\text{S}/\text{P}}$	Ausbeutekoeffizient Substrat/Produkt
PTS	Phosphotransferase- System		
pO_2 -Wert	Gelöstsauerstoffgehalt		
rel. AU	relative Absorptions- einheiten		
R	Rührgeschwindigkeit		
RISP	<i>Realtime integrated software platform</i>		
RNA	Ribonucleinsäure		

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Polysaccharide sind hochmolekulare Kohlenhydrate, die zahlreiche biologische Funktionen in den Organismen von Menschen, Tieren und Pflanzen, aber auch in Mikroorganismen erfüllen. Aufgebaut sind die Polysaccharide aus Pentosen und Hexosen, die über glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind. Durch die Vielzahl von Möglichkeiten der Verknüpfung der einzelnen Zuckerbausteine ergibt sich eine fast unüberschaubare Anzahl von verschiedenartigen Polysacchariden [1]. Die Funktion dieser Polysaccharide ist vielfältig. Sie spielen für die biochemischen Abläufe des Körpers eine wichtige Rolle und finden ebenso in unterschiedlichen technischen Bereichen, wie z.B. als Rohstoff in der Papier- oder Bekleidungsindustrie und in der Abwasserreinigung Anwendung. In den letzten Jahren ist der Bedarf an Polysacchariden vor allem im Bereich der Biomaterialien für Tissue Engineering gestiegen. Biomaterialien, wie z.B. biodegradierbare Implantate sollen im Körper Funktionen ersetzen, die aufgrund von Krankheiten oder Unfällen ausgefallen sind [2]. Diese werden je nach Anwendungszweck nach einer gewissen Zeitspanne vom Körper abgebaut und lösen sich langsam auf. Aus diesem Grund müssen diese Materialien eine sehr gute Bioverträglichkeit aufweisen und zugleich ohne schädigende Nebenprodukte abbaubar sein.

Die meisten bisher entwickelten Präparate werden im Körper zu unkontrolliert und somit häufig zu schnell abgebaut. Ein Beispiel hierfür sind Hyaluronsäurepräparate, die bei arthrosegeschädigten Gelenken als Gelenkschmiere eingesetzt werden. Jedoch ist die Halbwertszeit von Hyaluronsäure-Produkten von der molaren Masse abhängig, wobei Werte zwischen 17 h und 60 h [3] vorliegen. Die Kontrolle des Abbauprozesses von biodegradablen Materialien stellt eine zentrale Anforderung an die zukünftigen Implantate dar.

Diese Eigenschaften werden der Polysialinsäure, einem Polysaccharid aus α 2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäure, nachgesagt. Polysialinsäure ist sowohl in niederen Lebensformen wie Bakterien als auch bei hoch entwickelten Organismen anzutreffen. Beim Menschen spielt die Polysialinsäure bei der Ausbildung des Nervensystems und des Nervenwachstums in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle [4]. Im menschlichen Körper existiert kein Metabolismus für den Abbau von Polysialinsäure, wodurch letztere eine lange Halbwertszeit im Körper besitzt. Allerdings lässt sie sich durch das Enzym Endosialidase abbauen. Somit ist ein gezielter Verdau der Polysialinsäure durch die äußere Zufuhr dieses Enzyms möglich [5].

Für die Anwendung als Biomaterial ist eine ausreichende Verfügbarkeit der Polysialinsäure notwendig. Eine vielversprechende Gewinnung der Polysialinsäure stellt die Isolierung aus

Mikroorganismen dar. Bakterien, wie *Escherichia coli* K1 oder *Neisseria meningitidis* B bilden Polysialinsäure auf ihrer Zelloberfläche, welche hinsichtlich ihrer Struktur identisch mit der im menschlichen Körper ist.

Die vorliegende Arbeit wurde innerhalb der DFG-Forschungsgruppe 548 „Polysialinsäure“ durchgeführt. Das Ziel dieser interdisziplinären Forschergruppe ist es, Gerüste auf Basis von Polysialinsäure zu entwickeln, die nach Läsionen für die Nervenregeneration sorgen sollen. Eine der wichtigsten Teil-Aufgaben des Projekts ist die Bereitstellung ausreichender Mengen an reiner Polysialinsäure, welche die Anforderungen für die weiteren Forschungsstudien erfüllen. Hierzu werden sowohl hochmolekulare Polysialinsäure (> 100 DP, *degree of polymerization*) als auch niedermolekulare Polysialinsäure (< 40 DP), auch Oligosialinsäure genannt, benötigt. Die Oligosialinsäure kann neben der Polysialinsäure auch zur Beschichtung von Nanopartikeln verwendet werden. Durch diese Modifizierung der Nanopartikel wird die Fähigkeit der Oligosialinsäure die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ausgenutzt, um Wirkstoffe direkt ins Gehirn zu transportieren [6, 7].

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind die Optimierung der Produktion und Aufreinigung der humanidentischen Polysialinsäure aus *E. coli* K1 und die Herstellung der Oligosialinsäure. Im Mittelpunkt stand die Optimierung des gesamten Bioprozesses auf der Basis der Arbeit von Rode *et. al.* (2008) hinsichtlich der Quantität und Qualität der hergestellten Polysialinsäure.

Die Kultivierungen fanden dabei im Batch- und Fed-Batch-Betrieb in unterschiedlichen Maßstäben statt. Neben einer Optimierung der Parameter mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*) wurden die Prozesse so ausgerichtet, dass Polysialinsäure mit möglichst langer Polymerlänge produziert wird. Der anschließende Downstream-Prozess macht, abhängig von den jeweiligen Reinheitsanforderungen an das Produkt, den Großteil der Produktionskosten aus. Bei der Herstellung von reiner Polysialinsäure kommt somit der Produktisolierung eine wesentliche ökonomische Bedeutung zu. Die bisherigen Versuche, Polysialinsäure über Fällungsreagenzien aufzureinigen, waren sehr arbeitsintensiv und mit hohen Produktverlusten verbunden. Aus diesem Grund sollte ein neuer Downstream-Prozess auf Basis von verschiedenen Absorbertechnologien entwickelt und etabliert werden. Hierfür wurden Membranadsorber und anorganische Tonminerale verwendet. Anschließend fand eine nähere Charakterisierung der hergestellten Polysialinsäure hinsichtlich der Reinheit (DNA, Proteine, Endotoxine) und Polymerlänge statt.

Zur Produktion der Oligosialinsäure wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurde Oligosialinsäure aus dem Produktionsprozess der Polysialinsäure als Nebenpro-

dukt gewonnen, zum anderen wurde sie mittels enzymatischer Spaltung der hochmolekularen Polysialinsäure hergestellt. Die gewonnene Oligosialinsäure wurde analog zur Polysialinsäure hinsichtlich ihrer Polymerlänge und Reinheit charakterisiert.

Theoretische Grundlagen

2. Polysaccharide

Polysaccharide sind Kohlenhydrate und gehören neben Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden zu den vier Hauptklassen von Biomolekülen. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen in allen Lebensformen sind sie die häufigsten organischen Verbindungen auf der Erde. Sie dienen als Energiespeicher, Brennstoffe, Metaboliten und stellen außerdem als Kohlenhydrate in Form von Ribose und Desoxyribose Teil des Grundgerüsts der RNA und DNA zur Verfügung. In den Zellwänden von Bakterien und Pflanzen dienen sie als Strukturelemente. Zudem gehen Kohlenhydrate mit vielen Proteinen und Lipiden Verbindungen ein. Derartig gebundene Kohlenhydrate nehmen bei der Zell-Zell-Kommunikation sowie bei der Vermittlung von Wechselwirkungen zwischen Zellen und anderen Elementen der zellulären Umgebung eine Schlüsselrolle ein.

2.1 Vorkommen und biologische Bedeutung

Polysaccharide, oft auch als Glykane bezeichnet, sind im biologischen System ubiquitär verbreitete Makromoleküle, die zahlreiche biologische Funktionen erfüllen. Während sie bei Pflanzen und Mikroorganismen Funktionen als Gerüst- und Speichersubstanzen besitzen, sind sie für höheren Organismen in erster Linie energieliefernde Substanzen [8].

Die Polysaccharide zeichnen sich dadurch aus, dass sie zum größten Teil aus relativ wenigen Strukturelementen aufgebaut sind. Die wichtigsten Bausteine der Polysaccharide sind die Hexosen (D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose und D-Fructose), Pentosen (L-Arabinose und D-Xylose) und Uronsäuren (D-Glucuron- und D-Galacturonsäure), die durch unterschiedliche Ausbildung der glycosidischen Verknüpfungen mit den verschiedenen Kohlenstoffatomen der einzelnen Zuckerbausteine eine fast unübersehbare Anzahl von verschiedenartigen Polysacchariden ergeben [1]. Sie werden in Homopolysaccharide bzw. Heteropolysaccharide eingeteilt, je nachdem, ob sie aus einer oder mehreren verschiedenartigen Monosaccharideinheiten aufgebaut sind. Mit den neun Monosacchariden aus Abbildung 1 lassen sich fast alle im Säugerorganismus vorkommenden Oligo- und Polysaccharide aufbauen [9].

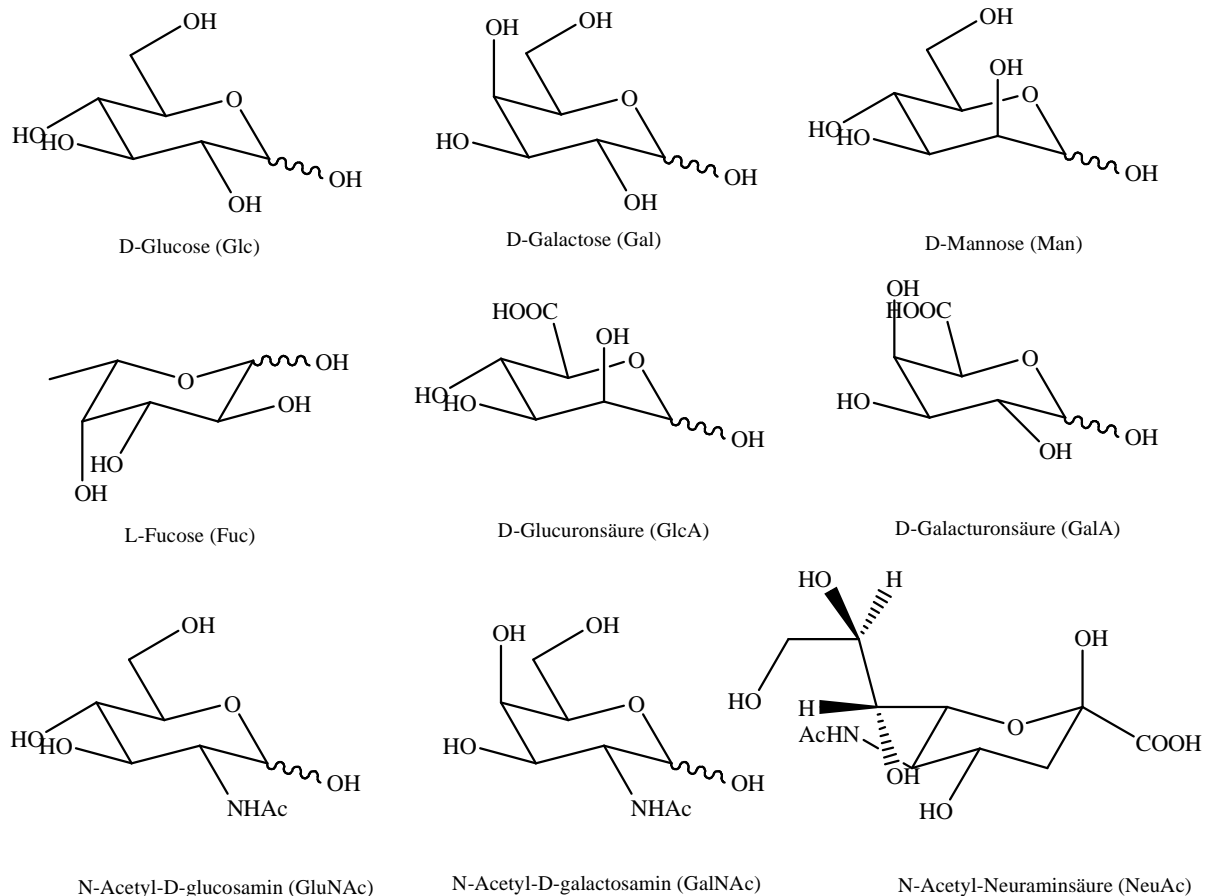


Abbildung 1: Neun Monosaccharide, die zur Biosynthese der meisten Oligo- und Polysaccharide im Säugerorganismus verantwortlich sind.

Monosaccharide, wie Glucose oder die isomeren Formen Mannose, Galactose oder Fructose lassen sich enzymatisch in alle anderen Biomoleküle umwandeln. Der Stoffwechsel aller Lebewesen basiert im Wesentlichen auf der Umsetzung von Glucose. Die Umsetzung der Glucose erfolgt oxidativ. Hierbei werden Kohlendioxid, Wasser und Energie gebildet. Die freigesetzte Energie wird in den Mitochondrien der Zelle in Form von neuem ATP gespeichert. Dieser Prozess läuft in den Zellen in drei Schritten ab:

- Bei der Glycolyse wird das Glucosemolekül in Verbindungen abgebaut, die noch sehr viel Energie enthalten.
- Im Zitronensäurezyklus werden die Endprodukte der Glycolyse zu Kohlendioxid abgebaut, außerdem entstehen wasserstoffreiche Verbindungen wie NADH und FADH_2 .
- Schließlich geben die wasserstoffreichen Verbindungen des Zitronensäurezyklus ihren Wasserstoff in der Atmungskette an das Sauerstoffmolekül ab. Die bei dieser Re-

aktion (exotherm) freigesetzte Energie wird zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat eingesetzt.

Sobald die Nahrungszufuhr den Bedarf übersteigt legen alle Organismen, in gewissem Maße auch Mikroorganismen, Nahrungsreserven an. Liegt zu einem späteren Zeitpunkt ein Nahrungsmangel vor, kann auf diese Reserven zurückgegriffen werden. Der Aufbau von Reserven geschieht bei Tieren und Pflanzen direkt nach der überschüssigen Energiezufuhr und bei den Mikroorganismen nur bei reichhaltiger C-Quelle und sobald andere Nahrungsingredienzien, z.B. Mineralstoffe, das Wachstum limitieren [9].

Bei den eingelagerten Energiereserven handelt es sich um wasserunlösliche, polymere Kondensationsprodukte der Monosaccharide. Niedermolekulare, wasserlösliche Monosaccharide würden den osmotischen Druck in den Zellen zu stark erhöhen. Diese Gefahr besteht bei den osmotisch inaktiven hochmolekularen Polysacchariden nicht. Da die Reservepolysaccharide rasch während der Nahrungszufuhr bzw. während der Kohlendioxid-Assimilation aufgebaut und ebenso rasch bei Bedarf wieder zu Monosacchariden abgebaut werden müssen, sind diese meist in Form von globulären Aggregaten eingelagert. Diese liefern dem enzymatischen Zugriff sehr viele Ansatzpunkte. Die Reservepolysaccharide fast aller Pflanzen und Tiere sowie vieler Mikroorganismen sind entweder Stärke, welche aus dem hochmolekularen Amylopektin und der niedermolekularen Amylose aufgebaut ist, oder das hochmolekulare Glykogen.

2.1.1 Stärke

Stärke befindet sich in allen Gewebeteilen grüner Pflanzen, vorwiegend aber in den für die Speicherung vorgesehenen Organen wie Getreidekörnern, Wurzelknollen, Früchten und Samen jeder Art [10]. Die Stärke liegt als Aggregat zweier Molekültypen, der Amylose und des Amylopektins, vor. Es existieren verschiedene Arten von Stärke mit unterschiedlichen Anteilen an Amylose (10 bis 30 %) und Amylopektin (70 bis 90 %). Die Amylose weist eine helicale Konformation auf und besteht aus etwa 200 bis 1.000 linear über α -1,4-glycosidische Verbindungen verknüpften Glucoseeinheiten, wobei jedes Makromolekül ein reduzierendes und ein nichtreduzierendes Ende aufweist.

Das Amylopektin hingegen ist hochverzweigt und besteht aus 2.000 bis 20.000 Glucoseeinheiten. Diese sind sowohl α -1,4-als auch α -1,6-glycosidisch verknüpft.

2.1.2 Glykogen

Das Reservepolysaccharid der Tiere und Pilze ist das Glykogen. Es weist eine ähnliche Struktur auf wie das Amylopektin. Im Gegensatz zu Amylopektin besitzt es jedoch eine dichtere Verzweigung. Bei Menschen wird das Glykogen in der Leber und in den Muskelzellen gespeichert. Bei Bedarf wird das Glykogen in den Zellen zu Glucose hydrolysiert [11].

2.1.3 Polysaccharid-Verbindungen (Glykokonjugate)

Die Verbindungen, in denen Kohlenhydrate kovalent mit Peptiden, Proteinen oder Lipiden verknüpft sind, werden als Glykokonjugate bezeichnet [12]. Die Untergruppen der Glykokonjugate sind die Glykoproteine, Glykopeptide, Peptidoglykane, Glykolipide und Lipopolysaccharide. Sie sind u.a. am Aufbau und der Struktur von Zellmembranen beteiligt.

Die Glykosylierung von Proteinen und Lipiden spielt in allen Organismen, einschließlich der Bakterien, vor allem aber in den hoch entwickelten Säugern eine wichtige Rolle. Diese Glykokonjugate sind Bestandteile der Zellmembran, wo sie verschiedene Funktionen bei Prozessen wie etwa der Zelladhäsion erfüllen [13]. Es handelt sich bei den Kohlenhydrat-Strukturen um Oligosaccharide von unterschiedlicher Größe und unterschiedlichem Verzweigungsgrad. Der Anteil an Kohlenhydraten bei Glykoproteinen kann zwischen wenigen Prozenten und mehr als der Hälfte der Gesamtmasse schwanken. Bei Glykolipiden überwiegt meist der Kohlenhydratanteil.

Die Lipopolysaccharide (LPS) gehören zu einer speziellen Klasse von Glykolipiden an, die in den Zellwänden von gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella* und *Shigella* vorkommen. LPS werden auch als Endotoxine bezeichnet und bestehen aus Lipid A, das zwei verknüpfte N-Acetylglucosaminreste und vier Fettsäureketten enthält. Lipid A wiederum ist mit einem Polysaccharid (die Polysaccharidkomponenten variieren von Spezies zu Spezies [14]) verbunden, welches aus einer Kernstruktur und einem variableren Bereich, der O-spezifischen Kette, besteht. Bei Bakteriolyse werden die Endotoxine freigesetzt, worauf der Wirt meistens mit Fieber reagiert. Hierbei werden die Wirtszellen dazu angeregt, endogene Pyrogene freizusetzen. Dabei handelt es sich um Proteine, die auf das Wärmesentrum im Gehirn einwirken. Der LD₅₀-Wert bei Mäusen liegt bei 200 bis 400 µg LPS pro Maus.

2.2 Polysialinsäure

2.2.1 Struktur der Polysialinsäure

Polysialinsäure stellt eine spezielle Gruppe der zahlreichen Oberflächenpolysaccharide dar, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vorkommen. Die Polysialinsäure ist dabei entweder an Glykolipide (Prokaryonten) oder über O- bzw. N-Glykane an Glykoproteine (Eukaryonten) gebunden. Sie besteht aus Monomeren der Sialinsäure, welche über glykosidische Bindungen verknüpft sind. Bei den Sialinsäuren handelt es sich um α -keto-Zucker, die neun Kohlenstoffatome besitzen. Am Kohlenstoff C_1 tragen sie eine Carboxylgruppe und an C_5 eine Aminogruppe [15].

Die 40 verschiedenen Derivate der Sialinsäure unterscheiden sich durch eine Substitution an der Amino- bzw. der Hydroxyfunktion [6]. Die drei häufigsten Baueinheiten der Polysialinsäure sind die 5-N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), die 5-N-Glycol-Neuraminsäure (Neu5Gc) und die 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (Kdn) (Abbildung 2).

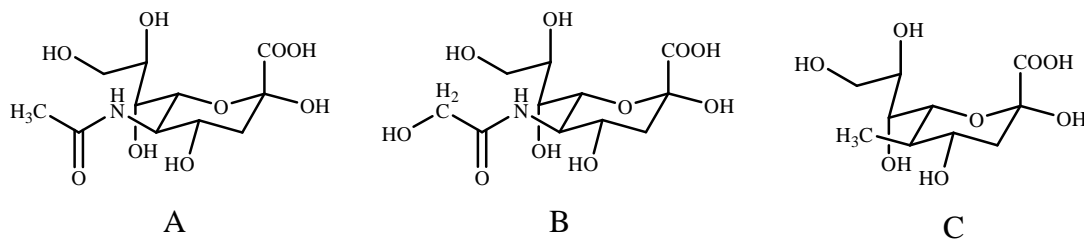


Abbildung 2: Struktur der häufigsten Baueinheiten der Polysialinsäure: 5-N-Acetyl-Neuraminsäure (A), 5-N-Glycol-Neuraminsäure (B) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (C).

Die Verknüpfung der 5-N-Acetyl-Neuraminsäuren kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: Das Polymer kann entweder α -2,8- oder α -2,9- verknüpft sein. Auch eine alternierende Verknüpfung der Polymere ist möglich [16]. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem α -2,8-verknüpften Polymer der Neu5Ac, da dieses im menschlichen Körper vorkommt (Abbildung 3).

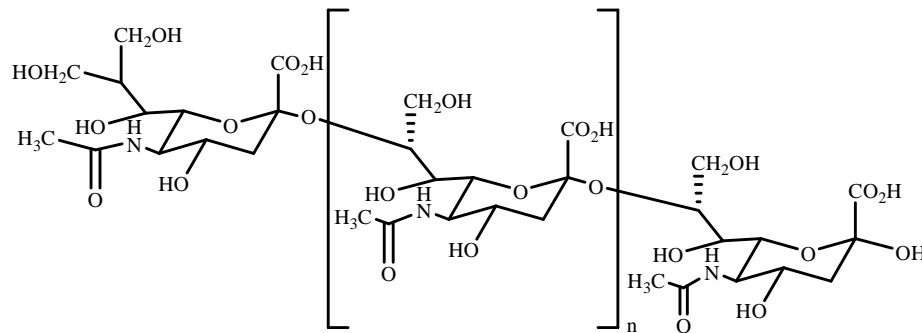


Abbildung 3: Die Struktur der Polysialinsäure aus α 2,8-verknüpften 5-N-Acetyl-Neuraminsäureeinheiten.

2.2.2 Vorkommen der Polysialinsäure

Die kommerziell erhältliche niedermolekulare α 2,8-verknüpfte poly-5-N-Acetyl-Neuraminsäure wird auch als Colominsäure bezeichnet [17]. Der Polymerisationsgrad liegt zwischen 30 und 70 Monomereinheiten.

Bakterien wie *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis* und *Pasteurella haemolytica* [18–22] produzieren Polysialinsäure, welche sich an die Zelloberfläche anlagert. Dort ist sie mit einem Phospholipidanker an die Zellmembran gebunden [16]. Diese Polymerschicht an der Bakterienoberfläche, auch Glycokalix genannt, fungiert als Schutzmantel (Abbildung 4). Diese in Bakterien synthetisierte Polysialinsäure ist chemisch und immunologisch identisch zu der Polysialinsäure, die im menschlichen Körper vorkommt. Aus diesem Grund erkennt die humane Immunabwehr solche Bakterien nicht als Fremdkörper. Überwinden diese ungehindert die Blut-Hirnschranke kann es zu einer Hirnhautentzündung oder einer Sepsis kommen [23].

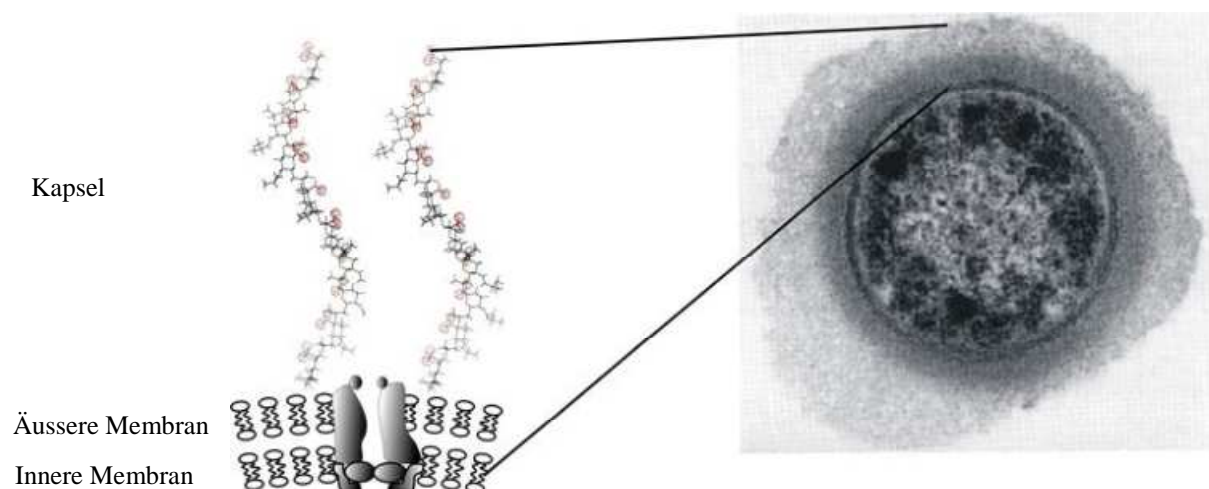


Abbildung 4: Oberflächenstruktur eines *E. coli* mit Glycokalix aus Polysialinsäure [24, 25].

Bei Vertebraten und insbesondere bei Säugetieren spielt Polysialinsäure bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle. Die Polysialinsäure ist überwiegend an das neurale Zell-Adhäsions-Molekül (NCAM), ein Zelloberflächenglycoprotein, gebunden [26, 27]. Hauptaufgabe ist dabei die Regulation der durch das NCAM vermittelten Zell-Zell-Kontakte. Durch sterische Hinderung und sich abstoßende negative Ladungen wirkt Polysialinsäure antiadhäsiv. Dadurch wird die Zelladhäsion verhindert (Abbildung 5).

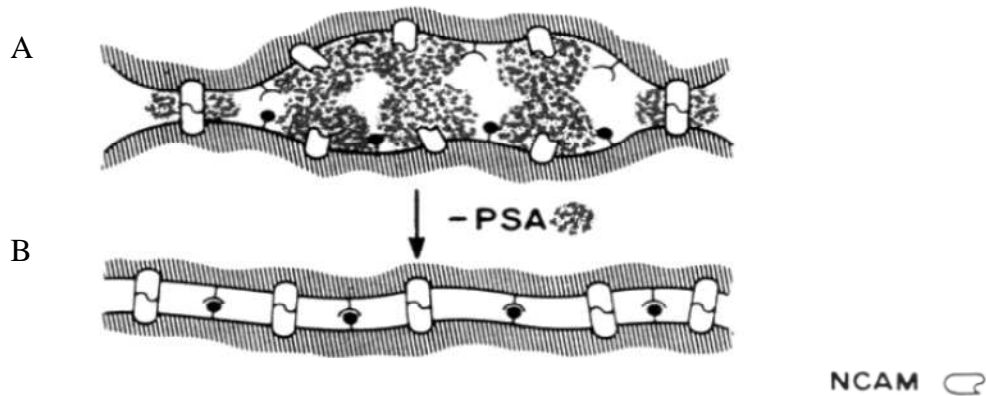


Abbildung 5: A) NCAM sind an Polysialinsäure gebunden, welche die Zell-Zell-Kontakte verringern. B) Ohne Polysialinsäure entstehen Kopplungen zwischen NCAM verschiedener Membranen, wodurch sich Zellagglomerate bilden [28].

Zudem nimmt die Polysialinsäure eine bedeutende Stellung bei der Zellmigration ein, z.B. durch Leitung und Verzweigung von Axonen und der Ausbildung von Synapsen [16, 29]. Die Polysialinsäure ist im menschlichen Körper nicht nur an der Anbindung an das neurale Zelladhäsionsmolekül beteiligt, sondern findet sich auch in der Muttermilch, der Niere, dem Herz, der Pankreas und in Natriummembrankanälen wieder [30–32].

Die chemisch relativ stabile Polysialinsäure kann gezielt durch den Einsatz spezieller Enzyme (Endosialidasen) abgebaut werden, welche im *E.coli* K1 Wildtyp Stamm U9/41 vorkommen [33]. Diese Enzyme sind im menschlichen Körper nicht vorhanden. Zudem existiert kein Metabolismus für den Abbau von Polysialinsäure. Daher besitzt Polysialinsäure eine lange Halbwertszeit im Körper. Diese Eigenschaften führen zu der Annahme, dass Polysialinsäure ein möglicherweise ideales Gerüstmaterial für die biomedizinische Geweberegeneration darstellt [34].

2.2.3 Enzymatische und Biotechnologische Produktion der Polysialinsäure

Darstellungsmethoden der Polysialinsäure

Eine vollsynthetische Darstellung der Polysialinsäure ist sehr aufwendig und kompliziert. Es bilden sich bei der Synthese verzweigte Heteropolymere, da die glycosidische Verknüpfung der Monomere schwer steuerbar ist. Daher werden sie überwiegend aus tierischen Materialien, Zellen oder Bakterien isoliert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der enzymatischen Herstellung von Polysialinsäure.

Bei der Produktion von Polysialinsäure durch eine enzymatischen Reaktion werden zwei Enzyme, CMP-Sialinsäure Synthetase [35] und Polysialyltransferase [36] verwendet (Abbildung 6). Die Produktion der Enzyme erfolgt aus unterschiedlichen Pro- und Eukaryonten.

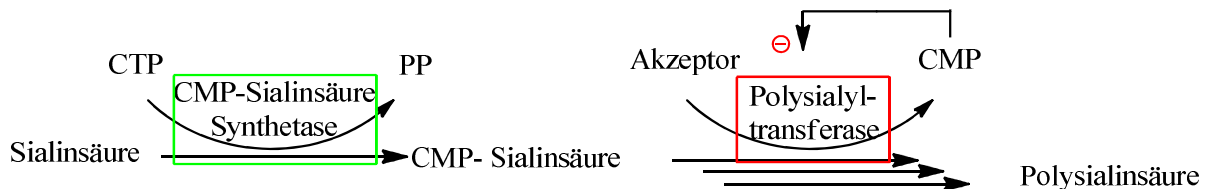


Abbildung 6: Die enzymatische Synthese von Polysialinsäure. Abkürzungen: CMP, Cytidin 5-monophosphat; CTP, Cytidin 5-Triphosphat; CMP-Sialinsäure, Cytidin 5-monophospho-N-Acetyl-Säure; PP, Pyrophosphat.

Die Produktionsmengen mit der enzymatischen Reaktion liegen im Milligramm-Bereich [37]. Eine Erhöhung der Produktionsmenge kann über eine cyclische Reaktion, entwickelt von Wong et al. [38, 39] erfolgen (Abbildung 7). Im System wird dabei CMP zu CDP durch Nukleosid- Monophosphat-Kinase (NMK) oder Myokinase (MK) in Gegenwart von ATP katalysiert. Das ATP wird aus ADP in Gegenwart von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch die Pyruvatkinase (PK) gebildet. CDP reagiert weiter zu CTP mit PEP, katalysiert mit PK. Anschließend reagiert CTP mit Sialinsäure in Gegenwart von CMP-Sialinsäure-Synthetase zu CMP-Sialinsäure. Schließlich erfolgt die Sialylierung von CMP-Sialinsäure mit dem Akzeptor (z.B. Sialinsäure) zu Oligosialinsäure. Durch mehrere Wiederholungen des Zyklus unter Verwendung der Oligosialinsäure als Akzeptor bildet sich schließlich Polysialinsäure.

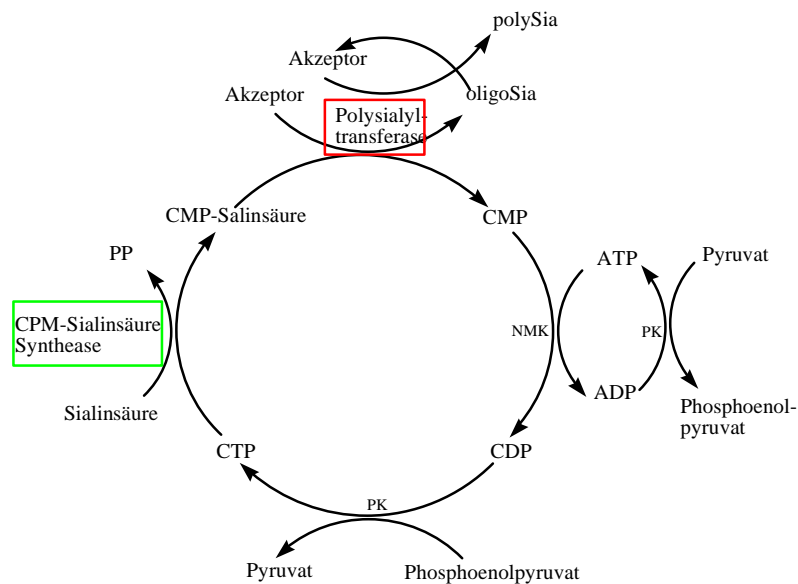


Abbildung 7: Die cyclische, enzymatische *in vitro*-Synthese von Polysialinsäure. Abkürzungen: ADP, Adenosin-5-Diphosphat; ATP, Adenosin-5-Triphosphat; CMP, Cytidin-5-monophosphat; CDP, Cytidin-5-Diphosphat; CTP, Cytidin-5-Triphosphat; CMP-Sialinsäure, Cytidin-5-monophospho-N-Acetyl-Säure; PP, Pyrophosphat; PK, Pyruvatkinase; NMK, Nucleosidmonophosphat Kinase; polySia, Polysialinsäure; oligoSia, Oligosialinsäure.

Die Ausbeute dieser Reaktion mit anschließender Aufreinigung liegt bei 64 % [25]. Da die verwendeten Enzyme derzeit nicht in großen Mengen zu Verfügung stehen, kann die enzymatische *in vitro*-Darstellung nicht im großen Maßstab durchgeführt werden.

Die einfachste Methode zur Gewinnung von Polysialinsäure stellt die Isolierung aus Mikroorganismen dar. Die Bakterien *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis* B bilden auf der Zelloberfläche Polysaccharide aus, die absolut strukturidentisch mit der im menschlichen Körper vorkommenden Polysialinsäure sind. Eine Vermehrung dieser Bakterien mit anschließender Isolierung und Aufarbeitung der Polysialinsäure stellt aus ökonomischer Sicht eine sinnvolle Alternative zum Aufskalieren des Produktionsprozesses dar.

Biosynthese von Polysialinsäure

Im Folgenden soll am Beispiel von *Escherichia coli* K1 die Biosynthese von Polysialinsäure beschrieben werden.

Sämtliche Gene für die Biosynthese von Polysialinsäure sind in einem *kps* (Transport ATPase)-Genkomplex lokalisiert, der in drei Regionen unterteilt ist (Abbildung 8). Die Gene der für die Synthese benötigten Enzyme befinden sich in Region 2, von denen *neuE* (Polysialinsäure Translokase) die Initiation und *neuS* (Polysialylsynthetase) die Elongation ausfüh-

ren. Die Regionen 1 und 3 enthalten u.a. die Gene *kpsT* (Transport ATPase T) und *kpsM* (Transport ATPase M) zur Translokation von Polysialinsäure [40].

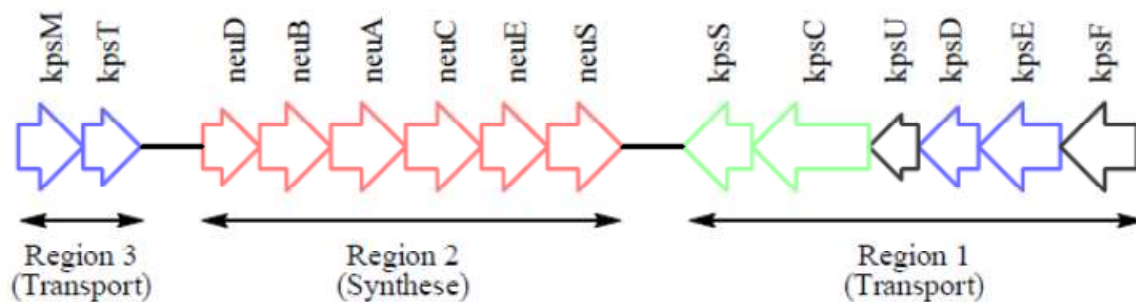


Abbildung 8: Genorganisation für die Ausbildung der Polysialinsäure-Kapsel von *Escherichia coli* K1. Die rot markierten Gene sind für die Polysialinsäure-Biosynthese verantwortlich, die blauen Bereiche für den Transport und die grünen für die Übertragung der Polysialinsäure auf den Phospholipidanker [19].

Der vollständige Biosyntheseweg von der Glucose bis hin zur Polysialinsäure in *E. coli* K1 ist in Abbildung 9 dargestellt. Der Ausgangsstoff für die Synthese von N-Acetylneuraminsäure (NeuAc) in der Zelle ist N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), welches aus Glucose über die Zwischenstufen Fructose-6-Phosphat (Fru-6-P) und Glucosamin (GlcNH₂) produziert wird. Über eine enzymatische Katalyse von GlcNAc wird N-Acetylmannosamin (ManNAc) durch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase (NeuC) gebildet. Die Reaktion von ManNAc zu 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) verläuft über zwei Zwischenprodukte mit Hilfe der Neu5Ac-Synthetase (NeuB) und Phosphoenolpyruvat (PEP) [41]. Für die nachfolgende Polymerisation wird Neu5Ac vorerst durch Cytidintriphosphat (CTP) aktiviert. Diese Aktivierung wird durch die CMP-NeuAc-Synthetase (NeuA) ermöglicht. Die Polymerisation erfolgt in Richtung des nichtreduzierenden Endes durch das Enzym poly- α 2,8-Sialyltransferase (NeuS). Das Endprodukt Sialinsäure wird schließlich über ein aktives ATP-bindendes System (*ATP-binding cassette*) mit Hilfe des ABC-Transporters an die Zelloberfläche transportiert. Ein ABC-Transporter wird generell aus einer transmembranen (TMD) und einer ATP-bindenden (ABD) Domäne gebildet. In *E. coli* K1 besteht der polySia-Transporter aus *kpsM* und *kpsT* [23]. Dabei übernimmt *kpsM* die Aufgabe der TMD und *kpsT* die ATP-bindende Domäne (ABD). Entscheidend für den Transport ist wahrscheinlich die über das *kpsSC* vermittelte Knüpfung der Polysialinsäure an den Diacylglycerophosphatrest [42].

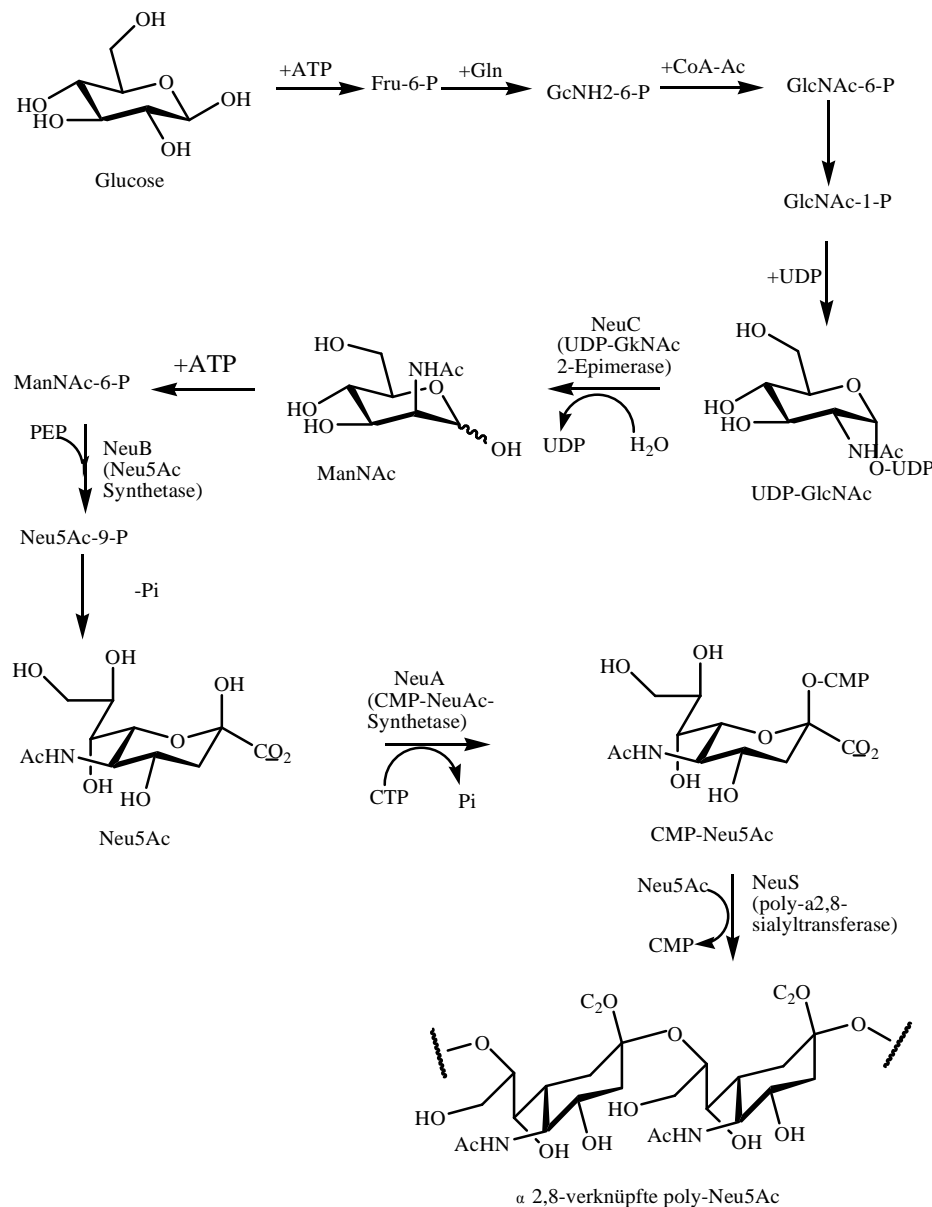


Abbildung 9: Syntheseweg von Polysialinsäure ausgehend von Glucose [43].

Isolierung der Polysialinsäure

Die Isolierung der Polysialinsäure kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Zum einen über Fällungsreaktionen [44–46], zum anderen über chromatographische Methoden [47]. Bei den Fällungsreaktionen wird versucht, den Anteil an Kontaminanten zu reduzieren bzw. die Polysialinsäure zu fällen. Dazu sind viele Reagenzien erforderlich. Die angegebenen Ausbeuten liegen laut Literatur zwischen 17 und 56 % [44, 45]. Bei der chromatographischen Aufreinigung werden die Interaktionschromatographie (HIC, Octyl Separose) und Ionenaustauschchromatographie (IEC, Q-Sepharose) verwendet [47]. Die Ausbeuten liegen dabei zwischen 55 und 60 %. Im Vergleich zu den Fällungsreaktionen stellen chromatographische Ver-

fahren eine sehr gute Alternative dar, jedoch sind die Anschaffungskosten dieser Materialien im Großmaßstab sehr hoch. Dies kann durch kostengünstigere Materialien wie z.B. Membranadsorber oder Tonminerale behoben werden.

3. Design of Experiments

Die statistische Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE) ist eine Methode zur effizienten Planung und Auswertung von Versuchsreihen. Diese Methode wurde bereits in den 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts entwickelt. Im Jahr 1935 wurde hierzu das erste Fachbuch von R.A. Fischer veröffentlicht. Die statistische Versuchsplanung setzte sich jedoch weltweit erst 1980 als Methode durch. Die Grundlage dieser Methode beruht auf einem mathematischen Modell, das es ermöglicht, alle potenziellen Einstellvariablen gleichzeitig zu untersuchen und dabei statistisch sichere Rückschlüsse auf alle einzelnen Faktoren zu ziehen. Die Versuchsergebnisse werden beim DoE zusammen betrachtet und nicht einzeln, wie es bei klassischen Methoden der Fall ist. Dadurch werden die Einflüsse experimenteller Fehler auf die Ergebnisse minimiert [48]. Die statistische Versuchsplanung besitzt gegenüber klassischen Methoden viele Vorteile (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Gegenüberstellung der klassischen Methoden und *Experimental Design* Methode

Klassische Methoden	<i>Experimental Design</i> Methode
<ul style="list-style-type: none"> • eine Variable zur Zeit verändert • Wechselwirkungen zwischen den Variablen können nicht bestimmt werden • eine Vielzahl an Versuchen sind notwendig • nur sinnvoll bei wenigen Variablen • Verifikation eines vorhandenen theoretischen Modells • anfällig für „Vorurteile“ • keine deskriptive Statistik • Aufbau der Experimente nicht einfach, oft Wiederholung aller Experimente nötig 	<ul style="list-style-type: none"> • alle Variablen gleichzeitig verändert • Wechselwirkungen ergeben sich unmittelbar aus dem Design • vergleichsweise wenig Versuche notwendig • immer sinnvoll, besonders bei vielen Variablen • Erstellung eines empirischen, polynomialen Modells • gut zur Beseitigung von „Vorurteilen“ • Statische Modelle und Methoden sind Grundlage • einfache Erweiterung der Experimente

Die Wahl der Designs hängt von verschiedenen Bedingungen, wie Aussehen des Konfigurationsraums, benötigter Zeit, linearen oder quadratischen Zusammenhängen ab. Je nach Bedingung kann einer der folgenden Pläne gewählt werden:

- Vollständiger Versuchsplan (*full factorial design*)
 - alle Ausprägungskombinationen aller Faktoren (Einflussgrößen)
- Unvollständiger Versuchsplan (*fractional factorial design*)
 - nur Teile der möglichen Faktorstufenkombination, Extremfall sind *Screening-Pläne* (Plackett-Burman-Pläne)
- Taguchi-Plan
 - wenn minimale Abhängigkeiten von Störgrößen erwünscht
- Zentral zusammengesetzter Plan (*central composite design*)
 - Wenn quadratische Effekte vermutet werden
- D-optimaler Plan
 - Wenn nicht alle Faktorstufenkombinationen realisierbar sind

3.1 Vollständiger Versuchsplan

Bei einem vollständigen Versuchsplan werden für jeden untersuchten Faktor (Einflussgröße) zwei Einstellungen (Faktorstufen) untersucht. Diese werden mit -1 und +1 bezeichnet. Abbildung 10,B zeigt, dass für zwei untersuchte Faktoren alle möglichen Faktorstufenkombinationen untersucht werden. Bei klassischen „one-factor-at-a-time“ werden die Faktoren separat untersucht (Abbildung 10, A).

