

Abschlussbericht:
Primär-Screening von Mikroorganismen
unter Fed-Batch-Bedingungen
durch polymerbasierte Freisetzungssysteme

(Az 13093)

Projektpartner: ¹RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

²RWTH Aachen, Lehrstuhl für Textilchemie und Makro-
molekulare Chemie

³AC Biotec GmbH, Jülich

Projektbearbeiter: Dipl.-Ing. Markus Jeude¹

Dipl.-Chem. Barbara Dittrich²

Dr.-Ing. Tibor Anderlei³

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
3. Material und Methoden	6
3.1. Mikroorganismen	6
3.2. Medien und Kultivierungsbedingungen	6
3.3. Online Überwachung der Sauerstofftransferrate (OTR), Kohlendioxidtransferrate (CTR) und des Respirationsquotienten (RQ)	8
3.4. Bestimmung der grün- und gelbfluoreszierenden Protein-(GFP, YFP)- Aktivitäten	9
3.5. Herstellung der Freisetzungssysteme	9
3.6. Messung der Freisetzung von Glucose aus den Silikonelastomerdisk.....	10
3.6.1. Freisetzungsmessung mittels Offline-Enzymtest.....	10
3.6.2. Etablierung der Freisetzungsmessung mittels Online-Enzymtest.....	10
3.6.3. Etablierung der Online-Freisetzungsmessung mittels Refraktometer	11
4. Ergebnisse.....	12
4.1. Einfluss von Silikonelastomeren auf die Kultivierung von <i>H. polymorpha</i> und <i>E. coli</i>	12
4.2. Freisetzung von Glucose aus Silikonelastomerdisk und in Deep-Well-Platten	13
4.2.1. Kinetik	13
4.2.2. Untersuchungen an Folien.....	14
4.2.3. Untersuchungen an gegossenen Folien.....	15
4.2.4. Untersuchungen an gerakelten Folien.....	18
4.2.5. Untersuchungen an Deep-Well-Platten	21
4.2.6. Partikelgröße der Glucose	24
4.2.7. Untersuchung des Einflusses von Zuschlägen.....	24
4.2.8. Beschichtungen	29
4.2.9. Silikon	30
4.2.10. Paracyclophanbeschichtungen	31
4.2.11. Hydrophile Beschichtungen.....	35
4.2.12. Seitengruppenmodifizierte Siloxane.....	36
4.3. Einflüsse von Silikonelastomerdisk auf das Wachstum von <i>Hansenula polymorpha</i>	36
4.4. GFP-Produktion durch <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (p _{FMD} -GFP) in Syn6-MES-Medium	38
4.5. GFP-Produktion durch <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (p _{FMD} -GFP) in YNB-Medium	41
4.6. Biomassebildung von <i>H. polymorpha</i> Kulturen	43
4.7. Vergleich der GFP-Produktion im Schüttelkolben- mit dem Fermentermaßstab von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (p _{FMD} -GFP) im Fed-Batch.....	44
4.8. YFP-Produktion durch <i>Escherichia coli</i> BL 21 dLys pRset eYFP-IL-6	46
4.9. Screening von Mikroorganismen unter Fed-Batch-Bedingungen.....	48
4.9.1. Vergleichsanalyse des Screenings der <i>H. polymorpha</i> Stämme mit FMD-Promotor.....	51
4.9.2. Vergleichsanalyse des Screenings der Stämme mit MOX-Promotor	58
4.9.3. Einfluss einer Sauerstofflimitierung auf das Screening	62
5. Diskussion.....	66

6. Ausblick	69
7. Soll/Ist-Vergleich des Projektes.....	70
7.1. Definition der Anforderungen	70
7.2. Entwicklung und experimentelle Charakterisierung der Freisetzungssysteme	70
7.3. Bestimmung der Kinetiken von <i>H. polymorpha</i> , Optimierung des Expressionssystems in <i>H. polymorpha</i>	70
7.4. Erstellung eines mathematischen Modells zur Optimierung der Freisetzung ..	71
7.5. Optimierung der Freisetzungssysteme.....	71
7.6. Screening nach geeignetem Expressionssystem im Schüttelkolben	71
7.7. Erstellung von Berichten, Publikation und Präsentation der Ergebnisse auf Tagungen.....	72
8. Erreichen der Meilensteine	73
9. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	73
10. Kooperation innerhalb des Projektes.....	74
Referenzen	73
Anhang 1: Abstract Bioperspectives 2005	75
Anhang 2: Abstract VAAM 2006	76

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vergleich der Batch und Fed-batch-Kolben.....	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Vulkanisierung.....	5
Abb. 3:	Respiration Activity Monitoring System (RAMOS).....	8
Abb. 4:	Schienenrakel.....	9
Abb. 5:	Vergleich des Sauerstofftransferratenverlaufs einer Batch-Kultivierung mit vier Silikonelastomerdisk.....	13
Abb. 6:	Prinzip der Folienherstellung beim Foliengießen (links) und Folienrakeln (rechts).....	14
Abb. 7:	Flächenbezogene Freisetzung von Glucose aus gegossenen Silikonelastomerdisk.....	15
Abb. 8:	REM-Aufnahmen der Oberflächen der Oberseite gegossener Silikonelastomerdisk.....	16
Abb. 9:	Freisetzung von Glucose aus gegossenen Silikonelastomerdisk mit Glucosegehalten von 20% (w/w) bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Freisetzungsmediums.....	17
Abb. 10:	Freisetzung aus gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w). 19	
Abb. 11:	REM-Aufnahmen der gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w). 19	
Abb. 12:	Freisetzung von Glucose aus den Bodenkörpern von Mikrotiterplatten.....	22
Abb. 13:	Freisetzungsraten der Bodenkörper in den Mikrotiterplatten bei Glucosegehalten von 20 bis 50% (w/w).....	23
Abb. 14:	Freisetzungskurven der mit BaSO ₄ in verschiedenen Partikelgrößen versetzten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w).....	25
Abb. 15:	Freisetzung der gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) und Zusatz von 5% (w/w) Bariumsulfat.....	27
Abb. 16:	Freisetzung von Glucose aus den Bodenkörpern von Mikrotiterplatten.....	28
Abb. 17:	Freisetzung von Glucose aus mit Silikonmembranen beschichteten gerakelten Silikonelastomerdisk mit 20% (w/w) Glucose.....	31
Abb. 18:	Freisetzungskurven der mit ppx- bzw. Amino-ppx-Membranen in unterschiedlicher Dicke beschichteten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w).	33
Abb. 19:	REM-Aufnahmen der Oberflächen der mit Amino-ppx-Membranen beschichteten Silikonelastomerdisk nach der Freisetzung der enthaltenen Glucose.....	34
Abb. 20:	Freisetzungskurve gerakelter und mit einer Amino-ppx-Membran beschichteter Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) Glucose und 5% (w/w) BaSO ₄	35
Abb. 21:	Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR) und des Respirationsquotienten (RQ) von H. polymorpha wt Kulturen in Batch- und Fed-Batch-Betriebsweise.....	37
Abb. 22:	H. polymorpha RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Kulturen.....	40
Abb. 23:	H. polymorpha RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Kulturen.....	42
Abb. 24:	Erhaltene Biotrockenmassen (BTM) von H. polymorpha Kulturen in Batch- und Fed-Batch Betriebsweise mit Silikonelastomerdisk.....	44
Abb. 25:	Fermentation von H. polymorpha Kulturen in Fed-Batch Betriebsweise im 3-L-Maßstab... 45	

Abb. 26:	Verlauf der Sauerstofftransferate (OTR) und relative YFP-Bildung von <i>Escherichia coli</i> BL 21 dLys pRset eYFP-IL-6 Kulturen.....	47
Abb. 27:	Vorkultivierungsstufen für ein Screening von transformierten Hefen	49
Abb. 28:	Tablar einer 6-fach MikroRAMOS-Anlage.	50
Abb. 29:	Wachstum von <i>H. polymorpha</i> auf Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bei unterschiedlichen Füllvolumina	50
Abb. 30:	Erste Vorkultur Screening 1 von <i>Hansenula polymorpha</i> RB11 Stämmen pC10-GFP (pFMD-GFP bzw. pMOX-GFP) in YPD-Medium	52
Abb. 31:	Zweite Vorkultur Screening 1 von <i>Hansenula polymorpha</i> RB11 Stämmen pC10-GFP (pFMD-GFP bzw. pMOX-GFP) in Syn6-MES-Medium	53
Abb. 32:	Erstes Screening von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin im Batch und Fed-batch	54
Abb. 33:	Vergleichsanalyse zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glycerin	55
Abb. 34:	Vergleichsanalyse von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose.....	56
Abb. 35:	Vergleichsanalyse von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose Fed-batch in Glucosedisks	57
Abb. 36:	Erstes Screening von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pMOX-GFP) Stämme in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin.....	58
Abb. 37:	Vergleichsanalyse von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pMOX-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glycerin.....	59
Abb. 38:	Vergleichsanalyse von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (P _{MOX}) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose.....	60
Abb. 39:	Vergleichsanalyse von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (pMOX-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose Fed-batch in Glucosedisks	61
Abb. 40:	Screening von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (PFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin	63
Abb. 41:	Screening von <i>H. polymorpha</i> RB11 pC10-GFP (PFMD-GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 20 g/L Glucose bzw. Glycerin	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht und Herkunft der verwendeten Mikroorganismen	6
Tab. 2: Zusammenstellung der Ausbeuten für GFP- und Biomasseausbeute aus Schüttelkolben- und Fermentationsansätzen	46

1. Zusammenfassung

Die meisten biotechnischen Produktionsprozesse werden heutzutage in der Fed-batch-Betriebsweise durchgeführt. Im Gegensatz dazu werden die Screenings nach mikrobiellen Produktionsstämmen im Batch betrieben. Hierbei herrschen physiologisch andere Bedingungen, was sich in negativen metabolischen Phänomenen des Mikroorganismus wie z.B. Katabolitrepression und Overflow-Metabolismus äußern kann. Unbewusst kann dies zur fehlerhaften Stammauswahl aufgrund einer falschen Screening-Methode führen. Ein Fehler in der Auswahl des Stammes hat Effekte auf die ganze Prozessentwicklung und kann später kaum kompensiert werden.

Aus genanntem Anlass wurde in diesem Projekt eine kontrollierte Fed-batch-Betriebsweise in Kleinkulturen durch polymerbasierte Freisetzungssysteme etabliert. Mittels Silikonelastomeren als Matrixsystem und darin enthaltener Glucose kann ein Fed-batch-Prozess ohne hohen finanziellen oder personellen Aufwand in parallelen Ansätzen betrieben werden. Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen Glucose durch Diffusion (Slow-release) an *Hansenula polymorpha* (DSM 70277) als auch einen rekombinanten Stamm, welcher grünfluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert, verfüttert wurde. Außerdem wurden solche Experimente mit einem rekombinanten *E. coli* Stamm durchgeführt, welcher gelbfluoreszierendes Protein (YFP) synthetisiert. Die spezifische Produktbildung von GFP und YFP in Schüttelkolben wurde im Vergleich zur Batch-Betriebsweise gemessen, wobei die Atmung mit einem Respiration Activity Monitoring System (RAMOS) erfasst wurde. Die Verläufe der Glucosefreisetzung aus den Silikonelastomeren wurde in abiotischen Experimenten fortwährend untersucht und die Glucosekonzentration mittels enzymatischen Tests analysiert.

Die GFP-Bildung konnte um den Faktor 35 in Syn6-MES-Medium verbessert werden. Im Fed-Batch wurden 88 mg/L GFP bei 35,9 g/L eingesetzter Glucose und im Batch 2,5 mg/L bei 40 g/L eingesetzter Glucose synthetisiert. In YNB-Medium wurden im Fed-Batch 421 mg/L GFP bei 41,3 g/L eingesetzter Glucose gebildet und nur 1 mg/L im Batch bei 40 g/L eingesetzter Glucose. Die YFP-Synthese von *E. coli* konnte durch die Verwendung der gleichen Silikonelastomerdisks als Glucosefreisetzungssystem vervierfacht werden.

In einer Fermentation mit *H. polymorpha* im 3-L-Maßstab, bei der ein Fed-Batch mit Pumpen realisiert wurde, konnten 718 mg/L GFP gebildet werden unter Verbrauch

von 41,6 g/L Glucose. Dabei wurden 17,1 g/L Biotrockenmasse gebildet. Mit Freisetzungssystemen im Kolben konnte der Overflow-Metabolismus von *H. polymorpha* so weit reduziert werden, dass bis zu 85% mehr Biomasse gebildet wurde. Bisher konnten 23,4 g/L Biotrockenmasse von *H. polymorpha* im Schüttelkolben erreicht werden, wobei die Biomasseertragskoeffizienten mit 0,37-0,47 in der gleichen Größenordnung liegen wie im Fermenteransatz.

Die Vorteile eines Fed-Batch-Verfahrens durch Freisetzungssysteme konnten damit bereits eindrücklich nachgewiesen und die Möglichkeiten zur Vermeidung von Scale-up-Problemen aufgezeigt werden. Des Weiteren konnten in ausführlichen Screening-Experimenten im Batch auf Glucose und Glycerin als auch im Fed-batch auf Glucose aus Silikonelastomer-Disks gezeigt werden, dass die sicherste Methode ein Fed-batch-Screening ist, um den richtigen Stamm für einen Fed-batch-Prozess zu finden. Die Relevanz der Sauerstoffverfügbarkeit in diesem Zusammenhang wurde ebenfalls ausgiebig untersucht.

2. Einleitung

Prinzipiell muss eine hohe Anzahl an Klonen in einem Primär-Screening getestet werden, um ein optimiertes mikrobielles Produktionssystem zu erhalten (Stöckmann et al., 2003a). Aufgrund hoher finanzieller und personeller Investitionen kann eine aussagekräftige Screening-Prozedur nur in der Kleinkulturtechnik, wie z.B. dem Schüttelkolbenmaßstab, durchgeführt werden (Weuster-Botz et al., 2001). Die Experimente werden im Schüttelkolben grundsätzlich in der Batch-Betriebsweise durchgeführt. In solchen Fermentationen werden hohe Substrat- und Pufferkonzentrationen von Beginn der Reaktion eingestellt (Riesenberg, 1991). Dies ist allerdings keine vorteilhafte Betriebsweise, wenn der Mikroorganismus metabolische Phänomene wie spezifische Substratüberschussinhibierung oder unspezifische Inhibierung aufgrund ungünstiger Wasseraktivität und osmotischem Druck durchläuft (Stöckmann et al., 2003a). Einige Mikroorganismen reagieren mit Overflow-Metabolismus bei hohen Substratkonzentrationen und scheiden große Mengen anaerober Nebenprodukte wie z.B. Milchsäure, Ameisen- und Essigsäure oder Ethanol unter aeroben Bedingungen aus (Riesenberg and Guthke, 1999). Bekannte Beispiele hierfür sind das Gram-negative Stäbchenbakterium *Escherichia coli* und die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha* (Suckow and Gellissen, 2002). Die Konsequenzen des Overflow-Metabolismus sind meist ein Drift des pH oder eine Nebenproduktinhibierung auf das Wachstum bzw. die eigentliche Produktbildung. Katabolitrepression bei erhöhten Konzentrationen einer direkt verfügbaren Kohlenstoffquelle ist der relevanteste Fall eines negativen metabolischen Phänomens in einer Batch-Kultivierung. Normalerweise wird kein oder kaum Produkt synthetisiert, wenn das Operon intakt ist und eine strikte Repression durch ein spezifisches Substrat vorliegt (Xu et al., 1999). Wegen der bereits genannten Aspekte werden die meisten industriellen Prozesse in der Fed-Batch-Betriebsweise durchgeführt (Larsson et al., 1997).

Kulturmedien mit hohen Mengen an Komplexbestandteilen von undefinierter und wechselnder Zusammensetzung werden in den meisten Kultivierungen oder Screenings angewendet. Dies ist problematisch bei Produktsynthesen, welche einer Katabolitrepression unterliegen. Üblicherweise werden so erzeugte Datensätze für Scale-up-Berechnungen herangezogen ohne die Rolle jeder Medienkomponente, jedes Prozessparameters oder des physiologischen Status der Kultur, wie z.B. Sauerstofflimitierung, bei der Prozessführung zu verstehen (Büchs, 2001; Clark et

al., 1995). Sehr oft werden komplexe Komponenten einfach nach langsamen Quell- oder Lösevorgängen hydrolysiert, wodurch ein Schlüsselsubstrat für die Stämme verfügbar wird. Dieser Zufallsprozess ist einem Fed-Batch-Prozess ähnlich jedoch vollkommen unkontrolliert (Rheinwald and Green, 1974). Unglücklicherweise ist dies einer der Hauptgründe, warum Probleme im Scale-up entstehen und was Scale-up-Verfahren immer noch mehr zu einer Kunst statt zu einer Wissenschaft macht (Humphrey, 1998).

Der im vorliegenden Projekt verfolgte Ansatz zur Etablierung einer Fed-Batch-Betriebsweise durch Freisetzungssysteme leistet an wesentlichen Entwicklungspunkten biotechnologischer Prozesse Beiträge zur Nachhaltigkeit. Zum einen ermöglicht der Einsatz von polymeren Freisetzungssystemen (s. Abb. 1) das Auffinden optimal funktionierender Stämme mit intakter Regulierung der Expression im Primär-Screening für den Fed-Batch-Betrieb. Zum anderen wird zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt eine genauere Kenntnis der prozessbestimmenden Mechanismen erarbeitet. Damit wird es zu effizienteren Bioprozessen mit weniger Material- und Energieaufwendungen kommen.



Abb. 1: Vergleich der Batch und Fed-batch-Kolben. 250-mL-Erlenmeyerkolben links in Modifikation mit Zu- und Abluftstutzen sowie Animpfstutzen für die RAMOS-Technologie zur Bestimmung der Atmungsraten und rechts als Standard für offline Schüttelkolbenexperimente bzw. als Probenkolben. Die Fed-Batch-Kolben enthalten z.B. vier weiße Silikonelastomerdisk.

Als Hauptkomponente wurden Silikonelastomere aus Polydimethylsiloxan verwendet. Polydimethylsiloxane können mithilfe verschiedener Verfahren vulkanisiert werden.

In dem vorliegenden Projekt wurden ausschließlich kaltvernetzende, platinkatalysierte Zweikomponentensysteme verwendet. Dabei enthält das eine Siloxanpräpolymer Vinylendgruppen (konventionsgemäß als Komponente A bezeichnet) und das andere Si-H-Gruppen (Komponente B). Die Vinylgruppen reagieren mit den Si-H-Gruppen ohne Abspaltung von Nebenprodukten zu einem dreidimensionalen Netzwerk (s. Abb. 2). Die Vulkanisierungsgeschwindigkeit kann durch die eingesetzte Katalysatormenge und die Reaktionstemperatur gesteuert werden.

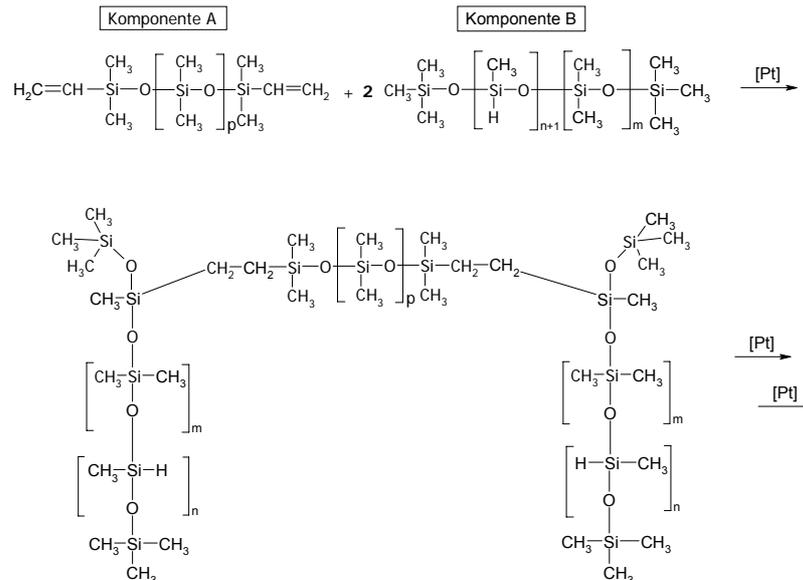


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vulkanisierung. Das vinylterminierte Polydimethylsiloxan (Komponente A) reagiert mit dem Polymethylhydrosiloxan-Polydimethylsiloxan-Copolymer (Komponente B). Indizes m, n und p: Anzahl der Wiederholungseinheiten, bei Komponente B sind die beiden Wiederholungseinheiten statistisch verteilt.

In diesem Bericht wird die Rolle von diffusionsbasierten Slow-release-Disks aus Silikonelastomeren bei der Fermentation von *H. polymorpha* und *E. coli* demonstriert. Es werden die Möglichkeiten gezeigt eine Fed-Batch-Fermentation ohne apparativen Aufwand zu führen und eröffnet die Option einen Prozess in der Kleinkultur zu optimieren. Ein Screening-Vergleich der Fed-batch-Betriebsweise mit Slow-release-Disks ohne hohen Kosten- und Personalaufwand im Hochdurchsatz mit mehreren hundert Klonen wird im Vergleich zu Batch-Kulturen beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1. Mikroorganismen

Alle verwendeten Mikroorganismen wurden zur Langzeitstammhaltung bei -80°C in spezifischem Medium aufbewahrt. *Hansenula polymorpha* Wildtyp (DSM 70277) und RB11-Derivat pC10-FMD ($P_{\text{FMD-GFP}}$) wurden in YNB-Medium gelagert. *Escherichia coli* K12 TG1 (DSM 6056) wurde in LB-Medium und *E. coli* BL 21 pLys pRset peYFP-IL-6 wurde in LB-Medium mit Ampicillin ($100 \mu\text{g/mL}$) gelagert. Stammsuspensionen enthielten 200 g/L Glycerin. Um jederzeit auf vitale Kulturen zugreifen zu können, wurden zur Kurzzeitstammhaltung von den Glycerinkulturen Quadrantenausstriche auf Medium-Agar-Platten in 14-tägigen Zyklen erzeugt.

H. polymorpha RB11 pC10-FMD ($P_{\text{FMD-GFP}}$) wurde freundlicherweise von Dr. C. Amuel zur Verfügung gestellt (Heinrich-Heine Universität, Institut für Mikrobiologie, Düsseldorf) (Amuel et al., 2000; Gellissen, 2000). *E. coli* BL 21 pLys pRset peYFP-IL-6 wurde freundlicherweise von Dr. G. Müller-Newen zur Verfügung gestellt (RWTH Aachen, Institut für Biochemie, Aachen) (Samorski et al., 2005).

Tab. 1: Übersicht und Herkunft der verwendeten Mikroorganismen

Stamm	Herkunft
<i>Hansenula polymorpha</i> Wildtyp	DSM 70277
<i>Hansenula polymorpha</i> RB11 pC10-GFP ($P_{\text{FMD-GFP}}$)	Amuel et al., 2000
<i>Hansenula polymorpha</i> RB11 pC10-GFP ($P_{\text{MOX-GFP}}$)	Amuel et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> K12 TG1	DSM 6056
<i>Escherichia coli</i> BL 21 pLys pRset peYFP-IL-6	Samorski et al., 2005

3.2. Medien und Kultivierungsbedingungen

Yeast Nitrogen Base-(YNB)-Medium

YNB-Mineralmedium bestand aus $13,3 \text{ g/L } (\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, $1,4 \text{ g/L}$ Yeast Nitrogen Base ohne Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren (Difco, Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ USA 07417). Das Medium hat eine Auto-pH-Einstellung auf $\text{pH} = 4,3 \pm 0,2$ (Stöckmann et al., 2003a).

Syn6-MES-Medium

Die Basislösung des Syn6-MES-Mineralmediums besteht aus 1,0 g/L KH_2PO_4 ; 7,66 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,3 g/L KCl; 3,0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L NaCl; 27,3 g/L 2-Morpholinoethanesulfonsäure (MES). Die Basislösung wurde auf pH = 6,4 eingestellt. Zu 1 L der Basislösung wurden zugegeben: 6,67 mL Calciumchlorid-Lösung [150 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], 6,67 mL Mikroelement-Lösung [10,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 3,0 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,0 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10,0 g/L EDTA (Titriplex III)], 6,67 mL of Vitamin-Lösung [0,06 g/L D-Biotin, 20,0 g/L Thiaminhydrochlorid], 3,33 mL Spurenelement-Lösung [0,2 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g/L Borsäure; 0,2 g/L KI und 0,2 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. c

Modifiziertes Wilms-Medium

Das modifizierte Wilms-Medium besteht aus 2,68 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L NH_4Cl ; 29,26 g/L K_2HPO_4 ; 2 g/L Na_2SO_4 ; 4,42 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L Ampicillin; 0,01 g/L Thiamin; 3 mL/L Spurenelementlösung [0,18 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,18 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 13,92 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,66 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 11,13 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. Das Medium hatte ein finales Volumen von 1 L und pH-Einstellung erfolgte auf 7,5 (Wilms et al., 2001).

In Batch-Kulturen wurde Glucose zugegeben wie es in den Abbildungslegenden spezifiziert ist. Für den Fed-batch wurden die Medien ohne Glucosegehalt hergestellt.

Standard und modifizierte 250-mL-Erlenmeyer-Schüttelkolben (Schott, Mainz) des Respiration Activity Monitoring Systems (RAMOS, HiTec Zang, Herzogenrath) wurden mit einem Standardfüllvolumen von 12,5 mL benutzt (Anderlei and Büchs 2001; Anderlei et al. 2004). Die Kultivierungen wurden bei 37°C, 350 rpm und einem Schütteldurchmesser von 50 mm auf einem Laborschüttler LS-W durchgeführt (Kühner, Birsfelden, Schweiz). Die Hauptkulturen wurden mit Zellen der gewaschenen Vorkulturen auf eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm angeimpft. Biotrockenmassen (BTM) wurden durch Gravimetrie bestimmt. Die Optische Dichte wurde bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) mit einem Uvikon 922 Spektrophotometer (Kontron, Basel, Schweiz) gemessen. Im Fall von *H. polymorpha* entsprach 1,0 g Biotrockenmasse (BTM) pro Liter Medium einer OD_{600} von 4,4 und im Fall von *E. coli* 3,5. Diese

Proben wurden gegen frisches Medium in einer Küvette, mit Schichtdicke von 1 cm, bei 25°C gemessen.

3.3. Online Überwachung der Sauerstofftransferrate (OTR), Kohlendioxidtransferrate (CTR) und des Respirationsquotienten (RQ)

Das System zur Online-Erfassung der OTR und des RQ in Schüttelkolben wurde von Anderlei beschrieben (Anderlei et al., 2004). Die Kultivierungen wurden in speziell angefertigten Messkolben durchgeführt, welche die gleichen Hydrodynamiken und Gasphasenbedingungen gewährleisten wie sie bei herkömmlichen Kulturen in Erlenmeyerkolben verschlossen mit Wattestopfen herrschen. Dieses System wurde bereits für einige Projekte erfolgreich eingesetzt (Danielson et al., 2004; Hermann et al., 2001; Losen et al., 2004; Lotter and Büchs, 2004; Maier et al., 2004; Peter et al., 2004; Raval et al., 2003; Silberbach et al., 2003; Stöckmann et al., 2003a; Stöckmann et al., 2003b).



Abb. 3: Respiration Activity Monitoring System (RAMOS). Im Bild sind acht Messschüttelkolben zu erkennen mit jeweils einem Sauerstoffsensoren im schwarzen Deckel. Jeder Kolben ist mit einem Differenzdrucksensoren verbunden und wird in alternierenden Zyklen durch ein Verschließen von Einlass- und Auslassventil für die Zuluft von der Atmosphäre abgeschlossen. Außen sind zur Probennahme sechs Standard-Erlenmeyerkolben mit Weithals angebracht.

