

Projektabschlussbericht

Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in der Zellkulturtechnik

Az. 13120

Antragsteller:

Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (kurz TCI)
Callinstrasse 3, D-30167 Hannover
Tel.: 0511-762-2509
Fax: 0511-762-3004
Email: Scheper@iftc.uni-hannover.de

Industriepartner:

1.
Dr. Uwe Klaus
Fa. Saxonia BioTec GmbH (kurz Saxonia)
Juri-Gargarin-Strasse 13, D-01454 Radeberg
Tel.: 03528-41460
Email: DrKlaus@saxonia-biotec.de

2.
Dr. Jörn Glöckler
Fa. RiNA GmbH Netzwerk RNA Technologien (kurz RiNA)
Takustrasse 3, D-14195 Berlin
Tel.: 030-844166-40
Fax: 030-844166-11
Email: Glöckler@rna-network.com

Berichtszeitraum:
01. Dezember 2004 – 30. November 2006

1. Zusammenfassung

Der vorliegende Bericht fasst die wissenschaftlichen Arbeiten der Projektpartner TCI, Saxonia und RiNA im DBU/ICBio-Forschungsprojekt „Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in der Zellkulturtechnik“, Az. 13120 zusammen, die in der Projektlaufzeit vom 01. Dezember 2004 bis 30. November 2006 erarbeitet wurden. Die Arbeiten dienten der Adaptierung eines miniaturisierten Mikrohohlfaserreaktor-Basissystems des Partners Saxonia für biotechnologische Anwendungen, wie die Zellkultivierung, das Downstream processing oder die Wirkstofftestung. Das ehrgeizige Arbeitsprogramm musste im Verlaufe des Projektes angepasst werden, da grundlegende Arbeiten nötig waren, um das vorliegende Reaktorbasissystem überhaupt für den Einsatz in biotechnologischen Anwendungen einsetzen zu können.

Die umfangreichen Arbeiten hinsichtlich Weiterentwicklung bzw. letztlich sogar einer vollständigen Neukonstruktion des Mikrohohlfaserreaktors des Partners Saxonia ermöglichten den Aufbau eines differenzierten Reaktorsystems, das z.B. durch Integration eines Rührers, zusätzlicher Hohlfasermembranlagern für eine O₂-Begasung oder den Einbau einer faseroptischen online-Analytik erfolgreich im Anwendungsbereich Zellkultivierung eingesetzt werden kann. Um kontaminationsfreies Arbeiten zu gewährleisten, wurde ein umfangreiches Screening von Sterilisationsmethoden durchgeführt und ein geeignetes Sterilisationsprotokoll unter Berücksichtigung einer intakten Membranoberflächenstruktur erarbeitet. Zudem wurde ein Integritätstest zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Hohlfasermembranen im Modul etabliert.

Das Mikrohohlfaserreaktor (MHFR)-System wurde während der Arbeiten in Bezug auf das Verweilzeit-, Mischungs- und Strömungsverhalten u.a. reaktionstechnisch charakterisiert, um die Weiterentwicklung des Reaktorsystems hinsichtlich seiner Optimierung zu überprüfen und um grundlegende technische Daten zu erarbeiten.

Die durchgeführten Arbeiten zeigten, dass verschiedene Hohlfasermembrantypen aus PES und PS auf Grundlage eines erarbeiteten Modifizierungsprotokolls mit unterschiedlichen Liganden dekoriert werden können. Die hydrophoben

Membranoberflächen mussten hierfür im Vorfeld aufwendig aktiviert werden, um überhaupt eine ausreichende Anzahl an Bindungsstellen für die Ligandenanbindung zur Verfügung zu stellen. Weiterführend wurden Analysen der Membranoberflächenstruktur vorgenommen, um die Integrität der Hohlfasern nach erfolgter Aktivierung und Ligandendekoration zu bestätigen.

Im Anwendungsbereich Downstream processing wurden die verschiedenen produzierten Affinitätshohlfasermembranen für spezifische Trennprobleme getestet und eingesetzt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf der Aufreinigung von His-tag-Proteinen, die durch entsprechende zur Verfügung stehende Testorganismen produziert wurden. Die neuartigen Aptamerliganden standen aufgrund des aufwendigen Herstellungsverfahrens der spezifischen Aptamere durch den Partner RINA nur in geringen Mengen zur Verfügung und konnten aufgrund von Stabilitätsproblemen bei der Anbindung an die aktivierten Hohlfaseroberflächen im Rahmen des Projektes nicht abschließend bearbeitet werden.

Die Etablierung des MHFR-Systems im Bereich Zellkultivierung wurde anhand der Kultivierung einer Auswahl verschiedener Produktionsorganismen, wie *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli* durchgeführt und der klassischen batch-Kultivierung im Schüttelkolben gegenübergestellt. Die Auswahl der verwendeten Mikroorganismen erfolgte anhand der spezifisch produzierten Produkte, die für verschiedene Untersuchungen als ideale Modellsysteme vorlagen. Ein His-GFP produzierender *E.coli*-Stamm eignete sich besonders für grundlegende Untersuchungen, da die Produktformation direkt durch die intakten Zellen im MHFR quantifiziert werden konnte. Weitere Mikroorganismen, wie das serin-produzierende *Corynebacterium glutamicum* wurden aufgrund ihrer Produktsekretion eingesetzt, um einerseits die Produktentfernung über die Hohlfasern des Reaktorsystems und andererseits die Induktion der im extrakapillaren Raum kultivierten Organismen über die Feed-Strömung zu untersuchen. Ein produktionsrelevanter Stamm des *Bacillus megaterium*, der eine His-Levansucrase produziert, wurde für Untersuchungen im Bereich des integrierten Downstreamings eingesetzt und für die Testung des MHFR-Systems zur kontinuierlichen Produktion. Die Entwicklung dieses MHFR-Systems zur kontinuierlichen Produktion und für die Integration von Prozessschritten im Bereich Downstreaming sollte durch die

Miniaturisierung des Systems eine ökonomisch wie ökologisch sinnvolle Verminderung des Ressourcenverbrauches und Verringerung der Reststoffströme bewirken.

Eine Adaptierung des MHFR-Systems im Bereich Wirkstofftestung konnte im Rahmen dieses Vorhabens nicht realisiert werden, da die adhärent wachsenden Zelllinien eine Verblockung der Hohlfasern bewirkten, die zu einer Verringerung der Feed-Strömung in den Extrakapillarbereich führten, die eine gezielte Inkubation mit Wirkstoffen verhinderten.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass das MHFR-System nach umfangreichen Entwicklungsarbeiten zur Neukonstruktion erfolgreich für einen Einsatz in der Biotechnologie angepasst werden konnte. Die hierfür nötigen Arbeiten erwiesen sich allerdings als wesentlich umfangreicher, als bei der Antragstellung bekannt, so dass nicht alle im Projekt anvisierten, weiterführenden Arbeitspakete abschließend bearbeitet werden konnten. Mit dem neukonstruierten MHFR-System steht nun der Prototyp eines Reaktorsystems zur Verfügung, das gut in den Bereichen Zellkultivierung und Downstream processing eingesetzt werden kann und eine Alternative zu herkömmlichen Screening-Systemen z.B. zur Optimierung von Induktionsprofilen bietet. Durch die Option der Stack-Bildung durch Zusammenschaltung mehrerer MHFR-Module lassen sich zudem Up-Scaling-Aufgaben einfacher verwirklichen, so dass nun zum ersten Mal ein MHFR-System für den Kleinmaßstab/Laborbetrieb zur Verfügung steht. Eine weitere zukunftsweisende Option ist die Integration des Capture-Schrittes für sekretierende Organismen durch direkten Einsatz ligandendekorierte Hohlfasern, wie sie im Rahmen dieses Projektes entwickelt wurden.

Eine ökonomische Bilanzierung wurde im Vergleich zu herkömmlichen batch-Reaktorsystemen durchgeführt und zeigte, dass der Hauptvorteil des MHFR-Systems nicht eine Verringerung des Ressourceneinsatzes im Vergleich zum batch ist, sondern dass erst die Integration des Downstreamings sowie die Optimierung von Prozessparametern im Labormaßstab, was bisher für MHFR-Systeme nicht möglich war, eine maßgebliche Verringerung des Ressourceneinsatzes und somit einen ökonomisch und ökologischen Benefit bewirkt.

2. Bericht

2.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Komplexe biotechnologische Abläufe sind oft nicht mit den klassischen Reaktortypen oder sonstigen Verfahrenselementen zu vereinbaren. Die Entwicklung von alternativen Verfahrenselementen im Bereich biotechnologischer Prozesse und die Integration von Prozessschritten ermöglicht die gezielte, effiziente sowie ökonomisch und ökologisch sinnvolle Herstellung neuer Produkte.

Die Einbindung von Hohlfasermodulen in den Produktionsprozess ist dabei ein zukunftsweisender Ansatz. Diese Module können sowohl im Bereich Downstreaming zur Abtrennung von Produkten, als auch im Bereich Kultivierung und Reaktion zur Rückhaltung von Zellen oder immobilisierten Biokatalysatoren eingesetzt werden. So können integrierte Produktionsabläufe aufgebaut werden, deren ökonomische und ökologische Bilanz durch Ressourcenschonung, durch Verringerung der Produktkontamination, durch Energieeinsparung und durch Minderung der Reststofffrachten im Vergleich zu herkömmlichen Produktionsprozessen erheblich verbessern sollte. Aus dem Einsatz der neuartigen MHFR-Module sollte daher eine erhebliche Umweltentlastung resultieren. Besonders durch die Miniaturisierung des Reaktors sollte es zu einer wesentlichen Verringerung der einzusetzenden Rohstoffe (Puffer, Medien, etc.) und der Reststofffrachten kommen. Außer der Miniaturisierung verspricht auch die Kombination der Hohlfasermodule zu Kaskaden oder Flächen eine Verringerung an einzusetzenden Rohstoffen, aufzuwendender Energie und ebenso eine Verringerung der Reststofffrachten.

Allgemein kann die Anwendung von Hohlfasermodulen im biotechnologischen Sektor in folgende Kategorien gegliedert werden:

- Selektive Produktabtrennung
- Rückhalt von Enzymen
- Rückhalt von Mikroorganismen
- Selektive Substratzugabe

Die Vorteile von Mikro-Hohlfaserreaktoren ergeben sich hauptsächlich aus dem kleinen Reaktorvolumen von wenigen Millilitern und aus der großen Anpassungsfähigkeit an individuelle Prozesse:

- Ressourcenschonung und Verringerung der Reststoffströme
- flexible und einfache Handhabung
- erleichtertes Upscaling in den Produktionsmaßstab
- Erleichterung des Downstreamings
(insbesondere durch integriertes Downstreaming)
- breites Anwendungspotential

Bis heute ist die Anwendung von Hohlfasermodulen jedoch auf die Produktionsebene beschränkt, da geeignete miniaturisierte Elemente nicht vorhanden sind. Screening-Systeme im Labormaßstab existierten bisher nicht, was zu einem erheblichen Mehraufwand bei der Optimierung von Prozessparametern führte. Ein Beispiel für die industrielle Nutzung von Hohlfaserreaktoren ist die Abwasserbehandlung. Abbildung 1 zeigt eine Konstruktionsskizze der miniaturisierten MHFR-Module des Partners Saxonia.

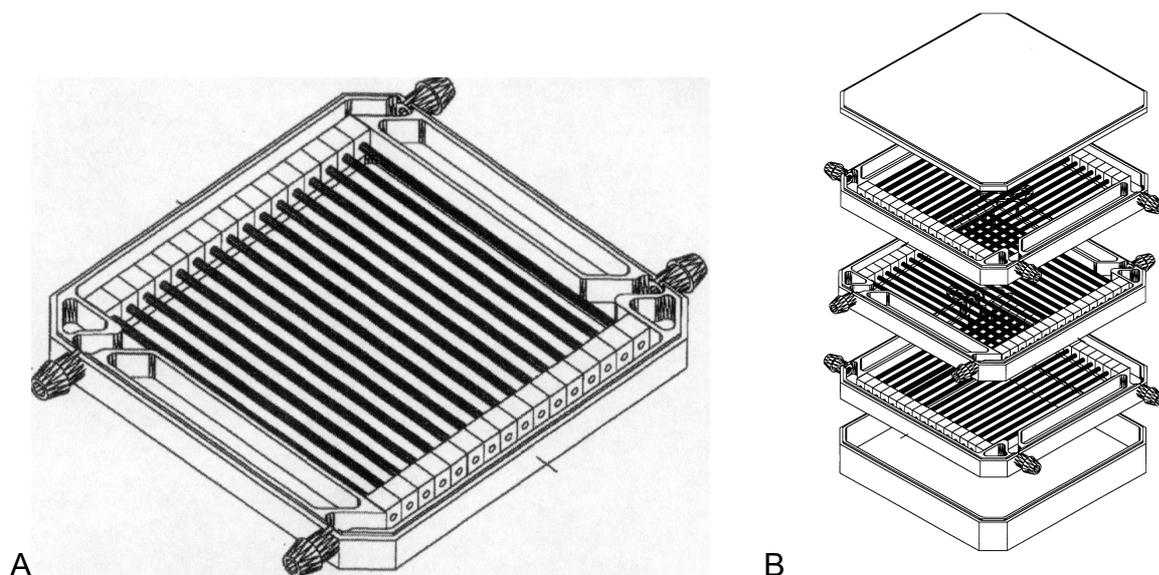


Abb.1: Hohlfasermodulkassette, einzeln (A) und in Form eines Stapels/ Kaskade (B)

Abbildung 2 zeigt einen vom Partner im Rahmen des Projektes zur Verfügung gestellten MHFR-Basisreaktor.



Abb.2: MHFR-Basisreaktor des Projektpartners Saxonia

Im Rahmen des Vorhabens wurden diese Hohlfaserreaktoren im Labormaßstab für die Kultivierung von Mikroorganismen und für die selektive Produktentfernung im Bereich integriertes Downstreaming eingesetzt.

Dazu wurden im Vorfeld zahlreiche Versuche im Bereich Reaktorentwicklung, Reaktorcharakterisierung und im Bereich der gezielten Modifikation und Funktionalisierung von Hohlfasern durchgeführt.

Die Kultivierung in den Mikro-Hohlfaserreaktoren erfolgt mit ausgewählten Testorganismen. Diese Organismen sollen auf die verschiedenen Einsatzbereiche der Hohlfaserreaktoren im Bereich Kultivierung, Screening von Verfahrensparametern, Erstellen von Induktionsprofilen und Kultivierung mit integrierter Produktaufreinigung über die Hohlfasern angewendet werden.

Die Modifikation und Funktionalisierung von Hohlfasern soll für unterschiedliche Anwendungsbereiche durchgeführt werden. Im Bereich der pharmazeutischen Industrie gibt es eine Reihe möglicher Zielproteine, bei deren Aufreinigung der Einsatz von Hohlfasermodulen einfach zu verwirklichen wäre. In der unten stehenden Tabelle (Tab. 1) ist eine Auswahl dieser Targetproteine mit den entsprechenden Bindungsgruppen angegeben.

Tab.1: Targets und spezifische Bindungsgruppen

Target	Bindungsgruppe
Immunglobuline	Protein A
glykosylierte Proteine	Concanavalin A
His-tag-Proteine	Cu, Ni, Co, Zn
Thrombin	Aptamere
Proteine (allg.)	Ionenaustauscher

Zusammenfassend zielt das Vorhaben darauf ab, neue biotechnologische Wege zu erarbeiten, die die Effizienz der biotechnologischen Produktion erhöhen. Besonders der kostenintensive Bereich des Downstream processings soll durch die Entwicklung ressourcenschonender, integrierter und vereinfachter Prozessabläufe entlastet werden.

2.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

2.2.1 Membranfunktionalisierung

Für die gezielte Modifizierung und Funktionalisierung sollten je nach Anwendungsbereich verschiedene Typen von Hohlfasermembranen eingesetzt werden. Die unten stehende Tabelle (Tab. 2) gibt einen Überblick über die verwendeten Hohlfasermembranen und deren Kenngrößen.

Tab.2: Verwendete Hohlfasermembranen und deren Kenngrößen

Membrantyp	Polymer	Porengröße	Innerer / Äußerer Durchmesser [µm]
1. MicroPES	Polyethersulfon (PES)	0,2 µm	300 / 500
2. UltraPES	Polyethersulfon (PES)	70 kDa	700 / 1000
3. High Flux	Polysulfon (PS)	30 kDa	200 / 280
4. Low Flux	Polysulfon (PS)	5 kDa	200 / 280

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bubble Point Messung an Ultrafiltrationsmembranen (2-4) werden in der Regel Kennzahlen zum MWCO angegeben, um die Porengröße zu beschreiben.

Die Modifikationen der entsprechenden Basismembranen zur Anbindung von Liganden sind ausschließlich an fertigen Hohlfasermembranen erfolgt. Ausgehend von terminalen Hydroxygruppen der Basismembran werden diese mit einem Epoxid-Linker versehen, um anschließend ein Cellulosederivat ankoppeln zu können. Nach

Anbindung des Zuckers werden die entstandenen Hydroxyendgruppen erneut epoxidiert. Abschließend erfolgt ausgehend von der epoxidierten Hohlfasermembran eine Ankopplung eines bifunktionellen Aminderivates. Somit können nach der Grundaktivierung (Herstellung der Epoxymembran) verschiedenste terminale Bindungsgruppen auf der Membranoberfläche realisiert werden.

Besonders interessant für den Bereich Downstreaming ist ausgehend von der epoxidierten Hohlfasermembran die Anwendung von Iminodiessigsäure (IDA) gefolgt von einer Komplexierung von 2-wertig positiv geladenen Metall-Ionen (z.B. Cu, Ni, Co, Zn). Solch generierte IMAC-Hohlfasermembranen können eingesetzt werden, um His-tag-Proteine aufzureinigen. Zudem können hergestellte Ionenaustauscher-Membranen (S, C, Q, D) für verschiedene Anwendungen im Bereich Proteinaufreinigung verwendet werden.

Der Nachweis der Beladungsdichten nach den einzelnen Funktionalisierungsstufen erfolgt über photometrische Messmethoden sowie mittels Titrationsanalysen. Zudem können durch rasterelektronenmikroskopische Analysen (REM) und Anwendung von Stickstoff-Desorptionsisothermen mögliche Veränderungen der Oberflächenstruktur des Membranmaterials nach durchgeführter Membrandekoration analysiert werden.

2.2.2 Verweilzeitverhalten

Die Zeit, die ein Spurenstoff (Tracer) zum Durchlaufen des Reaktors benötigt, bezeichnet man als Verweilzeit. Da gleichzeitig gestartete Teilchen in realen Reaktoren unterschiedliche Wegstrecken vom Reaktoreingang bis zum Reaktorausgang zurücklegen, resultieren verschiedene Aufenthaltsdauern. Als Tracer werden Standardproteinlösungen bzw. Hefezellsuspensionen genutzt, die durch die unterschiedlichen Membranen zurückgehalten werden und durch ihre Absorption bei 280 bzw. 600 nm nachgewiesen werden können. Somit kann die Verweilzeit des intrakapillaren und extrakapillaren Raumes innerhalb des Hohlfasermoduls bestimmt werden. Zusätzlich wird eine Modellierung der Verweilzeit bei unterschiedlichen Flussraten angestrebt, um durch wenige Versuchsdurchläufe eine Vorhersage der Verweilzeit bei vorgegebener Flussrate zu treffen.

2.2.3. Methoden zur Bestimmung des $k_L a$ -Werts

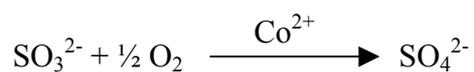
Aufgrund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in den verwendeten Nährstoffmedien stellt der Sauerstoffeintrag in den meisten Fällen die limitierende

Größe eines aeroben Prozesses dar. Der k_La -Wert wird durch die konstruktive Auslegung der Kultivierungssysteme sowie durch die eingestellten Betriebsparameter bestimmt. Durch deren Ermittlung kann die Eignung eines bestimmten Reaktorsystems, den Sauerstoffbedarf aerober Organismen zu decken, abgeschätzt werden.

Die Methoden zur Bestimmung des k_La -Werts lassen sich in stationäre und dynamische Methoden einteilen. Stationäre Methoden erzielen durch konstanten Sauerstoffverbrauch eine konstante Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase.

Die Sulfit-Methode:

Eine häufig angewendete stationäre Methode zur Bestimmung des k_La -Werts ist die Sulfit-Methode. Diese Methode basiert auf der Oxidation von Sulfit zu Sulfat in der Gegenwart katalytischer Mengen eines Metallions (i.d.R. Co^{2+}). Die Reaktionsgleichung ist nachfolgend dargestellt:



Durch die Gegenwart des Katalysators, wird der eingeführte Sauerstoff sofort verbraucht, so dass die Sauerstoffkonzentration im System bei Null bleibt. Erst wenn das Sulfit vollständig verbraucht ist, steigt die Sauerstoffkonzentration in der Lösung wieder an. Das Ende der Reaktion kann entweder durch eine pO_2 -Elektrode bzw. einen pO_2 -Sensor oder durch die Zugabe eines Farbindikators wie z.B. Bromthymolblau nachgewiesen werden.

Aus der Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Begasung und dem Anstieg der Sauerstoffkonzentration lässt sich die Sauerstoffeintragsrate durch eine Stoffbilanz berechnen.

Die dynamische Sulfit-Methode:

Dynamische Methoden zur Bestimmung des k_La -Werts beruhen auf der Messung der zeitlichen Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Bei der dynamischen Sulfit-Methode wird die katalysierte Sulfitoxidation zum Entfernen des in der Flüssigphase gelösten Sauerstoffs angewendet. Ab dem Zeitpunkt des stöchiometrischen Verbrauchs des Sulfits wird aus der Aufsättigungskurve der k_La -Wert bestimmt.

2.2.4. Kultivierungen

Verschiedene Zelllinien sollten in den Anwendungsbereichen Kultivierung und Downstreaming eingesetzt werden. Die unten stehende Tabelle (Tab. 3) gibt einen

Überblick über die verwendeten Bakterienstämme. Außerdem wurden für die Arbeiten im Bereich Wirkstofftestung HepG2 Zellen, eine Leberzelllinie, eingesetzt.

Tab.3: Verwendete rekombinante Bakterienstämme

Organismus	Produkt
<i>Escherichia coli</i>	Green-fluorescent-protein-His (GFP-His)
<i>Escherichia coli</i>	β -Glucanase-His (Bgl-His)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Serin
<i>Bacillus megaterium</i>	Levansucrase-His

Kultivierung der E.coli-Stämme

Die *E.coli*-Stämme zur Bgl-His- und GFP-His Produktion wurden von PD Dr. Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung wurde mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte in jeweils 100 mL LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin bei 120 rpm und 30 °C für 24 h durchgeführt. Bei einer optischen Dichte von 0,9 rel. AU wurde mit IPTG induziert (1 mM Endkonzentration im Medium). Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Bakterien von ihrem Flüssigmedium durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 4000 rpm) abgetrennt. Die Zellen wurden mit Aufschlusspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) versetzt und in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bzw. 50 mL Falcon Tubes mit Ultraschall bzw. durch wiederholendes Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Nach 30 min Abzentrifugieren bei 4000 rpm konnte der Überstand für Versuche im Bereich Downstreaming eingesetzt werden.

Kultivierung von Corynebacterium glutamicum

Der *Corynebacterium*-Stamm wurde von der AMINO GmbH in Frellstedt zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden aus einer Glycerinkultur auf eine BHI-Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird ein Abstrich mit einer Impföse in BHI-Komplexmedium überimpft, danach 12 h bei 30 °C und 120 rpm kultiviert und dann zu einer optischen Dichte von 1 rel. AU (OD bei 600 nm) in Minimalmedium mit 4 % Glucose und 10 μ M IPTG angeimpft. Nach 20 h Wachstum bei 30 °C und 120 rpm werden die Zellen schließlich nach zweimaligem Waschen mit steriler Saline in die Hauptkultur überimpft, ebenfalls zu einer OD bei 600 nm von 1 rel. AU. Es wird das Wachstum sowie die L-Serinbildung analysiert. Die Kultivierungsdauer beträgt 120 h.

Kultivierung von Bacillus megaterium

Der *Bacillus megaterium*-Stamm wurde von Prof. Dr. D. Jahn von der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung wurde mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte in jeweils 100 mL LB-Medium mit 10 mg/L Tetracyclin bei 100 rpm und 34 °C für 10 h durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0,5 % Xylose. Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Bakterien von ihrem Flüssigmedium durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 4000 rpm) abgetrennt. Der Zellüberstand wurde dann für Versuche im Bereich Downstreaming eingesetzt.

Kultivierung von HepG2 Zellen

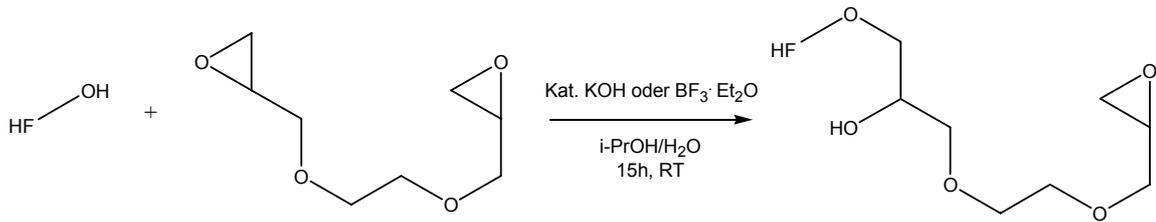
Die Leberzellen werden in einer 75 cm²-Zellkulturflasche mit 20 mL DMEM (10 % NKS, 1 % PS) ausgesät. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei normalem Wachstum werden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin behandelt. Durch Resuspendieren im Medium werden die Zellen vereinzelt und können nach Zellzahlbestimmung entsprechend verdünnt und ausgesät werden. Es wird das Zellwachstum auf sterilen Flach- und Hohlfasermembranen analysiert.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 AP 1: Modifikation der Basismembran zur Anbindung von Liganden

Um die Basismembran in Form von PES- bzw. PS-Hohlfasermembranen für die entsprechenden Ligandenanbindungen zu modifizieren, dient das nachfolgend dargestellte Reaktionsschema als Grundlage für das verwendete Standardprotokoll (Abb. 3). Die Grundaktivierung bezieht sich auf die Reaktionsschritte 1 bis 3. Dabei werden terminale OH-Gruppen der Hohlfasermembran zuerst epoxidiert. Anschließend werden an diese generierten Epoxygruppen kovalent Cellulosederivate (HEC) angebunden, wodurch eine Vervielfältigung der OH-Gruppen stattfindet. Mittels zweiter Epoxidierung im Schritt 3 wird final eine Epoxy-Hohlfasermembran geschaffen, die in nachfolgenden Reaktionen (Schritt 4) mit verschiedensten bifunktionellen Aminderivaten umgesetzt werden kann, um diverse Ligandensysteme auf der Hohlfaseroberfläche zu generieren.

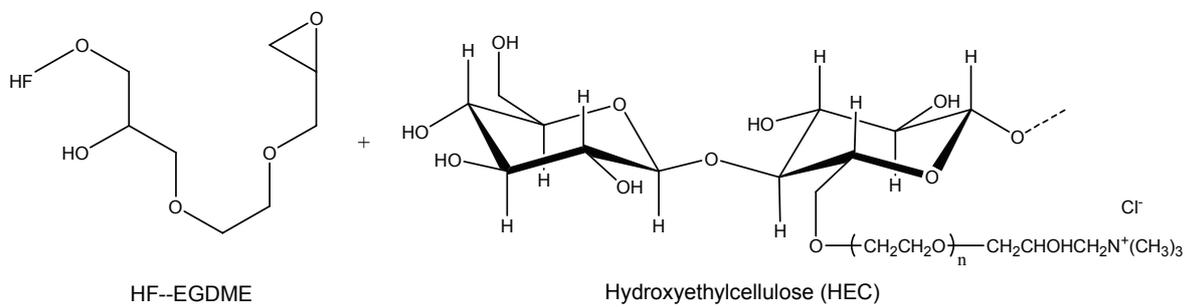
Reaktionsschritt 1:



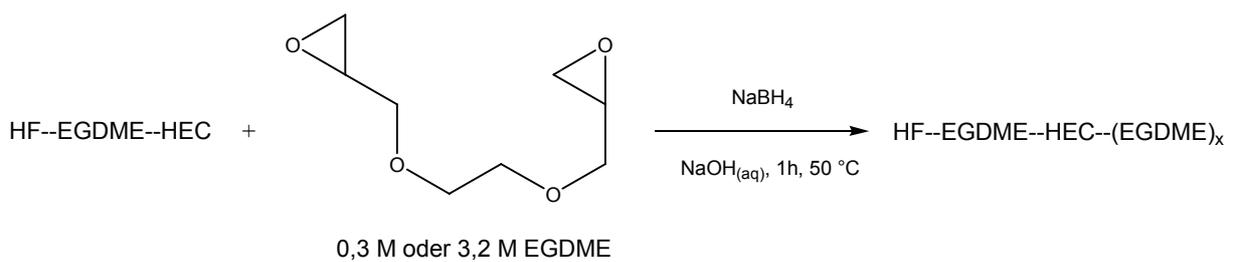
Hohlfasermembran (HF) 0,3 M Ethylenglykoldimethylether (EGDME)

HF--EGDME

Reaktionsschritt 2:



Reaktionsschritt 3:



Reaktionsschritt 4:

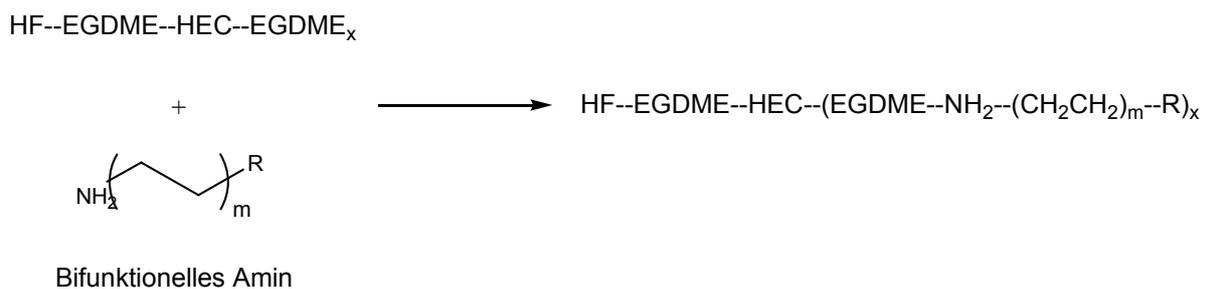


Abb.3: Reaktionsschema der Modifikation der Basishohlfasermembran zur Anbindung von Liganden

Für die Bestimmung der Beladungsdichten nach dem jeweiligen Funktionalisierungsschritt wird der Acid-Orange-Assay angewendet. Zusätzlich wird die Beladungsdichte des Cellulosederivates mittels Phenol-Schwefelsäure-Assay überprüft. In Tabelle 4 sind die jeweiligen Beladungskapazitäten in Bezug zur Funktionalisierungsstufe dargestellt.

Tab.4: Beladungsdichten der verschiedenen Hohlfasermembrantypen in Bezug zum Funktionalisierungsschritt bei der Grundaktivierung

Hohlfasermaterial (Porengröße)	Beladungsdichte / g Hohlfaser			
	Schritt 1	Schritt 2		Schritt 3
	µmol Epoxid	µmol Epoxid	mg HEC	µmol Epoxid
MicroPES (0,2 µm)	0,46 ± 0,09	0,09 ± 0,13	11,8 ± 2,3	8,59 ± 1,15
UltraPES (70 kDa)	0,33 ± 0,12	0,12 ± 0,04	9,78 ± 0,35	7,35 ± 0,55
High Flux PS (30 kDa)	0,56 ± 0,07	0,23 ± 0,19	9,9 ± 2,3	7,03 ± 0,92
Low Flux PS (5 kDa)	0,44 ± 0,07	0,19 ± 0,19	11,2 ± 2,3	9,88 ± 0,93

Tabelle 4 zeigt die Beladungskapazitäten verschiedener Hohlfasermembrantypen in Bezug zum Funktionalisierungsschritt bei der Grundaktivierung. Im ersten Reaktionsschritt werden relativ geringe Epoxidkonzentrationswerte (0,33-0,56 µmol Epoxid / g HF) erreicht. Durch kovalente Ankopplung des Cellulosederivates (HEC) im Schritt 2 und erneuter Epoxidierung im Schritt 3 werden deutlich erhöhte Beladungskapazitäten zwischen 7,03 und 9,88 µmol Epoxid pro g Hohlfasermaterial erhalten. Im Vergleich zum Schritt 1 entspricht das einer Vervielfältigung der Epoxidkonzentrationswerte um den Faktor 12-22 in Abhängigkeit zum verwendeten Hohlfasermembranmaterial.

Optimierungsarbeiten für die Realisierung hoher Beladungskapazitäten haben sich bei den Epoxidierungsreaktionen sowohl auf den Einsatz verschiedener Katalysesysteme im Schritt 1 als auch auf unterschiedliche Epoxidkonzentrationen im Schritt 3 bezogen. Des Weiteren ist der Einsatz verschiedener Cellulosederivate in der Form von Hydroxyethylcellulose (HEC), Cellulose, Methyl-Cellulose und Methyl-2-hydroxycellulose analysiert worden. Die höchsten Beladungskapazitäten sind durch Anwendung einer basischen Katalyse (KOH) bei der ersten Epoxidierung, Einsatz des Cellulosederivates in der Form von HEC im Schritt 2 und durch

Verwendung der höher konzentrierten EGDME-Lösung (3,2 M) bei der zweiten Epoxidierung erzielt worden (Tab. 4).

Für einen erfolgreichen Einsatz funktionalisierter Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Kultivierung und Reaktion (AP 5) und Downstreaming (AP 6) ist es essentiell, dass die jeweils angewandten Reaktionsschritte keine Beeinträchtigung der Porenstruktur nach sich ziehen. Um eine Beeinträchtigung der Porenstruktur auszuschließen, sind REM-Aufnahmen von der Oberflächenstruktur von MicroPES-Membranen nach erfolgter Membrandekoration durchgeführt worden. Die zu untersuchenden Membranen sind basierend auf dem oben erwähnten Standardprotokoll der Grundaktivierung sowohl mit HEC als auch mit dem Diepoxid EGDME dekoriert worden. Die REM-Aufnahmen wurden in folgenden Vergrößerungen aufgenommen: 1.000x, 2.000x, 3.000x, 5.000x und 10.000x. In der Abbildung 4 sind die verschiedenen Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 5.000x dargestellt.

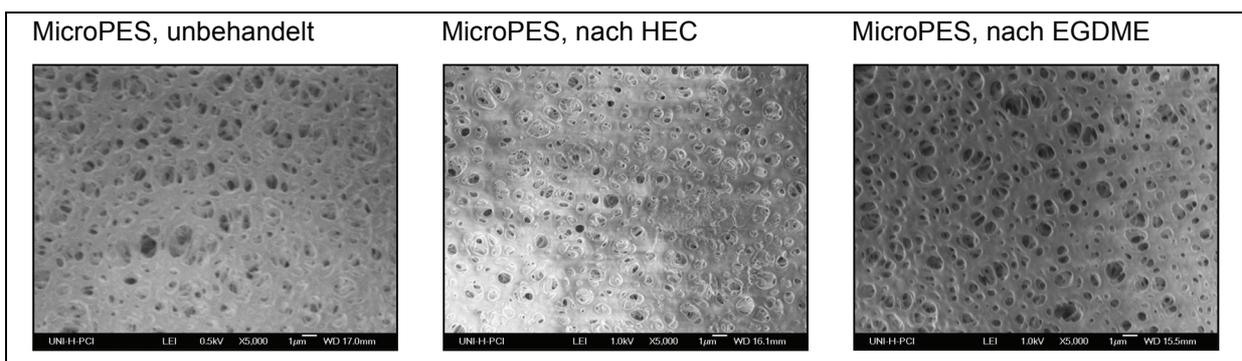


Abb.4: REM-Aufnahmen von oberflächenaktivierten MicroPES-Membranen nach Anbindung von HEC (Reaktionsschritt 2) bzw. nach zweiter Epoxidierung (Reaktionsschritt 3)

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass eine Oberflächenaktivierung mittels HEC bzw. nach zweiter Epoxidierung keine Beeinträchtigung der Porenstruktur nach sich zieht. Die Porenverteilung kann als homogen beschrieben werden und es treten keine Verblockungen der Poren auf. Somit kann das optimierte Protokoll (siehe Abb. 2) der Membrandekoration auf die Hohlfasermodule angewendet werden (AP 3).

Des Weiteren kann die Membranoberflächenstruktur modifizierter MicroPES-Membranen mit Hilfe von Stickstoff-Desorptionsisothermen untersucht werden. Unter der Verwendung der Gleichung von Brunauer, Emmett und Teller (BET) werden mit einer Software („Autosorb for Windows, Version 1.19.22“) charakteristische Größen der Membranoberflächen bestimmt. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich BET-Oberfläche und Porenvolumen der untersuchten MicroPES-Hohlfasermembranen.

Tab.5: Untersuchung von modifizierten MicroPES-Hohlfasermembranen mittels BET-Analyse

Probenbezeichnung	Seitenkette	BET-Oberfläche [m ² /g]	Porenvolumen [cm ³ /g]
PES-Basismembran	----	42,88	0,06874
PES--HEC (hydroxyaktiviert)	-OH	16,10	0,02854
PES--HE--EGDME (epoxyaktiviert)	Diepoxid- Linker	17,81	0,02450

Das modifizierte Funktionspolymer führt zu einem prozentualen Rückgang der Porenvolumina um 58 bzw. 64 % je nach Modifikation. Die damit verbundene Abnahme der BET-Oberfläche beträgt 58 bzw. 62 %. Die Anbindung des Diepoxids in Schritt 3 verringert wie erwartet das Porenvolumen. Weiterhin ist festzuhalten, dass die epoxyaktivierte MicroPES-Membran verglichen mit der hydroxyaktivierten MicroPES-Membran eine um ca. 10 % höhere BET-Oberfläche aufweist.

2.3.2 AP 2: Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen

Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen

Es ist von Interesse, ausgehend von der epoxyaktivierten Membran (Reaktionsschritt 3), weitere unterschiedliche, funktionelle Gruppen anzukoppeln, um eine Variation bei den terminalen „Ankergruppen“ zu erreichen. So besteht die Möglichkeit, verschiedenste Liganden in Form von bifunktionellen Aminderivaten anzukoppeln. Das epoxyaktivierte PES bzw. PS ermöglicht aufgrund seiner hohen Reaktivität zahlreiche Umsetzungen mit nucleophilen Reagenzien.

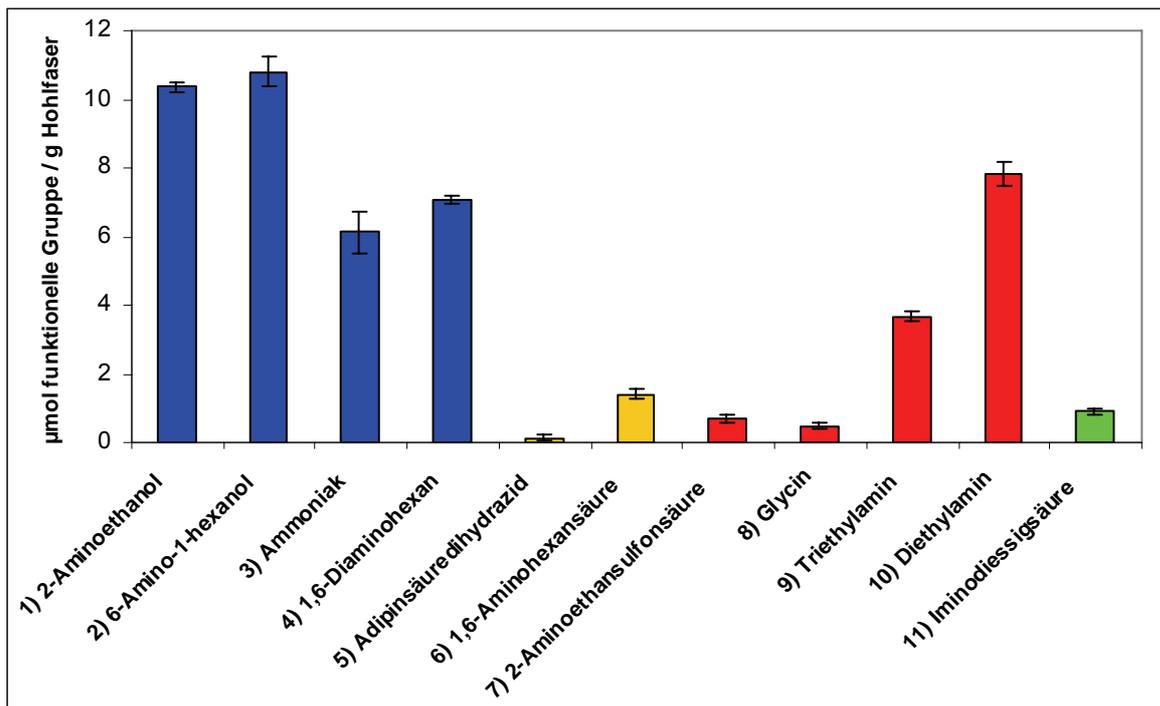


Abb.5: Beladungsdichten von verschiedenen final angebondenen bifunktionellen Aminderivaten an MicroPES-Hohlfasermembranen

In der Abbildung 5 sind die Beladungsdichten der an Epoxy-MicroPES-Hohlfasermembranen angebondenen stickstoffhaltigen Verbindungen dargestellt. Je nach angekoppeltem Reagenz werden Beladungskapazitäten im unteren μmol -Bereich pro g Hohlfaser erreicht. Es besteht die Möglichkeit, terminale Hydroxy- oder Aminfunktionen mit einem kurzen oder langen Spacer-Molekül auf die Hohlfaseroberfläche aufzubringen (Abb. 5, 1-4). Zudem können Endgruppen in Form von Dihydrazid- und Carboxy-Funktionen geschaffen werden (Abb. 5, 5-6). Des Weiteren ist ein Einsatz von Ionenaustauscher-Membranen (S-, C-, Q- und D-Membranen) realisierbar (Abb. 5, 7-10). Die letzte Kopplungsreaktion bezieht sich auf die Anbindung von Iminodiessigsäure (IDA), um Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften zu generieren (Abb. 5, 11).

Hervorzuheben bei der Entwicklung und Etablierung verschiedener Ligandensysteme ist hier besonders der Einsatz von Metallen (Cu, Ni, Co, Zn) für ihre Verwendung als Affinitätsliganden. Auf Stufe der IDA-Membran können 2-wertig positiv geladene Metallionen terminal komplexiert werden. Durch die Anwendung von Hohlfasern, die mit Metallen dekoriert worden sind, besteht die Möglichkeit, His-tag-Proteine in Form von Bgl-His bzw. GFP-His (Produktion durch entsprechende E.coli-Stämme, AP 5) und Levansucrase-His (Sekretion durch B.megaterium, AP 5) aufzureinigen.

In der Tabelle 6 sind die jeweiligen Beladungskapazitäten der Hohlfasermembranen (MicroPES und UltraPES) im Hinblick auf die finale Metallanbindung (Cu, Ni und Co) dargestellt.

Tab.6: Beladungsdichten verschiedener Hohlfasermembrantypen in Bezug zur finalen Metallanbindung

Hohlfasermaterial	Metall-Beladungsdichte / g Hohlfaser		
	$\mu\text{mol Cu}$	$\mu\text{mol Ni}$	$\mu\text{mol Co}$
MicroPES	$4,04 \pm 0,22$	$18,39 \pm 2,92$	$14,12 \pm 1,31$
UltraPES	$5,82 \pm 0,22$	$14,01 \pm 1,46$	$11,50 \pm 1,31$

Anhand des verwendeten Standardprotokolls kann gezeigt werden, dass ausgehend von epoxyaktivierten PES über eine IDA-Funktionalisierung Metall in Form von Cu, Ni und Co angebunden werden kann. Je nach eingesetztem Membrantyp und Metallion werden Beladungsdichten zwischen ca. 4 und 18 μmol Metall pro g Hohlfaser erreicht. Eine Langzeitstabilitätsanalyse ergibt, dass die bei RT im getrockneten Zustand gelagerten, mit Metall dekorierten, Hohlfasern sowohl vom Typ MicroPES als auch vom Typ UltraPES mindestens vier Wochen stabil sind (Ergebnisse nicht dargestellt).

Diese generierten IMAC-Hohlfasermembranen können in weiterführenden Anwendungen (AP 5, AP 6) eingesetzt werden, um His-tag-Proteine aufzureinigen.

Der Einsatz von Aptameren für die Verwendung als Affinitätsligand konnte aufgrund von Problemen hinsichtlich des aufwendigen Herstellungsverfahrens und damit verbundenen zur Verfügung gestellten geringen Menge durch den Projektpartner RiNA nicht erfolgreich realisiert werden. Versuche mit einem DNA-Modellaptamer (15-mer, NHS-carboxymodifiziert), welches an eine aminofunktionalisierte Hohlfasermembran gekoppelt werden kann und spezifisch das Target Thrombin bindet, haben aufgrund von Bindungs- und Stabilitätsproblemen keine abschließenden Ergebnisse im Rahmen dieses Projektes geliefert.

Sterilisation und Desinfektion

Der Aspekt der Sterilität ist sowohl für den Bereich der entsprechenden Liganden als auch für den Bereich Kultivierung im Arbeitspaket 5 und 7 essentiell. Dabei stellt die Stabilität der Liganden / biologischen Komponenten und des Membranmaterials ein Problem dar. Die verschiedenen Methoden der Sterilisation und Desinfektion könnten

zu einer Beeinträchtigung der Porenstruktur führen, außerdem wäre der Abbau oder das Auswaschen der Liganden / biologischen Komponenten zu befürchten. Prinzipiell kommen die verschiedenen, in Tabelle 7 aufgeführten Methoden der Sterilisation und Desinfektion in Frage.

Tab.7: Methoden für Sterilisation und Desinfektion (kursiv: durchgeführte Methoden)

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

Um eine Beeinträchtigung der Porenstruktur auszuschließen, wurden REM-Aufnahmen von der Oberflächenstruktur von MicroPES-Flachmenbranen durchgeführt, die entsprechend sterilisiert oder desinfiziert wurden. Die Aufnahmen wurden in folgenden Vergrößerungen aufgenommen: 1.000x, 2.000x, 3.000x, 5.000x und 10.000x. In Abbildung 6 sind die verschiedenen Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 5.000x dargestellt.

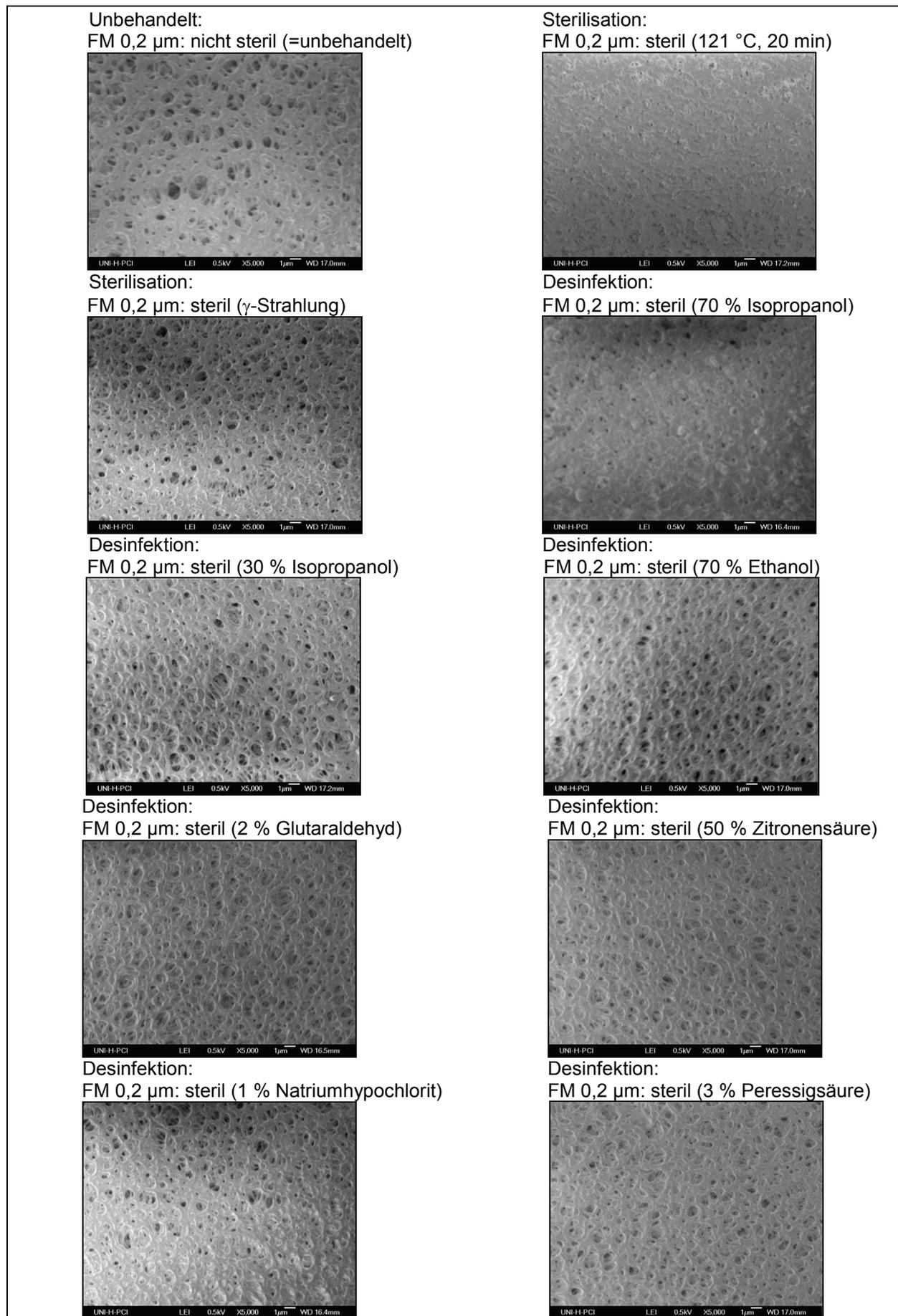


Abb.6: REM-Aufnahmen von unbehandelten und sterilisierten bzw. desinfizierten MicroPES-Flachmembranen (FM = MicroPES-Flachmembran)

Die Aufnahmen belegen, dass eine Sterilisation der Membran durch Autoklavieren zu einer Verschmelzung der Porenstruktur führt und somit ungeeignet ist. Die Sterilisation durch Grammabestrahlung beeinträchtigt die Porenstruktur hingegen nicht wie sich im Vergleich mit der unbehandelten Membran feststellen lässt.

Bei der Desinfektion konnte bei einigen Desinfektionsmitteln ein Aufquellen der Membran beobachtet werden. Besonders deutlich wird dies bei der Probe, die mit 70 %igem Isopropanol behandelt wurde. Insgesamt ist die Desinfektion mit 70 %igem Isopropanol ungeeignet, auch Peressigsäure und Zitronensäure bewirken ein leichtes Aufquellen der Membran. Alle anderen Desinfektionsmittel haben keine Auswirkung auf die Membranstruktur und sind somit geeignet (Natriumhypochlorit, Glutaraldehyd, 30 % Isopropanol, 70 % Ethanol). Die Methode der Wahl ist die Inkubation in 1% igem Natriumhypochlorid für 2 h.

2.3.3 AP 3: Aufbau und Charakterisierung der funktionalisierten Hohlfaser-module

Reaktoraufbau

Der Projektpartner Saxonia lieferte die Kassetten für den Aufbau des Reaktorsystems. Es wurden Kassetten mit Low Flux-, High Flux- und MicroPES-Hohlfasern hergestellt, die je nach Anwendungsbereich in ihrer Faseranzahl variieren. Diese Kassetten wurden durch die Feinmechanik-Werkstatt im TCI mit einem Anschlussystem ausgestattet (siehe Abb. 7), um eine Anströmung der Hohlfasern zu ermöglichen.

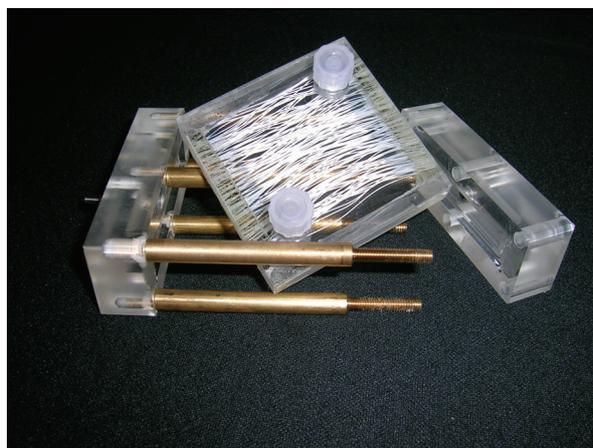


Abb.7: MHFR (Typ Saxonia) mit Anschlussystem

Weitere Modifikationen des Reaktors machten im Verlauf der Arbeiten eine vollständige Neukonstruktion des MHFR-Systems nötig, um einen Einsatz in der

Biotechnologie zu realisieren. Abbildung 8 zeigt einen neuentwickelten Reaktor-Rohling, in den genau 45 UltraPES-Fasern eingefädelt werden können. Somit liegt eine definierte Faseroberfläche vor, die für die wissenschaftlichen Untersuchungen unerlässlich ist und die im MHFR-Basissystem des Partners Saxonía nicht gewährleistet werden konnte. Das Gehäuse besteht aus Plexiglas, die Fasern wurden mit einer Pinzette in vorgebohrte Löcher eingefädelt und mit einem Zwei-Komponenten-Silikon verklebt (Elastosil RT 601 A, Wacker). Die Auswahl des Klebers erwies sich als sehr schwierig, da das Material viskos genug für eine gute Verarbeitung sein musste, jedoch nicht zu flüssig, da es sonst in die Faser hineinläuft und diese verstopft. Verschiedene Epoxydharze konnten aus diesem Grund nicht verwendet werden. Die Vereinzelung der Fasern im MHFR führte zudem zur Gewährleistung frei zugänglicher Hohlfasern und reduzierte die im MHFR-Basissystem auftretende Bildung von Strömungs-Totzonen, die durch Bündelbildung der statistisch verteilten Fasern nicht vermieden werden konnte. Abbildung 9 zeigt einen fertigen Reaktor mit UltraPES-Hohlfasern, in den zusätzlich ein Magnetrührer integriert wurde, da eine homogene Verteilung der Substrate ebenso wie der kultivierten Organismen für eine erfolgreiche Zellkultivierung unerlässlich sind.



Abb.8: MHFR-Rohling

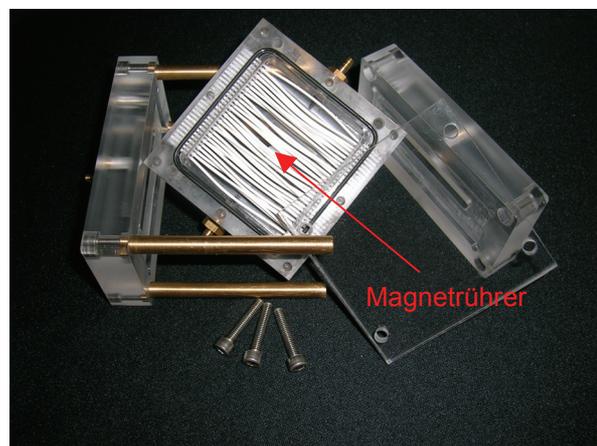


Abb.9: MHFR mit MicroPES-Fasern und Magnetrührstäbchen

Der Aufbau von hochaffinen Hohlfasermodulen konnte im MHFR-Basissystem nur durch die nachträgliche Modifikation der Hohlfasermembranen im Reaktormodul erfolgen, was von der Durchführbarkeit her gesehen extrem ungünstig war. Durch die neue Herstellungsweise der Reaktoren konnte diese Modifikation mit losen Faserbündeln in 50 mL Falcon-Tubes durchgeführt werden. Diese modifizierten Fasern wurden anschließend in die Reaktoren eingeklebt. Dies bietet den Vorteil,

dass größere Mengen an Fasern modifiziert werden können und durch die gegebene Lagerstabilität über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen in die Reaktoren eingebaut werden können. Außerdem können jederzeit kleinere Fasermengen für die Charakterisierung der funktionalisierten Hohlfasern, wie z.B. den Nachweis der Beladungsdichte (siehe AP2), entnommen werden.

2.3.4 AP 4: Reaktionstechnische Charakterisierung der Kassettenreaktoren

Verweilzeitverhalten (VWZ-Verhalten)

Um die Mikro-Hohlfaserreaktoren im Bereich der Kultivierung (AP 5) erfolgreich einsetzen zu können, wurden sie vorab reaktionstechnisch beschrieben. Die Module sind mittels Messungen zum VWZ-Verhalten (Sprungfunktion) charakterisiert worden. Es wurde eine Modellierung der Verweilzeit angestrebt, um auch Vorhersagen über das VWZ-Verhalten treffen zu können. Dazu wurden Messungen mit verschiedenen Flussraten durchgeführt, um mit diesen Daten die Verweilzeit modellieren zu können. Abbildung 10 zeigt die Daten einer Messung zum VWZ-Verhalten im extrakapillaren Raum eines Reaktors mit 140 Low Flux-Fasern.

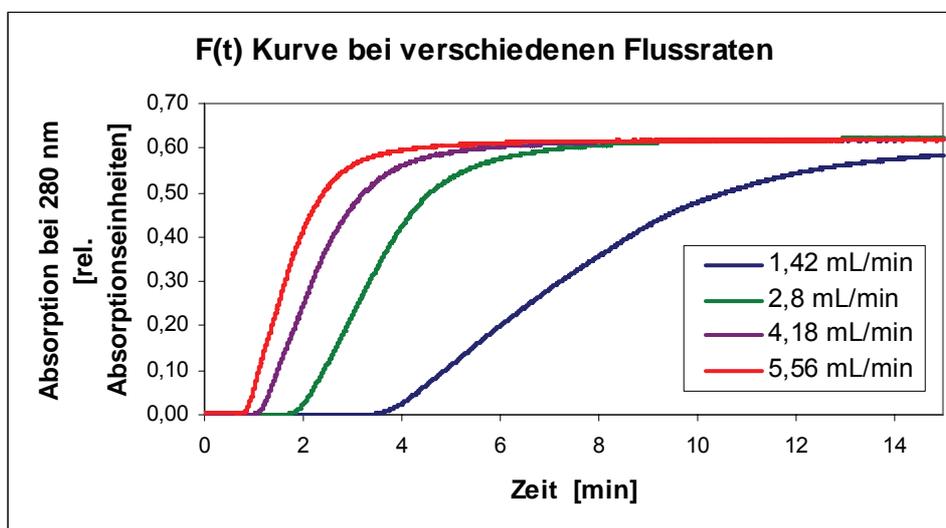


Abb.10: Kurven der Sprungfunktion eines Reaktors mit 140 Low Flux-Fasern bei verschiedenen Flussraten

Für die Modellierung dieser Daten wurde ein doppeltes Kaskadenmodell und somit folgende Formel gewählt:

Für $t > t_p$:

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

$$V = V_n + V_m$$

t_p Verweilzeit im Schlauchsystem

Mit Hilfe dieses Modells lassen sich die F(t)- und E(t)-Kurven für die verschiedenen Flussraten darstellen (Abb. 11) und auch die unterschiedlichen Verweilzeiten (τ) ermitteln (Tab. 8). Außerdem lassen sich sämtliche F(t)-, E(t)-Kurven und τ für alle Flussraten in diesem Bereich vorhersagen.

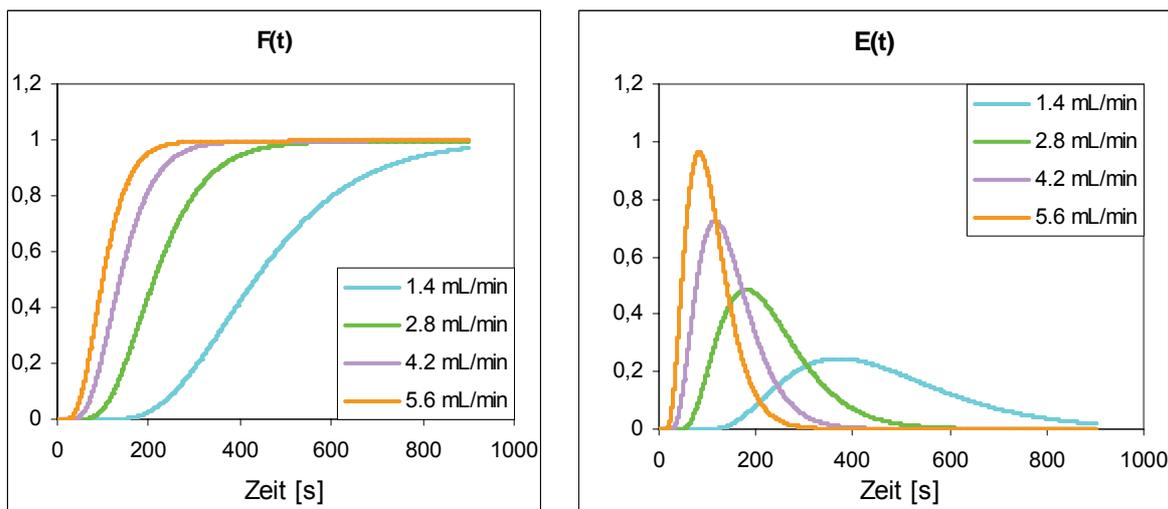


Abb.11: Aus dem Modell errechnete E(t)- und F(t)-Kurven

Tab.8: Verweilzeiten für die unterschiedlichen Flussraten

Flussrate [mL/min]	τ [s]
1,4	434,7
2,8	226,4
4,2	147,8
5,6	108,3

Mit dieser Methode können alle Reaktoren in Bezug auf die Verweilzeit charakterisiert werden und die Verweilzeit an die jeweiligen Versuchsbedingungen

angepasst werden. Außerdem bietet diese Methode den Vorteil, dass aus einmal erhobenen Daten $E(t)$, $F(t)$ und τ sämtliche Flussraten modelliert werden können.

Integritätstest

Um die Funktionsfähigkeit der Hohlfasern zu überprüfen, wurde ein Integritätstest entwickelt. Dabei werden die Fasern mindestens 30 min mit einer Proteinlösung (β -Galactosidase, bovines Serum Albumin) im Kreislauf durchspült. Die Größe der Proteine ist so gewählt, dass sie durch die Fasern zurückgehalten werden. Außerhalb der Fasern, im extracapillaren Raum, wird deionisiertes Wasser im Kreislauf gepumpt. Die Überprüfung des Rückhalts der Proteine durch die Membran erfolgt über die Proteinabsorption bei 280 nm. Bei Versuchen mit den MicroPES-Hohlfasern konnte keine Proteinlösung eingesetzt werden, da die Porengröße bei 0,2 μm liegt. Daher wurden Hefezellen verwendet und die zellhaltige Lösung wurde photometrisch bei einer Absorption von 600 nm vermessen. In Tabelle 9 ist die Zuordnung der eingesetzten Proteine bzw. Zellen für den Integritätstest dargestellt.

Tab.9: Zuordnung von Modellproteinen bzw. Zellen für den Integritätstest

Hohlfaser	MWCO bzw. Porengröße	Protein bzw. Zelltyp
MicroPES	0,2 μm	Hefezellen
UltraPES	70 kDa	β -Galactosidase (116 kDa)
High Flux	30 kDa	BSA (66,7 kDa)
Low Flux	5 kDa	BSA (66,7 kDa)

Die etablierten Integritätstests mussten routinemäßig an allen eingesetzten MHFR-Modulen angewendet werden, um die Intaktheit der Hohlfasern zu bestätigen.

2.3.5 AP 5: Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Kultivierung und Reaktion

In diesem Arbeitspaket wurden Vorversuche zur Kultivierung der in Abschnitt 2.2.4 aufgeführten rekombinanten Mikroorganismen durchgeführt. Des Weiteren wurden zahlreiche Kultivierungen im MHFR durchgeführt, wobei insbesondere der Sauerstoffeintrag in den Reaktor optimiert werden musste. Außerdem wurde eine Methode zur ausreichenden Desinfektion der Hohlfasermodule entwickelt.

Vorversuche

Zur Erstellung von Vergleichswerten zur Kultivierung im MHFR wurden Kultivierungen der angegebenen Testorganismen im Schüttelkolben durchgeführt. Es wurden Kultivierungen im 500 mL Schüttelkolben von *Corynebacterium glutamicum* (Serin), *E.coli* (GFP-His), *E.coli* (Bgl-His) und *B.megaterium* (Levansucrase-His) durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass beide *E.coli*-Stämme das Zielprotein intrazellulär produzieren, der *Corynebacterium*-Stamm und der *Bacillus*-Stamm hingegen das Produkt aus den Zellen ausschleusen und somit extrazellulär produzieren. Die Durchführung dieser Versuche ist in Abschnitt 2.2.4 erläutert.

Während der Kultivierung von ***Corynebacterium glutamicum*** wurden sowohl optische Dichte und pH-Wert, als auch Glucose- und Serinkonzentration im Medium offline vermessen. Die Glucosekonzentration wurde mittels Glucose- und Lactat-Analyser (YSI 2700) aufgenommen. Für die Bestimmung der Serinkonzentration erfolgte eine Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd (OPA), wodurch die Detektierbarkeit durch ein Fluoreszenzmessgerät möglich ist. Anschließend wurde durch HPLC die Serinkonzentration bestimmt. Die Kultivierung wurde über einen Zeitraum von 57 h durchgeführt. Anhand der optischen Dichte konnten die verschiedenen Phasen einer bakteriellen Wachstumskurve beobachtet werden: Lag Phase, exponentielle Phase, stationäre Phase, sowie der Beginn einer Absterbephase (Abb. 12). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultivierung bei einer optischen Dichte von 33,7 rel. AU beendet. Der Kurvenverlauf der Glucosekonzentration verhält sich gegenläufig zu dem der optischen Dichte, da die Glucose verstoffwechselt und Zellmasse produziert wird. Die Glucosekonzentration sinkt von einem Wert von 45,4 g/L innerhalb von 37 h auf einen Wert von nahezu Null (Abb. 12).

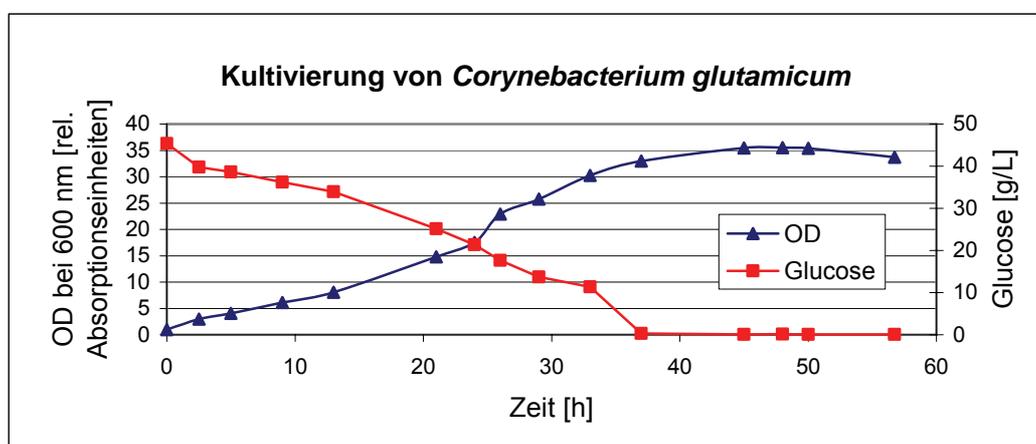


Abb.12: Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*, OD und Glucosekonzentration

Die Serinkonzentration steigt während der Kultivierung innerhalb von 45 h bis auf einen Wert von 72 mM (Abb. 13). Nach 45 h nimmt die Produktkonzentration rapide ab, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Glucose im Medium komplett umgesetzt ist und sich die Zellen auf bereits gebildetes Serin als Substrat umstellen. Der pH-Wert lag während der gesamten Kultivierung im Bereich von 6,9 bis 7,5 (nicht dargestellt).

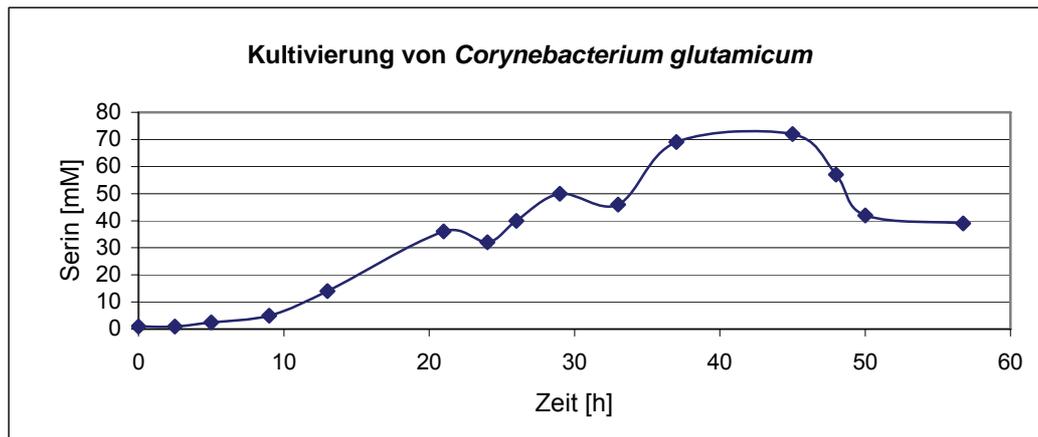


Abb.13: Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*, Serinkonzentration

Die Kultivierung der beiden ***E.coli*-Stämme** erfolgte parallel, da Medium, Probenahme und Aufarbeitung des Zielproteins mit Hilfe der gleichen Methoden durchgeführt wurden. Während der Kultivierung wurde die optische Dichte offline verfolgt. Bei dem Stamm *E.coli* (GFP-His) wurde zusätzlich die Fluoreszenz am 2D-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi) verfolgt. Abbildung 14 zeigt die Graphen zur optischen Dichte beider Stämme und die GFP-Konzentration von *E.coli* (GFP-His). Beide Stämme wachsen annähernd gleich bis auf eine optische Dichte von 4,5 rel. AU. Die GFP-Konzentration steigt mit zunehmender Zelldichte auf eine Fluoreszenzintensität von 12.000 rel. Fluoreszenzeinheiten.

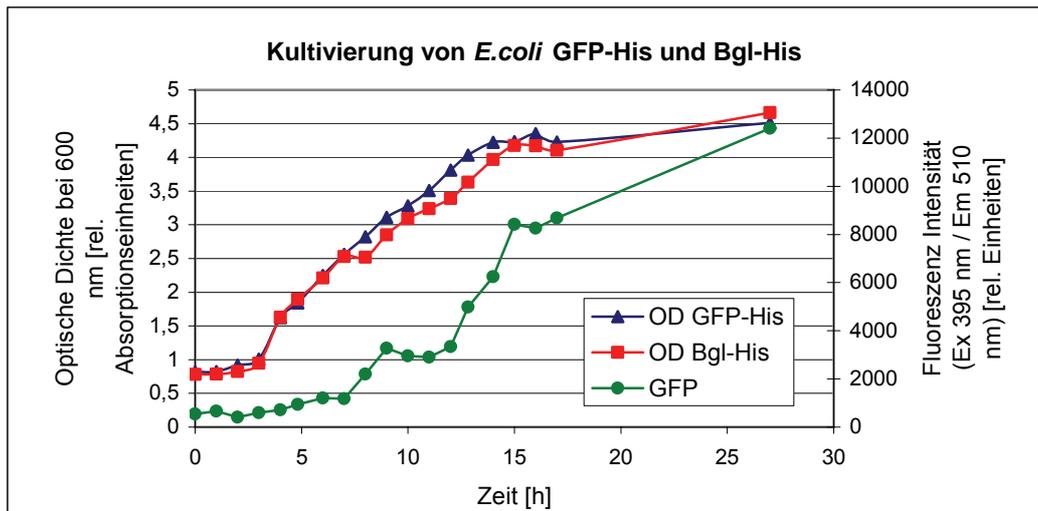


Abb.14: Kultivierung von *E. coli*, OD und GFP-Konzentration

Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Ultraschallaufschluss und Zentrifugation über ein Kit zur Aufreinigung von His-tag-Proteinen. Eingesetzt wurden die Vivapure Metal Chelate Mini spin columns (Sartorius AG). Dabei wurde die Metallchelate-Chromatographie mit verschiedenen Metall-Ionen durchgeführt: Kupfer, Nickel, Kobalt und Zink. Die Analyse der verschiedenen Schritte der Aufarbeitung erfolgte über die Fluoreszenz des GFP und über SDS-PAGE.

Abbildung 15 zeigt die verschiedenen Schritte während der Aufarbeitung von GFP mittels Vivapure Metal Chelate Mini spin columns durch fluoreszenzspektroskopische Messungen. Nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall liegt eine hohe GFP-Konzentration vor. Im Durchlauf und in den Waschfraktionen hingegen ist kaum GFP nachzuweisen. Das bedeutet, dass GFP quantitativ an der Membran bindet. Während der Elution wird das GFP von den Membranen herunter gewaschen. Dabei ist zu beobachten, dass die Durchführung mit Kobalt die besten Ergebnisse liefert, gefolgt von Nickel und Kupfer. Die relativ niedrigen Fluoreszenzintensitäten nach durchgeführtem Zellaufschluss (Ultraschall) lassen sich u.a. auf Streulichteffekte im Zell-Lysat zurückführen. In der zweiten Elutionsfraktion sind die GFP-Konzentrationen deutlich niedriger, wobei die Versuchsreihe mit Kobalt wiederum die besten Ergebnisse liefert, da hier im Vergleich zur ersten Elution 96% weniger GFP vorliegt. Bei der dritten Fraktion liegen die Werte unter 4% der Ausgangskonzentration. Der Vorteil der Aufarbeitung mit Kobalt liegt also darin, dass die höchste GFP-Konzentration erreicht wird und dass nach der ersten Elution das His-tag-Protein fast vollständig von der Membran eluiert werden konnte.

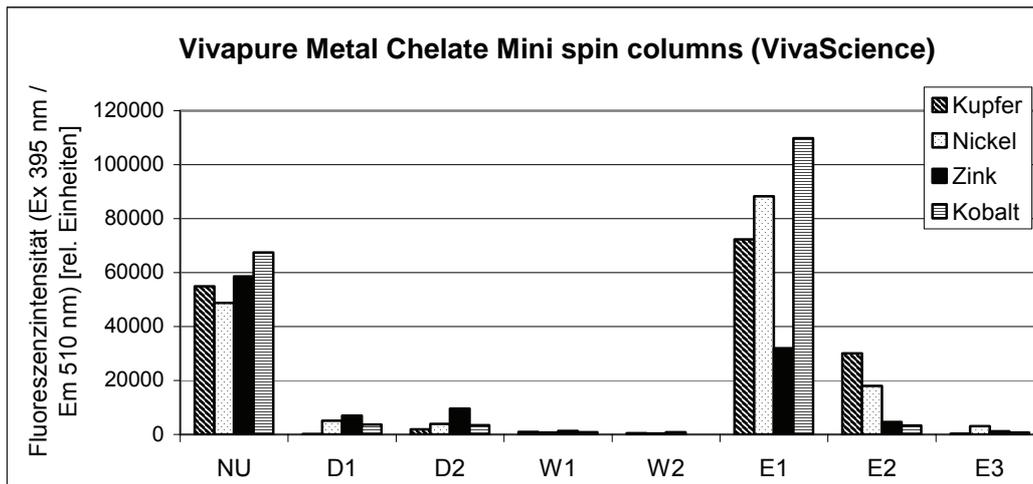


Abb. 15: Aufarbeitung mit Vivapure Metal Chelate Mini spin columns, NU = nach Ultraschall; D = Durchlauf; W = Waschfraktion; E = Elution

Die Aufreinigung beider *E.coli*-Kultivierungen konnte auch durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Abbildung 16 zeigt die Aufreinigung von GFP-His und Bgl-His aus *E.coli* mit Hilfe der Metallchelate-Chromatographie mit Vivapure Metal Chelate Mini spin columns. Die Spuren mit dem Zell-Lysat (jeweils Spur 1) zeigen ein Gemisch aus diversen Proteinen. Nach der Aufreinigung konnten die beiden His-tag-Proteine in allen Spuren bei etwa 27 kDa nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass das Produkt bei der Aufreinigung mit Kupfer durch zahlreiche andere Proteine verunreinigt ist. Dies liegt vermutlich an der wenig selektiven Bindung der Cu^{2+} -Ionen. Die Aufreinigung mit Co^{2+} -Ionen liefert die besten Ergebnisse, da die Spuren beider Proteine die wenigsten Verunreinigungen aufweisen. Außerdem konnte in Übereinstimmung mit der fluoreszenzspektroskopischen Analyse nachgewiesen werden, dass das Produkt schon nach der ersten Elution fast komplett von der Membran eluiert werden konnte.

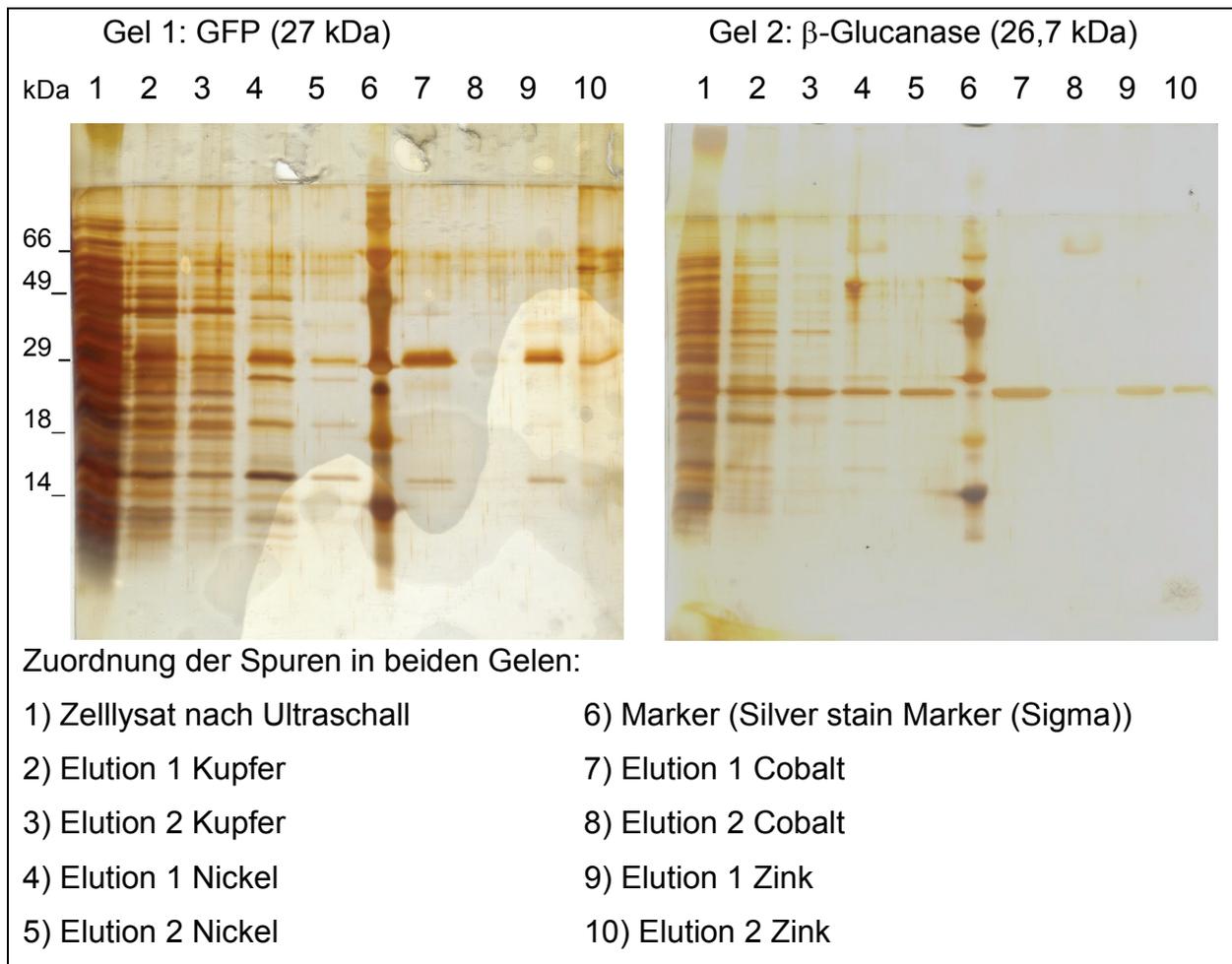


Abb.16: Aufreinigung von GFP-His und Bgl-His; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt

Während der Kultivierung von *Bacillus megaterium* wurde ebenfalls eine Wachstumskurve aufgenommen (Abb. 17). Die Wachstumskurve zeigt einen Anstieg der optischen Dichte bis annähernd von 4 rel. AU innerhalb von 10 h.

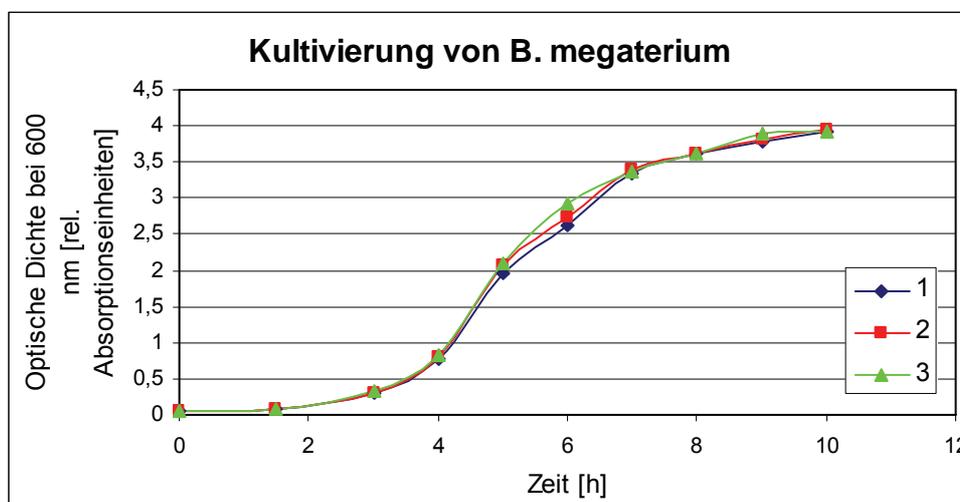


Abb.17: Kultivierung von *B.megaterium*, optische Dichte (Dreifachbestimmung)

Nach der Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert und der Zellüberstand für einen Enzymtest eingesetzt. Dieser DNS-Test ist ein Nachweisverfahren für reduzierende Zucker. Dabei geht die Dinitrosalicylsäure (DNS) eine Farbreaktion mit dem reduzierenden Zucker ein. