

Abschlussbericht



Einsatz effizienter Expressionssysteme und Membranverfahren für die Produktion von Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen AZ 13092

Projektkoordinator: Prof. Garabed Antranikian,
Institut für Technische Mikrobiologie, TU Hamburg-Harburg

Projektpartner: Prof. Roland Freudl, Institut für Biotechnologie 1,
Forschungszentrum Jülich GmbH

Prof. Horst Chmiel, Gesellschaft für umweltkompatible
Prozesstechnik mbH an der Universität des Saarlandes (upt)

Dr. Ralph Nonninger, ItN-Nanovation GmbH, Saarbrücken

Dr. Thomas Schäfer, Department Bacterial Discovery Unit,
Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark

Laufzeit: 2 Jahre (2004-2005)



Hamburg, Dezember 2005

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13092	Referat	32	Fördersumme	249.649,00 €
----	--------------	---------	-----------	-------------	---------------------

Antragstitel **Einsatz effizienter Expressionssysteme und Membranverfahren für die Produktion von Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen**

Stichworte Schwerpunkt-Biotechnologie
Expression , Mikrobiologie , Umweltchemikalien , Verfahren

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
2 Jahre	01.07.2003	30.06.2005	2

Zwischenberichte nach 18 Monaten

Bevolligungsempfänger	TUHH-Technologie GmbH (TuTech)	Tel	040/766180-81
		Fax	040/766180-88
	Schellerdamm 4	Projektleitung	
	21079 Hamburg	Prof. Dr. Dr. h.c. G. Antranikian	
		Bearbeiter	
		Maryna Royter, Moritz Katzer	

Kooperationspartner

- Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 1, Jülich
- Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH, Saarbrücken
- Novozymes A/S Department Bacterial Discovery Unit, Bagsvaerd (Dänemark)
- ItN Nanovation GmbH (ItN), Saarbrücken

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Die Anwendung von Biokatalysatoren in biotechnologischen Produktionsverfahren führt vielfach zu einer besseren Ausnutzung von Rohstoffen, einer Minimierung von Schadstoffemissionen und einer Herabsetzung des Energieverbrauchs bei gleichzeitig verbesserter Produktqualität und -reinheit. Aufgrund dieser Vorteile wird der Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen, in denen z. Zt. noch chemische oder physikalische Verfahren dominieren, weiter zunehmen. Es ist daher von besonderer Relevanz, effiziente Expressionssysteme in mesophilen Wirtsorganismen zu optimieren und einzusetzen, um so die natürlichen Quellen von Biokatalysatoren - insbesondere extremophile Mikroorganismen - für Umwelt und Gesellschaft zu nutzen.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Im Zuge des beantragten Projekts wurden aus extremophilen Mikroorganismen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden Lipasegene erfolgreich kloniert und rekombinant in mesophilen Produktionsstämmen exprimiert .

Zur Produktion und Sekretion hitze-stabiler rekombinanter Biokatalysatoren wurden die grampositiven Bakterien *Staphylococcus carnosus* und *Bacillus subtilis* sowie das alternative System der Hefe *Pichia pastoris* verwendet. Die im Rahmen des Vorhabens gewonnen Erkenntnisse mit Lipasen können modellhaft auf andere biotechnologisch relevante Biokatalysatoren übertragen werden.

Des weiteren sollte die Ausbeute an rekombinanten Lipasen durch optimierte Fermentationstechniken im 1-l und 20-l Maßstab erhöht werden. Hierzu wurden Parameter wie beispielsweise Temperatur, Rührerdrehzahl, Begasung und Induktionszeitpunkt untersucht. Zusätzlich sollte die technische Anwendbarkeit ausgewählter rekombinanter Enzyme getestet werden.

Die Hochdurchsatz-Bioproduktion von Lipasen setzt deren kontinuierliche Entfernung aus dem Bioreaktor voraus. Gleichzeitig muss der das Enzym sekretierende Mikroorganismus im Reaktor zurückgehalten werden um möglichst hohe Zelldichten zu erzielen. Dies sollte im Rahmen des Projekts durch neuartige keramische Membranen und Membranmodule im Fermenter realisiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

In der Arbeitsgruppe von Prof. Freudl am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich wurden zwei Modell-Lipasen, die extrazelluläre Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 sowie die im Cytosol lokalisierte Lipase TSL aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* mit Sec- bzw. Tat-Weg spezifischen Exportsignalen versehen. Durch die Klonierung solcher Genkonstrukte konnte eine sekretorische Proteingewinnung erreicht werden. Die rekombinanten Lipasen konnten über den generellen Sekretionsweg (Sec-Weg) oder über den alternativen Tat-Weg („twin-arginine-translocation“) aus den Gram-positiven Produktionswirten *Staphylococcus carnosus* und *Corynebacterium glutamicum* in den Kulturüberstand sekretiert werden. In der von Dr. Thomas Schäfer geleiteten Abteilung *Bacterial Discovery Unit* (Novozymes) wurde die Lipase aus *T. thermohydrosulfuricus* ohne Signalsequenz in *Bacillus subtilis* kloniert und extracellulär expremiert.

Die Arbeitsgruppe Technische Mikrobiologie von Prof. Antranikian an der TU Hamburg-Harburg hat sich der Arbeit mit Lipasen aus thermophilen und psychophilen Organismen gewidmet. Die Klonierungen der Lipasen aus den anaeroben thermophilen Organismen, *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* in *E. coli* in den Expressionsvektor pETBlue-1 wurden erfolgreich abgeschlossen. Die Lipasen wurden unter der Kontrolle des *T7lac*-Promotors intrazellulär expremiert. Die rekombinanten Enzyme wurden durch eine hydrophobe Interaktions- und eine Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt und anschließend charakterisiert. Die aufgereinigten rekombinanten Enzyme sind aktiv im Temperaturbereich von 40 bis 90 °C. Die Lipasen aus *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* und aus *T. thermohydrosulfuricus* sind aktiv in dem pH-Bereich von 6,5 bis 10,0. Eine kälte-aktive Lipase aus der psychophilen Hefe *Mrakia gelida* konnte aus dem Kulturüberstand des Wildtyps mit einem Reinigungsschritt isoliert werden. Diese psychrophile Lipase wurde anschließend charakterisiert. Mit Hilfe von degenerierten Primern und inverser PCR sowie einigen Primer-walking Schritten konnte eine Lipasegen-Sequenz ermittelt werden. Das hypothetische Lipasegen ist bereits in *E. coli* kloniert. Die Klonierung der Lipase aus dem thermoalkaliphilen Organismus *Anaerobranca gottschalkii* in das Expressionssystem der Hefe *Pichia pastoris* war ebenfalls erfolgreich. Die rekombinate Lipase wurde mittels hydrophober Interaktions- und Gelfiltrationschromatographie gereinigt und anschließend charakterisiert. *Pichia pastoris* lässt sich als bereits etabliertes Expressionssystem problemlos im Fermenter kultivieren. Gemeinsam mit dem Kooperationspartner Prof. Chmiel, Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH an der Universität des Saarlandes, wurde eine keramische Mehrkanal-Flachmembran in einen Versuchsfermenter integriert. Mit Hilfe der in den Fermenter integrierten Dialysemembran wurde eine extrazelluläre Lipase aus *T. Brockii* subsp. *Brockii* aus dem laufenden Produktionsprozess entnommen.

Die neuartige keramische Mehrkanal-Flachmembran (Patent-Nr. DE 197 49 411.0) wurde innerhalb des Projektes hinsichtlich der Trenneigenschaften (Porendurchmesser) und der Wechselwirkung mit dem Kulturmedium (Fouling) optimiert. Zusätzlich wurden an die Fermentationsbedingungen angepasste sterilisierbare Module entwickelt (Patent-Nr. DE 197 49 411.0). Der Einsatz der Membran und der Membranmodule zur Abtrennung der Biokatalysatoren bereits während der Fermentation gelang bei unterschiedlichen Enzym-Produzenten.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Präsentation des Projektes auf dem „International Congress on Extremophiles 2004“, Baltimore, USA

Posterpräsentation auf der „BioPerspectives 2004“ in Wiesbaden, Deutschland

Zwei Artikel über die Charakterisierung der thermo-aktiven Lipasen aus *T. thermohydrosulfuricus* und *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* sind bereits angefertigt.

Vortrag und Posterpräsentationen auf der „VAAM Jahrestagung 2005“ in Göttingen, Deutschland

Fazit

Sowohl die Klonierungen, die rekombinante Expression der Lipasen in *E. coli* und *P. pastoris* sowie in *Staphylococcus carnosus* und *Corynebacterium glutamicum*, als auch die Charakterisierung der Lipasen wurden abgeschlossen (AG Prof. Antranikian und AG Prof. Freudl). Somit wurden vier hitzestabile Lipasen erfolgreich rekombinant produziert und eine kälte-aktive Lipase charakterisiert. Die Konstruktion und Optimierung der Mehrkanal-Flachmembran war erfolgreich. Die enge Kooperation und der Erfahrungsaustausch mit den Projektpartnern ItN Nanovation GmbH und der Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH (Prof. Chmiel) ermöglichten einen reibungslosen Einbau des Membran-Moduls, so dass modellhafte Fermentationversuche mit verschiedenen Organismen durchgeführt werden konnten. Der Einsatz des Expressionssystems von *P. pastoris* erweist sich zur Produktion der Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* als nachteilig, da die Lipase zellmembrangebunden vorlag. In nachfolgenden Versuchen konnte eine Lipase bereits während einer kontinuierlich laufenden Fermentation mittels der neuartigen Mehrkanal-Flachmembran gewonnen werden. Die Fermentationsversuche mit der neuartigen Membran zeigten, dass Biokatalysatoren zukünftig schnell und äußerst wirtschaftlich produziert werden könnten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Zusammenfassung.....	1
2 Zielsetzung.....	3
3 Verwendete Methoden	7
3.1 Projektpartner TU-Hamburg Harburg	7
3.2 Projektpartner Forschungszentrum Jülich GmbH.....	7
3.3 Projektpartner Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH.....	7
3.4 Projektpartner ItN Nanovation GmbH(ItN).....	7
3.5 Novozymes.....	7
4 Ergebnisse	8
4.1 Etablierung neuer effizienter Expressionssysteme	8
4.1.1 Sekretion über den Sec- oder Tat-Weg	8
4.1.2 Signalsequenz-trapping	12
4.2 Klonierung der Lipasen.....	13
4.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus <i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> und <i>Caldanaerobacter</i> <i>subterraneus</i> subspec. <i>tengcongensis</i>	14
4.2.2 Expression der Lipasen in <i>Bacillus subtilis</i>	16
4.2.3 Reinigung, Charakterisierung und Klonierung der kälte-aktiven Lipase aus <i>Mrakia gelida</i>	18
4.2.4 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	19
4.2.5 Übersicht über die Klonierungsarbeiten.....	22

4.3	Dialysemembran und Fermentationsergebnisse	23
4.3.1	Membran- und Modulentwicklung.....	23
4.3.2	Charakterisierung und Auswahl von geeigneten Mikrofiltrationsmembranen.....	25
4.3.3	Modulentwicklung	27
4.3.4	Optimierung der Betriebsweise der Membran	35
4.4	Fermentation von <i>Pichia pastoris</i> zu Produktion der rekombinanten Lipase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	39
5	Diskussion	42
5.1	Soll-/Ist-Vergleich	42
5.2	Diskussion der Ergebnisse	46
5.3	Kooperation innerhalb des Projekts und innerhalb ICBio	48
6	Fazit	48

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Genkonstrukte für die Sec- bzw. Tat-abhängige sekretorische Expression.	10
Abb.2:	Lipaseaktivitäten (<i>p</i> -NPP-Assay) in Zellfraktion (Z) und Kulturüberstand (Ü).....	11
Abb.3:	Reinigungsgele der rekombinanten Lipasen <i>T. thermohydrosulfuricus</i> und <i>C. subterraneus</i> subspec. <i>tengcongensis</i>	14
Abb.4:	Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten vom pH-Wert.....	15
Abb.5:	Dargestellt ist der Einfluss von Lösungsmitteln (Diagram) und von Metallsalzen (Tabelle) auf die Lipaseaktivität	15
Abb.6:	Aktivitätsprofil der Lipase aus <i>M. gelida</i> in Abhängigkeit von der Temperatur	18
Abb.7:	Integration des Lipasegens aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i> in den pPIC9 Vektor ..	20
Abb.8:	Lipase-Gen Insertion in das Genom von <i>Pichia pastoris</i> durch homologe Rekombination am <i>his4</i> Gen	21
Abb.9:	Reinigungsgel und Zymogramm der rekombinanten Lipase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	21
Abb.10:	Spektrum druckbetriebener Filtrationsprozesse	24
Abb.11:	Lichtmikroskopische Aufnahme und Vermessung einer <i>Pichia</i> -Zelle	24
Abb.12:	Eingesetzte Mehrkanalfachmembran	25
Abb.13:	Geometrie der eingesetzten Mehrkanalfachmembran	27
Abb.14:	Modul mit um 90° versetzter Anordnung der Membranen	29
Abb.15:	Modul mit radialer Anordnung der Membranen	30
Abb.16:	Zetapotentiale der Hefe und der Membran Nr.4	31
Abb.17:	Optische Überprüfung der Permeatqualität (Versuch Nr.4 vgl. Tab.5).....	33
Abb.18:	Proteinkonzentration im Bioreaktor bzw. im Permeat bei Filtration einer Lipaselösung (pH 4) mit der Membran Nr. 4.....	34
Abb.19:	Proteinkonzentration im Bioreaktor bzw. im Permeat bei Filtration einer Lipaselösung (pH 7) mit der Membran Nr. 4.....	34
Abb.20:	Filtrationsversuch zur Ermittlung der bestmöglichen Betriebsweise.....	36
Abb.21:	optische Überprüfung einer Membran nach einem Langzeitversuch	37
Abb.22:	Eingesetzte Monokanalmembran	37
Abb.23:	installierte Monokanalmembran in einem Laborfermenter.....	38
Abb.24:	Vergleich der feststofffreien, filtrierten Lösung und der Biomasse	38
Abb.25:	Dialyse Folienfermenter 10-L mit integrierter Membran	39
Abb.26:	Fermentationsversuche mit <i>T. brockii</i> subsp. <i>brockii</i>	40

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Ergebnisse der Expression der verschiedenen Lipase-Konstrukte.	17
Tab. 2:	Klonierungsarbeiten.....	22
Tab. 3:	Charakterisierungsergebnisse der untersuchten Membranen.....	26
Tab. 4:	Übersicht und Bewertung der untersuchten Kleber.	28
Tab. 5:	Rückhaltung der Hefezellen bei unterschiedlicher Biomassekonzentration.	32
Tab. 6:	Filtrationsergebnisse.....	40

1 Zusammenfassung

Am Beispiel von Lipasen sollte die Produktion von Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen in mikrobiellen Produktionsstämmen modellhaft demonstriert werden. Durch die Verwendung neuartiger Keramikmembranen und innovativer Fermentationstechniken sollten sowohl kälteaktive als auch hitzestabile Lipasen mit besonderen Eigenschaften, z.B. Enantioselektivität, bis zur Produktreife für den industriellen Einsatz gebracht werden. Die in diesem Projekt mit Hilfe effizienter Expressionssysteme rekombinant gewonnenen Enzyme verfügen über ein großes Potenzial für weiterführende biotechnologische Anwendungen, beispielsweise in der Feinchemie oder zur Herstellung von building blocks.

Im Rahmen des Projektes sollten effiziente mesophile Expressions- und Sekretionssysteme für die biotechnologische Gewinnung von rekombinanten Lipasen etabliert und optimiert werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Freudl am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich hat zwei Modell-Lipasen, die extrazelluläre Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 sowie die im Cytosol lokalisierte Lipase TSL aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* mit Sec- bzw. Tat-Weg-spezifischen Exportsignalen versehen. Durch die Klonierung solcher Genkonstrukte wurde eine vorteilhafte sekretorische Proteingewinnung erreicht. Die rekombinanten Lipasen wurden über den generellen Sekretionsweg (Sec-Weg) oder über den alternativen Tat-Weg („twin-arginine-translocation“) aus den Gram-positiven Produktionswirten (wie z.B. *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*) in den Kulturüberstand ausgeschieden.

Die Arbeitsgruppe Technische Mikrobiologie von Prof. Antranikian an der TU Hamburg-Harburg hat sich den hitze-aktiven und den kälte-aktiven Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen gewidmet. Die Klonierungen der Lipasen aus den anaerob thermophilen Organismen *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis*¹ und *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*¹ in *E. coli* in den

¹ *Thermoanaerobacter tengcongensis* wurde umbenannt zu *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* zu *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*.