3.4. Bestimmung der grün- und gelbfluoreszierenden Protein-(GFP, YFP)-Aktivitäten

GFP- und YFP-Aktivitäten wurden fluorimetrisch in schwarzen 96er- μ Clear-Mikrotiterplatten der Fa. Greiner Bio-One bei einem Füllvolumen von 200 μ L pro Vertiefung bestimmt. Zur GFP-Analyse wurde die Emission bei $\lambda = 520$ nm nach Anregung bei $\lambda = 485$ nm gemessen und bei der YFP-Analyse wurde die Emission bei $\lambda = 540$ nm gemessen nach Anregung bei $\lambda = 510$ nm. Bei allen Messungen wurde als Referenz 1 μ M Fluorescein in 100 mM Phosphatpuffer bei pH = 7,5 verwendet. Zur quantitativen GFP-Bestimmung wurden Emissionen einer Eichreihe aufgereinigten GFPs aufgenommen.

3.5. Herstellung der Freisetzungssysteme

Zur Herstellung der Folien wurden Siloxankomponenten mit den gesiebten Glucosepartikeln vermischt. Daneben wurde ein Platinkatalysator zugesetzt, um die Vulkanisierung zu beschleunigen. Die fertige Mischung wurde dann entweder auf eine Teflonplatte gegossen oder (um dickere Folien zu erhalten) mit Hilfe eines Schienenrakels auf eine Glasplatte aufgetragen und vulkanisiert (Abb. 4).



Abb. 4: Schienenraker. (links: Seitenansicht und rechts Draufsicht mit Silikon-glucosemischung)

Zur Herstellung der Multiwellplatten-Systeme wurden die Siloxankomponenten, die Glucose enthielten jedoch kein zusätzlicher Katalysator, eingewogen und vermischt. Die Mischung wurde in die Kavitäten der Deep-Well-Platte gleichmäßig portioniert und die aufgebrauchte Menge jeweils für eine Reihe von zwölf Kavitäten anhand der

Gewichtszunahme kontrolliert. Nach Befüllung aller Kavitäten wird die Platte vulkanisiert.

Die Untersuchung der Freisetzung wurde in bidest. Wasser als Medium durchgeführt, die Proben auf einer Analysenwaage eingewogen, im Fall der untersuchten Folien wurde eine Seite der Folie mit handelsüblichen Doppelklebeband und Deckgläschen für die Mikroskopie abgedeckt. Die so präparierten Folien wurden mit einer definierten Menge bidest. Wasser versetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und das entsprechenden Volumen mit bidest. Wasser ergänzt. Die gewonnenen Proben wurden mit Hilfe des enzymatischen Tests (s. Kap. 3.6.) auf ihren Glucosegehalt untersucht. Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Glucose wurden die Restgehalte der Folien nach Abschluss des Freisetzungsexperiments in einer 50:50% (v/v) Mischung von Chloroform und Ethanol extrahiert, bestimmt und dem im Freisetzungsexperiment erhaltenen Gehalt zuaddiert.

3.6. Messung der Freisetzung von Glucose aus den Silikonelastomerdisk

3.6.1. Freisetzungsmessung mittels Offline-Enzymtest

Die Freisetzung der Glucose unter Fermentationsbedingungen wurde untersucht durch die Zugabe einer oder mehrerer Silikonelastomerdisk in ein definiertes Volumen (12,5-50 mL) von Kulturmedium, das vor Kontamination von Mikroorganismen durch Zugabe von 0,2 g/L Natriumazid geschützt wurde. Das Medium wurde nicht mit Mikroorganismen angeimpft, jedoch wurden alle anderen Bedingungen wie bei der Fermentation belassen. Über eine Periode von 1-3 d wurden Proben in Viertelstunden- bis Stundenintervallen entnommen. Die Freisetzung von Glucose wurde offline über einen Enzymtest mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Der Test ist kommerziell bei Roche Diagnostics erwerbbar.

3.6.2. Etablierung der Freisetzungsmessung mittels Online-Enzymtest

Es wurde ein Online-Enzymtest zur Freisetzungsmessung mit Glucose-Oxidase etabliert, bei dem eine Umsetzung von D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton katalysiert und das entstehende Nebenprodukt Wasserstoffperoxid durch Katalase abgebaut wird. Bei der Reaktion ergibt sich insgesamt ein Verbrauch von 0,5 Mol

Sauerstoff pro Mol Glucose. Der verbrauchte Sauerstoff kann mit Hilfe der RAMOS-Technologie im 250-mL-Erlenmeyerkolben unter Fermentationsbedingungen aufgezeichnet werden und die freigesetzte Glucose stöchiometrisch ermittelt werden. Die Entwicklung dieser Technik wurde inspiriert durch das IC Bio-Projekt Az 13094, in dem allerdings der Fokus nicht auf der Glucose liegt, sondern auf den dort untersuchten Enzymen.

3.6.3. Etablierung der Online-Freisetzungs-messung mittels Refraktometer

Zusätzlich zum Online-Enzymtest im RAMOS wurde ein weiterer Online-Test zur Freisetzungsmessung mittels Refraktometer etabliert. Hierbei wurde ein 250-mL-Erlenmeyerkolben mit Auslass am Boden an einen Pumpenkreislauf angeschlossen. Das Medium wurde über eine Schlauchpumpe kontinuierlich durch ein Differentialrefraktometer gepumpt und anschließend wieder durch den Kolbendeckel zurückgeführt. Die Änderung des Brechungsindex bei der Glucosefreisetzung wird hierbei gegen frisches glucosefreies Medium oder Puffer als Referenz gemessen. Als Messintervall wurde 60 s gewählt. Die freigesetzte Glucose kann somit ebenfalls unter Fermentationsbedingungen aufgezeichnet werden.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von Silikonelastomeren auf die Kultivierung von *H. polymorpha* und *E. coli*

Zum Test des Einflusses der gewählten Silikonelastomere auf das Wachstum von Mikroorganismen wurden *H. polymorpha* (DSM 70277) und *E. coli* K12 TG1 (DSM 6056) in Gegenwart von vier Silikonelastomerdisks ohne Glucosegehalt kultiviert. Zu einem Batch mit 20 g/L gelöster Glucose wurden die Disks ohne Glucosegehalt (Placebo-Disks) hinzugegeben. Verglichen wurden die Kurven der Sauerstofftransferaten einer Kultivierung mit und ohne Silikonelastomerdisks. Auf der folgenden Abbildung 5 sind die OTR über der Zeit aufgetragen. Im oberen Diagramm der *H. polymorpha*-Fermentation sind in beiden Kurven Doppelpeaks zu erkennen, welche in etwa die gleichen Maxima von 0,05 mol/L/h besitzen. Der erste Peak steht jeweils für metabolisierte Glucose und der zweite Peak entsteht aufgrund des Overflow-Metabolismus und repräsentiert Ethanol, welches wieder verstoffwechselt wird. Für *H. polymorpha* ergibt sich kein Unterschied bezüglich des OTR-Verlaufs, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Präsenz der Silikonelastomere keinen Einfluss auf den Stoffwechsel und das Wachstum hat.

Die Experimente mit *E. coli* im unteren Diagramm der Abbildung 5 haben eine leicht unterschiedliche Dauer, weil offenbar in der Kultivierung mit Silikonelastomerdisks eine Art Stromstörereffekt erzeugt wird. Die Kultur hat in limitierenden Phasen von 7-9 h Fermentationszeit wahrscheinlich etwas mehr Sauerstoff zur Verfügung, wodurch ein leicht abweichender OTR-Verlauf zu Kulturen ohne Silikonelastomerdisks verzeichnet wird. Dennoch wird die Glucose in gleichem Maße veratmet (die Integraldifferenz beider Kurven beträgt relativ nur 0,006%). Insgesamt gesehen ist also eine Kultivierung mit Silikonelastomeren unbedenklich.

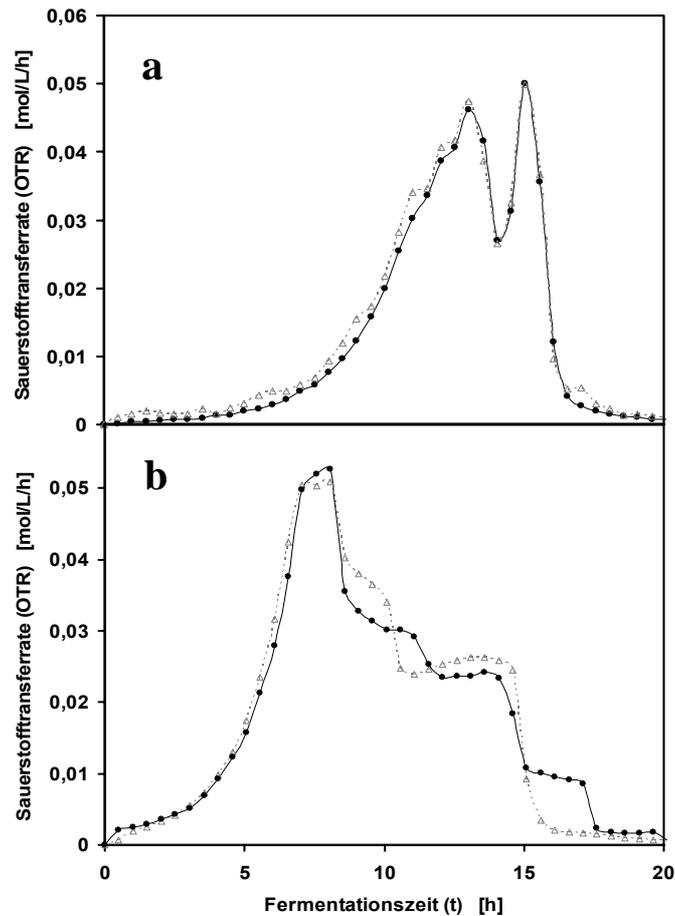


Abb. 5: Vergleich des Sauerstofftransferatenverlaufs einer Batch-Kultivierung mit vier Silikonelastomerdisks (●), welche keine Glucose enthielten (Placebo-Disks) und ohne (△) Silikonelastomerdisks. Versuchsbedingungen: **a:** *H. polymorpha* wt (DSM 70277); Syn6-MES-Medium; $\text{pH}_{\alpha}=6,4$; $\text{OD}_{600,\alpha}=0,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $D_0 = 50 \text{ mm}$; $n = 350 \text{ rpm}$; $V_L = 12,5 \text{ mL}$. **b:** *E. coli* K12 TG1; Wilms-Medium; $\text{pH}_{\alpha}=7,5$; $\text{OD}_{600,\alpha}=0,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $D_0 = 50 \text{ mm}$; $n = 450 \text{ rpm}$; $V_L = 12,5 \text{ mL}$.

4.2. Freisetzung von Glucose aus Silikonelastomerdisks und in Deep-Well-Platten

4.2.1. Kinetik

Zur Entwicklung eines Freisetzungssystems ist die genaue Kenntnis der Kinetik und der Einflussgrößen auf die Freisetzungsrates von besonderer Bedeutung. Für das hier vorliegende System, Glucose als Partikel definierter Größe eingebettet in eine Polymermatrix aus Polydimethylsiloxan, kommen im wesentlichen zwei mögliche

Freisetzungsmechanismen in Frage (Baker, 1987; Schirrer et al., 1992). Zum einen kann eine diffusionskontrollierte Freisetzung postuliert werden, deren Freisetzungsraten eine Abhängigkeit von der Zeit mit der Quadratwurzel zeigen sollte. Zum anderen kann für einen stark wasserlöslichen und osmotisch wirksamen Wirkstoff wie die eingesetzte Glucose ein Einfluss dieser Eigenschaften auf die Freisetzungskinetik erwartet werden und ein osmotischer Effekt postuliert werden, der eine lineare Zeitabhängigkeit der Freisetzung hervorrufen würde.

Um einen direkten Vergleich der Freisetzung aus Disks und Deep-Well-Platten zu ermöglichen, wurde die in den Freisetzungsexperimenten freigesetzte Glucosemenge enzymatisch bestimmt und die Kontaktfläche zwischen dem Freisetzungssystem und dem Kulturmedium bezogen.

4.2.2. Untersuchungen an Folien

Die glucosehaltigen Silikonfolien für die Untersuchung der Freisetzung von Glucose aus Folienscheiben wurden mit zwei Techniken hergestellt. Für das Gießen von glucosehaltigen Silikonfolien wurden in die noch nicht vulkanisierte Silikonmischung Glucosepartikel eingearbeitet und die Mischung mit Chloroform verdünnt. Die Mischung wurde in eine 15 x 15 cm große Teflonplatte mit einem erhöhten Rand gegossen und bei Raumtemperatur vulkanisiert. Die so hergestellten Folien wiesen Dicken zwischen 150 und 250 μm auf. Zur Herstellung gerakelter Folien wurde eine Silikon-/Glucosemischung hergestellt und unverdünnt mit einem Rakel bei einer Spaltweite von 1 mm auf eine Glasplatte gezogen und bei 50°C vulkanisiert. Die gerakelten Folien wiesen Dicken zwischen 800-900 μm auf. Das Prinzip der beiden Techniken ist in Abbildung 6 illustriert.

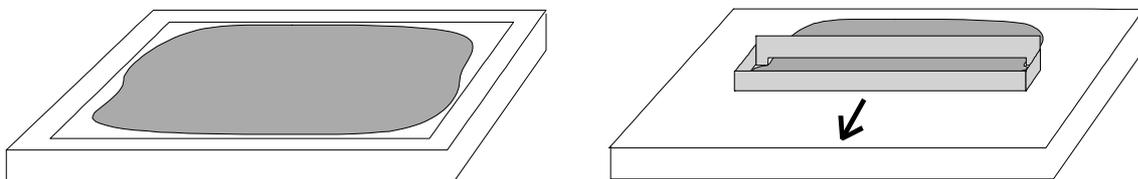


Abb. 6: Prinzip der Folienherstellung beim Foliengießen (links) und Folienrakeln (rechts).

Ein wesentlicher Vorteil des Rakelns ist die Einstellung definierter Foliendicken. Daneben ist ein geringerer Einfluss durch die Sedimentation der Glucosepartikel zu

erwarten, da zum einen die Viskosität der unvulkanisierten Masse höher ist, zum anderen eine schnellere Vulkanisierung möglich ist.

4.2.3. Untersuchungen an gegossenen Folien

Es wurde zunächst die Freisetzung von Glucose aus gegossenen Folien untersucht. In Abbildung 7 ist die Freisetzung dargestellt als flächenbezogene Freisetzung gegen die Zeit. Die Freisetzungen zeigen einen Verlauf entsprechend einer \sqrt{t} -Kinetik, wobei die Übereinstimmung bei einem Glucosegehalt von 20% (w/w) besser ist als bei einem Glucosegehalt von 10% (w/w). Die Freisetzungsrates der gegossenen Folienscheiben beträgt bei einem Glucosegehalt von 10% (w/w) $1,05 (\pm 0,09) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$ und bei einem Glucosegehalt von 20% (w/w) $6,02 (\pm 0,25) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$.

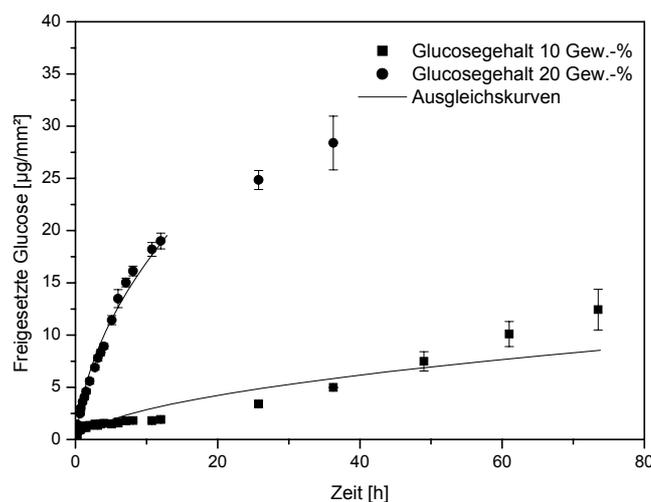


Abb. 7: Flächenbezogene Freisetzung von Glucose aus gegossenen Silikon-elastomerdisk. Die Glucosegehalte betragen 10% und 20% (w/w).

Von den Oberflächen der gegossenen Folien wurden REM-Aufnahmen vor und nach der Freisetzung der enthaltenen Glucose angefertigt. Abbildung 8 zeigt die REM-Aufnahmen der Folien im Überblick. Die in der Abbildung oben dargestellten Folienoberflächen wurden vor der Freisetzung der enthaltenen Glucose aufgenommen. Links sind die Oberflächen von Folien mit einem Gehalt von 10% (w/w) Glucose und rechts die Oberflächen von Folien mit einem Gehalt von 20% (w/w) Glucose dargestellt. Beide Folien zeigen eine glatte, wenig strukturierte Oberfläche. Die in der Abbildung unten dargestellten Folienoberflächen zeigen tiefe Kavitäten und Poren

nach der erfolgten Freisetzung der Glucose. Die in der Abbildung links unten gezeigte Oberfläche der Oberseite einer Folie mit einem Ausgangsglucosegehalt von 10% (w/w) ist nur wenig glatter als die rechts unten dargestellte Oberfläche einer Folienoberseite mit einem Ausgangsglucosegehalt von 20% (w/w).

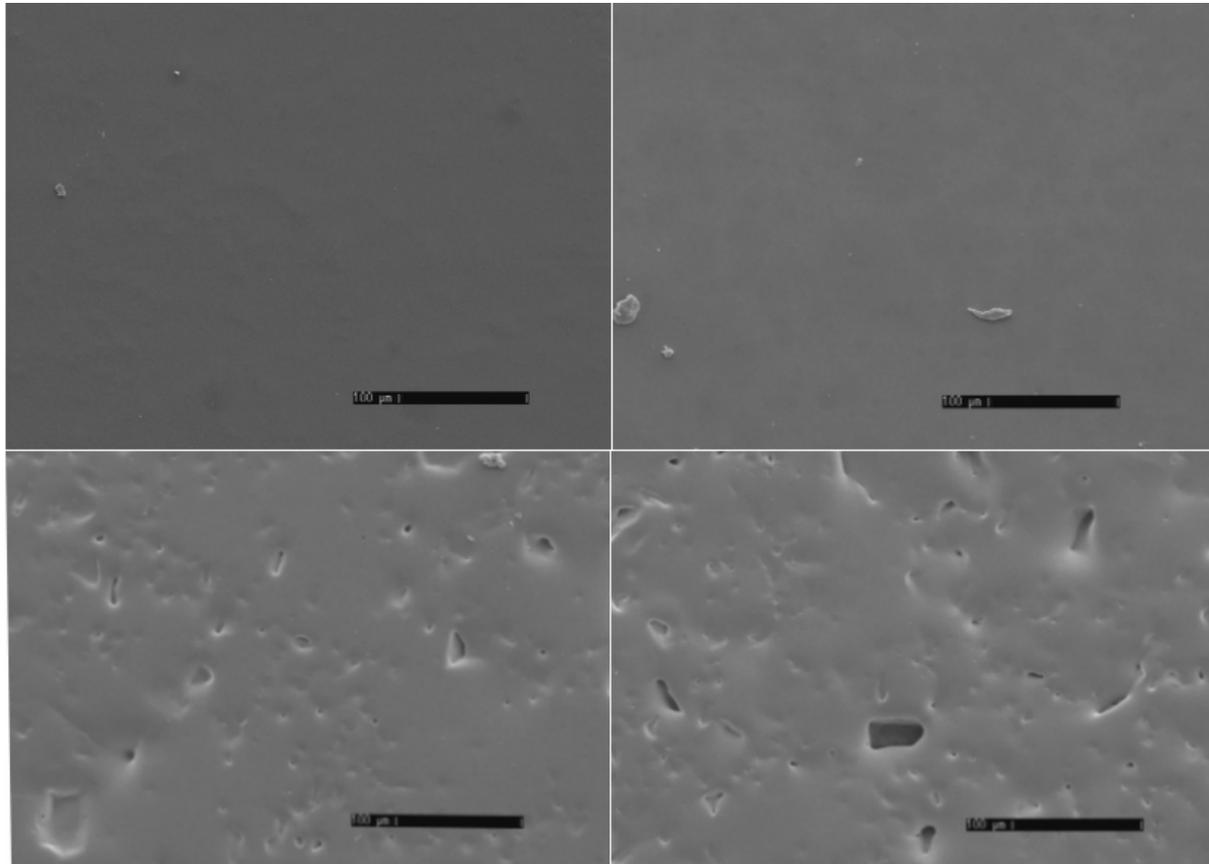


Abb. 8: REM-Aufnahmen der Oberflächen der Oberseite gegossener Silikonelastomerdisks. Die Silikonelastomerdisks wurden vor (oben) und nach (unten) erfolgter Freisetzung der enthaltenen Glucose aufgenommen. Die Glucosegehalte betragen 10% (w/w) (links) und 20% (w/w) (rechts).

Von den tiefen Kavitäten, die in Abbildung 8 unten für beide Glucosegehalte erkennbar sind, wird angenommen, dass sie von aufgelösten Glucosepartikeln verursacht werden. Sie sind unregelmäßig geformt und etwa 50 µm groß. Die aufgelösten Glucosepartikel waren offensichtlich nur von einer dünnen Silikonschicht überdeckt.

Die bei der Fermentation von Mikroorganismen verwendeten Kulturmedien enthalten in unterschiedlichem Umfang Salze. Diese können die Freisetzung der Glucose durch den im Freisetzungsmedium herrschenden osmotischen Druck beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Freisetzung von Glucose aus gegossenen Folien

gegen verschiedene Salzkonzentrationen im Freigabemedium getestet. Als entscheidend für eine Beeinflussung der Freisetzung(-raten) wurde der von den im FreisetzungsmEDIUM vorliegenden Salzen aufgebaute osmotische Druck und nicht die Art oder Ladung der Salze angesehen. Deshalb wurden NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration als Modellmedien als FreisetzungsmEDien getestet. Für die Freisetzung von Glucose aus SilikonelastomerdiskS wurden NaCl-Lösungen von 6 und 12 g/L überprüft. Es wurden gegossene Folienscheiben mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 9 als flächenbezogene Freisetzung von Glucose über der Zeit dargestellt.

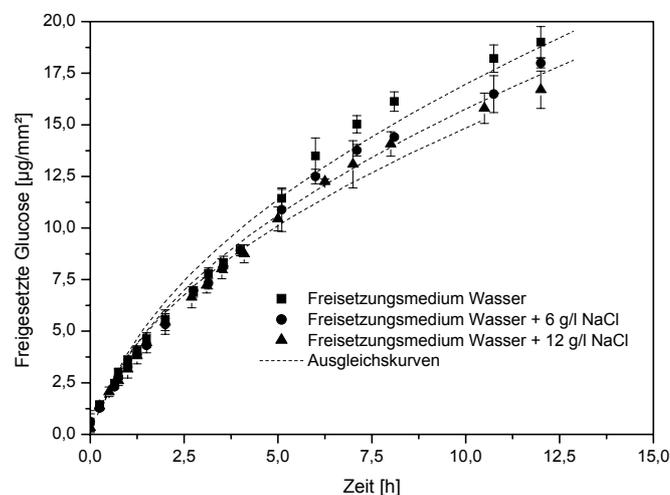


Abb. 9: Freisetzung von Glucose aus gegossenen SilikonelastomerdiskS mit Glucosegehalten von 20% (w/w) bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des FreisetzungsmEDIUMS. Es wurde NaCl-Konzentrationen im FreisetzungsmEDIUM von 6 und 12 g/L eingestellt.

Es wurde eine Abnahme der Freisetzungsraten bei höheren Salzkonzentrationen beobachtet. Die Freisetzungsrates fällt von $6,02 (\pm 0,25) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$ beim salzfreien FreisetzungsmEDIUM auf $5,55 (\pm 0,20) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$ bei einem Salzgehalt von 6 g/L NaCl und auf $5,10 (\pm 0,14) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$ bei einem Salzgehalt von 12 g/L NaCl. Es wurde in allen Fällen eine \sqrt{t} -Kinetik beobachtet.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass bei den Freisetzungssystemen ein Einfluss des Salzgehaltes des FreisetzungsmEDIUMS zu erkennen ist. Dies muss bei der Übertragung der Ergebnisse von den Freisetzungsexperimenten auf den Einsatz in der Zellkultur berücksichtigt werden. Im Zweifel müssen die Freisetzungsraten

raten im tatsächlich verwendeten Kulturmedium nochmals experimentell ermittelt werden.

4.2.4. Untersuchungen an gerakelten Folien

Im Anschluss wurde die Freisetzungsrates von gerakelten Silikonelastomerdisks bestimmt. Es wurden Silikonelastomerdisks mit einem Gehalt von 20% (w/w) Glucose hergestellt und die Freisetzung untersucht. In Abbildung 10 sind zwei parallele Experimente dargestellt als flächenbezogene Freisetzung von Glucose gegen die Zeit. In beiden Fällen wurde eine lineare Kinetik beobachtet. Die Freisetzungsrates der Folienscheiben waren vergleichbar und lagen bei näherungsweise $0,29 \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{h})$ ($0,29 (\pm 0,01) \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{h})$ für (A) und $0,29 (\pm 0,02) \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{h})$ für (B)).

Der Anfangsbereich der Abbildung 10 dargestellten Freisetzungsexperimente zeigt eine höhere Steigung als der weitere Verlauf der Freisetzung. Es wird angenommen, dass dies durch den beim Ausschneiden der Folien entstehenden Randbereich an den Seiten der Folien zustande kommt. In diesem Bereich liegen Partikel teilweise offen, die sich zu Beginn des Freisetzungsexperimentes auflösen. Dieser Randbereich ist bei den 800-900 μm dicken gerakelten Folienscheiben erheblich größer als bei den nur 150 bis 250 μm dicken gegossenen Folienscheiben. Der im Bereich der starken Steigung der Kurve zu Beginn der Freisetzung freigesetzte Anteil am gesamten Glucosegehalt beträgt zwischen 2-5%, dies entspricht in etwa dem Anteil an Glucose der rechnerisch auf den Randbereich der Folien entfallen sollte. Deshalb wird angenommen, dass hier kein kinetisch relevanter Faktor vorliegt.

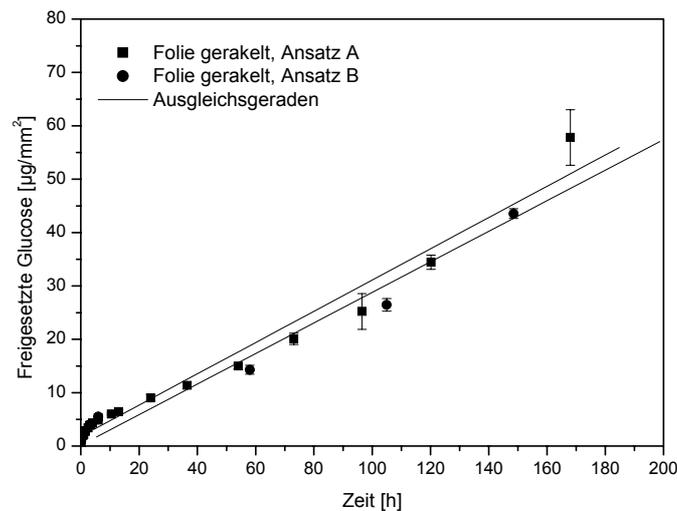


Abb. 10: Freisetzung aus gerakelten Silikonelastomerdisks mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w).

In Abbildung 11 sind REM-Aufnahmen der gerakelten Folienscheiben vor (links) und nach (rechts) der Freisetzung der enthaltenen Glucose in Höhe von 20%(w/w) dargestellt. Die links dargestellte Oberfläche der gerakelten Folie vor der Freisetzung ist glatt und ohne erkennbare Struktur. Nach der Freisetzung der enthaltenen Glucose zeichnen sich auf der Oberfläche Poren und kleine Kavitäten ab, deren Durchmesser bis zu 10 µm beträgt. Die nach der Freisetzung zurückbleibende Strukturierung der Oberfläche hat damit bei den gerakelten Folienscheiben deutlich kleinere Abmessungen als bei den gegossenen Folienscheiben, bei denen die Abmessungen der nach der Freisetzung zurückbleibenden Kavitäten bis zu 50 µm betragen (siehe auch Abb. 8).