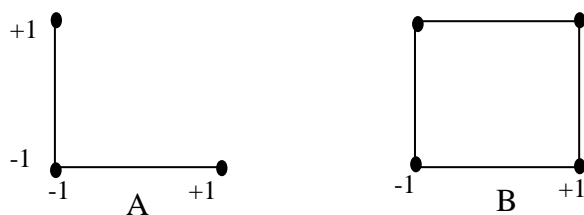


Abbildung 10: One-factor-at-a-time (A) und vollständiger Versuchsplan (B).

3.2 Unvollständiger Versuchsplan

Beim unvollständigen Versuchsplan werden nicht alle möglichen Faktorstufenkombinationen untersucht.

Die Anzahl der Faktorstufenkombinationen m nimmt bei vollständigen Versuchsplänen mit der Anzahl der Faktoren k mit $m = 2^k$ zu. Die zwei beschreibt dabei die Anzahl der Niveaus der ausgewählten Faktoren (low (-1) und high (+1)). Aus acht Faktoren werden z.B. 256 Kombinationen erhalten. Durch den hohen Versuchsaufwand besteht die Gefahr einer Vertauschung von Versuchseinheiten. Ebenso ist es unmöglich, die Einzelversuche unter identischen Randbedingungen durchzuführen.

Mit zunehmender Anzahl der Faktoren nimmt auch die Anzahl der Wechselwirkungen zu. Häufig sind diese Wechselwirkungen schwach und können daher vernachlässigt werden [49]. Durch die Vernachlässigung einiger Faktorkombinationen entstehen weniger Wechselwirkungen. Daher können unvollständige Faktorpläne genutzt werden, die mit weniger Experimenten auskommen, z.B. $m = 2^{k-1}$.

Die Geometrie eines unvollständigen 2^{3-1} Faktorplans ist in Abbildung 11 dargestellt. Der unvollständige Faktorplan benötigt vier Versuche und bei vollständigem Faktorplan sind alle Ecken des Würfels mit Versuchen besetzt.

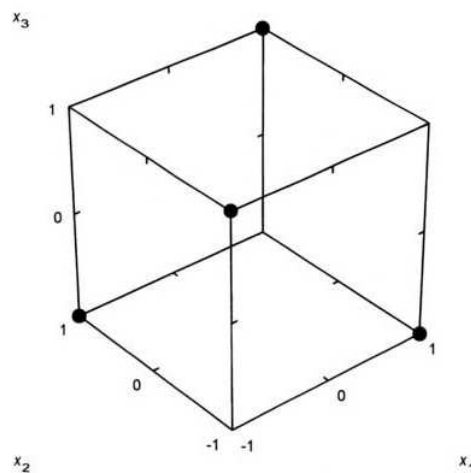


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Planmatrix eines unvollständigen 2^{3-1} Faktorplans [49].

Die *Screening*-Pläne nach Plackett und Burman sind sehr verbreitet, sodass mit m Versuchen die Haupteffekte von bis zu $k = m-1$ Faktoren untersucht werden können. Sie sind demnach für die ersten *Screening*-Versuche sehr gut geeignet. Eine Voraussetzung hierbei ist, dass die Anzahl der Versuche durch vier teilbar sein muss.

Bei der Versuchsplanung sollten folgende Grundsätze beachtet werden [50]:

- Wichtigste Entscheidung ist, welche Einflussgrößen (Faktoren) untersucht werden sollen und wie die Auswirkungen der Faktoren überhaupt gemessen werden können.
- Die Versuche sollten zweifach durchgeführt werden, um die Versuchsfehler zu bestimmen.
- Die Versuche müssen in völlig zufälliger Reihenfolge ausgeführt werden, um systematische Fehler, z.B. durch Gerätedrift zu vermeiden.
- Um den Versuchsfehler klein zu halten, sollten identische Versuchsbedingungen vorliegen.
- Eine verlässliche Auswertung wird durch einen symmetrischen Aufbau erreicht.

Bei Berücksichtigung dieser Grundsätze kann der Versuchsfehler bestimmt und eventuell aufgetretene systematische Fehler erkannt werden.

3.3 Auswertung von Faktorplänen

Mit Hilfe multipler linearer Regression können Faktorpläne ausgewertet werden. Zudem werden die statistisch signifikanten Einflussgrößen erhalten. Durch die multiple Regression wird der Einfluss einer Anzahl von unabhängigen Variablen x_i auf eine abhängige Variable y untersucht, d.h. die Stärke des Einflusses des jeweiligen Parameters auf die Messwerte:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot x_i \quad (1.1)$$

Bei Verwendung eines orthogonalen Versuchsplans mit codierten Variablen (-1, +1 bzw. -1, 0, +1) können die erhaltenen partiellen Regressionskoeffizienten b_i direkt als die Einflussstärken der jeweiligen Einflussfaktoren x_i auf den Messwert interpretiert werden, sofern sie signifikant von Null verschieden sind [49].

Ergebnisse und Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Produktion und Aufreinigung der humanidentischen Polysialinsäure aus *E.coli* K1 sowie in der Herstellung der Oligosialinsäure. Zunächst wird in Kapitel 4 die Produktion der Polysialinsäure im 10 L Bioreaktor beschrieben. Dabei wurde versucht, durch Gestaltung der Kultivierung als Fed-Batch-Verfahren die Ausbeuten zu erhöhen. Neben der Ausbeute sollte auch der Polymerisationsgrad als Funktion der Kultivierungsbedingungen (Batch- und Fed-Batch-Betrieb) untersucht werden. Anschließend wurde der Bioprozess bezüglich der selektiven Beeinflussung der Polymerlänge aufskaliert.

In Kapitel 5 wird der Downstream-Prozess zur Isolierung von Polysialinsäure aus den Kulturbrühen vorgestellt. Dabei wird auf Basis der Aufreinigungsmethode von Rode *et. al.* (2008) ein neuer Downstream-Prozess entwickelt und etabliert. Hierzu werden Anionenaustauscher-Membranen und anorganische Tonminerale verwendet.

Abschließend wird im Kapitel 6 die Produktion von Oligosialinsäure vorgestellt. Die Oligosialinsäure fällt bei Produktion der Polysialinsäure als Nebenprodukt an. Zudem kann sie gezielt durch einen enzymatischen Verdau produziert werden.

4 Produktion von Polysialinsäure

Für die Produktion von Polysialinsäure (polySia) wurde der Stamm *Escherichia coli* (*E. coli*) K1 B2032/82¹ verwendet. Die Produktion der Polysialinsäure aus *E.coli* K1 erfolgte in den meisten Fällen in einem 10 L Bioreaktor entweder im Batch - oder im Fed-Batch-Betrieb. Bei der verwendeten Bioreaktoranlage handelt es sich um ein Biostat C (10 L) (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen). Zusätzlich fand ein Scale-up auf 24 L im Biostat UD (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) ebenfalls entweder im Batch - oder im Fed-Batch-Betrieb statt. Während dieser Kultivierungen wurde der Polymerisationsgrad der hergestellten polySia verfolgt. Die genaue Beschreibung der Anlagen und Durchführungen sind im Kapitel 8.3 zu finden. Als Medium diente ein definiertes Medium bestehend aus Glucose, Ammoniumsulfat und Kaliumphosphat-Puffer, das sich bereits für die preisgünstige polySia-Produktion bewährt hatte [44, 46]. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist Kapitel 8.2 zu entnehmen. Für die automatischen *Online*-Aufzeichnungen von Temperatur, Rührerdrehzahl, Gelöstsauerstoffgehalt (pO₂), Abgaszusammensetzung (CO₂ und O₂) und pH-Wert wurde die RISP-Software (*realtime integrating software platform*, Institut für Technische Chemie,

¹ Zur Verfügung gestellt von Prof. Gerardy-Schahn, MHH.

Hannover) verwendet. Die pH-Regelung erfolgte über die DCU (*digital control unit*) des Reaktors. Zusätzlich wurden aus den Kultivierungen *Offline*-Proben entnommen und die polySia-, Protein-, Acetat- sowie Glucosekonzentration und die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt (siehe Kapitel 8.5). Der Biostat C wurde mit 100 mL einer ausgewachsenen *E. coli* K1 Vorkultur (37 °C , 130 min^{-1} , 8-10 h, Optische Dichte (OD_{600}) von 6) angeimpft, welche zuvor in LB-Medium wuchs. Zur Inokulierung des Biostat UD (24 L) wurden 200 mL Vorkultur verwendet.

4.1 Biostat C

4.1.1 10 L Batch-Kultivierung

Für die Produktion und Untersuchung der polySia wurden Batch-Kultivierungen im 10 L Bioreaktor durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen für die 10 L Batch-Kultivierung wurden aus vorherigen Arbeiten übernommen [43, 44]. Die Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Kultivierungsbedingungen für die polySia Produktion aus *E. coli* K1 im 10 L Bioreaktor im Batch-Betrieb (Biostat C).

Kultivierungsbedingungen	(Batch 10 L)
Temperatur	37 °C
Rührgeschw.	1000 min^{-1}
pH	7,5
Begasung	10 L min^{-1}

Der Verlauf einer typischen 10 L Kultivierung im Batch-Betrieb ist in der Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Die Batch-Kultivierung wurde mit einer Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} gestartet (Abbildung 12). Es ist zu erkennen, dass die Zellen eine kurze lag-Phase zu Beginn der Kultivierung aufweisen. Vermutlich sind nach 1 h die Restbestandteile des Komplexmediums aus der Vorkultur verbraucht und die Zellen gehen nach einer Adaptionszeit von 6 h in die exponentielle Phase über. In diesem Zustand verbleiben sie bis die Glucose nach ca. 9 h verbraucht ist. Die Kultivierung wurde direkt nach dem Verbrauch der Glucose gestoppt, um die Konzentration an Kontaminanten im Medium möglichst gering zu halten. Bei den Kontaminanten handelt es sich hauptsächlich um DNA, RNA aus der Zelle, Endotoxine und Proteine. Daher wurde während der Kultivierung zusätzlich die Proteinkonzentration bestimmt, sie betrug nach 9 h Kultivierung 194 mg L^{-1} . Die maximale BTM er-

reichte in der Kultivierung einen Wert von $8,6 \text{ g L}^{-1}$. Die polySia Konzentration wurde ausschließlich im Medium bestimmt, da 60-80 % der polySia sich in der Kulturbrühe befinden [43]. Der Anteil polySia, welcher sich noch auf der Zelloberfläche der *E.coli* befand, wird während der Aufreinigung verworfen. Die Konzentration der polySia betrug nach der Kultivierung $0,37 \text{ g L}^{-1}$. Die berechnete Wachstumsrate beträgt in der exponentiellen Phase zwischen 6 und 8 h $0,51 \text{ h}^{-1}$. Es ergibt sich dementsprechend eine Generationszeit von 81 min.

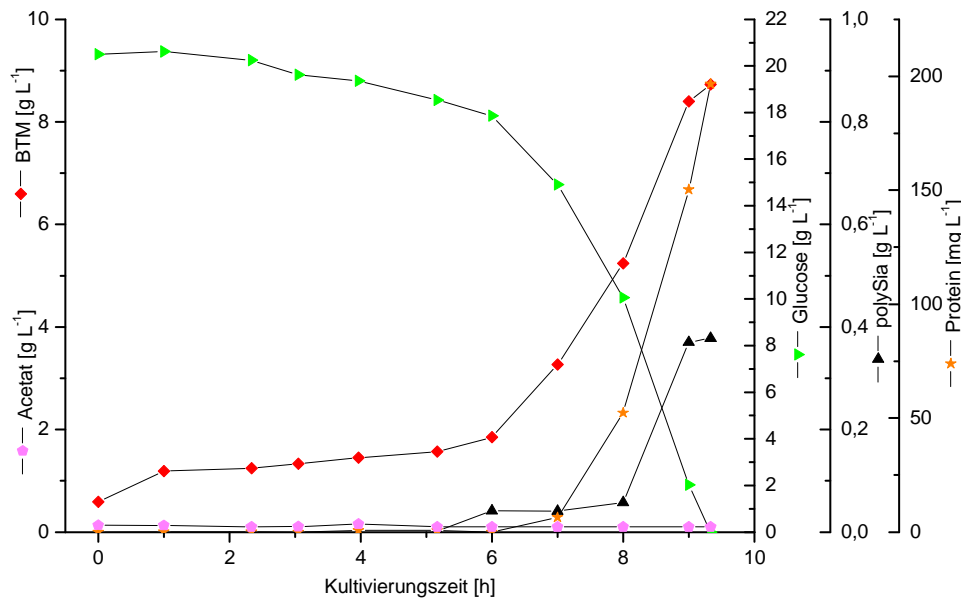


Abbildung 12: Dargestellt sind die *Offline* Daten der 10 L Batch-Kultivierung von *E.coli* K1 im Biostat C.

In Abbildung 13 sind der Kohlenstoffgehalt im Abgas, der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium, die berechnete Sauerstoffeintragsrate (OTR, *oxygen transfer rate*), die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CPR, *carbon production rate*) und der Respirationskoeffizient (RQ) dargestellt. Der Respirationskoeffizient (RQ) gibt das Verhältnis von Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CPR) zur Sauerstoffeintragsrate (OTR) wieder. Für die Bilanzierung eines Bioprozesses sind insbesondere die OTR, CPR und der RQ von Bedeutung (siehe Kapitel 8.9). Der Gelöstsauerstoff fiel von 100 % auf 41 % ab, d.h. während der gesamten Kultivierung ist ein ausreichender Sauerstoffgehalt vorhanden. Dies wird auch durch die OTR-, CPR- und RQ-Werte bestätigt. Der RQ-Wert liegt bei den aeroben Kultivierungen bei ≤ 1 . Ein Wert über 1 weist auf anaerobe Kultivierungsverhältnisse hin [51]. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist steigt der RQ-Wert in der lag-Phase über 1. Dies liegt an den kleinen Werten der CPR und OTR, die zu Beginn der Kultivierung mit großen Fehlern behaftet sind und damit in diesem Bereich ungenauer werden. In der exponentiellen Phase liegt der RQ-Wert bei 1, d.h. der

Stoffwechsel der Zellen unterliegt in diesem Zeitraum keinerlei Veränderung und der gesamte verbrauchte Sauerstoff findet sich im gebildeten Kohlenstoffdioxid wieder. Der Kohlenstoffdioxid-Anteil im Abgas verläuft gegensätzlich zum Gelöstsauerstoffgehalt.

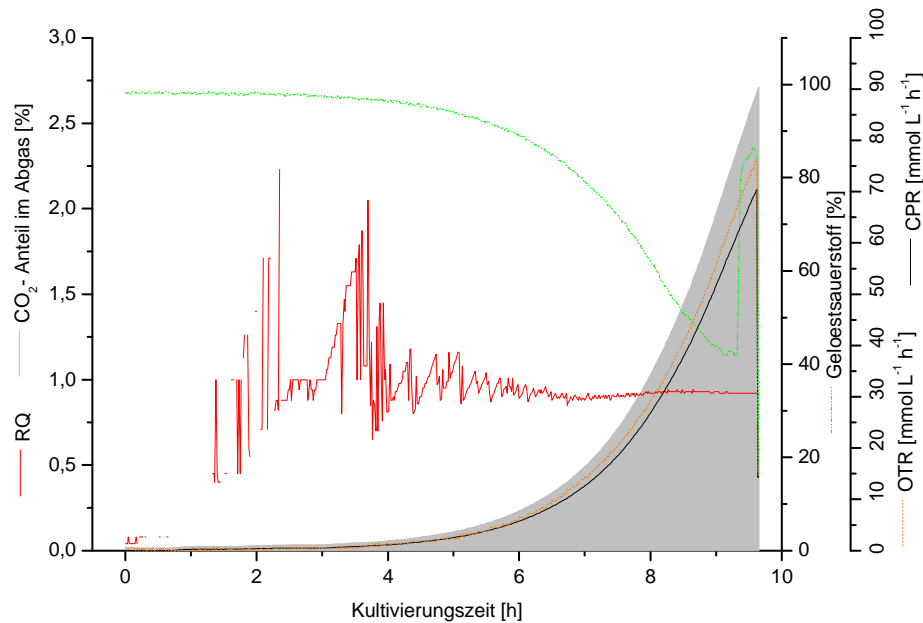


Abbildung 13: *Online*-Daten der 10 L Batch-Kultivierung von *E. coli* K1 im Biostat C. Dargestellt sind der CO_2 -Anteil im Abgas (grau unterlegt), Gelöstsauerstoff, OTR, CPR und RQ in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

4.1.2 10 L Fed-Batch-Kultivierung

Nach den Batch-Kultivierungen wurden Fed-Batch-Kultivierungen im 10 L Maßstab durchgeführt. Das primäre Ziel dabei ist, die Produktionsmenge an polySia und die Ausbeutekoeffizienten zu erhöhen. Zudem sollte kein Acetat gebildet werden. Die Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Medium und Kultivierungsbedingungen für die polySia-Produktion in *E. coli* K1 im 10 L Bioreaktor im Fed-Batch-Betrieb.

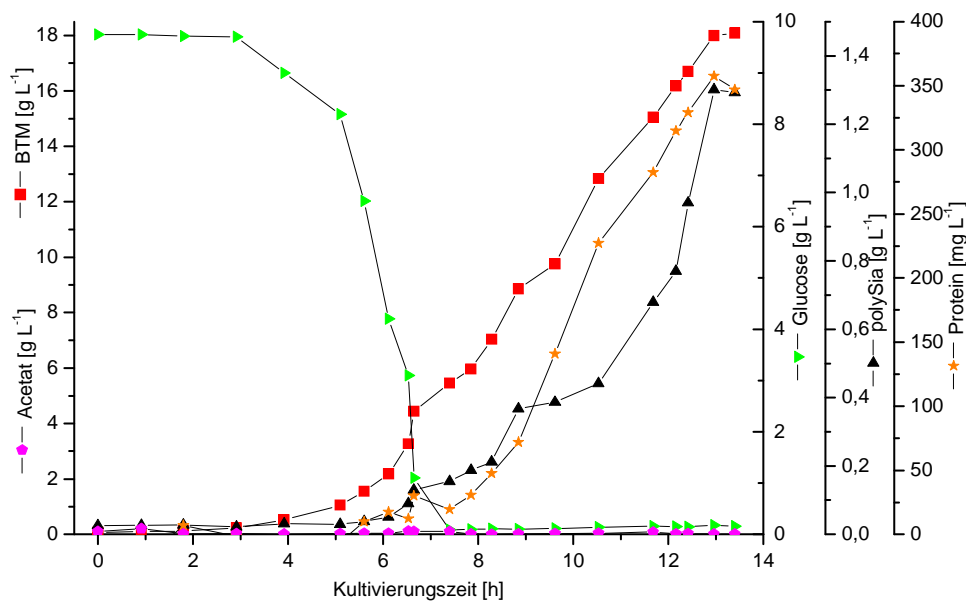
Synthetisches Medium (Start / Feed)			Bedingung	Batch / Fed-Bach
Substrat	Glucose	10 g L ⁻¹ / 200 g L ⁻¹	Temperatur	37 °C
N-Quelle	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g L ⁻¹ / -	Rührgeschw.	1000 min ⁻¹ / 150-1300 min ⁻¹
Puffer	KPP	0,08 M / 0,08 M	pH	7,5
Salzlösung		1 mL L ⁻¹ / 1 mL L ⁻¹	Begasung	10 L min ⁻¹ / 1,5-10 L min ⁻¹

Die Fed-Batch-Kultivierung wurde mit einer Glucosekonzentration von 10 g L^{-1} gestartet (Abbildung 14). Nach dem Verbrauch der Glucose bei $7,3 \text{ h}$ ($\mu = 0,69 \text{ h}^{-1}$), beobachtet durch den Anstieg des Gelöstsauerstoff (Abbildung 15), wurde die Fed-Batch-Regelung mit einer eingestellten Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ gestartet ($\mu_{\text{cal}} = 0,28 \text{ h}^{-1}$, berechnet aus den *Offline*-Daten). Für die Regelung der Fed-Batch-Kultivierung wurde basierend auf Substratlimitierung und für einen idealen Rührkesselreaktor ein Modell auf Basis der Monod-Kinetik entwickelt (siehe Kapitel 8.8) [52]. Das entwickelte Modell kann numerisch über einem Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung gelöst werden. Dies erfolgte hier *Online* mit dem MS-DOS Programm Neu-ork (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover). Die Startwerte der Fed-Batch-Regelungen befinden sich in der Tabelle 4. Nach dem Start der Regelung wurde die Feed-Pumpe angesteuert, so dass eine Substratlimitierung im Bioreaktor herrschte. Die Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase lag bei ca. $0,1 \text{ g L}^{-1}$.

Tabelle 4: Startwerte für das Neu-ork-Programm.

Parameter	$X(t_0)^a$ [g L ⁻¹]	$V_R(t_0)^b$ [L]	$S(t_0)^c$ [g L ⁻¹]	S_0^d [g L ⁻¹]	$Y_{X/S}^e$ [g g ⁻¹]	K_M^f [g L ⁻¹]	$\mu_{\text{set}}(t_0)^g$ [h ⁻¹]
Werte	7,2	8	0,1	200	0,5	0,01	0,30

^a Biomasse nach Batch-Phase; ^b Reaktorvolumen; ^c Substratkonzentration nach Batch-Phase; ^d Substratkonzentration der Feed-Lösung; ^e Ausbeutekoeffizient Biomasse/Produkt; ^f Monod-Konstante; ^g Eingestellte Wachstumsrate

Abbildung 14: *Offline*-Daten der 10 L Fed-Batch Kultivierung von *E.coli* K1 im Biostat C.

Während der Fed-Batch Kultivierung wurde der Anteil an Gelöstsauerstoff bei 30 % gehalten (Abbildung 15). Hierzu wurde mit Hilfe der DCU des Bioreaktors die Begasungsrate und Rührgeschwindigkeit geregelt. Die Begasungsrate wurde von 1,5 auf 10 L min⁻¹ während der Fed-Batch erhöht, dies erfolgte innerhalb von 5 min. Um trotzdem den Anteil an Gelöstsauerstoff auf 30 % zu halten, wurde zusätzlich die Rührgeschwindigkeit automatisch erhöht. Nach dem Verbrauch der Feed-Lösung (2 L) stieg der Gelöstsauerstoffgehalt abrupt an und die Rührgeschwindigkeit sank. Dies weist genau wie die erhaltenen CO₂-Abgaswerte darauf hin, dass die exponentielle Phase nach genau 13,6 h beendet ist. Nach der Kultivierung wurde eine BTM von 18 g L⁻¹ gemessen. Die polySia-Konzentration lag bei 1,3 g L⁻¹ und die Proteinkonzentration bei 340 mg L⁻¹.

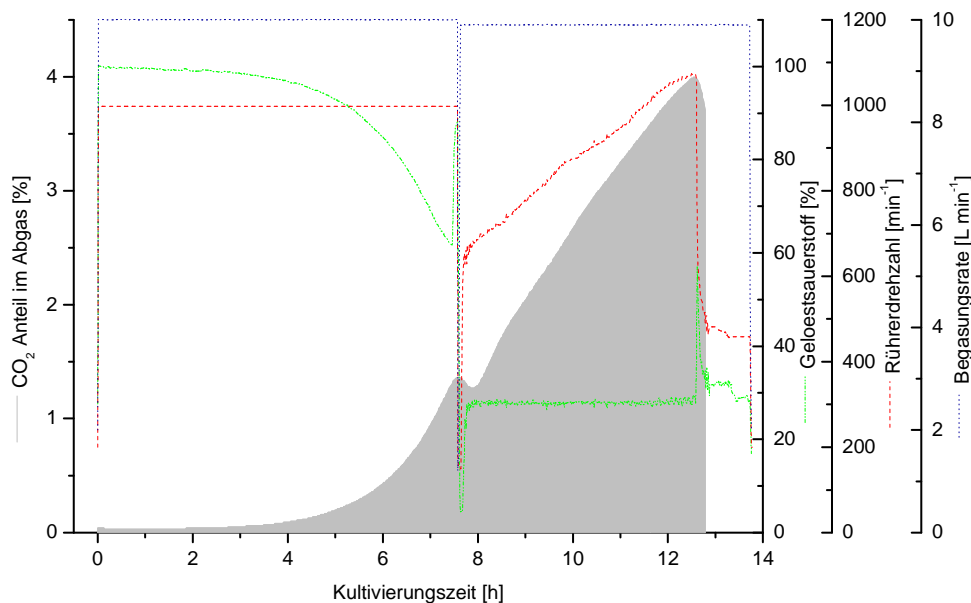


Abbildung 15: Online-Daten der 10 L Fed-Batch Kultivierung von *E. coli* K1 im Biostat C. Dargestellt sind der CO₂-Anteil (grau unterlegt), Gelöstsauerstoff, Rührerdrehzahl und Begasungsrate in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

In Abbildung 16 sind die OTR, CPR, der RQ und die Feed-Flussrate dargestellt. Der RQ-Wert schwankte auch hier zu Beginn der Kultivierung stark und lag während der Kultivierung bei ≥ 1 . Dies weist auf eine optimale Sauerstoff-Versorgung während der Kultivierung hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass die zugeführte Glucose ohne Nebenprodukte verstoffwechselt wurde, da keine messbaren Mengen Acetat innerhalb der Kultivierung entstanden (Abbildung 14) sind. Nach 8 h ist aufgrund einer kleiner eingestellten Wachstumsrate ein Abfall der OTR, CPR und RQ zu beobachten.

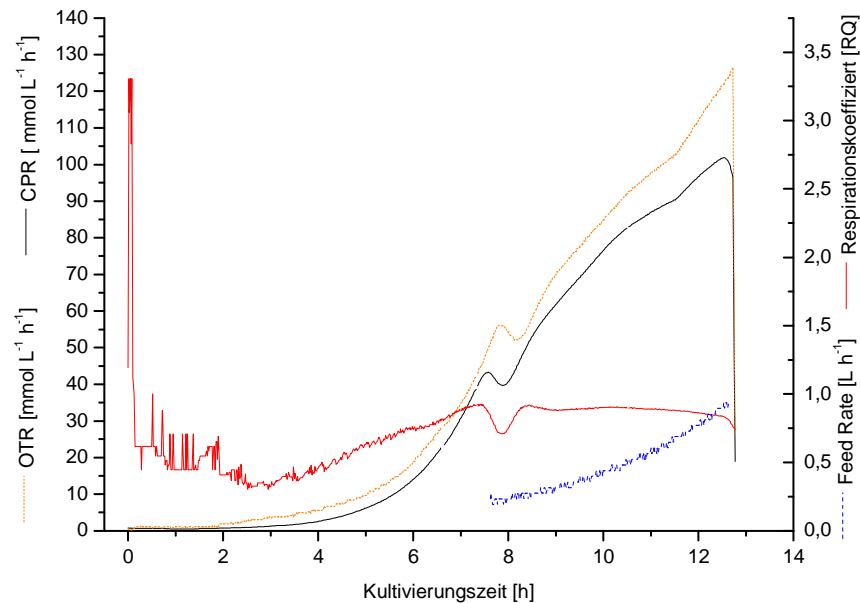


Abbildung 16: 10 L Fed-Batch Kultivierung im Biostat C: Dargestellt sind die OTR-, CPR-, RQ-Werte und Feed-Flussrate in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

Die Feed-Regelung wurde bei einem Bioreaktor-Volumen von 10 L gestoppt (13 h) und die Kultivierung nach dem Verbrauch der Glucose nach ca. 13,6 h beendet. Ein Vergleich der OTR und CPR für die Batch- und Fed-Batch-Kultivierung zeigt, dass im Batch-Reaktor der zugeführte Sauerstoff nahezu vollständig in Kohlendioxid umgewandelt wurde. Im Zufütterungsbetrieb wird mehr Sauerstoff zugeführt als verbraucht. Daher kann festgehalten werden, dass bei der 10 L Kultivierung keine Sauerstofflimitierung vorliegt und dadurch keine Nebenprodukte wie Acetat gebildet werden.

4.1.3 Fazit

Für die polySia-Produktion wurden Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen im 10 L Maßstab durchgeführt. Gestartet wurde die Batch-Produktion im 10 L Bioreaktor. Die Kultivierungszeit betrug mit 20 g L^{-1} Glucose 9,2 h mit einer maximalen Biotrockenmasse von $8,6 \text{ g L}^{-1}$. Die polySia-Konzentration lag nach 9,2 h bei $0,37 \text{ g L}^{-1}$. Die ermittelte Wachstumsrate μ betrug $0,51 \text{ h}^{-1}$ mit einer Generationszeit von 81 min. Die Kultivierung wurde direkt nach dem Verbrauch der Glucose gestoppt, um eine starke Zellyse und eine damit einhergehenden Verunreinigung der Kulturbrühe zu vermeiden. Zudem konnte bei der

Kultivierung kein signifikanter Anstieg der polySia-Konzentration nach dem Verbrauch der Glucose im Bioreaktor beobachtet werden. Nach mehrmaligen Kultivierungen im 10 L Bioreaktor im Batch-Betrieb konnte kein Zusammenhang zwischen Biotrockenmasse und polySia-Konzentration beobachtet werden. Die polySia-Konzentration schwankte zwischen 0,35 und 0,6 g L⁻¹. Anschließend wurden Fed-Batch Kultivierungen im 10 L Maßstab durchgeführt, um die Ausbeute an polySia zu erhöhen. Für die Zufütterung mit glucosehaltigem Feed-Medium in der Fed-Batch-Phase wurde ein Modell erstellt. Das Modell sorgt durch die Einstellung einer maximalen Wachstumsrate unter Substratlimitierung für ein geregeltes Zellwachstum. Die Kultivierungen wurden jeweils in der Batch-Phase mit 10 g L⁻¹ Glucose gestartet. Für die Fed-Batch-Kultivierung wurde eine Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Dieser Wert wurde während der Fed-Batch-Kultivierung konstant gehalten. Nach 14 h Kultivierung wurde eine BTM von 18 g L⁻¹ erreicht. Die polySia-Konzentration lag bei 1,3 g L⁻¹. Im Vergleich zu der 10 L Batch Kultivierung konnte die Konzentration an polySia um den Faktor 3,5 erhöht werden, während sich die BTM nur verdoppelte.

Zum besseren Vergleich der beiden Kultivierungen sind die Ausbeutekoeffizienten in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Ausbeutekoeffizienten der 10 L Batch-und Fed-Batch-Kultivierung im Biostat C.

Ausbeutekoeffizient	$Y_{X/S}$^a [g g⁻¹]	$Y_{P/X}$^b [g g⁻¹]	$Y_{P/S}$^c [g g⁻¹]
Batch	0,397	0,0455	0,0189
Fed-Batch	0,376	0,0722	0,0272

^a Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat; ^b Ausbeutekoeffizient Produkt/Biomasse; ^c Ausbeutekoeffizient Produkt/

Substrat

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ liegt für die Batch-Kultivierung bei 0,397 g g⁻¹ und für die Fed-Batch-Kultivierung bei 0,376 g g⁻¹. Dadurch ergibt sich im Batch-Modus eine etwas höhere Biomasse Ausbeute als im Fed-Batch-Modus. Beide Werte liegen unter der in der Literatur angegebenen $Y_{X/S}$, von 0,45 g g⁻¹ [53]. Anscheinend verwertet der verwendete *E.coli* K1 Stamm die Glucose nicht effektiv zu Biomasse, sondern vielmehr zur Produktbildung. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/X}$ sowie $Y_{P/S}$ sind für die Fed-Batch-Kultivierung höher, als für die Batch-Kultivierung. Der $Y_{P/X}$ konnte im Fed-Batch-Modus um den Faktor 1,6 und der $Y_{P/S}$ um einen Faktor von 1,4 erhöht werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Produktion von polySia im Fed-Batch ergiebiger ist. Die gesamte Produktmenge beträgt im Fed-Batch-Modus 13 g und im Batch-Modus 3,7 g. Die Produktmenge wurde mit der Fed-Batch-Kultivierung somit

um den Faktor 3,5 erhöht. In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse der polySia-Produktion mittels Batch- und Fed-Batch-Kultivierung zusammengefasst.

Tabelle 6: Ergebnisse der Produktion von polySia im 10 L Batch- und Fed-Batch-Bioreaktormaßstab.

Ergebnisse	10 L Batch	10 L Fed Batch
Ausbeute	3,7 g	13 g
Zeitaufwand	9,2 h	13,8 h
Materialkosten	7 €	13,45 €
Materialkosten/Ausbeute	1,89 € g ⁻¹	1,03 € g ⁻¹

Die Kosten der polySia-Produktion im Batch-Betrieb betragen 1,89 € g⁻¹ und im Fed-Batch-Betrieb 1,03 € g⁻¹. Sie unterscheiden sich um den Faktor 1,8. Daher bietet sich die Fed-Batch-Kultivierung für die Produktion und spätere Aufreinigung von polySia an.

4.2 Untersuchungen der polySia-Produktion und Polymerlänge

Im Kapitel 4.1.1 wurde festgestellt, dass die polySia-Konzentration nicht mit der Biomasse zusammenhängt. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE) für die Batch-Kultivierung die Faktoren (Einflussgrößen) ermittelt, welche einen wesentlichen und statistisch abgesicherten Effekt auf die polySia-Konzentration bzw. polySia-Produktion haben. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die Polymerlängen der polySia untersucht. Auch für die Fed-Batch-Kultivierung wurden die polySia-Produktion und Polymerlänge untersucht, jedoch erfolgte dies nicht über die statistische Versuchsplanung, sondern nur in Abhängigkeit von der Wachstumsrate.

4.2.1 Polymerisationsgrad der polySia

Zunächst wird in diesem Kapitel die DMB-HPLC ((1,2-Diamino-4,5-methoxybenzol)- *High-Performance Liquid Chromatography*)-Methode zur Bestimmung der Polymerkettenlänge der hergestellten polySia beschrieben. Diese Methode erlaubt eine sensitive Polymerkettenlängenbestimmung von polySia mit einer Auflösungsgrenze von 1,4 fmol pro Peak [54]. Die Probe wird dabei unter sauren Bedingungen, bei welchen es zu einer partiellen Hydrolyse der Probe kommt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff DMB (1,2-Diamino-4,5-

methoxybenzol) markiert. In Abbildung 17 ist die entsprechende Reaktionsgleichung dargestellt.

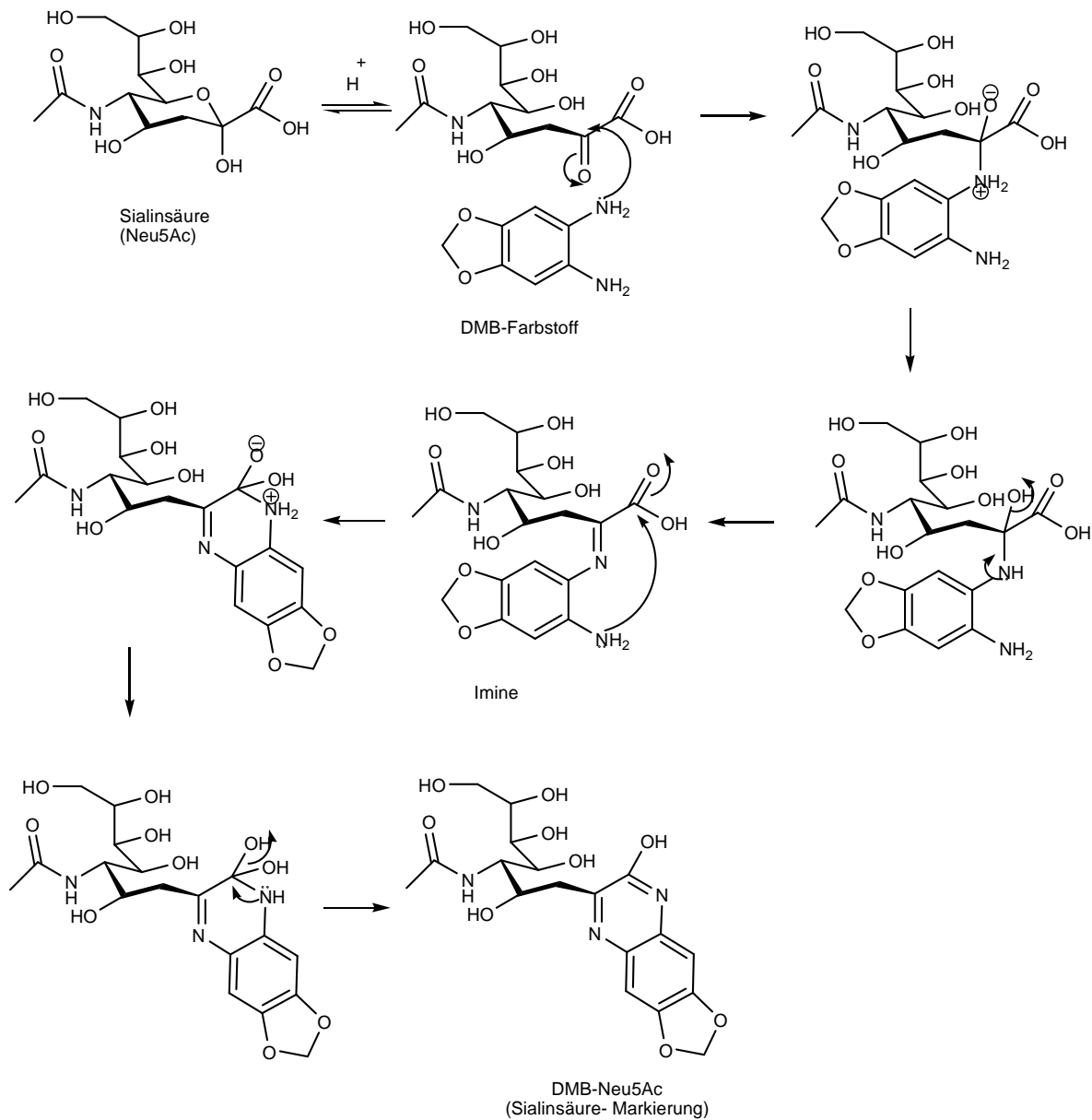
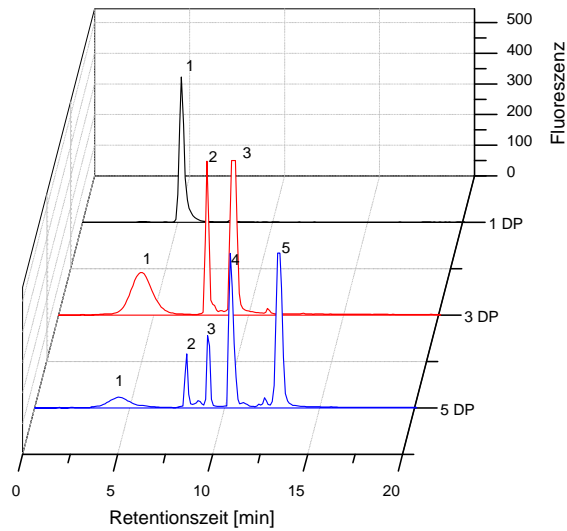


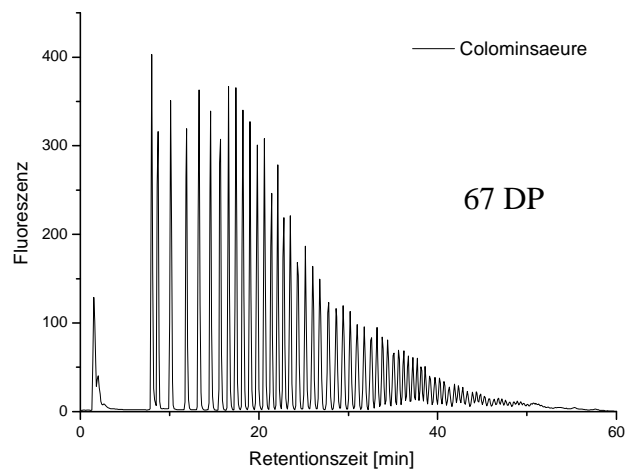
Abbildung 17: DMB-Markierung am Beispiel des Neu5Ac-Monomers [55].

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine säurekatalysierte Kondensation. Nach der Reaktion bildet sich ein Quinoxalin-Derivat, welches bei 372 nm angeregt wird und bei 456 nm emittiert. Aufgrund der partiellen Hydrolyse finden sich markierte Probemoleküle mit einer Polymerlänge von 1 bis n (n = maximale Polymerlänge) in der Probe, welche über eine Anionenaustauschersäule (DNAPac PA-100, Dionex GmbH, Idstein) mittels eines Salzgradienten getrennt und durch einen Fluoreszenzdetektor registriert werden. Für die Reaktion wird eine milde Hydrolyse gewählt, um eine statistische Polymerkettenlängenverteilung zu erhalten [54]. Die genaue Durchführung ist Kapitel 8.5.5 zu entnehmen.

Zur Charakterisierung der DMB-HPLC wurden zunächst drei Proben mit definierter Polymerlänge² (1, 3 und 5 DP) und die kommerziell erhältliche Colominsäure mit DMB-Reagenz und TFA für 24 h bei 10 °C inkubiert und die Reaktion mit NaOH gestoppt. Anschließend wurden die Polymerkettenlängen der Proben mit der DMB-HPLC bestimmt. In Abbildung 18 sind Sialinsäure (Neu5Ac) sowie Polymere aus Neu5Ac mit dem Polymerisationsgrad von 3 DP (*degree of polymerization*), 5 DP und die Colominsäure dargestellt.



A



B

Abbildung 18: DMB-HPLC Messung mit unterschiedlichen Polymerkettenlängen A: Sialinsäure (1 DP), Polymere mit 3 DP und 5 DP und B: Kommerziell erhältliche Colominsäure.

Wie erwartet, zeigt die Sialinsäure nur einen Peak (Abbildung 18 A). Durch die Hydrolyse wird die definierte Probe mit 3 DP gespalten, so dass Monomere und Dimere vorhanden sind.

² Zur Verfügung gestellt von Prof. Gerardy-Schahn, MHH.

Dies wird auch bei 5 DP beobachtet. Durch die milde Hydrolyse werden die Polymere (3 DP und 5 DP) nicht vollständig hydrolysiert, was auch eine Detektion des nicht gespaltenen Moleküls ermöglicht. Durch diesen Test konnte gezeigt werden, dass die Polymerkettenlängenbestimmung mit der DMB-HPLC möglich ist. Mit dieser Methode kann zwar die maximale Polymerkettenlänge bestimmt werden, der Anteil der maximalen Polymerkettenlänge in der Probe kann jedoch nicht festgestellt werden. Ursachen dafür sind einerseits die partielle Hydrolyse und andererseits die ungleichmäßige Markierung mit DMB, welche bei kürzeren Ketten wesentlich effektiver verläuft als bei längeren Ketten. Abbildung 18 B zeigt dem Polymerisationsgrad der kommerziell erhältlichen Colominsäure. Die Polymerkettenlänge beträgt bei der Colominsäure 67 DP. Die Signalintensität der markierten Colominsäure nimmt mit der Polymerkette ab. Dies ist ein typisches Verhalten der Polymerkettenlängenbestimmung mit der DMB-HPLC, da länger-kettige Moleküle leichter hydrolysiert werden. Daher wurde die Markierungsreaktion für die langkettige polySia optimiert, so dass die maximale Polymerkettenlänge bestimmt werden kann (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnten aus der Fed-Batch-Kultur Polymerkettenlängen zwischen 140 und 160 DP ermittelt werden. Eines der angestrebten Ziele stellt schließlich die Herstellung dieser langkettigen Polymerketten dar, um einen Einsatz im Bereich der Tissue Engineering zu ermöglichen.

4.2.2 Wahl der Faktoren für die statistische Versuchsplanung im Batch-Betrieb

Als Faktoren für die statistische Versuchsplanung kamen die verwendeten Kultivierungsbedingungen wie Temperatur, Begasungsrate, Rührgeschwindigkeit und Substratkonzentration zu Beginn der Kultivierung in Frage. Diese vier Faktoren wurden als Grundlage der statistischen Versuchsplanung in den folgenden Niveaus variiert:

Tabelle 7: Faktoren für die statistische Versuchsplanung.

Faktor	-1	0	+1
Temperatur (°C)	32	35	38
Rührgeschw. (min ⁻¹)	500	800	1100
Begasungsrate (L min ⁻¹)	5	10	15
Glucose (g L ⁻¹)	13	18	23

Die Auswirkungen der Faktoren (Tabelle 7) auf die Kultivierung wurden anhand der Optischen Dichte, polySia-Konzentration und Polymerkettenlänge der polySia (DP) beurteilt.

Jede der Zielgrößen wurde direkt nach Ende der Kultivierung und 2 h nach Kultivierungsende bestimmt, um den Einfluss der Zellyse auf die polySia-Menge und polySia-Polymerlänge zu untersuchen.

Für vier Faktoren auf zwei Stufen müssten bei einem vollfaktoriellen Plan 16 Kultivierungen durchgeführt werden. Da aber nur geringe (maximal doppelte) Wechselwirkungen zwischen den Einflussfaktoren zu erwarten sind, wird ein teilfaktorieller Versuchsplan mit 8 Experimenten aufgestellt [56].

Der teilfaktorielle Versuchsplan wurde durch drei identische Zentralversuche ergänzt, um die Kultivierungsvariabilität abschätzen zu können. Die Reihenfolge der Experimente wurde randomisiert, um systematische Fehler bei der Durchführung möglichst weit über den Versuchsplan zu verteilen. Die festgelegten Zielgrößen, also die Optische Dichte, polySia-Konzentration und polySia-Polymerlänge wurden für die 11 durchgeführten Kultivierungen (Versuchsbedingung im Kapitel 8.10, Tabelle 40) bestimmt. Die Auswertung der statistischen Versuchsplanung erfolgte über die Modde 9 Software (Umetrics, Schweden). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Ergebnisse der 11 durchgeführten Kultivierungen für die Versuchsplanung.

Randomisierte Reihenfolge	OD_{end}	OD_{+2h}	polySia_{end}	polySia_{+2h}	DP_{end}	DP_{+2h}
1	18,00	16,07	0,211	0,277	99	106
2	15,70	14,50	0,184	0,317	91	107
3	20,05	18,58	0,357	0,455	101	99
4	14,22	13,42	0,132	0,244	108	111
5	22,40	20,93	0,363	0,544	102	106
6	20,63	17,14	0,308	0,393	117	126
7	18,32	17,96	0,302	0,423	88	115
8	20,00	16,96	0,339	0,380	91	97
9	16,46	14,28	0,150	0,226	90	105
10	19,76	17,06	0,461	0,531	130	116
11	17,99	16,37	0,214	0,273	128	142

Die Optischen Dichten liegen am Ende der Kultivierung um 1 bis 3 Einheiten über der Optischen Dichte als nach weiteren 2 h. Die Kultivierung 5 zeigt die größte Optische Dichte. Die Zentralversuche 3, 6 und 10 zeigen zum Ende der Kultivierungen ebenfalls hohe Optische Dichten. Die polySia-Konzentration am Ende der Kultivierung liegt bei den Versuchen zwischen $0,132 \text{ g L}^{-1}$ und $0,461 \text{ g L}^{-1}$. Durch die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurden diese großen Unterschiede erwartet. Zwei Stunden nach dem Ende der Kultivierung

gen steigt die polySia-Konzentration bei den meisten Versuchen an. Da sich die Zellen zu dieser Zeit in der Absterbephase befinden, erfolgt vermutlich eine vermehrte Abgabe der polySia aus der Zelloberfläche. Bei den Versuchen 2, 4, 5 und 9 sind die polySia-Konzentrationen sogar um mehr als 50 % angestiegen. Dieser Anstieg wurde bei der Auswertung berücksichtigt, genauso wie die relative Veränderung innerhalb dieser Zeit. Die Polymerlänge der polySia lag zwischen 88 DP und 130 DP und erhöhte sich in den ersten zwei Stunden nach Ende der Kultivierung auf 97 bis 142 DP. Nur bei Versuch 3 und 10, den Zentralversuchen, verringert sie sich von 101 DP auf 99 DP, bzw. von 130 DP auf 116 DP. Eine Verringerung der Polymerkettenlänge ist unwahrscheinlich, da im Medium keine Abbauprodukte vorhanden sind. Ein Grund für die Verringerung der Polymerkettenlänge könnte eine fehlerhafte DMB-Markierung sein, die durch eine Verunreinigung der Proben verursacht wurde.

Optische Dichte

Die Abhängigkeit der Optischen Dichte von den Faktoren ist in der Abbildung 19 dargestellt. Die erreichte Optische Dichte ist bei Versuch 5 mit 22,4 bzw. 20,9 nach 2 h am höchsten und bei Versuch 4 mit 14,22 bzw. 13,4 nach 2 h nach Ende der Kultivierung am geringsten (vgl. Tabelle 40).

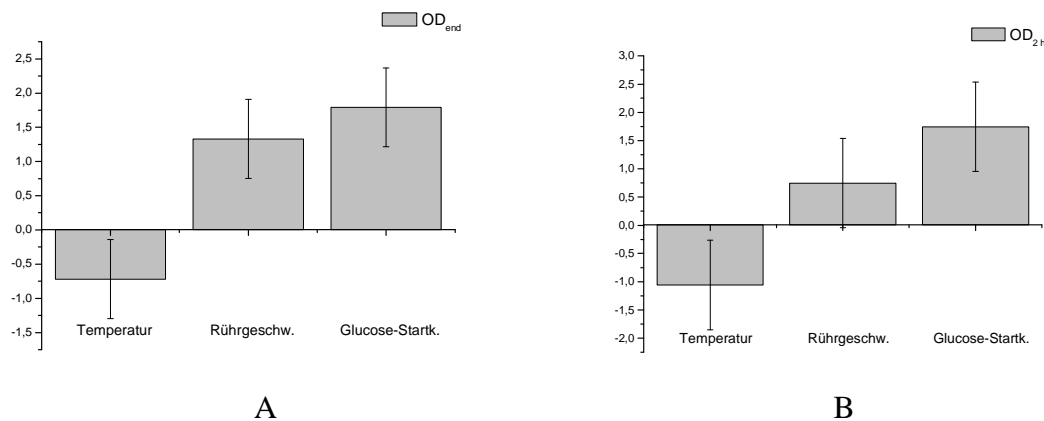


Abbildung 19: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Glucose-Startkonzentration nach Ende der Batch-Kultivierung (A) und 2 h nach Kultivierungsende (B).

Die Optische Dichte steigt mit der Erhöhung der Glucose-Startkonzentration und Rührgeschwindigkeit an und sinkt mit der Erhöhung der Temperatur. Direkt nach Prozessende haben alle drei Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Optische Dichte (Abbildung 19 A). Die Signifikanz des Einflusses der Rührgeschwindigkeit auf die Optische Dichte ist zum Zeitpunkt 2 h nach Kultivierungsende nicht mehr gegeben. Dies geht aus dem Fehlerbalken in

Abbildung 19 B hervor. Die Begasungsrate hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Optische Dichte. Mit Hilfe dieser drei Faktoren kann die Optische Dichte folgendermaßen aus den kodierten Faktorstufen (-1 und 1) mit Hilfe des Modde 9 Programms bestimmt werden:

$$OD_{end} = 17,89 + 1,79 * GS + 1,33 * R - 0,72 * T \quad (3.1)$$

$$OD_{+2h} = 16,31 + 1,75 * GS + 0,75 * R - 1,06 * T \quad (3.2)$$

GS = Glucose-Startkonzentration; R= Rührgeschwindigkeit; T= Temperatur; OD_{end} = Optische Dichte nach der Kultivierung und OD_{+2h} = Optische Dichte 2 h nach Ende der Kultivierung.

Der Modellfehler für die Optische Dichte direkt nach Prozessende liegt bei 1,29 und für die Messung 2 h später bei 1,03. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) direkt nach Prozessende liegt bei 0,9695 und 2 h nach der Kultivierung bei 0,9354. Daher ist das Modell direkt nach Prozessende vorzuziehen.

polySia-Konzentration

Als nächstes wurde untersucht, inwiefern die untersuchten Faktoren Einfluss auf die polySia-Konzentration haben. In Abbildung 20 ist die Abhängigkeit der polySia-Konzentration von den einzelnen Einflussgrößen dargestellt. Die polySia-Konzentration steigt mit der Erhöhung der Glucosestartkonzentration und der Rührgeschwindigkeit an und sinkt mit steigender Temperatur. Direkt nach Prozessende sind alle drei Faktoren signifikant für die polySia-Konzentration. Zusätzlich hat die Kombination der höheren Rührgeschwindigkeit und höheren Glucosestartkonzentration einen positiven Einfluss auf die polySia-Produktion, aber dieser Wert ist statistisch nicht signifikant. Bei dem Modell für die polySia-Konzentration 2 h nach Kultivierungsende sind jedoch die Wechselwirkungen zwischen Rührgeschwindigkeit und Glucosestartkonzentration sowie zusätzlich die Wechselwirkung zwischen Temperatur und Glucosestartkonzentration statistisch signifikant. Auch bei der polySia-Konzentration wurde keine Abhängigkeit von der Begasungsrate festgestellt.

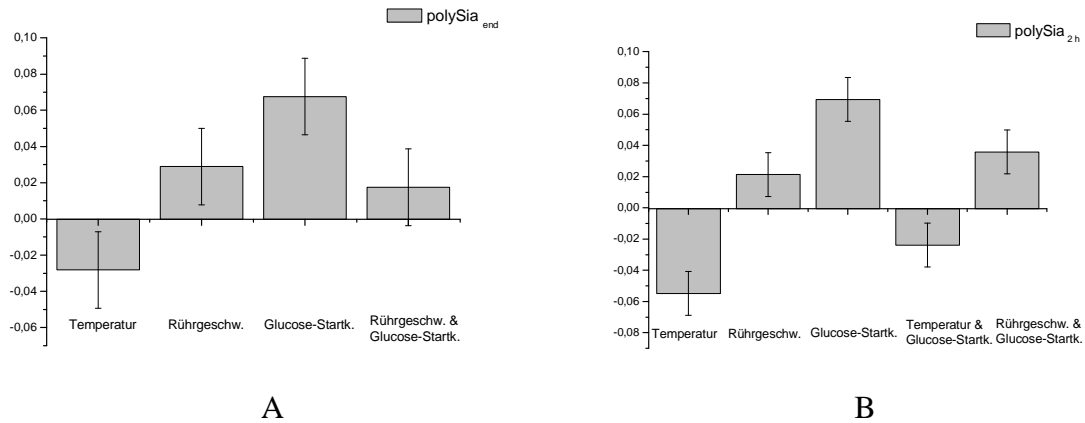


Abbildung 20: polySia-Konzentration in Abhängigkeit von der Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Glucose-Startkonzentration nach Ende der Batch-Kultivierung (A) und 2 h nach Ende (B) mit zusätzlicher Wechselwirkung zwischen Temperatur/Glucose-Startkonzentration und Rührgeschwindigkeit/Glucose-Startkonzentration.

Mit Hilfe dieser drei bzw. vier Faktoren kann die polySia-Konzentration folgendermaßen aus den kodierten Faktorenstufen (-1 und 1) bestimmt werden:

$$PS_{end} = 0,237 + 0,0676 * GS + 0,0289 * R - 0,0282 * T + 0,0175 * R * GS \quad (3.3)$$

$$PS_{+2h} = 0,335 + 0,0694 * GS + 0,0212 * R - 0,0549 * T + 0,0357 * R * GS - 0,0238 * T * GS \quad (3.4)$$

GS = Glucose-Startkonzentration; R= Rührgeschwindigkeit; T= Temperatur; PS_{end} = polySia-Konzentration nach der Kultivierung und PS_{2h} = polySia-Konzentration 2 h nach Ende der Kultivierung.

Der Modellfehler für die polySia-Konzentration direkt nach Prozessende liegt bei 0,0503 g L⁻¹ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9801 und für die Messung 2 h später bei 0,0473 g L⁻¹ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,9979. Aufgrund des höheren Bestimmtheitsmaß und geringeren Modellfehlers ist das Modell für die Messwerte 2 h nach Prozessende aussagekräftiger.

Polymerisationsgrad

Als letztes wurde die Abhängigkeit der Faktoren auf die Polymerlänge untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Polymerlänge mit der Erhöhung der Temperatur steigt und mit der Erhöhung von Rührgeschwindigkeit sinkt. Den einzigen signifikanten Effekt hat die Kombination von gesenkter Temperatur und erhöhter Rührgeschwindigkeit (Abbildung 21; A). Für 2 h nach Prozessende gibt es keine signifikanten Effekte (Abbildung 21 B).

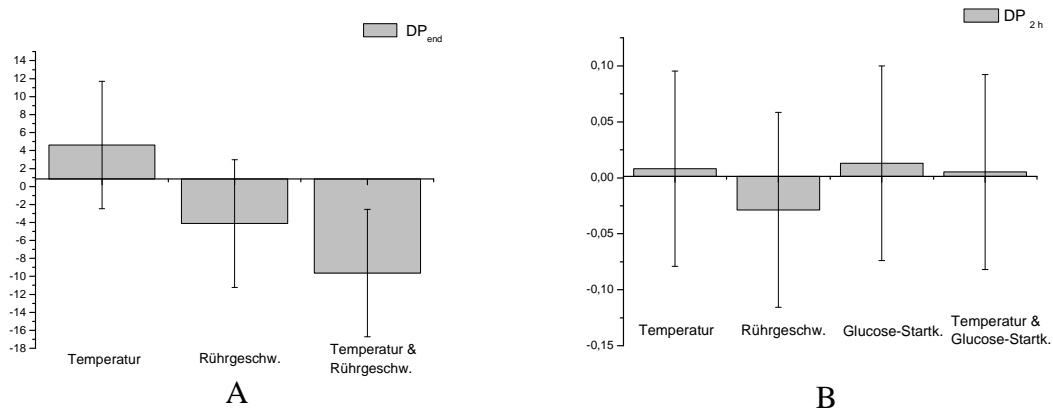


Abbildung 21: polySia-Polymerlänge in Abhängigkeit von der Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Wechselwirkung Temperatur / Rührgeschwindigkeit nach Ende der Batch-Kultivierung (A) für 2 h nach Ende (B).

Mit Hilfe dieser drei Faktoren kann die Polymerlänge am Ende der Kultivierung aus den kodierten Faktorstufen (-1 und 1) folgendermaßen bestimmt werden:

$$DP_{end} = 99,625 + 4,625 * T - 4,125 * R - 9,625 * T * R \quad (3.5)$$

R= Rührgeschwindigkeit; T= Temperatur und DP_{end} = polySia-Polymerlänge nach der Kultivierung.

Der Modellfehler für die Polymerlänge direkt nach Prozessende liegt bei 7,19 mit einer Bestimmtheitsgrad von 0,8334.

4.2.2.1 Fazit

Die Versuchsplanung hat ergeben, dass die Bedingungen für eine optimale Kultivierung des *E. coli* K1 und eine optimale Produktion von polySia von der Glucosestartkonzentration, der Rührgeschwindigkeit und der Temperatur abhängen. Die Begasungsrate hat keinen wesentlichen Einfluss auf den Prozess.

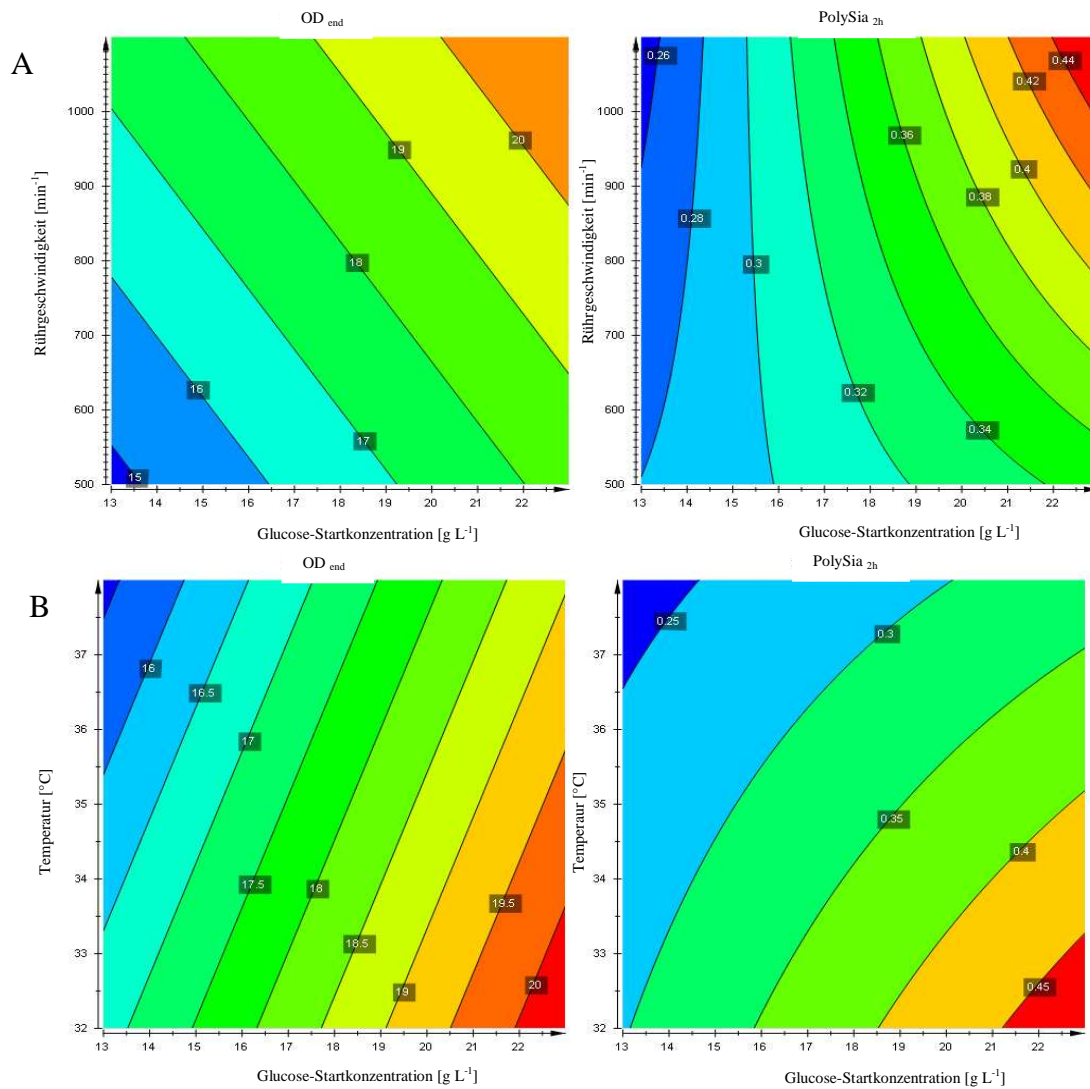


Abbildung 22: Optische Dichte direkt nach Prozessende und polySia-Konzentration 2 h nach der Kultivierung. Dargestellt ist Rührgeschwindigkeit (A) und Temperatur (B) in Abhängigkeit von der Glucose-Startkonzentration.

Wie Abbildung 22 verdeutlicht, steigen die Optische Dichte und die polySia-Konzentration mit hohen Glucosestartkonzentrationen, hohen Rührgeschwindigkeiten und bei niedrigen Temperaturen an. Daher empfiehlt es sich für die Produktion bei 32 °C mit einer Glucose-Startkonzentration von 22 g L⁻¹ und einer Rührgeschwindigkeit von 1.000 min⁻¹ zu arbeiten.

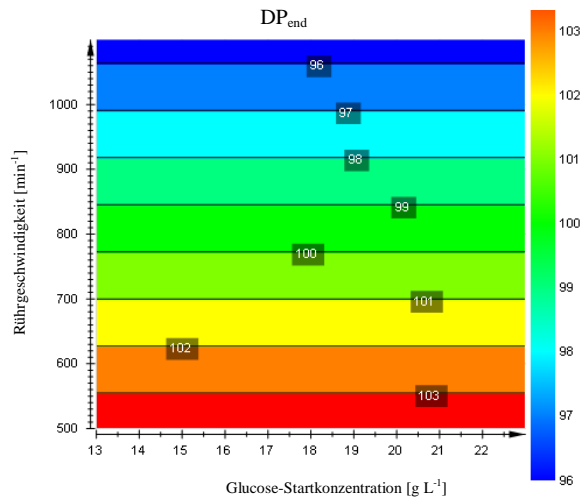


Abbildung 23: Die polySia-Polymerlänge direkt nach Prozessende in Abhängigkeit von der Glucose-Startkonzentration und Rührgeschwindigkeit.

Abbildung 23 zeigt allerdings, dass die polySia-Polymerlänge durch die hohe Rührgeschwindigkeit negativ beeinflusst wird. Um eine hohe Polymerkettenlänge zu erreichen, empfiehlt es sich bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten zu arbeiten. Die Glucosestartkonzentration hat keinen direkten Einfluss auf die Polymerkettenlänge.

In Abbildung 24 sind alle Ergebnisse der Kultivierungen zusammengestellt. Hier sind die Optische Dichte am Prozessende, die polySia-Konzentration 2 h nach Kultivierungsende und die polySia-Polymerlänge direkt nach Prozessende in Abhängigkeit von der Temperatur, der Glucosestartkonzentration und Rührgeschwindigkeit dargestellt. Es sind jeweils drei Kultivierungen mit drei unterschiedlichen Schwerpunkten (Temperatur, Glucosestartkonzentration und Rührgeschwindigkeit) zu sehen. Die Optische Dichte nimmt mit zunehmender Temperatur ab. Dies liegt an den steigenden Wachstumsraten mit zunehmender Temperatur, wodurch die Glucose schneller verbraucht wird. Wie erwartet, steigt die Optische Dichte mit der Glucose-Startkonzentration an, da mehr Glucose für das Wachstum der Zellen zu Verfügung steht. Mit zunehmender Rührgeschwindigkeit steigt auch die Optische Dichte aufgrund der besseren Versorgung der Zellen mit Sauerstoff an.

Die polySia-Konzentration fällt mit der Temperatur ab und steigt mit der Glucose-Startkonzentration an, analog zu der Optischen Dichte. Der Anstieg der Rührgeschwindigkeit (im betrachteten Fenster) zeigt im Gegensatz zur Optischen Dichte keinen starken Anstieg der polySia-Konzentration.

Die polySia-Polymerlänge steigt mit der Temperatur an. Der Stoffwechsel der Zellen wird durch die hohe Temperatur angeregt, wodurch längere polySia-Moleküle produziert werden können. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die Abnahme der polySia-Konzentration

im Medium mit zunehmender Temperatur, da die polySia länger auf der Zelloberfläche verbleibt. Desweiteren wurde keine Abhängigkeit zwischen der polySia-Polymerlänge und Glucose-Startkonzentration festgestellt. Wie zu erwarten, nimmt die Polymerlänge mit der Rührgeschwindigkeit ab, denn die Rührgeschwindigkeit erzeugt einen hohen Scherstress, wodurch die polySia leicht von der Zelloberfläche getrennt wird und somit keine längeren Polymere entstehen können. Für die Produktion von langkettiger polySia empfiehlt es sich, bei einer Temperatur von 38 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 500 min⁻¹ zu arbeiten.

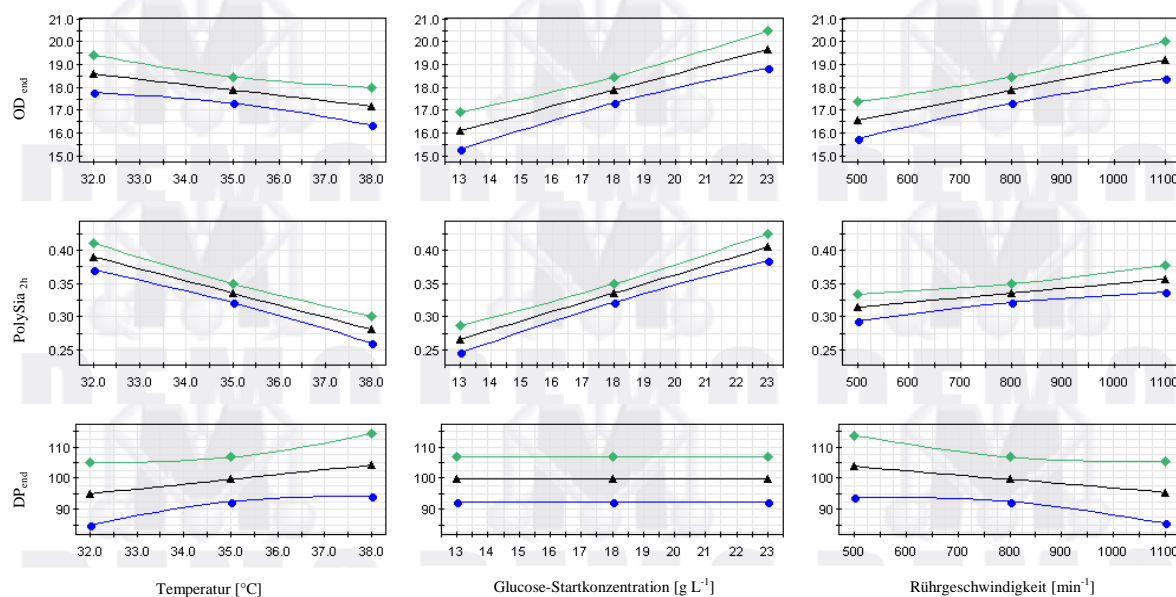


Abbildung 24: Optische Dichte am Prozessende, polySia-Konzentration 2 h nach Kultivierungsende und die polySia-Polymerlänge direkt nach Prozessende in Abhängigkeit von Temperatur, Glucose-Startkonzentration und Rührgeschwindigkeit.

Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung kann nun für verschiedene Bedingungen die Optische Dichte, polySia-Konzentration und polySia-Polymerlänge berechnet werden. Während die Optische Dichte und die polySia-Konzentration eine gleiche Abhängigkeit von den Faktoren Temperatur, Glucosestartkonzentration und Rührgeschwindigkeit zeigen, verhält sich die Polymerkettenlänge entgegengesetzt (Abbildung 24). Daher kann zwischen Polymerlänge und polySia-Produktion gewählt werden. Zudem bietet sich auch ein Kompromiss an, jedoch müssen hierzu die optimalen Kultivierungsbedingungen gefunden werden.

4.2.3 Einfluss der Wachstumsrate auf polySia-Produktion und polySia-Polymerlänge im Fed-Batch-Modus

In diesem Kapitel soll der Einfluss der Wachstumsrate auf die polySia-Produktion und polySia-Polymerlänge untersucht werden. Für die Untersuchung wurden fünf Fed-Batch-

Kultivierungen mit jeweils unterschiedlichen Wachstumsraten durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten im Biostat C mit 8 L definiertem Medium und einer Glucosestartkonzentration von 10 g L^{-1} . Die BTM der Kultivierung betrug nach der Batch-Phase $7,0\text{-}7,3 \text{ g L}^{-1}$. In der Fed-Batch-Phase wurden 2 L Glucoselösung mit einer konstanten Wachstumsrate durch das Neu-ork Programm zugefüttert. Die verwendeten Startparameter für das Neu-ork Programm sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Parameter für das Neu-ork Programm zur Bestimmung der polySia-Polymerlänge in der Fed-Batch-Phase (Biostat C).

Parameter	$X(t_0)^a$ [g L ⁻¹]	$V_R(t_0)^b$ [L]	$S(t_0)^c$ [g L ⁻¹]	S_0^d [g L ⁻¹]	$Y_{X/S}^e$ [g g ⁻¹]	K_M^f [g L ⁻¹]	$\mu_{set}(t_0)^g$ [h ⁻¹]
Werte	7,0 -7,3	8	0,1	200	0,5	0,01	0,2-0,45

^a Biomasse nach Batch-Phase; ^b Reaktorvolumen; ^c Substratkonzentration nach Batch-Phase; ^d Substratkonzentration der Feed- Lösung;

^e Ausbeutekoeffizient Biomasse/Produkt; ^f Monod-Konstante; ^g Eingestellte Wachstumsrate

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Kultivierung dargestellt. Es sind die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ und die Polymerlänge (DP) gegen die spezifische Wachstumsrate der Fed-Batch-Kultivierungen aufgetragen. Die Ausbeutekoeffizienten wurden aus den Fed-Batch-Kultivierungen berechnet. Die maximale Polymerkettenlänge wurde jeweils direkt nach der Kultivierung gemessen. Hierfür wurde die Kultivierung bzw. Endprobe der Kultivierung aufgereinigt und mit der DMB-HPLC gemessen (Kapitel 8.5.5). Für die Aufreinigung wurde die Adsorbertechnik aus Kapitel 5.6 verwendet. Der höchste Wert vom Ausbeutekoeffizient Produkt/Substrat ($Y_{P/S} = 0,027 \text{ g g}^{-1}$) und der Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat ($Y_{X/S} = 0,376 \text{ g g}^{-1}$) lag bei einer Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$. Im Allgemeinen ähnelt sich der Verlauf der beiden Ausbeutekoeffizienten sehr, da sich beide Werte auf das Substrat beziehen. Der Ausbeutekoeffizient Produkt/Biomasse ($Y_{P/X}$) fällt zunächst bei einer Wachstumsrate $0,25 \text{ h}^{-1}$ und steigt bis zu einer Wachstumsrate von $0,35 \text{ h}^{-1}$ an, bei welchem er den höchsten Wert von $0,0867 \text{ g g}^{-1}$ aufweist. Anschließend sinkt der Wert erneut auf $0,04 \text{ g g}^{-1}$.

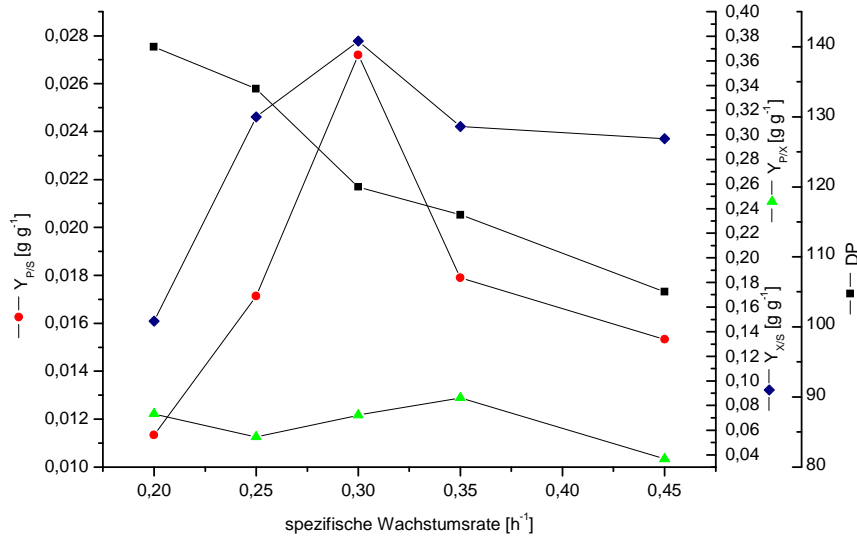


Abbildung 25: Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ und polySia-Polymerlänge (DP) in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate.

Die polySia-Polymerlänge (DP) fällt mit zunehmender Wachstumsrate. Dabei nimmt sie bei der Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$, also bei $Y_{P/S} = 0,027 \text{ g g}^{-1}$ und $Y_{X/S} = 0,376 \text{ g g}^{-1}$ noch stärker ab. Daher kann eine leichte Abhängigkeit zwischen polySia-Polymerlänge und Ausbeutekoeffizienten festgestellt werden. Die polySia-Polymerlänge wird aber hauptsächlich von der Wachstumsrate beeinflusst. Bei kleinen Wachstumsraten entstehen längere polySia-Ketten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die polySia bei kleinen Wachstumsraten länger auf der Zelloberfläche verbleibt und so stärker polymerisieren kann. Zudem kann festgestellt werden, dass eine zu hohe Wachstumsrate sich negativ auf die Ausbeutekoeffizienten und polySia-Polymerlänge auswirkt. Ein Kompromiss hinsichtlich des Ausbeutekoeffizienten und der Polymerlänge stellt eine Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ dar.

4.2.3.1 Fazit

Im Fed-Batch erfolgte die Untersuchung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate. Bei einer Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ wurde die höchste Ausbeute erzielt. Die Polymerlänge fällt mit der Wachstumsrate ab. Eine Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ stellt hinsichtlich des Ausbeutekoeffizienten und der Polymerlänge einen guten Kompromiss dar.

4.3 Scale-up im Biostat UD

In diesem Kapitel erfolgt der Scale-up auf 24 L im Biostat UD im Batch- sowie im Fed-Batch-Betrieb. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Erhöhung der Polymerlänge gelegt, die in Kapitel 4.2 ermittelt wurden. Beim Scale-up müssen grundsätzlich thermodynamische Phänomene (Sauerstofflöslichkeit der Fermentationsbrühe), kinetische Eigenschaften (Wachstumskinetik der Mikroorganismen) und Stofftransportprozesse berücksichtigt werden [53]. Dabei hängen die beiden ersten Aspekte nicht von der Größe des Bioreaktors ab, sofern sie sorgfältig gemessen werden. Jedoch hängt die aktuelle Sauerstoffkonzentration und das Wachstums- und Produktionsverhalten vom jeweiligen Maßstab ab. Daher spielt die geometrische Ähnlichkeit der Bioreaktoren beim Scale-up eine sehr wichtige Rolle. Die geometrischen Parameter sind z.B. Reaktorhöhe zu Reaktordurchmesser und Reaktordurchmesser zu Rührerdurchmesser. Diese Parameter unterscheiden sich beim Biostat C und Biostat UD nur um 1-2 %. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die Ergebnisse des Biostat C auf den Biostat UD übertragen lassen.

4.3.1 24 L Batch-Kultivierung

Um die Ausbeute an polySia zu erhöhen, wurde ein Scale-up auf den 24 L Maßstab durchgeführt. Dabei wurden die in Kapitel 4.2.2 ermittelten Parameter für eine mögliche hohe Polymerkettenlänge verwendet. Zudem wurden die Kultivierungsbedingungen so gewählt, dass stets genügend Sauerstoff während der Kultivierung zu Verfügung stand (Tabelle 10). Die Ergebnisse der Kultivierung sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Glucosestartkonzentration betrug 22 g L^{-1} (Abbildung 26 A). Die Kultivierung wurde nach ca. 11 h beendet.

Die Wachstumskonstante liegt hier bei $0,47 \text{ h}^{-1}$, woraus sich eine Generationszeit von 88 min ergibt. Im Vergleich zu der 10 L Kultivierung (81 min) besitzen die Zellen eine höhere Generationszeit, was sich in der längeren Kultivierungszeit widerspiegelt. Die maximale BTM beträgt 9 g L^{-1} und die polySia-Konzentration liegt bei $0,31 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 26 A). Zum Ende der Kultivierung fiel der gelöste Sauerstoff auf nur 3 % und die Acetatkonzentration stieg auf $0,12 \text{ g L}^{-1}$ an (Abbildung 26). Für die nächsten Kultivierungen im Biostat UD wurde die Rührgeschwindigkeit auf 550 min^{-1} erhöht, um eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen zu erzielen.

Tabelle 10: Kultivierungsbedingungen für die polySia-Produktion aus *E. coli* K1 im 24 L Bioreaktor im Batch-Betrieb.

Kultivierungsbedingungen	Batch
Temperatur	37 °C
Rührgeschw.	500 min ⁻¹
pH	7,5
Begasung	24 L min ⁻¹

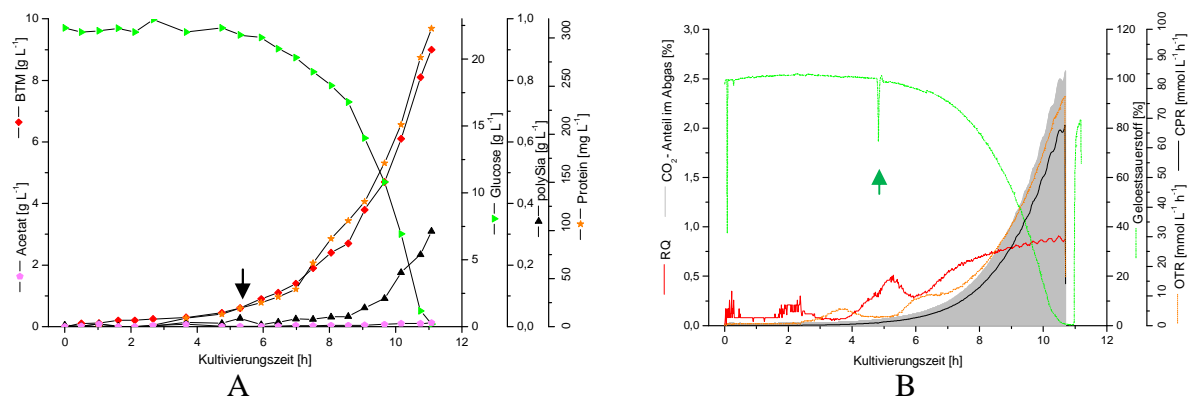


Abbildung 26: *Offline*-Daten der 24 L Batch-Kultivierung von *E.coli* K1 (A) und der CO₂-Anteil (grau unterlegt); Gelöstsauerstoffgehalt; OTR; CPR und RQ (B) im Biostat DU. Schwarzer Pfeil: Anstieg der polySia-Konzentration; Grüner Pfeil: Abfall des Gelöstsauerstoffgehalts.

Der RQ zeigt leichte Schwankungen zu Beginn der Kultivierung. Nach ca. 5 h steigt der RQ-Wert kurzfristig an, da zu dieser Zeit der Rührer ausfiel (Abbildung 26 B, grüner Pfeil). Auch ein Anstieg der polySia-Konzentration im Medium konnte in diesem Zeitraum beobachtet werden (Abbildung 26 A, schwarzer Pfeil). Dies wurde wahrscheinlich durch den hohen Zellstress verursacht, der bei dem Neustart des Rührers entsteht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Ablösung der zellgebundenen polySia durch das erneute Anfahren des Rührers beeinflusst wird. Der RQ-Wert verbleibt während der ersten 7 h der Kultivierung unterhalb von 0,7, was auf einen langsamen Stoffwechsel der Zellen hinweist.

4.3.2 29 L Fed-Batch-Kultivierung

Nach erfolgreicher Fed-Batch-Kultivierung im 10 L Maßstab fand auch hier ein Scale-up auf 29 L statt. Die Kultivierungsbedingungen für die Batch-Phase wurden aus der 24 L Batch-Kultivierung übernommen (siehe Kapitel 4.3.1). In der Fed-Batch-Phase wurden eine pO₂-

Regelung eingestellt, so dass ein Gelöstsauerstoffgehalt von 30 % im Bioreaktor herrschte (Tabelle 11). In der Batch-Phase wurden 24 L Medium vorgelegt und 5 L Glucoselösung (200 g L^{-1}) im Verlauf der Fed-Batch-Phase zugefüttert.

Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen für die polySia-Produktion aus *E. coli* K1 im 24 L Bioreaktor im Fed-Batch-Betrieb.

Kultivierungsbedingungen	Batch	/ Fed-Batch
Temperatur	37 °C	/ 37 °C
Rührgeschw.	550 min^{-1}	/ 150 – 750 min^{-1}
pH	7,5	/ 7,5
Begasung	24 L min^{-1}	/ 24 – 30 L min^{-1}

Tabelle 12 enthält die Start-Werte für die Fed-Batch-Regelung. Im Biostat UD wurde eine Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ eingestellt, da bei dieser Wachstumsrate eine hohe polySia-Ausbeute und hohe Polymerlängen zu erwarten waren (Kapitel 4.2.3).

Tabelle 12: Im Neu-ork Programm eingestellte Parameter für die 29 L Fed-Batch-Kultivierung.

Parameter	X (t₀)^a	V_R (t₀)^b	S (t₀)^c	S₀^d	Y_{X/S}^e	K_M^f	μ_{set} (t₀)^g
	[g L⁻¹]	[L]	[g L⁻¹]	[g L⁻¹]	[g g⁻¹]	[g L⁻¹]	[h⁻¹]
Werte	6,2	24	0,1	200	0,5	0,01	0,25

^a Biomasse nach Batch-Phase; ^b Reaktorvolumen; ^c Substratkonzentration nach Batch-Phase; ^d Substratkonzentration der Feed-Lösung;

^e Ausbeutekoeffizient Biomasse/Produkt; ^f Monod-Konstante; ^g Eingestellte Wachstumsrate

Abbildung 27 zeigt die *Offline*-Daten der Kultivierung im Form der BTM, Acetat-, Glucose-, polySia- und Proteinkonzentration. Nach der Batch-Phase (9,2 h), beobachtet durch den Anstieg des Gelöstsauerstoffgehalt (Abbildung 28 A), wurde die Fed-Batch-Phase mit Hilfe des Feed Modells gestartet. Es wurde am Ende der Kultivierung eine BTM von $15,6 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die polySia-Konzentration erreichte einen Wert von $0,9 \text{ g L}^{-1}$ und die Proteinkonzentration lag bei 460 mg L^{-1} . Die Wachstumsrate betrug in der Batch-Phase maximal $0,71 \text{ h}^{-1}$ und in der Fed-Batch Phase $0,24 \text{ h}^{-1}$ (μ_{cal} , berechnete Wachstumsrate), was aus dem eingestellten Wert μ_{set} von 0,25 resultiert.

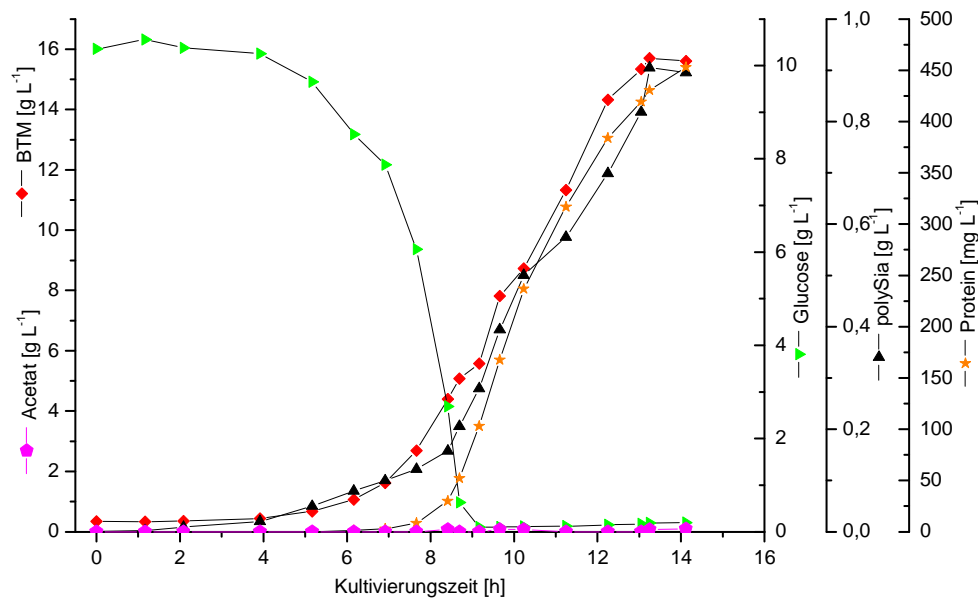


Abbildung 27: Dargestellt sind die *Offline*-Daten der 29 L Fed-Batch-Kultivierung von *E.coli* K1 im Biostat UD.

In Abbildung 28 A sind die *Online*-Daten aus der RISP-Software und in Abbildung 28 B sind OTR, CPR, RQ und Feedrate dargestellt. Aus Abbildung 28 wird ersichtlich, dass der Gelöstsauerstoffanteil von 30 % auch mit Hilfe der Rührgeschwindigkeitsregelung nicht konstant gehalten werden konnte. Zusätzlich fällt der OTR-Wert unter den Wert des CPR, d.h. die Zellen produzieren mehr Kohlendioxid als Sauerstoff zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurde nach 12,5 h die Begasungsrate von 24 L min⁻¹ auf 30 L min⁻¹ manuell erhöht, wodurch die Rührgeschwindigkeit sank. Nach 13,5 h war die 5 L Feed-Glucoselösung verbraucht und die Fed-Batch-Phase wurde beendet. Dies lässt sich auch an dem Anstieg des Gelöstsauerstoffs und dem Abfall der Rührgeschwindigkeit erkennen. Die starken Schwankungen des RQ zu Beginn der Kultivierung sind zu vernachlässigen, da sich der CPR- und OTR-Wert zu dieser Zeit nicht unterscheiden bzw. die Differenzen zu klein sind. Anschließend liegt der RQ-Wert während der Kultivierung bei 1, ausgenommen bei dem Übergang von Batch- zu Fed-Batch-Phase und am Ende der Kultivierung.

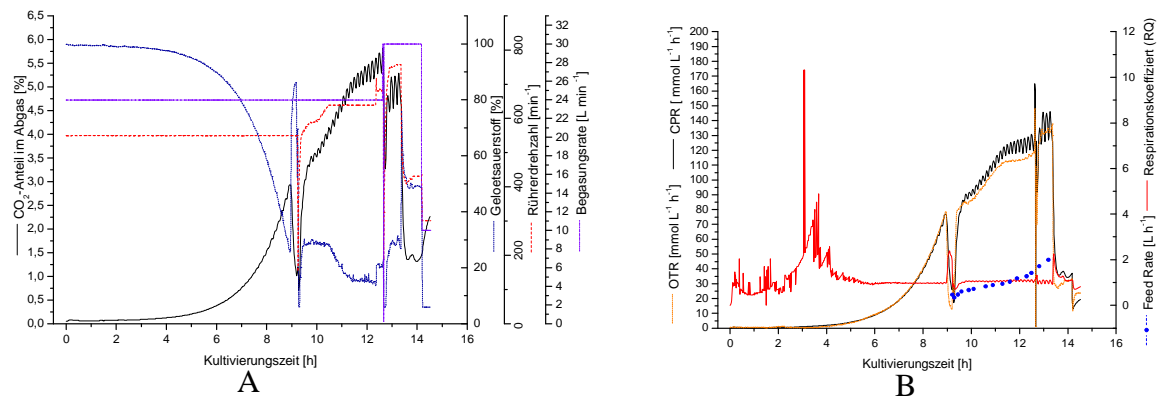


Abbildung 28: Online-Daten: CO₂-Anteil; Gelöstsauerstoffgehalt; Rührgeschwindigkeit und Begasungsrate der 29 L Fed-Batch-Kultivierung von *E.coli* K1 (A) und die OTR-, CPR-, RQ-Werte und Feed-Flussrate (B) im Biostat UD.

4.3.3 Fazit

Im Batch-Modus wurde ein Scale-up auf 24 L erfolgreich durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen wurden so gewählt, dass während der Kultivierung eine optimale Sauerstoffversorgung im Bioreaktor gewährleistet war. Das Ziel dabei war es, die Produktmenge an langkettiger polySia zu erhöhen. Die maximale Biotrockenmasse lag nach 11,1 h bei 9 g L⁻¹ (Tabelle 13). Die Wachstumsrate war mit 0,47 h⁻¹ etwas geringer als bei der 10 L Kultivierung (vgl. Kapitel 4.1.1), was zu einer 2 h längeren Kultivierungszeit führte. Dies hängt vermutlich mit den unterschiedlichen Glucosekonzentrationen zu Beginn der Kultivierungen zusammen.

Tabelle 13: Ergebnis-Zusammenfassung der 10 L und 24 L Batch-Kultivierungen.

	Batch-Kultivierung	
	10 L	24 L
polySia-Konzentration	0,37 g L ⁻¹	0,31 g L ⁻¹
BTM	8,6 g L ⁻¹	9,0 g L ⁻¹
Proteine	194 mg L ⁻¹	310 mg L ⁻¹
Kultivierungszeit	9,2 h	11 h

Anschließend wurde die Fed-Batch Kultivierung im Biostat UD (29 L) durchgeführt. In der Batch-Phase wurden 24 L Medium vorgelegt und 5 L glucosehaltiges Feed-Medium im Verlauf der Fed-Batch-Phase bei einer Wachstumsrate μ_{set} von 0,25 h⁻¹ zugefüttert. Wie schon im Kapitel 4.2.3 erwähnt, liefert eine Wachstumsrate von 0,25 h⁻¹ ein gutes Verhältnis zwischen

Produktausbeute und polySia-Polymerlänge. Nach 14,6 h wurde eine BTM von $15,6 \text{ g L}^{-1}$ und eine polySia-Konzentration von $0,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht (Tabelle 14). Im Vergleich zu der 24 L Kultivierung konnte durch den Fed-Batch die polySia-Konzentration um den Faktor 2,9 und die BTM um 1,7 erhöht werden.

Tabelle 14: Ergebnis-Zusammenfassung der 10 L und 29 L Fed-Batch-Kultivierungen.

	Fed-Batch-Kultivierung	
	10 L	29 L
polySia-Konzentration	$1,3 \text{ g L}^{-1}$	$0,9 \text{ g L}^{-1}$
BTM	18 g L^{-1}	$15,6 \text{ g L}^{-1}$
Proteine	340 mg L^{-1}	460 mg L^{-1}
Kultivierungszeit	14 h	13,5 h

Im der Tabelle 15 sind die Ausbeutekoeffizienten der 24 L Batch- und der 29 L Fed-Batch-Kultivierung gegenübergestellt.

Tabelle 15: Ausbeutekoeffizienten der 24 L Batch- und 29 L Fed-Batch-Kultivierung im Biostat DU.

Ausbeutekoeffizient	$Y_{X/S}^a$ [g g^{-1}]	$Y_{P/X}^b$ [g g^{-1}]	$Y_{P/S}^c$ [g g^{-1}]
Batch	0,403	0,0344	0,0137
Fed-Batch	0,3625	0,0573	0,0208

^a Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat; ^b Ausbeutekoeffizient Produkt/Biomasse; ^c Ausbeutekoeffizient Produkt/ Substrat

Der Vergleich der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ zeigt, dass die Umsetzung der Glucose zu Biomasse im Batch-Modus effektiver erfolgt. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/X}$ und $Y_{P/S}$ sind jedoch analog zu den 10 L Kultivierungen im Fed-Batch-Modus höher als im Batch-Modus. $Y_{P/X}$ konnte um den Faktor 1,7 und $Y_{P/S}$ um den Faktor 1,5 erhöht werden. Außer dem $Y_{X/S}$ im Batch-Modus liegen alle Ausbeutekoeffizienten im Biostat UD unter denn der in Biostat C Kultivierungen (siehe Tabelle 5). Dies liegt vermutlich an der niedrigeren Rührgeschwindigkeit im Biostat UD, welche im Hinblick auf die Produktion langkettiger polySia optimiert wurde. Zudem wurde in der Fed-Batch-Kultivierung eine niedrige Wachstumsrate während der Fed-Batch Phase eingestellt ($0,25$ statt $0,3 \text{ h}^{-1}$). Dies führt ebenfalls zu einer höheren Polymerlänge, und somit zu einer geringeren polySia-Ausbeute. Die polySia-Menge beträgt in der Batch-Kultivierung $7,4 \text{ g}$ und in der Fed-Batch-Kultivierung 26 g . Die Ausbeute konnte also analog zu der Fed-Batch-Kultivierung im Biostat C um den Faktor 3,5 erhöht werden.

In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse der polySia-Produktion im Biostat UD für die Batch- und Fed-Batch-Kultivierung zusammengefasst.

Tabelle 16: Ergebnisse der Produktion von polySia in der 24 L Batch- und 29 L Fed-Batch-Kultivierung im Biostat UD.

Ergebnisse	24 L Batch	29 L Fed-Batch
Ausbeute	7,4 g	26 g
Zeitaufwand	11,2 h	14,6 h
Materialkosten	16,80 €	34,90 €
Materialkosten/Ausbeute	2,27 € g ⁻¹	1,34 € g ⁻¹

Die Materialkosten pro g Produkt liegen im Biostat UD bei der Batch-Kultivierung bei 2,27 € g⁻¹ und bei der Fed-Batch-Kultivierung bei 1,34 € g⁻¹. Die Fed-Batch-Kultivierung ist folglich um den Faktor 1,7 günstiger als die Batch-Kultivierung. Im Vergleich zum Biostat C liegen die Kosten im Biostat UD um 17 bzw. 23 % höher, da mehr Medium benötigt wird. Die Kosten im Biostat DU könnten durch die Optimierung der polySia-Produktion verringert werden.

Ergebnisse des Scale-up

Für die Batch-Kultivierung im Biostat UD wurde das Kultivierungsvolumen von 10 L auf 24 L erhöht, dies entspricht einem Faktor von 2,4. Trotzdem wurde nur eine Zunahme des polySia-Gehalts um den Faktor von 2 beobachtet. Auch eine signifikante Erhöhung der BTM konnte im Biostat UD für die Batch-Kultivierung nicht beobachtet werden, obwohl sich die Ausbeutekoeffizienten „Biomasse zum Substrat“ ($Y_{X/S}$) im gleichen Bereich liegen. Dies lässt sich durch die niedrige Rührgeschwindigkeit erklären, wie bereits in Kapitel 4.3.3 beschrieben, wodurch weniger Sauerstoff für die Zellen zur Verfügung steht. Dies zeigt sich auch in den OTR-Werten der beiden Reaktoren. Für die Fed-Batch-Kultivierung im Biostat UD wurden die gleichen Beobachtungen wie bei der Batch-Kultivierung gemacht. Für die Steigerung der polySia-Konzentration empfiehlt sich eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit im Biostat UD.

Das primäre Ziel der Biostat UD-Kultivierungen lag nicht darin, die Produktausbeute zu erhöhen, sondern die Polymerlänge. In Tabelle 17 sind die durchschnittlichen Ergebnisse der maximalen Polymerlängen zweier Kultivierungen im Biostat C und Biostat UD jeweils in Batch- und Fed-Batch-Betrieb gegenüber gestellt. Für die Untersuchung wurden je 50 mL der

Kulterbrühe mit der in Kapitel 5.6 beschriebenen Downstream-Methode (Adsorbertechnik) aufgereinigt und die Polymerlänge untersucht.

Tabelle 17: Durchschnittliche polySia-Polymerlänge der Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen im Biostat C und UD.

Ergebnisse	Batch	Fed-Batch
Biostat C	102,5 DP	137 DP
Biostat UD	106 DP	140 DP

Tabelle 17 zeigt, dass die polySia-Polymerlänge im Biostat UD gegenüber Biostat C zugenommen hat. Die maximale Polymerlänge konnte in der Batch-Kultivierung um 3,5 DP und in der Fed-Batch-Kultivierung um 3 DP erhöht werden. Dies ist eine Bestätigung der in Kapitel 4.2.2 gezeigten Ergebnisse, wonach niedrige Rührgeschwindigkeiten sowie niedrige Wachstumsraten zu höheren Polymerkettenlängen führen.

5. Downstreaming von Polysialinsäure

Der biotechnische Verfahrensprozess schließt nach erfolgreicher Kultivierung Aufarbeitungs- bzw. Downstream-Schritte ein, die abhängig von den jeweiligen Reinheitsanforderungen an das produzierte Polysaccharid den Großteil der Produktionskosten ausmachen. Allgemein besteht der Downstream-Prozess aus den Teilschritten: Separation (Trennung von Biomasse und Medium), Aufkonzentration, Reinigung und Produktisolierung [57]. In diesem Kapitel wird die Entwicklung des Downstream-Prozesses für die Isolierung von Polysialinsäure mit Hilfe verschiedener Methoden vorgestellt. Der neu entwickelten Downstream-Prozess basiert dabei auf einer von Rode *et al.* (2008) entwickelten Aufreinigungsstrategie. Diese Methode enthält jedoch Präzipitationsschritte, die sich insbesondere für Fed-Batch-Kultivierungen nicht eignen, da hier mehr Kontaminanten gebildet werden. Daher wurde zusätzlich versucht, die Aufreinigungsschritte, die auf Fällungsreaktionen basieren, zu umgehen bzw. zu ersetzen. Hierzu wurde eine neuartige Adsorbertechnologie verwendet und optimiert. Für die Etablierung des Downstream-Prozesses wurden ausschließlich die Batch- und Fed-Batchbrühe des 10 L Bioreaktors verwendet, da die Unterschiede der ermittelten maximale Polymerlänge aus dem Biostat DU (24 L) nicht sehr groß waren (Kapitel 4.3.3).

5.1 Gewinnung der Polysialinsäure mittels Fällungsmethode

In diesem Kapitel wird die polySia-Aufreinigung mittels der Fällungsmethode vorgestellt, welche von Rode *et al.* (2008) entwickelt wurde. In Abbildung 29 ist das Fließschema des Produktionsprozesses von polySia dargestellt [43].

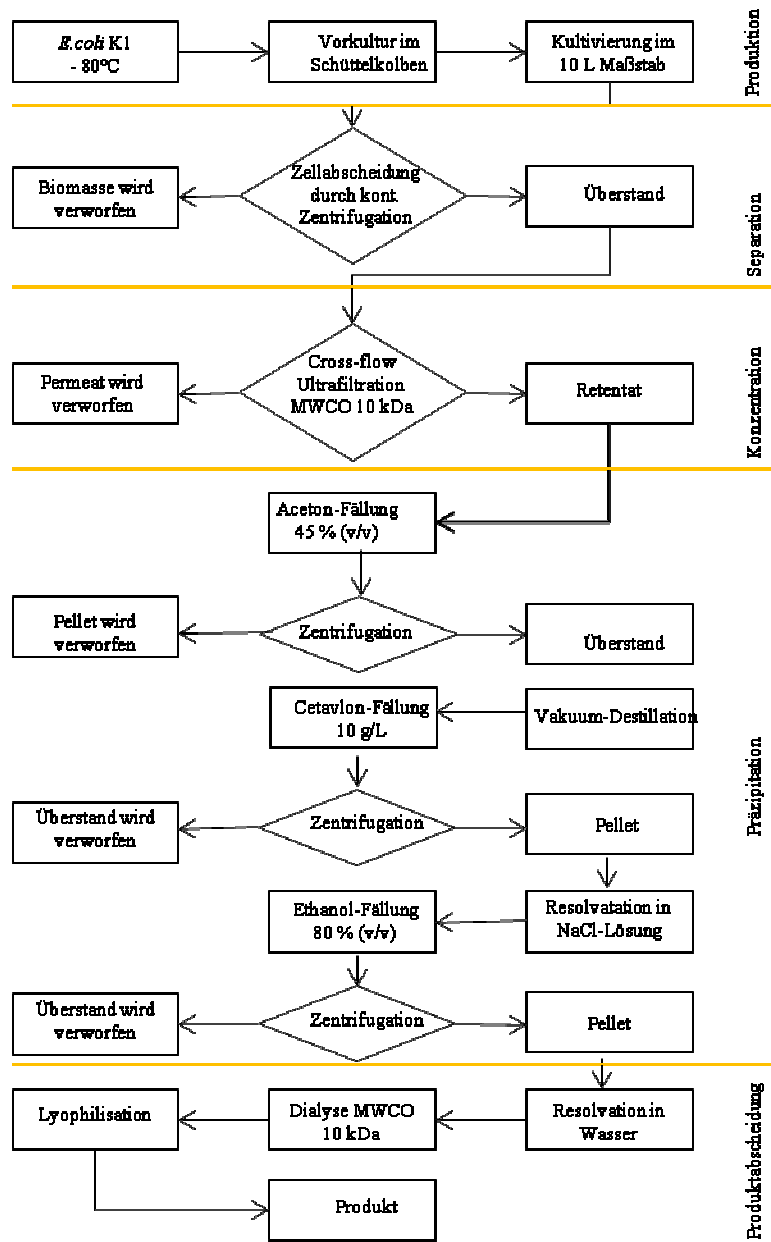


Abbildung 29: Fließschema des Produktionsprozesses von polySia aus *E. coli* K1 [43].

Der Downstream-Prozess beginnt mit der Separation von Biomasse und Medium. Hierzu wird die kontinuierliche Zentrifugation verwendet. Es folgt die Aufkonzentration des zellfreien Überstands mittels Cross-flow-Ultrafiltration (MWCO 10 kDa). Die Präzipitation startet mit der Aceton-Fällung 45 % ($v v^{-1}$), wodurch die meisten Proteine gefällt werden, während polySia im Überstand verbleibt. Als nächster Schritt folgt die Cetavlonfällung (Hexadecyl-

(trimethyl)-azanium), welches bei einer Konzentration von 10 g L^{-1} in der Lage ist, polySia auszufällen. Anschließend wird das Pellet in 1 M NaCl -Lösung resolvatisiert und mit $80 \% (\text{v v}^{-1})$ Ethanol gefällt. Es folgt die Resolvatisierung in Wasser und eine Dialyse (MWCO 10 kDa) zur Entsalzung. Das erhaltene Produkt wird im Anschluss an die Dialyse durch Gefriertrocknung gewonnen. Die Aufarbeitung einer 10 L Kultur lieferte nach der beschriebenen Methode $0,8\text{-}2 \text{ g polySia}$, was einer Ausbeute von $17\text{-}37 \%$ entspricht [43]. Die größten Nachteile dieser Aufreinigungsstrategie stellen die hohen Verluste an Produkt dar. Zudem lässt sich das zur polySia-Fällung verwendete Cetavlon schwer aus dem Aufreinigungsprozess entfernen. Zusätzlich ist die Aufreinigung sehr zeit- und arbeitsintensiv sowie mit hohen Materialkosten verbunden. Daher wurde diese Aufreinigungsstrategie modifiziert, was in den folgenden Kapiteln beschrieben ist.

5.2 Zellseparation

Die Zellseparation erfolgte anstatt der kontinuierlichen Zentrifugation durch die Cross-flow-Filtration. Diese Filtration eignet sich besonders gut für stark zellhaltige Kulturen, da durch die tangential Ausströmung des Filters eine Verblockung deutlich herabgesetzt wird. Daher können mit der Cross-flow-Filtration größere Volumina als mit der kontinuierlichen Zentrifugation bearbeitet werden. Hier entfällt die zwischenzeitliche Entleerung des Rotors bzw. ein Austausch des Filters.

Für die Separation der Biomasse und des Mediums wurden drei Filter, bestehend aus regenerierter Cellulose (Hydrosart, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen), mit den Porengrößen 30 kDa , $0,2 \mu\text{m}$ und $0,45 \mu\text{m}$ untersucht. Der entscheidende Punkt für die Wahl der optimalen Porengröße ist die Separation von Biomasse und Medium mit möglichst geringem polySia-Verlust. In Abbildung 30 ist die verwendete Cross-flow-Anlage schematisch dargestellt.

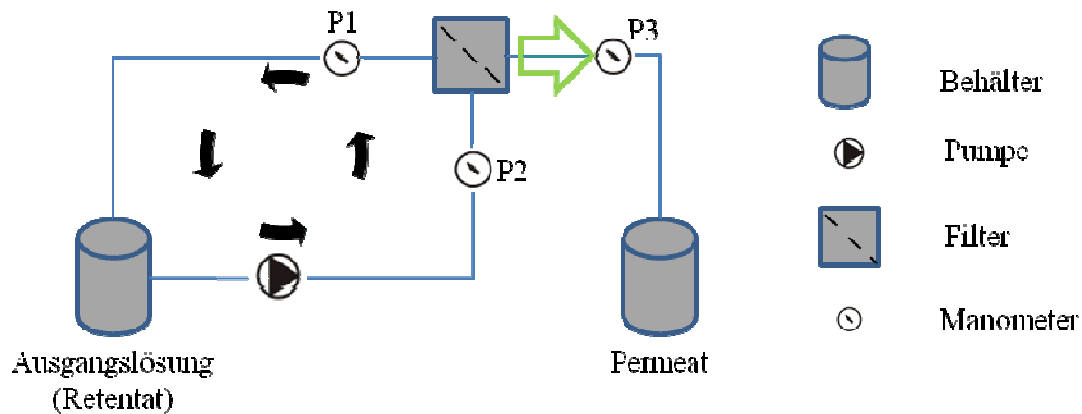


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Cross-flow-Filtration (schwarze Pfeile: Zirkulation des Retentatstroms; grüner Pfeil: Permeatstrom).

Die Untersuchung der einzelnen Filter (30 kDa, 0,2 μm und 0,45 μm) erfolgte in einem Maßstab von 10 L mit unterschiedlichen Fed-Batch-Kultivierungen. In Abbildung 31 sind die gemessenen polySia-Ausbeuten im Retentat und Permeat dargestellt. Für den besseren Vergleich ist der polySia-Gehalt in Prozent angegeben, normiert auf den polySia-Gehalt der Reaktorbrühe. Der eingestellte Druckabfall über den Filter betrug jeweils 3 bar. Nach dem Durchlauf der Reaktorbrühe sollte sich die polySia im Permeat befinden. Zusätzlich wurde die Separation einer Batchbrühe mittels Mikrofiltration (0,45 μm) und Zentrifuge durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind zum besseren Vergleich ebenfalls in Abbildung 31 aufgeführt. Die detaillierte Durchführung der Zellseparation ist in Kapitel 8.6.1 zusammengefasst.

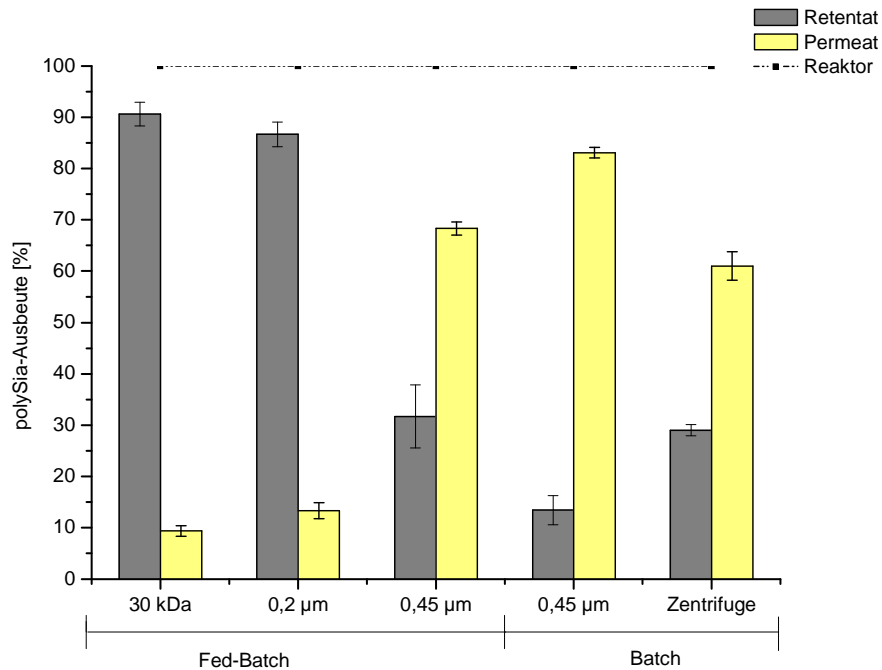


Abbildung 31: PolySia-Ausbeuten der 10 L Fed-Batch- und 10 L Batch-Bioreaktorkultivierungen nach und vor der Zellseparation. Der verwendete Fed-Batch-polySia-Gehalt für die 30 kDa Filter liegt bei 9,57 g, für 0,2 µm bei 13,4 g und für 0,45 µm bei 10,26 g. Der polySia-Gehalt der Batchbrühe bei 0,45 µm beträgt 3,6 g und für die Zentrifuge liegt er bei 3,1 g.

Bei der 30 kDa Filtration liegt die polySia-Ausbeute bei 9,4 % im Permeat, somit verbleiben ca. 90 % der polySia im Retentat. Der Vorteil dieser Filtration ist, dass auch kein Protein im Permeat gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Ausbeute an polySia liegt bei der 0,2 µm-Filtration im Permeat bei 13,3 %. Damit konnte die Ausbeute gegenüber der 30 kDa-Filtration nicht signifikant erhöht werden. Bei der 0,45 µm-Mikrofiltration konnte eine Ausbeute von 68 % erreicht werden. Aus diesem Grund wurde mit dem 0,45 µm Filter die Aufreinigung einer 10 L Batchbrühe mit einem polySia-Startgehalt von 3,6 g durchgeführt. Die polySia-Ausbeuten lagen hier bei 83 %. Zum Vergleich sind die Ausbeuten der Zentrifugation für die Batchbrühe in Abbildung 31 aufgeführt. Die polySia-Ausbeute lag dabei bei 61 %. Daran lässt sich feststellen, dass die 0,45 µm-Mikrofiltration eine gute Alternative zu der kontinuierlichen Zentrifuge darstellt.

Trotz der bereits guten Ergebnisse der Cross-flow-Filtration wurde versucht, die polySia-Ausbeute weiter zu erhöhen oder aufzubessern. Hierfür wurde nach Abschluss der Filtration 2,5 L demineralisiertes Wasser zu dem Retentat gegeben und die Filtration weitergeführt. Die Zugabe des Wassers zum Retentat kann auch während der Filtration durchgeführt werden, wodurch ein frühzeitiger Anstieg der Viskosität des Retentats vermieden werden kann. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dargestellt.

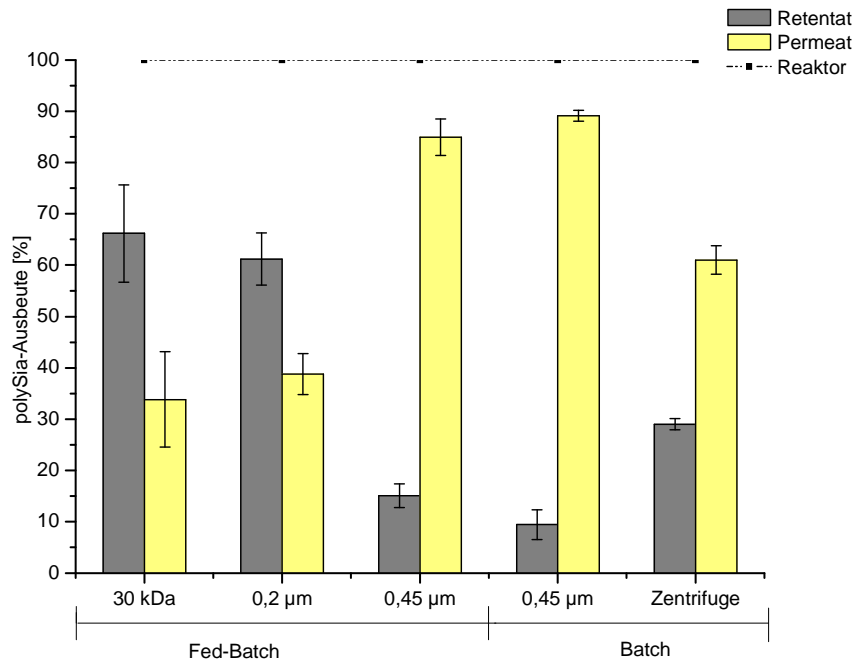


Abbildung 32: PolySia-Ausbeute nach Zugabe von 2,5 L demineralisiertem Wasser zu der Cross-flow-Filtration. Zusätzlich sind die Ausbeuten der kontinuierlichen Zentrifugation aufgeführt.

Durch die Zugabe des demineralisierten Wassers konnte die Ausbeute der Cross-flow-Filtration weiter erhöht werden. Im Fall der 30 kDa-Filtration konnte die Ausbeute von 9,4 auf 33,8 % gesteigert werden. Bei der 0,2 µm-Filtration stieg die Ausbeute von 13,3 auf 38,8 %. Die Porengrößen 30 kDa und 0,2 µm eignen sich nicht für die Separation von Biomasse und Medium, da der Verlust an polySia zu hoch ist. Dies liegt zum einen an der Größe der polySia-Moleküle, zum anderen auch an dem Effekt der Deckschichtbildung. Bei der Cross-flow-Filtration erfolgt die Bildung der Deckschichten aufgrund von Zellrückständen, die die Poren verstopfen oder durch Proteine. Im Fall von polySia erfolgt die Bildung einer Deckschicht aufgrund der Adsorption dieses Polymers an vollständig retentiven Membranen [58]. Die Ausbeute der Mikrofiltration (0,45 µm) konnte sogar von 68,3 auf 84,9 % erhöht werden. Auch die Ausbeute der Batch-Kultivierung konnte mit der 0,45 µm-Mikrofiltration gesteigert werden. Die polySia-Ausbeute wurde von 83 auf 89,1 % erhöht. Durch das zusätzliche Wasser wird die Viskosität der Flüssigkeit verringert, wodurch mehr polySia abgetrennt werden kann. Die 0,45 µm-Mikrofiltration eignet sich sehr gut für die Separation von Biomasse und Medium, da damit kein hoher Verlust der polySia einhergeht.

5.2.1 Fazit

Durch eine Modifikation der Aufreinigungsstrategie von Rode *et. al.* (2008) sollte der Aufarbeitungsprozess hinsichtlich höherer polySia-Ausbeuten optimiert werden. Hierbei wurde die kontinuierliche Zentrifuge durch eine Cross-flow-Filtration ersetzt. Es wurden drei Filter mit unterschiedlicher Porengröße für die Aufarbeitung einer Fed-Batch-Kultivierung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Filtration mit einer Porengröße von 0,45 μm die beste Separation von Biomasse und Medium erzielt. Die *Escherichia coli* weisen eine Größe von 2,5 x 0,8 μm [59] auf und können somit vollständig entfernt werden. Durch die Zugabe von 2,5 L demineralisiertem Wasser konnte die Ausbeute der Filtration verbessert werden. Dieser Effekt lässt sich auf die starke Wasserlöslichkeit von polySia zurückführen. Anschließend fand die Separation einer Batch-Kultivierung mit der 0,45 μm -Filtration statt. Die polySia-Ausbeute für die Batchbrühe lag mit ca. 89 % gegenüber der Fed-Batchbrühe mit ca. 84 % etwas höher. Die polySia-Ausbeuten der kontinuierlichen Zentrifugation lagen hingegen bei 61 %. Da eine Erhöhung der Ausbeuten erzielt werden konnte, wurde die kontinuierliche Zentrifugation durch die Mikrofiltration ersetzt. Zudem können mit der Cross-flow-Filtration höhere Volumina (> 15 L) in einer kurzen Zeit bearbeitet werden.

5.3 Übertragung der Zellseparation auf die Fällungsmethode

Die kontinuierliche Zentrifugation wurde durch die Mikrofiltration (0,45 μm) ersetzt, da damit höhere polySia-Ausbeuten erzielt wurden. In Anschluss daran erfolgte die Aufreinigung der Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen mit der von Rode *et. al.* (2008) beschriebenen Fällungsmethode (Kapitel 5.1). In Tabelle 18 sind die einzelnen Aufreinigungsschritte und die jeweiligen Verluste an polySia in % für die Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen dargestellt.

Tabelle 18: Durchschnittliche Verluste an polySia während der einzelnen Aufreinigungsschritte der Batch- und der Fed-Batch-Kultivierung bezogen auf den Ausgangsgehalt des Reaktors.

Aufreinigungsschritte	Batch (10 L)	Fed Batch (10 L)
Mikrofiltration (0,45 μm)	1 bis 10 %	10 bis 40 %
Ultrafiltration (10 kDa)	bis 30 %	20 bis 30 %
Aceton-Fällung (45 % v v ⁻¹)	~10 %	12 bis 15 %
Cetavlon-Fällung (10 g L ⁻¹)	< 1 %	74 %
Ethanol-Fällung (80 % v v ⁻¹)	< 1 %	< 1 %
Gesamtverlust	45 bis 50 %	89 bis 95 %

Der Austausch der kontinuierlichen Zentrifugation durch die Mikrofiltration (0,45 μm) konnte die Gesamtausbeute der Batch-Kultivierung gegenüber der etablierten Aufreinigung von Rode *et al.* (2008) erhöhen. Durch die Modifikation beträgt die polySia-Ausbeute für eine 10 L Batchbrühe zwischen 50 und 55 %. Die größten Verluste von bis zu 30 % treten bei der Ultrafiltration (10 kDa) auf, wobei es sich wahrscheinlich um kurzkettige polySia-Moleküle (oligoSia) handelt. Anschließend wurde die Aufreinigungsstrategie auf die 10 L Fed-Batch-Kultivierung übertragen. Die Gesamtausbeute an polySia betrug zwischen 5 und 11 %. Die polySia-Ausbeuten der Batch- und Fed-Batchbrühen unterschieden sich somit stark voneinander. Bei der Fed-Batchbrühe treten hohe Verluste bei der Mikrofiltration und Ultrafiltration auf.

Der Verlust bei der Mikrofiltration ist vermutlich auf langkettige polySia-Moleküle zurückzuführen. Die kurzkettigen polySia-Moleküle in der Fed-Batch-Kultur gehen bei Ultrafiltration verloren. Der größte Verlust tritt jedoch bei der Cetavlonfällung auf. Die Fällung der polySia mit dem Cetavlon scheint nicht vollständig zu verlaufen. Cetavlon bildet gewöhnlich eine schwer lösliche Verbindung mit der polySia. Die Wirkung basiert auf den amphiphilen Kationen des Cetavlons und den anionischen polySia-Molekülen. Möglicherweise ist die Konzentration des verwendeten Cetavlons nicht ausreichend für die Fed-Batchbrühe, welche eine höhere polySia-Konzentration aufweist. Eine Erhöhung der Cetavlon-Konzentration hat auf die nachfolgenden Aufreinigungsschritte negative Einflüsse, da u.a. nur eine schwere Resolvatisierung in Wasser erfolgen kann. Zudem gibt es in den nachfolgenden Aufreinigungsschritten keine Möglichkeit, Cetavlon aus dem Downstream-Prozess zu entfernen. Aus diesen Gründen wurde auf die Erhöhung der Cetavlon-Konzentration verzichtet. Um die großen Verluste bei der Fed-Batch Kultivierung zu umgehen, wurde eine neue Aufreinigungsstrategie auf Basis von Adsorbermaterialien entwickelt.

In Abbildung 33 sind die polySia-Polymerlängen der Fällungsmethode dargestellt. Die Bestimmung erfolgte mit der DMB-HPLC (Kapitel 8.5.5).

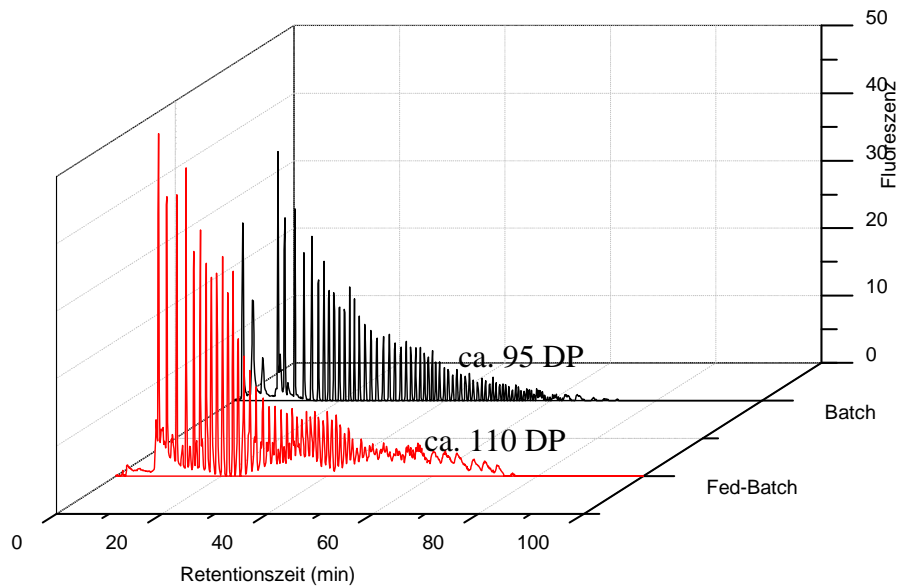


Abbildung 33: Ermittelte polySia-Polymerlänge nach der Aufreinigung mittels Fällungsmethode der Batch und Fed-Batch-Kultivierung mit der DMB-HPLC.

Für die Batchbrühe wurden Polymerlängen von 95 DP und für die Fed-Batchbrühe 110 DP ermittelt. Die genaue Bestimmung der Polymerlänge erschwerte sich bei der Fed-Batchbrühe, da es zu Signalüberlappungen kam, welche wahrscheinlich durch Verunreinigungen, wie z.B. Cetavlon zustande gekommen sind. Dennoch weist die aus dem Fed-Batch-Prozess gewonnene polySia eine größere Polymerlänge als die polySia aus dem Batch-Prozess auf. Dieses Ergebnis wurde zuvor bei der Mikrofiltration vermutet.

5.3.1 Fazit

Die Cross-flow-Mikrofiltration wurde anstatt der kontinuierlichen Zentrifugation für die Zellseparation verwendet und nach erfolgreicher Ultrafiltration wurde die Fällungsmethode aus Kapitel 5.1 durchgeführt.

Die Ausbeuten der Batch- und Fed-Batch-Aufreinigung mit Hilfe der Fällungsreaktionen weichen stark voneinander ab. Für die Batchbrühe liegt die polySia-Ausbeute bei 50-55 % und im Fall der Fed-Batchbrühe bei nur 5-11 %. Der hohe Verlust bei der Filtration weist darauf hin, dass im Fed-Batch-Produkt sowohl polySia mit hohen Polymerlängen als auch mit kleineren Polymerlängen produziert wird. Zudem eignet sich die Fällungsmethode nicht

für die Fed-Batch-Kultivierung, da relativ viel Kontaminanten vorhanden sind, wie z.B. Proteine, Lipide, DNA und Endotoxine. Aus diesem Grund wurde ein neuer Downstreamprozess auf Basis der Membranadsorbertechnik und anorganische Tonminerale entwickelt.

5.4 Downstream-Prozess auf Basis der Membranadsorbertechnik und anorganischer Tonminerale

In diesem Kapitel wird die Aufreinigung der polySia über Membranadsorbertechnik und anorganische Tonminerale vorgestellt. Diese Materialien dienen als Alternative zu den Fällungsreaktionen (Aceton-, Cetavlon- und Ethanol-Fällung), die bereits im Kapitel 5.1 beschrieben wurden. Der Downstream-Prozess wurde zunächst im Labormaßstab für die Batch-Kultivierung etabliert und in den Technikumsmaßstab übertragen. Anschließend erfolgte die Übertragung der Aufreinigungsstrategie auf die Fed-Batch-Kultivierung. Dabei wurden folgende Ziele verfolgt:

- Verringerung der Aufarbeitungsschritte und Arbeitsmaterialien
- Erhöhung der polySia-Ausbeute
- Gewinnung von möglichst langkettigen polySia-Molekülen bis zu 200 DP

5.4.1 Separation und Aufkonzentration

Bevor die Adsorbertechnik zum Einsatz kam, erfolgte zunächst die Zellseparation einer 10 L Batch-Kultivierung mittels Mikrofiltration (0,45 µm). Anschließend wurde das Volumen (10 L) mittels Ultrafiltration (10 kDa) auf 600 mL aufkonzentriert. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse dargestellt.

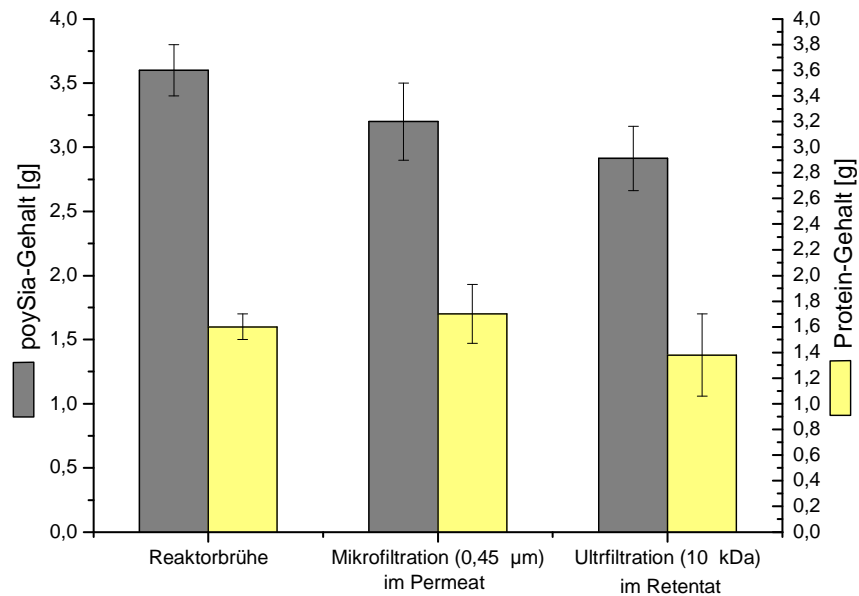


Abbildung 34: PolySia- und Protein-Gehalt in der 10 L Reaktorbrühe (Batch-Kultivierung), nach der Mikrofiltration im Permeat und nach der Ultrafiltration im Retentat.

Der polySia-Gehalt in der Reaktorbrühe beträgt 3,6 g mit einem Protein-Gehalt von 1,6 g. Nach der Mikrofiltration (0,45 µm) liegt der polySia-Gehalt im Permeat bei 3,2 g (89 %) und der Protein-Gehalt wächst durch die partielle Zellyse auf ca. 1,7 g an. Der polySia-Gehalt beträgt nach der Ultrafiltration 2,9 g (80 %) im Retentat mit einem Protein-Gehalt von 1,4 g (86 %). Der Verlust an niedermolekularer polySia und an Proteinen während der Ultrafiltration findet sich im Permeatstrom wieder. Zudem treten Proteinverluste durch thermische Denaturierung auf, verursacht durch die hohen Scherkräfte an der Membranoberfläche [60]. Die denaturierten Proteine bilden auf der Membranoberfläche eine Deckschicht. Der restliche polySia-Gehalt (0,3 g) findet sich im Permeat der Ultrafiltration wieder (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Konzentrate (Retentat der Ultrafiltration) für die Aufreinigung mittels Membranadsorber und Tonmineralien enthalten unterschiedliche Mengen an polySia und Proteinen. Da in vorangegangenen Experimenten eine Lagerung des Konzentrats bei -20 °C zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Aufreinigung führte (Daten nicht gezeigt), stammen die verwendeten Konzentrate jeweils aus neu angesetzten Kultivierungen. Aufgrund der Übersichtlichkeit ist in dem folgenden Kapitel der polySia- und Protein-Gehalt in Prozent angegeben. Zusätzlich wurden Aufreinigungen ohne den Aufkonzentrationsschritt durchgeführt (ohne Ultrafiltration).

5.4.2 Aufreinigung von polySia mit Hilfe der Membranadsorbertechnik

In diesem Abschnitt wird die Aufreinigung der hergestellten polySia mittels Membranadsorbertechnik vorgestellt. Die Membranadsorber gehören zu einer besonderen Form der Chromatographie-Technik, welche über eine oder mehrere Lagen mikro- und makroporöser Membranen verfügen [61]. Dabei sind auf der inneren Porenoberfläche spezielle Liganden angebracht, wodurch die Membran als extrem kurze chromatographische Säule mit großem Durchmesser fungiert [62]. Im Gegensatz zu den klassischen Trägermaterialien bieten die Membranadsorber erhebliche Vorteile [63] wie auch einige Nachteile (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Vor- und Nachteile der Membranadsorber gegenüber gepackten Chromatographie-Säulen.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • niedriger Durchflusswiderstand • Lösungsmitteltransport durch Konvektion, wodurch Prozesszeit und Elutionsvolumen reduziert werden • niedriger Druckabfall • konstante dynamische Bindungskapazitäten (sogar bei hohen Flussraten) [64] 	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Bindungskapazitäten • ineffiziente Einlaufverteilung • ungleichmäßige Porengrößenverteilung

Der entscheidende Punkt für die Wahl der Membranadsorber gegenüber den gepackten Chromatographie-Säulen stellt der einfache Scale-up für Membranen dar. Zudem sind die Membranen einfacher und preisgünstiger zu produzieren [65, 66], was sich auch in den Anschaffungskosten gegenüber den klassischen Trägermaterialien widerspiegelt.

5.4.2.1 Aufreinigung von polySia im Labormaßstab

Die polySia besitzt einen durchschnittlichen pK_a -Wert von 4,83. Daher liegt die polySia schon bei einem pH-Wert ab 5 in ihrer basischen (deprotonierten) Form vor [67]. Sialinsäure weist dagegen ein pK_a -Wert von 2,6 auf [68], wobei mit zunehmender Polymerlänge der pK_a -

Wert zunimmt, da die längeren Ketten die Carboxylgruppe abschirmen [67]. Die Untersuchung des Bindungs- und Durchbruchverhaltens von polySia erfolgte mit einer Sartobind® Q 100 Membran (Membranfläche 100 cm², Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Bei der Sartobind® Q 100 Membran handelt es sich um eine starke Anionenaustauscher-Membran mit quaternären Ammonium-Molekülen (Q-Membran), die sich als funktionelle Gruppe auf ihren inneren Porenoberflächen befindet.

Neben der Q-Membran wurde ebenfalls die S-Membran (Vivawell 8-Strip, Kationenaustauscher, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) im Mikromaßstab getestet. Im pH-Bereich von 3 bis 10 wurde jedoch keine Bindung der polySia an die Membran beobachtet. Da zudem keine signifikante Proteinadsorption in diesem pH-Bereich festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden sie nicht weiter für die Aufreinigung von polySia verwendet.

Die pH-Abhängigkeit der polySia- und Proteinadsorption an der Q-Membran wurde nur im pH-Bereich von pH 7-10 untersucht, um eine Hydrolyse der polySia zu verhindern. Hierfür wurde die Q-Membran an eine FIA-Anlage (*Flow Injection Analysis*) angeschlossen. In Abbildung 35 ist der Aufbau der FIA schematisch dargestellt. Die FIA-Anlage wurde über die FIA-Master Software (entwickelt am Institut für Technische Chemie) angesteuert. Die FIA-Anlage wurde anstatt einer FPLC verwendet, da mit der FIA die Versuchszeiten von 1 h auf 20 min deutlich verkürzt werden konnten. Dies liegt an dem einfacheren Aufbau der FIA-Anlage.

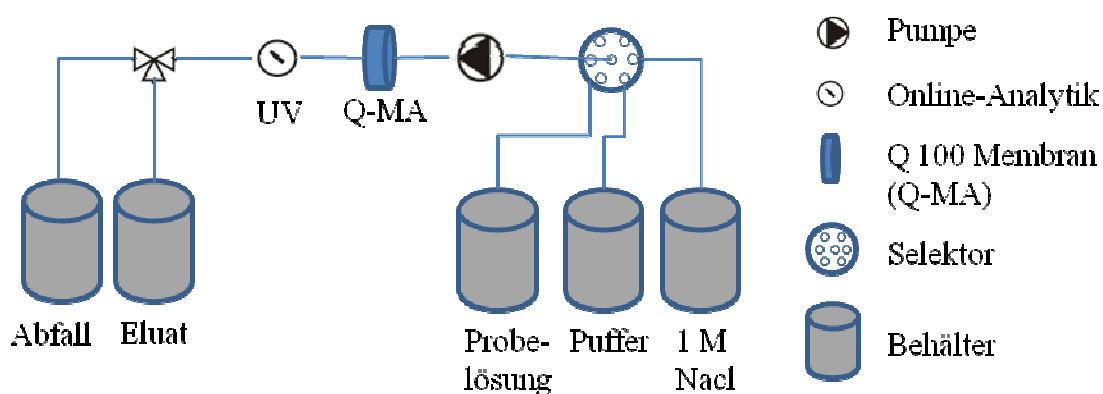


Abbildung 35: Schematische Darstellung der FIA-Anlage für die Verwendung im Labormaßstab.

Als Pumpe wurde eine Peristaltikpumpe eingesetzt. Sie garantiert eine stabile Flussrate im Bereich von 0,5 – 4 mL min⁻¹ [69]. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf einen konstanten Wert von 3 mL min⁻¹ eingestellt. Es wurde ein definiertes Volumen des Konzentrats einer polySia-Probe (Batch-Kultivierung) 1:1 mit verschiedenen Bindungspuffern (HEPES, Tris und CAPS) verdünnt und auf die Q 100 Membran aufgetragen. Zusätzlich wurden die Puf-

ferkonzentrationen in den jeweiligen pH-Bereichen variiert. Eine ausführliche Versuchsdurchführung ist im Kapitel 8.6.3.1 beschrieben. Um die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können, wurde immer die gleiche polySia-Probe mit einer Ausgangskonzentration von $0,51 \text{ g L}^{-1}$ polySia und einer Proteinkonzentration von $0,66 \text{ g L}^{-1}$ gewählt. In Abbildung 36 sind exemplarisch die Durchbruchkurven von polySia (A) und der Proteine (B) bei pH 7 in unterschiedlichen Konzentrationen des HEPES-Puffers dargestellt. Für die weiteren Puffer-Systeme sind die erhaltenen Werte der Bindungskapazitäten in Tabelle 21 und 22 zusammengefasst. Grundsätzlich wird in allen pH-Bereichen ein Trennungseffekt erzielt. Der Durchbruch von polySia und Proteinen erfolgte jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten. Eine optimale Aufreinigung mit diesem Verfahren liegt vor, wenn der Proteindurchbruch bei niedrigen und der polySia-Durchbruch bei höheren Durchlaufvolumina eintreten. Je höher die dynamische Bindungskapazität der polySia und je geringer die dynamische Bindungskapazität der Proteine an die Membran ist, desto effektiver wird demnach die Trennwirkung. Die Bestimmung der Membrankapazität erfolgte bei 10 % Durchbruch (c/c_0). In der Industrie ist diese Vorgehensweise üblich, um einen schnellen Überblick über die Bindungskapazitäten zu erhalten und so den Verlust des Produkts während der Aufreinigung möglichst gering zu halten. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der Membran bei 100 % Durchbruch.

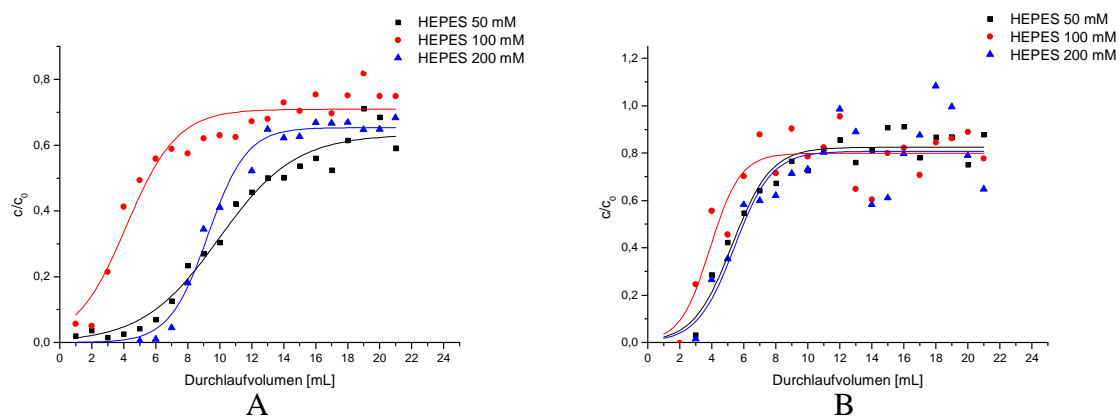


Abbildung 36: Durchbruchkurve von polySia (A) und Proteine (B) bei Verwendung unterschiedlicher Pufferkonzentrationen (pH 7).

Die Durchbruchkurven für Proteine zeigen ein starkes asymmetrisches Durchbruchsverhalten (Streuung der Proteine im Durchlaufvolumen, Abbildung 36 B). Dies liegt vermutlich an der Vielzahl der unterschiedlichen Proteine, die im Konzentrat der Batch-Kultur vorhanden sind. Trotzdem können anhand der Kurvenverläufe Aussagen über die dynamischen Bindungskapazitäten von polySia und der Proteine an die Q-Membran gemacht werden. In Tabelle 20

sind die erhaltenen Bindungskapazitäten für polySia und die Proteine bei 10 % Durchbruch und 100 % Durchbruch zusammengestellt.

Tabelle 20: Bindungskapazitäten für die Q 100 Membran bei pH 7 in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration (50 mM, 100 mM, 200 mM) HEPES-Puffer.

Puffer [mM]	pH	polySia		Protein	
		10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
HEPES 50	7	34,1 \pm 1,0	255,1 \pm 7,6	11,6 \pm 0,6	22,2 \pm 1,1
HEPES 100		9,4 \pm 0,3	179,9 \pm 5,4	9,2 \pm 0,5	90,9 \pm 4,5
HEPES 200		39,9 \pm 1,2	262,8 \pm 7,8	24,2 \pm 1,2	57,58 \pm 2,8

Die Bindungskapazitäten für die polySia und die Proteine sind bei pH 7 im HEPES-Puffer stark von den Pufferkonzentrationen abhängig (Tabelle 20). Während die Werte für die Bindungskapazität bei 10 % Durchbruch und Pufferkonzentrationen von 50 mM und 200 mM im gleichen Bereich liegen, bricht polySia bei 100 mM HEPES schneller durch. Die dynamische Kapazität beträgt bei 10 % Durchbruch nur 9,4 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Der Proteindurchbruch liegt dabei bei 9,2 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Eine effektive Auftrennung liegt jedoch nur dann vor, wenn die Bindungskapazität für polySia hoch und für Proteine niedrig ist.

Tabelle 21: Bindungskapazitäten für die Q 100 Membran bei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration 50 mM, 100 mM, 200 mM in unterschiedlichen Puffern.

Puffer [mM]	pH	polySia		Protein	
		10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
Tris 50	8	46,4 \pm 4,1	282,2 \pm 25,3	6,5 \pm 0,5	62,7 \pm 5,6
Tris 100	8	54,9 \pm 4,9	220,6 \pm 19,8	25,1 \pm 2,2	70,1 \pm 6,3
Tris 200	8	16,8 \pm 1,5	158,7 \pm 14,2	21,3 \pm 1,9	116,8 \pm 10,5
Tris 50	9	35,2 \pm 3,1	231,2 \pm 20,8	16,2 \pm 2,0	151,2 \pm 13,6
Tris 100	9	19,8 \pm 1,7	114,3 \pm 10,2	21,2 \pm 1,9	134,0 \pm 12,0
Tris 200	9	24,3 \pm 2,1	211,2 \pm 19,0	22,4 \pm 0,4	166,12 \pm 14,9
CAPS 50	10	17,97 \pm 1,6	139,6 \pm 12,5	21,5 \pm 1,9	124,4 \pm 11,1
CAPS 100	10	10,18 \pm 0,9	122,3 \pm 11,0	4,99 \pm 0,4	10,60 \pm 0,90
CAPS 200	10	15,5 \pm 0,9	134,8 \pm 2,1	6,31 \pm 0,50	10,37 \pm 0,90

PolySia und Proteine weisen im pH-Bereich von pH 8-10 unterschiedliche Bindungsverhalten auf (Tabelle 21). Die beste Auftrennung von polySia und Protein erfolgt bei pH 8 mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris. Während polySia unter diesen Bedingungen eine hohe Bindungskapazität bei 10 % Durchbruch von $46,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ aufweist, liegt der Wert für die Proteine bei nur $6,5 \mu\text{g cm}^{-2}$. Bei vollständigen 100 %igen Durchbrüchen von polySia ($282,2 \mu\text{g cm}^{-2}$) und Proteine ($62,7 \mu\text{g cm}^{-2}$) wurde ebenfalls ein großer Unterschied zwischen den Bindungskapazitäten festgestellt. Außerdem lässt sich anhand der Tabelle 21 erkennen, dass die Bindungskapazität der polySia mit zunehmendem pH-Wert abnimmt. Dies steht im Widerspruch mit dem pK_a -Wert der polySia von 4,83. Mit zunehmendem pH-Wert ist polySia stärker negativ geladen und müsste somit besser an die Membran binden. Vermutlich beeinflussen die Pufferbestandteile die polySia-Adsorption an der Q-Membran. Um dieses Verhalten näher zu untersuchen, empfiehlt es sich, Versuche mit einer einzigen Puffer-substanz bei unterschiedliche pH-Werte durchzuführen.

Zusätzlich wurde die Bindungskapazität von polySia im Natriumphosphat-Puffer (NaPP) bei pH 7 untersucht. Die Pufferkonzentrationen liegen ebenfalls bei 50 mM, 100 mM und 200 mM. In Tabelle 22 sind die erhaltenen Bindungskapazitäten von polySia und Proteine zusammengefasst.

Tabelle 22: Bindungskapazitäten für die Q 100 Membran bei pH 7 in Abhängigkeit der Pufferkonzentration von pH 7 und der Pufferkonzentration 50 mM, 100 mM und 200 mM NaPP.

Puffer [mM]	pH	polySia		Protein	
		10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
NaPP 50	7	$37,2 \pm 2,6$	$321,3 \pm 22,4$	$15,6 \pm 1,2$	$42,2 \pm 3,3$
NaPP 100		$59,4 \pm 4,1$	$412,2 \pm 28,8$	$9,6 \pm 0,7$	$35,9 \pm 2,8$
NaPP 200		$58,7 \pm 4,1$	$312,3 \pm 21,8$	$8,6 \pm 0,6$	$32,2 \pm 2,5$

Die Bindungskapazitäten von polySia bei 100 % Durchbruch liegen bei Verwendung des NaPP in einer Konzentration von 100 mM bei $412,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Tabelle 22). Bei 50 mM und 200 mM liegen sie im gleichen Bereich, jedoch deutlich niedriger als bei 100 mM NaPP. Die Proteinbindungskapazität bei einem 100 %igen Durchbruch nimmt mit der Pufferkonzentration ab. Somit werden bei hohen Pufferkonzentrationen die Proteine eluiert. Im Vergleich zum HEPES Puffer werden mit NaPP im gleichen pH-Bereich höhere polySia-Bindungskapazitäten erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass Pufferbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen der Membran und

der Proteine ebenso einen Einfluss auf die Trennwirkung haben. Der NaP-Puffer weist in einer Konzentration von 100 mM eine hohe Bindungskapazität für polySia auf und gleichzeitig erfolgt ein schneller Durchbruch der Proteine.

Da das Ziel dieser Arbeit darin besteht, in erster Linie eine kostengünstige Aufreinigung von polySia im Technikums- bzw. Industriemaßstab zu erreichen, sind in Tabelle 23 die Kosten der verschiedenen Puffer gegenübergestellt.

Tabelle 23: Preise der verwendeten Puffer.

Puffer	HEPES	TRIS	CAPS	NaPP
Preis	0,62 € g ⁻¹	1,22 € g ⁻¹	0,52 € g ⁻¹	0,13 € g ⁻¹

Als kostengünstiger Puffer erweist sich NaPP mit 0,13 € g⁻¹. Obwohl NaPP und HEPES im gleichen Bereich puffern (pH 7), weist NaPP eine bessere polySia- und Proteinabtrennung auf. Zudem liegt der Vorteil des NaPP zu TRIS (pH 8-9) und CAPS (pH 10) darin, dass aufgrund des pH-Werts eine Umpufferung der Kulturbrühe (pH 7) nicht notwendig ist.

5.4.2.2 Fazit

Die Bestimmung der Bindungskapazität von polySia und der Proteine an die Q-100 Membran erfolgten im pH-Bereich von 7-10. Bei den Durchbruchkurven wurde ein asymmetrisches Strömungsverhalten beobachtet. Bedingt durch eine konvektive Strömung wird bevorzugt die Membranmitte von der Probe angeströmt, so dass sich dieser Effekt auf die dynamische Bindungskapazität negativ auswirkt [70]. Dennoch konnte im Labormaßstab eine erfolgreiche Auftrennung von polySia und Proteine erzielt werden. Die Q-100 Membran zeigt bei verschiedenen pH-Werten und Pufferkonzentrationen sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Bindungskapazität von polySia. Zudem wurde festgestellt, dass sich mit steigendem pH-Wert die Bindungskapazitäten der polySia an der Membran verringern. Die effektivste Aufreinigung von polySia konnte in einem pH-Bereich von pH 7 - 8 erzielt werden. Die bestmöglichen Ergebnisse wurden mit 100 mM NaPP Bindungspuffer (pH 7) erreicht. Dieser Puffer bietet neben einer effektiven Aufreinigung eine kostengünstige Variante, die im Technikums- bzw. Industriemaßstab ökonomisch einsetzbar ist. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Adsorption an der Q-Membran zusammengefasst.

Tabelle 24: Ergebnisse der polySia-Adsorption mit dem 100 mM NaPP (pH 7) an der Q 100 Membran im Überblick.

Ergebnisse	
Ausbeute	81 %
Zeitaufwand	20 min
Materialkosten	-

5.4.3 Aufreinigung des polySia-Überstands aus dem Fed-Batch-Betrieb mit der Q-100 Membran

Nach der Optimierung der Puffer- und pH-Bedingungen unter Verwendung des Konzentrats einer Batchbrühe (Kapitel 5.4.2), soll hier nun die Bindungskapazität von polySia aus einer Fed-Batchbrühe direkt nach der Separation (vor der Aufkonzentrierung) bestimmt werden. Die Ausgangskonzentration der polySia betrug $0,47 \text{ g L}^{-1}$ und der Protein-Gehalt lag bei $0,35 \text{ g L}^{-1}$. Hierzu wurde die Q-100 Membran mit 100 mM NaPP equilibriert und anschließend mit der Probe beladen. Zur Eliminierung der Proteine wurde die Membran mehrmals mit 100 mM NaPP gewaschen. Die Elution von polySia erfolgte mit 1 M NaCl-Lösung. In Abbildung 37 ist das Durchbruchverhalten der polySia und Proteine dargestellt.

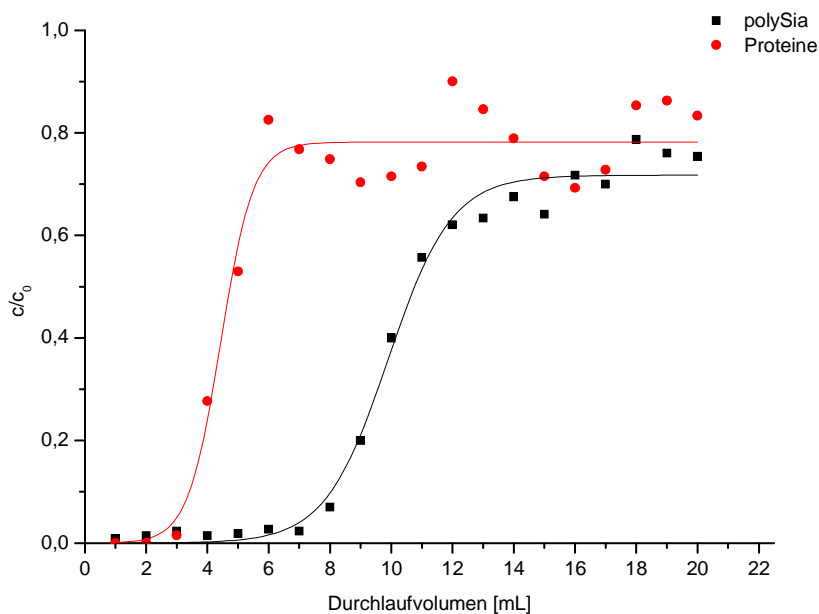


Abbildung 37: Durchbruchkurve von polySia und Proteine bei einem pH-Wert von 7 (100 mM NaPP).

Tabelle 25: Bindungskapazität von polySia und Proteine bei einem pH-Wert von 7 (100 mM NaPP).

Puffer [mM]	pH	polySia		Protein	
		10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	10 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	100 % Durchbruch [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
NaPP 50	7	61,1 \pm 0,7	423,1 \pm 5,1	10,4 \pm 0,4	49,2 \pm 1,9

Die Bindungskapazitäten von polySia und den Proteinen an der Q-Membran unterscheiden sich stark voneinander. Die polySia weist eine Bindungskapazität von 423,1 $\mu\text{g cm}^{-2}$ auf und die Proteine eine Bindungskapazität von 49,2 $\mu\text{g cm}^{-2}$ auf (Tabelle 25).

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass mit dem Kulturüberstand einer Fed-Batchbrühe durchaus hohe Bindungskapazitäten an der Q-Membran für polySia erreicht werden können. Gleichzeitig konnten die Proteine sehr schnell entfernt werden. Bei dem Vergleich der Bindungskapazität des Überstands und des Konzentrats der polySia-Probe wurden höhere Bindungskapazitäten für den Überstand erreicht. Die polySia-Ausbeuten liegen im Falle des Konzentrats (Tabelle 24) bei 81 % und für den Überstand bei 90 %. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, die Aufreinigung der polySia ausschließlich aus dem Kulturüberstand durchzuführen, insbesondere bei der Übertragung der Membranadsorbertechnologie in den Technikumsmaßstab.

5.4.4 Aufreinigung von polySia mit Tonmineralien

In diesem Kapitel wird die Aufreinigung von polySia mit Hilfe von Tonmineralien der Firma Südchemie (Moosburg) beschrieben. Die Versuche im Modellsystem sollen Aufschluss über die charakteristischen Eigenschaften hinsichtlich der Bindung von Proteinen an diese Materialien geben. Das Ziel ist eine möglichst effektive Abreicherung der Proteine, wobei die Adsorption von polySia unerwünscht ist.

Tonmineralien sind aus schichtartig angeordneten Kristallstrukturen aufgebaut, bestehend aus Tetraeder- und Oktaederschichten. Aluminosilikate bilden dabei die tetraedrischen Schichtstrukturen, wobei die Siliziumatome im Tetraeder durch Aluminium- oder Eisenatome ersetzt werden können. Die Tetraeder sind jeweils über drei Sauerstoffatome miteinander verknüpft. Die Verbindung der Tetraederschicht mit der Oktaederschicht ist über ein viertes Sauerstoffatom gewährleistet. Die Oktaederschicht besteht aus kantenverknüpften Oktaedern, aufgebaut aus Aluminiumhydroxid oder Magnesiumhydroxid [71]. Die Klassifizierung der Tonminera-

lien erfolgt anhand der Anzahl ihrer tetraedrischen und oktaedrischen Schichtenfolge. Es wird der 1:1-Schichttyp oder der 2:1-Schichttyp unterschieden [72]. Der Aufbau beider Schichttypen ist in Abbildung 38 dargestellt.

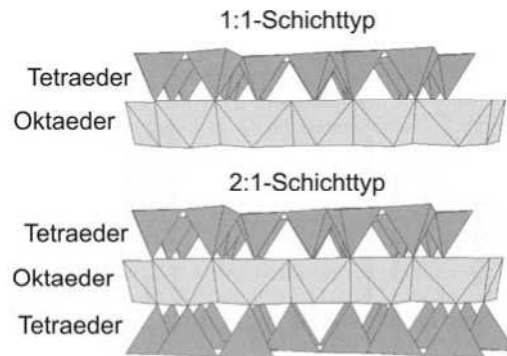


Abbildung 38: Modell der 1:1- und 2:1-Schichttypstrukturen von Tonmineralien [72].

Die wichtigsten Merkmale der Tonmineralien sind folgende [73]:

- Anisotrope Schichten und Partikel
- Hohe spezifische Oberfläche und Oberflächenaktivität
- Variierende Oberflächenstrukturen
- Quellung und Ionenaustausch
- Hohe Bindungskapazitäten

Die hohen Bindungskapazitäten von anorganischen Tonmineralien ermöglichen die Adsorption von Proteinen und anderen organischen Molekülen. Besonders von Vorteil sind dabei die große spezifische Oberfläche und die damit verbundene Oberflächenaktivität.

5.4.4.1 Wahl der Tonminerale

Um die Adsorption von Proteinen zu untersuchen, wurden vier Tonminerale (EX M 926 I, EX M 1753, Puranit UF und EX M 1607) mit verschiedenen Ladungseigenschaften ausgewählt.

EX M 926 I (Experimentelles Muster 926 I) wurde als gering geladenes Material ausgewählt, bestehend aus einer Mischphase aus Saponit und Keralit. EX M 1753 (Experimentelles Muster 1753), welches den Saponiten zugeordnet wird, besitzt eine höhere negative Ladung als EX M 926 I. Zusätzlich verfügen EX M 1753 und EX M 926 I über eine hydrophobe Eigenschaft. Puranit UF besitzt eine sehr hohe Kationenaustauscherkapazität und weist als reines

Montmorillonit ein starkes Quellverhalten auf [74]. Als Letztes wurde EX M 1607 (Experimentelles Muster 1607) untersucht. Dieses Material besteht zu 40 bis 50 % aus Nebenmineralien und Kieselgel, daher besitzt es eine ähnliche Kationaustauschkapazität wie Puranit UF. In Tabelle 26 sind die ausgewählten Tonmineralien und deren Eigenschaften zusammengefasst [73].

Tabelle 26: Eigenschaften der verwendeten Tonmineralien EX M926 I (Kerolit/ Saponit), EX M 1753 (Saponit), EX M 1607 (Montmorillonit / amorphes Silika + Sepiolit) und Puranit UF (Montmorillonit mit hoher Schichtladung).

	EX M 926 I	EX M 1753	EX M 1607	Puranit UF
Zuordnung	Kerolit/Saponit	Saponit	Montmorillonit/ Kieselgel	Montmorillonit
Ladung	Geringe Ladung	Mittlere Ladung	Mittlere bis hohe Ladung	Hohe Ladung
Kationaustausch- kapazität [meq 100mg⁻¹]	20- 30	20-30	52	105
Spezifische Ober- fläche [m² g⁻¹]	215	124	208	80
Kumulatives Po- renvolumen [cm² g⁻¹]	0,26	0,12	0,9	0,13
Durchschnittlicher Porendurchmesser [nm]	7,20	6,06	17,8	9,90

Um abschätzen zu können, welche Tonminerale sich für die Aufreinigung von polySia eignen, wurde die Adsorption einer Batch-Probe (Retentat aus der Ultrafiltration, 10 kDa) bei pH 7 mit NaPP (100 mM) unter statischen Bedingungen untersucht. Hierzu wurden 40 mg der Minerale jeweils mit 1 mL der Batch-Probe in einem Überkopfmischer inkubiert. Die Adsorptionszeit betrug 3 h. Nach der Inkubation wurde die Batch-Probe zentrifugiert und die verbleibenden polySia- und Proteinkonzentrationen im Überstand gemessen. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 8.6.3.2 zusammengestellt. In Abbildung 39 sind die nach der Inkubation im Überstand gemessenen polySia- und Protein-Konzentrationen dargestellt.

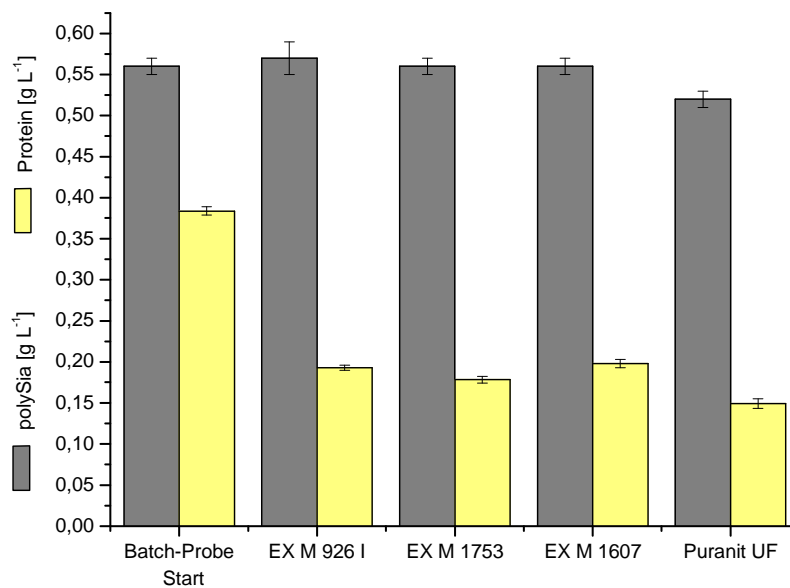


Abbildung 39: Gemessene polySia- und Protein-Konzentrationen im Überstand bei Verwendung unterschiedlichen Tonmineralien. Die polySia Anfangskonzentration liegt bei $0,56 \text{ g L}^{-1}$ und die Protein-Konzentration bei $0,38 \text{ g L}^{-1}$.

Anhand der Abbildung 39 kann festgestellt werden, dass alle Tonmineralien die Fähigkeit besitzen, Proteine zu binden. Die Bindung der Proteine am EX M 926 I, EX M 1607 und EX M 1753 liegen im gleichen Bereich. Das beste Ergebnis lieferte das Puranit UF mit einer Proteinbindung von 61 %, da es eine hohe Ladung und Kapazität aufweist. Bei EX M 926 I, EX M 1753 und EX M 1607 erfolgte keine Adsorption von polySia, was jedoch bei Puranit UF der Fall war. Dies liegt wahrscheinlich an elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der polySia und der Puranit UF Oberfläche [75].

5.4.4.2 Fazit

Zur Untersuchung der polySia-Aufreinigung wurden vier verschiedene Tonminerale (EX M 926I, EX M 1753, Puranit UF und EX M 1607) verwendet. Dabei wurde das Konzentrat der Batchbrühe mit 40 mg Tonmineral im Überkopfmischer inkubiert und anschließend die polySia- und Protein-Konzentration im Überstand gemessen. Das Ziel war dabei, die Proteine an die Minerale zu binden und den Verlust an polySia so gering wie möglich zu halten. Es wurde festgestellt, dass Puranit UF mit einer Proteinadsorption von 61 % die besten Ergebnisse liefert. Der Nachteil ist, dass auch polySia an Puranit UF adsorbiert wird. Bei den Tonmineralien EX M 926 I, EX M 1753 und EX M 1607 wurde keine polySia-Adsorption festgestellt.

EX M 1753 stellte mit einer Proteinadsorption von 54 % das zweitbeste System dar. Daher wurde für die weiteren Versuche EX M 1753 verwendet und näher charakterisiert.

5.4.4.3 Charakterisierung von EX M 1753

Adsorptionsprozesse auf heterogenen und homogenen Oberflächen können mit Hilfe der Langmuir-Freundlich-Isotherme (LF-Isotherme) für hohe als auch für niedrige Konzentrationen gut modelliert werden. Daher wurde die nähere Charakterisierung von EX M 1753 auf Basis dieser Isotherme durchgeführt [76]. Die Formel hierfür lautet:

$$q = \frac{q_{max} \cdot K \cdot C_{eq}^m}{1 + K \cdot C_{eq}^m} \quad (3.6)$$

K	Koeffizient (Maß für die Bindungsaffinität)
q	adsorbierte Proteinmenge
q _{max}	max. adsorbierbare Proteinkonzentration
C _{eq}	Protein-Konzentration im Überstand
m	Heterogenitätsindex (zwischen 0 und 1)

Es wurden je 40 mg des Adsorbens mit 1 mL einer unterschiedlich stark konzentrierten BSA-Lösung in einem Überkopfmischer inkubiert. Nach erfolgreicher Inkubation wurden die Proben zentrifugiert und anschließend die verbliebene Konzentration an Protein im Überstand gemessen, wodurch die adsorbierte Proteinmenge ermittelt werden konnte (Versuchsdurchführung im Kapitel 8.6.3.2).

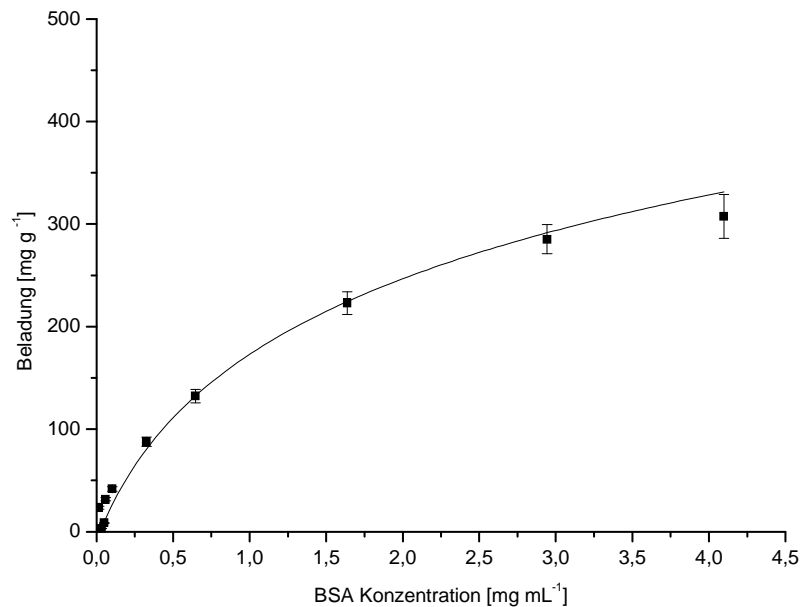


Abbildung 40: Ermittelte Langmuir-Freundlich-Isotherme der Bindung von BSA an EX M 1753 ($R^2=0,97$). Die Adsorption wurde in 200 mM NaPP (pH 7) durchgeführt (Mittelwert aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Der berechnete Wert für den Heterogenitätsindex m liegt unterhalb von 1. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche von EX M 1753 von heterogener Natur ist. Die Kurve läuft gegen einen Grenzwert von $300 \pm 11,7 \text{ mg g}^{-1}$ (Abbildung 40). Da BSA einen isoelektrischen Punkt von 4,7 bis 4,9 aufweist, sollte es bei dem pH-Wert 7 nicht sehr stark binden. Trotzdem konnte eine maximale Adsorption von ca. 300 mg g^{-1} festgestellt werden. Dies zeigt, dass EX M 1753 von weiteren Wechselwirkungen beeinflusst wird, die nicht elektrostatischer Natur sind, wie z.B. hydrophobe Interaktionen. Zudem besitzt die Oktaederschicht des EX M 1753 laut einer Analyse des Forschungszentrums Karlsruhe eine leichte positive Überschussladung [73]. Dadurch werden elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Proteinen begünstigt. Aus diesen Gründen eignet sich EX M 1753 als Adsorptionsmaterial für die Aufreinigung von polySia aus den Kulturbrühen.

5.4.4.4 pH –Wert-Abhängigkeit von EX M 1753

Um den Einfluss des pH-Werts von der Proteinadsorption an EX M 1753 näher zu untersuchen, wurde 1 mL des Konzentrats (Permeat der 10 kDa Membran) einer polySia-Batchbrühe mit 40 mg Adsorbens bei verschiedenen pH-Werten in einem Überkopfmischer inkubiert. Die pH-Werte wurden dabei mit folgenden Puffern eingestellt: pH 4 und pH 5 mit Acetat,

pH 6 mit MES, pH 7 mit HEPES und NaPP (gekennzeichnet als pH 7*), pH 8 und 9 mit Tris und pH 10 mit CAPS. Außerdem wurden drei verschiedene Puffer-Konzentrationen (50 mM, 100 mM, 200 mM) verwendet. Die Anfangskonzentration der Proteine in den Proben betrug 649 mg L^{-1} . In Abbildung 41 ist die Konzentration der nicht gebundenen Proteine bei Einsatz von EX M 1753 in Abhängigkeit vom pH-Wert nach einer Inkubationszeit von 30 min dargestellt.

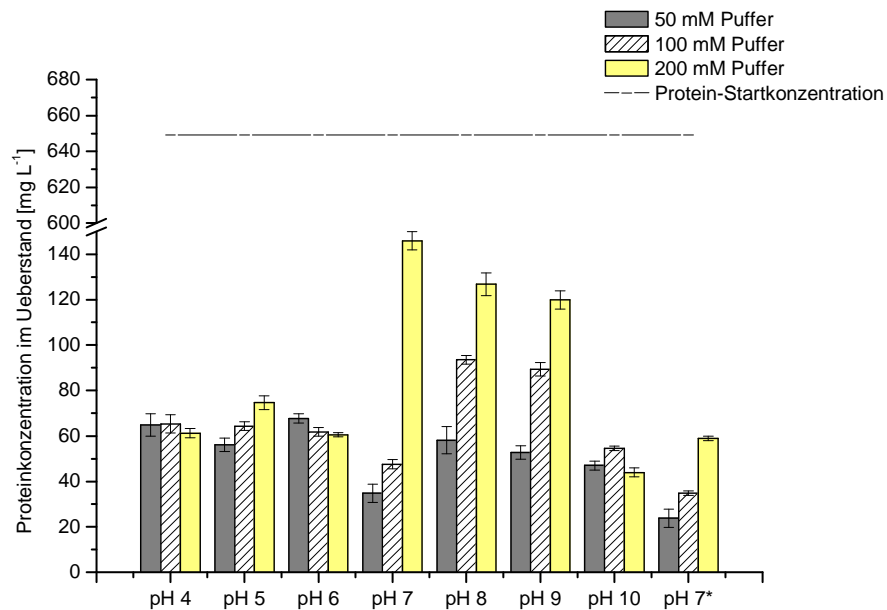


Abbildung 41: pH-Wert-Abhängigkeit der Proteinadsorption an EX M 1753. Die Adsorption wurde für 30 min jeweils in 50 mM, 100 mM und 200 mM Puffer bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Protein-Startkonzentration betrug 649 mg L^{-1} (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen).

Generell ist in allen pH-Bereichen eine Adsorption von Proteinen zu beobachten. Mit steigender Pufferkonzentration nimmt die Adsorptionskapazität in den meisten Fällen ab, da durch die höhere Konzentration des Puffers eine hohe Ionenstärke vorliegt, die die Bindung der Proteine an das Mineral behindert. Im pH-Bereich 4-6 ist die Adsorptionsfähigkeit des EX M 1753 konstant. Bei pH 8-9 fällt die Bindungskapazität nochmals leicht ab. Dies ist ein typisches Verhalten von Kationenaustauschermaterialien, da eine höhere Repulsion zwischen der permanent negativ geladenen EX M 1753 Oberfläche und dem über seinem isoelektrischen Punkt negativ geladenen Protein entsteht [73]. Bei pH 7 und einer Pufferkonzentrationen von 50 mM NaPP wurden die Proteine am stärksten adsorbiert. Die Proteinkonzentration konnte dabei um den Faktor 27 verringert werden.

Nach Ruiz-Hitzky *et al.* (2005) werden Polysaccharide je nach Ladungszustand über elektrostatische Wechselwirkungen an Tonmineraloberflächen adsorbiert oder auch zum Teil interkaliert [75]. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch für polySia zutrifft, wurde die polySia-Konzentration nach 30 min Inkubation im Überstand mittels TBA-Assay bestimmt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 8.6.3.2 zu entnehmen. Die polySia-Startkonzentration betrug $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$.

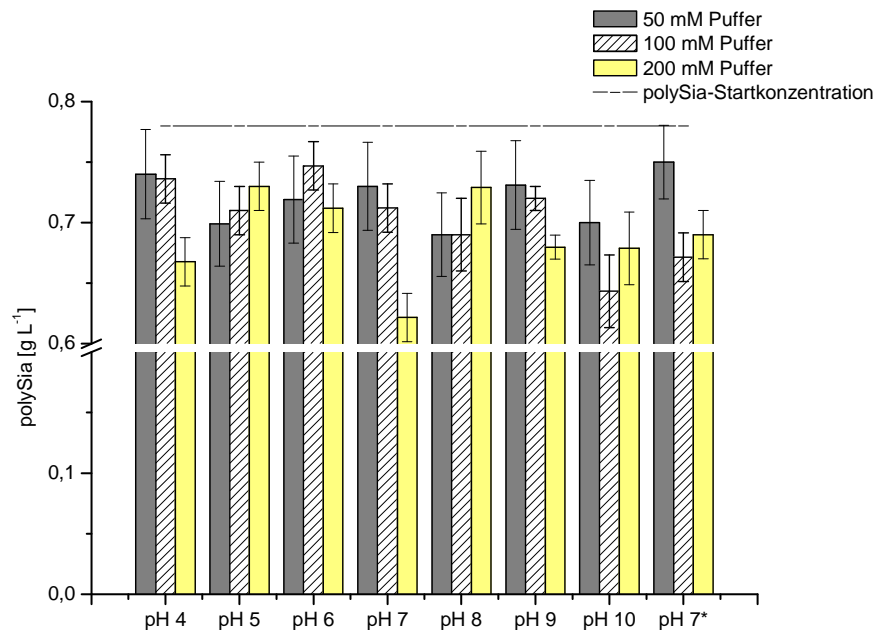


Abbildung 42: pH-Wert-Abhängigkeit der Batch-Probe von polySia an EX M 1753 nach 30 min. Die Adsorption wurde in 50 mM, 100 mM und 200 mM Puffer des entsprechenden pH-Werts durchgeführt. Die polySia-Startkonzentration betrug $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen).

Aus der Abbildung 42 lässt sich erkennen, dass bei allen pH-Werten eine leichte Adsorption von polySia auftritt. Die polySia-Adsorption nimmt trotz der eluierenden Wirkung der hohen Pufferkonzentrationen zu. Wahrscheinlich tritt polySia mit den Kationen der Puffer in Wechselwirkung, sodass die negative Ladung der polySia verringert wird und diese besser an EX M 1753 bindet. Die Konzentrationen der nicht adsorbierten polySia lagen dabei zwischen $0,65$ und $0,75 \text{ g L}^{-1}$. Die größte Wiederfindungsrate von polySia war im 50 mM NaPP (pH 7) mit $0,75 \text{ g L}^{-1}$ (96 %).

5.4.4.5 Fazit

Die Charakterisierung des Tonminerals EX M 1753 hinsichtlich der Adsorption von Proteinen und polySia zeigt, dass dieses Material eine vielversprechende Möglichkeit zur Aufreinigung von polySia darstellt. Die Proteine konnten im pH-Bereich von pH 4 bis 10 mit EX M 1753 zum größten Teil adsorbiert werden. Dies zeigt, dass EX M 1753 von weiteren Wechselwirkungen beeinflusst wird, die nicht elektrostatischer Natur sind, wie z.B. hydrophobe Interaktionen. Zudem besitzt die Oktaederschicht des EX M 1753 eine geringe positive Überschussladung, wodurch auch negativ geladene Proteine adsorbiert werden können [73]. Wie vermutet nimmt die Adsorptionskapazität für Proteine mit der Pufferkonzentration ab. Die Ionen des Puffers interkalieren in EX M 1753 bzw. besetzen die Oberfläche, so dass die Wechselwirkung zwischen Tonmineral und Protein mit steigender Pufferkonzentration verringert wird. Die effektivste Proteinadsorption wird bei pH 7 (NaPP) und pH 10 (CAPS) erreicht.

Desweiteren konnte die These von Ruiz-Hitzky *et al.* (2005), dass Polysaccharide je nach Ladungszustand über elektrostatische Wechselwirkungen an den Oberflächen von Tonmineralien adsorbiert oder zum Teil interkaliert werden, bestätigt werden. Die Adsorption von polySia an EX M 1753 lag bei 3-18 %. Im Gegensatz zu den Proteinen wurde ein entgegengesetzter Trend beobachtet. Die polySia-Adsorption nimmt mit steigender Pufferkonzentration zu. Die geringste Adsorption (3 %) konnte bei 50 mM NaPP (pH 7) erzielt werden. Aufgrund dieser minimalen Produktverluste und der hohen Proteinadsorption bei 50 mM NaPP (pH 7) stellt EX M 1753 eine kostengünstige Alternative zu den Fällungsreaktionen dar. In Tabelle 27 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 27: Ergebnisse der polySia-Aufreinigung mit dem 50 mM NaPP (pH 7) über den EX M 1753.

Ergebnisse	
Ausbeute	96 %
Zeitaufwand	30 min
Materialkosten	-

5.5 Kombination von Q-Membran und EX M 1753

Anschließend wurde untersucht, inwiefern durch eine Hintereinanderschaltung der Q-Membran und EX M 1753 die Aufreinigung von polySia noch weiter optimiert werden kann. Das

Ziel dabei ist es, die Adsorptionseffizienz zu steigern und eine effektive Aufreinigung von polySia zu etablieren. Hierzu wurden die Versuche auf Basis der besten Aufreinigungsergebnisse (Puffersubstanz, Pufferkonzentration und pH) aus dem Kapitel 5.4.2 und 5.4.4 durchgeführt. In Vorversuchen wurde zunächst untersucht, in welcher Reihenfolge die beiden Methoden eingesetzt werden sollten. Es stellte sich heraus, dass der Einsatz der Q-Membran gefolgt von EX M 1753 am effektivsten ist.

Der Aufarbeitungsprozess startet, wie im Kapitel 5.4.1 bereits beschrieben, mit einer Zellseparation mittels Mikrofiltration (0,45 μm). Hierzu wurde sowohl eine Batch- als auch eine Fed-Batchbrühe verwendet. Das Volumen der Brühen wurde mit Hilfe der Cross-flow-Ultrafiltration bei einem Größenausschluss von 10 kDa eingengt.

Die Proben wurden zunächst mit der Q-100 Membran aufgereinigt. Hierzu wurde die Q-100 Membran mit 100 mM NaPP (pH 7) equilibriert und anschließend mit 20 mL der jeweiligen Probe beladen. 10 mL der Elutionsfraktionen von polySia wurden anschließend jeweils mit 400 mg EX M 1753 versetzt (NaPP, 50 mM, pH 7) und für 3 h inkubiert. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 8.6.3.2 zu entnehmen. In Abbildung 43 sind die erhaltenen polySia-Ausbeuten sowie Proteinkonzentrationen nach der Aufreinigung von polySia aus Batch- und Fed-Batch-Proben mit der Q-Membran und anschließender Adsorption an EX M 1753 dargestellt.

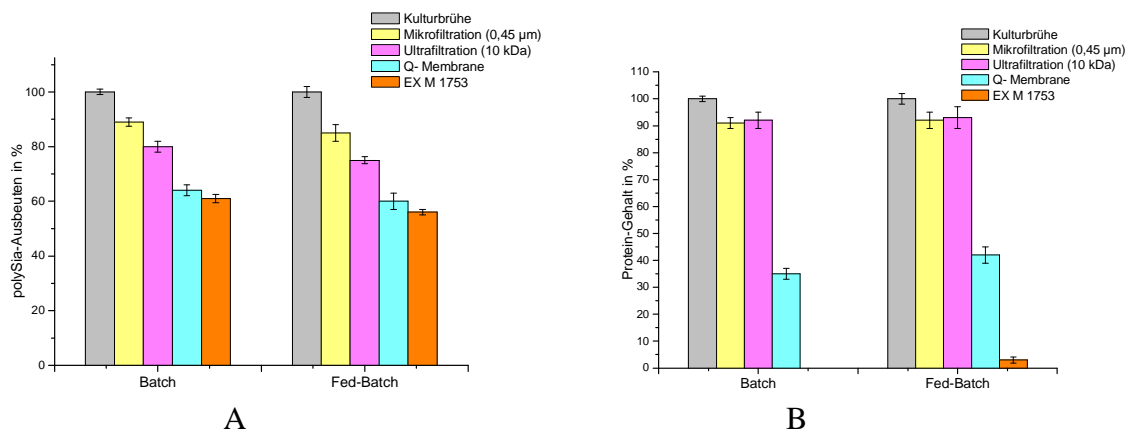


Abbildung 43: polySia- (A) und Protein-Gehalt (B) in der Batch- und Fed-Batchbrühe. Die polySia-Anfangskonzentration für die Batchbrühe lag bei $0,49 \text{ g L}^{-1}$ und die Proteinkonzentration bei $0,23 \text{ g L}^{-1}$. Für die Fed-Batchbrühe lagen die polySia-Anfangskonzentration bei $0,94 \text{ g L}^{-1}$ und die Proteinkonzentration bei $0,37 \text{ g L}^{-1}$.

Abbildung 43 A zeigt die polySia-Ausbeuten für die Batch- und Fed-Batchbrühe. Die polySia-Ausbeute für die Batchbrühe betrug 61 %. Bei der Fed-Batchbrühe konnten Ausbeuten um 56 % erzielt werden. Die größten Verluste liegen jeweils bei der Membranadsorption vor,

für die Batchbrühe dementsprechend bei 14 % und für die Fed-Batchbrühe bei 15 %. Zusätzlich treten hohe Verluste bei der Mikrofiltration im Falle der Fed-Batchbrühe auf (15 %). Bei Einsatz der EX M 1753 treten hingegen nur minimale Verluste an polySia auf (3-4 %). Die Abbildung 43 B zeigt die jeweiligen Protein-Gehälter der Batch- und Fed-Batchbrühe. Die größte Proteinanreicherung erfolgt auch hier während der Membranadsorption. Der nachfolgende Aufreinigungsschritt mit EX M 1753 konnte eine komplette Entfernung aller Proteine in der Batchbrühe gewährleisten. Für die Fed-Batchbrühe ergab sich eine minimale Proteinwiederfindung von 3 %.

Für die Fed-Batchbrühe konnte insgesamt eine sehr gute polySia-Ausbeute erzielt werden. Trotzdem waren nach der EX M 1753 Aufreinigung noch Proteine messbar. Aus diesem Grund wurde für die Fed-Batchbrühe die Aufreinigungsstrategie leicht modifiziert. Die Aufreinigung mit der Q-Membran erfolgte direkt nach der Zellseparation ohne Aufkonzentration, mit der Inkubation mit EX M 1753 im Anschluss. Für größere Volumina bietet sich eine Aufkonzentration nach dem ersten Schritt bereits an. Da diese Aufreinigung im Labormaßstab stattfand (10 mL Volumen), wurde auf eine Aufkonzentration verzichtet. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse dieser modifizierten Aufreinigungsstrategie dargestellt.

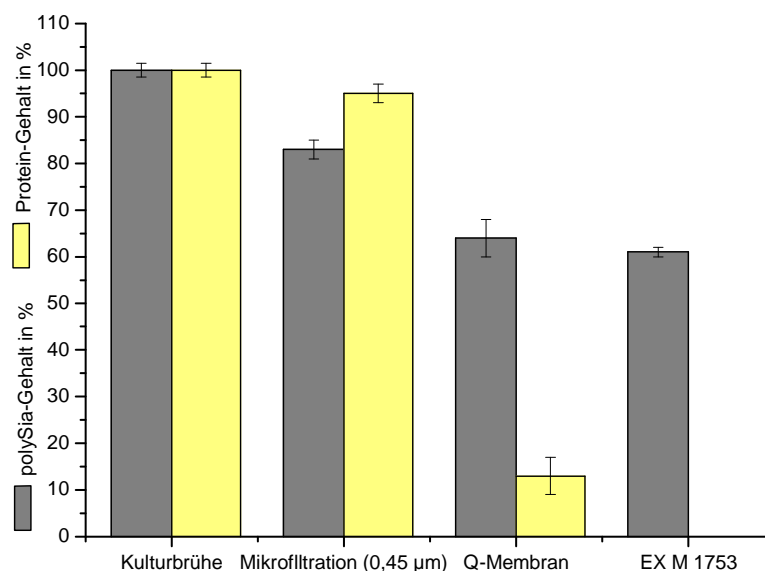


Abbildung 44: PolySia- und Protein-Gehalt für den Fed-Batch-Überstand. Die polySia-Anfangskonzentration lag bei $0,94 \text{ g L}^{-1}$ und die Proteinkonzentration bei $0,37 \text{ g L}^{-1}$.

Es konnte eine polySia-Ausbeute von 61 % erreicht werden. Die größten Verluste treten, wie bereits beschrieben, bei der Membranadsorption auf. Zudem konnte mit der Q-Membran eine

Proteinanreicherung von 82 % erzielt werden, da hier die Proteine nicht konzentriert vorliegen. Nach der Adsorption an EX M 1753 konnte kein Protein mehr in der Lösung nachgewiesen werden. Da diese Modifikation sehr erfolgreich war, empfiehlt es sich, den Übergang in den Technikumsmaßstab mit den Kulturüberständen durchzuführen.

5.5.1 Polymerlängen-Bestimmung für den Labormaßstab

Nach der Aufreinigung mit dem Membranadsorber und EX M 1753 erfolgte die Bestimmung der polySia-Polymerlänge mit der DMB-HPLC. In Abbildung 45 ist die erhaltene polySia-Polymerlänge des Konzentrats der Batch- und Fed-Batchbrühe sowie derjenigen aus dem Kulturüberstand der Fed-Batchbrühe dargestellt.

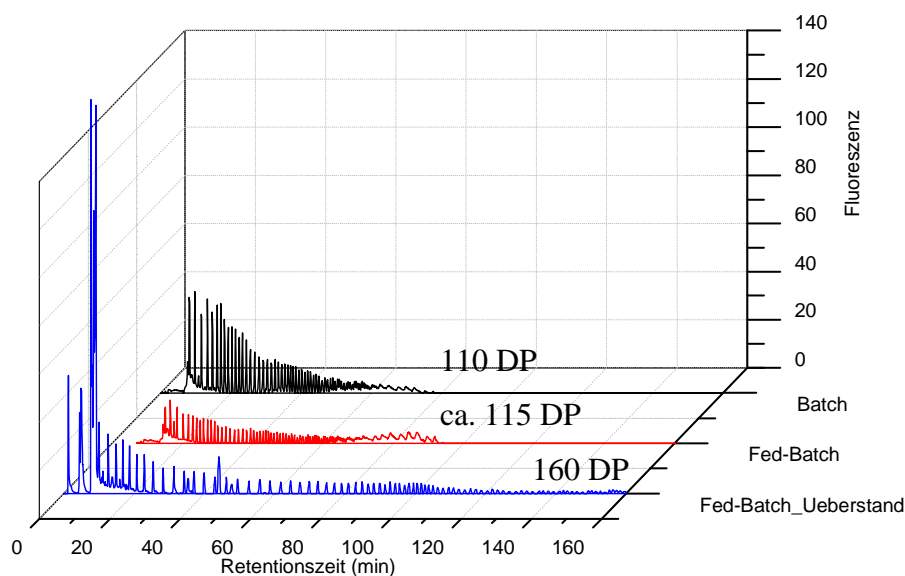


Abbildung 45: Ermittelte polySia-Polymerlänge nach der Aufreinigung der Batch- und Fed-Batch-Konzentrate und des Fed-Batch-Überstands mit der DMB-HPLC im Labormaßstab.

Für die Batchbrühe wurde mit der DMB-HPLC eine maximale Polymerlänge von 110 DP ermittelt. Bei der Fed-Batchbrühe konnte eine Polymerlänge von ca. 115 DP ermittelt werden. Wie schon im Kapitel 5.3 erwähnt, werden bei Fed-Batch-Kultivierungen höhere polySia-Polymerlängen produziert als bei der Batch-Kultivierung. Die Polymerlänge für die Fed-Batchbrühe konnte nicht genau bestimmt werden, da die Messung vermutlich durch die Proteinverunreinigungen gestört wird. Mit einer polySia-Polymerlänge von 160 DP war die Aufreinigung des Fed-Batch-Überstands (Kulturbrühe direkt nach der Mikrofiltration) im Labormaßstab am erfolgreichsten. Hier trat keine Signalüberlappung auf, was auf eine sehr

reine polySia-Probe hindeutet. Aus diesem Grund wurde der Scale-up vom Labormaßstab in den Technikumsmaßstab ausschließlich mit dem Überstand aus den Batch- und Fed-Batchbrühen (Kulturbrühe direkt nach der Mikrofiltration) durchgeführt.

5.5.2 Fazit

Die Ergebnisse der Kombination von Q-Membran und EX M 1753 in Abbildung 43 zeigen, dass zum einen bei allen polySia-Proben eine effektive Proteinadsorption erzielt werden konnte, zum anderen, dass die polySia-Ausbeuten mit 56 und 61 % in einem hohen Bereich liegen. Der verlustreichste Schritt während der Aufreinigung trat bei der Membranadsorbertechnik auf. Dabei gingen bis zu 19 % des Produkts verloren. Da die adsorptiven Wechselwirkungen zwischen dem Tonmineral EX M 1753 und Proteinen im Vergleich zu polySia sehr hoch sind, trat in diesem Aufreinigungsschritt nur ein geringer Verlust an polySia auf. Durch die Aufreinigung mit der Q-Membran wurden die Proteine größtenteils abgereichert. Der Fed-Batch-Überstand wies dabei mit 82 % die effektivste Abreicherung auf, gefolgt von der Batchbrühe mit 58 % und der Fed-Batchbrühe mit 51 %. Durch die anschließende Inkubation mit EX M 1753 wurde bei dem Fed-Batch-Überstand (Kulturbrühe direkt nach der Mikrofiltration) und der Batchbrühe eine vollständige Proteinabreicherung erzielt. Für die Fed-Batchbrühe ergab sich eine minimale Proteinwiederfindung von 3 %. Zudem wurden die Polymerlängen der aufgereinigten polySia bestimmt. Für die Batchbrühe ergab sich eine Polymerlänge von 110 DP. Aus der Fed-Batchbrühe konnten polySia-Längen von ca. 115 DP gewonnen werden. Eine genaue Bestimmung der Polymerlänge war jedoch nicht möglich, da die DMB-HPLC-Messung durch Verunreinigungen in der Probe gestört wird. Die Polymerlänge der polySia aus dem Fed-Batch-Überstand (Kulturbrühe direkt nach der Mikrofiltration) betrug sogar 160 DP. Der Scale-up des Aufreinigungsprozesses in den Technikumsmaßstab wurde nur mit dem Batch- und Fed-Batch-Überstand durchgeführt, da aus diesem ein Produkt mit der höchsten Polymerlänge isoliert werden konnte.

5.6 Scale-up: Technikumsmaßstab

Wie schon im vorigen Kapitel beschrieben, wurde der Übergang in den Technikumsmaßstab mit den Batch- und Fed-Batch-Überständen (Kulturbrühe direkt nach der Mikrofiltration) durchgeführt. Für die Aufreinigung im Technikumsmaßstab wurde eine Sartobind® SingleSep 5 (Q-Membran, Membranfläche 2500 cm², Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

verwendet. Die Sartobind® SingleSep 5 wurde dabei an eine Membranadsorberanlage angeschlossen. In Abbildung 46 ist eine schematische Skizze der Anlage dargestellt [77]. Die Anlage besteht aus einem Kreislauf (schwarze Pfeile), wodurch die Membran zyklisch mit der Probe beladen werden kann. Über ein lineares Pumpensystem (grünen Pfeile), kann die Membran mit Puffer- oder Elutions-Lösung gespült werden. Durch die programmierbaren Ventile und die Pumpensteuerung kann zwischen beiden Systemen automatisch gewechselt werden. Zusätzlich verfügt die Anlage über *Online*-Analysegeräte zur Messung der UV-Absorption, der Leitfähigkeit, dem Druck und der Durchflussgeschwindigkeit. Zur Bestimmung der polySia- und Proteinkonzentrationen wurden *Offline*-Proben aus dem System entnommen.

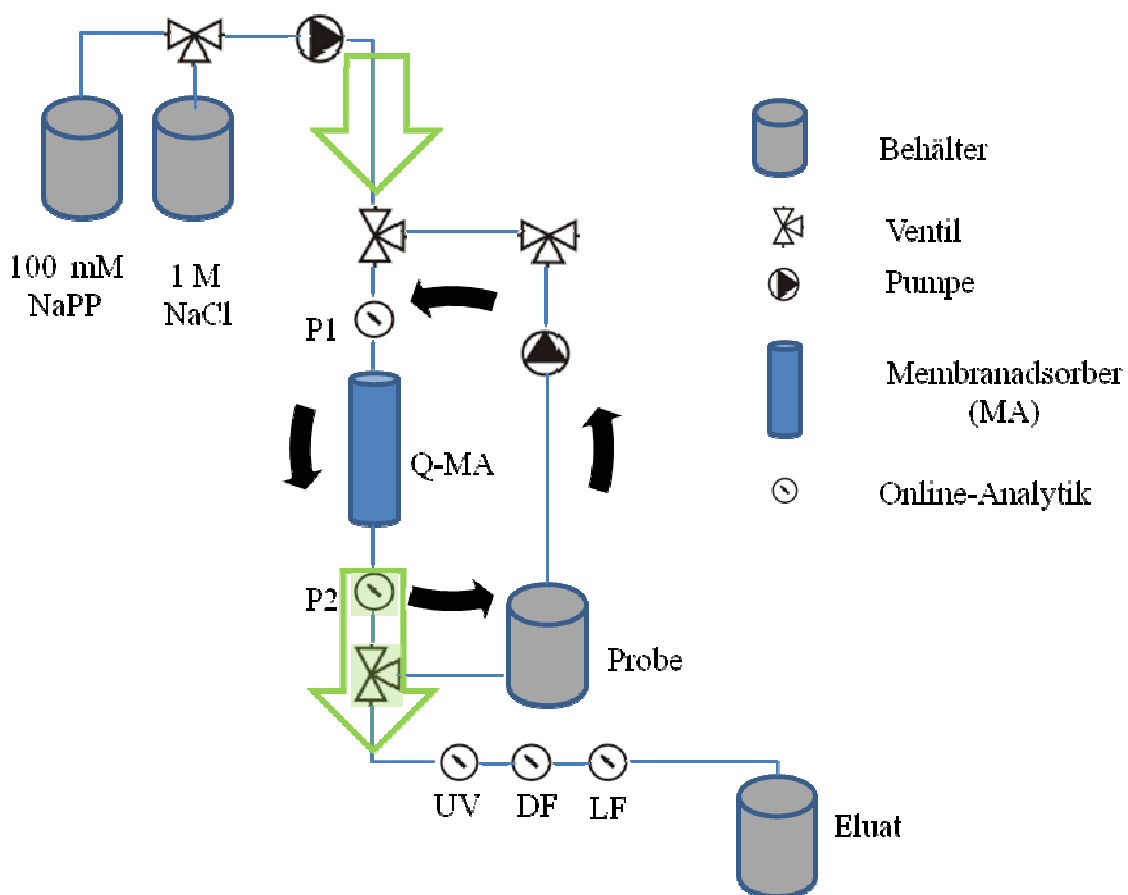


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Membranadsorberanlage zur Aufreinigung von polySia mit Sartobind® SingleSep 5 im Technikumsmaßstab. UV = UV-Absorption; DF = Durchflussgeschwindigkeit; LF = Leitfähigkeit.

Bei EX M 1753 erfolgte im Technikumsmaßstab eine Erhöhung der eingesetzten Materialmenge (2 g), welche linear mit dem Volumen (200 mL) erhöht wurde. In Abbildung 47 ist die optimierte Aufreinigungsstrategie für den Technikumsmaßstab schematisch dargestellt.

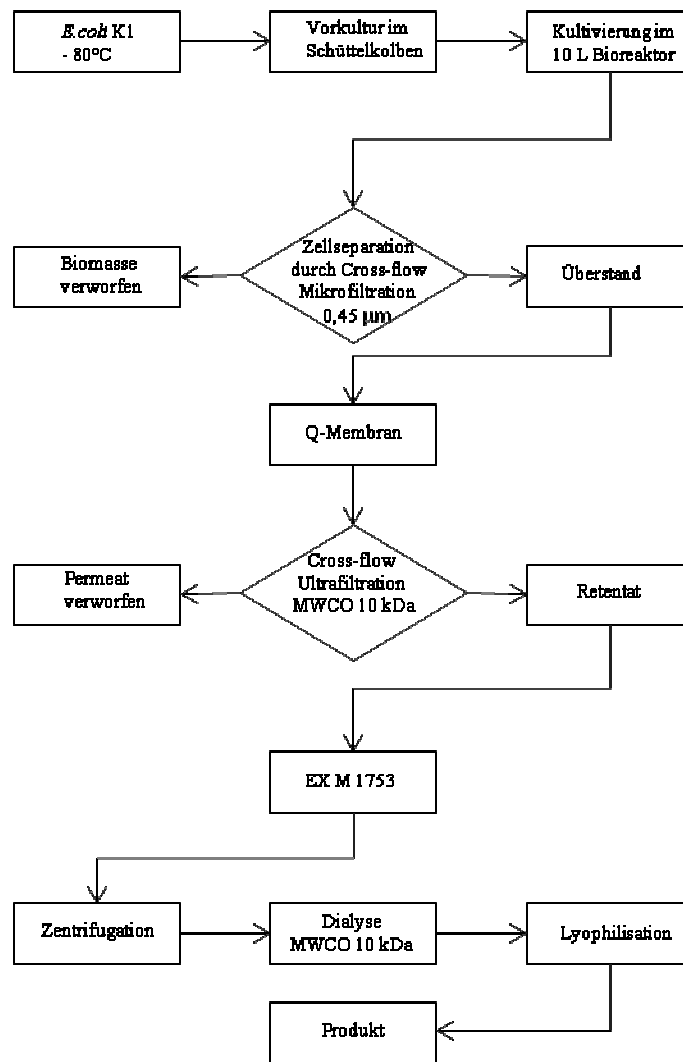


Abbildung 47: Fließschema des Produktions- und Aufarbeitungsprozesses von polySia aus *E. coli* K1 unter Verwendung der Adsorbertechnik im Technikumsmaßstab.

Der Aufarbeitungsprozess startete analog zu der in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Strategie mit der Trennung von Zellmasse und Kulturmedium. Der 10 L Kulturüberstand wurde mit 10 L 100 mM NaPP (pH 7) auf die Q-Membran (Sartobind® SingleSep 5, Membranfläche 2.500 cm² Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) aufgetragen und mit 1 M NaCl eluiert. Um eine Erschöpfung der Membrankapazität zu vermeiden und eine möglichst effektive Produktausbeute zu erlangen, wurden insgesamt vier Durchgänge im Fall der Batchbrühe durchgeführt. Aufgrund höherer polySia-Konzentrationen wurde die Fed-Batchbrühe in insgesamt sieben Zyklen prozessiert. Ein Zyklus besteht dabei aus der Equilibrierung mit 100 mM NaPP (pH 7), der Beladung, dem Waschen mit 100 mM NaPP (pH 7) und der Elution mit 1 M NaCl. In Abbildung 48 sind die erhaltenen polySia- und Proteinbindungskapazitäten in den einzelnen Zyklen für die Batchbrühe dargestellt.

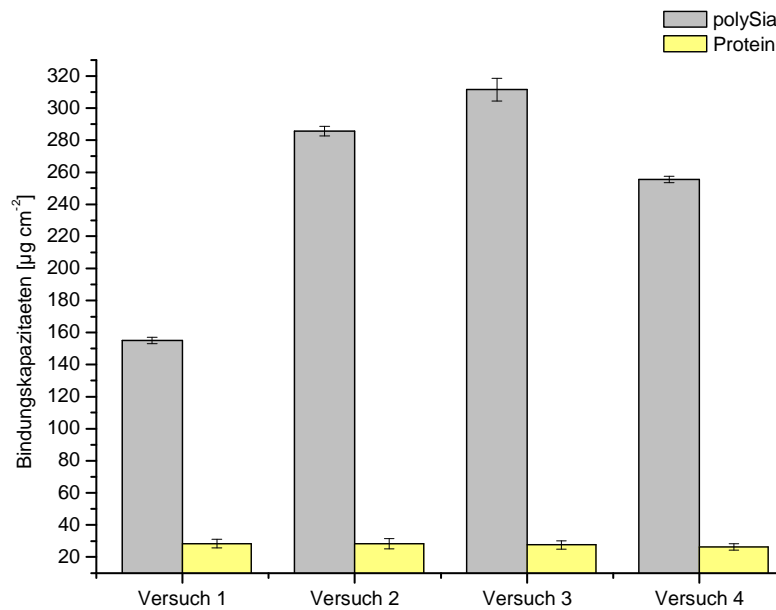


Abbildung 48: Erhaltene Bindungskapazität von polySia und Proteinen auf der Sartobind® SingleSep 5-Membran. Als Ausgangslösung wurde eine 10 L Batchbrühe mit einem polySia-Gehalt von 3,31 g und einem Protein-Gehalt von 2,13 g verwendet.

Es ist zu erkennen, dass die maximale Bindungskapazität für polySia erst beim dritten Zyklus erreicht wurde. Anschließend fällt die Bindungskapazität ab, da die polySia-Konzentration in der Probelösung erschöpft ist. Insgesamt wurde für polySia eine maximale Bindungskapazität von $311,5 \pm 7 \mu\text{m cm}^{-2}$ erreicht. Für die Proteine betrug die maximale Bindungskapazität schon beim ersten Zyklus $28,4 \pm 2,7 \mu\text{m cm}^{-2}$. Danach sank die Bindungskapazität langsam ab. Die niedrige Bindungskapazität der polySia beim ersten Zyklus lässt sich dadurch erklären, dass die Membran noch nicht ausreichend mit 100 mM NaPP (pH 7) equilibriert war bzw. mehr Proteine während des ersten Zyklus gebunden wurden, sodass weniger Plätze für die polySia zu Verfügung stehen. Die mittlere Bindungskapazität aus den vier Zyklen beträgt für polySia $239,4 \mu\text{m cm}^{-2}$ und für die Proteine $27,7 \mu\text{m cm}^{-2}$. Alle Bindungskapazitäten der polySia an der Sartobind® SingleSep 5 sind kleiner als an der Sartobind Q 100 ($412,2 \mu\text{g cm}^{-2}$, Kapitel 5.4.2). Der große Unterschied könnte an der Modulgeometrie der Q 100- und SingleSep 5-Membran liegen. Bei der Q-100-Membran liegen die Membranlagen flach übereinander und bei der SingleSep 5 ist das Membranmaterial um einen Kern gewickelt.

Nach der Membranadsorption wurde das Volumen des aufgereinigten Kulturüberstands mit Hilfe der Cross-flow-Ultrafiltration bei einem Größenausschluss von 10 KDa aufkonzentriert und entsalzt. Daraufhin folgte die Adsorption der restlichen Proteine aus dem Retentat an EX M 1753. Zur vollständigen Entfernung der Pufferanteile wurde diese Lösung dialysiert. An-

schließlich wurde aus der wässrigen Phase durch Gefriertrocknung ein stabiles Produkt erhalten. In Abbildung 49 und Abbildung 50 sind die kompletten Aufreinigungsschritte mit den jeweiligen polySia- und Protein-Gehältern der Batch- und Fed-Batchbrühe dargestellt.

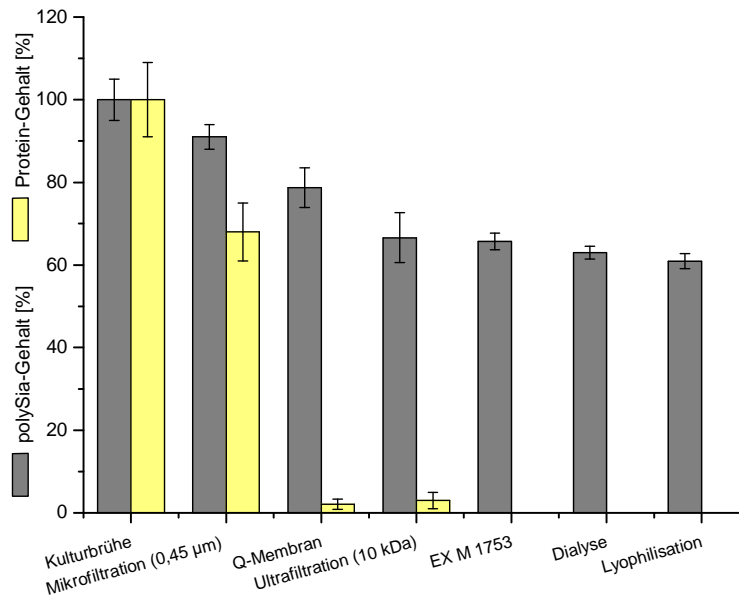


Abbildung 49: Erhaltene polySia- und Protein-Konzentrationen der 10 L Batchbrühe bei der Aufreinigung im Technikumsmaßstab. Die Ausgangslösung enthielt eine polySia-Gehalt von 3,31 g und ein Protein-Gehalt von 2,13 g.

Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse der Aufreinigung mit der Q-Membran gefolgt von EX M 1753 für die Batchbrühe. Es wurde eine polySia-Ausbeute von 61 % (2,02 g aus 10 L) erzielt. Die größten Verluste traten bei der Membranadsorbertechnik und Ultrafiltration auf. Der Verlust liegt bei 24,4 %. Bei EX M 1753 wurde ein sehr kleiner Verlust von 1-2 % an polySia ermittelt. Nach der Adsorption an der Q-Membran war bereits ein Großteil der Proteine abgereichert. Durch die Dialyse wurden die restlichen Pufferbestandteile entfernt. Abschließend erfolgte die Produktabscheidung über die Lyophilisation. Die Verluste an polySia in diesen letzten beiden Schritten waren mit 4,8 % sehr gering. Die Ausbeuten konnten gegenüber der Fällungsmethode um 6 bis 11 % (Kapitel 5.3) erhöht werden.

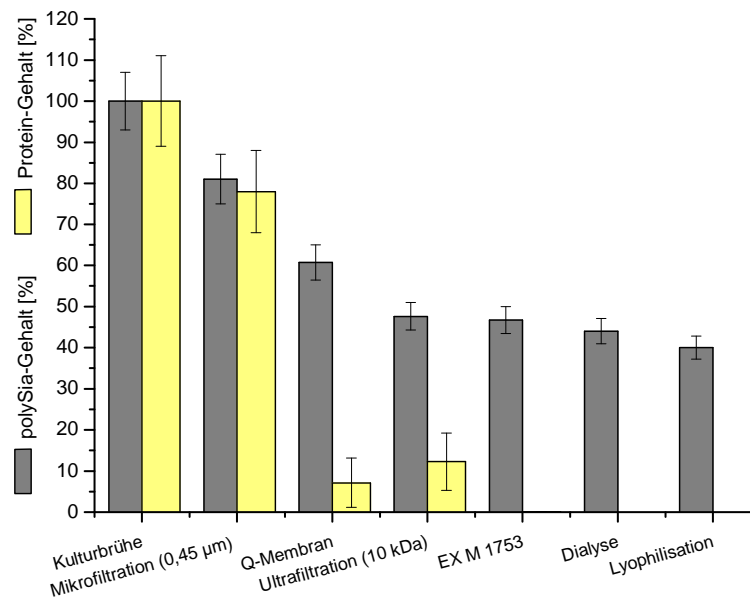


Abbildung 50: Erhaltener polySia- und Protein-Konzentratione der 10 L Fed-Batchbrühe Aufreinigung im Technikumsmaßstab. Die Ausgangslösung enthielt einen polySia-Gehalt von 7,2 g und einen Protein-Gehalt von 3,27 g.

Abbildung 50 zeigt die Ergebnisse der vollständigen Aufreinigung von polySia aus der Fed-Batchbrühe. Der polySia-Anfangsgehalt lag bei 7,2 g aus 10 L. Durch die Mikrofiltration (0,45 µm) konnte die Proteinmenge um 22 % reduziert werden, da ein Teil der Proteine im Retentat der Mikrofiltration verbleibt. Gleichzeitig erfolgt jedoch ein hoher Produktverlust von 19 %. Durch die Aufreinigung mit der Q-Membran wurden die Proteine zu 70 % eliminiert. Allerdings fand auch in diesem Schritt ein Produktverlust von 19 % statt. Mit der Ultrafiltration wurde die polySia im Retentat aufkonzentriert. Hier wurde ein Produktverlust von 5 % ermittelt. Dieser Verlust resultiert aus der niedermolekularen polySia, die sich im Permeat anreichert. Die nachfolgende Verwendung von EX M 1753 gewährleistet eine vollständige Entfernung der Proteine. Die polySia wurde dabei nur zu ca. 1 % adsorbiert. Als letzter Aufreinigungsschritt folgte die Dialyse. Die entsalzte polySia-Lösung wurde abschließend lyophilisiert und als Feststoff isoliert. In diesen beiden Schritten war der Produktverlust minimal und betrug insgesamt nur 6,7 %. Die finale Ausbeute der aufgereinigten polySia liegt bei 2,9 g, was in Bezug auf die eingesetzte Kulturbrühe einer Ausbeute von 40 % entspricht. Die Ausbeuten der Fed-Batchbrühe liegen mit 21 % unter dem der Batchbrühe. Durch die Erhöhung der Adsorptionszyklen an der Membran könnte die Ausbeute der Fed-Batchbrühe erhöht werden. Hierzu wären weitere Optimierungsarbeiten notwendig. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Aufreinigungsstrategie konnten die Ausbeute gegenüber der

Fällungsmethode trotz der derzeitigen Verluste bei der Membranadsorption von 5-11 % auf 40 % erhöht werden.

5.6.1 Polymerlängen-Bestimmung für den Technikumsmaßstab

Nach der Produktabscheidung wurde die Polymerlänge der im Technikumsmaßstab hergestellten polySia mittels DMB-HPLC bestimmt. In Abbildung 51 sind die erreichten polySia-Polymerlängen der Batch- und Fed-Batch-Kultivierung nach der Aufreinigung dargestellt.

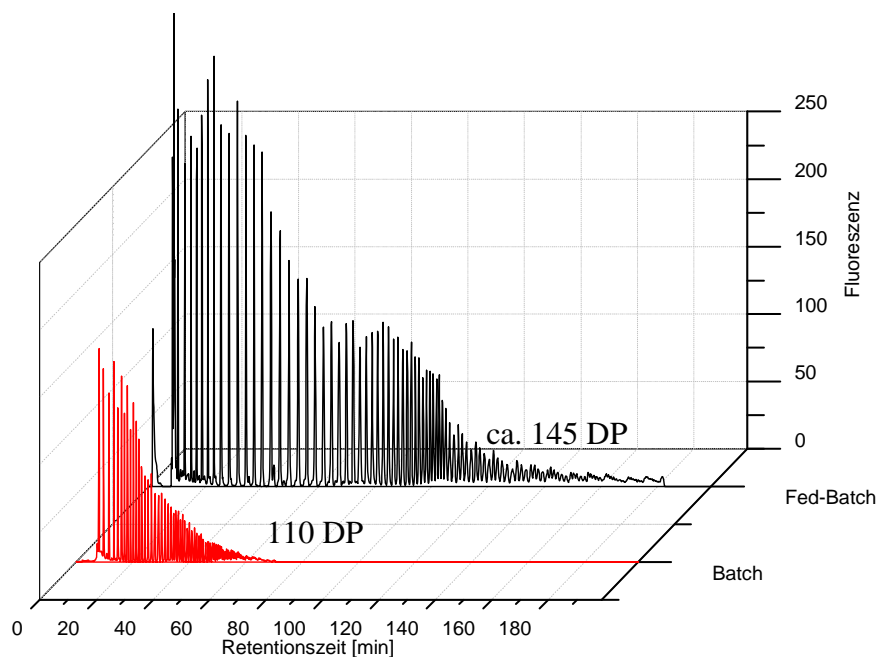


Abbildung 51: Mittels DMB-HPLC ermittelte polySia-Polymerlänge der Batch- und Fed-Batch-Kultivierung nach der Aufreinigung im Technikumsmaßstab.

Mit der DMB-HPLC wurde für die Batch-Kultivierung eine polySia-Polymerlänge von 110 DP ermittelt. Die Polymerlänge der polySia aus der Fed-Batch-Kultur beträgt ca. 145 DP. Eine genaue Polymerlänge konnte nicht ermittelt werden, da nach 145 Einheiten eine Signalüberlappung vorliegt.

5.6.2 Bestimmung des Endotoxin- und DNA-Gehalts

Die isolierte polySia soll als Gerüstsubstanz zur gerichteten Regeneration von Nervenzellen im menschlichen Körper eingesetzt werden. Eine wichtige Voraussetzung ist demnach die Reinheit des Produktes. Zur Ermittlung dieser wurde der Endotoxin- und DNA-Gehalt der isolierten polySia bestimmt.

Endotoxine sind Lipopolysaccharide, welche Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (*Salmonellen*, *Shigellen*, *E.coli*) sind. Lipopolysaccharide haben eine toxische Wirkung auf eukaryontische Zellen [78]. Der Endotoxin-Gehalt wurde mit dem LAL-Test (*Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test) bestimmt (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 8.5.6). In der polySia aus der Batch- und Fed-Batchbrühe betrug der Endotoxin-Gehalt nach der Aufreinigung 14 EU mg^{-1} . Zum Vergleich wurde bei der chromatographischen Aufreinigung von polySia ein Endotoxin-Gehalt von 10 EU mg^{-1} und $90.000 \text{ EU mg}^{-1}$ gemessen [47]. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigte polySia liegt folglich im unteren Randbereich.

Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 bestimmt. Die aufgereinigte polySia wurde dementsprechend mit diesem DNA-Farbstoff gefärbt und anschließend mit einem Fluoreszenzphotometer gemessen (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 8.5.7). Für die polySia aus der Batch- und Fed-Batchbrühe wurde ein DNA-Gehalt zwischen $11,5$ bis 14 ng mg^{-1} gemessen. Die DNA-Abreicherung erfolgte über die Q-Membran. Beim Eluieren mit 1 M NaCl verbleibt die DNA dabei überwiegend auf der Membran haften. Erst bei einer Salzkonzentration von $1,25 \text{ M}$ wird die DNA eluiert [79]. Der DNA-Gehalt liegt bei der chromatographischen Aufreinigung zwischen 8 ng mg^{-1} und 10 ng mg^{-1} [47]. Trotz der hohen Anschaffungskosten der chromatographischen Säulen unterscheiden sich die DNA-Gehälter nicht wesentlich von der polySia aus der Adsorbertechnik.

5.6.3 Fazit

Die polySia-Aufreinigung der Batch- als auch der Fed-Batchbrühe war im 10 L Maßstab erfolgreich. Die Proteine konnten dabei vollständig entfernt werden. Bei der Batchbrühe wurde eine polySia-Ausbeute von 61% erzielt. Die größten Verluste von $24,4 \%$ traten bei der Membranadsorption und der Ultrafiltration auf.

Die Ausbeute der Fed-Batchbrühe lag bei 40% . Der Separationsschritt mit der Mikrofiltration und der erste Aufreinigungsschritt mit der Q-Membran weisen mit 40% die größten Produktverluste auf. Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte zeigten geringere Verluste mit einer Summe von 20% . Der Verlust an der Membran könnte durch eine Erhöhung der Zyklen erniedrigt werden. Außerdem können die Verluste aus der Ultrafiltration durch die Aufreinigung der Oligosialinsäure zurückgewonnen werden (vgl. Kapitel 6). Im Vergleich zu

der Fällungsmethode konnte mit der Adsorbertechnik die Ausbeute für die Batchbrühe von 55 auf 61 % erhöht werden. Im Fall der Fed-Batchbrühe konnte die Ausbeute von 5-11 % sogar auf 40 % gesteigert werden. Außerdem wurden im Vergleich zur bisherigen präzipitations-basierten Aufreinigungsmethode längere polySia-Moleküle isoliert werden. Die polySia-Polymerlängen bei der Fällungsmethode lagen für die Batchbrühe bei 95 DP und für die Fed-Batchbrühe bei 110 DP. Mit der neuen Aufreinigungsstrategie konnte für die Batchbrühe eine Länge von 110 DP und für die Fed-Batchbrühe eine Länge von 145 DP erreicht werden. Eine weitere wesentliche Verbesserung dieser Methode mittels Q-Membran und EX M 1753 stellte die Verkürzung der Aufreinigungszeit von 10 auf 8 Tage dar (Abbildung 52). Zusätzlich konnte der Arbeitsaufwand erheblich verringert werden (s. Abbildung 29 und Abbildung 47).

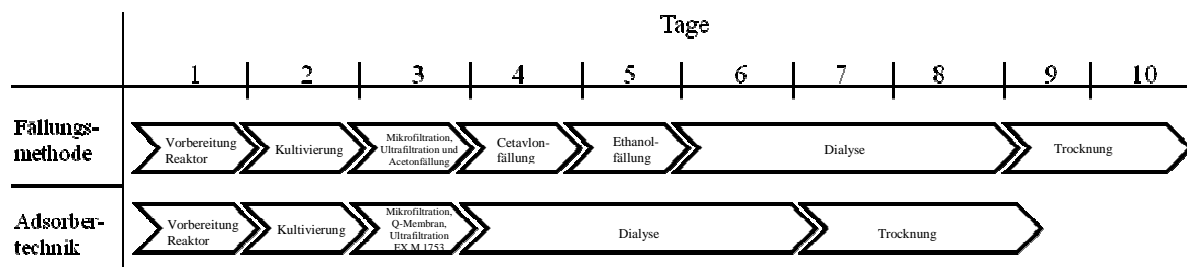


Abbildung 52: Vergleich der Aufreinigungszeit mit Fällungsmethode bzw. Adsorbertechnik.

Der Endotoxin-Gehalt der aufgereinigten polySia aus der Batch- und Fed-Batchbrühe liegt bei je 14 EU mg^{-1} . Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt gemessen, welcher für die Batch- und Fed-Batchbrühen zwischen $11,5\text{-}14 \text{ ng mg}^{-1}$ liegt. Die Reinheit der polySia aus der Adsorbertechnik liegt bei 97-99 %.

Somit stellt die neu entwickelte Aufreinigungsmethode eine gute Alternative zu der konventionellen Fällungsmethode dar. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der vollständigen Aufreinigung der Batch- und Fed-Batch Kultivierung zusammengefasst.

Tabelle 28: Ergebnisse der Batch- und Fed-Batch Aufreinigung in 10 L.

Ergebnisse	Batch 10 L	Fed-Batch 10 L
Ausbeute	61 %	40 %
Zeitaufwand	8 Tage	8 Tage
Materialkosten ³	42,4 € g ⁻¹	59,9 € g ⁻¹

³ Hier sind Materialkosten (ohne Arbeitszeit) von der Kultivierung bis zum isolierten Produkt aufgeführt.

Das Preis-Leistungs-Verhältnis der Batch-Aufreinigung ist um 29 % niedriger als die der Fed-Batch-Aufreinigung, da die Aufreinigung der Batchbrühe bei gleichen Materialkosten effektiver ist. Durch weitere Optimierung (Erhöhung der Adsorberzyklen) der Fed-Batch-Aufreinigung können die Materialkosten gesenkt werden.

6. Aufreinigung von Oligosialinsäure

In diesem Kapitel soll die Produktion und Aufreinigung von Oligosialinsäure (oligoSia) beschrieben werden. Ihre Herstellung kann über die Ultrafiltration als Nebenprodukt [43] oder durch enzymatische Spaltung der langkettigen polySia erfolgen. Die oligoSia ist eine niedermolekulare α 2,8-verknüpfte 5-N-Acetylneuraminsäure. Der Übergang zwischen oligo- und polySia ist fließend, eine genaue Grenze der Polymerlänge gibt es jedoch nicht [80]. Die Grenzen der Oligosialinsäure wurde in dieser Arbeit auf 35 bis 40 DP festgelegt, da diese Länge für die Forschungsgruppe benötigt wurde. Die Oligosialinsäure wurde für die Untersuchung der Struktur und zur Beschichtung von Nanopartikeln benötigt. Durch die Beschichtung der Nanopartikel wird die Fähigkeit der Oligosialinsäure die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ausgenutzt, um Wirkstoffe direkt ins Gehirn zu transportieren [6, 7].

6.1 Aufarbeitung von Oligosialinsäure mittels Ultrafiltration

Zur Aufkonzentrierung der oligoSia wurde mit der Fed-Batchbrühe zunächst eine Cross-Flow-Ultrafiltration (10 kDa) durchgeführt. Das Permeat dieser Filtration weist einen hohen Anteil an oligoSia auf und wurde zunächst mit Hilfe von Hydrosat-Ultrafiltrations-Kassetten mit einer Porengröße von 5 bzw. 2 kDa aufkonzentriert. Es wurden jeweils 8 L Permeat mit unterschiedlicher Anfangskonzentration verwendet. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse hierzu dargestellt.

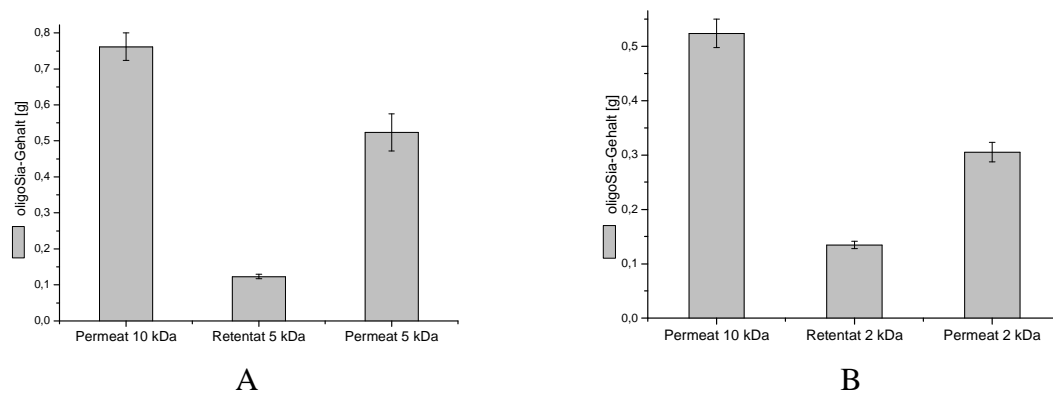


Abbildung 53: OligoSia-Gehalt vor und nach der Aufkonzentration mittels A: 5 kDa Filter, B: 2 kDa-Filter.

Es konnten aus der Ausgangslösung mit einem oligoSia-Gehalt von 0,76 g nur 123 mg oligoSia durch die 5 kDa Filtration erhalten werden (Abbildung 53 A). Dies entspricht einer Ausbeute von 16 %. Der größte Anteil verbleibt jedoch im Permeat der 5 kDa-Filtration (69 %). Daraus lässt sich schließen, dass ein Großteil der oligoSia durch die 5 kDa-Membran dringt. Aus diesem Grund wurde für die Aufkonzentration ein Filter mit 2 kDa getestet. Die 2 kDa-Filtration wurde ausgehend von einem oligoSia-Gehalt von 0,52 g durchgeführt (Abbildung 53, B). Bei der Aufkonzentration mit dem 2 kDa-Filter verbleiben 26 % oligoSia im Retentat (2 kDa) und 74 % im Permeat (2 kDa). Bei der 2 kDa-Filtration konnte somit der Anteil an oligoSia gegenüber der 5 kDa Filtration nur um 10 % erhöht werden. Trotz der kleineren Porengröße von 2 kDa, konnten nicht alle oligoSia-Moleküle im Retentat gehalten werden.

Da für die Cross-flow-Filtration keine Filter mit kleineren Porengrößen als 2 kDa erhältlich sind, wurde ein neues System (LabCell) der Firma Koch Membrane Systems getestet und es erfolgte eine Untersuchung, ob die Ausbeuten der oligoSia im Retentat erhöht werden können. In Abbildung 54 ist die Anlage schematisch dargestellt.

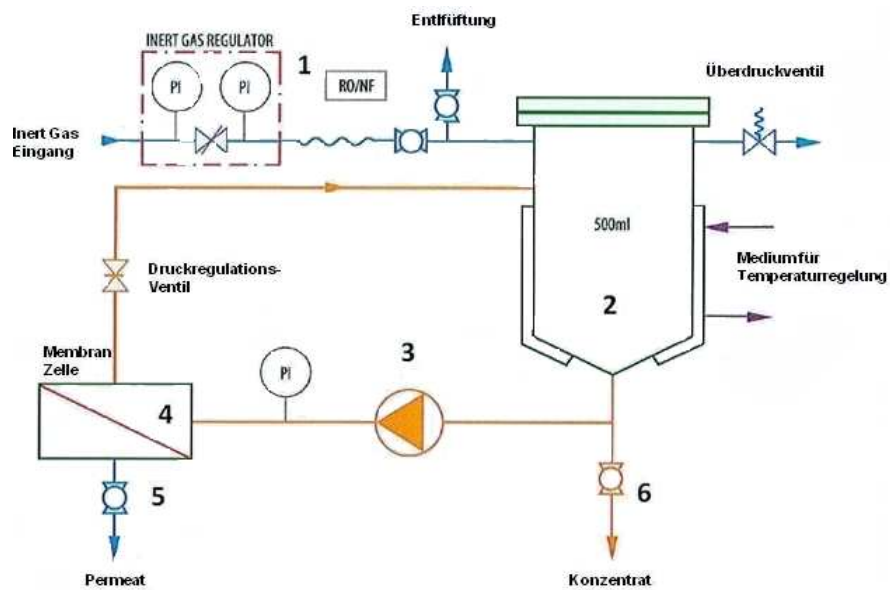


Abbildung 54: Schematische Darstellung des Koch Membrane Systems mit Druckregelung (1), Probenbehälter (2), Pumpe (3), Membran (4) und Auslassventilen (5+6) [81].

Diese Anlage erlaubt die Aufkonzentration und die Entsalzung von Lösungen im Labormaßstab und verfügt über die Möglichkeit, Membranen mit unterschiedlicher Porengröße (0,2 und 1 kDa) zu verwenden (Tabelle 29). Das dargestellte System (Abbildung 54) besteht aus einem druckfesten Edelstahlbehälter (2) für die Probenlösung sowie einer Pumpe (3) zum Transport der Lösung durch das System und über die Membran (4). Der Druckaufbau erfolgt im System durch Stickstoff (1) aus einer angeschlossenen Druckflasche. Es kann abhängig von der verwendeten Membran bis zu einem Druck von 35 bar gearbeitet werden. Die Regelung des Volumenstroms erfolgt dabei über das Ventil der Druckflasche und kann mittels der Regelung für die Pumpe nachjustiert werden. Für thermolabile Substanzen bietet das System die Möglichkeit, eine Temperaturregelung über einen Hohlmantel um den Probenbehälter vorzunehmen. Das Permeat verlässt das System über ein geöffnetes Ventil (5) und das Retentat kann ebenfalls nach beendeter Filtration über ein weiteres Ventil abgelassen werden (6).

Tabelle 29 zeigt drei verschiedene Membranen. Die MPF Membranen sind praktisch über den gesamten pH-Bereich einsetzbar und können bei Temperaturen von bis zu 70 °C verwendet werden. Die SR 3-Membran kann in einem Bereich von pH 4-10 und bis zu einer Temperatur von 50 °C benutzt werden.

Tabelle 29: Verwendete Membranen für die Aufkonzentration des Permeats zur Gewinnung von oligoSia. System: Koch Membran Systems.

Bezeichnung	Porengröße
SR 3	0,2 kDa (Retention von 30-50 % Chlorid-Ionen)
MPF 34	0,2 kDa
MPF 36	1 kDa

Zum Testen der Membranen wurden 250 mL des Permeats der 10 kDa-Filtration mit einem oligoSia-Gehalt von $0,132 \text{ g L}^{-1}$ (33 mg) auf 50 mL aufkonzentriert. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse der Aufkonzentration mit den Membranen SR 3, MPF 34 und 36 dargestellt.

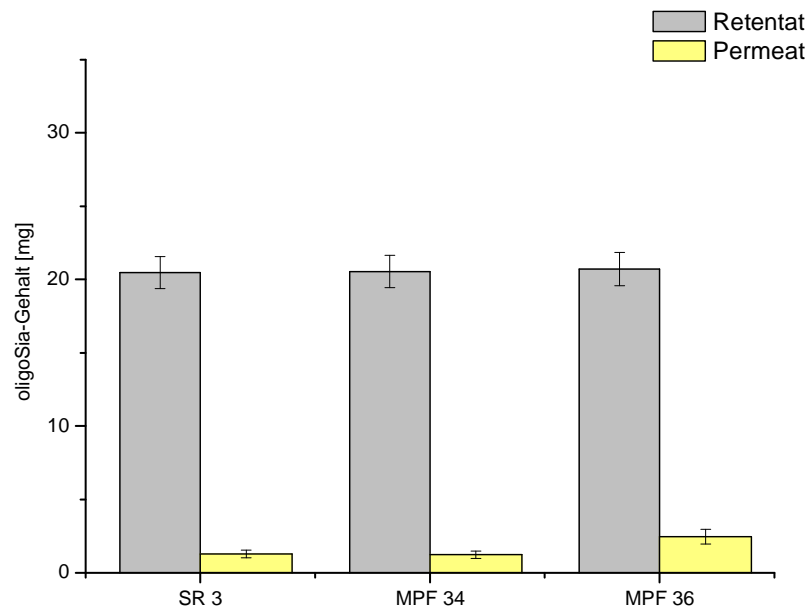


Abbildung 55: OligoSia-Gehalt nach der Aufkonzentration mit SR 3-, MPF 34- und MPF 36-Membran. Der oligoSia-Gehalt des verwendeten 10 kDa Permeats liegt bei 33 mg.

Sowohl mit der 0,2 kDa- (SR 3 und MPF 34) Membran als auch mit der 1 kDa- (MPF 36) Membran konnten bis zu 62 % der oligoSia im Retentat gehalten werden und nur ein geringer Teil der oligoSia gelangte ins Permeat über. Der größte Verlust mit 7,5 % wurde für die MPF 36 Membran bestimmt. Mit der SR 3 und der MPF 34 erhöhte sich die Filtrationszeit um 27 % gegenüber der MPF 36. Zusätzlich zeigt sich bei der SR 3-Membran eine deutliche Farbveränderung gegenüber dem 10 kDa-Permeat, welches eine leicht braune Färbung besaß; Das erhaltene Retentat der SR 3-Membran war leuchtend gelb und das Permeat wies eine rosa Färbung auf. Dies hängt wahrscheinlich mit der Retention der Chlorid-Ionen zusammen

(Eigenschaft der SR 3-Membran, vgl. Tabelle 29). Daher empfiehlt es sich aufgrund der kürzeren Filtrationsdauer, die MPF 36 Membran zu verwenden. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit diesem System die Ausbeuten an oligoSia im Retentat gegenüber der Cross-Flow-Filtration deutlich erhöht werden können. Der Nachteil bei der Anlage von Koch Membrane Systems ist das niedrige Arbeitsvolumen von maximal 500 mL.

Fazit

Mit der Cross-flow-Ultrafiltration (2 kDa und 5 kDa) konnte die oligoSia mit nur geringer Ausbeute aufkonzentriert werden. Mit der 2 kDa-Filtration konnten 10 % höhere Ausbeuten als mit der 5 kDa-Filtration erzielt werden. Jedoch erhöht sich das Risiko einer Kontamination bei der 2 kDa-Filtration, da die Aufkonzentrationszeit für 8 L der Ausgangslösung bei einem Eingangsdruck von 3 bar 12 h beträgt. Daher empfiehlt es sich bei der 2 kDa-Filtration, das Retentat zukühlen, um das Risiko einer Kontamination zu erniedrigen. Zudem finden oligoSia-Verluste an der Membran statt.

Das LabCell-System hielt die oligoSia-Moleküle größtenteils zurück und ermöglichte somit eine vielversprechende Volumenreduktion mit gleichzeitiger Produktkonzentration. Aber auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die oligoSia an den Membranen adsorbiert wird. Das LabCell-System dient lediglich der Erprobung von Membranen und der Simulation der gewünschten Anwendung. Daher ist es nicht in der Lage, größere Volumina als 500 mL zu bearbeiten. Systeme für größere Volumina mit den getesteten Membranen bietet Koch Membrane Systems ebenfalls an. Diese könnten für eine Aufkonzentration von oligoSia in Betracht gezogen werden. Alle getesteten Membranen zeigten hier ähnliche Ergebnisse. Aufgrund der kürzeren Filtrationsdauer empfiehlt es sich, für große Volumina die MPF 36 Membran zu verwenden.

6.1.1 Aufreinigung der OligoSia-Konzentrate

Nach der Aufkonzentration der oligoSia wurden die Proben parallel mit der Fällungsmethode bzw. der Adsorbertechnik aufgereinigt. Hierzu wurden ausschließlich die Konzentrate der Cross-flow-Ultrafiltration (2 kDa und 5 kDa) verwendet, da die Konzentrate aus dem LabCell System sich aufgrund des kleinen Volumens nicht für den Technikumsmaßstab eignen. Es wurden je 300 mL des Konzentrats der 2 kDa und 5 kDa Ultrafiltration mit der Fällungsme-

thode (Kapitel 5.1) und der Adsorbertechnik (Kapitel 5.5) aufgereinigt. In Abbildung 56 und Abbildung 57 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

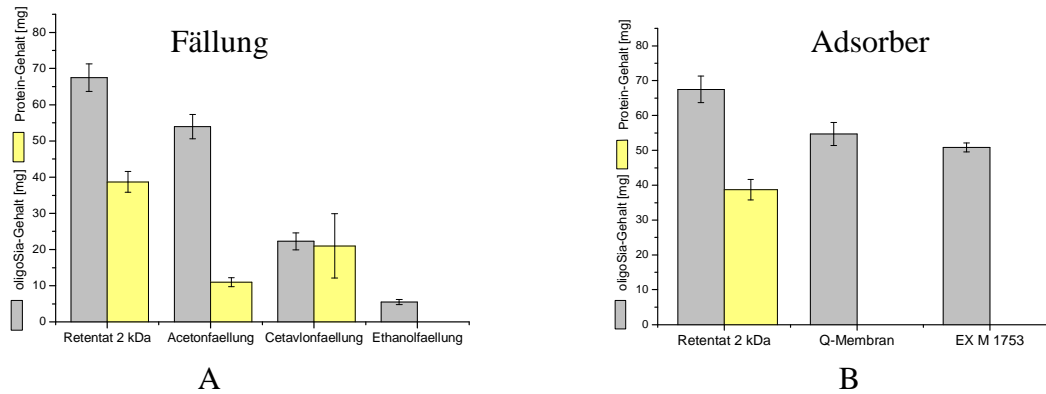


Abbildung 56: Ergebnisse der 2 kDa OligoSia Aufreinigung mit der Fällungsmethode (A) und Adsorbertechnik (B).

Abbildung 56 A zeigt die oligoSia-Aufreinigung mit der Fällungsmethode und Abbildung 56 B die Aufreinigung mit Hilfe der Adsorbertechnik. Die Aufreinigungen wurden mit dem gleichen Ausgangsgehalt an oligoSia und Proteinen durchgeführt. Für die Fällungsmethode ergab sich ein Ausbeute von 5,5 mg (8,2 %) und mittels der Adsorbertechnik eine Ausbeute von 50,8 mg (75 %). Die Ausbeute der Adsorbertechnik liegt somit um den Faktor 10 höher als die der Fällungsmethode. Die größten Verluste treten bei der Cetavlonfällung und Ethanolfällung auf. Der hohe Verlust bei der Ethanolfällung kann damit erklärt werden, dass das noch vorhandene Cetavlon die Fällung stört. Zusätzlich beeinflusst das Cetavlon die Proteinmessung mittels Bradford Assay. Aus diesem Grund kann festgehalten werden, dass Cetavlon für die oligoSia-Aufreinigung nicht geeignet ist.

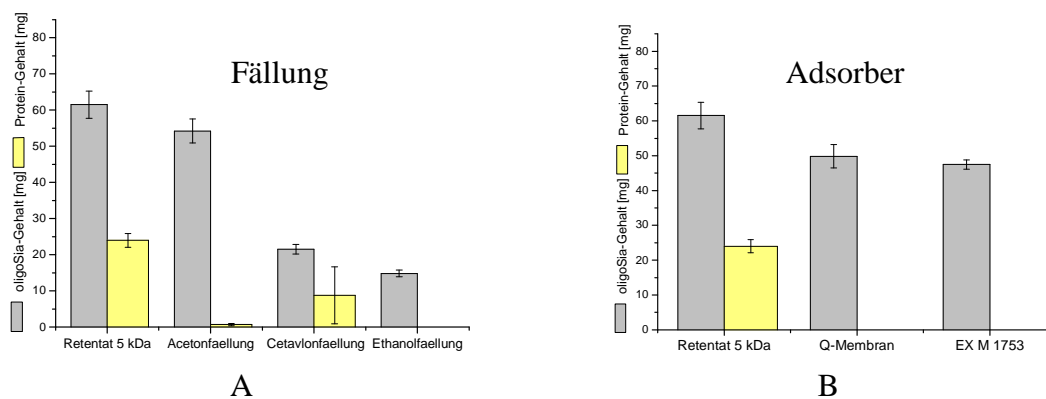


Abbildung 57: Ergebnisse der 5 kDa oligoSia-Aufreinigung mit der Fällungsmethode (A) und Adsorbertechnik (B).

Die Abbildung 57 zeigt die Aufreinigung des 5 kDa Retentats mit der Fällungsmethode (A) und der Adsorbertechnik (B). Die Ausbeuten liegen bei der Fällungsmethode bei 14,8 mg (24,1 %) und bei der Adsorbertechnik bei 47,5 mg (77 %). Auch bei der Fällungreaktion der 5 kDa-Filtration tritt der größte Verlust bei der Cetavlonfällung auf. Im Vergleich zu der 2 kDa Aufreinigung unterscheiden sich die Verluste nur um 2,5 %. Die Ausbeuten der Adsorbertechnik für 2 kDa- und 5 kDa-Aufreinigung weisen mit 77 und 75 % nur eine Differenz von 2 % auf.

Nach den Aufreinigungen wurden die Proben mit einer 1 kDa Membran dialysiert und anschließend das Produkt mittels Gefriertrocknung getrocknet. Dabei verringerte sich bei allen Proben die Ausbeute. Für die 2 kDa-Aufreinigung aus der Fällungsmethode ergab sich eine endgültige Ausbeute von 3 mg (4 %) und bei der 5 kDa-Aufreinigung eine Ausbeute von 10,8 mg (18 %). Die Ausbeute der 2 kDa- und 5 kDa-Aufreinigung über die Adsorbertechnik lag nach der Trocknung bei 21 mg (31 %) und 28,5 mg (47 %). Die Ausbeuten der 2 kDa-Aufreinigung wurden sogar um 59 % verringert und bei der 5 kDa-Variante lag der Verlust bei 43 %. Die Verluste treten bei der Dialyse auf. Anscheinend reicht die Porengröße von 1 kDa nicht aus, um die oligoSia-Moleküle vollständig zurückzuhalten, obwohl für die Aufkonzentration 2- bzw. 5 kDa-Membranen verwendet wurden. Wahrscheinlich liegen die kurzkettigen oligoSia-Moleküle linear vor, sodass sie durch die Poren des Dialyse-Schlauchs gelangen. Bei der Ultrafiltration wird dies durch das tangential Anströmen verhindert. Der hohe Verlust bei der 2 kDa-Aufreinigung weist darauf hin, dass dort kürzere oligoSia-Ketten vorhanden sind.

Polymerlängen-Bestimmung der produzierten oligoSia

Nach der Aufreinigung erfolgte die Polymerlängebestimmung der produzierten oligoSia. Hierfür wurde die DMB-HPLC verwendet. In Abbildung 58 und Abbildung 59 sind die erhaltenen oligoSia-Polymerlängen nach der Aufreinigung mittels Fällungsmethode und Adsorbertechnik dargestellt.

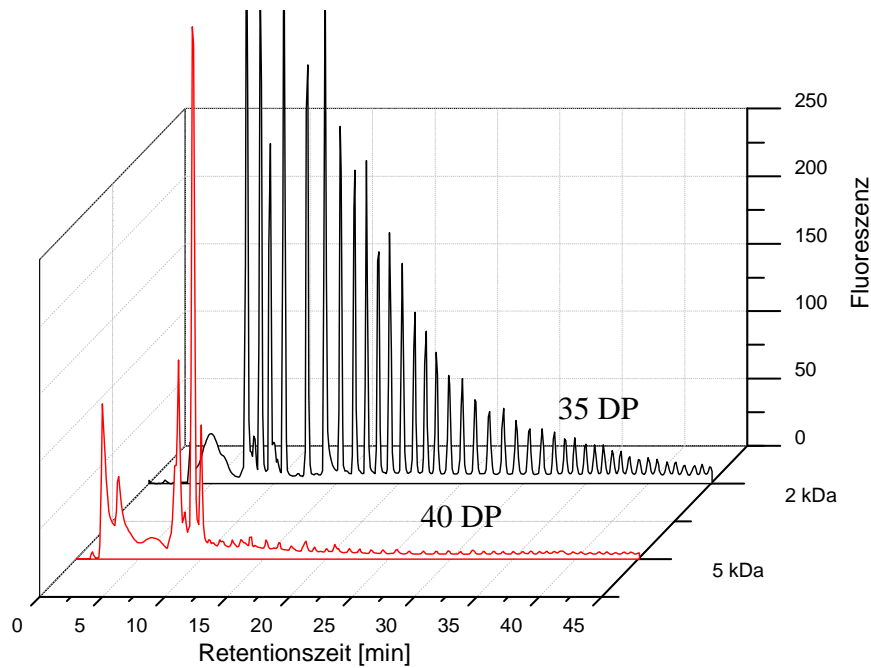


Abbildung 58: oligoSia-Polymerlänge der 2 kDa (schwarze Kurve) und 5 kDa (rote Kurve)-Aufreinigung mit der Fällungsmethode.

Abbildung 58 zeigt die Analyse der Polymerlänge der oligoSia, welche mittels Fällungsmethode (2 kDa- und 5 kDa-Retentat) aufgereinigt wurde. Die maximale Polymerlänge für die 2 kDa-Aufreinigung beträgt 35-40 DP. Dies entspricht den Erwartungen, da Moleküle mit einer Länge von etwa 35 DP bei einer 10 kDa-Ultrafiltration in das Permeat übergehen. Demnach ist die Produktion von oligoSia im kleinen Maßstab erfolgreich gewesen. Die Untersuchung der oligoSia aus der 5 kDa-Aufreinigung ergab ebenfalls eine Polymerlänge von ca. 40 DP. Eine eindeutige Bestimmung konnte aufgrund der geringen Auflösung der Peaks nicht durchgeführt werden. Vermutlich enthielt die verwendete polySia aus der Fällungsmethode noch Verunreinigungen, wodurch die DBM-Reaktion gestört wurde.

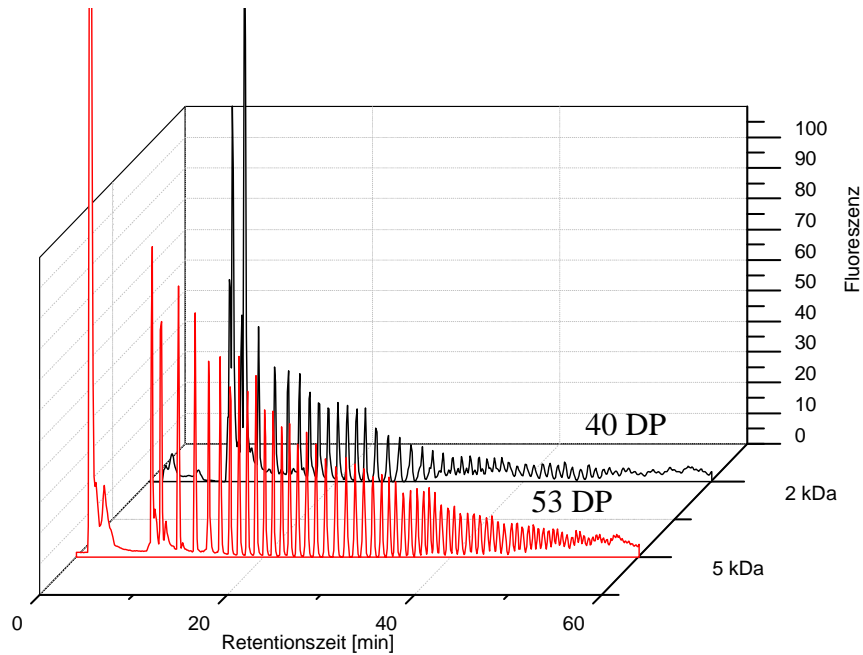


Abbildung 59: OligoSia-Polymerlänge der 2 kDa- (schwarze Kurve) und 5 kDa- (rote Kurve) Aufreinigung mit der Adsorbertechnik.

Die Abbildung 59 zeigt die oligoSia-Polymerlängen nach der Aufreinigung mit der Adsorbertechnik (2 kDa und 5 kDa-Retentat). Bei der 2 kDa-Aufreinigung beträgt die oligoSia-Polymerlänge 40 DP und für die 5 kDa-Aufreinigung wurde sogar eine Polymerlänge von 53 DP festgestellt. Wie bereits in Kapitel 5.5 erwähnt, werden durch die Adsorbertechnik höhere Polymerlängen erhalten, da die länger-kettigen polySia-Moleküle vermutlich bei der Fällung verloren gehen. Somit eignet sich die Fällungsmethode besser für die Produktion von kurzkettiger oligoSia, womit jedoch eine niedrigere Ausbeute verbunden ist.

6.1.2 Fazit

Mittels der Fällungsmethode und der Adsorbertechnik konnte oligoSia erfolgreich aus dem Retentat der 2 kDa und 5 kDa-Konzentration gewonnen werden. Die erhaltenen Ausbeuten unterschieden sich erheblich. Bei der Fällungsmethode konnten Ausbeuten zwischen 8,2 % (2 kDa) und 24,1 % (5 kDa) erreicht werden. Im Fall der Adsorbertechnik wurden hingegen Ausbeuten zwischen 75 und 77 % erzielt. Durch die anschließende Dialyse und Trocknung des Produkts wurden die Verluste erhöht.

Die Analyse der Polymerlänge ergab, dass durch die Adsorbertechnik höhere Polymerlängen erhalten werden können (40-53 DP). Bei der Fällungsmethode wurden oligoSia-Ketten mit einer Länge von 35-40 DP isoliert. Daher eignet sich die Fällungsmethode zur Produktion

von kurzkettiger oligoSia. Es ist jedoch anzumerken, dass die Ausbeuten sehr gering sind. Alternativ bietet sich auch die 2 kDa-Aufreinigung von oligoSia über die Adsorbertechnik an, da hier hohe Ausbeuten mit einer Polymerlänge von bis zu 40 DP erzielt werden können.

6.2 OligoSia-Produktion durch Endosialidase

In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob sich mit der Endosialidase (EndoNF⁴) gezielt niedermolekulare polySia-Moleküle aus polySia herstellen lassen. Die Grundlage dieser Versuche bildet hierbei die Arbeit von *Schwarzer et al.* (2009). Die Endosialidase ist schließlich ein Enzym, welches in der Lage ist, spezifisch α -2,8-glykosidisch verknüpfte Sialinsäure-Reste innerhalb (endo) der Polymer-Kette zu spalten [34]. Ziel dabei ist es, definierte oligoSia-Polymerlängen zu isolieren. Für die Versuche wurde polySia aus der Batch-Aufreinigung (Kapitel 5.6) mit einer maximalen Polymerlänge von 110 DP verwendet. 800 μ g polySia wurden mit 2 pmol EndoNF bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lang inkubiert (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 8.7). Der Erfolg des Verdaus wurde anschließend durch die Charakterisierung der erhaltenen Polymerlänge überprüft.

6.2.1 Enzymatischer Verdau der polySia bei 37 °C

Der enzymatischer Verdau wurde bei 37 °C und unterschiedlichen Inkubationszeiten (1h, 2h, 4h und 6h) durchgeführt. Die enzymatische Reaktion wurde bei -80 °C mit Ethanol (1:1) gestoppt. Die Überwachung des Verdaus erfolgte mittels DMB-HPLC. Dadurch konnten die maximalen Polymerlängen bzw. der Polymerisationsgrad bestimmt werden. In Abbildung 60 sind die Ergebnisse des Verdaus mit 2 pmol EndoNF nach verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt.

⁴ Zur Verfügung gestellt von Prof. Gerardy-Schahn, MHH.

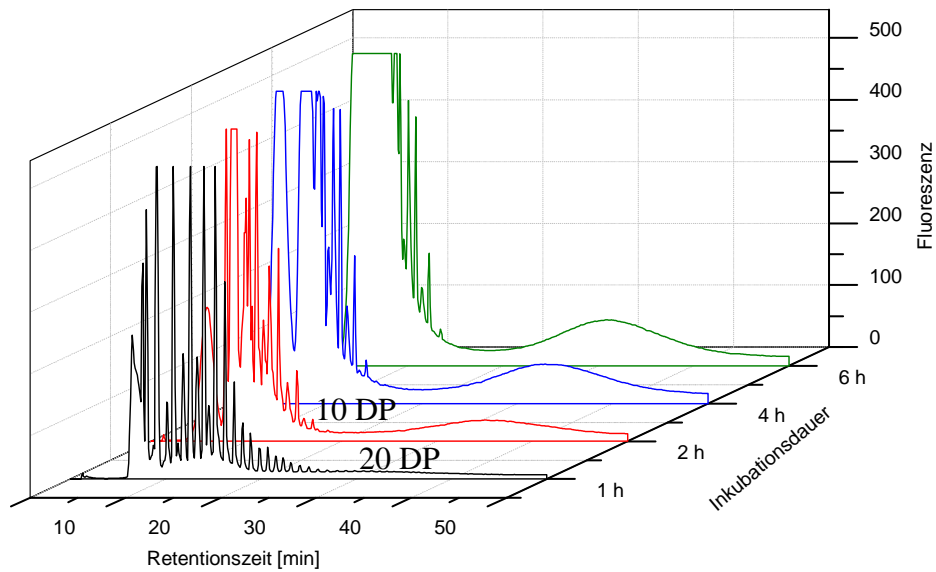


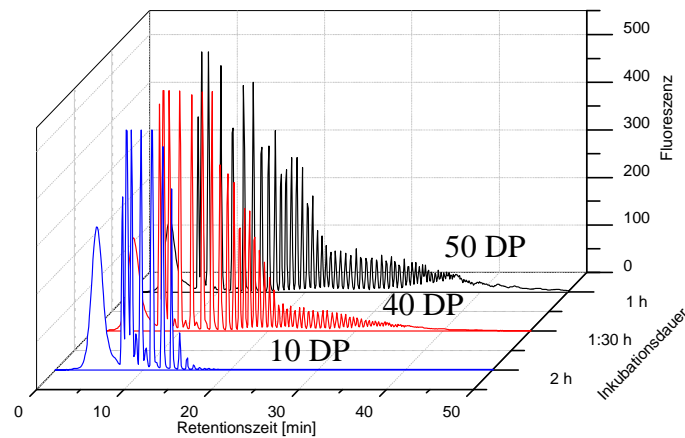
Abbildung 60: DMB-HPLC Chromatogramme von oligoSia bei 37 °C mit 2 pmol EndoNF und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Abbildung 60 zeigt, dass das Enzym EndoNF in der Lage ist, polySia zu spalten. Bereits nach 1 h wurde eine maximale Polymerlänge von 20 DP gemessen. Mit zunehmender Inkubationszeit steigt die Degradation, so dass nach 2 h eine maximale Polymerlänge von 10 DP ermittelt wurde. Nach 4 h wurde das Chromatogramm von 2 Peaks dominiert und nach 6 h zeigte das Chromatogramm hauptsächlich einen Peak. In beiden Fällen wurde das Maximum des Detektors überschritten. Daher lässt sich vermuten, dass nach 4 h überwiegend Dimere und nach 6 h Monomere vorliegen. Daher empfiehlt es sich, nach maximal 2 h die Reaktion zu stoppen. Zusätzlich befindet sich nach einer Inkubation von 2 h, 4 h und 6 h bei einer Retentionszeit von 30 min ein breiter Peak. Dieser nimmt mit der Inkubationsdauer zu. Eine Verunreinigung mit dem Verdauungsenzym ist sehr unwahrscheinlich, da die Reaktionen bei einer gleichen Enzymkonzentration durchgeführt wurden und somit der Peak nicht ansteigen dürfte. Bei dem Peak könnte es sich um einen Agglomerat an oligoSia handeln, die mit zunehmender Inkubationszeit zunimmt.

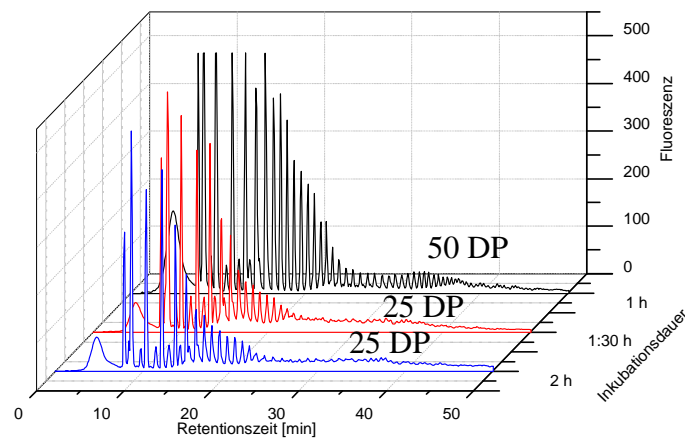
6.2.2 Enzymatischer Verdau der polySia bei 30 und 27 °C

Als nächstes wurde überprüft, wie sich eine niedrigere Temperatur auf die Degradation auswirkt. Gewünscht ist ein milderer bzw. ein kontrollierter Verdau der polySia. Hierzu wurde die enzymatische Reaktion bei 30 und 27 °C bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (1h, 1,5

und 2 h) wiederholt. In Abbildung 61 sind die Ergebnisse der enzymatischen Reaktion bei 30 und 27 °C dargestellt.



A



B

Abbildung 61: DMB-HPLC-Chromatogramme von oligoSia bei 30 °C (A) und 27 °C (B) mit 2 pmol EndoNF und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Abbildung 61 zeigt die enzymatische Reaktion bei 30 °C (A) und bei 27 °C (B). Die Inkubation bei 30 °C zeigt nach 1 h eine Polymerlänge von 50 DP. Nach 1,5 h liegt eine Länge von 40 DP vor und nach 2 h liegt die maximale Polymerlänge bei 10 DP. Trotz der niedrigen Temperatur von 30 °C wurde in allen Chromatogrammen ein hoher Anteil an Monomeren festgestellt. Durch die Temperaturniedrigung auf 27 °C erfolgte nach 1,5 h und 2 h eine mildere Degradation. Hier wurde jeweils eine Polymerlänge von 25 DP ermittelt. Nach 1 h lag die Polymerlänge, wie bei der 27 °C-Verdauung bei 50 DP.

Nachdem die Bestimmung der optimalen Parameter des enzymatischen Verdaus der polySia erfolgte, wurde die chromatographische Trennung der einzelnen Polymerlängen vorgenom-

men. Es sollte gezeigt werden, dass die oligoSia aus dem enzymatischen Verdau von polySia nach der Polymerlänge getrennt werden kann. Dies erfolgte mit einer MonoQ 5/50 GL-Säule über die FPLC (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 8.7). Für den Versuch wurde die polySia für 2 h bei 27 °C enzymatisch gespalten. Die gesammelten Fraktionen der FPLC wurden anschließend mit der DMB-HPLC untersucht. In Abbildung 62 sind die Polymerlängen der einzelnen Fraktionen dargestellt.

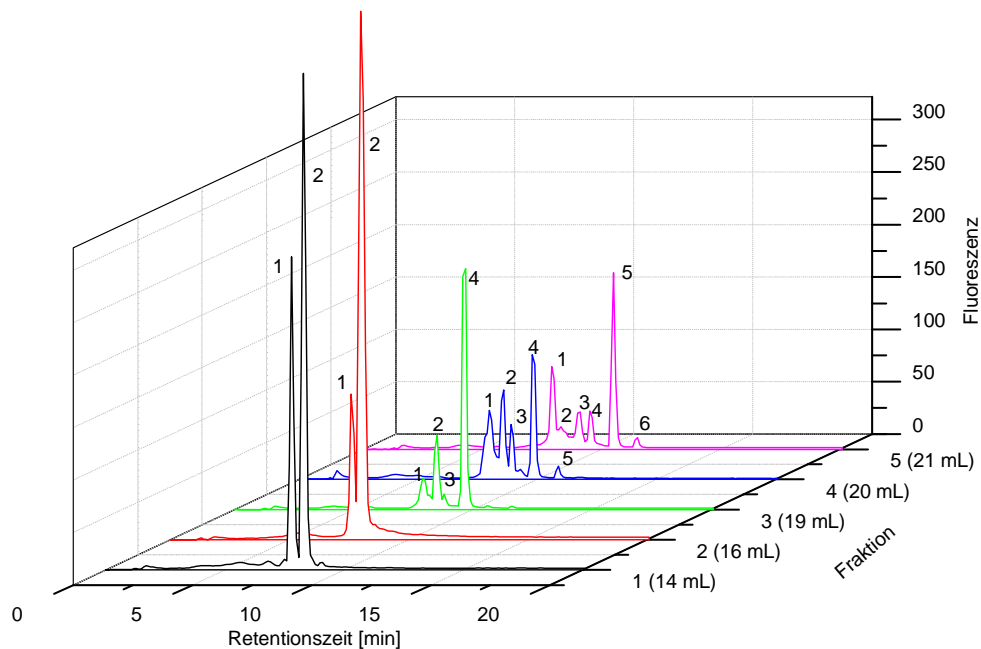


Abbildung 62: DMB-HPLC-Chromatogramme der FPLC Fraktionen nach zweistündigem enzymatischen Verdau von polySia bei 27 °C.

Die Abbildung 62 zeigt die Polymerlängen der oligoSia in den FPLC-Fraktionen. Es wurden insgesamt 5 Fraktionen (nach 14, 16, 19, 20 und 21 mL) aus der FPLC für die DMB-HPLC verwendet. Bei Fraktion 1 wurden ausschließlich Monomere und Dimere chromatographisch getrennt. Der Anteil an Monomeren nimmt bei Fraktion 2 ab, hier befinden sich hauptsächlich Dimere. Mit zunehmendem Volumen erhöhen sich die Polymerlängen der Fraktionen. Bei Fraktion 3 und 4 sind hauptsächlich oligoSia-Moleküle mit 4 DP vorhanden und bei Fraktion 5 oligoSia mit 5 DP. Die Fraktionen 4 und 5 enthalten neben ihrer Hauptkomponente noch größere und kleinere Moleküle. Dies weist auf eine schlechte Trennwirkung hin. Zur Optimierung dieser könnte die Flussgeschwindigkeit erniedrigt bzw. die Pufferzusammensetzung verbessert werden.

Mit der FPLC können definierte Polymerlängen isoliert werden, doch die Ausbeuten liegen im Mikrogramm-Maßstab. Daher ist diese Methode in dieser Form nicht für die großtechnische Aufreinigung von oligoSia geeignet.

6.2.3 Fazit

Für die Herstellung der oligoSia wurde die polySia (110 DP) aus dem Batch-Verfahren (vgl. Kapitel 5.6) enzymatisch mit EndoNF gespalten. Anschließend wurden die Polymerlängen mittels DMB-HPLC untersucht. Die Spaltung der polySia wurde bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht. Bei hohen Temperaturen und hohen Inkubationszeiten wurde die polySia vollständig gespalten. Durch die Verringerung von Temperatur und Inkubationszeit konnte eine „mildere“ Spaltung erzielt werden. Als ideal erweist sich ein polySia-Gehalt von 800 µg versetzt mit 2 pmol Enzym bei 27 °C und 1,5 bzw. 2 h Inkubationszeit. Die Menge der polySia wurde so gewählt, dass eine maximale Enzymaktivität vorliegt. Nach der enzymatischen Reaktion besteht die oligoSia aus unterschiedlichen Polymerlängen. Um definierte Polymerlängen zu erhalten, wurde die gespaltene polySia mit der FPLC unter Verwendung einer Mono Q 5/50 GL-Säule aufgetrennt. Ein Teil der Fraktionen wurde mit der DMB-HPLC analysiert. Die Auftrennung mit der FPLC war erfolgreich, jedoch enthielten die Fraktionen 4 (20 mL) und 5 (21 mL) Reste an größeren Molekülen (5 DP und 6 DP). Dies könnte an der hohen Flussgeschwindigkeit (1 mL min^{-1}) liegen, da die Säule sehr klein ist und die Moleküle direkt hinterher auftreten. Hier hätten die Fraktionsvolumina noch verkleinert werden müssen. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch den enzymatischen Verdau oligoSia mit definierte Polymerlänge hergestellt werden kann. Trotz dieser Ergebnisse eignet sich diese Methode nicht für die großtechnische Produktion von oligoSia, da das verwendete Enzym nicht in großen Mengen zur Verfügung steht. Zudem ist die Isolierung des Enzyms aufwendig und teuer. Die Ausbeuten des enzymatischen Verdau liegen hier im Mikrogramm-Bereich.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Fokus dieser Arbeit stand die gezielte Optimierung eines Herstellungsprozesses für Polysialinsäure (polySia). Das Verfahren sollte dabei die Gewinnung langkettiger und kurzkettiger polySia ermöglichen. Die Produktion in *E.coli* K1 ermöglicht dabei die Herstellung von polySia die struktidentisch mit der im menschlichen Körper nachgewiesener polySia ist. Daher eignet sie sich als mögliches Gerüstmaterial für die Regenerierung von Nervenzellen.

Zur Produktion und Untersuchung der Polysialinsäure wurde zunächst *E. coli* K1 im 10 L Bioreaktor im Batch-Modus kultiviert. Bei mehrmaliger Kultivierung im Batch-Modus schwankte die polySia-Konzentration zwischen 0,35 und 0,6 g L⁻¹. Es konnte desweiteren kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der polySia-Konzentration und der Biotrockenmasse festgestellt werden. Dies kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden, wie z.B. die unterschiedlichen Kultivierungszeiten und die variierende Zusammensetzung des Mediums. Anschließend wurden Fed-Batch-Kultivierungen durchgeführt, um die Ausbeute der polySia zu erhöhen. Die Fed-Batch-Kultivierung erfolgte dabei unter substratlimitierten Bedingungen. Die automatische Zufütterung des glucosehaltigen Mediums erfolgte durch eine computergesteuerte Feed-Pumpe basierend auf einer Monod-Kinetik. Durch die Einstellung einer konstanten Wachstumsrate in der Fed-Batch-Phase wurde das Zellwachstum geregelt. Die polySia-Konzentration konnte damit um den Faktor 3,5 gegenüber der Batch-Kultivierung erhöht werden. Die Ausbeute an polySia kann im Fed-Batch-Betrieb noch weiter gesteigert werden, indem für die Zufütterung eine FIA-Anlage verwendet wird. Mit dieser Anlage kann die Substratkonzentration kontinuierlich überwacht und somit die Regelung automatisch angepasst werden.

In einem nächsten Schritt wurden mit Hilfe statistischer Versuchsplanung (*Design of Experiments*) die Einflussgrößen für die Batch-Kultivierung ermittelt, welche einen wesentlichen und statistisch abgesicherten Effekt auf die polySia-Konzentration und polySia-Polymerlänge haben. Auch für die Fed-Batch-Kultivierung wurden die polySia-Produktion und polySia-Polymerlänge untersucht. Dies erfolgte in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate. Für die Untersuchung der polySia-Polymerlänge wurde die DMB-HPLC verwendet. Bei der statischen Versuchsplanung wurden vier Einflussgrößen (Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Begasungsrate und Glucose-Startkonzentration) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass hohe Glucose-Startkonzentrationen, hohe Rührgeschwindigkeiten und niedrige Temperaturen einen positiven Einfluss auf die polySia-Produktion ausüben. Für hohe Polymerlängen sind

hohe Temperaturen und niedrige Rührgeschwindigkeiten erforderlich. Die Polymerlänge ist unabhängig von der Glucose-Startkonzentration. Daher ist es schwierig, hohe Produktionsraten in Verbindung mit langen polySia-Ketten zu realisieren.

Für die Untersuchung der polySia-Produktion und Polymerlänge im Fed-Batch-Betrieb wurden fünf Kultivierungen mit jeweils unterschiedlichen spezifischen Wachstumsraten (0,2, 0,25, 0,3, 0,35 und 0,45 h⁻¹) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die maximale Ausbeute an Produkt pro Substrat ($Y_{P/S}$) bei $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ liegt und die Polymerlänge mit zunehmender Wachstumsrate abnimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Polymerlängen wurden anschließend auf die 24 L Bioreaktorkultivierung (Biostat UD) übertragen. Bei der Batch-Kultivierung im Biostat UD konnte die Ausbeute um den Faktor 2 erhöht werden. Die durchschnittliche Polymerlänge konnte gegenüber der 10 L Kultivierung um 3,5 DP erhöht werden. Im Fed-Batch-Betrieb konnte die Ausbeute im Biostat UD gegenüber der 10 L Kultivierung ebenfalls um den Faktor 2 erhöht werden. Die durchschnittliche Erhöhung der Polymerlänge betrug hier 3 DP. Die Erhöhung der polySia-Ausbeute bezogen auf den Reaktorvolumen ist jedoch geringer als bei der 10 L Kultivierung. Daher sind noch weitere Optimierungsansätze zur Erhöhung der Ausbeute notwendig.

Nach erfolgreich weiterentwickelter Kultivierung erfolgte der Downstream-Prozess auf Basis des von Rode *et al.* entwickelten Aufreinigungsprotokolls. Die kontinuierliche Zentrifugation wurde durch Cross-flow-Mikrofiltration (0,45 μm) ersetzt. Durch diese Modifikation konnte die Ausbeute für die Batchbrühe um 33-66 % erhöht werden. Die anschließende Übertragung auf die Fed-Batch-Kultivierung ergab lediglich eine Verbesserung der Ausbeute zwischen 5 bis 11 %. Die größten Verluste an polySia für die Fed-Batch-Kultivierung lagen bei der Cetavlonfällung bei 74 %. Zudem erwies sich das Aufreinigungsprotokoll als zu zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde versucht, die Fällungsmethode durch Adsorbentechnik zu ersetzen. Hierzu wurden im Labormaßstab Anionenaustauschermembranen und Kationenaustauscher-tonmineralien untersucht. Dabei wurde das Adsorptionsverhalten von polySia und Proteinen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen und pH-Bereichen untersucht. Bei der Q-Membran wurde mit 100 mM NaPP (pH 7) die höchste polySia-Bindungskapazität ermittelt. Mit dem Adsorptionsmaterial EX M 1753 konnten die Proteine unter statischen Bedingungen aufgrund der hohen Adsorberkapazität von 300 mg g⁻¹ effektiv und kostengünstig abgereichert werden. Bei den Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit war 50 mM NaPP (pH 7) am geeignetsten. Durch die Kombination von Q-Membran und EX M 1753 entstand eine

Aufreinigungsmethode, mit der sowohl Batch- als auch Fed-Batchbrühen erfolgreich aufgereinigt werden konnten. Die Proteine wurden dabei vollständig entfernt.

Die neu entwickelten Aufreinigungsprotokolle wurden anschließend in den Technikumsmaßstab übertragen. Hierfür wurden 10 L Batch- sowie Fed-Batchbrühen verwendet. Bei der Aufreinigung aus der Batchbrühe wurde eine polySia-Ausbeute von 61 % und für die Fed-Batchbrühe eine Ausbeute von 40 % erreicht. Die größten Verluste traten während der Membranadsorption und der Filtration auf. Der Verlust an der Membran kann durch eine Erhöhung der Adsorptionszyklen an der Membranadsorberanlage erniedrigt werden. Zudem können die Verluste der Ultrafiltrationen durch die Isolierung der oligoSia ausgeglichen werden. Im Technikumsmaßstab zeigte sich beim Vergleich der Fällungsmethode mit der Adsorbertechnik, dass die Ausbeuten einer Batchbrühe von 50-55 auf 61 % leicht erhöht werden konnten. Bei der Fed-Batchbrühe sind die Unterschiede der Ausbeuten zwischen Fällung und Adsorbieren gravierender. Sie konnten von 5-11 % deutlich auf 40 % erhöht werden. Zudem lassen sich längere polySia-Ketten besser durch die Adsorbertechnik isolieren. Der Endotoxin-Gehalt nach der polySia-Isolierung lag für die Batch- und Fed-Batch-Kultivierung jeweils bei 14 EU mg^{-1} und der DNA-Gehalt zwischen $11,5\text{-}14 \text{ ng mg}^{-1}$. Die Reinheit der polySia liegt bei 97-99 %. Die Aufreinigung mit der Adsorbertechnik konnte erfolgreich etabliert werden und eignet sich hervorragend auch für größere Maßstäbe.

Tabelle 30: Gegenüberstellung der Aufreinigung von polySia aus der Fällungsmethode [43] und Adsorbertechnik für Batch- und Fed-Batch-Kultivierung.

	Fällungsmethode [43]		Adsorbertechnik	
	Batch	Fed-Batch	Batch	Fed-Batch
Ausbeute	13-37 %	-	61 %	40 %
DNA	-	-	$11,5\text{-}14 \text{ ng mg}^{-1}$	
Endotoxin	-	-	14 EU mg^{-1}	
Reinheit	95-99 %	-	97-99 %	
Aufreinigungsdauer	10 Tage	-	8 Tage	
Materialkosten (ohne Arbeitszeit)	36 € g^{-1}	-	$42,4 \text{ € g}^{-1}$	$59,9 \text{ € g}^{-1}$

Im Vergleich zur bisher verwendeten Fällungsmethode konnte die Ausbeute und die Reinheit deutlich gesteigert werden (Tabelle 30). Zusätzlich wurde die Aufreinigungsdauer um 2 Tage verkürzt. Die Materialkosten sind bei der Fällungsmethode zwar niedriger, doch ist zu beach-

ten, dass hierbei (wie auch bei der Adsorbertechnik) die Arbeitszeit nicht berücksichtigt wurde.

Neben den Arbeiten mit polySia wurde auch versucht, oligoSia zu isolieren. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden untersucht: Zum einen die Aufreinigung aus der Ultrafiltration (Permeats aus der polySia Aufkonzentration), zum anderen durch die enzymatische Spaltung der langkettigen polySia-Moleküle mittels der Endosialidase. Für die Ultrafiltration wurden zwei Porengrößen (2 und 5 kDa) für die Aufkonzentration verwendet. Bei der Fällungsmethode lag die Ausbeute für den 2 kDa-Filter bei 3 mg und für den 5 kDa-Filter bei 10,8 mg. Die Polymerlängen lagen bei 35-40 DP. Mit der neu entwickelten Adsorbertechnik konnte die Ausbeute mit dem 2 kDa-Filter auf 21 mg und mit dem 5 kDa-Filter auf 28,5 mg erhöht werden. Die Polymerlängen lagen in diesem Fall zwischen 40-53 DP. Die größten Verluste lagen hier bei der Dialyse (1 kDa). Aus diesem Grund empfiehlt es sich, für die weiteren Arbeiten mit geringeren Ausschlussgrenzen zu arbeiten. Mit der enzymatischen Spaltung von langkettiger polySia zu oligoSia konnte bei 27 °C und 2 h Inkubation eine maximale Polymerlänge von 25 DP erreicht werden. Auch die anschließende Trennung in definierten Polymerlängen (1- 6 DP) über die FPLC war erfolgreich. Doch die Ausbeuten lagen lediglich im Mikrogramm-Bereich. Daher eignet sich die Trennung der definierten Polymerlängen nicht für die großtechnische Produktion.

Als mögliche Optimierungsansätze und Erweiterungen des erarbeiteten Produktionsprozess können folgende Punkte in zukünftigen Arbeiten in Erwägung gezogen werden:

- Bei der Produktion selbst könnte die Fed-Batch-Strategie auf Basis der FIA-Anlage weiterentwickelt werden. Dies erlaubt eine kontrollierte Zufuhr der Feed-Lösung.
- Bei dem Aufreinigungsprozess könnte eine größere Anionenaustauscher-Membran verwendet werden, so dass die Anzahl der Adsorptionszyklen erniedrigt werden bzw. die Verluste an der Membran minimiert werden können. Durch die Verwendung des Tonminerals als Säulenmaterial könnte die Aufreinigung automatisiert werden. Hierzu müsste zunächst ein Aufquellen des EX M 1753 verringert werden.
- Um die Ausbeute der oligoSia zu erhöhen, empfiehlt es sich, eine Aufkonzentration des Permeats aus der polySia-Aufkonzentration durch niedrige Porengrößen (0,2 kDa oder 1 kDa) durchzuführen. Zudem kann die Trennung der

definierten Polymerlängen durch die FPLC aus der Ultrafiltrations-Aufreinigung erfolgen. Diese würde den enzymatischen Verdau ersetzen.

Auch wenn weitere Optimierungsschritte notwendig sind, um polySia im technischen Maßstab effektiv und kosteneffizient aufzureinigen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aufreinigung der polySia mit der Adsorbertechnik sehr erfolgreich war. Dabei konnte im Vergleich zur bisher verwendeten präzipitations-basierten Aufreinigung (Fällungsmethode) von polySia die Ausbeuten wesentlich erhöht werden.

Anhang

8. Material und Methoden

8.1 Mikrobiologische Techniken

8.1.1 Stammhaltung

Für die Langzeitlagerung der Stämme werden Gefrierkulturen angelegt. Dafür werden 100 mL LB-Medium (Tabelle 31) in einem 500 mL- Schüttelkolben mit 2 Schikanen mit 100 μ L Zellkultur angeimpft und 6 h bei 37 °C und 130 min^{-1} im Brutschrank bis zu einer OD_{600} von 3 inkubiert. Anschließend werden jeweils 20 mL dieser Kultur mit 20 mL Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Alle Kultivierungsarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

8.1.2 Kultivierung von *E. coli* K1 im Schüttelkolben

Die Herstellung der Vorkulturen für die Bioreaktorkultivierungen wird im Schüttelkolben durchgeführt. Hierzu wird ein steriler Schüttelkolben mit 100 mL LB -Medium (Tabelle 32) beschickt. Die Kultur wird bei 37 °C im Schüttelschrank bei 130 min^{-1} für 8-9 h inkubiert (OD_{600} 6).

8.2 Medien

8.2.1 LB-Medium

Tabelle 31: Zusammensetzung des LB-Mediums im Schüttelkolben

Substanz	Konzentration
Bacto Pepton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
NaCl	5 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf 7,3 eingestellt.

8.2.2 Synthetische Medien

Für die Kultivierung im Bioreaktor wird ein definiertes Medium, das sich aus vier Komponenten zusammensetzt, verwendet: Aus Basismedium, welches Salze und Spurenelemente enthält, und drei Zusätzen in Form von Puffer, Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle.

Tabelle 32 : Zusammensetzung des Reaktormediums.

Mediumzusammensetzung		Batch	Feed Lösung
Basismedium:	K ₂ SO ₄	1,1 g L ⁻¹	
	NaCl	1,2 g L ⁻¹	
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,013 g L ⁻¹	0,026 g L ⁻¹
	Spurensalzlösung	1 mL L ⁻¹	2 g L ⁻¹
N-Quelle	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g L ⁻¹	
C-Quelle	Glucose	20 ⁵ / 10 ⁶ g L ⁻¹	200 g L ⁻¹
Puffer	K ₂ HPO ₄	13,33 g L ⁻¹	
	KH ₂ PO ₄	0,5 g L ⁻¹	

Die Glucose- und Pufferlösung wird separat autoklaviert. Die restlichen Mediumbestandteile werden im Bioreaktor vorgelegt und zusätzlich 0,2 mL L⁻¹ Desmophen 3900 (Bayer) zugegeben. Die vorgelegten Mediumbestandteile werden im Bioreaktor autoklaviert.

Tabelle 33: Spurensalz-Lösung.

Substanz	Konzentration
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	150 g L ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g L ⁻¹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 g L ⁻¹

8.3 Kultivierungssystem

8.3.1 Biostat C

Der Edelstahlreaktor des Biostat-C-Systems (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) hat ein Fassungsvermögen von 10 L. Über die Steuereinheit sind der fest installierte Kessel sowie die Ablasshähne dampfsterilisierbar. In Reaktordeckel und der Außenwand befinden sich insgesamt sieben 25-mm-Ports und drei 19-mm-Ports für die Montage von Messelektroden,

⁵ Nur für die Batch-Kultivierung

⁶ Startkonzentration der Fed-Batch-Kultivierung

optischen Analysegeräten und Anstechgarnituren. Integriert in den Deckel ist ein Scheibenrührer mit vier sechsblättrigen Scheibenrührern.

8.3.2 Biostat UD

Der Biostat UD ist ein System bestehend aus 30-L-Edelstahlreaktor (Arbeitsvolumen) mit Steuereinheit (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen). 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 sind drei Standard-19-mm-Ports für den Anschluss von Zu- bzw. Ableitungen (z.B. pH- und Feed-Lösung) eingelassen. 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 Probenentnahme kann mittels eines sterilisierbaren Ventils am Reaktorboden vorgenommen werden. Der fest installierte Reaktor ist vollständig *in place* sterilisierbar.

8.4 Online-Analytik

Mit den Steuereinheiten der Versuchsanlagen werden, je nach Anlage, vor und während der Kultivierung verschiedene Parameter geregelt und damit die Prozesse gesteuert. Der pH-Wert der Kulturbrühe wird kontinuierlich jeweils mit Hilfe einer Einstabmesskette (EASYFERM PlusTM, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) überwacht. Geregelt wird dies durch die automatische Zugabe einer 25 %igen NH₄OH-Lösung und einer 1 M HCl-Lösung.

Die Temperaturregelung der Reaktoren erfolgt über einen Thermomantel, der an einen in den Steuereinheiten befindlichen Thermostaten angeschlossen wird. Die Temperatur wird kontinuierlich mit einem Thermoelement (PT100) überwacht. Der prozentuale Gelöstsauerstoff hängt von der Begasung und der Durchmischung der Kulturbrühe ab. Beide Parameter können von den Steuereinheiten geregelt werden. Detektiert wird der pO₂-Wert durch eine optische Sauerstoffelektrode (VISIFERMTM, Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Zu Kultivierungszwecken verwendete Gase werden durch Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm geleitet.

Gemessen wird der prozentuale Anteil an Sauerstoff und Kohlendioxid im Reaktorabgas mit der Abgasanalytik des Typs Uras 14 und Magnos 106 (AO 2020) (ABB Ltd, Schweiz).

Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgt mittels einer institutseigenen Software (RISP -

Realtime Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover). Aufgenommen werden unter anderem

- die Reaktortemperatur
- der pH-Wert
- der pO₂-Wert
- die Rührerdrehzahl
- der CO₂- und O₂-Gehalt im Abgas

8.5 Offline-Analytik

8.5.1 Optische Dichte

Die Optische Dichte (OD₆₀₀) der Kulturproben wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Proben werden mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt bis diese unterhalb eines Extinktionswerts von 0,8 liegen. Gemessen wird in 1,5 mL Einwegküvetten (Halbmikroküvetten, Nr. 67.742, Fa. Sarstedt) mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung.

8.5.2 Glucose-Messungen

Zur Messung der Glucosekonzentration wird mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select der Firma Yellow Springs Instruments, Ohio, USA gearbeitet. Zu messende Proben werden vor der Messung mit ddH₂O auf eine ungefähre Endkonzentration von 4 g L⁻¹ Glucose verdünnt und, sofern Zellmasse enthalten ist, 4 min bei 13.000 min⁻¹ in einer Zentrifuge (Eppendorf 5415 c) zentrifugiert. Anschließend wird der zellfreie Überstand gemessen.

Die Endkonzentration der Proben sollte bei etwa 4 g L⁻¹ liegen, da sich das Gerät auf diesen Wert kalibriert und daher in die genauesten Messergebnisse in dem Bereich um diesen Wert erreicht werden.

8.5.3 TBA-Test zur Polysialinsäure-Bestimmung

Zur Ermittlung der PSA-Konzentration in den einzelnen Proben wurde der TBA-Test eingesetzt und als Referenzproben eine Standardreihe an Sialinsäure von 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 und 0,75 g L⁻¹ angesetzt.

Im ersten Schritt werden 50 µL der zu untersuchenden Proben und der Referenzproben mit 100 µL Hydrolyselösung (0,1 mM H₃PO₄, pH 2-3) und mit 100 µL ddH₂O versetzt. Die vor-

handene polySia wird mittels der Phosphorsäure bei 70 °C für 18 h hydrolysiert und mit jeweils 100 µL 0,1 M NaOH neutralisiert. Es folgt die Zugabe von je 100 µL Oxidationslösung (0,27 g Periodsäure, 0,31 mL Phosphorsäure (1 M), 5,69 mL ddH₂O) und die Inkubation bei 37 °C für 30 min, wodurch die Sialinsäure mit der Periodsäure im sauren Milieu oxidiert wird. Anschließend werden die Proben mit 500 µL Reduktionslösung (1,5 g Natriumarsenit, 2,13 g Natriumsulfat, 0,6 mL Schwefelsäure, 29,4 mL ddH₂O) bis zum Verschwinden der braunen Farbe geschüttelt. Durch die nachfolgende Zugabe von 500 µL 3 %iger TBA-Lösung (2-Thiobarbitursäure) (0,9 g TBA, 0,9 mL Natriumhydroxid, 29,1 mL ddH₂O) und die Inkubation bei 95 °C für 13 min bildet das Oxidationsprodukt mit 2-Thiobarbitursäure einen rosa Chromophor. Nachdem die Proben für 5 min im Wasserbad abgekühlt wurden, werden 400 µL abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 700 µL Cyclohexanon gemischt.

Die Proben werden für 1 min bei 13.000 xg zentrifugiert und zur Absorptionsmessung in eine UV-Mikrotiterplatte gegeben und in einem Photometer (Multiskan, Thermo scientific, USA/Canada) bei 549 nm gemessen.

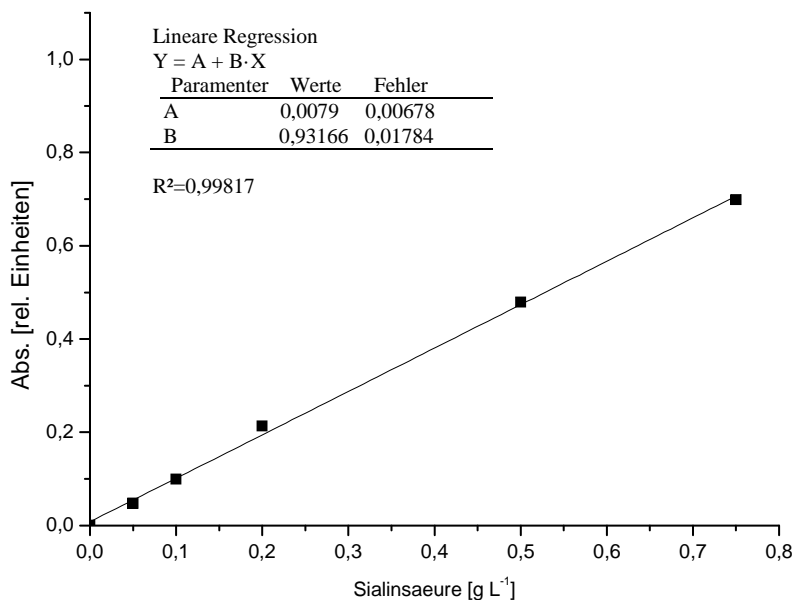


Abbildung 63: Typische Absorptionswerte für polySia-Konzentration zwischen 0 bis 0,75 g L⁻¹ bei einer Wellenlänge von 549 nm mit linearer Regression.

Abbildung 63 zeigt die erhaltenen Absorptionswerte einer Sialinsäure-Standardreihe mit Konzentrationen von 0 bis 0,75 g L⁻¹ in ddH₂O. Die Berechnung der polySia-Konzentration erfolgt aus der gemessenen Absorption und über die ermittelten Regressionsparameter.

8.5.4 Proteinnachweis nach Bradford

Die Nachweismethode nach Bradford beruht auf der Eigenschaft des im Reagenz enthaltenen Farbstoffs Coomassie-Brillantblau (Triphenylmethanfarbstoff), sich an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine anzulagern. Dabei sind die Wechselwirkungen von Coomassie-Brillantblau mit Arginin entscheidend. In Gegenwart von Proteinen und saurem Milieu verschiebt sich demnach das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillantblau von 465 zu 595 nm. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums ist auf die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform durch die Komplexierung zwischen Farbstoff und Protein zurückzuführen [82].

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der verschiedenen Proben wird eine BSA-Standardreihe im Bereich von 0 bis 2.000 mg L⁻¹ und Wasser nach dem in Tabelle 34 dargestellten Schema angesetzt.

Tabelle 34: Schema zur Herstellung der BSA-Standardlösung für den Bradford-Assay.

	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6	Nr.7	Nr.8	Nr.9
Wasser [μL]	0	63	163	88	163	163	163	200	400
BSA-Lösung [μL]	150	188	163	88 Nr.2	163 Nr.3	163 Nr.5	3 Nr.6	50 Nr.7	0
Konz. [mg L ⁻¹]	2000	1500	1000	750	500	250	125	25	0

Jeweils 10 μL der Standards und der zu untersuchenden Proben werden mit 300 μL Coomassie Plus Reagenz in eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wird für 30 s geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Messung am Photometer bei 595 nm. Jede der Proben wird in Dreifachbestimmung gemessen.

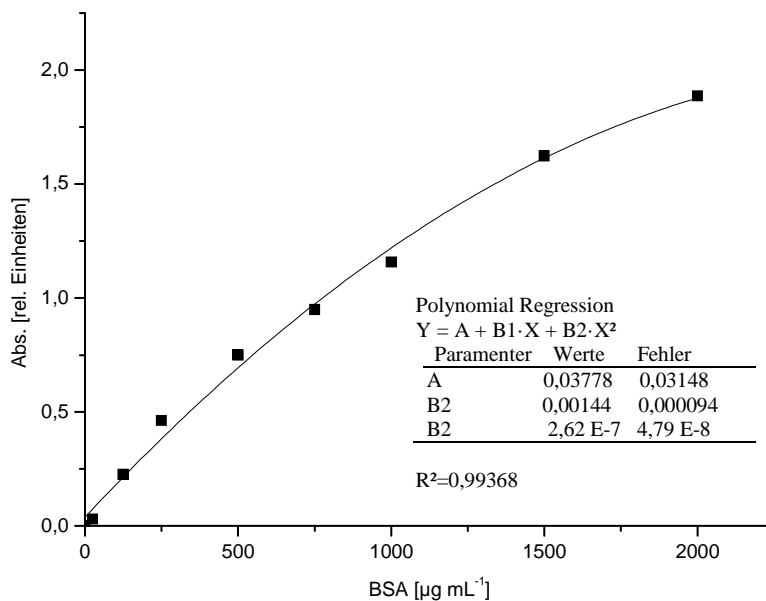


Abbildung 64: Typische Absorptionswerte für BSA-Konzentrationen zwischen 0- 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Wasser bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einer polynomischen Regression.

Abbildung 64 zeigt typische Absorptionen einer BSA-Standardreihe der Konzentration 0 bis 2000 mg L^{-1} . Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgt aus den normierten Absorptionen mit den ermittelten Parametern einer polynomischen Regression [83].

8.5.5 DMB-HPLC

Mit der DMB-HLPC können die maximalen Polymerlängen von polySia bestimmt werden.

Durchführung

- 80 μL DMB-Reagenz (Tabelle 36) + 80 μL TFA (20 mM)
- Zugabe der Probe (Volumen von 10 μL , 10 g L^{-1} und 70 $\mu\text{L H}_2\text{O}$)
- Inkubation für 24 h bei 10 °C im Thermoschüttler
- Stoppen der Reaktion mit 20 μL 1 M NaOH

Nach erfolgreicher Reaktion erfolgt die Trennung über eine DNAPac PA-100 Säule (Dioex, Idstein) mit einer HPLC Anlage. Als Laufmittel wurde ddH₂O und 4 M Ammoniumacetat-Lsg. bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL min^{-1} benutzt. Der Fluoreszenzdetektor (RF-10A_{XL}, Shimadzu) wurde auf eine Wellenlängenkombination Ex/Em von 372/456 nm eingestellt. Das verwendete Gradientenprofil ist in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: Gradientenprofil für die DMB-HPLC Analyse von polySia auf einer DNAPac PA-100 Säule.

Zeit	ddH₂O	4 M NH₄AC-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 %

Tabelle 36: Zusammensetzung des DMB-Reagenz.

DMB-Reagenz	
DMB	7 mM g
Natriumsulfit	12,5 mM
β-Mercaptoethanol	0,8 mM

8.5.6 Endotoxinnachweis mittels Endosafe[®]-PTS[™]

Die Endotoxin-Kontrolle erfolgte mittels des chromogenen Endosafe[®]-PTS[™]-Verfahrens (Charles river, Wilmington, USA). Beim Vorkommen von Endotoxinen werden Faktoren im *Limulus*-Amöbocyten-Lysat (LAL) aktiviert, und zwar in einer proteolytischen Kaskade, die zur Spaltung eines Substrats aus farblosem, künstlichem Peptid führt, welches im Pyrochrome[®]-LAL vorliegt. Die proteolytische Spaltung des Substrats setzt Paranitroanilin (pNA) frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Jeweils 25 µL der Probe werden in die vier Kanäle einer Einwegkartusche gegeben. Die quantitative Endotoxin-Bestimmung erfolgt mit einer kinetischen Methode. Hierbei wird die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion bei 405 nm bestimmt (Anlaufzeit). Eine höhere Endotoxinkonzentration entspricht einer kürzeren Anlaufzeit. Die Optische Dichte wird bei einer kontrollierten Temperatur (37 °C) in regelmäßigen Abständen gemessen. Als Referenz wird ein Endotoxin-Standard im Bereich von 0,1-10 EU mL⁻¹ eingesetzt.

Zur Endotoxin-Bestimmung der polySia-Probe wird je 1 g in 1 mL *Limulus*-Amöbocyten-Lysat -Reagenzwasser gelöst und wie oben beschrieben, vermessen.

8.5.7 DNA-Bestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen wird auf eine 96-Loch-Platte jeweils 10 μL polySia Probe (1 g L^{-1}) sowie eine Standardreihe mit DNA-Konzentrationen von $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ aufgetragen und mit einer Mischung aus 100 μL Hoechst-33342-Stammlösung mit 20 mL TNE-Puffer versetzt. Daraufhin werden die Proben 30 min unter Lichtausschluss bei 120 min^{-1} inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Proben werden bei 460 nm im Fluoreszenzphotometer (Thermo Scientific, USA/ Kanada) detektiert. Mit Hilfe der Kalibrationsgerade aus der Standardreihe lässt sich die DNA-Konzentration aus der Fluoreszenzintensität der Proben bestimmen.

8.5.8 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wird 1 mL Zellsuspension für 10 min bei 13.200 min^{-1} und bei einer Temperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert und der zellfreie Überstand abdekantiert. Das Pellet wird 2 Tage bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und gewogen. Die Differenz beider Messungen (Leergewicht und Gewicht mit Pellet) ergibt das Trockengewicht. Zur Darstellung einer Wachstumskurve wird die Trockenmasse gegen die Zeit aufgetragen.

8.5.9 Acetat

Die Acetat Messung erfolgt mit der HPLC. Hierfür wurden die Kultivierungsproben zentrifugiert (5 min bei 13.000 min^{-1}) und auf eine Ausschlussäule PRP-X300 Säule (Hamilton, Schweiz) gegeben. Als Laufmittel dient $10 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, die Flussrate beträgt 1 mL min^{-1} . Die Trennung erfolgt isokratisch und die Detektion bei 220 nm .

8.6 Arbeitsvorschriften für die Aufreinigung von polySia

In diesem Abschnitt sind die Standardschritte zur Aufreinigung von polySia zusammengefasst.

8.6.1 Separation der Zellen

Die Separation der Zellen erfolgt mit zwei verschiedenen Methoden, zum einen mittels kontinuierlicher Zentrifugation (Heraeus Contifuge Stratos, Thermo Scientific, USA/Kanada), zum anderen mittels Cross-flow-Filtration (Sartorius Sartocoon Filtrationsanlage, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen).

Bei der kontinuierlichen Zentrifugation wird die Zellsuspension direkt aus dem Reaktor in die Zentrifuge gepumpt. Die Pumprate liegt zwischen 80 bis 100 mL h⁻¹. Zunächst wird die Zentrifuge auf 6.000 min⁻¹ eingestellt bis der Zentrifugenzyylinder gefüllt ist. Danach wird die Zentrifuge auf eine maximale Geschwindigkeit von 17.000 min⁻¹ (25.000·xg) eingestellt. Die Zentrifugationstemperatur beträgt 4 °C.

Bei der Cross-flow-Filtration wird die Zellsuspension geerntet, in 15 L Glasflaschen gefüllt und anschließend an die Filtrationsanlage angeschlossen.

Durchführung:

- Kassette mit entsprechender Porengröße (0,45 µm) einbauen
- Wasserwert bestimmen
- Für die Filtration die Pumpe auf die notwendige Leistung einstellen (max. 4 bar Eingangsdruck)
- Nach der Filtration die Kassetten durch Spülen reinigen (Wasser, 0,1 M NaOH) und Wasserwert bestimmen.
- Kassetten in 0,1 M NaOH-Lösung lagern.

8.6.2 Aufkonzentration des zellfreien Kulturüberstands

Die Aufkonzentration erfolgt analog zu der Zellseparation mit der Cross-flow-Filtration (10 kDa). Die Durchführung ist in Abschnitt 5.4.1 dargestellt.

8.6.3 Präzipitationsschritte (Fällungsmethode) und Adsorbertechnik

Zunächst erfolgt die Aufreinigung von polySia aus dem Konzentrat der Ultrafiltration. Hierfür werden Fällungsmethode und Adsorbertechnik verwendet.

8.6.3.1 Fällungsreaktionen

Aceton-Fällung

- Versetzen des Konzentrats der Ultrafiltration mit 45 % (v v⁻¹) Aceton
- Lösung für 24 h bei 8 °C rühren

- Zentrifugation der Lösung bei 4000 min^{-1} für 15 min bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Verwerfen des Pellets
- Entfernen des Acetons mittels Rotationsverdampfer

Cetavlon-Fällung

- Versetzen der Probenlösung mit Cetavlon-Stocklösung (100 g L^{-1}) bis zu einer Cetavlon-Konzentration von 10 g L^{-1}
- Lösung für 24 h bei $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ rühren
- Zentrifugation der Lösung bei 4000 min^{-1} für 15 min bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Verwerfen der Überstandes
- Resuspendierung des Pellets in 1M NaCl

Ethanol-Fällung

- Versetzen der Probenlösung mit $80 \text{ } \%$ (v v^{-1}) Ethanol
- Lösung für 24 h bei 8°C rühren
- Zentrifugation der Lösung bei 4000 min^{-1} für 15 min bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Resuspendierung des Pellets in H_2O

8.6.3.2 Adsorbertechnik

Membranadsorber

Zur Membranadsorption kommen Vivawell 8-strips (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen), bestehend aus 15 Membranlagen und einer Membranoberfläche von $3,74 \text{ cm}^2$ zum Einsatz. Es werden jeweils $300 \text{ }\mu\text{L}$ Probe/Puffer in jedes Well pipettiert und jeweils 5 min bei $1.000 \cdot \text{xg}$ zentrifugiert.

Anschließend wird die pH-Abhängigkeit der Bindung von polySia an die Q-100-Membran-Einheiten untersucht. Hierfür werden verschiedene Puffer mit jeweils 50 mM , 100 mM und 200 mM im pH-Bereich 7 bis 10 untersucht (Tabelle 37). Die polySia-Adsorption und Elution wird in einer FIA-Anlage durchgeführt. Es wird das UV-Signal der Proteine bei 280 nm beobachtet.

Durchführung:

- Versetzen der Probenlösung mit Puffer (1:1), Gesamtvolumen 20 mL
- Äquilibrierung der Membran mit Puffer (10 mL)
- Beladen der Membran mit Probe
- Waschen der Membran mit Puffer (10 mL)
- Elution mit 1M NaCl (10 mL)

Q-Membran im Technikumsmaßstab

Die Membranaufreinigung im Technikumsmaßstab erfolgt mit der Membranadsorptionsanlage (Abbildung 46). Es wird eine Sartobind® SingleSep 5 (Q-Membran, Membranfläche 2500 cm², Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) verwendet.

Für die Durchführung wurden 10 L zellfreie polySia-Lösung (ohne Aufkonzentration) mit 10 L 100 mM NaPP (pH 7) versetzt.

Durchführung:

- Equilibrierung der Membran mit 100 mM NaPP (Flussrate: 2 L min⁻¹ bis zu einem rel. UV-Wertunterhalb von 0,2 rel. E.)
- Beladen der Membran mit Probe (Flussrate: 6 L min⁻¹, 10 min)
- Waschen der Membran mit 100 mM NaPP (Flussrate; 2 L min⁻¹, 3 min)
- Elution mit 1 M NaCl (Flussrate: 2 L min⁻¹, bis zur einer Leitfähigkeit von 12)

Anmerkung:

Diese Durchführungen werden für die Batchbrühe viermal und die Fed-Batchbrühe siebenmal wiederholt. Zwischen den Schritten wird die Membran mit 100 mM NaPP gewaschen.

Die Anlage wird nach beendeter Prozessierung mit 0,1 M NaOH gereinigt. Die Membran wird nach der Reinigung in 1 M NaCl-Lösung mit 20 % Ethanol gelagert.

Aufreinigung mit Tonmineralien

Zur Untersuchung der Proteinadsorption an Tonminerale wurden zunächst unterschiedliche Kationenaustauscher-Tonmineralien getestet.

Durchführung:

- 40 mg Tonmineral (EX M 1753) in 1 mL 100 mM NaPP (pH 7) mittels Überkopfschüttler bei RT und 10 min^{-1} für 1 h inkubieren
- Puffer abzentrifugieren und 1 mL Probenlösung hinzugeben
- 3 h bei RT inkubieren
- Entfernen des EX M 1753 durch Zentrifugation (4.000 min^{-1} , 15 min)

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit Proteinbindung kommen pH- Werte von 7 bis 10 (Tabelle 37) sowie Pufferkonzentrationen von 60, 100 und 200 mM zum Einsatz.

EX M 1753 im Technikumsmaßstab

Für den Technikumsmaßstab werden 8 g EX M 1753 mit 40 mL 100 mM NaPP (pH 7) in einen Schüttelkolben gegeben und für 1 h bei 130 min^{-1} inkubiert (Raumtemperatur). Anschließend werden 200 mL Probenlösung zugegeben und für 3 h bei 130 min^{-1} inkubiert. Die Entfernung des EX M 1753 erfolgt über die Zentrifugation bei 10.000 min^{-1} für 15 min (Heraeus Stratos, Thermo Scientific, USA/Kanada).

EX M 1753 Adsorptionsisotherme von BSA

Die Versuche werden für BSA und EX M 1753 bei pH 7 und in 100 mM NaPP durchgeführt für welche die Maxima der Adsorption bei der pH-Wert-abhängigen Adsorption ermittelt wurden. Dazu wird eine BSA Standardreihe im Bereich von $0-4 \text{ mg mL}^{-1}$ hergestellt.

Zunächst werden 40 mg EX M 1753 in 1 mL des entsprechenden Puffers (100 mM) in einem Überkopfmischer bei 10 min^{-1} equilibriert. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4.000 xg wird der Überstand verworfen. 1 mL BSA-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen wird zu dem equilibrierten EX M 1753 gegeben. Das Adsorbens wird in der Proteinlösung vorsichtig resuspendiert und im Überkopfmischer für 0,5 h bei 5 min^{-1} inkubiert. Nach Zentrifugation wird anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand die nicht gebundene Proteinmenge bestimmt.

Puffer

Die Puffer mit den jeweiligen pH-Werten wurden mit den in Tabelle 37 aufgeführten Chemikalien angesetzt.

Tabelle 37: Verwendete Puffer.

pH Wert	Puffer
4	Acetat
5	Acetat
6	MES
7	NaPP und HEPES
8	Tris
9	Tris
10	CAPS

Die Puffer wurden jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen (50 mM, 100 mM und 200 mM) hergestellt.

Anmerkung:

Alle Puffer und polySia-Lösungen werden vor der Auftragung auf die Membranen filtriert (0,2 µm) und entgast.

8.6.4 Dialyse

Die Dialyse dient im Downstreaming-Verfahren als letzter Schritt zur Entfernung von Salzen in der Probenlösung. Die Dialyse wurde in Celluloseacetat-Schlauchmembran „Visking“ (Carl Roth, Karlsruhe) durchgeführt.

Durchführung:

- Dialyseschläuche in 2 % Natriumhydrogencarbonatlösung (+ 1 mM Na-EDTA) kochen und 2 x mit Wasser spülen
- Befüllen der Schläuche mit Probenlösung
- 24 h in Dialyselösung (Tabelle 38) bei 8 °C rühren
- Verwerfen der Lösung und Ersetzen durch 5 L Wasser und 20 µL NaOH (10 %)
- Wiederholung des vorangehenden Schrittes nach 24 Stunden
- Beenden der Dialyse nach weiteren 24 Stunden

Verwendete Lösungen:

Lösung zur Vorbereitung der Schläuche:

- 600 mL ddH₂O

- 12 g Natriumhydrogencarbonat
- 228 mg Na-EDTA

Tabelle 38: Dialyse-Lösung.

Dialyse-Lösung	
1 x NaCl	5,5 g
2-3 x ddH ₂ O	5 L

Zu der Dialyse-Lösung wurden zusätzlich 20 μ L NaOH (10%) zugegeben.

8.6.5 Lyophilisation

Um ein stabiles Produkt zu erhalten wurde die Probenlösung bei -80 °C eingefroren (1 h) und in der Lyophilisationsanlage für mehrere Tage vakuumgetrocknet.

8.7 Enzymatischer Verdau

800 μ g polySia werden mit 2 pMol EndoNF (Enzym) bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe desselben Volumens kaltem (-80 °C) Ethanol gestoppt und die Proben eingefroren.

Trennung der polySia über die FPLC

Die Trennung der definierten Polymerlänge erfolgte mittels FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*). Hierzu wird verdaute polySia zentrifugiert (5 min bei 19.000·xg) und filtriert (0,2 μ m). Die Probe wird dann auf eine Mono Q HR 5/50 Säule (Amersham, Biosciences) gegeben. Als Laufmittel wird 10 mM Tris-HCl (pH 8) bei 1 mL min⁻¹ verwendet. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten (Tabelle 39).

Tabelle 39: Linearer Gradient für die Trennung der definierten Polymerlänge über die FPLC.

mL	10 mM Tris-HCl, 1M NaCl
2	0 %
2	0-8 %
7	8-20 %
8	20-28 %
1	28-100 %
5	100 %

8.8 Feed-Programm

Für die Kontrolle der Fed-Batch-Kultivierung wurde zur Berücksichtigung der Substratlimitierung ein Modell für ideale Rührkesselreaktoren auf Basis der Monod- Kinetik entwickelt.

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{K_M + S} X(t) - \frac{\dot{V}_F(t)}{V_R(t)} X(t) \quad (5.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{\mu_{max} S}{K_M + S} \frac{X(t)}{Y_{X/S}} - \frac{\dot{V}_F(t)}{V_R(t)} (S_0 - S) \quad (5.2)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_M + S} \quad (5.3)$$

$$\frac{dV_R(t)}{dt} = \dot{V}_F(t) \quad (5.4)$$

Bei Glucoselimitierung der Fed-Batch-Kultivierungen wird davon ausgegangen, dass die Substratkonzentration $\frac{dS}{dt} = 0$ im Bioreaktor 0 entspricht. Daher kann Gleichung 5.2 zu Gleichung 5.5 abgeleitet werden.

$$\dot{V}_F(t) = \mu_{max} \frac{S}{K_M + S} \frac{X(t)}{Y_{X/S}} - \frac{1}{(S_0 - S)} V_R(t) \quad (5.5)$$

$X(t)$ Biomasse bei t (g L^{-1}); S Substratkonzentration (Glucose) (g L^{-1}); μ_{max} max. Wachstumsrate (h^{-1}); K_M Monod Konstante (g L^{-1}); $\dot{V}_F(t)$ Fütterungsrate bei t (L h^{-1}); $V_R(t)$ Reaktorvolumen bei t (L); S_0 Startkonzentration der Feed-Lösung (g L^{-1}) und $Y_{X/S}$ Ausbeutekoeffizient (g g^{-1}).

Mit Hilfe dieser Gleichungssysteme kann das Wachstum der Zellen in einem Fed-Batch-Prozess beschrieben werden. Die Differentialgleichungen können mit einem Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung numerisch integriert werden. Dies erfolgt hier *Online* mit dem MS-DOS Programm Neu-ork (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover). Hierfür sind die Startbedingungen der Kultivierung erforderlich.

8.9 Berechnungen der Respirationsdaten

Die Berechnung der Sauerstoffeintragsrate (OTR, *oxygen transfer rate*) und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CTR, *carbon production rate*) erfolgt aus den Abgaswerten der Kultivierungen.

Sauerstoffeintragsrate (OTR, *oxygen transfer rate*):

$$OTR = \frac{M_{O_2} \cdot F^{in}}{V_R(t) \cdot V_M} (x_{O_2}^{in}(t) - x_{O_2}^{out}(t)) \cdot \frac{1 - x_{O_2}^{in}(t) - x_{CO_2}^{in}(t)}{1 - x_{O_2}^{out}(t) - x_{CO_2}^{out}(t)} \quad (5.6)$$

Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CTR, *carbon production rate*):

$$CPR = \frac{M_{CO_2} \cdot F^{in}}{V_R(t) \cdot V_M} (x_{CO_2}^{out}(t) - x_{CO_2}^{in}(t)) \cdot \frac{1 - x_{O_2}^{in}(t) - x_{CO_2}^{in}(t)}{1 - x_{O_2}^{out}(t) - x_{CO_2}^{out}(t)} - x_{CO_2}^{in}(t) \quad (5.7)$$

Der Respirationskoeffizient (RQ) ergibt sich aus dem Quotienten des CPR und OTR:

$$RQ = \frac{CPR}{OTR} \quad (5.8)$$

F^{in} = Volumenstrom des eintretenden Gases [L h⁻¹], V_M = Molvolumen des idealen Gases (22,41 L mol⁻¹), $V_R(t)$ = Reaktorarbeitsvolumen zurzeit t, $x_{O_2}^{in}$ = Molenbruch von O₂ im Gaseintritt, $x_{O_2}^{out}$ = Molenbruch von O₂ im Gasaustritt, $x_{CO_2}^{in}$ = Molenbruch von CO₂ im Gaseintritt, $x_{CO_2}^{out}$ = Molenbruch von CO₂ im Gasaustritt

8.10 Ergänzende Daten

Tabelle 40: Versuchsbedingungen der 11 Kultivierungen für die statistische Versuchsplanung.

Randomisierte Reihenfolge	Temperatur [°C]	Begasung [L h ⁻¹]	Rührer [min ⁻¹]	GlucoseStart [g L ⁻¹]
1	32	15	1100	13
2	32	5	500	13
3	35	10	800	18
4	38	15	500	13
5	32	5	1100	23
6	35	10	800	18
7	32	15	500	23
8	38	15	1100	23
9	38	5	1100	13
10	35	10	800	18
11	38	5	500	23

9. Literaturverzeichnis

- [1] Balsler, K.: Polysaccharide. Eigenschaften und Nutzung ; eine Einführung. Berlin [u.a.] 1985.
- [2] Burkart, A.; Imhoff, A. B.: Bildgebung nach autologer Chondrozytentransplantation. Korrelation kernspintomographischer, histologischer und arthroskopischer Befunde. In: Der Orthopäde 29 (2000) 2, S. 135–44.
- [3] Weirather, K.-P.: Hyaluronsäure (Suplaysn u.a.): Was ist belegt? In: arznei-telegramm 33 (2002) 4.
- [4] Husmann, M.; Roth, J.; Kabat, E. A.; WEISGERBER, C.; Frosch, M.; Bitter-Suermann, D.: Immunohistochemical localization of polysialic acid in tissue sections: differential binding to polynucleotides and DNA of a murine IgG and a human IgM monoclonal antibody. In: Journal of Histochemistry & Cytochemistry 38 (1990) 2, S. 209–15.
- [5] Haastert-Talini, K.; Schaper-Rinkel, J.; Schmitte, R.; Bastian, R.; Muehlenhoff, M.; Schwarzer, D.; Draeger, G.; Su, Y.; Scheper, T.; Gerardy-Schahn, R.; Grothe, C.: In Vivo Evaluation of Polysialic Acid as Part of Tissue-Engineered Nerve Transplants. In: TISSUE ENGINEERING PART A 16 (2010) 10, S. 3085–98.
- [6] Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L.: Pathogenic Escherichia coli. In: Nature reviews. Microbiology 2 (2004) 2, S. 123–40.
- [7] Menneking, C.: Organisch-anorganische Komposite auf der Basis von Polysacchariden für die Anwendung als Biomaterialien unter besonderer Berücksichtigung der Polysialinsäure. Dissertation. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2008).
- [8] Franz, G.; Blaschek, W.: Polysaccharide. Berlin ;, New York 1991.
- [9] Lehmann, J.: Kohlenhydrate. Chemie und Biologie ; 416 Abbildungen, 22 Tabellen, 2., neubearbeitete und erw. Aufl., 1. [Dr.]. Stuttgart [u.a.] 1996.
- [10] Guilbot, A. a. M. C.: The Polysaccharides (1985) III, S. 209–82.
- [11] Campbell, N. A.; Kratochwil, A.; Lazar, T.; Reece, J. B.: Biologie, 8., aktualisierte Aufl. [der engl. Orig.-Ausg., 3. Aufl. der dt. Übers.]. München [u.a.] 2009.
- [12] Wollrab, A.: Organische Chemie. Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten, 3., erg. Berlin ;, Heidelberg 2009.
- [13] Shaw, C. J.; Chao, H.; Xiao, B.: Determination of sialic acids by liquid chromatography-mass spectrometry. In: Journal of chromatography. A 913 (2001) 1-2, S. 365–70.
- [14] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.: Mikrobiologie. Berlin 2000.

-
- [15] Traving, C.; Schauer, R.: Structure, function and metabolism of sialic acids. In: Cellular and molecular life sciences : CMLS 54 (1998) 12, S. 1330–49.
- [16] Janas, T.: in Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. In: ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker (2005) 2, S. 707–27.
- [17] McGuire, E.J.; Binkley, S.B.: The structure and chemistry of colominic acid. In: Biochemistry 3 (1964), S. 247–51.
- [18] Henderson, T. J.; Venable, R. M.; Egan, W.: Conformational flexibility of the group B meningococcal polysaccharide in solution. In: Journal of the American Chemical Society 125 (2003) 10, S. 2930–39.
- [19] Tzeng, Y.-L.; Datta, A. K.; Strole, C. A.; Lobritz, M. A.; Carlson, R. W.; Stephens, D. S.: Translocation and surface expression of lipidated serogroup B capsular Polysaccharide in *Neisseria meningitidis*. In: Infection and immunity 73 (2005) 3, S. 1491–505.
- [20] Steenbergen, S. M.; Vimr, E. R.: Functional relationships of the sialyltransferases involved in expression of the polysialic acid capsules of *Escherichia coli* K1 and K92 and *Neisseria meningitidis* groups B or C. In: The Journal of biological chemistry 278 (2003) 17, S. 15349–59.
- [21] Pon, R. A.; Lussier, M.; Yang, Q. L.; Jennings, H. J.: N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. In: The Journal of experimental medicine 185 (1997) 11, S. 1929–38.
- [22] Häyrynen, J.; Jennings, H.; Raff, H. V.; Rougon, G.; Hanai, N.; Gerardy-Schahn, R.; Finne, J.: Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. In: The Journal of infectious diseases 171 (1995) 6, S. 1481–90.
- [23] Bliss, J. M.; Silver, R. P.: Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. In: Molecular microbiology 21 (1996) 2, S. 221–31.
- [24] Scheidegger, P.; Papay, J.; ZUBER, C.; Lackie, P. M.; Roth, J.: Cellular site of synthesis and dynamics of cell surface re-expression of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. In: European journal of biochemistry / FEBS 225 (1994) 3, S. 1097–103.
- [25] Freiburger, F.: Structure-function relations and application of the neisserial polysialyltransferase of serogroup B. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2010).

-
- [26] Ohe, M. von der; Wheeler, S. F.; Wuhrer, M.; Harvey, D. J.; Liedtke, S.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Geyer, H.; Dwek, R. A.; Geyer, R.; Wing, D. R.; Schachner, M.: Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. In: *Glycobiology* 12 (2002) 1, S. 47–63.
- [27] Finne, J.; Finne, U.; Deagostini-Bazin, H.; Goridis, C.: Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. In: *Biochemical and biophysical research communications* 112 (1983) 2, S. 482–87.
- [28] Rutishauser, U.: Polysialic acid and the regulation of cell interactions. In: *Current Opinion in Cell Biology* 8 (1996) 5, S. 679–84.
- [29] Monnier, P. P.; Beck, S. G.; Bolz, J.; Henke-Fahle, S.: The polysialic acid moiety of the neural cell adhesion molecule is involved in intraretinal guidance of retinal ganglion cell axons. In: *Developmental biology* 229 (2001) 1, S. 1–14.
- [30] Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K.: Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (2003) 16, S. 13875–80.
- [31] Roth, J.; Taatjes, D. J.; Bitter-Suermann, D.; Finne, J.: Polysialic acid units are spatially and temporally expressed in developing postnatal rat kidney. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987) 7, S. 1969–73.
- [32] Zuber, C.; Lackie, P. M.; Catterall, W. A.; Roth, J.: Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (1992) 14, S. 9965–71.
- [33] Gerardy-Schahn, R.; Bethe, A.; Brennecke, T.; Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Ziesing, S.; Lottspeich, F.; Frosch, M.: Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E-encoded endoneuraminidase Endo NE. In: *MOLECULAR MICROBIOLOGY* 16 (1995) 3, S. 441–50.
- [34] Schwarzer, D.; Stummeyer, K.; Haselhorst, T.; Freiberger, F.; Rode, B.; Grove, M.; Scheper, T.; Itzstein, M. von; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.: Proteolytic Release of the Intramolecular Chaperone Domain Confers Processivity to Endosialidase F. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009) 14, S. 9465–74.
- [35] Kean, E.: CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1673 (2004) 1-2, S. 56–65.
- [36] Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R.: Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. In: *Current Opinion in Structural Biology* 8 (1998) 5, S. 558–64.

- [37] Freiburger, F.; Claus, H.; Günzel, A.; Oltmann-Norden, I.; Vionnet, J.; Mühlenhoff, M.; Vogel, U.; Vann, W. F.; Gerardy-Schahn, R.; Stummeyer, K.: Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. In: *Molecular microbiology* 65 (2007) 5, S. 1258–75.
- [38] Zapata, G.; Vann, W. F.; Aaronson, W.; Lewis, M. S.; Moos, M.: Sequence of the cloned *Escherichia coli* K1 CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase gene. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (1989) 25, S. 14769–74.
- [39] Ichikawa, Y.; Look, G. C.; Wong, C. H.: Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. In: *Analytical biochemistry* 202 (1992) 2, S. 215–38.
- [40] Whitfield, C.: Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. In: *Annual Review of Biochemistry* 75 (2006) 1, S. 39–68.
- [41] Ferrero, M. A.; Reglero, A.; Fernandez-Lopez, M.; Ordas, R.; Rodriguez-Aparicio, L. B.: N-acetyl-D-neuraminic acid lyase generates the sialic acid for colominic acid biosynthesis in *Escherichia coli* K1. In: *The Biochemical journal* 317 (Pt 1) (1996), S. 157–65.
- [42] Weisgerber, C.; Troy, F. A.: Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. The endogenous acceptor of polysialic acid is a membrane protein of 20 kDa. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (1990) 3, S. 1578–87.
- [43] Rode, Bastian: Biosynthetische Produktion von Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2008).
- [44] Rode, B.; Endres, C.; Ran, C.; Stahl, F.; Beutel, S.; Kasper, C.; Galuska, S.; Geyer, R.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Scheper, T.: Large-scale production and homogeneous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. In: *Journal of biotechnology* 135 (2008) 2, S. 202–09.
- [45] Liu, J.-L.; Zhan, X.-B.; Wu, J.-R.; Lin, C.-C.; Yu, D.-F.: An efficient and large-scale preparation process for polysialic acid by *Escherichia coli* CCTCC M208088. In: *Biochemical Engineering Journal* 53 (2010) 1, S. 97–103.
- [46] L. B. Rodríguez-Aparicio, A. R. A. I. O. u. J. M. L.: Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 27 (1988) 5-6, S. 474–83.
- [47] Kapre, S. V. (. I. S. U.: Highly pure polysialic acid and process for preparation thereof (2010) 20100086974. Abrufdatum 04.11.2011.

-
- [48] Siebertz, K.; van Bebber, D.; Hochkirchen, T.: Statistische Versuchsplanung. Berlin, Heidelberg 2010.
- [49] Danzer, K.: Chemometrik. Grundlagen und Anwendungen. Berlin ;, Heidelberg ;, New York ;, Barcelona ;, Hongkong ;, London ;, Mailand ;, Paris ;, Singapur ;, Tokio 2001.
- [50] Kessler, W.: Schulung über Statistische Versuchsplanung (Design of Experiments-DoE) (2010).
- [51] Kranert, M.; Cord-Landwehr, K.: Biologische Verfahren. In: Einführung in die Abfallwirtschaft, S. 185–291.
- [52] Chen, R.; John, J.; Rode, B.; Hitzmann, B.; Gerardy-Schahn, R.; Kasper, C.; Scheper, T.: Comparison of polysialic acid production in *Escherichia coli* K1 during batch cultivation and fed-batch cultivation applying two different control strategies. In: Journal of biotechnology 154 (2011) 4, S. 222–29.
- [53] Hass, V. C.; Pörtner, R.: Praxis der Bioprozesstechnik. Mit virtuellem Praktikum. Heidelberg 2009.
- [54] Inoue, S.; Inoue, Y.: A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues. In: BIOCHIMIE 83 (2001) 7, S. 605–13.
- [55] Ludger Limited: Ludger Tag DMB, Sialic Acid Labelin kit. In: Instruction Guide (2006).
- [56] Kleppmann, W.: Taschenbuch Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren, 6., überarb. München [u.a.] 2009.
- [57] Verrall, M. S.: Downstream processing of natural products. A practical handbook, Reprint. Chichester u.a 1997.
- [58] Naohiko Nagata, K. J. H. D. M. D. G. B.; Nagata, N.; Herouvis, K. J.; Dziewulski, D. M.; Belfort, G.: Cross-Flow Membrane Microfiltration of a Bacterial Fermentation Broth // Cross-flow membrane microfiltration of a bacteriol fermentation broth. In: Biotechnology and Bioengineering 34 (1989) Volumen 34, issue 4 // 4, S. 447–66.
- [59] Berg, H. C.: *E. coli* in motion. New York, NY, New York, NY 2004.
- [60] Pots, A. M.; Grotenhuis, E. ten; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J.; Kruif, K. G. de: Thermal Aggregation of Patatin Studied in Situ. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999) 11, S. 4600–05.
- [61] Labrou, N.: Design and selection of ligands for affinity chromatography. In: Journal of Chromatography B 790 (2003) 1-2, S. 67–78.

-
- [62] Yang, H.; Viera, C.; Fischer, J.; Etzel, M. R.: Purification of a Large Protein Using Ion-Exchange Membranes. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 41 (2002) 6, S. 1597–602.
- [63] Boi, C.: Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. In: *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES* 848 (2007) 1, S. 19–27.
- [64] Kasper, C.; Reif, O. W.; Freitag, R.: Evaluation of affinity filters for protein isolation. In: *BIOSEPARATION* 6 (1996) 6, S. 373–82.
- [65] Heath, C. A.; BELFORT, G.: Synthetic membranes in biotechnology: Realities and possibilities. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (1990), S. 45–88.
- [66] Roper, D; Lightfoot, E.: Separation of biomolecules using adsorptive membranes. In: *Journal of Chromatography A* 702 (1995) 1-2, S. 3–26.
- [67] Manzi, A. E.; Higa, H. H.; Diaz, S.; Varki, A.: Intramolecular self-cleavage of polysialic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (1994) 38, S. 23617–24.
- [68] Vimr, E. R.; Kalivoda, K. A.; Deszo, E. L.; Steenbergen, S. M.: Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (2004) 1, S. 132–53.
- [69] Rehbock, C.: Entwicklung eines Durchfluss-Multitestersystems zur Beobachtung von Kultivierungsprozessen in der Biotechnologie. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2009), S. 1–130.
- [70] Kökpinar, Ö.: Untersuchung von Membranadsorbersystemen in der Proteinaufreinigung und Entwicklung Aptamer-basierter Affinitätschromatografie. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2008).
- [71] Sanz, J. und Robert, J. -L.: Influence of structural factors on ^{29}Si and ^{27}Al NMR chemical shifts of phyllosilicates 2:1. In: *Physics and Chemistry of Minerals* 1991 Volume 19, Number 1, S. 39–45.
- [72] Bergaya, F.: *Handbook of clay science*, 1. Auflage. Amsterdam 2006.
- [73] Ralla K.: Untersuchungen zur Anwendung anorganischer Adsorbentien für die Separation biologisch aktiver Substanzen. In: Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2008).
- [74] Jasmund, K.: *Tonminerale und Tone. Struktur, Eigenschaften, Anwendungen und Einsatz in Industrie und Umwelt*. Darmstadt 1993.

-
- [75] Ruiz-Hitzky, E.; Darder, M.; Aranda, P.: Functional biopolymer nanocomposites based on layered solids. In: *Journal of Materials Chemistry* 15 (2005) 35-36, S. 3650.
- [76] Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Rampey, A. M.; Rushton, G. T.; Chen, Y.; Shimizu, K. D.: Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 804 (2004) 1, S. 141–49.
- [77] Graf, A.-M.: Entwicklung und Anwendung prozesstechnischer und analytischer Systeme zur Wertschöpfung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Kartoffeln. In: *Dissertation* 2011.
- [78] Yoshinuma, N.; Tanaka, K.; Suzuki, K.; Fujikawa, K.; Ito, K.; Murai, S.: The inhibitory effect of endotoxins on growth of human cell lines. In: *The Journal of Nihon University School of Dentistry* 36 (1994) 2, S. 139–44.
- [79] Lottspeich, F.; Zorbas, H.: *Bioanalytik*. Heidelberg 1998.
- [80] Blaschek, W.; Alban, S.: Kohlenhydrate I: Chemie, wichtige Mono- und Oligosaccharide. In: *Pharmakognosie — Phytopharmazie* (2007), S. 475–514.
- [81] Koch Membran System: KMS Laboratory Cell CF-1 Crossflow Membrane Separation Test Unit 2011 (2011).
- [82] Lottspeich, F.; Engels, J. W.: *Bioanalytik*, 2. Auflage. München; , Heidelberg 2006.
- [83] Pierce Biotechnology: How to use a protein assay standard curve. In: *Technical Handbook* (2004).

10. Geräte, Materialien und Chemikalien

10.1 Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifuge	Multifuge S3	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0RS	Heraeus instruments
Kontinuierliche Zentrifuge	Contifuge stratos	Heraeus
Zentrifuge	5415C	Eppendorf
Vortex Mixwe	VM300	Gemmy Industrial
Analysenwaage	Analytic AC 210 S	Sartorius
pH-Meter	605	Metrohm
Glucosemessgerät	YSI 2700	Yellow Springs Instruments
Spektrophotometer	Uvikon 922	Kontron instruments
Clen bench		Heraeus
Inkubationshaube	Certomat HK	Sartorius bbi
Schüttler	Certomat SII	Sartorius
Photometer	Multikan Spectrum	Thermolabs
Fluoreszenz Detektor	RF-10A _{XL}	Shimadzu
Sampler	Triathlon	Spark
FPLC-System	BioLogic DuoFlow	Biorad
Lyophille	ALPHA 1-4 LSC	Martin Christ GmbH
Überkopfmischer		Kali-Chemie
Wasseraufbereitungsanlage		Sartorius AG
Endotoxin Gerät	Endosafe®-PTS™	Charles river

Fermenterkultivierung

Edelstahlreaktor (10 L)	Biostat C	Sartorius bbi
Edelstahlreaktor (30 L)	Biostat DU	Sartorius bbi
Steuereinheit	DCU	Sartorius bbi
pH-Elektrode	EASYFERM Plus	Hamilton
Sauerstoffelektrode	Visiferm™	Hamilton
Thermoelement	Pt-100	Sartorius bbi
Abgasanalytik	Uras 14 und Magnos	ABB

10.2 Materialien

96-Loch-Platte	UV-durchlässig	Cornig Inc.
Küvette	halbmikro	Sarstedt
Dialyseschlauch	Visking	Carl Roth

10.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)

Lebenslauf

Ismet Bice

Persönliche Informationen

Geburtstag: 01.07.1982

Geburtsort: Besiri, Türkei

Familienstand: ledig

Studium und berufliche Ausbildung

10/2008-02/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Promotionsarbeit im Bereich Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Thomas Scheper
8/2008	Abschluss des Studiums als Dipl.-Chem.
02/2008–08/2008	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover mit dem Thema „Untersuchung der spezifischen Aktivität von rekombinanten <i>Bacillus megaterium</i> in unterschiedlichen Wachstumsphasen“ unter der Leitung von Prof. Thomas Scheper
10/2003-02/2008	Diplomstudium Chemie an der Leibniz Universität Hannover

Schulbildung

08/2000 – 07/2003	Axel-Bruns-Schule, Celle, Abschluss: Abitur mit den Prüfungsfächern Chemie, Elektrotechnik, Wirtschaftslehre, Deutsch
12/1997 – 07/2000	Blumenläger Schule Grund- und Hauptschule mit 10. Klasse, Celle, Abschluss: Erweiterter Sekundarabschluss I
08/1996 – 12/1997	Haupt- und Realschule Hambühren
08/1994 – 07/1996	Orientierungsstufe, Hambühren
08/1990 – 07/1994	Grundschule Hambühren

Veröffentlichungen

Artikel

- [1] Jonczyk, P.; Schmidt, A.; Bice, I.; Gall, M.; Gross, E.; Hilmer, J.-M.; Bornscheuer, U.; Beutel, S.; Scheper, T.: Strikt anaerobe Batch-Kultivierung von *Eubacterium ramulus* in einem neuartigen Einweg-Beutelreaktorsystem. In: Chemie Ingenieur Technik 83 (2011) 12, S. 2147–52.
- [2] Ismet Bice, Hilal Celik, Christoph Wolff, Sascha Beutel, Cornila Kasper, Rita Gerardy-Schahn, Thomas Scheper: A novel downstream process for polysialic acid using membrane adsorber and clay minerals, bisher unveröffentlicht.

Mündliche Präsentation

- [3] Ismet Bice, Hilal Celik, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Purification of polysialic acid using adsorbers, 28. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen 2010, Aachen.

Poster

- [4] Ismet Bice, Michael Büring, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Untersuchung der Aktivität von rekombinanten *Bacillus megaterium* in unterschiedlichen Wachstumsphasen, VCI-Tagung 2008, Hannover.
- [5] Ismet Bice, Michael Büring, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Untersuchung der Levansucrase-Produktion von rekombinantem *Bacillus megaterium* innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen, 27. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen 2009, Mannheim.
- [6] Ismet Bice, Bastian Rode, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Produktion und Aufarbeitung von Polysialinsäure aus *E. coli* K1, 27. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen 2009, Mannheim.
- [7] Ismet Bice, Dorte Solle, Sascha Beutel and Thomas Scheper: Chain length determination of polysialic acid isolated from *E. coli* K1 batch and fed- batch cultivations, 1st European Congress of Applied Biotechnology 2011, Berlin.