Expressionsvektor pETBlue-1 wurden erfolgreich abgeschlossen. Die Lipasen konnten unter der Kontrolle des *T7lac*-Promotors intrazellulär exprimiert werden. Die rekombinanten Enzyme wurden durch Hitzefällung, hydrophobe Interaktions- und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt und anschließend charakterisiert. Die aufgereinigten rekombinanten Enzyme sind aktiv im Temperaturbereich von 40 bis 90 °C. Die Lipasen aus *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* und *T. thermohydrosulfuricus* sind aktiv bei pH-Werten zwischen 6,5 und 9,5 bzw. 10,0. In der von Dr. Thomas Schäfer geleiteten Abteilung *Bacterial Discovery Unit* (Novozymes) wurde die hitze-aktive Lipase aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* in *Bacillus subtilis* kloniert. Diese Lipase wurde ohne eine eigene identifizierbare Signalsequenz oder ein zusätzliches Signalsequenz-Konstrukt in *Bacillus subtilis* extrazellulär exprimiert. Dieses Enzym nutzt also einen anderen Sekretionsmechanismus als den generellen Sekretionsweg (Sec-Weg). Die Klärung dieses Sekretionsmechanismus ist für die weitere Entwicklung von Expression- bzw. Sekretionssystemen sehr interessant.

Eine kälte-aktive Lipase aus der psychrophilen Hefe *Mrakia gelida* konnte aus dem Kulturüberstand des Wildtyps mit einem Reinigungsschritt isoliert werden. Diese kälte-aktive Lipase wurde anschließend charakterisiert. Mit Hilfe von degenerierten Primern und inverser PCR, sowie einigen Primer-walking Schritten konnte eine Lipasegen-Sequenz ermittelt werden. Das hypothetische Lipasegen wurde in *E. coli* kloniert. Hierbei konnte jedoch keine Lipase expremiert werden.

Die Klonierung der Lipase aus dem thermoalkaliphilen Organismus *Anaerobranca gottschalkii* in das Expressionssystem der Hefe *Pichia pastoris* ist erfolgreich verlaufen. Die rekombinante Lipase wurde mittels hydrophober Interaktions- und Gelfiltrationschromatographie gereinigt und anschließend charakterisiert. *Pichia pastoris* lässt sich als bereits etabliertes Expressionssystem problemlos im Fermenter kultivieren. Gemeinsam mit dem Kooperationspartner Prof. Chmiel, Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH an der Universität des Saarlandes, wurde eine keramische Mehrkanal-Flachmembran in einen Versuchsfermenter integriert.

Die neuartige keramische Mehrkanal-Flachmembran (Patent-Nr. DE 197 49 411.0) wurde innerhalb des Projektes hinsichtlich der Trenneigenschaften (Porendurchmesser) und der Wechselwirkung mit dem Kulturmedium (Fouling) optimiert. Neuartige, sterilisierbare und an die Fermentationsbedingungen angepasste Membranmodule wurden entwickelt (Patent-Nr. DE 197 49 411.0).

2 Zielsetzung

Biokatalysatoren werden von der Industrie zunehmend verwendet, um chemische Herstellungsprozesse zu ersetzen, da dabei sowohl ökologische als auch ökonomische Vorteile erwachsen. Für viele Prozesse stehen aber noch keine geeigneten Enzyme zur Verfügung. Die extremophilen Mikroorganismen besitzen aufgrund ihrer Anpassung an ungewöhnliche Lebensräume besondere Enzyme mit industriell interessanten Eigenschaften wie z.B. Thermostabilität oder Aktivität bei sehr hohen oder niedrigen pH-Werten (Bertoldo *et al.*,2002). Die von ihnen katalysierten Reaktionen laufen oft sehr enantioselektiv ab, was zu hochreinen Produkten führt. Dies ist z. B. besonders für die pharmazeutische Industrie von Interesse, da bei manchen Wirkstoffen nur ein Enantiomer therapeutisch wirksam ist. Da sich die biotechnologisch relevanten Biokatalysatoren oftmals nicht in ausreichenden Mengen aus den Ursprungsorganismen gewinnen lassen, ist eine effektive Enzymproduktion mit Hilfe rekombinanter Organismen notwendig, um der steigenden Marktnachfrage in Zukunft gerecht werden zu können. Ausschlaggebend bei der Produktion rekombinanter Enzyme ist die Entwicklung effizienter Expressionssysteme, mit denen Biokatalysatoren aus Mikroorganismen in mesophilen Wirtsorganismen in großem Maßstab (mehrere Gramm pro Liter) hergestellt werden können.

Der Anteil rekombinant erzeugter industrieller Biokatalysatoren liegt bei etwa 60%. Dieser Prozentsatz wird in nächster Zeit deutlich steigen. Im Zuge des Projekts sollte das Potenzial der Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus subtilis* und der Hefe *Pichia pastoris* zur Produktion und Sekretion rekombinanter Biokatalysatoren unter Beweis gestellt werden. Die Überexpression rekombinanter Proteine in diesen mesophilen Wirtsorganismen ist ein wichtiger Beitrag zur

Bereitstellung neuartiger Enzyme und zur Sicherstellung des steigenden Bedarfs an industriellen Biokatalysatoren. Durch die oben genannten Faktoren, Überexpression mit optimierter Sekretion des rekombinanten Enzyms sowie innovative Fermentationstechniken, insbesondere der geplanten Filtrationsmodule, sollten die Voraussetzungen für eine Hochdurchsatz-Bioproduktion der industriell sehr interessanten Lipasen geschaffen werden. Die im Rahmen des Vorhabens gewonnenen Erkenntnisse mit Lipasen sollen so weit wie möglich modellhaft auf andere biotechnologisch relevante Biokatalysatoren übertragbar sein.

Ein Ziel des Projektes war die Etablierung und Bereitstellung effizienter mesophiler Expressions- / Sekretionssysteme für die biotechnologische Gewinnung von Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen. Im Gegensatz zu Ansätzen mit einer intrazellulären Enzymproduktion bietet eine sekretorische Proteingewinnung mit mesophilen Gram-positiven Bakterien (wie z.B. *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*) den Vorteil, dass die gewünschten Zielproteine direkt in den Kulturüberstand ausgeschleust werden und daher ein Zellaufschluss sowie aufwändige nachfolgende Reinigungsverfahren entfallen können. *S. carnosus* und *C. glutamicum* eignen sich besonders als Produktionswirte, da diese Bakterien (im Gegensatz zu den meisten *Bacillus*-Arten) keine bzw. nur geringe proteolytische Aktivitäten im Kulturüberstand aufweisen, die die Ausbeute an gewünschtem Zielprotein beeinträchtigen können.

Außerdem wurde für die Expression von Lipasen alternativ das *Pichia pastoris* Expressionsystem eingesetzt. Die heterologe Genexpression in der methylotrophen Hefe *P. pastoris* ist ein inzwischen gut etabliertes System. Der größte Vorteil liegt in der Möglichkeit der Sekretion heterolog exprimierter Proteine, wobei *P. pastoris* nur in geringem Maße native Proteine sekretiert. Außerdem kann bei der Expression in *P. pastoris* der Produktionsmaßstab ohne Verluste bei der Ausbeute an rekombinantem Protein von der Schüttelflasche auf Fermentation mit hohen Zelldichten vergrößert werden. Gegenüber dem *Saccharomyces cerevisiae*-System bietet das *P. pastoris*-System den Vorteil einer 10- bis 100-fach höheren Expressionsrate heterologer Proteine bei gleicher molekularer und genetischer Manipulationsmöglichkeit.

Des Weiteren besteht bei *P. pastoris* weit weniger das Problem der Hyperglycosylierung als bei *Saccharomyces cerevisiae* (Grinna und Tschopp, 1989; Tschopp et al., 1987). Ein weiterer Vorteil des *P. pastoris*-Systems ist, dass bei der Anzucht im Fermenter eine stark reduzierte ethanolische Gärung vorliegt und es nicht, wie bei *S. cerevisiae*, zur Akkumulation von toxischen Ethanolkonzentrationen kommt. Dass *P. pastoris* Stämme ohne lipolytische Aktivität existieren und sich für die Sekretion von Lipasen eignen, konnte bereits am Beispiel von Lipasen aus dem phytopathogenen Ascomyceten *Nectria haematococca* und der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* gezeigt werden (Nasser Eddine et al. 2001, Haase, 2002).

Durch optimierte Fermentationstechniken im 1-L und 20-L Maßstab sollte die Ausbeute an rekombinantem Protein erhöht werden. Durch den Einsatz eines innovativen Keramikmembranmoduls, dessen Integration in den Bioreaktor sowie durch eine neuartige Steuerung für die Membranrückspülung, sollten die Voraussetzungen für eine Hochdurchsatz-Bioproduktion geschaffen werden. Die Übertragung biotechnologischer Produktionsverfahren vom Labormaßstab in den industriellen Maßstab scheitert häufig an der kontinuierlichen Entfernung des Produkts aus dem Bioreaktor. Dies ist aber Voraussetzung für den Übergang vom Batch-Verfahren zu einer Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. Diese Aufgabe wurde von der Gesellschaft für umweltkompatible Prozeßtechnik mbH (upt) an der Universität des Saarlandes übernommen. Große Fortschritte wurden in den letzten Jahren in der Membrantechnik erzielt. Hohe Selektivität, chemische, biologische und thermische Stabilität und ein akzeptabler Preis prädestinieren die Membrantechnik für die Integration in den Bioprozess. Diese innovativen Membranverfahren sind jedoch in der Regel für andere Aufgaben entwickelt worden; es fehlt die Übertragung in den Bioprozess. Innerhalb des Projekts sollten die produzierten rekombinanten Lipasen kontinuierlich aus dem Bioreaktor entfernt werden. Gleichzeitig muss der das Enzym sekretierende Mikroorganismus (*B. subtilis*, *S. carnosus*, *P. pastoris*) im Reaktor zurückgehalten werden, um möglichst hohe Zelldichten zu erzielen. Im Prinzip bieten sich hierfür Mikrofiltrations- und Ultrafiltrationsmembranen an. Deren Neigung zum Fouling, d. h. insbesondere zur Adsorption von Proteinen und dem Aufwachsen von Mikroorganismen auf der Oberfläche, versuchte man bisher dadurch in Grenzen zu halten, dass man das Membranmodul extern anordnete und es cross-flow durchströmte (sogenannte externe Schleife). Dies ist allerdings mit

einer Reihe von Nachteilen verbunden, wie z. B. hoher Energieverbrauch, Scherung der Mikroorganismen und des Produkts sowie Probleme bei der Sterilisation des externen Kreislaufs. Außerdem lassen sich damit Ablagerungen in den Membranporen nicht verhindern. Sie führen mit zunehmender Betriebsdauer nicht nur zu einer Abnahme der Membranpermeabilität, sondern auch zu einer Reduktion des Durchmessers der Poren. Dadurch werden schließlich nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Produkte im Bioreaktor zurückgehalten. Ein Ziel des Forschungsvorhabens war es, diese Nachteile zu beseitigen.

Dabei sollten neuartige keramische Vielkanal-Flachmembranen (Patent-Nr. DE 43 29 473.1) so oberflächenmodifiziert (z.B. minimale Rauigkeit) und im Bioreaktor integriert werden, dass sie quasi dead end filtriert werden können. Besondere Vorteile der keramischen Flachmembran sind das günstige Verhältnis Oberfläche zum Volumen sowie deren thermische und chemische Stabilität, die das Fermentieren sowohl mit mesophilen als auch extrem thermophilen Mikroorganismen und die *in situ* Sterilisation ermöglichen. Im Rahmen des Projekts sollten bestehende keramische Membranmodule auf ihre Eignung in Bioreaktoren untersucht und weiterentwickelt werden. Eine ebenfalls neu entwickelte Steuerung sollte dafür sorgen, dass jeweils einer von mehreren im Bioreaktor befindlichen Modulen (Patent-Nr. DE 197 49 411.0) im Rückspülmodus ist, während sich die übrigen Module im Filtrationsmodus befinden.

Als besonders interessante Variante sollte die Möglichkeit untersucht werden, das im Rückspülmodus befindliche Membranmodul für die Medienzufuhr zu nutzen. Die Minimierung der Wechselwirkung zwischen den Reaktorinhaltsstoffen und der Oberfläche der Keramikmembranen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Neben der bereits erwähnten Minimierung der Oberflächenstruktur ist eine permanente Hydrophilie besonders wichtig. Besondere Beachtung finden sollten in diesem Zusammenhang die Wechselwirkungen zwischen Medienbestandteilen und Membranoberfläche. Zusätzlich sollte die technische Anwendbarkeit ausgewählter rekombinanter Enzyme getestet werden.

3 Verwendete Methoden

3.1 Projektpartner TU-Hamburg Harburg

- PCR mit degenerierten Primern / Inverse PCR
- Klonierung mehrerer Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen (hitze-stabil / kälte-aktiv)
- Rekombinante Expression in mesophilen Produktionsstämmen (*Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*)
- Reinigung der rekombinanten Lipasen
- Charakterisierung der rekombinanten Lipasen
- Fermentation der Lipase-produzierenden Mikroorganismen

3.2 Projektpartner Forschungszentrum Jülich GmbH

- Umklonierung der Lipasen in *Staphylococcus carnosus*
- Expressionsoptimierung
- Sekretion über Sec- und Tat-Weg

3.3 Projektpartner Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH

- Charakterisierung von keramischen Vielkanal-Flachmembranen
- Integration in den Bioreaktor
- Versuche mit Modell-Proteinlösungen
- Entwicklung einer Rückspülsteuerung

3.4 Projektpartner ItN Nanovation GmbH(ItN)

- Optimierung der keramischen Vielkanal-Flachmembran

3.5 Novozymes

- Umklonierung der Lipasen in *Bacillus subtilis*
- Expressionsoptimierung
- Sekretion über Sec-Weg
- Signalsequenz-Trapping

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung neuer effizienter Expressionssysteme

4.1.1 Sekretion über den Sec- oder Tat-Weg

Prinzipiell können bei Gram-positiven Bakterien zwei Proteinexportwege für die heterologe Proteinsekretion ausgenutzt werden. Dies ist zum einen der ubiquitär vorhandene, generelle Sekretionsweg (Sec-Weg), bei dem die Proteine in ungefalteter Form über die Plasmamembran transloziert werden. Allerdings verläuft in manchen Fällen aufgrund des Fehlens von extracytosolischen Chaperonen die anschließende Faltung der Proteine ineffizient, was einen Abbau der Proteine durch Zellwand-assoziierte Proteasen zur Folge hat. Die Verwendung eines speziellen Sekretionscarriers, welcher auf einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* basiert und bei dem die Zielproteine C-terminal an ein Propeptid fusioniert werden, das eine Beschleunigung des Transports durch den Gefahrenbereich Zellwand bewirkt, bietet eine potentielle Lösungsmöglichkeit des genannten Problems. Nachteil dieses Ansatzes ist die Sekretion eines Propeptid-Zielprotein-Fusionsproteins, bei dem sich die Anwesenheit des Propeptids am N-Terminus des Zielproteins negativ auf dessen Faltung in die native, enzymatisch-aktive Konformation auswirken kann.

Im Gegensatz dazu besitzt der alternative Tat-("twin-arginine-translocation")-Exportweg die herausragende Fähigkeit, bereits fertig gefaltete Proteine durch die Plasmamembran zu transportieren. Dies erlaubt es, die im Cytosol vorhandenen generellen Chaperonsysteme (Hsp60, Hsp70) für die Faltung des heterologen Zielproteins auszunutzen und dieses erst anschließend aus der Zelle auszuschleusen.

In einem vorangegangenen, ebenfalls von der DBU geförderten Projekt (AZ 13040/09) konnte anhand der Kohlehydrat-umwandelnden Enzyme Cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) und Verzweigungsenzym aus *Anaerobranca gottschalkii* erstmals gezeigt werden, dass *Staphylococcus carnosus* über einen funktionellen Tat-Weg verfügt und dass ein Export der genannten Enzyme über diesen Weg zu deutlich höheren Ausbeuten im Vergleich zu deren Ausschleusung über den Sec-Weg führte. In Fortsetzung dieser Arbeiten wurde nun

im laufenden Projekt versucht, die Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus carnosus* und *Corynebacterium glutamicum* (ein normalerweise für die biotechnologische Produktion von Aminosäuren eingesetztes Bakterium) als effiziente Expressionssysteme für die sekretorische Gewinnung von Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen zu etablieren. Als Modell-Lipasen wurden zum einen die extrazelluläre Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 sowie die normalerweise im Cytosol lokalisierte Lipase TSL aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* eingesetzt.

Für die sekretorische Expression in *S. carnosus* wurden die beiden Modell-Lipasen mit Sec- bzw. Tat-Weg-spezifischen Exportsignalen versehen (Abb. 1). Nach Transformation der entsprechenden Genkonstrukte wurden die Lipase-Aktivitäten in der Zellfraktion und im Kulturüberstand der rekombinanten *S. carnosus* Stämme über die Hydrolyse des Lipasesubstrats *para*-Nitrophenylpalmitat (*p*-NPP) in einem Enzymassay bestimmt. Im Falle der Lipase TSL zeigte keine der getesteten Varianten eine signifikante Akkumulation von aktivem Enzym im Kulturüberstand oder in der Zellfraktion. Dieser Befund deutet sehr stark darauf hin, dass im Falle der TSL-Lipase die Fusion von Signalpeptiden am aminoterminalen Ende eine schnelle Falschfaltung der Lipase in eine export-inkompetente sowie enzymatisch inaktive Konformation zur Folge hat. Solch ein häufig bei artifiziellen Fusionsproteinen beobachtetes Verhalten lässt vermuten, dass sich der N-terminus der TSL-Lipase sehr wahrscheinlich im Inneren der Proteinstruktur befindet und eine Fusion an dieser Stelle mit Sekretionssignalen mit einer Faltung in die native Form nicht kompatibel ist.

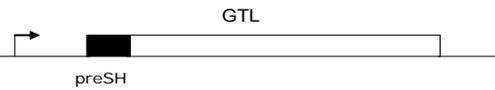
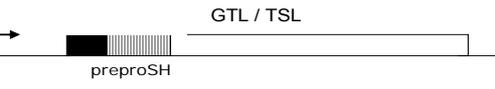
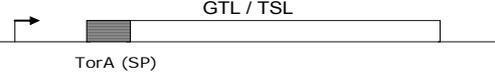
Fusionsprotein			Expression GTL in	Expression TSL in
Sec- Weg	authentisches Signalpeptid		<i>S. carnosus</i>	/
	Prepeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase		<i>S. carnosus</i>	/
	Prepropeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase		<i>S. carnosus</i>	<i>S. carnosus</i>
Tat- Weg	TorA Signal- peptid aus <i>E. coli</i>		<i>S. carnosus</i> und <i>C. glutamicum</i>	<i>S. carnosus</i> und <i>C. glutamicum</i>

Abb.1: Genkonstrukte für die Sec- bzw. Tat-abhängige sekretorische Expression der Lipasen GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 und TSL aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* in den mesophilen Wirtsbakterien *Staphylococcus carnosus* und *Corynebacterium glutamicum*.

Die Fusion der Lipase GTL an das Sec-Weg spezifische Signalpeptid bzw. an dieses Signalpeptid plus Propeptid der *S. hyicus* Lipase führte ebenfalls zu keiner nennenswerten Sekretion von aktiver Lipase in den Kulturüberstand. Im Gegensatz dazu führte die Expression des authentischen GTL Proteins mit seinem eigenen Signalpeptid zur Ausschleusung großer Mengen von aktivem Enzym (ca. 280 U / l x mg Zellen). Diese Befunde verdeutlichen, dass evolutionär an den reifen Teil des dazugehörigen Exportproteins angepasste Signalpeptide gegenüber artifiziellen Fusionen mit fremdem Signalpeptiden deutlich höhere Ausbeuten liefern können und daher, wenn möglich (d.h. wenn es sich bei dem Zielprotein um ein sekretorisches Protein handelt), stets als eine der möglichen Optionen für die Proteingewinnung eingesetzt werden sollten. Überraschenderweise wurde bei der Fusion der GTL-Lipase an das Tat-spezifische Signalpeptid (TorA) ebenfalls eine gute Sekretion (ca. 100 U / l x mg Zellen) an aktivem Enzym beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die GTL-Lipase im Kontext der fremden Signalpeptide eine hohe Tendenz zur Faltung im Cytosol besitzt und daher nur noch für einen Export über den Tat-Weg, jedoch nicht über den Sec-Weg, kompatibel ist.

Da die Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Freudl mehrfach gezeigt haben, dass sich die Exporteffizienz ein und desselben Proteins in verschiedenen Bakterien signifikant unterscheiden kann, wurde als weitere Alternative das normalerweise für die Produktion von Aminosäuren eingesetzte Gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* auf seine Eignung als möglicher Expressions- / Sekretionsswirt für die Lipaseproduktion untersucht. Hierfür wurden bislang die mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid (TorA) versehenen Lipasen TorA-GTL und TorA-TSL in *C. glutamicum* eingebracht und die Enzymaktivitäten in Zellfraktion und Kulturüberstand über *p*-NPP-Hydrolyse bestimmt. Wie schon bei *S. carnosus* wurde auch bei *C. glutamicum* keine Sekretion an aktiver TorA-TSL Lipase beobachtet. Ebenfalls im Einklang mit den Befunden bei *S. carnosus* wurde im Falle des TorA-GTL Konstrukts eine signifikante Akkumulation von aktivem Enzym im Überstand erhalten, wobei die Ausbeuten bei *C. glutamicum* sogar fast doppelt so hoch (ca. 200 U / l x mg Zellen) waren als die, welche bei Expression des identischen Gens in *S. carnosus* erzielt wurden.

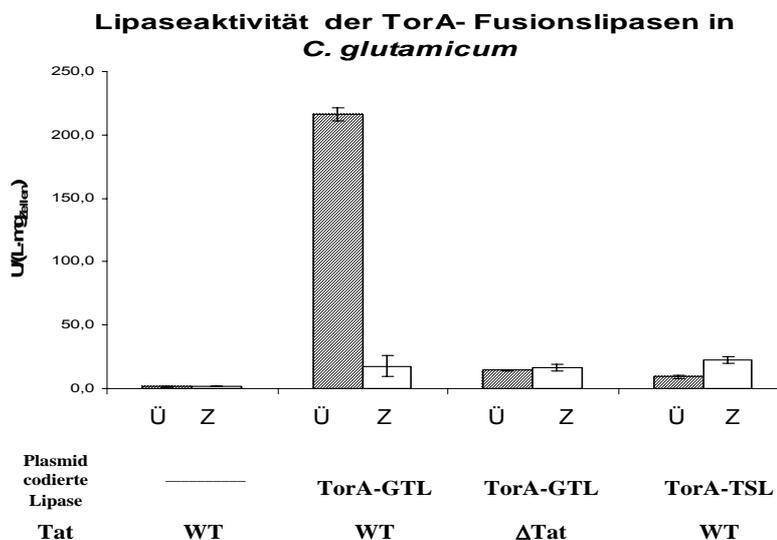


Abb.2: Lipaseaktivitäten (*p*-NPP-Assay) in Zellfraktion (Z) und Kulturüberstand (Ü) von *Corynebacterium glutamicum* Stämmen mit intaktem (WT) oder deletiertem (Δ Tat) Tat-Proteinexportsystem.

Die Tat-abhängige Proteinsekretion besitzt eine sehr starke Spezifität im Hinblick auf die Signalpeptiderkennung durch den Tat-Transportapparat. So funktionieren Tat-Signalpeptide aus einem bestimmten Bakterium häufig (jedoch nicht immer) optimal nur mit der dazugehörigen Translokase und sind in einem fremden Organismus nicht

oder nur sehr unzureichend in der Lage, den Tat-abhängigen Membrantransport zu vermitteln. Die hierfür verantwortlichen Parameter auf Sequenz- bzw. Konformationsebene sind noch völlig unbekannt. Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Sekretionseffizienz der Tat-abhängigen heterologen Proteingewinnung ist daher die Optimierung der Passfähigkeit eines bestimmten Tat-Signalpeptids an den Exportapparat des eingesetzten Wirtssystems durch gerichtete Evolution. In Ausweitung der oben dargestellten Ergebnisse zur Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL unter Verwendung des *E. coli* TorA Signalpeptids wurde daher das TorA-Signalpeptid durch error-prone (EP)-PCR mutagenisiert und der so erhaltene Pool von Mutantensignalpeptiden vor den reifen Teil der Lipase GTL kloniert. Nach Transformation der entsprechenden so erhaltenen Plasmidbank in *C. glutamicum* wurden in einem ersten Ansatz 40 Klone, die Lipaseaktivität auf Tributyrin-Agarplatten zeigten, genauer charakterisiert und die Lipaseaktivität photometrisch mit para-Nitrophenylpalmitat als Substrat sowohl im Gesamtzellextrakt als auch im Kulturüberstand bestimmt. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass in diesem ersten Ansatz keiner der Klone eine signifikant erhöhte Menge an sekretierter Lipase im Kulturüberstand aufwies. Dies könnte bedeuten, dass das verwendete TorA Signalpeptid aus *E. coli* bereits über einen optimalen Fit zur Tat-Translokase von *C. glutamicum* verfügt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Anzahl der bislang analysierten Klone noch zu gering war und eine deutlich größere Zahl von Klonen (unter Einsatz von Robotern für die Enzymassays) getestet werden muss, um Varianten mit verbesserter Sekretionsfähigkeit zu identifizieren. Letzteres ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

4.1.2 Signalsequenz-trapping

Signalsequenz-trapping ist eine von Novozymes neu entwickelte Methode zur Identifizierung von Genen, die ein Signalpeptid (SP) enthalten. Dabei findet eine translationale Fusion des Signalpeptids mit einem extracytosolischen Reporter gen (ohne die eigene Signalsequenz) statt. Verwendbare Reporter sind die Proteine, die nur nach dem Membranentransfer aktiv sind, wie z.B. eine β -Lactamase in *E. coli* oder eine Invertase in *S. cerevisiae*. Zur Identifizierung von Genen von extracytosol-lokalisierten Proteinen wurde ein Minitransposon TnSig mit einem β -Lactamase-

Repotergen, ohne die Signalsequenz ('*bla*), konstruiert. *In vitro* wurde das Minitransposon für die Transposition von genomischen *E. coli* Bibliotheken benutzt. Das '*bla*-Gen wurde in ein Minitransposon des Bakteriophagens Mu kloniert um eine translationale Fusions zwischen '*bla* –Signalsequenz und den Zielgenen zu ermöglichen. Eine korrekte Integration von TnSig im korrekten Leserahmen führt zu einer Ampicillinresistenz des entsprechenden Klons. Die Mu-Transposition mit dem Enzym Transposase MuA ist leistungsfähig und genau. Es ermöglicht die zufällige Insertion in beliebige DNA und ist für den Gebrauch bei DNA-Sequenzierungen und Mutagenesen in den Handel gebracht worden (Finnzymes, OY). Die Genbibliotheken vom alkaliphilen Bakterium *Bacillus halodurans* C125 und vom hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 wurden mit dem TnSig bereits untersucht. Die öffentlichen Gensequenzen (EMBL:[BA000004](#) und EMBL:[AE006641](#)) wurden für eine schnelle ORF-Kennzeichnung und Vorhersage der Proteinlokalisierung in der Zelle verwendet. Gene für sekretierte Proteine, Transmembranproteine und Lipoproteine wurden erfolgreich gekennzeichnet (Becker, 2004). Im Gegensatz zu den früheren Transposon-basierenden Kennzeichnungsstrategien, ist die in der von Dr. Thomas Schäfer geleiteten Abteilung (Novozymes) neu entwickelte Methode schnell und vielseitig einsetzbar.

4.2 Klonierung der Lipasen

Die Klonierungsarbeiten der in diesem Projekt verwendeten Lipasen aus der psychrophilen Hefe *Mrakia gelida* und den thermophilen Bakterien *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis* und dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* wurden in der Arbeitsgruppen von Prof. Antranikian durchgeführt. Ein Sequenzvergleich der Lipase-codierenden Sequenzen zwischen den thermophilen Bakterien und der psychrophilen Hefe ergab, dass sich die Gensequenzen bis auf wenige konservierte Bereiche (Aktives Zentrum und Oxianionhole) in Länge und Basensequenz deutlich unterscheiden.

4.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* und *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis*

Die Lipasegene aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* und *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis* wurden zur Expression in *E. coli* in den Vektor pETBlue-1 kloniert. Die thermostabilen Lipasen wurden unter der Kontrolle des T7lac-Promotors intrazellulär exprimiert. Die rekombinanten Enzyme konnten durch eine hydrophobe Interaktions- und eine Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt und anschließend charakterisiert werden (siehe Abb. 3).

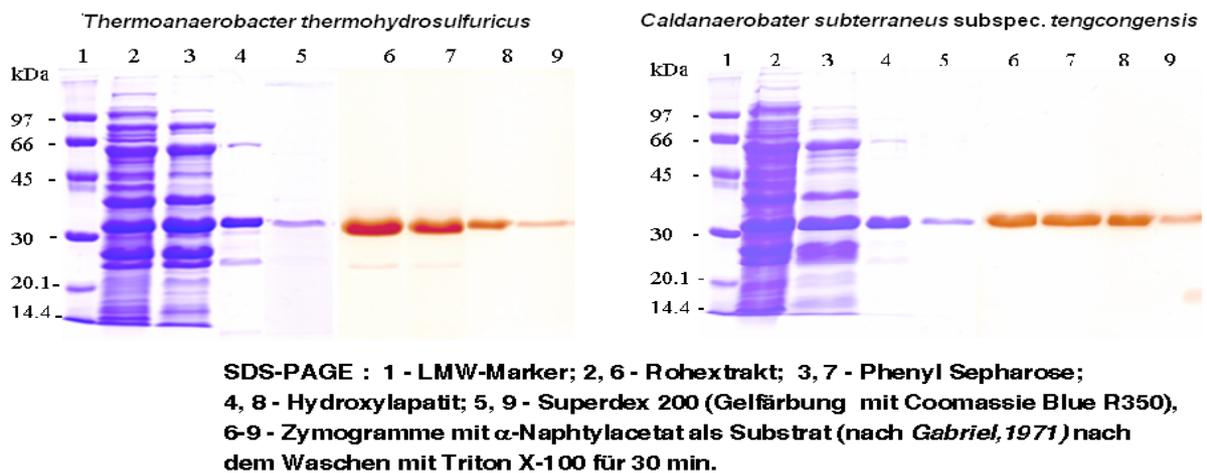


Abb.3: Reinigungsgele der rekombinanten Lipasen *T. thermohydrosulfuricus* und *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis*

Die aufgereinigten rekombinanten Enzyme besaßen ein Temperaturoptimum von 75°C. Die Lipase aus *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* war optimal aktiv bei einem pH-Wert von 7,0, die Lipasen aus *T. thermohydrosulfuricus* war optimal aktiv bei einem pH-Wert von 8,0. Bis zu einer Temperatur von 75°C waren die Lipasen sehr stabil. Beide Enzyme können als alkalische Lipasen bezeichnet werden, da sie bei der Inkubation in Lösungen mit hohen pH-Werten von 9,0 bis 11,0 stabil bleiben (siehe Abb. 4). Diese Eigenschaft ist sehr interessant und ermöglicht die Anwendung der Enzyme als Waschmittelzusatz.

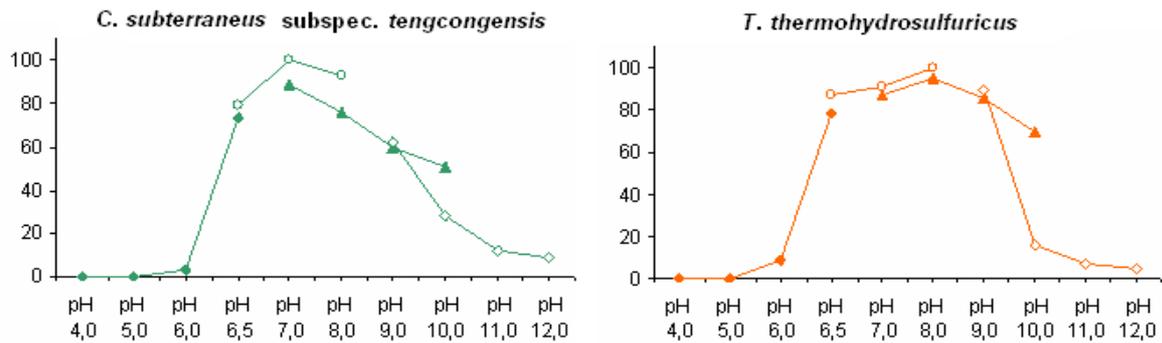


Abb.4: Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten vom pH-Wert. Dargestellt ist die relative Aktivität der Lipase in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Bestimmung der Lipaseaktivität wurden Substratlösungen mit *p*-NPP in 20 mM Puffern unterschiedlicher pH-Werte von 4 bis 12,0 angesetzt. Gemessen wurde die relative Aktivität gegen einen für jeden pH-Wert mitgeführten Blindwert.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität der Lipasen wurde festgestellt, dass die Enzyme Substrate mit einer mittleren Acylkettenlänge bevorzugten. Die höchste Aktivität im Test wurde mit *p*-NP-Caprato (C10:0) und Tricaprylin (C8:0) gemessen. Erstaunlich ist, dass keine Aktivitätsverluste bei Reaktionen in 99% Ethanol und 99% Isopropanol beobachtet wurden. Die Stabilität der rekombinanten Lipasen gegenüber Lösungsmitteln und die ebenfalls hohe Toleranz gegenüber Metallionen (siehe Abb. 5) sind gute Voraussetzungen für den Einsatz in industriellen Prozessen.

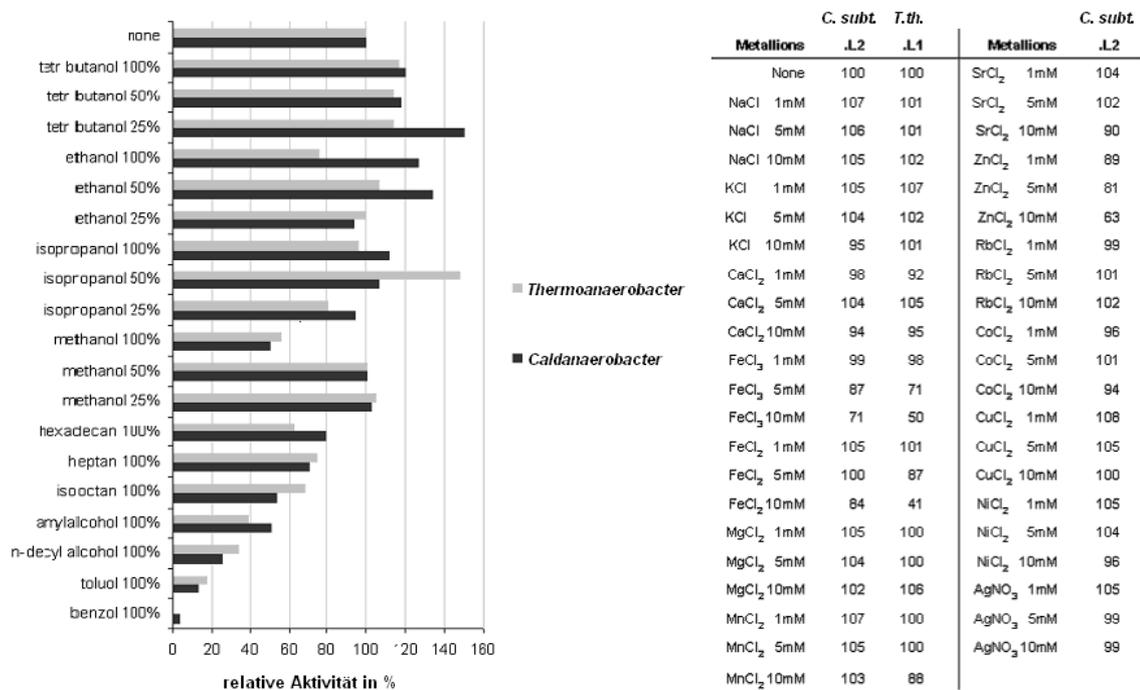


Abb.5: Dargestellt ist der Einfluss von Lösungsmitteln (Diagram) und von Metallsalzen (Tabelle) auf die Lipaseaktivität. Getestet wurde die Aktivität (mit *para*-Nitrophenylpalmitat) der rekombinant produzierten Enzyme aus *T. thermohydrosulfuricus* (*T. th.*= hellgrau) und *C. subterraneus subsp. tengcongensis* (*C. subt.* = dunkelgrau).

Die thermostabilen Lipasen aus *T. thermohydrosulfuricus* und *C. subterraneus subspec. tengcongensis* sind die ersten Lipase kodierenden Gene aus thermophilen anaeroben Bakterien, welche in *E. coli* in aktiver Form zur Expression gebracht werden konnten.

4.2.2 Expression der Lipasen in *Bacillus subtilis*

Zwei Stämme, *Bacillus sp.* NN018312 und *Bacillus sp.* NN017528, wurden für ein Signal-tagging ausgewählt. *Bacillus sp.* NN018312 ist ein marines-Isolat, das bei 26°C und pH 7,0 wächst. Bei ersten Screeningversuchen wurde eine Lipaseaktivität nachgewiesen. *Bacillus sp.* NN017528 ist ein thermoalkaliphiler Stamm, der bei 60°C und pH 10 wächst. Die beiden Stämme wurden nach der Signal-tagging-Methode untersucht. Bei der Untersuchung der Enzymsequenzen mit Signalsequenz, wurden vier Sequenzen von hypothetischen lipolytisch-aktiven Enzymen identifiziert. Die vier hypothetischen Lipasen aus den oben genannten *Bacillus sp.* und die Lipase aus *T. thermohydrosulfuricus* wurden bei Novozymes in *Bacillus subtilis* exprimiert. Die Lipase aus *T. thermohydrosulfuricus* wurde zuvor schon in der AG Antranikian in *E. coli* kloniert und exprimiert. Die vier Sequenzen aus *Bacillus sp.* besitzen eine eigene Signalsequenz (SignalP). Bei der Lipasesequenz aus *T. thermohydrosulfuricus* wurde keine Signalsequenz identifiziert, obwohl das Enzym aus *T. thermohydrosulfuricus* sekretiert wird.

Ein lineares Integrationsvektorsystem wurde für die Expression der klonierten Gene verwendet. Das lineare Integrationskonstrukt ist ein PCR-Fusionssprodukt, das durch die Fusion eines Gens zwischen zwei Regionen des *Bacillus subtilis*, mit einem starken Promoter und einer Chloramphenicol-Resistenz konstruiert wurde. Die Fusion wurde mittels einer „Splicing by Overlapping Extension PCR“ (SOE-PCR) gemacht (Horton *et al.*, 1989). Das abschließende Genkonstrukt wurde in *Bacillus subtilis* transformiert und mittels homologer Rekombination in das *Bacillus*-Chromosom integriert.

Alle fünf Gene wurden mit einem Sekretionssignal exprimiert, das von einer in hohem Grade sekretierten Protease stammt. Die ursprünglichen Signalepeptide wurden durch das Proteasesignalpeptid einschließlich der Schnittstellen ersetzt. Drei unterschiedliche Konstrukte wurde für das Lipasegen aus *T. thermohydrosulfuricus*, das kein eigenes Sekretionssignal enthält, erstellt: ein Konstrukt mit einem zusätzlichen Signal einer Protease, eines mit dem Signal einer Amylase und ein Konstrukt ohne zusätzliches Signal. Die jeweiligen Transformanden wurden überprüft und in Flüssigkulturen angezogen. Die Kulturüberstände wurden mittels einer SDS-Gel-Analyse auf rekombinante Proteine geprüft. Die Überstände wurden ebenfalls auf eine Lipaseaktivität getestet, dazu wurde ein spektralphotometrischer Assay *para*-Nitrophenyl-Palmitat (*p*-NPP) als Substrat durchgeführt und ein Punkttest auf Tributyrinplatten gemacht. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Konstrukte werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Ergebnisse der Expression der verschiedenen Lipase-Konstrukte.

Stamm	Gen	eigenes Signal	konstruiertes Signal	Rekombinantes Protein im SDS-Gel	Aktivität mit Tributyrin	Aktivität mit <i>p</i> -NPP
Bacillus NN018312	NP001012	ja	Protease	nein	-	-
Bacillus NN018312	NP001014	ja	Protease	nein	-	-
Bacillus NN018312	NP001015	ja	Protease	nein	-	-
Bacillus NN017528	NP001027	ja	Protease	ja (50-100 mg/l)	-	-
<i>T. thermohydr.</i>	NP001915	nein	Protease	ja (100 mg/l)	+	+
<i>T. thermohydr.</i>	NP001915	nein	Amylase	ja (100mg/l)	?	?
<i>T. thermohydr.</i>	NP001915	nein	ohne	ja (500mg/l)	+	+

4.2.3 Reinigung, Charakterisierung und Klonierung der kälte-aktiven Lipase aus *Mrakia gelida*

Die Wildtyp-Lipase aus der psychrophilen Hefe *Mrakia gelida* konnte erfolgreich isoliert und charakterisiert werden. Diese Lipase ließ sich in einem einzigen Schritt mit einer Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose vollständig reinigen. Die Lipase aus *M. gelida* besitzt ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Die Charakterisierung der Lipase ergab, dass eine maximale Aktivität bei 20°C und einem pH-Wert von 7,0 vorlag. Die spezifische Aktivität betrug 52 U/mg und die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für das Substrat *para*-Nitrophenylpalmitat bei optimalen Reaktionsbedingungen ergab $1,2-1,4 \cdot 10^{-4}$ M. Die Lipase aus *M. gelida* ist gegenüber Lyophilisierung und Einfrieren bei -80°C und -20°C stabil. Die Enzym zeigt bei der Temperaturabhängigkeit typische Merkmale eines psychrophilen Biokatalysators; bei 10°C ist noch eine Aktivität von über 60 % vorhanden, bei Temperaturen von über 25°C nahm die Lipaseaktivität jedoch deutlich ab (siehe Abb. 6).

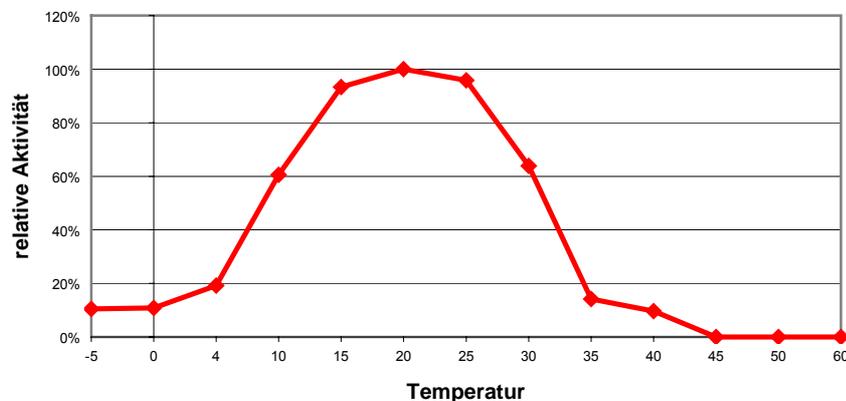


Abb.6: Aktivitätsprofil der Lipase aus *M. gelida* in Abhängigkeit von der Temperatur. Dargestellt ist die relative Aktivität der Lipase in Bezug auf die Reaktionstemperatur. Zur Messung der Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Temperatur wurden identische Reaktionsansätze bei unterschiedlichen Temperaturen von -5°C bis $+60^\circ\text{C}$ inkubiert. Testsubstrat war *p*-NPP und der pH-Wert betrug 7,0. Gemessen wurde die relative Aktivität gegen einen bei jeder Temperatur mitgeführten Blindwert.

Die Untersuchung des Substratspektrums der Lipase ergab eine deutliche Präferenz langkettiger Substrate (C_{14} - C_{18}), wobei die größte Aktivität mit *para*-Nitrophenylpalmitat (C_{16}) gemessen wurde. Bei der Hydrolyse von Triglyceriden konnte ebenfalls ein Vorzug langkettiger Substrate festgestellt werden. Die höchste Aktivität konnte

mit Olivenöl und Tripalmitin beobachtet werden. Die Lipase zeichnet sich gegenüber Inhibitoren (Ausnahme Iodoacetat) und organischen Lösungsmitteln durch eine hohe Robustheit aus, was sich bei der Verwendung in industriellen enzymatischen Umsetzungen als sehr vorteilhaft erweisen kann. Das hypothetische Lipasegen wurde in *E. coli* kloniert, jedoch konnte bisher keine aktive Expression einer Lipase erreicht werden.

4.2.4 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii*

Zur Expression der Lipase aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* sollte als Modell-Expressionssystem die eukaryotische Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt werden. Durch Verwendung dieses bereits gut etablierten Expressionssystems sollte die Möglichkeit geschaffen werden, neben Enzymen aus Prokaryoten auch Biokatalysatoren aus eukaryotischen Mikroorganismen effizient exprimieren zu können. Durch Verwendung von Expressionsvektoren mit einem eukaryotischen Sekretionssignal, z.B. der Vektor pPIC9, wird eine Sekretion des rekombinanten Biokatalysators in den Kulturüberstand erreicht. Da *P. pastoris* selbst nur wenige Proteine sekretiert, liegt das Enzym somit relativ rein vor. Als methylotrophe Hefe hat *P. pastoris* die Fähigkeit, mit Methanol als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Der erste Schritt im Methanolmetabolismus ist die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid durch das Enzym Alkoholoxidase. Die Alkoholoxidase besitzt einen sehr starken Promoter und wird daher in großen Mengen produziert. Dieser Promoter wird auch für die Expression des heterologen Enzyms verwendet. Der Alkoholoxidase-Promoter wird durch Methanol induziert. Methanol ist also gleichzeitig Substrat und Induktor. Das ist besonders kosteneffizient z.B. im Vergleich zu Systemen mit IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) als Induktor. Für eine hohe Expression ist insbesondere eine optimierte Methanolkonzentration ausschlaggebend, welche während der Fermentation konstant gehalten werden muss. Durch Etablierung einer kontinuierlichen Fermentation, in der der Biokatalysator unter Zurückhaltung der Hefe durch eine Filtrationseinheit gewonnen wird, sollte es möglich sein, die Produktausbeute deutlich zu verbessern.

Das Lipasegen aus *Anaerobranca gottschalkii* wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *NotI* in den pPIC9 Vektor kloniert (s. Abb. 7). Dabei wurde die Gensequenz der Lipase an der multiplen Klonierungsstelle gleichzeitig mit einem Signalpeptid (S, verantwortlich für die Ausschleusung der Lipase aus der Hefezelle) und einem Methanol-reguliertem Terminationspunkt (TT) versehen. Der pPIC9 Vektor ermöglicht das Screening von positiven (rekombinanten) *E. coli* Klonen durch eine vektorcodierte Ampicillin-Resistenz.

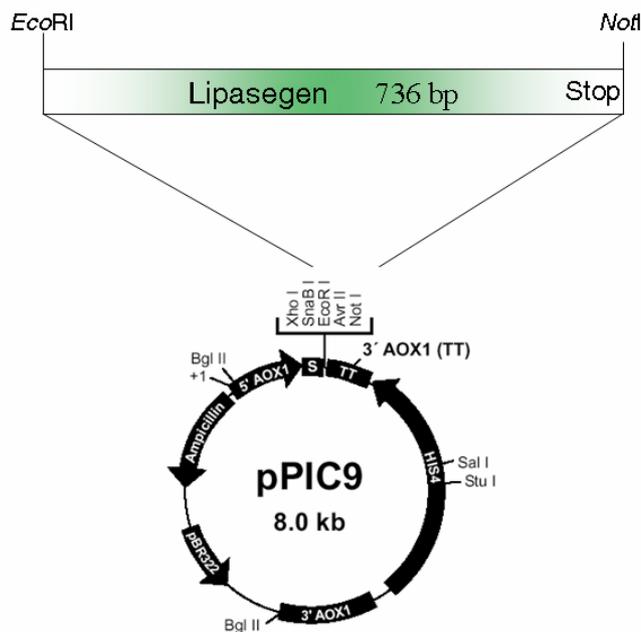


Abb.7: Integration des Lipasegens aus *Anaerobranca gottschalkii* in den pPIC9 Vektor.

Nach der Vervielfältigung der Vektoren in *E. coli* Zellen wurde der Vektor mittels Elektrotransformation in die *Pichia pastoris* Zellen eingebracht. Dort wurde das Lipasegen aus *Anaerobranca gottschalkii* samt Promotor (der Alkohol-Oxygenase AOX1) und Terminationssequenz mittels homologer Rekombination ins *his4*-Gen integriert (s. Abb. 8). Der verwendete *Pichia pastoris* Wirtstamm ist eine His^- Mutante, der die Aminosäure Histidin nicht synthetisieren kann. Durch die homologe Rekombination mit dem pPIC9/Lip Vektor am *his4* Gen erhält der rekombinante *Pichia*-Stamm wieder ein aktives *his4*-Gen, so dass die Mutation im Histidin-Syntheseweg aufgehoben wird. Rekombinante *Pichia pastoris* Zellen sind nach der Insertion des Vektors nicht länger Histidin negativ, da sie ein aktives *his4*-Gen und somit das für den Histidinsyntheseweg essentielle Genprodukt *HIS4* besitzen.

Das insertierte Lipase-Gen wurde durch den AOX1-Promotor der Alkohol-Oxygenase 1 reguliert und konnte durch die Fütterung der *Pichia pastoris* Kultur mit Methanol induziert werden.

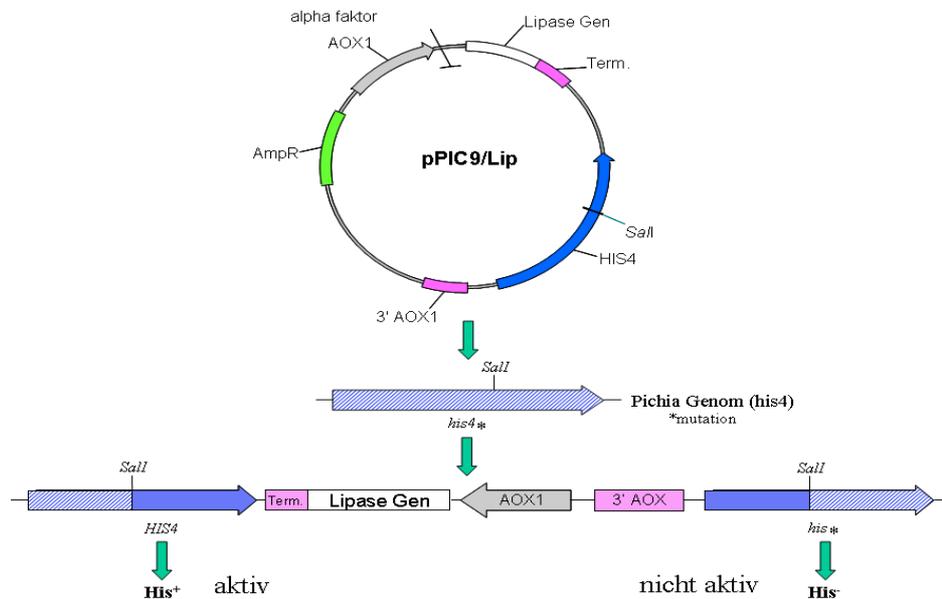


Abb.8: Lipase-Gen Insertion in das Genom von *Pichia pastoris* durch homologe Rekombination am his4 Gen.

Die Aufreinigung der rekombinanten Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* erfolgte über eine Ionenaustausch-Chromatographie und eine Gelfiltration. Zuvor wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mittels eines Ultrafiltrationsverfahren (Cross flow) 12,5 fach konzentriert.

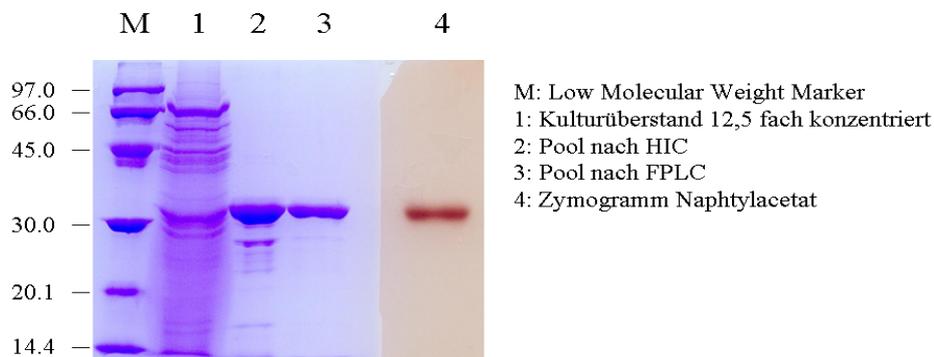


Abb.9: Reinigungsgel und Zymogramm der rekombinanten Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii*.

Die Charakterisierung der Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* wurde mit dem in *Pichia pastoris* rekombinant produzierten Enzym durchgeführt. Die rekombinante Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* besitzt ein Temperaturoptimum von 40°C und

ein pH-Optimum von 7,0. Hervorzuheben ist das breite Substratspektrum. Bei der Enzymreaktion mit *para*-Nitrophenylestern wurden Acylkettenlängen von C6 (Caproat) bis C18 (Stearat) mit nahezu gleichbleibender Aktivität abgespalten. Gegenüber Hemmstoffen, wie β -Mercaptoethanol, DTT und PMSF wurde keine Hemmung beobachtet.

4.2.5 Übersicht über die Klonierungsarbeiten

Die nachfolgende Tabelle dient als Ergänzung und soll eine kurze Übersicht über die durchgeführten Klonierungsarbeiten geben, genauere Angaben zur Klonierung und zur Charakterisierung der Lipasen wurden zuvor im Text gemacht.

Tab. 2: Klonierungsarbeiten.

Die Lipasen aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*, *Anaerobranca gottschalkii*, *Mrakia gelida* wurden kloniert. Die Charakterisierung der Lipasen beziehen sich auf das rekombinante Enzym, bei *M. gelida* hingegen auf das Wildtyp-Enzym. Die Substratspezifität wurde mit *para*-Nitrophenyl-Estern (*p*-NP-Ester) bestimmt, die Angabe der C-Atome bezieht sich auf die Kettenlänge des Esters. Die verwendeten Reinigungsmethoden sind wie folgt abgekürzt: HIC- Hydrophobe Interaktions Chromatographie, FPLC- Gelfiltration, H-AC- Heparinsepharose-Affinitätschromatographie,

	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>tengcongensis</i>	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	<i>Mrakia gelida</i>
T.-Optimum in C °	75	75	40	20
T.-Bereich aktiv (rel. Aktivität > 20%)	40-85	40-90	30-50	4-30
pH-Optimum	8	7	7	7
pH-Bereich aktiv	6,5-10	6,5-9,5	6-11	5-8
Substrat-Spektrum <i>p</i> NP-Estern	C4-C16, max. C8	C4-C16, max. C8	C6-C18, max. C6	C12-C18, max. C16
Substrat-Spektrum Triacylglyceride	C6, C8, C16 max. C8	C6, C8, C16 max. C8	C6, C8, C16 max. C6	C2-C18 max. C16
Verhalten gegenüber Hemmstoffen	robust	robust	robust	robust
Verhalten gegenüber Lösungsmitteln	stabil	stabil	stabil	stabil
Reinigung	HIC, FPLC	HIC, FPLC	HIC, FPLC	H-AC
Sequenziertes Lipasegen	ja	ja	ja	ja
Kloniert in / Expression	<i>E. coli</i> / ja	<i>E. coli</i> / ja	<i>P. pastoris</i> / ja	<i>E. coli</i> / nein
Charakterisierung nativ	ja	ja	nein	ja
Charakterisierung rekombinant	ja	ja	ja	nein

4.3 Dialysemembran und Fermentationsergebnisse

4.3.1 Membran- und Modulentwicklung

Die eingesetzte Membran sollte die Rückhaltung der Mikroorganismen bei gleichzeitiger Produktentfernung (Proteine) gewährleisten, d.h. die Membran musste für das gewünschte Enzym permeabel sein. Dabei müssen die Membran und ihre Einfassung in ihrer Materialbeschaffenheit resistent gegenüber den eingesetzten Mikroorganismen sowie den benötigten Chemikalien (pH-Wert) sein. Ihre Trenneigenschaften dürfen zudem während des kontinuierlichen Fermentationsprozesses sowie während der Reinigung mittels Dampfsterilisation nicht beeinträchtigt werden. Des Weiteren sind Wechselwirkungen, die zur Denaturierung oder Adsorption des Produktes an der Membran führen, unerwünscht und müssen vermieden werden. Für die Integration des Membranelementes in den Bioreaktor wurde ein geeignetes Membranmodul entwickelt und gebaut, wobei neben den technischen Randbedingungen, wie z.B. der im Reaktor zur Verfügung stehende Raum, auch die zum Betrieb der Membran notwendigen Prozessparameter zu berücksichtigen waren.

Außerdem sollten im Rahmen des Forschungsvorhabens geeignete Gegenmaßnahmen sowie entsprechende Prozessparameter zur Minimierung des Foulings auf der Membranoberfläche, in den Membranporen sowie der möglichen Adsorption von Proteinen, evaluiert werden. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Membran kontinuierlich aber auch effizient in Bezug auf die Permeatflussleistung im Bioreaktor betrieben werden konnte.

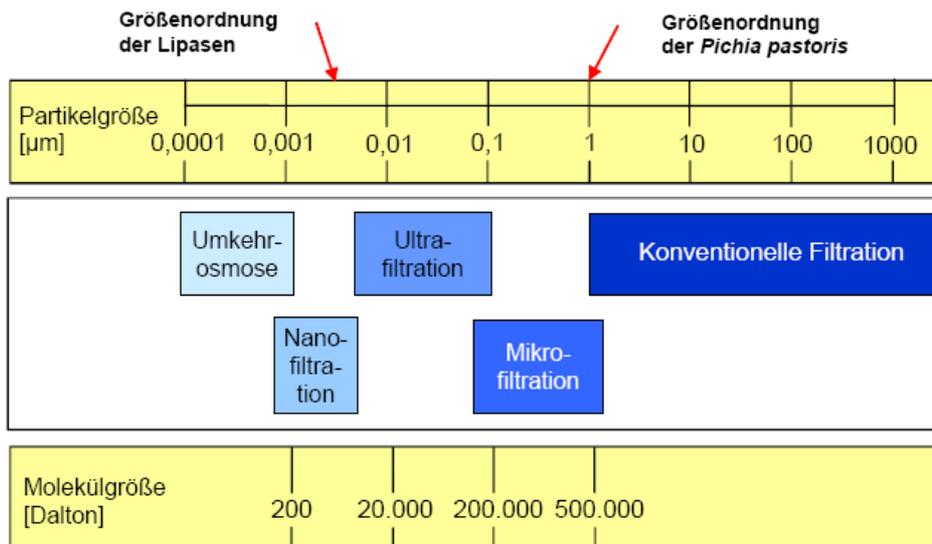


Abb.10: Spektrum druckbetriebener Filtrationsprozesse.

Zum Einsatz kamen neuentwickelte keramische Flachmembranen, die den Mikrofiltrationsmembranen zuzuordnen sind (Abb. 10). Aufgrund der Materialeigenschaften weist dieser Membrantyp eine hohe mechanische, chemische und thermische Stabilität auf. Er ist sowohl gegenüber Chemikalien als auch gegenüber hohen Temperaturen beständig und somit für den Einsatz in einem Fermenter besser geeignet als herkömmliche Polymermembranen.

Messungen zur Partikelgrößenverteilung sowie mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Hefezellen kugelförmig und im Durchschnitt ca. 3 bis 6 μm groß sind (Abb. 11).

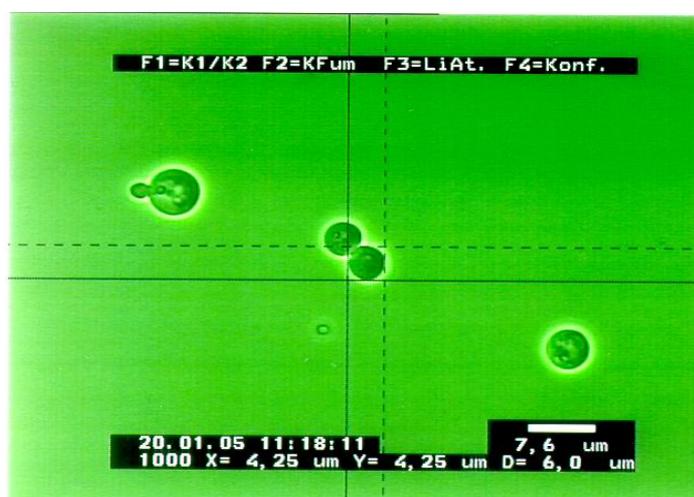


Abb.11: Lichtmikroskopische Aufnahme und Vermessung einer *Pichia*-Zelle.

4.3.2 Charakterisierung und Auswahl von geeigneten Mikrofiltrationsmembranen

Von der ItN Nanovation GmbH wurden Mikrofiltrationsmembranen mit verschiedenen Porengrößen zur Verfügung gestellt (Abb. 12), die charakterisiert und auf ihre Eignung für diese spezielle Trennaufgabe überprüft worden waren. Die Rückhalteeigenschaften einer Mikrofiltrationsmembran wird maßgeblich durch ihre Porengrößenverteilung bestimmt. Wünschenswert ist eine möglichst enge Verteilung, die gleichbedeutend mit einer scharfen Trenngrenze ist. Die Porengrößenverteilung wird mit Hilfe der Flow-Pore-Methode bestimmt, bei der durch das Durchströmen eines Gases durch eine trockene und eine mit Testflüssigkeit benetzten Membran die Porendurchmesser und ihre anteilmäßige Verteilung bestimmt werden. Bei dieser Methode wird auch der sogenannte Bubble-Point der Membran bestimmt, welcher dem Durchmesser der größten Membranpore entspricht. Dieser sollte kleiner als die zurückzuhaltenden Hefezellen sein, um einen vollständigen Rückhalt zu gewährleisten.



Abb.12: Eingesetzte Mehrkanalflachmembran.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Charakterisierung einer Membran stellt die Bestimmung der Reinwasserpermeabilität dar. Dieser Wert gibt die hydraulische Leistungsfähigkeit der Membran wieder, welche so hoch wie möglich sein sollte.

In der Tabelle 3 sind die wesentlichsten Ergebnisse der Charakterisierung der untersuchten Membranen dargestellt. Insgesamt wurden fünf verschiedene Membranen mit einer zu erwartenden mittleren Porengröße (nach Herstellerangaben) zwischen 200 – 800 nm untersucht. Dabei zeigte sich der Membrantyp Nr. 4 als bestmögliche Alternative für die angesprochene Trennaufgabe. Mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,19 μm und einer Wasserpermeabilität von 600 $\text{l}/(\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar})$ erwies sich diese Membran gerade gegenüber der ebenfalls untersuchten Membran Nr. 5 insofern als vorteilhafter, als dass sie eine wesentlich engere Porengrößenverteilung aufwies (Tab. 3). Der gemessene Bubble-point der Membran Nr. 5 lag bei etwa 5 μm , wodurch kein vollständiger Rückhalt aufgrund der abzutrennenden Größe der Hefezellen von 3 - 6 μm (vgl. Abb. 11) zu gewährleisten war.

Tab. 3: Charakterisierungsergebnisse der untersuchten Membranen (Herstellerangaben)

Nr.	Beschichtung	Bubble Point [μm]	Mittlerer Poren- \varnothing [μm]	Wasserpermeabilität [$\text{l}/(\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar})$]
1	200 nm	0,80	$\ll 0,07$	65
2	200 nm	0,89	$\ll 0,07$	110
3	300 nm	0,44	0,10	500
4	300 nm	0,81	0,19	600
5	800 nm	5,08	0,37	790

4.3.3 Modulentwicklung

4.3.3.1 Konstruktion der Module

Bei der Integration eines getauchten Membransystems in einen Bioreaktor spielt neben den Eigenschaften der Membran, insbesondere die Auswahl der eingesetzten Materialien für das Modul eine maßgebliche Rolle. Gerade im vorliegenden Fall mussten nicht nur die keramische Membran, sondern auch die Anschlüsse bzw. Abdichtungen so gewählt werden, dass eine Beständigkeit während der Sterilisation (durch Autoklavieren) gegeben ist. Während die Anschlüsse für das Modul in Edelstahl ausgeführt werden konnten, musste für die Verbindung zwischen Membran und Modul eine Verbindungstechnik mit einem geeigneten Kleber gefunden werden (Abb. 13).

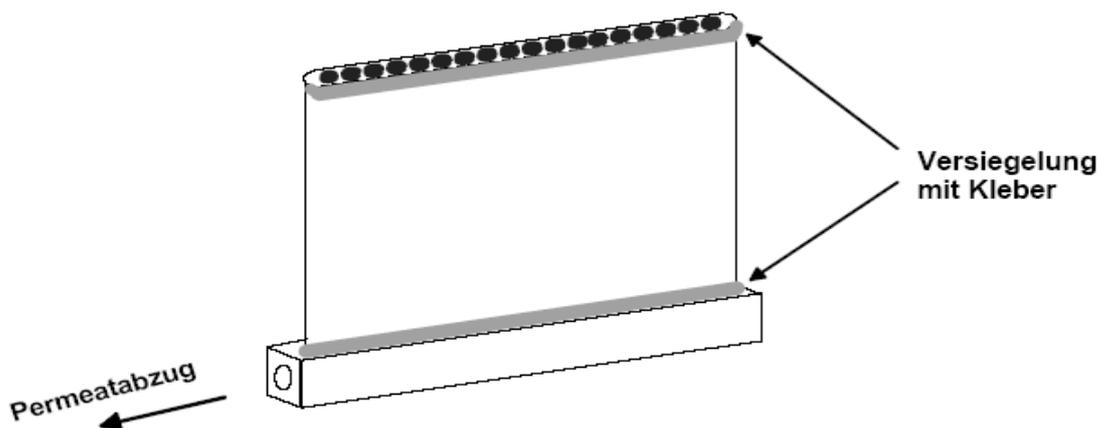


Abb.13: Geometrie der eingesetzten Mehrkanalfachmembran.

Insgesamt wurden zu diesem Zweck 15 verschiedene Kleber getestet und mittels Dampfsterilisation auf ihre Autoklavierfähigkeit überprüft. Eine Übersicht aller getesteten Kleber ist in nachfolgender Tabelle (Tab. 4) aufgelistet. Da ein dauerhafter Einsatz des Membranmoduls und eine mehrmals wiederholte Sterilisation gewährleistet werden sollte, wurde die Dichtigkeit der Verbindung durch Drucktests nach jeder Sterilisation überprüft. Aus den getesteten Kleber konnte letztendlich nur einer die gestellten Anforderungen (chemische und thermische Beständigkeit) zur vollsten Zufriedenheit erfüllen. Der Epoxidharz-Kleber (WEICON Fast-Metal) konnte als einziger eine stabile und dauerhafte Verbindung zwischen Keramik und Edelstahl herstellen. Er zeigte sich zudem druckstabil und beständig gegenüber den hier untersuchten Chemikalien, und verlor selbst nach mehrmaligen Autoklavieren nicht die geforderten Eigenschaften.

Tab. 4: Übersicht und Bewertung der untersuchten Kleber.

Kleber	Hauptbestandteile	Haftung zw. Keramik & Edelstahl	Beständigkeit gegenüber		
			121 °C	HCl (1 mol/l)	NaOH (1 mol/l)
Supracraft PUR 566.0	Polyurethan	--	--	-	-
Suprasil 594 N	Silikon (Oxym-System)	--	--	-	-
Suprasil 590 E	Silikon (Acetat-System)	--	--	-	-
Bylapox 3125 A+B	Epoxidharz	--	--	-	-
Atmosit compact	1-Komponenten-Silikon	+	+++	+++	+++
Araldit 2021	Methacrylat	+++	--	++	++
Araldit 2014	Epoxidharz	+++	-	++	++
Araldit XD 4510	Epoxidharz	++	-	+++	+++
Loctite 5910	Oxim-Silikon	--	--	-	-
UHU plus endfest 300	Epoxidharz	--	--	+	+
Hylosil	1-Komponenten-Silikon	-	+++	+++	+++
Scotch Weld 2216 B/A	mod. Polyurethan Härter: mod. Polyamin	++	--	+	+
WEICON-Epoxyd-Minutenkleber	Epoxydharz Härter: Polyaminoamid	+++	-	++	++
WEICON Konstruktionskleber RK 1300	2-Komponenten-kleber	-	++	+	+
WEICON-Fast-Metal	Epoxydharz Härter: Polyaminoamid	+++	+++	+++	+++

Legende:

- +++ sehr gut
- ++ gut
- + bedingt
- ungeeignet
- ungenügend

Die Konstruktion eines Membranmoduls hängt sehr stark von den konstruktiven Randbedingungen ab, wie Geometrie des Bioreaktors aber auch von der Anordnung von Einbauten, die für den eigentlichen Bioprozess notwendig sind (z.B. Begasungssysteme, Rührer, Sensorik etc.). Gleichfalls müssen membrantechnische Anforderungen, wie z. B. optimale Packungsdichte und Überströmung der Membran eingehalten werden.

Um die keramische Flachmembran variabel und unabhängig vom im Prozess eingesetzten Reaktortyp (Air-Liftreaktor oder Rührkesselreaktor) effektiv integrieren zu können, wurden zwei verschiedene Modultypen entwickelt. Diese Module wurden derart gebaut, dass je nach geforderten hydraulischem Durchsatz respektive Größe des Bioreaktors, die Membranfläche modular angepasst werden konnte. Das hier entwickelte Modul kann leicht in Rührkesselreaktoren integriert werden (Abb. 14). Die um 90° versetzte Anordnung der Membranen stellt sicher, dass zum Einen die Membran optimal überströmt wird, aber auch zum Anderen, dass der im Bioreaktor zur Verfügung stehende Raum optimal ausgenutzt wird (Packungsdichte). Ebenso kann das Modul je nach Anforderung zusätzlich mit strömungsführenden Elementen ausgestattet werden, die den Effekt der Überströmung erhöhen.

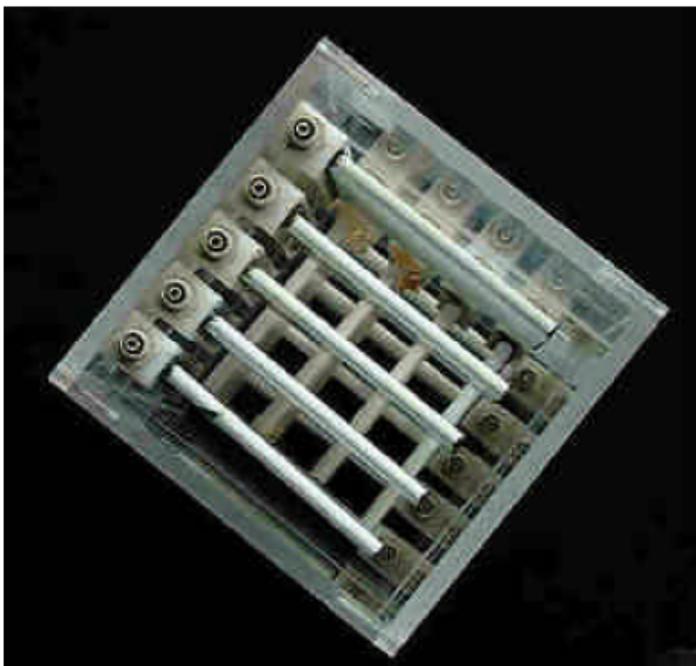


Abb.14: Modul mit um 90° versetzter Anordnung der Membranen.

Eine weitere hier entwickelte Modulvariante stellt das Modul mit radial angeordneten Flachmembranen dar. Dieses Modul eignet sich besonders zum Einbau in sehr schlanke Bioreaktoren (z. B. Air-Liftreaktoren) bzw. auch in Reaktoren in denen nur sehr wenig Raum zum Einbau des Moduls zur Verfügung steht (Abb. 15).

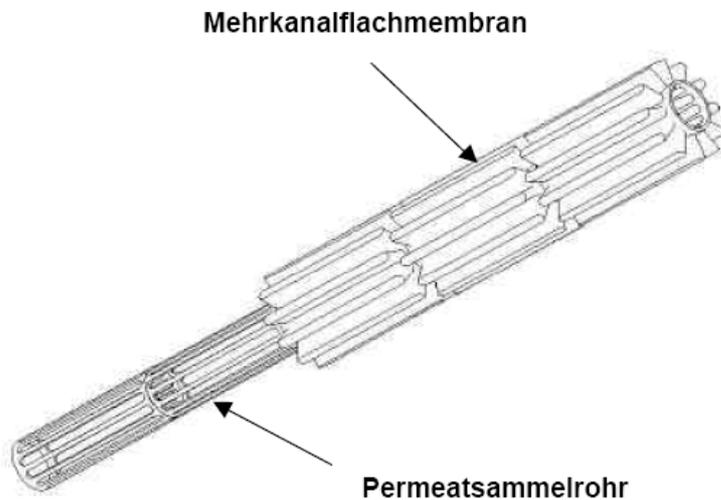


Abb.15: Modul mit radialer Anordnung der Membranen (Rippberger, 1992).

4.3.3.2 Laboruntersuchungen zum Membranfouling

Zetapotentialmessung

Die adsorptiven Wechselwirkungen von Inhaltsstoffen des zu filtrierenden Mediums mit der Membran sind häufig die Ursache von Membranfouling infolgedessen der Permeatfluss mit zunehmender Filtrationszeit sehr stark abnimmt (Sonnenberger *et al.*, 2003). So fördern Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen die Adsorption, während gleichnamig elektrostatische Ladungen hemmend wirken. Um mögliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten Hefen und der ausgewählten Membran Nr. 4 zu erfassen, wurde das Zetapotential der Hefe (*Pichia pastoris*) aber auch der keramischen Membran über einen größeren pH-Bereich bestimmt.

Die Abbildung 16 zeigt die gemessenen Zetapotenziale für die keramische Membran und der eingesetzten Hefe. Wie deutlich wird, liegen gerade in dem für den Fermentationsprozess relevanten pH-Bereich (5 - 6) die gemessenen Potenziale

beider untersuchten Oberflächen im gleichen Bereich von ca. -10 mV. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass durch die gleichgerichtete Oberflächenladung und der damit verbundenen gegenseitigen Abstoßung, eine geringere Foulingneigung der Membran bei der Filtration der Hefe resultiert.

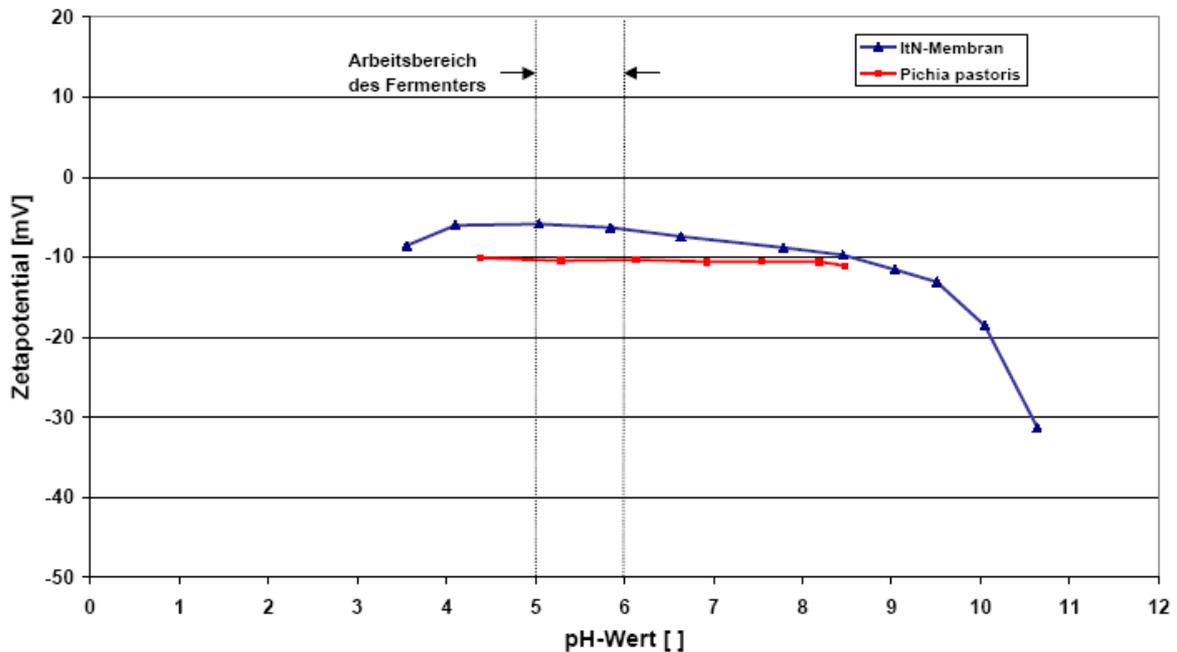


Abb.16: Zetapotentiale der Hefe und der Membran Nr.4.

Rückhaltevermögen der ausgesuchten Membran

Aufbauend auf den Voruntersuchungen zur Auswahl der geeigneten Membran, wurden anschließend Filtrationsversuche im Labormaßstab unter annähernd realen Bedingungen durchgeführt, um das Rückhaltevermögen gegenüber den Hefezellen aber auch die (gewollte) Durchlässigkeit der Proteine zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde ein Filtrationsstand bestehend aus einem Bioreaktor und dem für die Filtration notwendigen Equipment (Pumpen, Druckaufnehmer etc.) aufgebaut. Die Membran wurde in den Bioreaktor getaucht und das Permeat über eine Schlauchpumpe abgezogen. Der sich einstellende Permeatfluss der Membran wurde gravimetrisch über eine Waage gemessen und in Abhängigkeit der Filtrationsdauer bestimmt. Durch gleichzeitige online-Aufzeichnung der transmembranen Druckdifferenz konnte die Permeabilität $[l/(m^2 \cdot h \cdot bar)]$ der Membran ermittelt werden.

Heferückhalt

In ersten Untersuchungsreihen wurde zunächst der Rückhalt der Hefezellen mit der ausgewählten Membran (Nr. 4 vgl. Tab. 3) bestimmt. Hierfür mussten die Hefen in mehreren Schüttelflaschen aufgezogen werden, um ein ausreichendes Kulturvolumen für die Filtrationsversuche zu erhalten. Die Biomassekonzentration (WCW) im Bioreaktor der Versuchsanlage wurde in fünf aufeinanderfolgenden Versuchsreihen stetig erhöht.

Während die ersten Versuche bis zu einer Biomassekonzentration von 40 g/l mit einem Wildstamm von *Pichia pastoris* erfolgten, wurden die Konzentrationen oberhalb von 40 g/l bis 255 g/l mit handelsüblicher Backhefe simuliert. Die Überprüfung der Integrität der Membran erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) des Permeats und wurde sowohl über die rheologische Bestimmung der Viskoelastizität (Zhang *et al.*, 2000) als auch über eine mikroskopische Untersuchung verifiziert. In dem genannten Untersuchungsbereich bis 255 g/l (WCW) konnte bei der ausgewählten Membran Nr. 4 kein Unterschied im Rückhaltevermögen festgestellt werden. Der Rückhalt lag unabhängig von der Biomassekonzentration im Reaktor stets im Bereich von größer 99,9 % und kann somit als vollständig bezeichnet werden (Tab. 5, Abb. 17).

Tab. 5: Rückhaltung der Hefezellen bei unterschiedlicher Biomassekonzentration gemessen in OD (optische Dichte bei 600 nm).

Versuch Nr.	Konzentration WCW [g/l]	OD ₆₀₀ Reaktor	OD ₆₀₀ Permeat	Rückhalt [%]
1	23	7	0,003	99,96
2	44	21	0,006	99,97
3	82	32	0,010	99,97
4	177	90	0,012	99,99
5	255	141	0,021	99,99

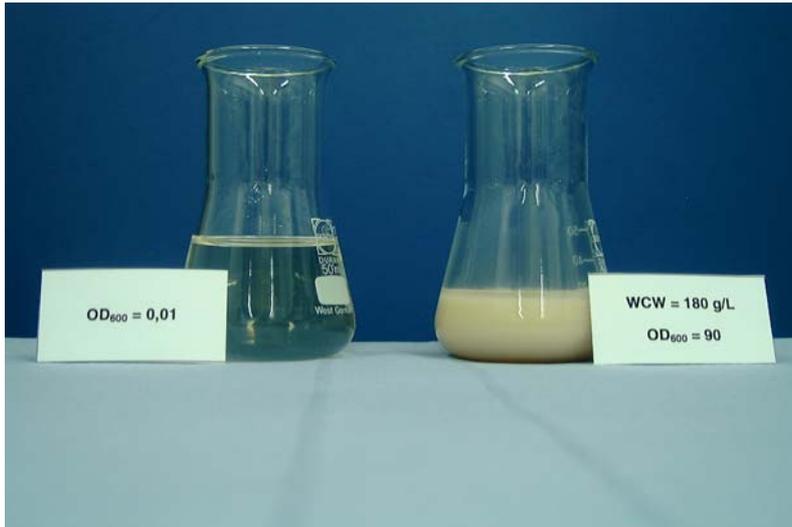


Abb.17: Optische Überprüfung der Permeatqualität (Versuch Nr.4 vgl. Tab.5).

Rückhaltung der Proteine

Um eine mögliche Adsorption des zu isolierenden Enzyms an der ausgesuchten keramischen Membran und somit auch die Durchlässigkeit der Membran für das Enzym zu bestimmen, wurden Filtrationsversuche mit einer Modell-Lipase (Lipolase von Novozymes) bei unterschiedlichen pH-Werten vorgenommen. Dabei wurde eine definierte Menge einer Lipase in einen Behälter gegeben und mittels der keramischen Membran über einen längeren Zeitraum filtriert. In regelmäßigen Abständen wurden zeitgleich Proben aus dem Behälter und dem Permeat entnommen und deren Proteingehalt verglichen. Die Versuche wurden für gleiche Konzentrationen bei pH = 4 und pH = 7 durchgeführt. Für den analytischen Nachweis der Lipolase wurde der BCA-Standardtest herangezogen.

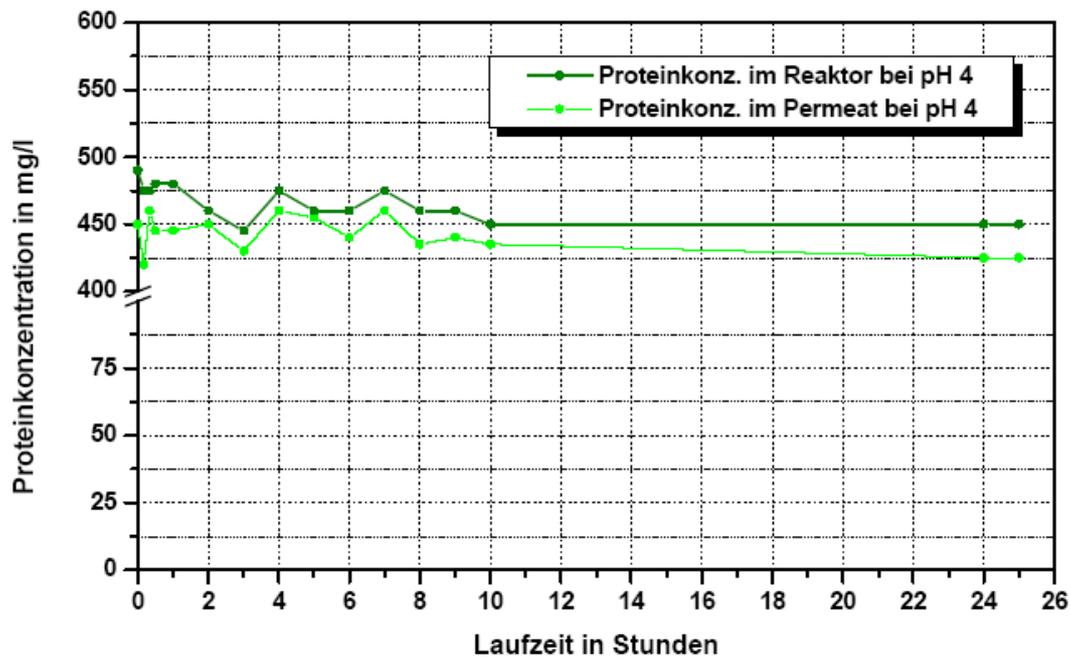


Abb.18: Proteinkonzentration im Bioreaktor bzw. im Permeat bei Filtration einer Lipaselösung (pH 4) mit der Membran Nr. 4.

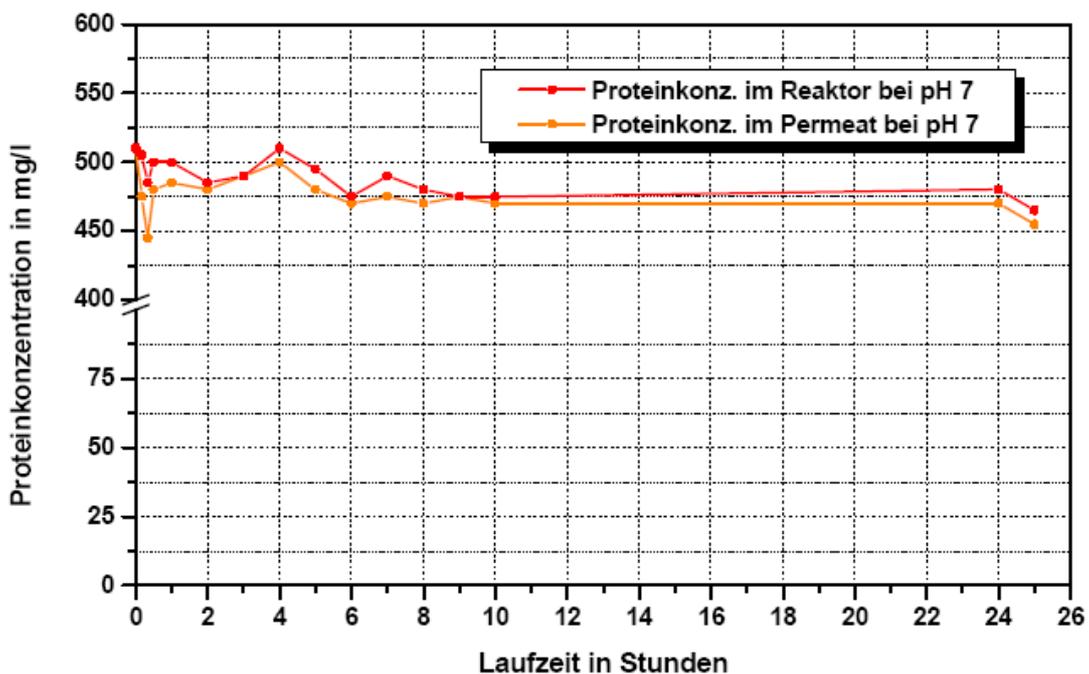


Abb.19: Proteinkonzentration im Bioreaktor bzw. im Permeat bei Filtration einer Lipaselösung (pH 7) mit der Membran Nr. 4.

Wie Abb. 18 und 19 verdeutlichen, konnte bei beiden Versuchen kein wesentlicher Rückhalt der Lipolase durch die Membran nachgewiesen werden. Dieser lag konstant über den Filtrationszeitraum im Bereich von < 2 %, wodurch die Adsorption und andere Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der ausgesuchten Membran ausgeschlossen werden konnten.

4.3.4 Optimierung der Betriebsweise der Membran

Beim Betrieb von Mikrofiltrationsmembranen hat neben der Adsorption auch die Bildung einer Deckschicht einen wesentlichen Einfluss auf die hydraulische Leistungsfähigkeit. Um diese Deckschichtbildung zu kontrollieren und somit einen kontinuierlichen und hohen Permeatfluss der Membran sicherzustellen, muss die Art der Überströmung und/oder die Betriebsweise der Membran (mit zyklischer Rückspülung oder mit zyklischen Pausenzeiten) optimiert werden.

Zunächst wurde die Betriebsweise der Membran mit zyklischen Pausenzeiten untersucht. Diese Betriebsweise hat gegenüber dem Betrieb der Membran „mit zyklischer Rückspülung“ den entscheidenden Vorteil, dass rückgespültes Permeat nicht wiederfiltriert werden muss, womit also der Netto-Permeatfluss der Membran deutlich gesteigert werden kann.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich ist, haben die Pausenzeiten einen erheblichen positiven Einfluss auf den Verlauf des Permeatflusses. Nachdem zunächst mit der Membran nur filtriert wurde - also Betrieb ohne Gegenmaßnahme zur Deckschichtkontrolle - und der Permeatfluss (bei konstantem Transmembrandruck) um mehr als 50 % abfiel, wurde anschließend die Membran mit zyklischer Pausenzeit betrieben. Der Filtrationsfluss stieg nach der Pausenzeit kurzfristig um das Vierfache an, bevor sich wieder ein stabiler Wert von etwa $100 \text{ l}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ einstellte. Abbildung 20 zeigt ebenfalls, dass die Dauer der Pausenzeiten einen Einfluss auf den Filtrationsbetrieb hat. Im Rahmen des dargestellten Langzeitversuches wurden unterschiedlich lange Pausenzeiten eingestellt. Die Pausenzeit (nach jeweils 30 min Filtrationszeit) wurde dabei von anfangs 5 Minuten bis auf zuletzt 30 Sekunden verkürzt. Wie Abbildung 20 verdeutlicht, muss die Filtration für mindestens 3 Minuten unterbrochen werden, um die Deckschicht weitestgehend von der Membranoberfläche abzutragen, und sich daraus eine erhebliche Verbesserung des Permeatflusses ergibt. Dieser positive Effekt der erfolgreichen Deckschichtkontrolle wurde in der Literatur für den Cross-Flow-Betrieb (Cregg *et al.*, 2000) mehrfach beschrieben und ist darauf zurückzuführen, dass die erzeugten Scherkräfte durch Permeationspausen (d. h. durch Stoppen des Filtrationsbetriebes) noch verstärkt werden, da der konvektive Stofftransport an die Membran unterbrochen wird. Hierdurch können die durch den Rührer erzeugten Scherkräfte zum Abtrag der sich bildenden Deckschicht an der Membranoberfläche genutzt werden.

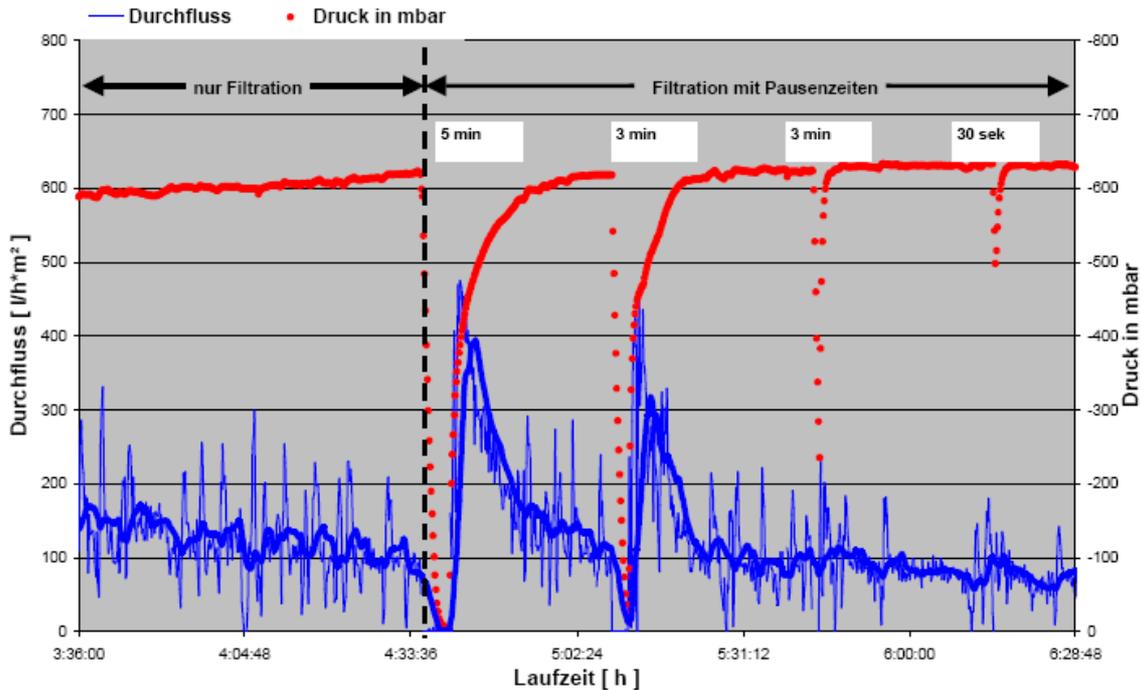


Abb.20: Filtrationsversuch zur Ermittlung der bestmöglichen Betriebsweise der Membran.

In weiteren Versuchsreihen wurde die Wirkung der Überströmung (impliziert durch den im Bioreaktor eingebauten Rührer) und der damit gleichzeitig erzeugten Überströmung der Membran in Verbindung mit den optimierten Pausenzeiten untersucht. Es zeigte sich, dass die für den Fermentationsprozess notwendige Mindest-Durchmischung und die dadurch schon vorliegenden hochturbulenten Strömungsverhältnisse im Bioreaktor bereits eine optimale Überströmung der Membran (maximale Scherkräfte) gewährleistet. Versuche bei deutlich geringeren Durchmischungsverhältnissen im Bioreaktor (Rührerdrehzahl um Faktor 15 kleiner als für den Fermentationsprozess benötigt) zeigten, dass kein negativer Einfluss auf die hydraulische Leistungsfähigkeit der Membran zu verzeichnen war.

Eine Überprüfung der Membran, die mit den evaluierten optimalen Einstellungen in einem Langzeitversuch betrieben wurde, zeigte, dass zumindest optisch keine wesentliche Deckschichtbildung auf der Membranoberfläche erkennbar war. Weiterhin wies die Membran erwartungsgemäß keine Verfärbung durch das sogenannte Biofouling auf, was auf die Abwesenheit von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) zurückzuführen war (Abb. 21). Diese Ausscheidungen von Mikroorganismen auf benetzten Oberflächen findet bei Hefen nicht statt.



Abb.21: optische Überprüfung einer Membran nach einem Langzeitversuch (Filtrationszeit 30 min; zyklische Pausenzeit 3 min).

Alternativkonzept zur Flachmembran

Wie sich bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte, waren die erarbeiteten Modulkonzepte - basierend auf dem Einsatz der keramischen Flachmembran – nur für Fermentergrößen ab ca. 3-L Arbeitsvolumen geeignet. Es ist aufgrund der Abmessungen der Flachmembran und der dazugehörigen Einbauten nicht möglich ein geeignetes Modul in sehr kleine Fermenter (< 3-L) technisch sinnvoll zu integrieren.

Zweckmäßigerweise wurde aus diesem Grund vorgesehen, die Flachmembran durch eine Monokanalmembran zu ersetzen (Abb. 22). Diese wurde auf Basis der vorher gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls von der ItN Nanovation GmbH hergestellt. Die Monokanalmembran wurde aus dem gleichen Ausgangsmaterial (Al_2O_3) wie die zuvor eingesetzte Mehrkanalflachmembran gefertigt und weist auch die gleiche Charakteristika in Bezug auf die Trenneigenschaften auf.



Abb.22: Eingesetzte Monokanalmembran.

Die stabile Verbindung zwischen der Keramikmembran und den Edelstahlanschlüssen wurde ebenso wie bei den Mehrkanalflachmembranen mit dem Epoxidharzkleber (Weicon Fast-Metal) garantiert. Die Befestigung der Monokanalmembran kann grundsätzlich über den Deckel oder den Boden des Fermenters erfolgen, die mit jeweiligen Anschlussmöglichkeiten versehen sind. Aus Gründen der Stabilität wurde entschieden, die Membran am Boden der Laborfermenters zu befestigen (Abb. 23).

In ersten orientierenden Versuchen mit einem Laborfermenter (1-L Arbeitsvolumen) bewährte sich der Einsatz der Monokanalmembran und die gewählte Anordnung im Fermenter unter realen Betriebsbedingungen. Die Biomasse konnte bei diesen Versuchen vollständig zurückgehalten werden (Abb. 24).



Abb.23: Installierte Monokanalmembran in einem Laborfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 1-L.



Abb.24: Vergleich der feststofffreien, filtrierten Lösung und der Biomasse.

4.4 Fermentation von *Pichia pastoris* zu Produktion der rekombinanten Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii*

Die Anzucht von *Pichia pastoris* im Fermenter zur Produktion der rekombinanten Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* wurde etabliert und optimiert (Abb. 25 A). Aus dem Kulturmedium einer batch-Fermentation konnte bereits die rekombinante Lipase gereinigt werden. Um längere Fermentationszeiten mit kontinuierlichem Produktabfluss und gleichzeitigem Medienzufluss zu ermöglichen und somit Produktion der Lipase effizienter zu gestalten, wurden neue Membranen und Membranmodule entwickelt.

Eine keramische Mehrkanal-Flachmembran wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Antranikian in enger Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH (Prof. Chmiel) in einen Dialyse-Folienfermenter eingebaut (Abb. 25 B) und Fermentations- und Optimierungsversuche durchgeführt.

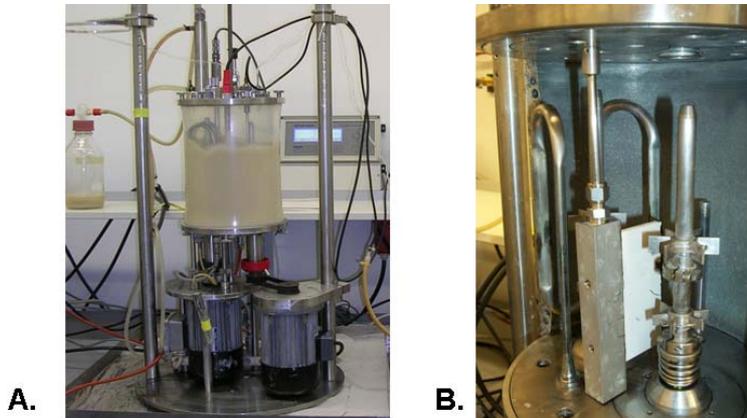


Abb.25: Dialyse Folienfermenter 10-L mit integrierter Membran.
A. Dialyse-Folienfermenter. B. Die mittig im Fermenter eingebaute keramische Mehrkanal-Flachmembran.

Da die Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* in *Pichia pastoris* wider Erwarten hauptsächlich zellgebunden vorlag und nicht extrazellulär, eignete sich dieses System nicht für die geplanten Fermentationsversuche. Die zuerst erhaltenen Aktivitäten im Überstand, waren vermutlich auf die Lyse einzelner Zellen und dem daraus resultierenden Ablösen der Lipase von der Zellwand zurückzuführen.

Für weitere Fermentationen wurde der thermophile, anaerobe Stamm *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *brockii* ausgewählt, da dieser eine extrazelluläre Lipase produziert. Im folgenden Diagramm (Abb. 26) sind das Wachstum von *T. brockii* subsp. *brockii* und die Lipaseproduktion, bzw. die Aktivität im Kulturüberstand dargestellt.

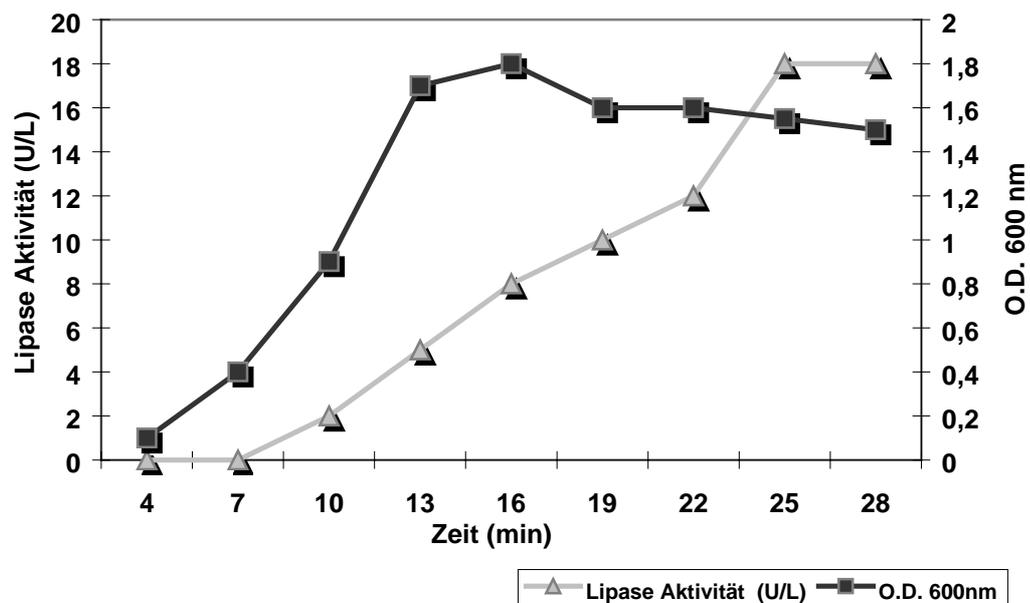


Abb.26: Fermentationsversuche mit *T. brockii* subsp. *brockii*.
 Untersucht wurde die Produktion der extrazellulären Lipase aus *T. brockii* subsp. *brockii* über den Verlauf der Zeit. Dargestellt ist die Optische Dichte der Kultur (O.D. 600 nm) und die Lipase-Aktivität (U/L) des Kultur-überstandes.

Mit Hilfe der in den Fermenter integrierten Dialysemembran wurde die Lipase aus *T. brockii* subsp. *brockii* aus dem Produktionsprozess entnommen.

Tab. 6: Filtrationsergebnisse.

	Überstand	Permeat	% Verlust
Lipase Aktivität U/L	18	14,5	20
Protein Konz. g/L	65	34	47

Einige wenige *T. brockii*-Zellen wurden im Permeat mikroskopisch nachgewiesen, was in der Porengröße der Membran begründet ist. Die Membranen wurden ursprünglich für den Gebrauch mit deutlich größeren Hefezellen konstruiert und optimiert. Hefezellen (*P. pastoris* und *S. cerevisiae*) konnten zu 99,9% zurückgehalten werden (vgl. Tab. 5, Abb. 17). Der Verlust der Lipase über die Membran betrug 20% (Tab. 6). Durch weitere Fermentationsoptimierungen, wie z.B. an angepasste Pausenzeiten oder Rückspülsteuerungen zur Vermeidung einer Deckschicht und dem daraus resultierenden Blocken der Membran, könnte hier sicherlich ein geringerer Wert erreicht werden. Versuche mit der Lipolase von Novozymes zeigten in vorhergehenden Versuchen deutlich geringere Verluste (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

5 Diskussion

5.1 Soll-/Ist-Vergleich

Im vorliegenden Projektverlauf konnten alle wichtigen Ziele des Projektantrags erreicht werden. Hervorzuheben war die stark ausgeprägte Zusammenarbeit und der Erfahrungsaustausch zwischen den beteiligten Projektpartnern. Innerhalb des stark interdisziplinären Projekts fand ein reger und konstruktiver Austausch von Expertisen und Ergebnissen statt.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Freudl konnte durch die Fusion eines Lipasegens aus *Geobacillus thermoleovorans* (GTL-Lipase) an ein Sec- und überraschender Weise auch an ein Tat-spezifisches Signalpeptid eine gesteigerte Exporteffizienz erreicht werden. Durch die Verwendung eines weiteren Produktionswirts, *Corynebacterium glutamicum* konnte nahezu eine Verdoppelung der Ausbeuten im Vergleich zur Expression in *Staphylococcus carnosus* erzielt werden. Die Expression und Sekretion der rekombinanten Lipasen konnte durch die Konstruktion neuer Systeme deutlich gesteigert werden (AP-10). Für die TSL-Lipase aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* konnte noch keine Erhöhung der Ausbeuten von aktivem Enzym festgestellt werden. Vermutlich wird das Protein durch die Addition eines Signalpeptid falsch gefaltet und in inaktiver Form exprimiert. Zum Nachweis der rekombinanten Fusionslipasen der Lipase TSL werden z. Z. Antikörperversuche durchgeführt, die wertvolle Hinweise auf die Ursache der Falschfaltung geben können.

Die Klonierung der Lipasen aus extremophilen Organismen in der Arbeitsgruppe von Prof. Antranikian ist weitestgehend abgeschlossen (AP-1,2,6,7). Die Lipase aus den thermophilen Organismen *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* und *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis* konnten mit dem pETBlue-1 Expressionssystem erfolgreich in *E. coli* rekombinant produziert werden. Eine Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* konnte mit dem *Pichia pastoris* Expressionssystem rekombinant in großen Mengen im Fermenter hergestellt werden. Die Lipase lag jedoch nicht extrazellulär vor, sondern war größtenteils Membrangebunden. Die Ursache hierfür ist sicherlich in der Proteinstruktur der rekombinanten Lipase begründet, vermutlich lag eine sterische Hinderung vor, die ein vollständiges

Ausschleusen aus der Zelle verhinderte. Versuche, die Lipase mit Hilfe von Detergenzien von der Membran abzulösen, scheiterten vermutlich aus dem selben Grund. Die gemessenen Lipase-Aktivitäten im Kulturüberstand sind daher als Produkte der Zellyse zu betrachten und eher als nebensächlich zu bewerten.

Die Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme wurde vollständig abgeschlossen. Die rekombinanten Lipasen aus *T. thermohydrosulfuricus* und *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* zeichnen sich durch eine hohe Temperaturstabilität und hohe Temperaturoptima aus. Außerdem sind sie auch im alkalischen Milieu noch aktiv und sehr beständig gegenüber Lösungsmitteln, Detergenzien, Metallsalzen und anderen Inhibitoren, so dass sie für industrielle Prozesse vielfältig eingesetzt werden können.

Eine kälte-aktive Lipase aus der psychophilen Hefe *M. gelida* wurde in *E. coli* kloniert, konnte jedoch nicht zur Expression gebracht werden. Die Wildtyp-Lipase konnte jedoch durch einen einzigen Schritt aufgereinigt werden und wurde vollständig charakterisiert. Die Enzymeigenschaften, besonders die hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen, können für wirtschaftliche Anwendungen in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie von großem Interesse sein. Weitere Experimente zur Klonierung eines Lipasegens aus *Mrakia gelida* sind geplant. Eine cDNA-Genbank könnte zu einer erfolgreichen Klonierung des Gens der psychophilen Lipase führen. Sollte die Enzymproduktion im *E. coli* Expressionssystem nicht erfolgreich sein, d.h. kein aktives Enzym expremiert werden, steht für weitere Expressionsversuche das bereits gut etablierte *P. pastoris* Expressionssystem zur Verfügung. Die innerhalb des Projektes optimierten Membranen- und Membranmodule sowie die gemachten Fermentationserfahrungen stehen dann bereits für die Produktion dieser Lipase im großen Maßstab zur Verfügung.

Die keramischen Mehrkanal-Flachmembranen wurden erfolgreich konstruiert und sind einsatzfähig für den täglichen Gebrauch im Fermenter. Ebenso wurden Membranmodule gefertigt, die für den Einsatz in größerem Maßstab verwendet werden können, so dass einem scale-up bis hin zum industriellen Maßstab nichts im Wege steht (AP- 11,12,15). Die Optimierung der Membran durch den Projektpartner

ItN Nanovation GmbH ist ebenso abgeschlossen wie die Charakterisierung der Membran – mit Hilfe von Proteinlösungen vom Projektpartner Novozymes - durch die Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH (AG Prof. Chmiel). Eine effiziente Reinigung der Membran zur Vermeidung von Fouling während der Fermentation konnte durch dreiminütige Pausenzeiten erreicht werden.

Die keramische Mehrkanal-Flachmembran ist durch gemeinsam durchgeführte Arbeiten der Arbeitsgruppen von Prof. Antranikian und Prof. Chmiel erfolgreich in einen Dialysefermenter integriert worden (AP-13,14), so dass alle Grundlagen für die letzten Arbeitspakete (AP-16,17) bereits geschaffen wurden. Da die rekombinante Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* in *Pichia pastoris* wider Erwarten membrangebunden vorlag, musste ein anderer Organismus gefunden werden, der eine extrazelluläre Lipase produziert. Der thermophile, anaerobe Stamm *Thermoanaerobacter brockii* sp. *brockii*, der als Produzent einer extrazellulären Lipase in der Arbeitsgruppe von Prof. Antranikian bereits bekannt war, wurde daher für die Lipaseproduktion im Dialyse-Fermenter ausgewählt. Obwohl die keramische Flachmembran ursprünglich für die Fermentation mit *Pichia pastoris*, einer Hefe, konstruiert wurde, funktionierte der Abzug der Lipase aus dem Fermenter während einer laufenden Fermentation mit *T. brockii* sp. *brockii* einwandfrei (AP-16,17). Die Durchlässigkeit der Membran für die im Vergleich zu Hefen deutlich kleineren Bakterienzellen ist erstaunlich gering, die Biomasse im Fermenter konnte weitestgehend zurückgehalten werden. Eine Blockung der Membranporen, die ursprünglich für Hefezellen dimensioniert wurden, durch die kleineren Bakterienzellen kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der Verlust von 20% Lipaseaktivität über die Membran könnte dadurch begründet werden. Der Verlust der Proteinkonzentration über die Membran stützt diese Begründung zusätzlich. Eine auf *T. brockii* optimierte Rückspülsteuerung könnte diesen Effekt vermutlich reduzieren. Die Integration und der Einsatz der Membran und der Membranmodule kann dennoch als erfolgreich eingestuft werden. Die Abtrennung der Enzyme bereits während der Fermentation, eines der Ziele des Projektes, konnte anhand mehrerer extrazellulärer Lipasen erfolgreich demonstriert werden. Die Anwendungstechnischen Versuche haben daher einen Modellcharakter, der sich für weitere Fermentationen nutzen lässt.

Arbeitsschritte	Monat											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Klonierung der Lipasen (AP-1,2,6,7)					✓							
					✓							
					✓							
Optimierung der Expression und Sekretion in <i>S. carnosus</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>P. pastoris</i> (AP-3,5,7)								✓				
								✓				
								✓				
Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme (AP-4,8,9)									✓			
									✓			
									✓			
Erhöhung der Ausbeute rekombinanter Enzyme durch Optimierung der Fermentation von <i>S. carnosus</i> (AP-10)										✓		
										✓		
Herstellung von einsatzfähigen Membranen und Modulen (AP-11, 12)						✓						
Integration des Membranmoduls und Versuche mit Proteinlösungen (AP-13, 14)								✓				
Entwicklung der Rückspülsteuerung (AP-15)												✓
Integration und Anwendungstechnische Versuche bei ausgewählten rekombinanten Biokatalysatoren (AP-16, 17)										✓		
										✓		
										✓		
										✓		

AG Antranikian 
AG Freudl 
AG Schäfer 
AG Chmiel + ItN 

✓ = abgeschlossen

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die entscheidenden Ziele des Projektes „Einsatz effizienter Expressionssysteme und Membranverfahren für die Produktion von Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen“ konnten erreicht werden.

Die Klonierung und Expression der Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen ist gelungen, so dass neue biotechnologisch interessante Biokatalysatoren produziert werden können. Zur Expression wurden bereits etablierte Expressionssysteme von *E. coli*, *S. carnosus*, *B. subtilis* und *P. pastoris* verwendet. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann man zusammenfassend sagen, dass es auch für Lipasen kein universell einsetzbares Expressions- / Sekretionssystem gibt, sondern dass nach wie vor die Evaluierung eines möglichst breiten Spektrums von alternativen Expressionswirten und Sekretionssystemen die größtmöglichen Erfolgchancen für das Erreichen von biotechnologisch-relevanten Ausbeuten bietet. Darüber hinaus stellen die begonnenen Ansätze zur evolutiven Optimierung der Substrat-Exportapparat-Wechselwirkungen eine denkbare zusätzliche Option dar, die Lipaseausbeuten noch weiter zu verbessern.

Die Lipasen aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* und *Caldanaerobacter subterraneus* subspec. *tengcongensis* konnten im großen Maßstab produziert werden. Das verwendete *E. coli*-Expressionssystem ermöglicht jedoch nur die intrazelluläre Produktion der Lipase. Für die Aufreinigung und Charakterisierung stellt diese Tatsache kein Problem dar, jedoch konnten die Expressionsstämme nicht innerhalb des Dialysefermenters mit dem neuartigen Membransystem getestet werden. Die Lipasen aus *T. thermohydrosulfuricus* und *C. subterraneus* subspec. *tengcongensis* wurden vollständig gereinigt und charakterisiert.

Die Klonierung einer Lipase, nicht nur aus thermophilen und psychrophilen, sondern auch aus thermoalkaliphilen Mikroorganismen war erfolgreich. Die Klonierung einer Lipase aus *Anaerobranca gottschalkii* in *Pichia pastoris* gelang. Die Lipase konnte mittels Hydrophober-Interaktions-Chromatographie (HIC) und anschließender Gelfiltration (FPLC) bis zur Homogenität gereinigt werden. Das gereinigte Enzym wurde weitestgehend beschrieben und zeigt deutliche Charakteristika einer Lipase.

Wider Erwarten lag die rekombinante Lipase nicht extrazellulär vor, sondern zellgebunden. Für die geplanten Fermentationsversuche mit der in den Fermenter integrierten, keramischen Membran eignete sich der *Pichia pastoris* Klon somit nicht. Die im Überstand gemessene Aktivität der rekombinanten Lipase war vermutlich das Produkt während der Fermentation lysierter Hefezellen. Für die Fermentationsversuche konnte auf *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *brockii*, als Produzent einer extrazellulären, thermostabilen Lipase, zurückgegriffen werden.

Neuartige keramische Flachmembranen konnten erfolgreich in einen biotechnologischen Prozess derart integriert werden, dass bei gleichzeitig vollständigem Rückhalt der Hefezellen das Produkt (Lipase) kontinuierlich aus dem Bioreaktor abgezogen werden konnte.

Zunächst wurden dazu mehrere verfügbare keramische Mikrofiltrationsmembranen mit unterschiedlicher Trenngrenze charakterisiert. Für diesen speziellen Anwendungsfall wurde letztlich eine Membran mit einer mittleren Porengröße von 0,19 µm ausgewählt. Diese Membran wurde in Filtrationsversuchen im Labormaßstab unter den Betriebsbedingungen des biotechnologischen Prozesses erfolgreich getestet: Unabhängig der Biomassekonzentration im Fermenter wurde in jedem Versuch die vollständige Rückhaltung der Hefezellen nachgewiesen. Gleichzeitig wies die getestete Membran - wie beabsichtigt - eine nur unwesentlichen Rückhaltung (ca. 2%) für die Proteine auf. Diese beobachtete Trenncharakteristik ist neben der Porengrößenverteilung auch auf die modifizierte Oberfläche der Membran zurückzuführen: Durch die gezielte und der Hefe gleichgerichtete Oberflächenladung der Membran kann dem Fouling entgegengewirkt werden. In weiterführenden Untersuchungen im Labormaßstab zur optimalen Betriebsweise der Membran im Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass nur ein Filtrationsbetrieb mit zyklischer Unterbrechung (Pausenzeit) zielführend ist.

Die Fermentationsergebnisse mit *T. brockii* zeigten, dass der Einsatz der Membranverfahren auch auf andere Organismen übertragbar ist, also ein Prozess mit Modellcharakter geschaffen wurde. Eine entsprechende Optimierung der Membran für Bakterienzellen, würde die Verluste der Lipaseaktivität, bzw. der Proteinkonzentration über die Membran vermutlich deutlich reduzieren. Die Integration und der Einsatz der innovativen Membranmodule zur Gewinnung der

Biokatalysatoren aus dem Fermentationsprozess mit Hefen als Expressionsorganismus darf, auf Grund der innerhalb des Projekts gewonnenen Ergebnisse, als erfolgreich und zukunftsweisend eingestuft werden.

5.3 Kooperation innerhalb des Projekts und innerhalb ICBio

Die Zusammenarbeit der Projektpartner war eng verzahnt. Die in der AG Antranikian klonierten Lipasen wurden in der AG Freudl hinsichtlich ihrer Sekretion bzw. Expression optimiert. In der von Dr. Thomas Schäfer geleiteten Abteilung *Bacterial Discovery Unit* (Novozymes) wurde die hitze-aktive Lipase aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* in *Bacillus subtilis* kloniert und die Expression der rekombinanten Lipase optimiert. Die Partner upt GmbH und ItN-Nanovation GmbH entwickelten keramische Mehrkanal-Flachmembranen, die in Fermentern der AG Antranikian für eine Produktion der Expressions- und Sekretions-optimierten Lipasen eingebaut und erprobt wurden. Innerhalb der Initiative ICBio ist das Projekt im Schwerpunkt „Effiziente Expression“ angesiedelt. Durch den Einsatz innovativer Keramikmembranen ergeben sich darüber hinaus Überschneidungen mit dem ICBio-Schwerpunkt „Verfahrensentwicklung“.

6 Fazit

Die Etablierung effizienter Expressionssysteme und Fermentationsverfahren zur Produktion biotechnologischer relevanter Biokatalysatoren ist notwendig, um der steigenden Marktnachfrage in Zukunft gerecht zu werden. Die Ergebnisse dieses Projekts sind von besonderer biotechnologischer Relevanz, um zukünftig die natürlichen Quellen von neuartigen Biokatalysatoren – insbesondere auch aus extremophilen Mikroorganismen - für Umwelt und Gesellschaft nutzen zu können.

Die im Rahmen dieses Projektes durch optimierte Fermentation produzierten, rekombinanten Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen verfügen über besondere Eigenschaften, die sie von den bereits auf den Markt befindlichen Lipasen deutlich abheben. Der Industriepartner Novozymes ist seinerseits an der Vermarktung neuartiger Lipasen interessiert.

Literatur:

Becker, P., I. Abu-Reesh, S. Markossian, G. Antranikian, H. Märkl (1997).

Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 184-190.

Bertoldo, C., Grote, R., Antranikian G. (2002).

Extremophiles: Life in extreme environments. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* **6**:1232-1237.

Cregg M.J., Cereghino L.J., Shi J., Higgins R.D. (2000).

Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**: 23-52

Grinna L.S. und Tschopp J.F. (1989).

Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**: 107-115.

Haase, C. (2002).

Etablierung eines Lipase-Expressionssystems in *Pichia pastoris*. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg.

Horton, R.M., Hunt, M.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989).

Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61–68.

Nasser Eddine, A., Hannemann, F., Schäfer, W. (2001).

Cloning and expression analysis of *NhL1*, a gene encoding an extracellular lipase from the fungal pea pathogen *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*) that is expressed *in planta*. *Mol. Gen. Genomics.* **265**: 215-224.

Rippberger S. (1992).

Mikrofiltration mit Membranen, VCH Verlagsgesellschaft mbH,

Sonnenberger K., Antranikian G., Freudl R., Chmiel H., Nonninger R., Schäfer T. (2003).

Einsatz effizienter Expressionssysteme und Membranverfahren: Produktion von Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen. transkript BioTechnologie Nachrichten-Magazin, (Sonderband), pages 94-95

Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., and Grinna L.S. (1987).

High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* **5**: 1305-1308.

Zhang W., Inan M., Meager M.M. (2000).

Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **5**: 275-287