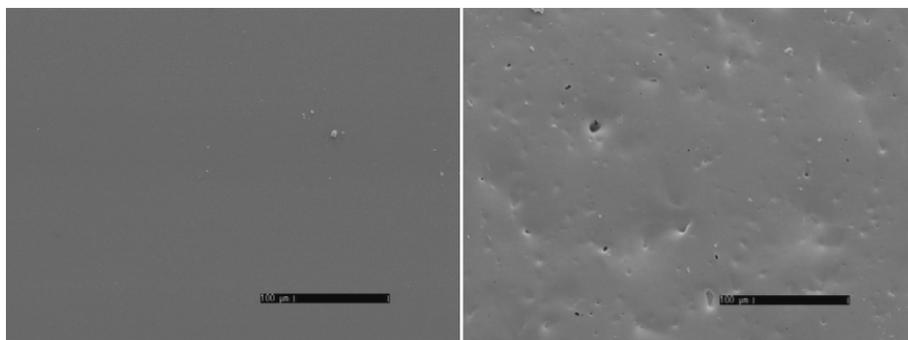


Abb. 11: REM-Aufnahmen der gerakelten Silikonelastomerdisks mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w). Die Oberflächen wurden vor (links) und nach (rechts) erfolgter Freisetzung aufgenommen.

Somit zeigten sich große Unterschiede zwischen gegossenen und gerakelten Folienscheiben mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w).

Da die Freisetzungsraten nicht unmittelbar verglichen werden können, wurden für die gegossenen und gerakelten Folienscheiben die nach den ersten 24 h flächenbezogen freigesetzten Glucosemengen berechnet. Für die gegossenen Folienscheiben wird eine freigesetzte Glucosemenge von 27,44 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ermittelt, für die gerakelten Folienscheiben liegt die freigesetzte Glucosemenge bei 8,86 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ (A) bzw. 7,04 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ (B). Damit zeigen die gegossenen Folienscheiben eine mehr als dreimal so schnelle Freisetzung der enthaltenen Glucose als die gerakelten. Dies kann auf den höheren Anteil von Glucosepartikeln zurückgeführt werden, die in den gegossenen Folienscheiben unmittelbar unter der Foliensoberfläche liegen und der insgesamt kürzeren Weglänge, die von der diffundierenden Glucose in den dünneren gegossenen Folienscheiben zurückgelegt wird.

Die gegossenen Folien waren erheblich dünner (150-250 μm gegenüber 800-900 μm) und die eingearbeiteten Glucosepartikel liegen teilweise nur wenige Mikrometer unterhalb der Oberfläche der Silikonelastomerdisk. Die von den aufgelösten Glucosepartikeln zurückbleibenden Kavitäten in der Foliensoberfläche wurden in den REM-Aufnahmen sichtbar und zeigten bei gegossenen Folienscheiben deutlich größere Abmessungen als bei gerakelten Folienscheiben (50 μm gegenüber 10 μm). Weiterhin muss für die gegossenen Folien eine erhebliche Sedimentation der Glucosepartikel angenommen werden. Diese führt zur Anreicherung von Glucosepartikeln an der Unterseite der gegossenen Folien und daraus resultierend einer inhomogenen Verteilung der Partikel.

Die strukturellen Unterschiede zwischen gegossenen und gerakelten Silikonelastomerdisk schlagen sich in den unterschiedlichen Freisetzungsraten und der unterschiedlichen Freisetzungskinetik nieder. Die konstante Freisetzungsrate der gerakelten Folienscheiben ist ein Indiz für einen Einfluss von Quellungsprozessen an der Freisetzungskinetik, die in der Regel lineare Kinetiken hervorrufen. Bei den gegossenen Folien wurde ein gegebenenfalls stattfindender Quellungsprozess überlagert von der wesentlich schneller stattfindenden Freisetzung der Glucose durch die Auflösung der oberflächennah liegenden Glucosepartikel und der Diffusion weiterer Glucose durch entstehende Poren und die offen liegenden Kavitäten. Die Unterschiede zwischen gegossenen und gerakelten Folien zeigen, dass sowohl eine

Freisetzung durch Diffusion der Glucose durch wassergefüllte Poren in der Silikonmatrix als auch durch Quellung und Rissbildung in der Silikonmatrix stattfindet. Beide Faktoren spielen bei der Freisetzung der Glucose eine Rolle und durch Unterschiede wie die Gleichverteilung der Glucosepartikel oder die Dicke der Silikonmatrix kann der eine oder andere überwiegen. Es wurde deshalb im Projektverlauf entschieden, die Arbeiten mit gerakelten Folien fortzuführen.

4.2.5. Untersuchungen an Deep-Well-Platten

Während bei den bisherigen Untersuchungen die Freisetzungssysteme frei im FreisetzungsmEDIUM suspendiert vorlagen, wird das Freisetzungssystem in MTP am Boden immobilisiert. Es steht daher nur an der Oberseite mit dem FreisetzungsmEDIUM in Kontakt. Daraus resultiert ein entscheidender Unterschied zur Verwendung von Folienscheiben: die absolut freigesetzte Glucosemenge kann nicht durch die Verwendung von mehr oder weniger Material (Folienscheiben) angepasst werden, da die Oberfläche, die im Kontakt zum MEDIUM steht, nicht verändert wird. Gängige Glucosekonzentrationen bei der Batch-Kultivierung von mikrobiellen Kulturen im Primär-Screening liegen im Bereich von 10-20 g/L Kulturmedium. Umgerechnet auf die Füllmenge der Mikrotiterplatten (500 µl) müssen also 5-10 mg Glucose pro Kavität innerhalb der ersten 24 h freigesetzt werden. Daraus ergibt sich eine angestrebte Freisetzungsrate (unter Berücksichtigung der geometrischen Gegebenheiten der Kavitäten) von 2,9 bis 5,9 µg/mm²*h bzw. einer freigesetzten Glucosemenge von 70 bis 142 µg/mm² nach 24 h. Die Folienscheiben hatten bei Glucosegehalten von 20% (w/w) innerhalb der ersten 24 h flächenbezogen eine Glucosemenge von 27,44 µg/mm² (gegossene Folienscheiben) bzw. maximal 8,86 µg/mm² (gerakelte Folienscheiben) freigesetzt. Daraus war ersichtlich, dass die angestrebten Freisetzungsraten mit Glucosegehalten von bis zu 20% (w/w) nicht zu erzielen waren. Es wurde der Versuch unternommen, durch höhere Glucosegehalte eine höhere Freisetzungsrate zu erzielen.

Es wurde die Freisetzung von Glucose aus Bodenkörpern von Mikrotiterplatten mit Glucosegehalten von 20-50% (w/w) untersucht. In Abbildung 12 wurde die flächenbezogene Freisetzung von Glucose bei Gehalten von 20, 30, 40 und 50% (w/w) gegen die Zeit aufgetragen. Alle vier Kurven entsprechen einer \sqrt{t} -Kinetik. Besonders auffallend ist der dramatische Anstieg in der Freisetzungsrate zwischen einem

Gehalt von 40% (w/w) und einem Gehalt von 50% (w/w) Glucose. Die Bodenkörper mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) zeigten eine Freisetzungsrates von $2,39 (\pm 0,29) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$, die den Werten der gerakelten Folienscheiben vergleichbar ist. Die nach den ersten 24 h freigesetzte Glucosemenge lag bei den Bodenkörpern der Mikrotiterplatten mit einem Gehalt von 20% (w/w) Glucose mit $14,66 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ etwas höher als die mit vergleichbaren gerakelten Folienscheiben erzielte Menge (maximal $8,86 \mu\text{g}/\text{mm}^2$), dies ließ sich auf das am Rand der Kavitäten anhaftende Material zurückführen, dessen Oberfläche bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden konnte. Die Freisetzungsrates steigt bei einem Glucosegehalt von 30% (w/w) auf $7,55 (\pm 0,20) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$ und bei einem Glucosegehalt von 40% (w/w) auf $12,17 (\pm 0,54) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$. Bei einem Glucosegehalt von 50% (w/w) wurde ein enormer Anstieg auf $63,14 (\pm 3,39) \mu\text{g}/(\text{mm}^{2*}\sqrt{\text{h}})$ beobachtet. Die enorme Steigerung der Freisetzungsrates zwischen einem Glucosegehalt von 40 und 50% (w/w) wurde hinsichtlich einer möglichen Durchsickerung der Silikonmatrix genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden neben den bereits vorhandenen Untersuchungen mit Gehalten von 20, 30, 40 und 50% (w/w) auch noch Bodenkörper mit Gehalten von 42, 44 und 47% (w/w) untersucht.

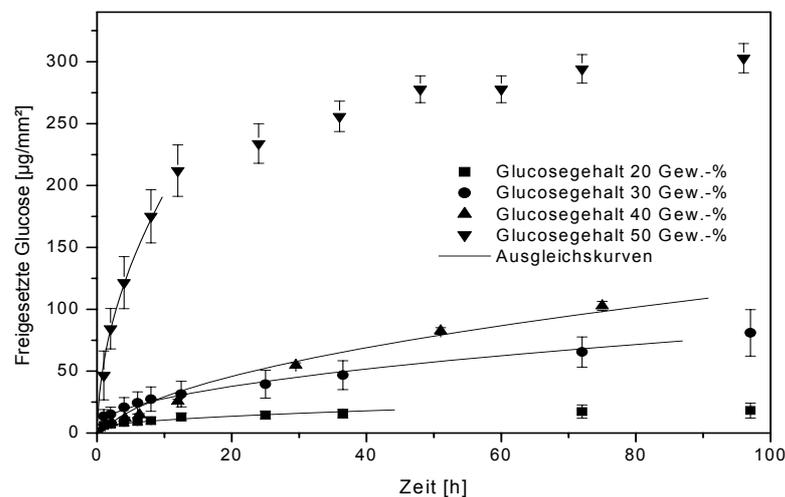


Abb. 12: Freisetzung von Glucose aus den Bodenkörpern von Mikrotiterplatten. Es wurden Glucosegehalte von 20, 30, 40 und 50% (w/w) untersucht. Die Messpunkte entsprechen dem Durchschnitt aus 72 Kavitäten (40% (w/w) Glucose) bzw. 18 Kavitäten (20, 30 und 50% (w/w) Glucose).

Abbildung 13 zeigt die bereits bestimmten und die zusätzlich gemessenen Freisetzungsraten von Bodenkörpern mit Glucosegehalten von 20 bis 50% (w/w). Der enorme Anstieg in der Freisetzungsrates zwischen 40 und 50% (w/w) kann gut mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben werden. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve liegt bei 43,0% (w/w) und stellt den Punkt dar, an dem die Durchsickerungsschwelle überschritten wird.

Die Durchsickerungsschwelle wurde anhand des sogenannten "soft-sphere" Modell berechnet (Moore, 1976), dazu wurde für einen weiten Volumenbereich von Wirkstoffpartikeln in einer Matrix berechnet, wie groß die Anzahl nächster Nachbarn ist, mit denen ein Partikel in Kontakt steht. Es lässt sich der Punkt berechnen, an dem alle Partikel mit mindestens einem Nachbarn in Kontakt stehen. Die ist bei einem Anteil von 33% (w/v) der Fall. Unter Berücksichtigung der Dichten kann für das hier untersuchte System aus Glucosepartikeln in einer Siliconmatrix der Anteil von 33% (w/v) auf einen Glucosegehalt von 42,3% (w/w) umgerechnet werden. Dies entspricht hervorragend dem experimentell bestimmten Durchsickerungsschwellwert von 43,0% (w/w).

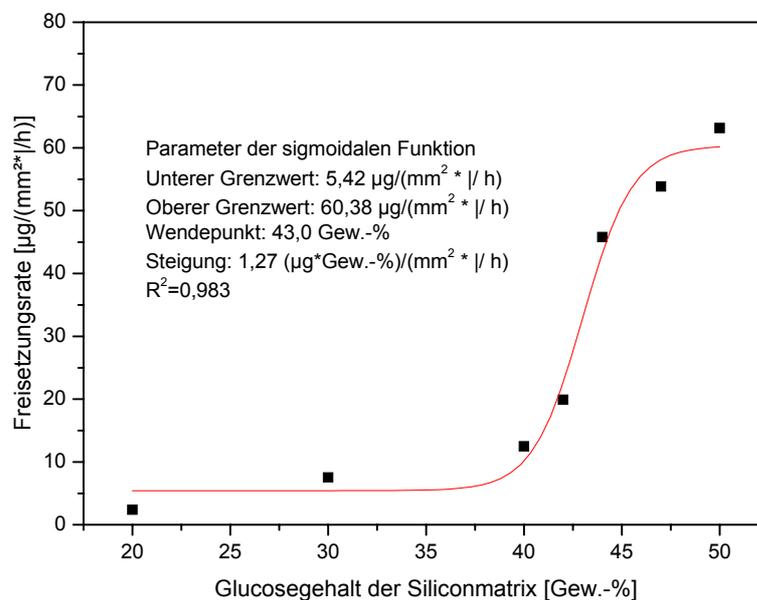


Abb. 13: Freisetzungsrates der Bodenkörper in den Mikrotiterplatten bei Glucosegehalten von 20 bis 50% (w/w).

Als Konsequenz für die weitere Entwicklung der Freisetzungssysteme muss festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Freisetzungsrates über den eingesetzten Glucosegehalt nur bis zu einem Glucosegehalt von ca. 40% (w/w) möglich ist, da mit Annäherung und Überschreiten der Durchsickerungsschwelle die Kontrolle der Freisetzungsrates durch die Polymermatrix entfällt.

Die Untersuchungen an Deep-Well-Platten wurden im letzten Viertel des Projektes aufgenommen und werden in einem anschließenden Projekt fortgeführt.

4.2.6. Partikelgröße der Glucose

Für den beschriebenen Mechanismus ist ein Einfluss der Partikelgröße der eingesetzten Substanz auf die Freisetzungsrates zu erwarten (Schirrer et al., 1992). Dies wurde anhand von gerakelten Folien, die 20% (w/w) Glucose in Partikelgrößen zwischen 20 und 50 µm, 100 und 200 µm sowie 200 und 300 µm enthielten, untersucht. Dabei wurde eine deutliche Beschleunigung der Freisetzungsrates mit größeren Partikeldurchmessern gefunden (siehe auch Zwischenbericht).

4.2.7. Untersuchung des Einflusses von Zuschlägen

Für das vorliegende Projekt wurden Bariumsulfat-Partikel, Aerosil-Partikel und Polyvinylalkohol-Partikel als Zuschläge untersucht.

Bariumsulfat

Bariumsulfat wurde aufgrund seiner hohen Dichte von 4,5 g/cm³ ausgewählt, die es ermöglicht, die Silikonmatrix mit einem geringen Anteil an Bariumsulfat von 5% (w/w) zu beschweren. Dadurch sinken die Silikonelastomerdisketten auch in konzentrierten salzhaltigen Medien ab. Bariumsulfat wird in der Medizin als Röntgenkontrastmittel eingesetzt, da es neben seiner hohen Röntgendichte eine feine Verteilung in Suspensionen und wichtiger noch keine Toxizität aufweist. Bariumsulfat gehört zur Kategorie der nichtverstärkenden Füllstoffe, die sich durch schwache Wechselwirkungen mit dem Silikon auszeichnen (Tomanek, 1990).

Es wurden gerakelte Silikonelastomerdisketten mit Glucosegehalten von 20% (w/w) und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) hergestellt. Das Bariumsulfat wurde in

Partikelgrößen von $<20\ \mu\text{m}$, $20\text{-}50\ \mu\text{m}$ und $50\text{-}100\ \mu\text{m}$ eingesetzt, um zu untersuchen, ob ein Einfluss der Partikelgröße auf die Freisetzungsrates der enthaltenen Glucose feststellbar ist. Weiterhin wurden gerakelte Silikonelastomerdisk mit Glucosegehalten von 30% (w/w) und 5% (w/w) Bariumsulfat mit Partikelgrößen zwischen $20\text{-}50\ \mu\text{m}$ und Bodenkörper in Mikrotiterplatten ebenfalls mit Glucosegehalten von 20 und 30% (w/w) und einem Gehalt an Bariumsulfat von 5% (w/w) mit Partikelgrößen zwischen 20 und $50\ \mu\text{m}$ hergestellt.

In Abbildung 14 ist die Freisetzung gerakelter mit 5% (w/w) Bariumsulfat und 20% (w/w) Glucose hergestellter Silikonelastomerdisk dargestellt. Aufgetragen wurde die flächenbezogene Freisetzung gegen die Zeit. Für die Freisetzungskinetik wurde in allen drei Fällen eine Übereinstimmung mit einer linearen Kinetik gefunden. Dies entspricht den Ergebnissen, die für gerakelte Silikonelastomerdisk ohne Zuschläge und mit Glucosegehalten von 20% (w/w) gefunden wurden, die ebenfalls eine lineare Freisetzungskinetik zeigten. Die Freisetzungsrates der gerakelten Silikonelastomerdisk mit Glucosegehalten von 20% (w/w) variiert unabhängig von der Partikelgröße des Bariumsulfats zwischen $0,64$ und $0,68\ \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{h})$ innerhalb des Fehlerbereiches der ermittelten Werte.

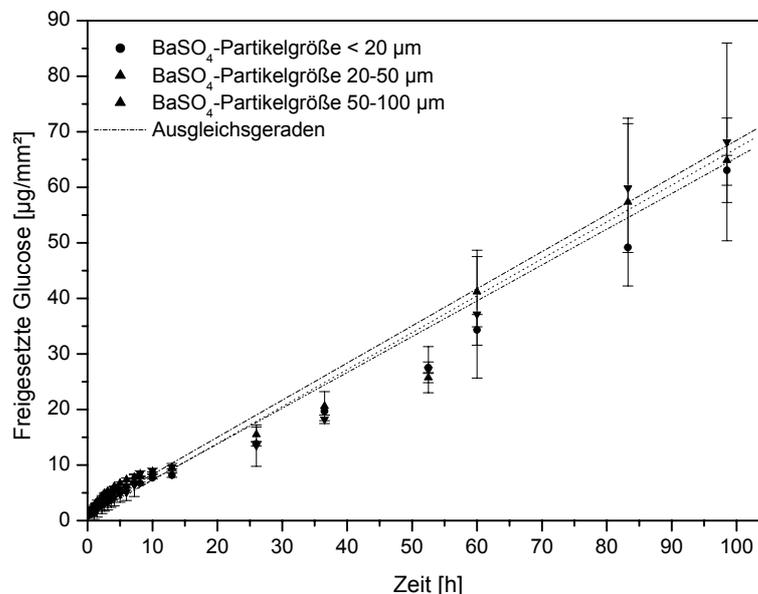


Abb. 14: Freisetzungskurven der mit BaSO₄ in verschiedenen Partikelgrößen versetzten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w).

Die Freisetzungsraten der mit Bariumsulfatpartikeln hergestellten Silikonelastomerdisks mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) liegen erheblich höher als die für vergleichbare gerakelte Folien mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) gemessene Freisetzungsraten (durchschnittlich $0,29 \mu\text{g}/\text{mm}^2\cdot\text{h}$). Dies wurde aufgrund der schwachen Wechselwirkungen zwischen der Silikonmatrix und den zugefügten Bariumsulfat-Partikeln erwartet.

Neben den gerakelten Silikonelastomerdisks mit Gehalten von 20% (w/w) Glucose wurden auch gerakelte Silikonelastomerdisks mit Gehalten von 30% (w/w) Glucose und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) in Partikelgrößen zwischen 20-50 μm untersucht. Da für die Bariumsulfatpartikel aufgrund der hohen Dichte von $4,5 \text{ g}/\text{cm}^3$ mit einer besonders hohen Sedimentationsgeschwindigkeit zu rechnen ist, wurde mit einer Anreicherung der Bariumsulfatpartikel auf der Unterseite der Folien gerechnet. Da die Freisetzung der Glucose aus den Silikonelastomerdisks durch die Bariumsulfatpartikel beschleunigt wird, wurde eine unterschiedliche Freisetzungsraten für die Folienoberseite und die Folienunterseite der gerakelten Silikonelastomerdisks erwartet. Deshalb wurde im Fall der gerakelten Silikonelastomerdisks mit Glucosegehalten von 30% (w/w) und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) die Freisetzung der enthaltenen Glucose auch von der sonst abgeklebten Folienunterseite her untersucht wobei die Folienoberseite abgeklebt wurde.

In Abbildung 15 ist die flächenbezogene Freisetzung von Glucose der gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) sowohl von der Folienoberseite als auch von der Folienunterseite gegen die Zeit dargestellt. In beiden Fällen wurde eine Übereinstimmung mit einer \sqrt{t} -Kinetik beobachtet. Es wurde insbesondere zu Beginn der Freisetzung ein Unterschied in der Freisetzungsraten der Folienseiten beobachtet. Es wurde für die Freisetzung der Glucose von der Folienoberseite eine Freisetzungsraten von $10,92 (\pm 0,25) \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\sqrt{\text{h}})$ und von der Folienunterseite eine Freisetzungsraten von $14,28 (\pm 0,47) \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\sqrt{\text{h}})$ beobachtet.

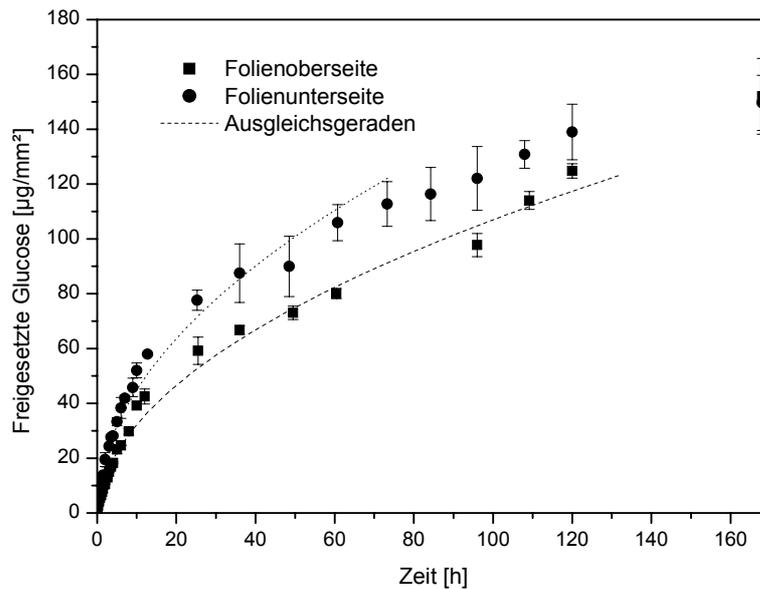


Abb. 15: Freisetzung der gerackelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) und Zusatz von 5% (w/w) Bariumsulfat. Untersucht wurde die Freisetzung der Glucose jeweils über die Folieoberseite bzw. Folieunterseite.

Bei den gerackelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) wurde gegenüber den Freisetzungsraten einer entsprechenden Silikonmatrix ohne Bariumsulfat ebenfalls eine Erhöhung der Freisetzungsrates festgestellt. Die Freisetzungsrates von Bodenkörpern in Mikrotiterplatten mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) wurde mit $7,55 \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$ bestimmt.

Im Anschluss wurde die Freisetzung von Glucose aus Bodenkörpern in Mikrotiterplatten mit Glucosegehalten von 20 und 30% (w/w) Glucose und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) mit Partikelgrößen von 20-50 μm untersucht. Abbildung 16 zeigt die Freisetzung von Glucose als flächenbezogene Glucosemenge gegen die Zeit für die Bodenkörper in Mikrotiterplatten mit Glucosegehalten von 20 und 30% (w/w). Für die Bodenkörper mit einem Gehalt von 20% (w/w) Glucose zeigt sich eine nur geringfügig bessere Übereinstimmung mit einer \sqrt{t} -Kinetik als mit einer linearen Kinetik ($r = 0,988$ gegenüber $r = 0,984$), die Freisetzungsrates wurden mit $3,81 (\pm 0,20) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$ bestimmt. Die Freisetzung aus Bodenkörpern mit einem Glucosegehalt von 30% (w/w) entspricht einer \sqrt{t} -Kinetik und die Freisetzungsrates wurde mit $12,17 (\pm 0,54) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$ bestimmt.

Die Freisetzungsrates der Bodenkörper mit einem Gehalt von 20% (w/w) wurde aufgrund der unterschiedlichen Freisetzungskinetik mit der Freisetzungsrates der entsprechenden gerakelten Silikonelastomerdisk vereinfacht über die nach 24 h erreichte freigesetzte Glucosemenge verglichen. Diese lag bei einer mit 20% (w/w) Glucose und 5% (w/w) BaSO₄ hergestellten Silikonelastomerdisk bei 16,1 µg/mm² und wurde für die Bodenkörper der Mikrotiterplatten mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w) mit 15,91 µg/mm² bestimmt. Somit kann eine gute Übereinstimmung für die Freisetzungsrates festgestellt werden. Die Freisetzungsrates der Bodenkörper mit einem Gehalt von 30% (w/w) Glucose liegt mit 12,17 µg/(mm²·√h) wenig über dem Wert, der für eine Silikonelastomerdisk von der Folienoberseite mit 10,919 µg/(mm²·√h) berechnet wurde. Da die Oberfläche der Bodenkörper nur aus der Bemaßung der Kavitäten bestimmt wurde und die Vergrößerung der Oberfläche durch Ränder unberücksichtigt blieb, ist die Übereinstimmung als gut anzusehen.

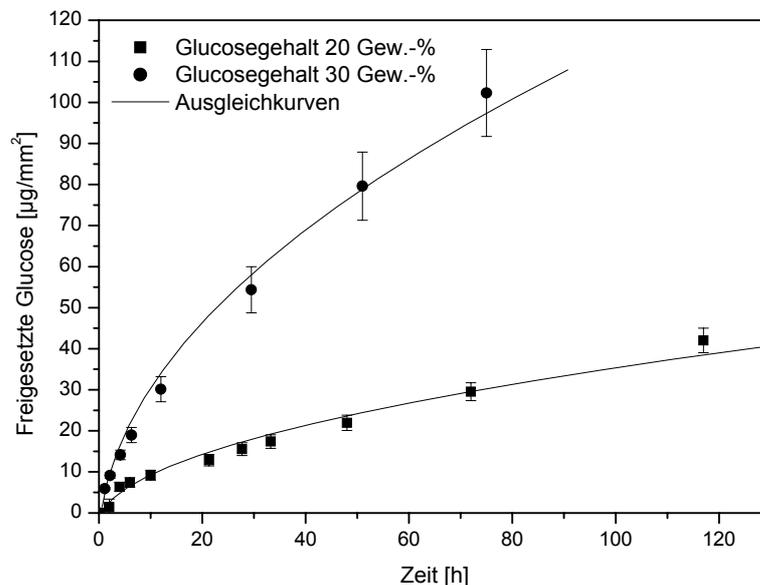


Abb. 16: Freisetzung von Glucose aus den Bodenkörpern von Mikrotiterplatten. Die Freisetzungssysteme enthielten neben 20 und 30% (w/w) Glucose noch 5% (w/w) Bariumsulfat. Die Messpunkte entsprechen dem Durchschnitt aus 72 Kavitäten.

Somit konnte festgestellt werden, dass durch die Zugabe von Bariumsulfat zur Silikonmatrix ein Einfluss auf die erzielte Freisetzungsrates erreicht wurde. Der

Einfluss, der zu einer Erhöhung der Freisetzungsrates führt, wurde auf die Schwächung der Silikonmatrix durch die schwachen Wechselwirkungen zwischen Silikonmatrix und eingelagerten Bariumsulfatpartikeln zurückgeführt.

Aerosil

Aerosile sind pyrogene Silikate extrem kleiner Partikelgrößen (im Nanometerbereich), die hohe spezifische Oberflächen aufweisen und starke Wechselwirkungen mit dem Silikon erwarten lassen. Bei mit 5% (w/w) Aerosil 300 versetzten gerakelten Folien zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Freisetzungsrates gegenüber Silikonfolien ohne Zuschläge.

Poly(vinylalkohol)

Polyvinylalkohole bilden mit Wasser Hydrogele und werden in der Medizin in den verschiedensten Zusammenhängen eingesetzt. Es wurde aufgrund der Quellung des Materials eine Beschleunigung der Freisetzung erwartet, bei gegossenen Folien wurde jedoch eine geringfügige Erniedrigung der Freisetzungsrates gefunden. Die Arbeiten werden im anschließenden Projekt an gerakelten Folien fortgeführt.

4.2.8. Beschichtungen

Die Zielsetzung der Beschichtung von glucosehaltigen Folien war die Erzeugung einer sogenannten Lag-phase, d.h. eine Verzögerung des Starts der Freisetzung. Dabei soll das für die Beschichtung verwendete Material zunächst das Eindringen von Wasser in die Hauptmasse des Freisetzungssystems verhindern. Zwei Ansätze wurden dabei verfolgt: Zum einen wurden hydrophobe Materialien aufgebracht. Hier stand die Überlegung im Vordergrund, die Hauptmasse gegen das Eindringen von Wasser zu schützen. Zum anderen wurde eine Beschichtung mit hydrophilen, hydrogelbildenden Materialien vorgenommen. Hier sollte durch die vorgelagerte Quellung der Schicht eine zweiphasige Freisetzung erzielt werden. Für den ersten beschriebenen Weg wurde das schon für die Herstellung der Freisetzungssysteme verwendete Siloxan zusätzlich auf die Folien aufgebracht sowie eine Beschichtung mit Paracyclophanen mittels CVD Technik erprobt.

4.2.9. Silikon

Die einfachste mögliche Beschichtung der silikonbasierten Freisetzungssysteme ist eine zusätzliche Silikonschicht auf den Folien. Die Beschichtung wurde auf die schon als Disks präparierten Folien auf die nicht abgeklebte Seite aufgebracht. Die Masse der Beschichtung wurde gravimetrisch bestimmt und die Dicke der Schicht daraus berechnet. Es wurden Silikonmembranen von ca. 100 μm und ca. 180 μm Dicke auf die Silikonelastomerdisks aufgebracht. Zusätzlich wurden Silikonelastomerdisks präpariert, bei der die ca. 90 μm dicke Silikonmembran mit 10% (w/w) Glucose angereichert wurde.

In Abbildung 17 ist für die drei Membranvarianten die flächenbezogene Freisetzung der Glucose dargestellt gegen die Zeit. Die eingesetzte Grafik zeigt die Freisetzung von Glucose aus Silikonelastomerdisks, die mit einer ca. 90 μm dicken mit Glucose angereicherten Silikonmembran beschichtet wurden, über einen Zeitraum von 0-7 h. Bei diesen Silikonelastomerdisks wurden die ersten 4 h des Freisetzungszeitraumes gesondert betrachtet. Die Freisetzungskinetik wurde für die ersten 4 h der Freisetzung einer \sqrt{t} -Kinetik zugeordnet. Im weiteren Verlauf des Freisetzungszeitraumes wurde eine lineare Freisetzung beobachtet. Für die mit 100 und 180 μm dicken, glucosefreien Silikonmembranen beschichteten Silikonelastomerdisks mit 20% (w/w) Glucose wurde eine Übereinstimmung mit einer linearen Freisetzungskinetik gefunden.

Die höchste Freisetzungsrates wurde bei den Silikonelastomerdisks erzielt, die mit einer ca. 90 μm dicken und mit 10% (w/w) Glucose angereicherten Silikonmembran beschichtet wurden. Für die ersten 4 h des Freisetzungszeitraumes wurde eine Freisetzungsrates von 1,07 ($\pm 0,03$) $\mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \sqrt{\text{h}})$ berechnet. Für die im weiteren Verlauf der Freisetzung beobachtete lineare Freisetzung wurde eine Freisetzungsrates von 0,11 ($\pm 0,002$) $\mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$ berechnet. Die Freisetzungsrates ist gegenüber der Freisetzungsrates einer unbeschichteten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) (0,29 ($\pm 0,01$) $\mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$) deutlich erniedrigt. Die ermittelte Freisetzungskinetiken und Freisetzungsrates deuten darauf hin, dass zunächst die in der aufgetragenen Silikonmembran vorhandene Glucose freigesetzt wurde und im Anschluss die Freisetzung der Glucose erfolgte, die in der Silikonelastomerdisk vorhanden war. Dabei wurde die Freisetzungsrates durch die aufgetragene Silikonmembran erniedrigt.

Die Silikonelastomerdisk, die mit einer glucosefreien aber mit ca. 100 μm vergleichbar dicken Silikonmembran beschichtet waren, zeigten eine nochmals geringere Freisetzungsrates von $0,09 (\pm 0,001) \mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$. Die geringste Freisetzungsrates zeigten die Silikonelastomerdisk, die mit einer 180 μm dicken Silikonbeschichtung präpariert wurden ($0,07 (\pm 0,01) \mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$).

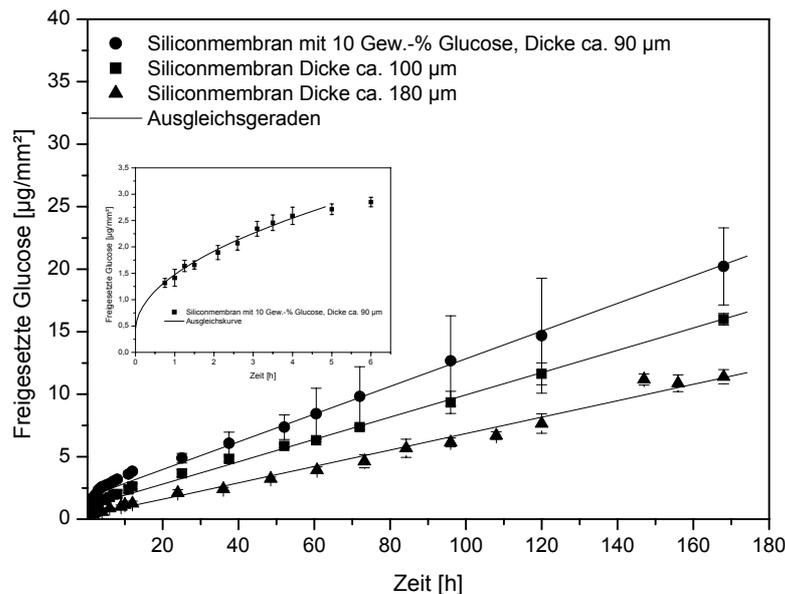


Abb. 17: Freisetzung von Glucose aus mit Silikonmembranen beschichteten gerakelten Silikonelastomerdisk mit 20% (w/w) Glucose. Die "eingeklinkte" Grafik zeigt die Freisetzung von Glucose aus der mit einer ca. 90 μm dicken und mit Glucose angereicherten Silikonmembran beschichteten Silikonelastomerdisk über einen Zeitraum von 0-7 h.

Die Beschichtung mit Silikonmembranen kann somit genutzt werden, um die Freisetzungsrates über die Dicke der aufgetragenen Membran zu kontrollieren.

4.2.10. Paracyclophanbeschichtungen

Die Zielsetzung der Paracyclophanbeschichtungen mittels der *Chemical Vapor Deposition* (CVD) Methode in dem hier vorliegenden Projekt war die Ausrüstung des zugrundeliegenden Matrixsystems mit einer sehr dünnen hydrophoben Membran. Diese sollte im Verlauf der Freisetzung Risse bilden und die Einstellung einer Lag-Phase ermöglichen.

Die CVD-Methode wird eingesetzt, um metallische und polymere Grundkörper mit Oberflächenfunktionalitäten auszustatten und im Anschluss durch weitere Umsetzungen z.B. für einen Einsatz in der Medizin hinsichtlich der Biokompatibilität zu optimieren (Lahann, 2001; Ademovic, 2002; Boeing, 2003).

Zur Beschichtung der Silikonfolien mit Paracyclophanen wurde mit Hilfe des CVD-Prozesses nach Gorham eine Polymerisation von 4-Amino-[2.2]-paracyclophan und unmodifizierten Paracyclophan durchgeführt. Die Dicke der erzeugten Schichten wurde anhand der Beschichtungsdauer und der eingesetzten Monomermenge als relative Dicke berechnet.

Zur Untersuchung der Einflussnahme der Membranen auf die Freisetzung wurde sowohl die Silikonmatrix als auch die Art und Dicke der ppx- bzw. Amino-ppx-Membran variiert. In einem ersten Schritt wurden gerakelte Silikonelastomerdisk mit einem Gehalt von 20% (w/w) Glucose mit jeweils einer dickeren (ca. 130 bzw. 120 nm rel. Dicke) und einer dünneren (ca. 65 bzw. 80 nm) ppx- bzw. Amino-ppx-Membran ausgerüstet. Die Freisetzungskurven der so präparierten Silikonelastomerdisk sind in Abbildung 18 dargestellt als flächenbezogene Glucosefreisetzung gegen die Zeit. Die Freisetzungskurven zeigen in allen Fällen bis ca. 100 h einen linearen Verlauf und unterscheiden sich hinsichtlich der Freisetzungsrates insgesamt nur geringfügig. Bei den 120 und 80 nm dicken Amino-ppx-Membranen wurde ein Burst-Effekt angenommen (siehe auch "eingeklinkte" Graphik in Abbildung 18), wobei die Freisetzung in beiden Fällen bereits nach 2 h in einen linearen Verlauf übergeht. Die Freisetzungsrates wurde im linearen Bereich mit $0,16 (\pm 0,004) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$ bei der 80 nm dicken Amino-ppx-Membran und mit $0,17 (\pm 0,01) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$ bei der 120 nm dicken Amino-ppx-Membran bestimmt. Für alle Freisetzungsexperimente wurde eine Übereinstimmung mit einer linearen Freisetzung gefunden, wobei für die Amino-ppx-beschichteten Folien der Bereich von 0-2 h nicht berücksichtigt wurde. Die Freisetzungskurven verlaufen fast parallel, entsprechend wird eine näherungsweise gleiche Freisetzungsrates gefunden. Für die 65 und 130 nm dicken ppx-Membranen wurde kein Burst-Effekt beobachtet. Die Freisetzungsrates, die für die mit einer 65 nm dicken ppx-Membran beschichteten Silikonelastomerdisk berechnet wurde, lag mit $0,19 (\pm 0,01) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$ nur wenig über der Freisetzungsrates, die für die mit einer 130 nm dicken ppx-Membran beschichteten Silikonelastomerdisk mit $0,16 (\pm 0,01) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$ berechnet wurde.

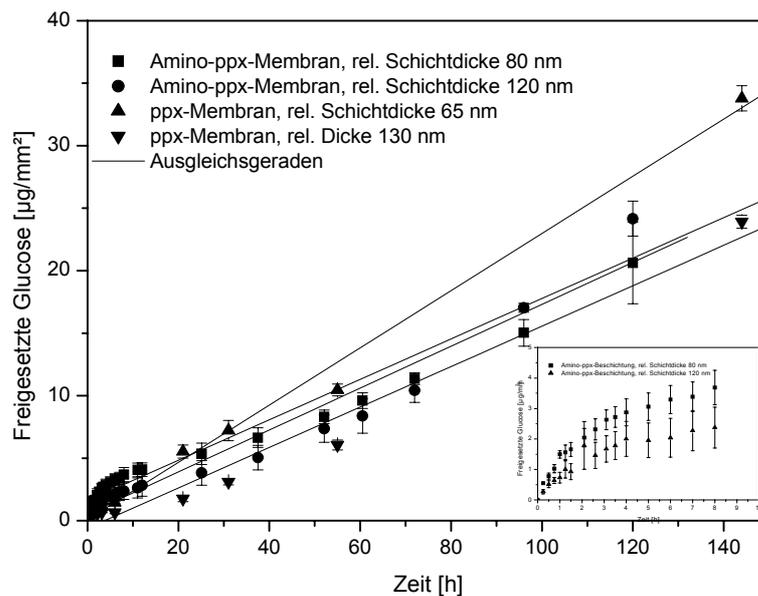


Abb. 18: Freisetzungskurven der mit ppx- bzw. Amino-ppx-Membranen in unterschiedlicher Dicke beschichteten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w). "Eingeklinkt" ist eine Vergrößerung des Zeitraumes von 0-10 h für die Amino-ppx-beschichteten Folien zur Hervorhebung des angenommenen Burst-Effektes.

Für die mit einer Amino-ppx-Membran beschichteten Silikonelastomerdisk wurde untersucht, wie sich die im Verlauf der Freisetzung stattfindende Wasseraufnahme in die Silikonmatrix auf die Membran auswirkt. Infolge der Wasseraufnahme quillt die Matrix und durch die Volumenvergrößerung der Matrix wird die aufliegende Membran gedehnt. Im Fall der Amino-ppx und ppx-Membranen könnte diese Dehnung Risse in der Membran oder eine Ablösung verursachen, da die Membranen weder flexibel noch kovalent gebunden sind. Die Beschaffenheit der mit Amino-ppx beschichteten Folienoberflächen wurde nach der Freisetzung der enthaltenen Glucose mit Hilfe von REM-Aufnahmen untersucht. Abbildung 19 zeigt links die REM-Aufnahme der Oberfläche der Silikonelastomerdisk mit einer 65 nm dicken Amino-ppx-Membran und rechts die REM-Aufnahme der Silikonelastomerdisk mit einer 130 nm dicken Amino-ppx-Membran. Es sind tiefe Kavitäten in der Oberfläche erkennbar, die auf von der aufgelösten Glucose zurückgelassene Poren zurückgeführt wurden. Darüber hinaus zeigen die Folienoberflächen Strukturen, die als Faltungen der Amino-ppx-Membran interpretiert werden können. Die entstandenen Faltungen der Membran wurden auf

die im Verlauf der Freisetzung stattfindende Quellung der darunter liegenden Silikonelastomerdisk zurückgeführt, infolge derer die Membran gedehnt und teilweise abgelöst wurde. Die nach den Freisetzungsexperimenten getrockneten Silikonelastomerdisk schrumpfen auf ihre Ausgangsgröße und die aufliegende gedehnte Amino-ppx-Membran wird gestaucht.

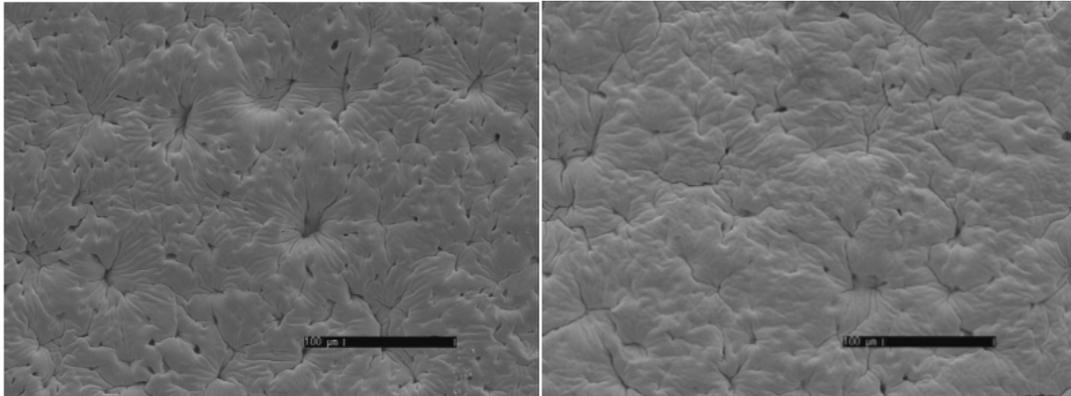


Abb. 19: REM-Aufnahmen der Oberflächen der mit Amino-ppx-Membranen beschichteten Silikonelastomerdisk nach der Freisetzung der enthaltenen Glucose. Die Aufnahme links zeigt die Oberfläche einer Silikonelastomerdisk mit einer 65 nm dicken Amino-ppx-Membran, die Aufnahmen rechts die Silikonelastomerdisk mit einer 130 nm dicken Amino-ppx-Membran.

Im Anschluss wurden gerakelte Silikonelastomerdisk, die neben 20% (w/w) Glucose auch 5% (w/w) Bariumsulfat enthielten, mit 4-Amino-[2.2]-paracyclophan im CVD-Verfahren beschichtet.

Abbildung 20 zeigt die flächenbezogene Freisetzung von Glucose aus gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Gehalt von 20% (w/w) (extrahiert: 21,6% (w/w)) Glucose und einem Bariumsulfatgehalt von 5% (w/w), die mit einer 70 nm dicken Amino-ppx-Membran beschichtet wurden, aufgetragen gegen die Zeit. Es wurde eine lineare Freisetzungskinetik gefunden ($r = 0,99$) mit einer Freisetzungsrates von $0,215 (\pm 0,006) \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$. Bemerkenswert ist, dass die Freisetzungsrates nur wenig über der Freisetzungsrates der ohne Bariumsulfat hergestellten gerakelten Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) liegt ($0,162 \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$), die mit einer 65 nm dicken Amino-ppx-Membran beschichtet wurden.

Für unbeschichtete gerakelte Silikonelastomerdisk mit 20% (w/w) Glucose und 5% (w/w) Bariumsulfat wurde eine Freisetzungsrates von $0,67 \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{h})$ bestimmt.

Durch die Beschichtung mit einer Amino-ppx-Membran wurde die Freisetzungsrates der gerakelten Silikonelastomerdisk auf etwa ein Drittel der Ausgangsrates reduziert.

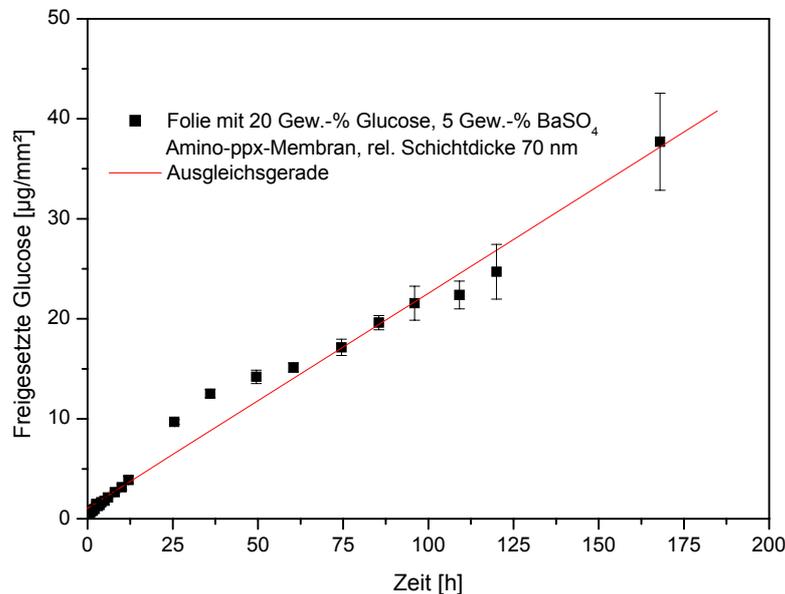


Abb. 20: Freisetzungskurve gerakelter und mit einer Amino-ppx-Membran beschichteter Silikonelastomerdisk mit einem Glucosegehalt von 20% (w/w) Glucose und 5% (w/w) BaSO₄.

Es zeigte sich somit, dass durch funktionalisierte und nichtfunktionalisierte Paracyclophanbeschichtungen keine Lag-Phase erreicht werden kann, durch die Beschichtung können jedoch die Freisetzungsrates deutlich reduziert werden.

4.2.11. Hydrophile Beschichtungen

Für die hydrophile und hydrogelbildende Beschichtung wurden als Materialien Polyvinylalkohol und sternförmig verzweigtes Polyethylenglycol ausgewählt. Die hydrophile Beschichtung sollte vor Beginn der Freisetzung der Glucose aus der beschichteten Silikonmatrix quellen und so eine Lag-Phase verursachen.

Eine einfache Tauchbeschichtung mit Polyvinylalkohol führte leider zu keiner Veränderung gegenüber den unbeschichteten Folien, da die Schicht nicht haftete.

Die Beschichtung mit sternförmig verzweigten Polyethylenglycolen beruht auf einer kovalenten Kopplung der Polymermoleküle der Beschichtung an die Moleküle der

Silikonfolie. Für die Kopplung wird die präparierte Folie in einem Sauerstoffplasma aktiviert, die entstandenen reaktiven Gruppen reagieren mit den reaktiven Gruppen der Polyethylenglycol-Sterne zu einer kovalent gebundenen Beschichtung. Die mit sternförmigen Polyethylenglycolen beschichteten glucosehaltigen Silikonmatrices zeigten über den gesamten Freisetzungszeitraum erheblich reduzierte Freisetzungsraten gegenüber vergleichbaren unbeschichteten Matrices. Dies wurde auf die starke Vernetzung der sternförmigen Polyethylenglycole innerhalb der Beschichtung zurückgeführt. Diese Beschichtungstechnik wurde auch aufgrund des damit verbundenen extrem hohen experimentellen Aufwands nicht weiterverfolgt.

4.2.12. Seitengruppenmodifizierte Siloxane

Als ein sehr vielversprechender Ansatz zur Modifizierung der Freisetzungsraten wurde die Verwendung von seitenkettenmodifizierten Siloxanen gesehen. Erste Voruntersuchungen wurde bereits im Statusbericht angegeben. Die Untersuchungen werden im anschließenden Projekt als eigener Schwerpunkt fortgeführt.

4.3. Einflüsse von Silikonelastomerdiskts auf das Wachstum von *Hansenula polymorpha*

Der Overflow-Metabolismus von *H. polymorpha* (DSM 70277) bei Glucose als einziger Kohlenstoffquelle in MES-gepuffertem Syn6-Medium wird in Abbildung 21 gezeigt. Die Sauerstofftransferrate (OTR) wurde im RAMOS erfasst. Ein Batch mit 20 g/L Glucose wird verglichen mit einem Fed-Batch, bei dem mit Hilfe von 4 Silikonelastomerdiskts Glucose in dem spezifischen Freisetzungsprofil verfüttert wurden.

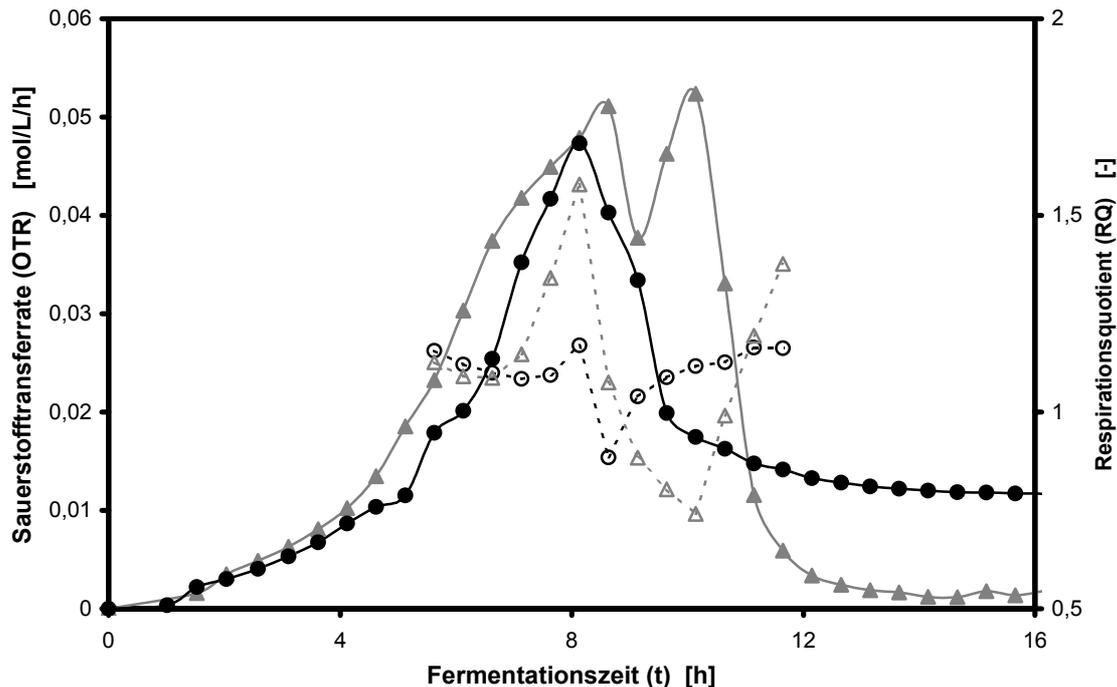


Abb. 21: Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR) und des Respirationsquotienten (RQ) von *H. polymorpha* wt Kulturen in Batch- und Fed-Batch-Betriebsweise. Kulturbedingungen: MES-gepuffertes Syn6-MES-Medium; Glucose als einzige C-Quelle; $\text{pH}_\alpha = 6,4$; $\text{OD}_{600,\alpha} = 0,5$; $T = 37^\circ\text{C}$; $D = 50$ mm; $n = 350$ rpm; $V_L = 12,5$ mL. Fed-Batch mit 4 Silikonelastomerdisk (d = 22 mm; h = 1,8 mm; 20% (w/w) Glc; 5% (w/w) BaSO_4). Batch mit 20 g/L direkt verfügbarer Glucose. OTR: Fed-Batch (●), Batch (▲); RQ: Fed-Batch (○), Batch (△).

In beiden Experimenten steigt die Sauerstofftransferrate mit dem Glucoseverbrauch an bis auf ein Maximum (OTR_{max}) von 0,048 mol/L/h nach 8,5 h im Fed-Batch und im Batch mit 0,052 mol/L/h nach 9 h Fermentationszeit. Die OTR des Batch fällt auf ein Niveau von 0,038 mol/L/h nach 9 h aufgrund des Verbrauchs von Glucose. Der Organismus stellt seinen Stoffwechsel auf die Oxidation von Ethanol um und zeigt darauf nach 10 h ein zweites OTR_{max} von 0,053 mol/L/h. Das Ethanol wurde unter aeroben Bedingungen während der Verstoffwechslung von Glucose gebildet. Nach der Veratmung von Ethanol fällt die OTR nach 10 h Fermentationszeit bis auf null bei 14 h ab. Im Vergleich zeigt der Fed-Batch während des Abfalls der OTR nach 8 h eine kleine Ausbauchung, welche durch Ethanolkatabolismus hervorgerufen wurde, bevor sie auf ein Niveau von 0,015 mol/L/h aufgrund von Glucoselimitierung fällt. Dieses Plateau verringert sich bis auf eine Versuchszeit von über 40 h (hier nur bis

16 h gezeigt) aufgrund linearen Wachstums von *H. polymorpha* wt und der Verarmung der Disks an Glucose. Insgesamt wurden 33,4 g/L Glucose verfüttert.

Die Limitierung von Glucose hat in dieser Fed-Batch-Fermentation eine Minimierung des Overflow-Metabolismus zur Folge, was im Verlauf des Respirationsquotienten (RQ) ersichtlich wird. Wenn *H. polymorpha* wt unter Glucosekatabolismus wächst, verbleibt das RQ-Signal auf 1,2 aufgrund von Wachstum und Erhaltung der Zellen. Die RQ-Kurve des Batch fällt von 8-11,5 h unter 1,0 auf 0,55, was auf die Präsenz einer weiteren Kohlenstoffquelle deutet (in diesem Fall Ethanol). Durch eine Änderung des Stoffwechsels auf die zweite C-Quelle und Wachstum steigt das Signal über 1,0. Der RQ des Fed-Batch zeigt einen kürzeren Abfall von 1 h auf 0,85, welches ebenfalls auf die Präsenz von Ethanol deutet, jedoch in viel niedriger Konzentration, was durch HPLC-Proben bestätigt wurde (s. auch Abb. 22).

4.4. GFP-Produktion durch *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (p_{FMD}-GFP) in Syn6-MES-Medium

Die Wirkung der Betriebsweise auf die Produktbildung von katabolitreprimierten Mikroorganismen wurde an *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (p_{FMD}-GFP) in MES-gepuffertem Syn6-Medium und in YNB-Medium getestet. Hierbei sind in folgender Abbildung (22) OTR-Kurven von Batch und Fed-Batch verglichen und die erreichten GFP-Ausbeuten im oberen Diagramm aufgetragen.

An der OTR-Kurve ist zu erkennen, dass im Batch wie beim Wildtyp erhöhter Overflow-Metabolismus vorherrscht. Bei Konzentrationen von 40 g/L C-Quelle ist nicht mehr ein Doppelpeak zu erkennen, sondern es resultiert eine Atmung bei der Glucose, Ethanol und Essigsäure ineinander übergreifend metabolisiert werden. Aufgrund von Glucoselimitierung wächst der Fed-Batch langsamer, wobei hier 35 g/L Glucose gefüttert wurden. Im OTR-Verlauf ist nur ein Peak (stehend für Glucose) wegen der Minimierung des Overflow-Metabolismus zu erkennen, der gefolgt von einem Plateau bei 0,017 mol/L/h von 18 h Fermentationszeit bis zum Versuchsende bei 46 h auf 0,008 mol/L/h abfällt.

Die Expression von GFP erfolgt verstärkt unter Glucoselimitierung beim Fed-Batch ab 15 h Fermentationszeit aufgrund von Katabolitderepression. Die GFP-Konzentration im Versuch steigt linear bis zum Ende an. Im Batch wird bei Anwesenheit von hohen Konzentrationen reprimierender Glucose kein GFP gebildet. Die Synthese

beginnt erst beim Ethanolkatabolismus. Die GFP-Ausbeute im Fed-Batch liegt um den Faktor 35 über dem Batch mit 88,0 mg/L zu 2,5 mg/L, wobei im Batch mit 40 g/L mehr Glucose verbraucht wurde als im Fed-Batch mit 35,9 g/L.

Im mittleren Diagramm ist die Biomassebildung als auch der hierbei vorliegende pH-Drift aufgezeigt. Hier wird die niedrigere Atmung des Fed-Batch aus dem oberen Diagramm mit langsamerem Biomasseanstieg aufgrund der Glucoselimitierung bestätigt. Deutlich wird der Unterschied beider Betriebsweisen durch pH-Drift trotz Pufferung erkennbar. Aufgrund der durch Overflow-Metabolismus gebildeten Nebenprodukte wie z.B. Essigsäure kommt es zu einem stärkern pH-Abfall im Batch. Im unteren Diagramm ist die Dynamik der metabolisierten Glucose und temporär gebildeten Kohlenstoffquellen Ethanol und Essigsäure festgehalten. Im Batch werden zwischenzeitlich 5 g/L Ethanol und 0,8 g/L Essigsäure im Medium akkumuliert. Im Fed-Batch dagegen sind beide Metabolite in Konzentrationen kleiner als 0,2 g/L nachgewiesen.

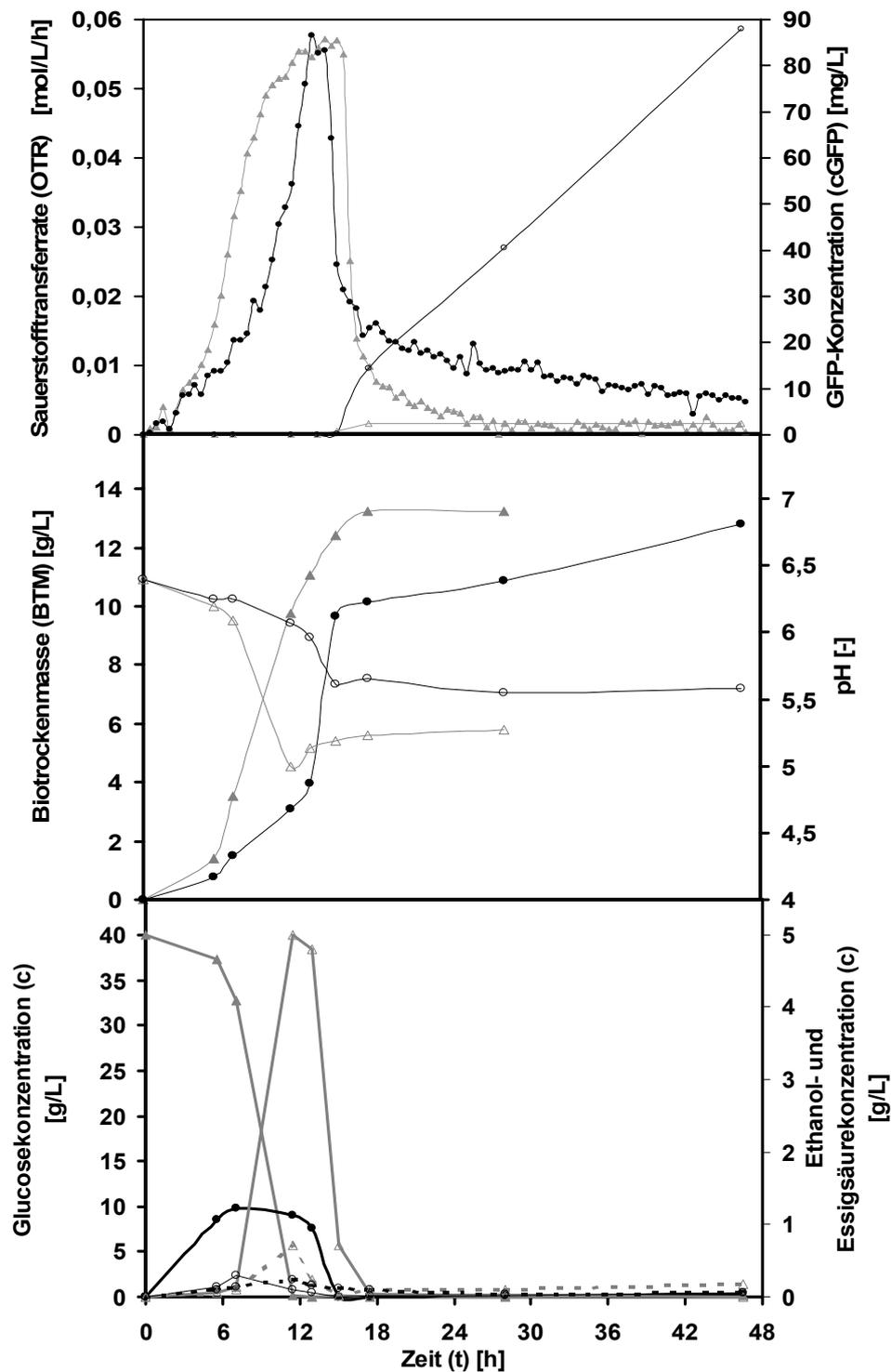


Abb. 22: *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Kulturen. Vergleich von Batch mit 40 g/L Glucose und Fed-Batch-Betriebsweise mittels 5 Silikonelastomerdisks (D = 22 mm; h = 1,8 mm; 20% (w/w) Glc; 5% (w/w) BaSO₄). Kulturbedingungen: MES-gepuffertes Syn6-Medium; Glucose als einzige Kohlenstoffquelle; pH_α = 6,4; OD_{600,α} = 0,5; T = 37°C; D₀ = 50

mm; $n = 350$ rpm; $V_{R,L} = 12,5$ mL. Oberes Diagramm: OTR: Batch (-▲-); Fed-Batch (-●-); GFP: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-). Mittleres Diagramm: BTM: Batch (-▲-); BTM: Fed-Batch (-●-); pH: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-). Unteres Diagramm: Glucose: Batch (-▲-), Fed-Batch (-●-); Ethanol: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-); Essigsäure: Batch (""△""), Fed-Batch (""○"").

4.5. GFP-Produktion durch *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (p_{FMD} -GFP) in YNB-Medium

Bei der Kultivierung in YNB-Medium ist an der OTR-Kurve in Abbildung 23 zu erkennen, dass im Batch Overflow-Metabolismus wie auf Syn6-MES-Medium vorherrscht. Jedoch sind die OTR-Peaks auf niedrigerem Niveau von ca. 0,040 mol/L/h und nicht so stark ausgeprägt wie in Syn6-MES-Medium.

Aufgrund von Glucoselimitierung wächst der Fed-Batch langsamer. Die Wachstumsrate ist generell niedriger als in Syn6-MES-Medium, weil der pH-Wert schnell aus dem Optimum von pH = 4,1 driftet. Der Overflow-Metabolismus ist kleiner aufgrund verlangsamter Biomassebildung und es kommt zur Ausprägung eines kleinen separaten Ethanolpeaks im Fed-Batch.

Die Expression von GFP erfolgt auch in diesem Experiment verstärkt unter Glucoselimitierung beim Fed-Batch ab der 15 h Fermentationszeit aufgrund von Katabolitderepression. Die GFP-Konzentration im Versuch steigt nahezu linear bis zum Ende an. Im Batch wird wie im vorigen Versuch kaum GFP gebildet, da erst beim Ethanolkatabolismus eine Derepression vorliegt. Der Organismus erfährt eine Inhibierung des Wachstums aufgrund des pH-Drifts. In diesem Falle ist Glucose sowie das Ethanol nie vollständig metabolisiert und die Essigsäurekonzentration steigt bis zum Ende auf 2,5 g/L an. Die GFP-Ausbeute im Fed-Batch liegt um den Faktor 400 über dem Batch mit 421 mg/L zu 1 mg/L.

Im mittleren Diagramm ist die Biomassebildung als auch der hierbei vorliegende pH-Drift aufgezeigt. Hier wird die niedrigere Atmung des Fed-Batch aus dem oberen Diagramm mit etwas langsamerem Biomasseanstieg aufgrund der Glucoselimitierung bestätigt. Die pH-Werte fallen in diesem Experiment relativ gleich in beiden Betriebsweisen.

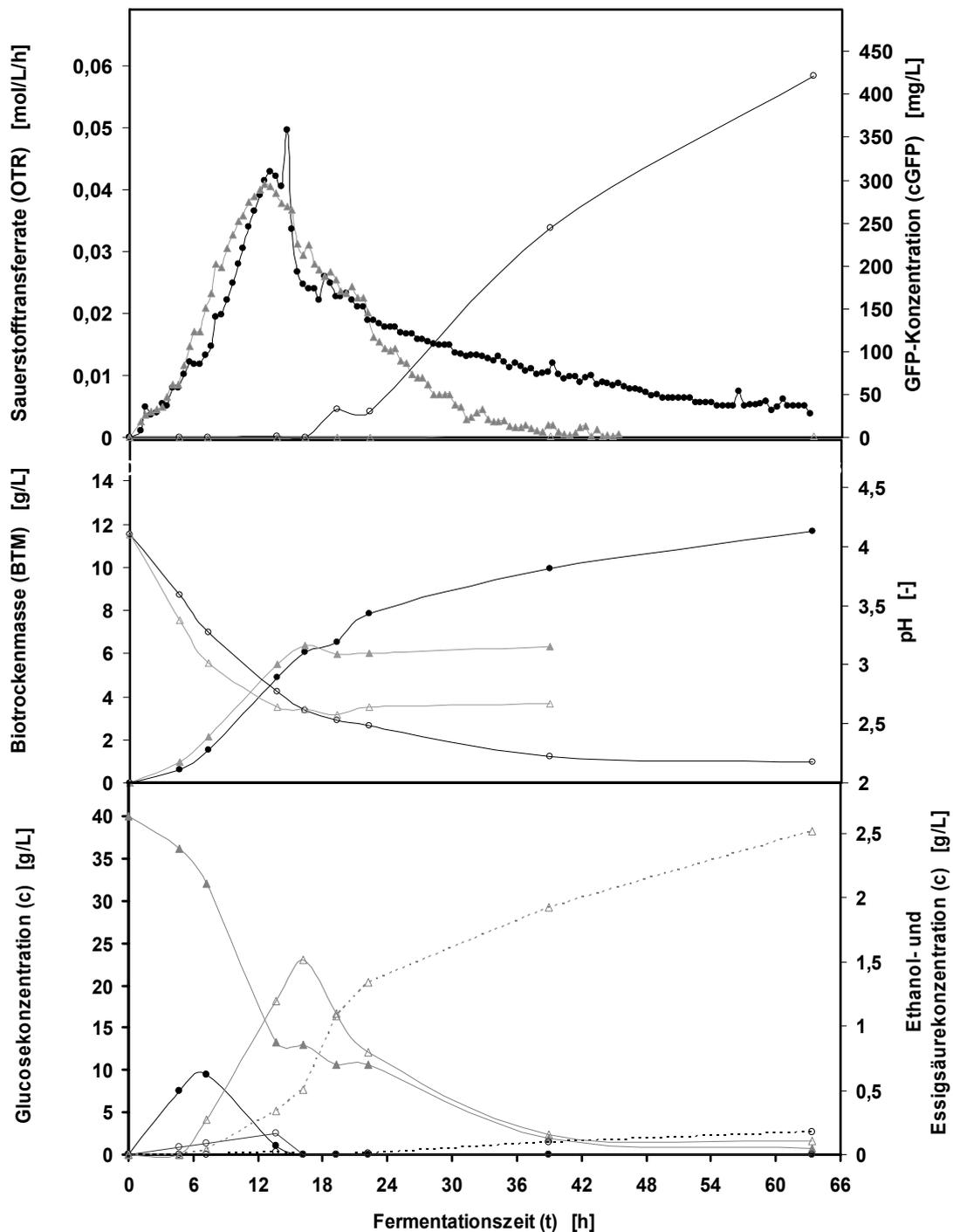


Abb. 23: *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (pFMD-GFP) Kulturen. Vergleich von Batch mit 40 g/L Glucose und Fed-Batch-Betriebsweise mittels 5 Silikonelastomerdisks ($D = 22$ mm; $h = 1,8$ mm, 20% (w/w) Glc; 5% (w/w) BaSO_4). Kulturbedingungen: YNB-Medium; Glucose als einzige Kohlenstoffquelle; $\text{pH}_\alpha = 4,1$; $\text{OD}_{600,\alpha} = 0,5$; $T = 37^\circ\text{C}$; $D_0 = 50$ mm; $n = 350$ rpm; $V_L = 12,5$ mL.

Oberes Diagramm: OTR: Batch (-▲-); Fed-Batch (-●-); GFP: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-). Mittleres Diagramm: BTM: Batch (-▲-); BTM: Fed-Batch (-●-); pH: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-). Unteres Diagramm: Glucose: Batch (-▲-), Fed-Batch (-●-); Ethanol: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-); Essigsäure: Batch (""△""), Fed-Batch (""○"").

4.6. Biomassebildung von *H. polymorpha* Kulturen

Nach Durchführung einiger Kultivierungen von *H. polymorpha* in Batch- und Fed-Batch-Betriebsweise in Syn6-MES- und YNB-Medium wurden die Unterschiede der Biomassebildung beider Betriebsweisen nach Metabolismus unterschiedlicher Mengen an Glucose ausgewertet (Abb. 24). Bis zu einer Substratkonzentration von 15 g/L konnte kein großer Unterschied in der Biomasseausbeute festgestellt werden. Die kleinen Differenzen sind auf die Bildung und Verstoffwechslung anaerober Nebenprodukte durch den Overflow-Metabolismus zurückzuführen. Im Falle von *H. polymorpha* waren dies Ethanol und Essigsäure. Durch die Konversion von Glucose zu Ethanol oder Essigsäure geht Energie aber auch Kohlenstoff in Form von CO₂ durch das Abgas verloren. Dies führt zu niedrigeren Biomasseausbeuten in solchen Ansätzen. Wenn also die Produktion von Ethanol und Essigsäure durch den Anstieg von direkt verfügbarer Glucose erhöht wird, dann verringert sich die relative Biomassebildung. Signifikant höhere Mengen von Ethanol und Essigsäure, als auch moderate Mengen nicht-metabolisierter Komponenten wurden erzeugt, wenn die Glucose Konzentration im Batch 15 g/L überschritt. Die höchste Biomassekonzentration, die bisher erreicht wurde, liegt bei 23,4 g/L bei 64,5 g/L metabolisierter Glucose mit Freisetzungssystemen.

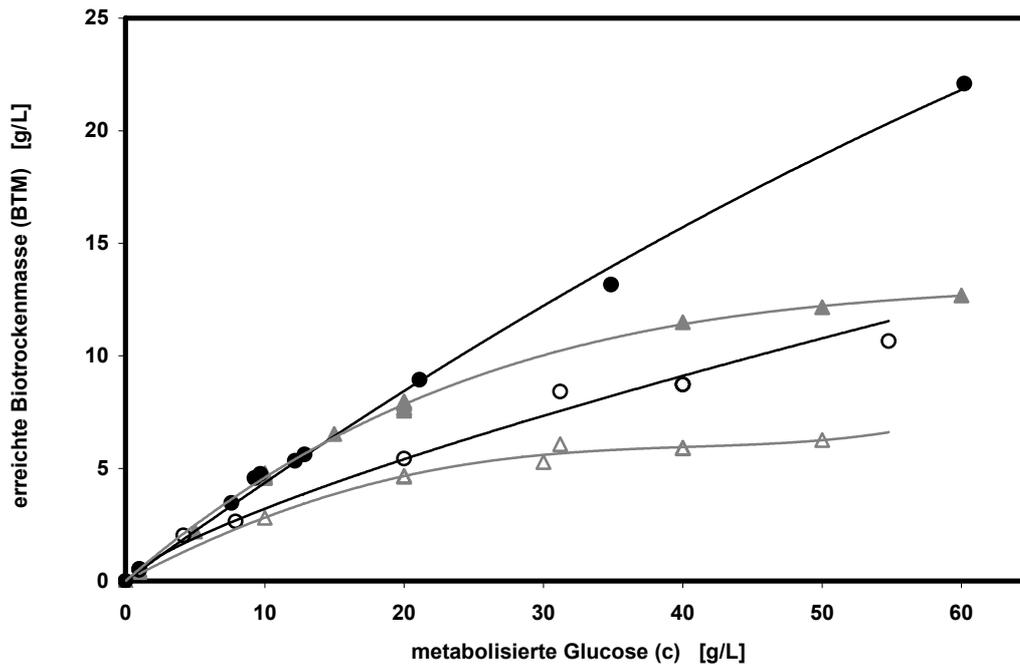


Abb. 24: Erhaltene Biotrockenmassen (BTM) von *H. polymorpha* Kulturen in Batch- und Fed-Batch Betriebsweise mit Silikonelastomerdisk (D = 22 mm; h = 1,8; 20% (w/w) Glc; 5% (w/w) BaSO₄). Kulturbedingungen: Syn6-MES-Medium: Batch (-▲-), Fed-Batch (-●-), Glucose als einzige Kohlenstoffquelle; pH_□ = 6,4; OD_{600,□} = 0,5; T = 37°C; D₀ = 50 mm; n = 350 rpm; V_L = 12.5 mL.; YNB-Medium: Batch (···△···), Fed-Batch (···○···); Glucose als einzige Kohlenstoffquelle; pH_□ = 4,1; OD_{600,□} = 0,5; T = 37°C; D₀ = 50 mm; n = 350 rpm; V_{R,L} = 12,5 mL.

4.7. Vergleich der GFP-Produktion im Schüttelkolben- mit dem Fermentermaßstab von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (p_{FMD}-GFP) im Fed-Batch

Bei einer glucoselimitiert geführten Fed-Batch-Fermentation von *H. polymorpha* pC10-GFP (p_{FMD}-GFP) in Syn6-Medium im 3-L-Maßstab ergaben sich keine Nebenprodukte durch Overflow-Metabolismus. Die Gesamtmenge an eingesetzter Glucose wurde zur Biomasse- bzw. Produktbildung und Erhaltung verbraucht. In Abbildung 25 sind im oberen Diagramm der Anstieg des OTR und der Abfall des gelösten Sauerstoffs (pO₂) mit steigender Biomassekonzentration aufgeführt. Um die erforderliche Begasung und den Leistungseintrag zu gewährleisten, wurde die Rührgeschwindigkeit mit steigender Biomassekonzentration erhöht. Die GFP-Bildung ist hierbei nahezu proportional zur Biomassebildung.

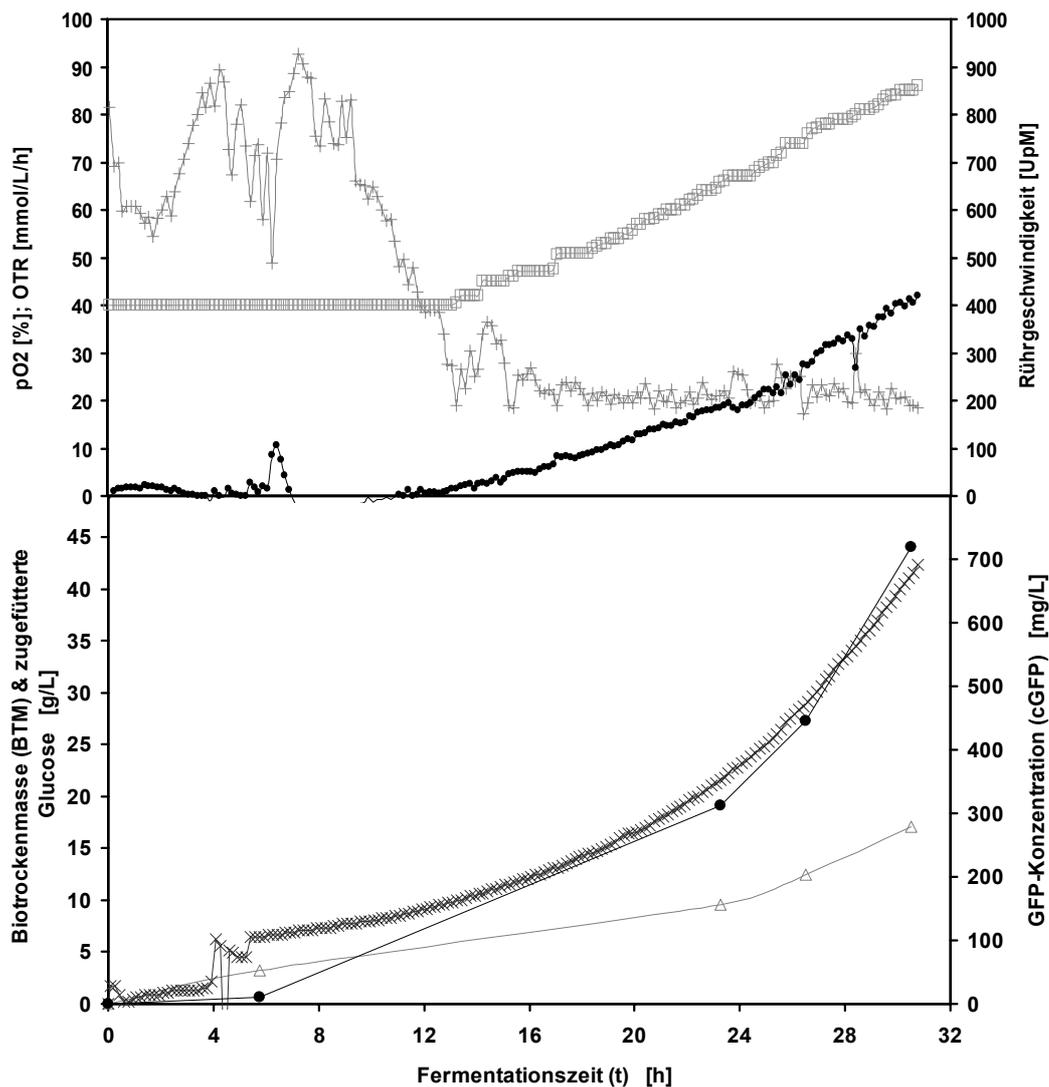


Abb. 25: Fermentation von *H. polymorpha* Kulturen in Fed-Batch Betriebsweise im 3-L-Maßstab. Kulturbedingungen: Syn6-Medium: Glucose als einzige Kohlenstoffquelle; $\text{pH}_\alpha = 6,4$; $\text{OD}_{600,\alpha} = 0,5$; $T = 37^\circ\text{C}$; $V_L = 3,5 \text{ L}$. Oberes Diagramm: OTR (●-), Rührgeschwindigkeit (□-), Gelöstsauerstoff (+-). Unteres Diagramm: GFP (●-), Biotrockenmasse (△-), zugefütterte Glucose (x-).

Die Gesamtausbeute von GFP in der 3-L-Fermentation liegt bei 718 mg/L. Spezifisch auf die gebildete Biomasse berechnet, entspricht das einem Produktausbeutekoeffizienten von Ausbeute von 0,042 g GFP/ g BTM.

Vergleicht man diese Ausbeute nun mit den Schüttelkolbenansätzen, so ergibt sich hierbei ein Produktausbeutekoeffizient von 0,061 in YNB-Medium und 0,007 in Syn6-Medium. Mit Syn6 beträgt die spezifische Ausbeute an GFP also 17% des

Fermenteransatzes aufgrund von erhöhter Biomassebildung. Auf YNB kann durch Abfall des pH-Wertes eine Wachstumsinhibierung erzeugt werden, wodurch sich weniger Biomasse und dafür mehr Produkt bildet. Die spezifischen GFP-Ausbeuten (27,5 g/L freigesetzte Glucose) sind hierbei 148% des Fermenteransatzes. Absolut gesehen konnte im Schüttelkolben 71% der GFP-Konzentration des Fermenters erreicht werden. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 3 dargelegt.

Tab. 2: Zusammenstellung der Ausbeuten für GFP- und Biomasseausbeute aus Schüttelkolben- und Fermentationsansätzen

Maßstab	Medium	Glucose [g/L]	BTM [g/L]	GFP [mg/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]	$Y_{P/X}$ [g/g]
Schüttelkolben	Syn6	35,9	12,8	88	0,36	0,007
Schüttelkolben	Syn6	12,5	5,9	25	0,47	0,004
Laborfermenter	Syn6	41,6	17,1	718	0,41	0,042
Schüttelkolben	YNB	41,3	11,1	421	0,27	0,038
Schüttelkolben	YNB	27,5	8,2	509	0,30	0,062

4.8. YFP-Produktion durch *Escherichia coli* BL 21 dLys pRset eYFP-IL-6

Wendet man die Fed-Batch-Technik mit Freisetzungssystemen bei *E. coli* BL 21 dLys pRset eYFP-IL-6 an, hat dies wie auch bei *H. polymorpha* Auswirkungen auf dessen Overflow-Metabolismus. Das charakteristische erste Nebenprodukt ist Essigsäure, welche wieder als C-Quelle genutzt werden kann. In Abbildung 26 wird der OTR-Verlauf einer Batch- und Fed-Batch-Betriebsweise in Schüttelkulturen gezeigt. Nach 7-8 h Fermentationszeit zeigen beide Kultivierungen ihr OTR_{max} mit 0,053 mol/L/h im Batch und zu 0,037 mol/L/h im Fed-Batch. Aufgrund der limitierenden Glucosekonzentration im Fed-Batch fällt der OTR auf ca. 0,010 mol/L/h und verbleibt auf diesem Plateau für mindestens 30 h. Der Batch fällt auf ein Niveau von 0,025 mol/L/h wegen des Overflow-Metabolismus und dem Verbrauch von gebildeter Essigsäure von 10-14 h Fermentationszeit. Die OTR fällt darauf von 14-18 h auf null ab aufgrund des Verbrauchs von C-Quellen. Die YFP-Bildung wurde nach 7 h Fermentationszeit durch die Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Wenn der Überschuss von Glucose verbraucht ist, wächst *E. coli* langsamer.

Aufgrund der Anwesenheit von hoher Glucosekonzentrationen zu Beginn ist die YFP-Bildung verlangsamt und erhöht sich umgekehrt proportional zum Abfall der Glucosefütterung aus den Silikonelastomerdisks.

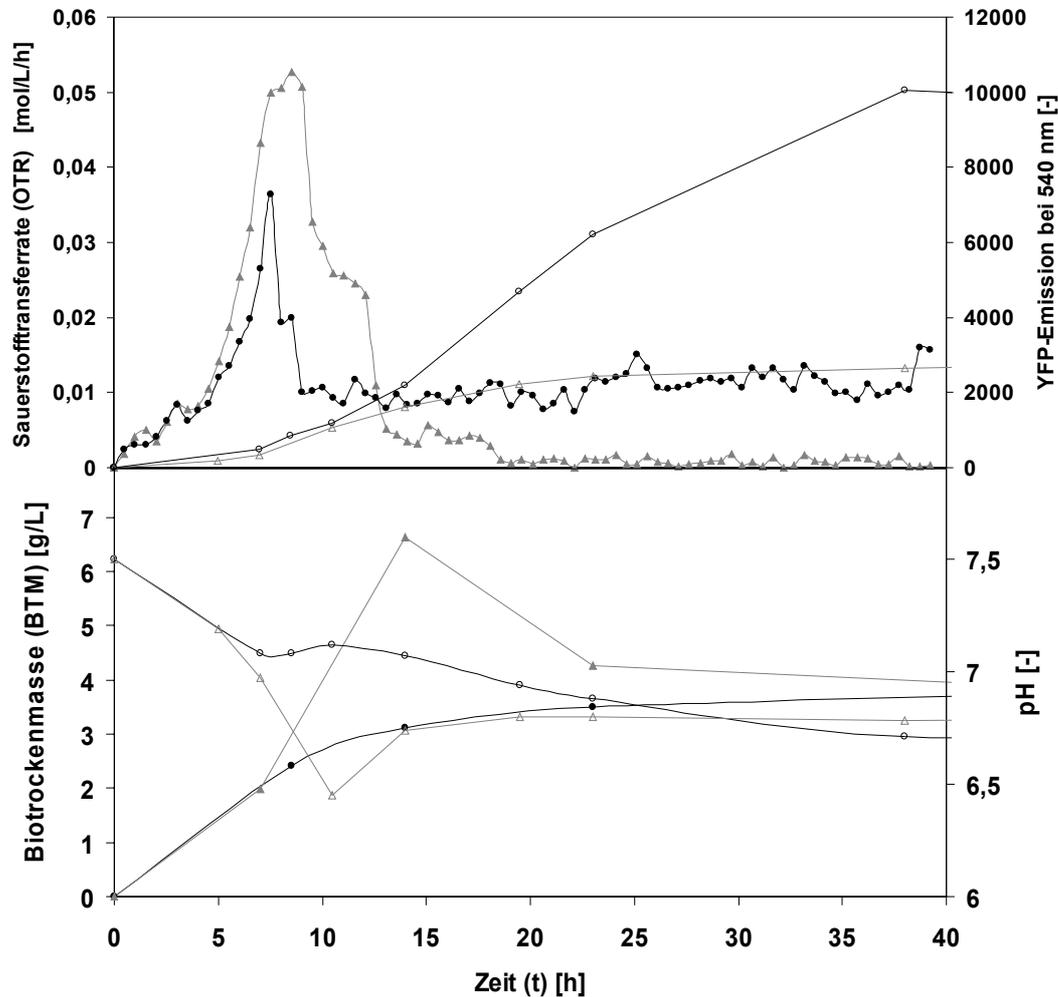


Abb. 26: Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR) und relative YFP-Bildung von *Escherichia coli* BL 21 dLys pRset eYFP-IL-6 Kulturen in Batch mit 20 g/L und Fed-Batch-Betriebsweise mittels 2 Silikonelastomerdisks ($D = 22$ mm; $h = 1,8$ mm; 20% (w/w) Glc; 5% (w/w) BaSO_4). Kulturbedingungen: Wilms-Medium ohne Zitronensäure; Glucose als einzige C-Quelle; $\text{pH}_\alpha = 7,5$; $\text{OD}_{600,\alpha} = 0,5$; $T = 37^\circ\text{C}$; $D_0 = 50$ mm; $n = 350$ rpm; $V_L = 12,5$ mL. OTR: Fed-batch (-●-), Batch (-▲-), YFP: Fed-batch (-○-), Batch (-△-). BTM: Batch (-▲-); BTM: Fed-Batch (-●-); pH: Batch (-△-), Fed-Batch (-○-).

Die YFP-Konzentration ist ungefähr vierfach höher im Fed-Batch, weil die Glucose nicht durch Overflow-Metabolismus zur Nebenproduktbildung verschwendet wird und der größte Teil in Energiegewinnung und in Produktbildung geht. Im Fed-Batch

wurden 16,5 g/L im Vergleich zu 20 g/L Glucose im Batch angeboten. Die Essigsäurebildung und der Verbrauch kann durch den Abfall und Anstieg des pH im Batch verfolgt werden.

4.9. Screening von Mikroorganismen unter Fed-Batch-Bedingungen

Zum Screening von Mikroorganismen wurden bereits transformierte *H. polymorpha* RB11-Stämme verwendet, wie in Amuel et. al. beschrieben (Amuel et al., 2000). Hierbei geht es um Plasmidkonstrukte, bei denen die GFP-Expression zum einen unter der Kontrolle eines Formiat-Dehydrogenase-Promotors (FMD) und zum anderen unter der Kontrolle eines Methanol-Oxidase-Promotors (MOX) gestellt ist. *H. polymorpha* integriert nach Transformation solch episomal vorliegende Konstrukte ins Genom und wird dann erst ein stabiler Stamm.

Um diesen Vorgang zu beschleunigen und zu erzwingen, gibt es folgende Kultivierungsprozedur. Nach Transformation und Ausplattieren auf YPD-Vollmedium erfolgen acht Kultivierungsschritte auf uracilfreiem YNB-Minimalmedium mit dem Ziel nichttransformierte Stämme aufgrund von Uracilautotrophie herauszufiltern. Transformierte Stämme sind aufgrund des Plasmidkonstrukts wieder uracilautotroph. Durch die Mehrfachkultivierung in YNB-Minimalmedium mit Glucose wird die Integration begünstigt. Darauf erfolgen zwei Stabilisierungsschritte auf YPD-Vollmedium und danach ein Selektionsschritt auf YNB-Minimalmedium mit Glucose, um die Plasmide zu beseitigen (s. Abb. 27). Die Stammerzeugung ist somit abgeschlossen. Dabei wurde zum ersten Mal eine in einem anderen Projekt entwickelte Technik zur Online-Bestimmung der OD und der Produktfluoreszenz erfolgreich eingesetzt. Insgesamt wurden mehr als 500 Einzelklone mitgeführt, die nun als Population zum Screeningverfahren vorliegen. Das Screening wurde im Batch-Verfahren einmal mit Glucose als einzige C-Quelle und einmal mit Glycerin als einzige C-Quelle zu Vergleichszwecken durchgeführt werden. Weiterhin wurde ein Screening im Fed-Batch mit Glucose als einzige C-Quelle gefüttert aus polymerbasierten Freisetzungssystemen durchgeführt.

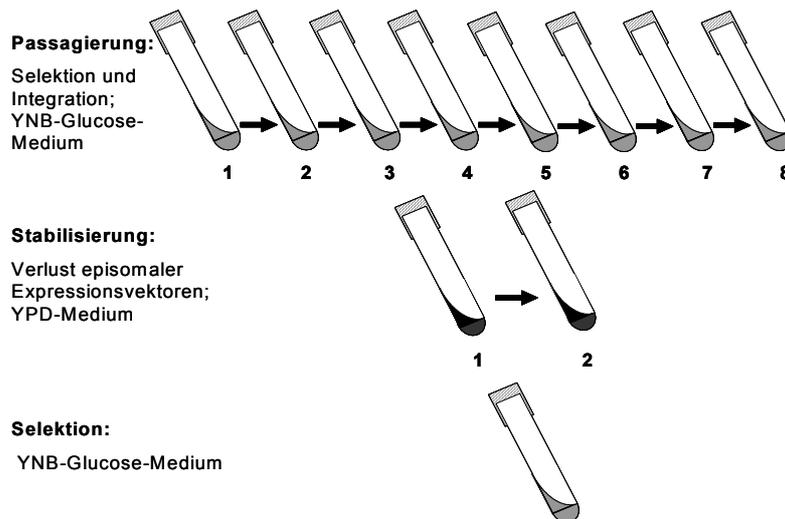


Abb. 27: Vorkultivierungsstufen für ein Screening von transformierten Hefen (Rekonstruktion aus Stöckmann et al., 2003a)

Der Maßstab für das Screening ist die 96-fach Deep-Well-Platte. Für das Fed-Batch-Screening war geplant die Platte mit Silikonelastomer zur Glucosefütterung auszugießen. Dies führte zu anderen Kinetiken als bei suspendierten Disks. Aus Gründen der knappen Zeit und der einfacheren Berechenbarkeit im Down-Scale von Freisetzungen aus dem Millilitermaßstab in den Mikrolitermaßstab, wurden die Disks (D= 5 mm; H = 1,1 mm) lose in die Deep-Well-Platte eingelegt.

In ausführlichen Vorversuchen wurden nach Realisierung einer MikroRAMOS-Anlage die optimalen verfahrenstechnischen Parameter für ein sauerstoffunlimitiertes Screening ermittelt. Abbildung 28 zeigt das in der BioVT neu konstruierte Tablar der MikroRAMOS. Ein Beispieldiagramm der Kultivierung von *H. polymorpha* in Deep-Well-Platten aus der MikroRAMOS ist in Abbildung 29 dargestellt, bei der die Abwesenheit einer Sauerstofflimitierung für das Screening nachzuweisen war. Es wurden drei Platten untersucht, wobei das Füllvolumen pro Kavität von Platte zu Platte variiert wurde mit 300 μL , 400 μL oder 500 μL . Die nötige Drehzahl wurde zuvor bestimmt und auf 400 rpm festgelegt.

Man erkennt, dass erst ab einem Füllvolumen von 300 μL von einem unlimitierten Wachstum ausgegangen werden kann. Bei diesem Füllvolumen wird ein OTR-Peak mit richtig ausgeprägter Spitze ausgebildet. Alle anderen getesteten Füllvolumen führen zur Bildung von Plateaus aufgrund von Sauerstofflimitierung. In der Abbildung 29 unten ist der Respirationsquotient dargestellt. Eine kleine Schwankung im RQ-Verlauf deutet auf Nebenproduktbildung durch Overflow-Metabolismus hin.

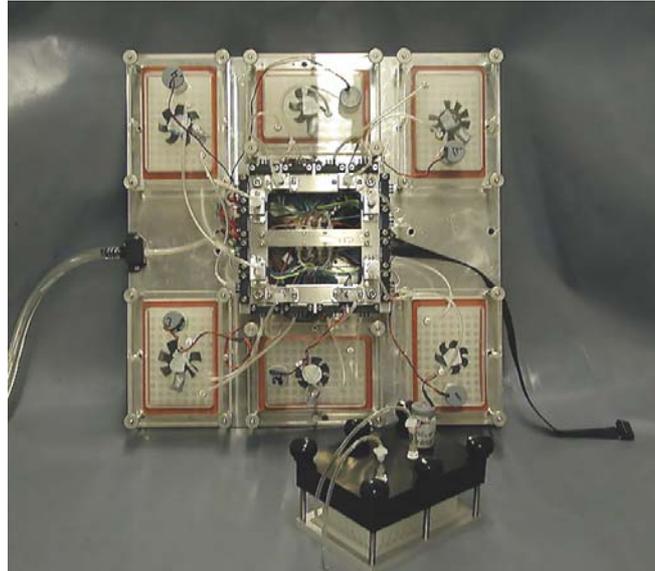


Abb. 28: Tablar einer 6-fach MikroRAMOS-Anlage. Die Deckel mit Sauerstoffsensoren schließen mit einer Flachmembran auf den meisten handelsüblichen Deep-Well- und normalen Mikrotiter-Platten luftdicht ab und sind zur Messung, um eine Ventil- und Steuermittekonsole angeordnet. Eine Deep-Well-Platte ist im Vordergrund mit schwarzem Deckel zu erkennen.

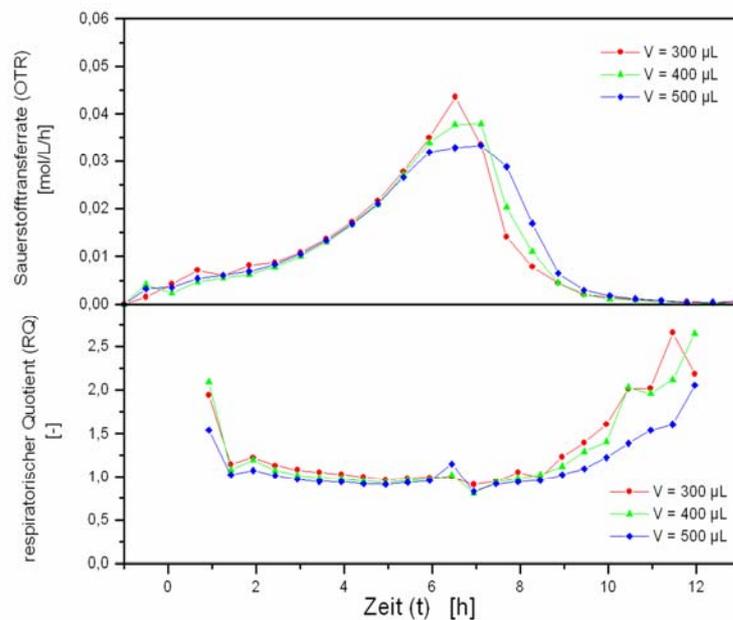


Abb. 29: Wachstum von *H. polymorpha* auf Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bei unterschiedlichen Füllvolumina: $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{OD}_{600,\alpha} = 0,5$; $\text{pH}_\alpha = 6,4$ $q = 1$ vvm; $d_0 = 50$ mm, $n = 400$ rpm, 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit einer semipermeablen Membran (Fa. AB-Gene).

Aufgrund der aus vielen Vorversuchen erhaltener Ergebnisse können die Bedingungen für das Screening wie folgt festgelegt werden:

- Syn6-MES-Medium
- Glucosekonzentration (c_0): 10 g/L
- Schütteldurchmesser (d_0): 50 mm
- Schüttelfrequenz (n): 400 rpm
- Temperatur (T): 37°C
- Füllvolumen (V_L): 300 μ L

4.9.1. Vergleichsanalyse des Screenings der *H. polymorpha* Stämme mit FMD-Promotor

Das Screening wurde mit *Hansenula polymorpha* RB11 Derivaten durchgeführt, welche sich nach Transformation mit einem Vektor mit GFP-Expressions-kassette (pC10-GFP ($p_{\text{FMD-GFP}}$) bzw. pC10-GFP ($p_{\text{MOX-GFP}}$)) lediglich in ihrem Promotor unterscheiden und an der individuellen Integration des Vektorkonstruktes im Genom nach Stabilisierung. In diesem Kapitel sollen zunächst die Ergebnisse der Stämme mit FMD-Promotor geschildert werden. Es wurden Batch-Kulturen auf Glucose und Glycerin mit jeweils 10 g/L und Fed-batch-Kulturen auf Glucose betrieben. Bei letzterem entsprach die zugeführte Menge an Glucose 10 g/L, welche in den Batches vorgelegt wurde.

Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die sequentiellen Vorkulturen auf komplexem YPD- und definiertem Syn6-MES-Medium je mit 10 g/L Glucose für das erste durchgeführte Screening. Mit der Doppelvorkultur wurde das Ziel verfolgt den Stämmen bessere Wachstumsmöglichkeiten nach der Kryokultur zu geben. Die Belegung der Platten entspricht zur Hälfte Stämmen mit FMD- und zur anderen Hälfte mit MOX-Promotoren. Die OTR, gemessen mit der MikroRAMOS, sind Mittelwerte der Atmung von Klonen über der ganzen Platte beim Verbrauch der Glucose und anderer C-Quellen im Fall des komplexen YPD-Mediums. Die Atmung signalisiert in den ersten 3 h eine Lag-Phase. Dann steigt die OTR an und erreicht im Mittel von 10-15 h ihr Maximum von 0,03 mol/L/h. Die Ansätze wurden auf definiertes Medium überimpft nachdem die OTR wieder auf 0,015 mol/L/h abgefallen war (halbe

OTR_{max}), um den Nachzüglern unter den Klonen die Chance zu geben zu einer moderaten Zelldichte zu gelangen (Abb. 30).

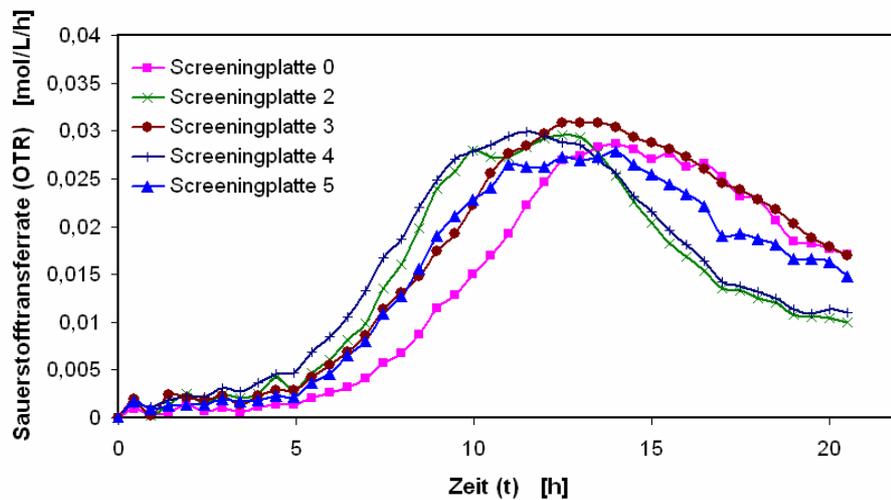


Abb. 30: Erste Vorkultur Screening 1 von *H. polymorpha* RB11 Stämmen pC10-GFP (P_{FMD} -GFP bzw. P_{MOX} -GFP) in YPD-Medium: 10 g/L Glucose; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit einer semipermeablen Membran (AB Gene).

Nach Überimpfen auf definiertes Syn6-MES-Medium ist keine Lag-Phase mehr erkennbar. Die OTR_{max} von 0,025 mol/L/h wird schon nach ca. 6 h erreicht und die Zellen verbrauchen bis ca. 17 h die ganze vorgelegte C-Quelle. Die meisten Stämme müssten bis zu diesem Zeitpunkt angewachsen sein und waren bereit für den Screening-Ansatz (Abb. 31).

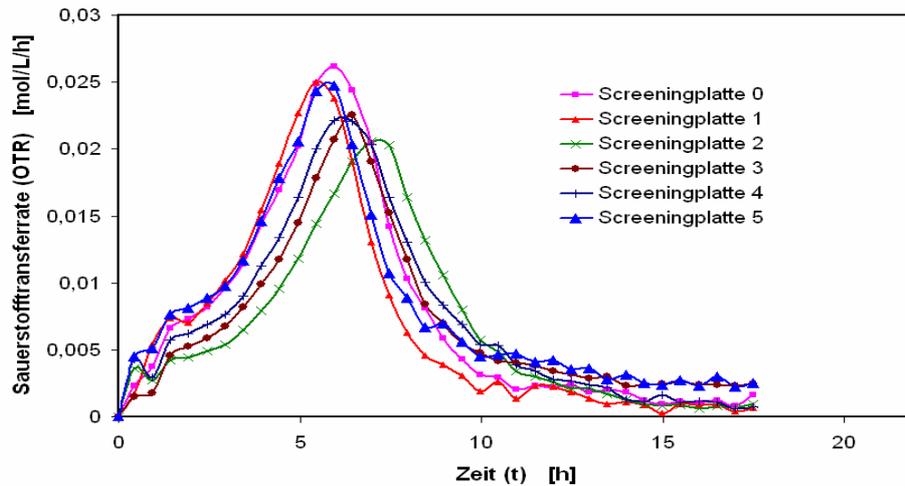


Abb. 31: Zweite Vorkultur Screening 1 von *H. polymorpha* RB11 Stämmen pC10-GFP (P_{FMD} -GFP bzw. P_{MOX} -GFP) in Syn6-MES-Medium: 10 g/L Glucose; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene)

Die Ergebnisse des Screenings werden in den folgenden Diagrammen präsentiert. Abbildung 32 zeigt die Produktausbeute pro BTM auf Glucose im Batch und Fed-batch im Vergleich zu Glycerin. Hierbei sind die Klone aufsteigend ihrer Ausbeute auf Glycerin von links nach rechts angeordnet. Es wurde eine maximale Ausbeute von 16 mg GFP/g BTM auf Glycerin erzielt. Es ist erkennbar, dass ca. 20% aller untersuchten Klone in einem der Durchgänge kein Produkt bildeten. Die maximale Ausbeute im Fed-batch entspricht der auf Glycerin mit 15 mg/g GFP/BTM. Insgesamt gesehen ist die durchschnittliche Ausbeute im Fed-batch am besten und liegt zwischen 4-15 mg GFP/g BTM. Der bereits im Schüttelkolben eingesetzte Stamm von Dr. C. Amuel, der das gleiche Konstrukt trägt, hatte nur eine Ausbeute von 6,6 mg GFP/g BTM. Dieser liegt somit eher im Mittelfeld mit der Ausbeute. Eine Steigerung zu besseren Stämmen als der bisher etablierte ist also noch möglich.

50% der Klone liegen in diesem Bereich im Gegensatz zum Glycerinansatz, bei dem nur ca. 7% diese Ausbeuten erreichen. Die Ausbeute im Fed-batch mit Glucose steigt tendenziell mit den Ausbeuten im Batch auf Glycerin. Im Batch mit Glucose erreichen nur ca. 7,5% Ausbeuten von 1 mg GFP/g BTM und höher. Die Verteilung ist eher zufällig.

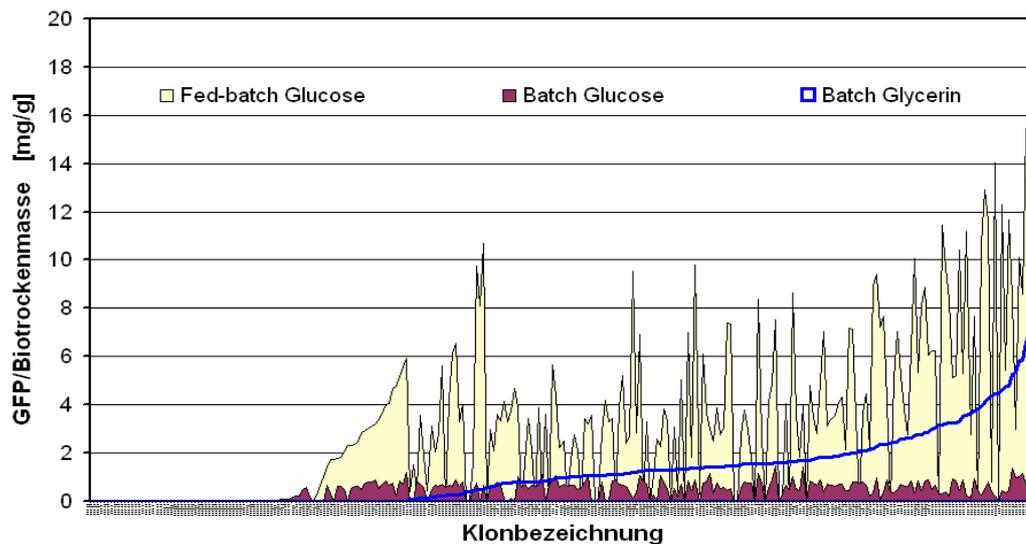


Abb. 32: Erstes Screening von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{FMD} -GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin im Batch und Fed-batch: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ Rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; Disks: 30% (w/w) Glucose; 5% BaSO_4 , $D = 5$ mm; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Um einen Eindruck von der Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses zu bekommen, wurden in den weiteren Diagrammen Vergleichsanalysen durchgeführt und die Ergebnisse des Wiederholungsscreenings über denen des ersten aufgetragen. So kann ein Überblick gewonnen werden, ob Klone die beim ersten Screening gute GFP-Ausbeuten zeigten auch beim zweiten Mal ähnliche Ausbeuten erzielten. Es wurde jeweils eine Ausgleichsgerade in die Diagramme gelegt. Diese markiert die optimale Lage der Punkte, bei gleich guten Ausbeuten der Stämme. Abbildung 33 zeigt die Verteilung für den Batch mit 10 g/L Glycerin.

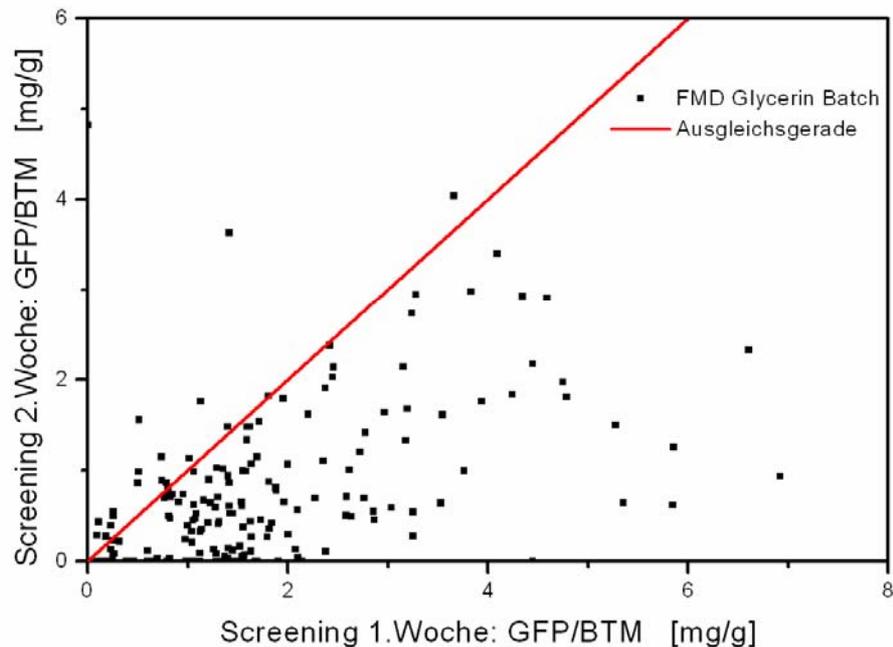


Abb. 33: Vergleichsanalyse zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{FMD} -GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glycerin: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Hier ist deutlich erkennbar, dass ca. 92% der Messwerte unterhalb der Ausgleichsgeraden liegen. Dies führt zu der Aussage, dass die Ausbeuten des ersten Screenings auf Glycerin besser waren als bei der Wiederholung. Beim zweiten Durchgang hatten die Klone das Glycerin nicht vollständig verbraucht. Es wird auf eine lange Lag-Phase geschlossen. Dies war aufgrund der Vorversuche und der Vorkulturdaten aus der MikroRAMOS nicht zu erwarten, da die Stämme hier bereits nach 10 h ihr maximales Wachstum erreicht hatten. Es kann aber auf unterschiedliche Vorkulturen und auf den Substratwechsel von Glucose auf Glycerin zurückgeführt werden (Stöckmann et al., 2003b). Ansonsten ist eine ansteigende Tendenz der Ausbeutenverteilung von links nach rechts erkennbar. Jedoch ist die Streuung der Messwerte recht stark.

Bei einem Batch-Ansatz mit Glucose (Abb. 34) sind die Klone in beiden Fällen gleichmäßiger gewachsen, und die Werte liegen zu ca. 80% oberhalb der

Ausgleichsgeraden, was eine bessere Ausbeute im zweiten Screening bedeutet. Aufgrund der insgesamt niedrigen Ausbeuten von bis zu ca. 2,5 mg GFP/g BTM können die Klone auf Glucose kaum voneinander in ihrer Produktausbeute unterschieden werden. Es gibt auf Glucose kaum Anhaltspunkte für gute Expressionsstämme, weil die Expression durch Katabolitrepression unterdrückt ist.

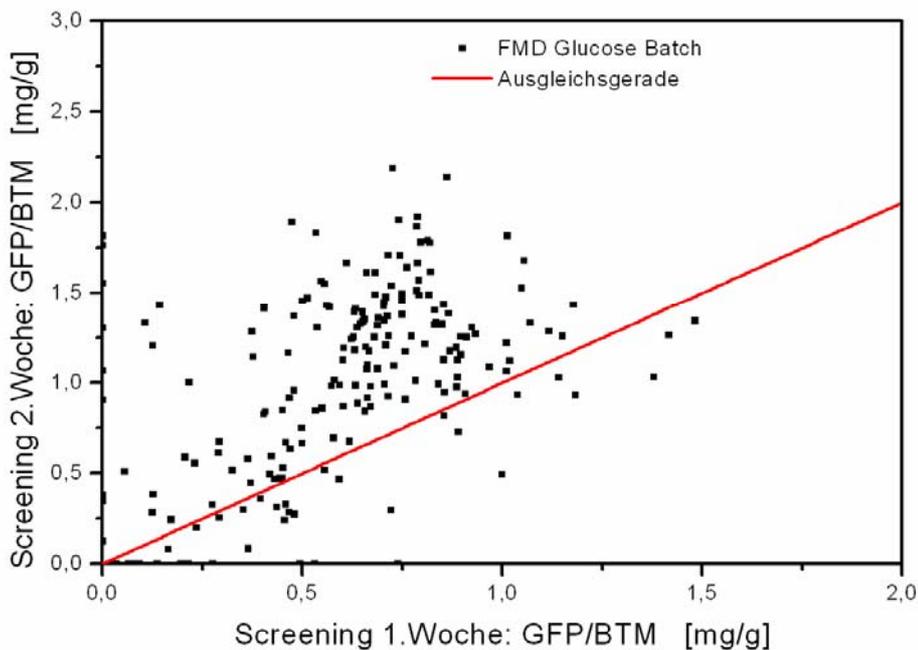


Abb. 34: Vergleichsanalyse von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP ($P_{FMD-GFP}$) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose: T = 37°C; n = 400 rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μ L; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Die in Abbildung 35 dargestellte Vergleichsanalyse für den Fed-batch zeigt eine Verteilung der Punkte um die Ausgleichsgerade. Es werden Werte bis maximal 16 mg GFP/g BTM erreicht, was das 8-fache der Ausbeute im Batch ist. Allerdings ist auch hier die Streuung recht hoch. Es sind aber Tendenzen zu erkennen, dass viele Klone, die beim ersten Screening gute Ausbeuten zeigten auch im zweiten Durchgang gute Ergebnisse erbrachten. Aber hier wie auch auf Glucose im Batch sind wieder Klone zu verzeichnen, die nur in einem der beiden Versuche GFP produziert haben. Auch hier sind Kontaminationen vermutlich die Ursache. 90% der Organismen haben aber in beiden Fällen Produkt gebildet.

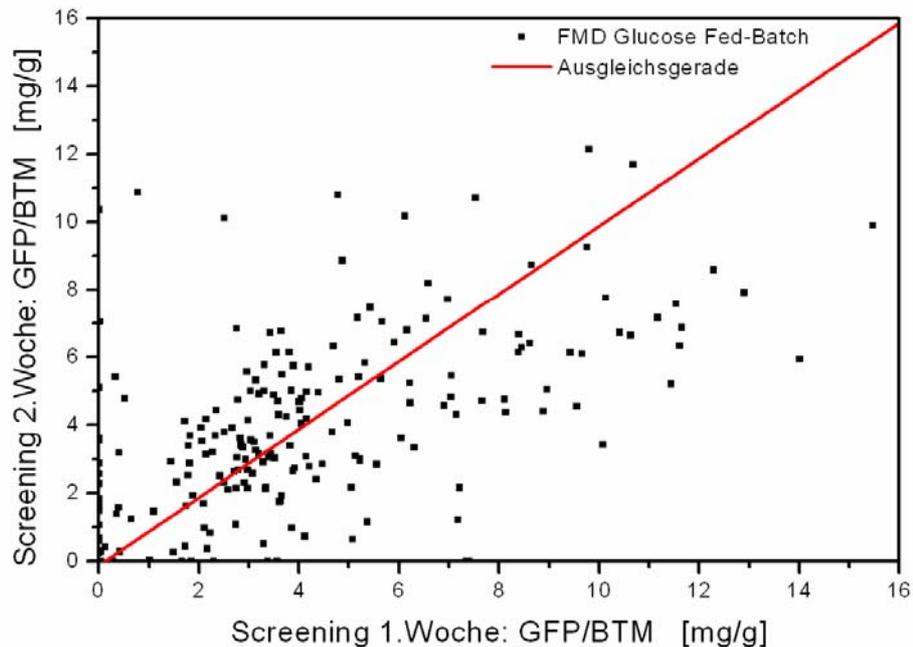


Abb. 35: Vergleichsanalyse von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP ($P_{\text{FMD-GFP}}$) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose Fed-batch in Glucosedisks: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; Disks: 30% (w/w) Glucose; 5% BaSO_4 , $D = 5$ mm; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Zusammenfassend kann also für die Stämme mit FMD-Promotor festgehalten werden, dass die Expression im Fed-batch am stärksten war mit Ausbeuten bis 16 mg GFP /g BTM. 50% der Klone hat Ausbeuten von 4 mg/g und mehr erzielt. Eine Reproduzierbarkeit ist in sofern gegeben, als dass auf Glucose sowohl im Batch als auch im Fed-batch 90% der Stämme in beiden Screeningdurchgängen Produkt gebildet haben. Auf Glycerin waren es vermutlich durch den Wechsel der C-Quelle von Vor- und Hauptkultur nur ca. 70% der Stämme. Auf Glycerin wie auch im Fed-batch war eine Tendenz erkennbar, dass gute Stämme im ersten Durchgang auch im zweiten zu guten Ergebnissen führen. Beim Screening auf Glucose konnte keine Korrelation erkannt werden, da die Stämme ähnliche Ausbeuten im Bereich von 1-2,5 mg GFP/g BTM erzielten.

4.9.2. Vergleichsanalyse des Screenings der Stämme mit MOX-Promotor

In wie weit sich Ergebnisse für den sehr starken MOX-Promotor (Wolf, 1996) von denen der FMD-Stämmen unterscheiden, wird in der folgenden Analyse der erhaltenen Ergebnisse gezeigt.

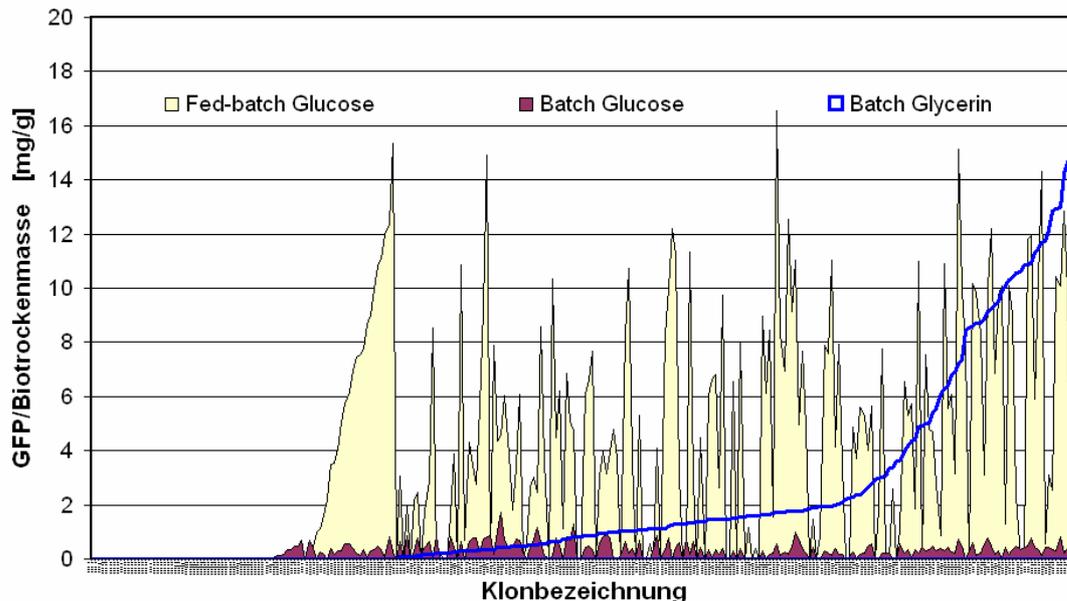


Abb. 36: Erstes Screening von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{MOX} -GFP) Stämme in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; Disks: 30% (w/w) Glucose; 5% BaSO_4 , $D = 5$ mm; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Abbildung 36 zeigt die Produktausbeute pro BTM auf Glucose im Batch und Fed-batch im Vergleich zu Glycerin für die Stämme mit MOX-Promotor. Auch hier sind die Klone aufsteigend nach ihrer Ausbeute auf Glycerin angeordnet. Es wurde eine maximale Ausbeute von 18 mg GFP /g BTM auf Glycerin erzielt. Auch bei diesen Stämmen haben ca. 20% aller untersuchten Klone nicht exprimiert. Die Ausbeute im Fed-batch ist auch hier im Durchschnitt am besten mit maximal 16 mg GFP/g BTM. Insgesamt gesehen ist sie höher als bei Stämmen mit FMD-Promotor und liegt zwischen 6 und 16 mg GFP/g BTM. Auch die Ausbeuten auf Glycerin sind bei den Stämmen mit MOX-Promotor besser. Besonders sticht heraus, dass der zweitbeste Stamm im Fed-batch auf Glucose im Batch auf Glycerin gar nicht exprimiert. Daher wäre dieser Stamm bei einem Batch-Screening nicht delektiert worden. Etwa 12%

aller Stämme liegt mit den Ausbeuten über 8 mg GFP/g BTM. Einzig die Ausbeuten auf Glucose gleichen denen der Stämme mit FMD-Promotor und liegen um 1 mg GFP/g BTM.

Um auch hier einen Eindruck von der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse zu bekommen, wurden wiederum Vergleichsanalysen erstellt und die Ergebnisse des zweiten Screening über denen des ersten aufgetragen.

Abbildung 37 zeigt das Ergebnis der Kultivierung auf Glycerin. Auch hier befinden sich viele Punkte unterhalb der Winkelhalbierenden. Allerdings gibt es Unterschiede in der Verteilung, denn hier befindet sich auch ein Hauptanteil von Werten oberhalb der Geraden. Ca. 60% der Ausbeuten sind geringer als 2-3 mg GFP/g BTM. Weitere Punkte verteilen sich unterhalb der Ausgleichsgeraden und haben im ersten Screeningdurchgang besser exprimiert. Diese Klone unterscheiden sich in ihren Ausbeuten stärker und es ergeben sich Korrelationen zwischen dem ersten und zweiten Screeningdurchgang. Es kann daraus geschlossen werden, dass sich bei diesem stärkeren Promotor die Nachteile der kürzeren Kultivierung nicht so stark zeigen wie dies bei den Stämmen mit FMD-Promotor der Fall war.

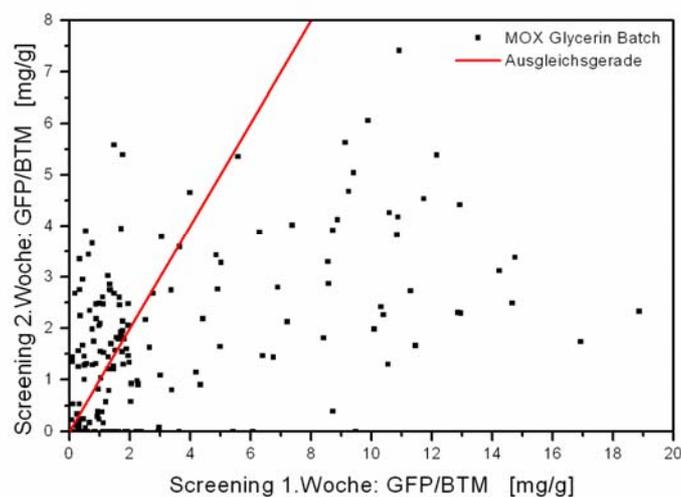


Abb. 37: Vergleichsanalyse von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{MOX} -GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glycerin: T = 37°C; n = 400 rpm; $d_0 = 50\text{mm}$; $V_L = 300\ \mu\text{L}$; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

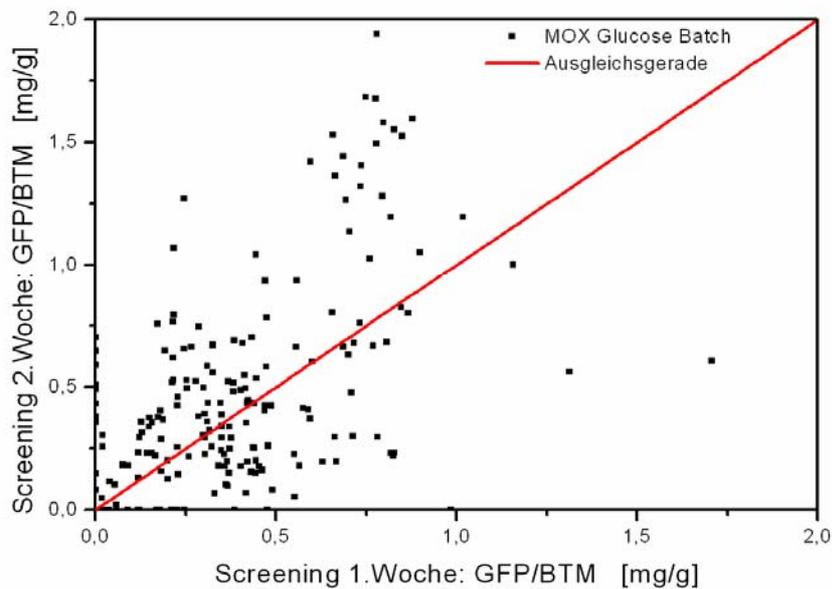


Abb. 38: Vergleichsanalyse von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP ($P_{\text{MOX-GFP}}$) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 400$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

In Bezug auf Glucose geht aus der Abbildung 38 hervor, dass sich die Ausbeuten zwischen 0-2 mg GFP/g BTM bewegen. Dies ist im Vergleich zu den Glycerinwerten gering. Die Punkte verteilen sich um die Gerade in hauptsächlich zwei Pulks. Einer davon liegt oberhalb. Auch bei den Stämmen mit MOX-Promotor haben 13,5% der Klone nur in einem der beiden Durchgänge exprimiert. Diese liegen auf den Achsen. Dies korreliert ziemlich exakt mit den Ergebnissen der Stämme mit FMD-Promotor.

Die Ergebnisse für den Fed-batch sind in Abbildung 39 dargestellt. Auch hier ist die Verteilung der Punkte anders als bei den FMD-Stämmen. Es gibt eine Verteilung im unteren Drittel der y-Achse (2. Screening), also zwischen 0-6 mg GFP/g BTM. Hier liegen die Ausbeuten der meisten Klone. Dieses Band streckt sich in Richtung der x-Achse (1. Screening) bis zu Werten von 17 mg GFP/g BTM. Es gibt auch einige Punkte, die sich entlang der Ausgleichgeraden anordnen, was in Bezug auf die Reproduzierbarkeit ideal ist.

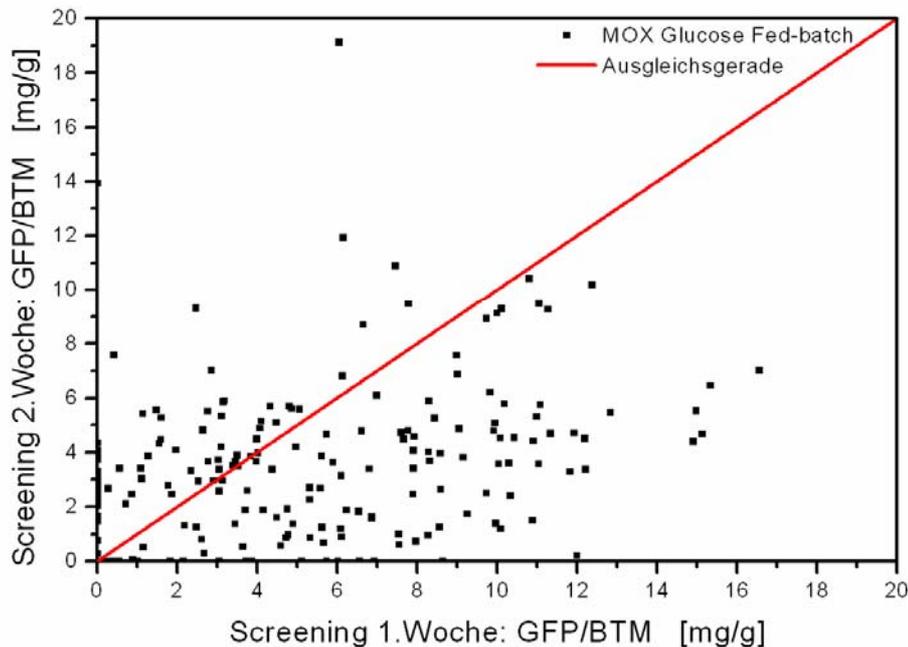


Abb. 39: Vergleichsanalyse von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP ($P_{\text{MOX-GFP}}$) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose Fed-batch in Glucosedisks: T = 37°C; n = 400 rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; Disks: 30% (w/w) Glucose; 5% BaSO₄, D = 5 mm; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

In Bezug auf die Stämme mit MOX-Promotor kann also ausgesagt werden, dass die Ausbeuten sowohl auf Glycerin als auch auf Glucose im Fed-batch deutlich besser sind als die mit FMD-Promotor.

Bei Betrachtung der Gesamtergebnisse kann gefolgert werden, dass sowohl im ersten als auch im zweiten Durchgang ähnlich exprimiert wurde. Zur Beurteilung der Qualität der Reproduktion müssten weitaus mehr Screenings unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Außerdem wäre ein Pipetierroboter hilfreich um Kreuzkontaminationen und Pipetierfehler zu minimieren. Erst dann kann dieser Aspekt richtig eingeschätzt werden. Des Weiteren spielt die Vorkultur für ein reproduzierbares Ergebnis offenbar eine entscheidende Rolle.

Zusammenfassend können sowohl für Stämme mit FMD- als auch für Stämme mit MOX-Promotor folgende Aussagen getroffen werden:

1. Es gibt keine Korrelation zwischen Batch- und Fed-batch-Screening auf Glucose, d.h. die Wahrscheinlichkeit der richtigen Stammauswahl im Batch auf Glucose ist gering.
2. Es gibt eine Korrelation zwischen Batch-Screening auf Glycerin und Fed-batch-Screening auf Glucose, wodurch die Chancen der richtigen Stammwahl steigen.
3. Der beste Stamm im Glucose Fed-batch ist nur Mittelmaß auf Glycerin im Batch und wäre damit nicht gefunden worden.
4. Ein Screening im Fed-Batch ist möglich und auch sinnvoll, da sich gezeigt hat, dass auch auf Glycerin nicht alle Stämme zu finden sind, die im Fed-batch hohe Produktausbeute erzielen.
5. Der bereits im Schüttelkolben eingesetzte Stamm von Dr. C. Amuel, der das gleiche Konstrukt trägt, hatte nur eine Ausbeute von 6,6 mg GFP/g BTM. Dieser liegt somit eher im Mittelfeld mit der Ausbeute. Eine Steigerung zu besseren Stämmen als der bisher etablierte ist also noch möglich.

4.9.3. Einfluss einer Sauerstofflimitierung auf das Screening

Ein weiterer wichtiger Parameter der in Bezug auf das Screening untersucht werden muss, ist der Einfluss einer Sauerstofflimitierung. Aufgrund der fehlenden Online-Analytik bei Kultivierungen in der Kleinkultutechnik ist es möglich, dass auch in der Industrie falsche Bedingungen für das Screening gewählt werden, die zu einer Sauerstofflimitierung führen. Daher ist dies ein interessanter Aspekt, dessen Auswirkungen auf die Stammauswahl untersucht werden sollten. Zu diesem Zweck wurden zwei Versuche mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt, die jeweils zu einer Sauerstofflimitierung führen. Dies wurde in entsprechenden Vorversuchen sichergestellt. Im ersten Screening wurden die gleichen Bedingungen wie bei den vorher beschriebenen nicht limitierten Versuchen eingehalten. Die Sauerstofflimitierung wurde durch eine Reduktion der Drehzahl auf 200 rpm herbeigeführt. Auch in diesem Versuch wurden 10 g/L Glucose bzw. Glycerin im Batch vorgelegt.

Abbildung 40 zeigt das Ergebnis des sauerstofflimitierten Screenings auf Glucose im Vergleich zu Glycerin für Stämme mit FMD-Promotor. Die Stämme sind nach ihrer

Ausbeute in mg GFP/ gBTM auf Glycerin aufsteigend sortiert. Es zeigt sich, dass ca. 30% der Stämme nicht exprimiert haben.

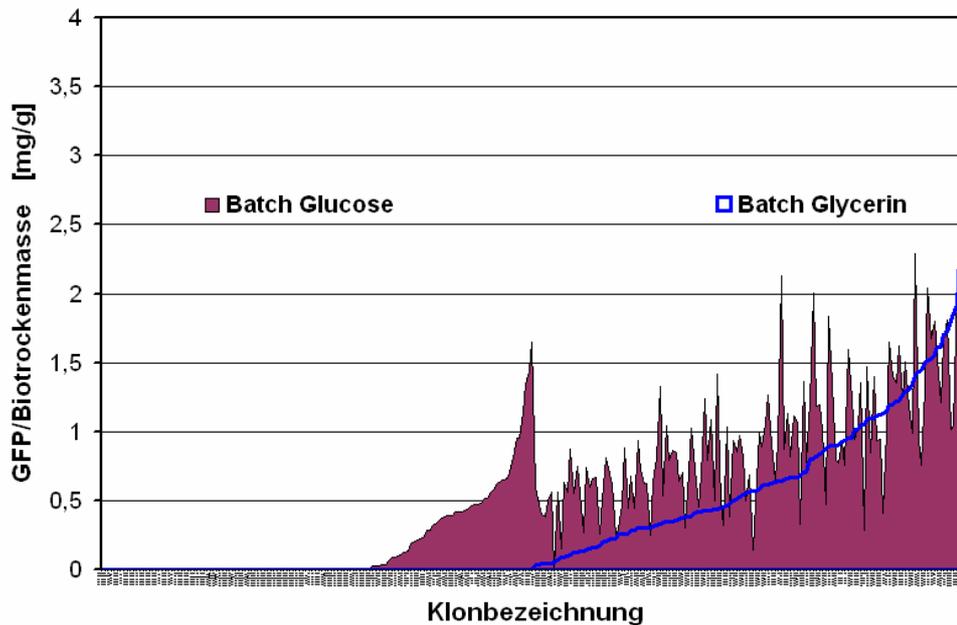


Abb. 40: Screening von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{FMD} -GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 10 g/L Glucose bzw. Glycerin: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 200$ rpm; $d_0 = 50$ mm; $V_L = 300$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:30; 96er-Deepwell-MTP mit 2,2 mL-quadratischen Kavitäten, verschlossen mit semipermeabler Membran (AB Gene).

Des Weiteren kann eine Steigerung der Ausbeute im Batch auf Glucose im Vergleich zum nicht sauerstofflimitierten Screening festgestellt werden. Hier werden Produktkonzentrationen von bis zu 2 mg GFP/g BTM erreicht. Immerhin 20% der Stämme erreichen Ausbeuten von über 1 mg GFP/g BTM. Die Steigerung im Vergleich zum nicht limitierten Screening kann über die gebildeten anaeroben Nebenprodukte erklärt werden, die im Verlauf der Kultivierung zu Produkt verstoffwechselt werden können. Auf Glycerin kam es hingegen zu geringeren Produktausbeuten bis 3 mg GFP/g BTM als bei unlimitierter Sauerstoffversorgung. Als weitere Konsequenz der Sauerstofflimitierung steigen die Ausbeuten im Batch auf Glucose tendenziell mit den Ausbeuten im Batch auf Glycerin. Auch im Batch auf Glucose liegen die guten Klone in Anordnung nach rechts entsprechend der Glycerinsortierung. Das bedeutet, dass die Stämme mit guter Expression auf Glycerin auch gut auf den Nebenprodukten aus der Gärung von Glucose exprimieren. Es gibt also unter diesen Bedingungen eine

Korrelation zwischen Batch auf Glucose und Glycerin, die unter unlimitierten Bedingungen nicht erkennbar ist. Ähnliches gilt auch für das sauerstofflimitierte Screening der Stämme mit MOX-Promotor (Daten nicht gezeigt). Auch hier kommt es zu einer Ausbeutesteigerung auf Glucose und zu einer Korrelation zwischen Glycerin und Glucose-Kultivierung. Außerdem wird auf Glycerin wiederum die Stärke des MOX-Promotors im Vergleich zum FMD-Promotor sichtbar. Hier gibt es mehr Stämme mit höheren Ausbeuten von 2 bis 3 mg GFP/g BTM. Die maximale Ausbeute von 3 mg GFP/g BTM wird aber auch mit dem FMD-Promotor erreicht.

Im zweiten sauerstofflimitierten Versuch wurden andere Bedingungen gewählt. Der Schütteldurchmesser betrug hier nur 25 mm, die Drehzahl 350 rpm und die Glucose- bzw. Glycerinkonzentration 20 g/L.

Abb. 41 zeigt das Ergebnis dieses Screenings der Stämme mit FMD-Promotor. Zunächst fällt hier die überaus hohe Produktausbeute auf Glycerin und Glucose auf, die mit maximal 375 mg GFP/g BTM auf Glucose und knapp über 300 mg GFP/g BTM hundertfach höher ist als im ersten Versuch.

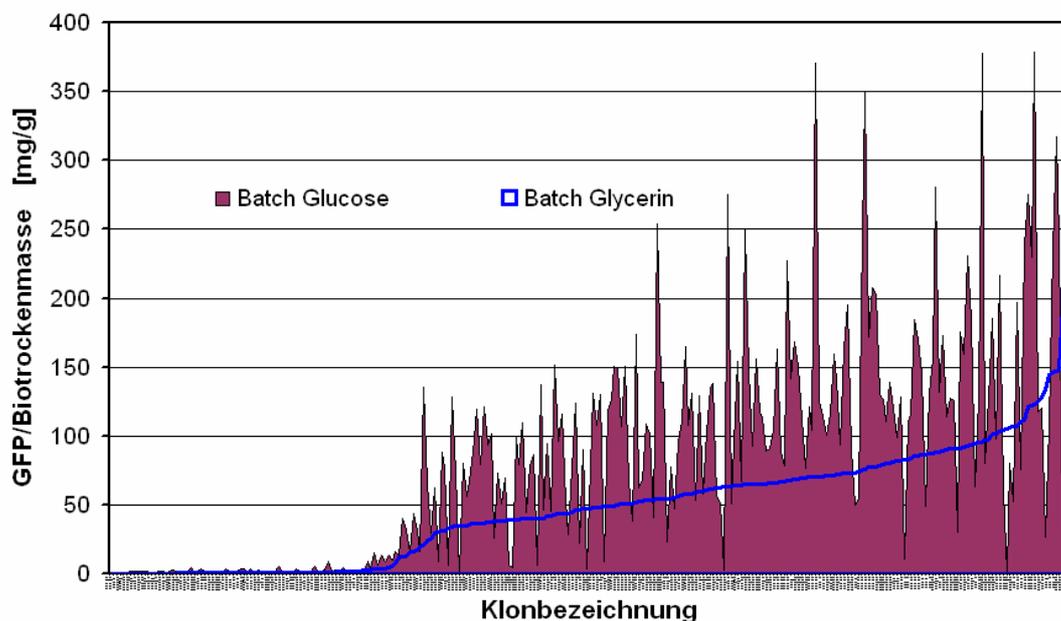


Abb. 41: Screening von *H. polymorpha* RB11 pC10-GFP (P_{FMD} -GFP) Stämmen in Syn6-MES-Medium mit 20 g/L Glucose bzw. Glycerin: $T = 37^{\circ}\text{C}$; $n = 350$ Rpm; $d_0 = 25$ mm; $V_L = 500$ μL ; befeuchtete Luft; Animpfverhältnis 1:25; 4-eckige Platten (AB Gene) + semipermeable Membran (AB Gene)

Dies liegt an der höheren Glucosekonzentration über die mehr BTM gebildet werden kann und an einer längeren als auch stärkeren Limitierungsphase in der mehr anaerobe Nebenprodukte wie Ethanol bei Glucose als Substrat gebildet werden. Auf diesem Nebenprodukt sind die Stämme dann dereprimiert und können viel Produkt synthetisieren.

Ansonsten kommt es auch hier wieder zu einer Korrelation zwischen Glucose- und Glycerin-Kultivierung. Wiederholt haben ca. 25% der Stämme kein Produkt gebildet bzw. sind nicht angewachsen.

Allerdings sind die Stämme mit MOX-Promotor diesmal schlechter als die mit FMD-Promotor. Insgesamt können hier aber die gleichen Aussagen getroffen werden. Auch hier ist eine Korrelation zwischen Glucose und Glycerin sichtbar. Durch die höheren Glucosekonzentrationen und die längere Limitierung kommt die ebenfalls 100-fach höhere Produktausbeute im Vergleich zu sauerstoffunlimitierten Bedingungen zustande.

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse wie folgt:

1. Die Sauerstofflimitierung hat einen Einfluss auf die Stammauswahl und verändert die Produktausbeute.
2. Es kommt zu höheren Ausbeuten unter sauerstofflimitierten Bedingungen auf Glucose.
3. Die Vorteile einiger Stämme kommen unter diesen Bedingungen auch auf Glucose zum Tragen, da die Stämme auf anaeroben Nebenprodukten wie Ethanol dereprimiert sind und Produkt bilden.

Es muss also auf eine Sauerstofflimitation geachtet werden, da diese das Ergebnis des Screenings verfälscht.

5. Diskussion

Es wurde durch den Einsatz von Silikonelastomerdisk zur Etablierung eines Fed-Batchs im Schüttelkolben gezeigt, dass es durch relativ einfach praktikable Weise möglich ist die spezifische Expression von katabolitreprimierten Produkten immens zu erhöhen. Signifikant hebt sich die Ausbeute von grünfluoreszierendem Protein (GFP) und gelbfluoreszierendem Protein (YFP) im Vergleich zu Batch-Kulturen mit direkt verfügbarer Glucose in höheren Konzentrationen ab. Die höhere Ausbeute im Vergleich zu Batch-Kulturen wurde durch definiert niedrig eingestellte Glucoselevel erreicht. Hierbei wurde die Katabolitrepession aufgehoben, welche in allen Batchansätzen bis kurz vor dem absoluten Verbrauch der Glucose vorliegt.

Eine weitere Folge einer allmählichen Zufütterung von Glucose anstatt direkt verfügbar zu sein wie im Batch ist die Minimierung des Overflow-Metabolismus, was sich nicht nur in Produktausbeuten, sondern auch in höheren Biomasseausbeuten niederschlägt. Es wurde gezeigt, dass es verschiedene Stufen des Overflow-Metabolismus von *H. polymorpha* gibt. Bis zu einer Glucosekonzentration von 20 g/L ist der Hauptmetabolit Ethanol. Bei *E. coli* ist dies Essigsäure. Diese wird in beiden Fällen wieder verstoffwechselt, wenn Glucose aufgebraucht ist. Ist das direkte Glucoseangebot höher als 20 g/L bildet *H. polymorpha* ebenfalls signifikante Mengen an Essigsäure und anderen Nebenprodukten, die nicht unbedingt verstoffwechselt werden können oder das Wachstum bzw. Produktbildung inhibieren.

Die Vorteile der Fed-Batch-Technik durch Freisetzungssysteme liegen in ihrer einfachen Handhabung und vor allem darin, dass keine Mess- und Regelapparaturen benötigt werden, um die Systeme zu kontrollieren. Wenn die Freisetzungssysteme einmal eingestellt und charakterisiert sind, werden alle Prozesse absolut reproduzierbar ablaufen. Eine solche Technik ist gerade bei Fermentation mit Katabolitrepessionen, wie im Bericht aufgezeigt, von großem Vorteil. In den meisten Fällen muss nicht die gleiche Fütterrate wie im Großmaßstab eingestellt werden, um nützliche Prozessinformationen zu erhalten.

Weiterhin ist die Erschließung von Deep-Well-Platten für die Fed-Batch-Kultivierung von Mikroorganismen, wegen des Hochdurchsatzes und der enormen Parallelisierbarkeit von großem Vorteil. Der wichtigste Grund zur Anwendung solcher Freisetzungssysteme ist, dass nur ein Screening unter Fed-Batch-Bedingungen den optimalen Stamm für eine Fed-Batch-Fermentation im größeren Maßstab liefern

kann. Ein Fehler in der Auswahl des Stammes im Primär-Screening hat Auswirkungen auf die folgende Prozessentwicklung und kann in der Regel nicht wieder kompensiert werden (Büchs, 2001; Peter et al., 2004).

Ein Screening kann durch verschiedenste Faktoren positiv oder negativ beeinflusst werden. Im letzten Kapitel dieses Berichts wurde der Einfluss der Betriebsweise auf die Selektion eines optimalen Stammes zur Fed-batch-Kultivierung untersucht. Das Ergebnis sind Vergleichsanalysen, die eine Aussage darüber geben unter welchen Bedingungen mit der größten Wahrscheinlichkeit der beste Stamm ausgewählt wird. Die Untersuchung ergab große Unterschiede in der Produktausbeute im Fed-batch zum Batch, sowohl für die Stämme mit MOX-Promotor als auch für die mit FMD-Promotor. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung im Batch auf Glucose sehr gering und bei allen Stämmen ähnlich sind.

Im Vergleich dazu sind die Ausbeuten des Batch auf Glycerin viel weiter gestreut. Sehr hohe Ausbeuten werden erreicht, die mit dem Fed-batch nur eine tendenzielle Ähnlichkeit zeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich also folgern, dass im Screening unter Batch-Bedingungen keine Stämme erkannt werden, die unter Fed-batch-Bedingungen optimal exprimieren. Dies liegt daran, dass unter Batch-Bedingungen auf Glucose der Promotor reprimiert ist, und so das Expressionspotential der einzelnen Stämme nicht erkennbar ist. Dies ist auf Glycerin anders. Hier liegt nur partielle Repression des Promotors vor und daher können unter diesen Bedingungen potentiell gute Stämme selektiert werden. Die Wahl eines anderen Substrats und Betriebsweise ist jedoch für eine Maßstabsübertragung nicht zu empfehlen und birgt generelle Risiken.

Der bereits im Schüttelkolben eingesetzte Stamm von Dr. C. Amuel, der das gleiche Konstrukt trägt, hatte nur eine Ausbeute von 6,6 mg GFP/g BTM. Dieser liegt somit eher im Mittelfeld mit der Ausbeute im Fed-batch und wurde auf Glycerin von Amuel et al. selektiert (Amuel et al., 2000). Eine Steigerung zu besseren Stämmen als der bisher etablierte ist also noch möglich.

Das Screening unter Sauerstofflimitierung führt zu einem anderen Ergebnis als unter unlimitierten Sauerstoffverhältnissen. Unter diesen Bedingungen lässt sich auch im Batch auf Glucose eine Tendenz mit dem Glycerin-Screening erkennen. Eine Sauerstofflimitierung im Batch führt bei vielen Mikroorganismen zu einer verstärkten Nebenproduktbildung. Dies wurde von Clark et. al. z.B. für *S. erythraea* nach-

gewiesen (Clark et al., 1995). Auf diesen Nebenprodukten ist der Promotor nicht länger reprimiert und es setzt die Produktbildung ein. Dadurch ergaben sich ähnliche Tendenzen wie auf partiell reprimiertem Glycerin-Ansatz.

In Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Screenings können bisher nur sehr schwer Aussagen getroffen werden, da die ersten aufwendigen Untersuchungen nur einmal unter leicht unterschiedlichen Bedingungen wiederholt wurden. Es kann festgehalten werden, dass ca. 80-90% der Stämme in beiden Screening-Durchgängen Produkt gebildet haben. Auf Glycerin war die Ausbeute geringer, da die Stämme wegen des Substratwechsels in einem Durchgang schlechter angewachsen sind und nach 20 h noch nicht vollständig durchgewachsen waren (Stöckmann et al., 2003a).

6. Ausblick

Mit den untersuchten mikrobiellen Systemen konnte der Vorteil der neu entwickelten Technik bereits eindeutig demonstriert werden. Es ist sinnvoll weitere recht unterschiedliche Mikroorganismen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Auf polymerchemischem Gebiet sind weitere Untersuchungen zur Modifizierung und Anpassung der Freisetzungskinetik an die Bedürfnisse der verschiedenen Mikroorganismen erforderlich. Das bereits vorliegende beachtliche Syntheseportfolio muss dazu sicher noch erweitert und verfeinert werden. Besonders die Entwicklung und Optimierung von Mikrotiterplatten kombiniert mit Freisetzungssystemen erscheint sehr zukunftssträftig. Anzustreben ist eine Lösung, bei der eine Online-Verfolgung der Kulturen auf optischem Wege erhalten bleibt. Im allgemeinen sind pH-Regulierungen durch Freisetzungen pH-aktiver Substanzen möglich und aufgrund einer nicht ausreichenden Puffermöglichkeit bei vielen Mikroorganismen erforderlich.

7. Soll/Ist-Vergleich des Projektes

Die Aufteilung der verschiedenen Arbeitspakete wurde im geplanten Zeitrahmen weitestgehend so durchgeführt wie im Antrag geplant war. Die noch fehlenden Arbeitspunkte wurden über eine kostenneutrale Verlängerung von einem halben Jahr bearbeitet.

7.1. Definition der Anforderungen

Es sollten Freisetzungssysteme entwickelt werden, die einen Fed-Batch-Betrieb in Schüttelkulturen ermöglichen. D.h. es musste ein Polymer gefunden werden, welches eine Freisetzung im Bereich von: $2,5-250 \text{ g}_{\text{Nährstoff}} / (L_{\text{Kulturvolumen}} \times h_{\text{Gesamtkulturzeit}})$ besitzt. Die angegebenen Freisetzungsgeschwindigkeiten konnten mit der eingesetzten Mischung von Silikonelastomeren eingestellt werden und wurden in ihren Freisetzungsprofilen näher untersucht.

7.2. Entwicklung und experimentelle Charakterisierung der Freisetzungssysteme

Die gewählten Freisetzungssysteme wurden, wie im Bericht ausführlich dargelegt, in allen Variationen charakterisiert und ihr spezifisches Verhalten in Bezug auf Glucosebeladung, geometrischer Form und Silikonzusammensetzung bzw. Beschichtung untersucht. In dieses Arbeitspaket wurde mehr Zeit investiert als eigentlich im Antrag vorgesehen, weil die neu aufgenommene Miniaturisierung hin zur Deep-Well-Platte ein äußerst interessanter Aspekt für die Industrie ist.

7.3. Bestimmung der Kinetiken von *H. polymorpha*, Optimierung des Expressionssystems in *H. polymorpha*

Die Bestimmung der Kinetiken von *H. polymorpha* wurde zunächst im 3-L-Maßstab im Laborfermenter durchgeführt. Die Optimierung der Bedingungen hinsichtlich Minimalmedium und aller weiteren Prozessparameter wurden in der RAMOS-Anlage in Batch- und Fed-Batch-Betriebsweise durchgeführt. Interessante Unterschiede diverser Medien wurden aufgedeckt und ebenfalls hier beschrieben. Im Unterschied zum Antrag wurde ein Organismus gewählt, der GFP exprimiert. Für *E. coli* wurde analog ein YFP-Stamm ausgesucht. Diese Stämme wurden aufgrund leichter

Produktdetektierbarkeit bzw. Möglichkeit zu Online-Überwachung einem phytaseproduzierenden Stamm vorgezogen.

7.4. Erstellung eines mathematischen Modells zur Optimierung der Freisetzung

Zur Optimierung der Freisetzungssysteme wurden die erhaltenen Kurven mit Wurzelfunktionen beschrieben. Daher sind einige Auftragungen in dieser Form gestaltet, so daß die Kurven mittels Regression beschrieben und in Klassen eingeordnet werden konnten. Die Kinetiken werden nun maßgeschneidert auf die Wachstumsgeschwindigkeiten der Organismen und an verschiedene Anforderungen wie z.B. Kultivierungen in der Deep-Well-Platte angepasst. Dafür wurde ein Modell entwickelt, um beispielsweise das Wachstum und den Overflow-Metabolismus von *H. polymorpha* im Batch zu simulieren und auf den Fed-batch zu übertragen.

7.5. Optimierung der Freisetzungssysteme

Die Freisetzungssysteme werden fortwährend hinsichtlich ihrer Parameter: Zusammensetzung, geometrischer Form und Glucosebeladung angepasst und für die entsprechenden Anforderungen produziert. Dementsprechend werden neuerdings für Kultivierungen mit *H. polymorpha* andere Glucosegehalte benutzt als für *E. coli*. Weiterhin gibt es die Freisetzungen in Deep-Well-Platten, die reproduzierbare Freisetzungen liefern müssen und direkt mit dem Schüttelkolben vergleichbar sein sollen. Da die Freisetzungen nur von einer Seite des Materials stattfinden können, sind hierfür auch Veränderungen in der Polymerchemie erforderlich gewesen. Diese Platten sollen nun zum Screening eingesetzt werden.

7.6. Screening nach geeignetem Expressionssystem im Schüttelkolben

Es wurden je ca. 250 Klone aus einer Transformation von *H. polymorpha* mit Konstrukten mit FMD- oder MOX-Promotor gesteuerter GFP-Synthese gewählt. Diese wurden in entsprechenden Vorkultivierungen bis zu stabilen Stämmen geführt. Die Screening-Arbeiten wurden im Batch auf Glycerin und auf Glucose als auch im Fed-batch auf Glucose auf Disks durchgeführt. Vergleichend wurden auch Batch-Screenings unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Eine noch einfachere, parallele

Handhabung der Disks war dabei gewährleistet durch Kultivierung in Deep-Well-Platten.

7.7. Erstellung von Berichten, Publikation und Präsentation der Ergebnisse auf Tagungen

Die erforderlichen Texte für Sonderbände der Transkript als auch das Internetportal der IC Bio wurden wie gewünscht verfasst und zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden Teile der Arbeit aus diesem Projekt auf den Bioperspectives 2005 von Herrn Markus Jeude unter dem Titel „*Fed-Batch mode in shake flasks by slow-release technique*“ vorgetragen (Abstract siehe Anlage). Ebenso gab es eine Präsentation von AC Biotec bei den Bioperspectives 2005, wobei Dr.-Ing. Tibor Anderlei einen Vortrag hielt. Weiterhin werden Teile dieser Arbeit bei der Jahrestagung der VAAM (Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie) im März 2006 durch Herrn Markus Jeude vorgetragen. Geplant ist außerdem eine Veröffentlichung der Inhalte in dem Journal „*Biotechnology & Bioengineering*“.

8. Erreichen der Meilensteine

Der Meilenstein nach dem 60% der spezifischen Produktivität eines Fermenteransatzes erreicht werden sollte, wurde bereits jetzt erzielt. Die spezifische Produktivität konnte mit Hilfe der Freisetzungssysteme im Vergleich zum Batch enorm gesteigert werden. Bei der Biomassebildung konnten bis Glucosefreisetzungssystemen von 40 g/L ohne Stellmittelzugabe die gleiche Zelldichte eines Fermenters erreicht werden.

Ein weiterer Meilenstein ist, dass AC Biotec Auftragsforschungen für Fremdfirmen durchführt. Bisher steht AC Biotec in Projektbesprechungen mit der Fa. N-Zyme bezüglich Kultivierungen mit Freisetzungssystemen. AC Biotec hat die Lizenzrechte bei der Vermarktung von „Feed-Beads in der Mikrotiterplatte“ nach einer deutschen Patentanmeldung (102005022045.2: „Fermentationsverfahren und Anordnung zu dessen Durchführung“) erworben.

9. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Polymere Freisetzungssysteme sind in biotechnologischen Anwendungen zur Wertstoffproduktion bislang nicht bekannt. Sie stellen eine Umsetzung des Fed-Batch-Prinzips in Schüttelreaktoren dar und ermöglichen bei einfacher Anwendbarkeit im Laboralltag einen frühzeitigen Informationsgewinn zur Prozessteuerung. Gegenüber Dosier- und Regelapparaturen sind sie eine billige Alternative und ermöglichen durch die konkurrenzlos einfache Handhabung vollkommen neue Arbeitsweisen in der Biotechnologie.

In einer von der AC Biotec GmbH durchgeführten Studie wurde eine grobe Abschätzung des Marktpotentials von polymerbasierten Freisetzungssystemen durchgeführt.

Die derzeitigen Überlegungen zur Vermarktung des in diesem Projekt erarbeiteten Know-how und möglicher Produkte (polymerbasierte Freisetzungssysteme) sieht folgendermaßen aus:

- Einmal könnte ein Sortiment polymerbasierter Freisetzungssysteme mit verschiedenen Freisetzungskinetiken weltweit angeboten werden. Dieses Sortiment ist erforderlich, um für jeden Anwendungsfall (schnell oder langsam wachsende und metabolisierende Organismen) geeignete Lösungen anbieten zu

können. Es ist plausibel Variationen von verschiedenen Freisetzungssystemen anzubieten, um Zwischenpunkte abzudecken.

- Nach allgemeiner Erfahrung reicht oft bei neuen erklärungsbedürftigen Produkten und Techniken das bloße Anbieten auf dem Markt nicht aus. Potentielle Kunden möchten sich nicht in alle Neuerungen gleich einarbeiten und erwarten zunächst, dass man den Nutzen der neuen Produkte an ihren eigenen Problembeispielen vorführt. Wenn diese Phase positiv verläuft, besteht die Chance, dass das neue Produkt oder die Technik in den Routinebetrieb des Kunden überführt wird. Oft haben Kunden auch nur eine begrenzte Anwendung und sind hierfür bereit, ihr Problem von einem externen Dienstleister lösen zu lassen.

Die am Projekt beteiligte Firma AC Biotec GmbH bietet inzwischen mit den neu zu entwickelnden polymerbasierten Freisetzungssystemen eine bisher nicht verfügbare Dienstleistung auf dem Gebiet der Prozessentwicklung an. Die Firma AC Biotec bietet außerdem für Firmen die Überarbeitung und Optimierung derer Screening-systeme hinsichtlich Sauerstoffversorgung und anderer verfahrenstechnischer Parameter an. Die Etablierung von Fed-Batch-Screening-Protokollen mit Hilfe von polymerbasierten Freisetzungssystemen für Kunden paßt daher hervorragend in die Angebotspakete der Firma. Außerdem besitzt die Firma AC Biotec mit ihrem speziellen Know-how im Umgang mit der RAMOS-Technologie beste Voraussetzungen zur Vermarktung der erläuterten Dienstleistung. Die RAMOS-Technologie ist ein sehr geeignetes Mittel, um die Auswirkungen der Freisetzungssysteme in der Schüttelkultur zu dokumentieren.

Die Studie liegt bei AC Biotec schriftlich vor und kann ebenfalls im Projektantrag eingesehen werden. Neue Studien liegen für Deep-Well-Platten vor.

10. Kooperation innerhalb des Projektes

Die Anzahl der Projekttreffen belaufen sich auf sieben, wobei das Intervall ca. drei Monate betrug. Es herrschte ein reger Austausch der Bearbeiter in Aachen und AC Biotec in Abständen von weniger als 14 Tagen. Engagement innerhalb des Verbundes/ Taskforcegruppen gab es mit dem Projekt von Dr.-Ing. Tibor Anderlei (Az 13094) für Glucose-Oxidase/ Katalase gekoppelter Glucosefreisetzungsmessung in der RAMOS-Anlage. Weiterhin wurde mit Phenion GmbH & Co. KG, Frankfurt

kooperiert zwecks einer CTR-Messung diverser Hefe-Stämme in der RAMOS-Anlage (Az 13082).

Referenzen

- Amuel C, Gellissen G, Hollenberg CP, Suckow M. 2000. Analysis of Heat Shock Promoters in *Hansenula polymorpha*: The TPS1 Promoter, a Novel Element for Heterologous Gene Expression. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 5:247-252.
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):187-194.
- Baker R. 1987. Controlled release of biologically active agents. John Wiley & Sons, New York:1-280.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):91-98.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME. 1995. Oxygen Limitation Can Induce Microbial Secondary Metabolite Formation - Investigations with Miniature Electrodes in Shaker and Bioreactor Culture. *Microbiology-Uk* 141:663-669.
- Danielson PB, Büchs J, Stöckmann C, Fogleman JC. 2004. Maximizing cell densities in miniprep-scale cultures with H15 medium and improved oxygen transfer. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):175-180.
- Gellissen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6):741-750.
- Hermann R, Walther N, Maier U, Büchs J. 2001. Optical method for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. *Biotechnology and Bioengineering* 74(5):355-363.
- Humphrey A. 1998. Shake flask to fermentor: What have we learned? *Biotechnology Progress* 14(1):3-7.
- Larsson G, Jorgensen SB, Pons MN, Sonnleitner B, Tijsterman A, Titchener-Hooker N. 1997. *Biochemical engineering science.* *J Biotechnol* 59(1-2):3-9.
- Losen M, Frolich B, Pohl M, Büchs J. 2004. Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnology Progress* 20(4):1062-1068.
- Lotter S, Büchs J. 2004. Utilization of specific power input measurements for optimization of culture conditions in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):195-203.
- Maier U, Losen M, Büchs J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):155-167.
- Peter CP, Lotter S, Maier U, Büchs J. 2004. Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):205-215.
- Raval KN, Hellwig S, Prakash G, Ramos-Plasencia A, Srivastava A, Büchs J. 2003. Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(1):16-22.
- Rheinwald J, Green H. 1974. Growth of cultured mammalian cells on secondary glucose sources. *Cell* 2(4):287-93.
- Riesenber D. 1991. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 2(3):380-4.
- Riesenber D, Guthke R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(4):422-430.
- Samorski M, Müller-Newen G, Büchs J. 2005. Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: a novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* 92(1):61-8.
- Schirrer R, Thepin P, Torres G. 1992. Water-Absorption, Swelling, Rupture and Salt Release in Salt Silicone-Rubber Compounds. *Journal of Materials Science* 27(13):3424-3434.
- Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, Büchs J. 2003. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62(1):92-98.
- Stöckmann C, Losen M, Dahlems U, Knocke C, Gellissen G, Büchs J. 2003a. Effect of oxygen supply on passaging, stabilising and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res* 4(2):195-205.
- Stöckmann C, Maier U, Anderlei T, Knocke C, Gellissen G, Büchs J. 2003b. The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hansenula polymorpha* screening cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(10):613-622.
- Suckow M, Gellissen G. 2002. *Hansenula polymorpha* - Biology and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim.
- Tomanek A. 1990. *Silicone & Technik.* Hrsg. Wacker-Chemie GmbH, Hanser München.
- Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M. 2001. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):163-170.

- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Syltatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering* 73(2):95-103.
- Wolf K. 1996. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*: Springer Verlag, S. 293-306.
- Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO. 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(5):564-571.
- Van Noort, R.; Black, M. M. "Silicone rubbers for medical applications" in Williams, D. F. (Ed.) "Biocompatibility of clinical implant materials" CRC Press, Boca Raton, Florida (1981).
- Gorham, W. F. "A new, general synthetic method for the preparation of linear Poly-p-xylylenes" *Journal of Polymer Science Part A-1* 4 (1966), 3027.
- Moore, G. A. "Connectivity of Dispersed Particles: A Probabilistic Computation" in Proceedings of the Fourth International Congress for Stereology, NBS Special Publication no. 431, NBS Gaithersburg (1976) zitiert nach (Baker, 1987).
- Lahann, J.; Klee, D.; Plüster, W.; Höcker, H. "Bioactive immobilization of r-hirudin on CVD-coated metallic implant devices" *Biomaterials* 22 (2001) 817-826.
- Ademovic, Z. "Oberflächenmodifizierung von Poly(vinylidenfluorid) zur Minimierung der Proteinadsorption" Dissertation an der Math.-Naturwiss. Fakultät der RWTH Aachen (2002).
- Boeing, J. "Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität" Dissertation an der Math.-Naturwiss. Fakultät der RWTH Aachen (2003).

Anhang 1: Abstract Bioperspectives 2005**Influence of operational mode in screenings on clone selection**

*Markus Jeude*¹, *Barbara Dittrich*², *Tibor Anderlei*³, *Doris Klee*², *Jochen Büchs*¹

¹Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, 52056 Aachen, Germany

²Textile Chemistry and Macromolecular Chemistry, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

³AC Biotec GmbH, 52428 Jülich, Germany

In principle, a high number of clones need to be tested in primary screening procedures to reveal new or optimized microbial production systems. Due to high financial and personell effort a rational screening can only be performed in small scale cultures. Therefore, shake flask experiments in batch mode are commonly performed. Within such fermentation processes high substrate and buffer concentrations are applied from the beginning of the reaction.

If a microorganism undergoes phenomena like specific substrate inhibition, unspecific inhibition owing to low water activity or high osmotic pressure, batch is not a desired operational mode. Some microorganisms show overflow metabolism at high substrate concentrations and excrete large amounts of anaerobic byproducts even under strictly aerobic conditions. Well-known representatives are *Escherichia coli* and the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. The consequence of overflow metabolism is very often a drift of pH or byproduct inhibition. Catabolite repression occurring at elevated concentration of a readily available carbon source is the most relevant case of negative metabolic phenomena during batch cultivation. Hardly any product will be synthesized, if the operon is intact and completely repressed by a specific substrate. Because of the above mentioned aspects most industrial production processes are performed in fed-batch mode. In contrast, the screenings for the microbial production system are still conducted in batch mode and, therefore, an inappropriate screening system is applied. An error in the selection of a strain has effects on the whole process development and can hardly be compensated afterwards.

In this project a fed-batch mode in small scale cultures with low financial and personal effort was established by applying silicone elastomer discs containing glucose. Experiments were performed to feed glucose by diffusion (slow-release) (1) to recombinant *Escherichia coli* strains producing yellow fluorescent protein (YFP), (2) to the facultative methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* wildtype and (3) to a recombinant strain synthesizing green fluorescent protein (GFP). The formation of specific products like GFP or YFP in shake flasks was measured offline while respiration of the cultures was monitored online by a Respiration Acitivity MOnitoring System (RAMOS). The courses of substrate release from the silicone elastomers were continuously investigated in an abiotic test performing an enzymatic glucose assay. The formation of GFP and YFP was improved up to 30-fold by using the silicone elastomer discs establishing fed-batch mode. Overflow metabolism of *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* could be reduced and therefore up to 50% higher biomass concentrations were revealed in comparison to batch cultures.

Finally, slow-release based fed-batch and its possibilities were pointed out in small scale cultures focussing on process optimization and decrease of scale-up problems. Obviously, an operational mode specific strain screening is essential for more efficient fed-batch processes.

Anhang 2: Abstract VAAM 2006**Influence of operational mode in screenings on clone selection**

Markus Jude¹, Barbara Dittrich², Tibor Anderlei³, Manfred Suckow⁴, Doris Klee², Jochen Büchs¹

¹Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

²Textile Chemistry and Macromolecular Chemistry, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

³AC Biotec GmbH, 52428 Jülich, Germany

⁴Rhein Biotech GmbH, 40595 Düsseldorf, Germany

In principle, a high number of clones needs to be tested in primary screening procedures to reveal new or optimized microbial expression systems. Due to high financial and personell effort a rational screening can only be performed in small scale cultures. Therefore, shake flask experiments in batch mode are commonly performed. Within such fermentation processes high initial substrate and buffer concentrations are applied.

If a microorganism undergoes phenomena like specific substrate inhibition, unspecific inhibition owing to low water activity or high osmotic pressure, batch is not a desired operational mode. Some microorganisms respond with overflow metabolism at high substrate concentrations and excrete large amounts of anaerobic byproducts even under strictly aerobic conditions. Well-known representatives are *Escherichia coli* and the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. The consequence of overflow metabolism is very often a drift of pH or byproduct inhibition. Catabolite repression occurring at elevated concentration of a readily available carbon source is the most relevant case of negative metabolic phenomena during batch cultivation. Hardly any product will be synthesized, if the operon is intact and completely repressed by a specific substrate. Because of the above mentioned aspects most industrial production processes are performed in fed-batch mode. In contrast, the screenings for the microbial production system are still conducted in batch mode and, therefore, an inappropriate screening system is applied.

In this project, a fed-batch mode in small scale cultures was established based on diffusion (slow-release) from silicone elastomer discs containing glucose. Experiments were performed to feed glucose to *H. polymorpha* wildtype (DSM 70277) and RB11 derivate pC10-FMD (P_{FMD} -GFP) synthesizing green fluorescent protein (GFP). Overflow metabolism of *H. polymorpha* could be reduced in fed-batch and up to 85% higher biomass concentrations were revealed. This lead to 23.4 g/L cell dry weight in contrast to 12.7 g/L in batch. The formation of GFP was improved up to 35-fold compared to batch mode by using the silicone elastomer discs based fed-batch mode.

This aroused the hypothesis whether the operational mode has an influence on the clone selection in a screening. Therefore, from a transformation of *H. polymorpha* RB11 pC10-FMD (P_{FMD} -GFP) and pC10-MOX (P_{MOX} -GFP) about 250 clones each were stabilized in 11 cultivation steps. Specific GFP formation was investigated in a simultaneous screening step on Syn6-MES mineral medium. A batch mode with 10 g/L of catabolite repressing glucose was performed in comparison to a batch with 10 g/L of non-repressing glycerol and a fed-batch mode with glucose achieving derepression at a certain fermentation step. Different levels of GFP expression on the two carbon sources and on operational mode were observed leading to the general result that a process directed screening is essential for the selection of the most efficient clone.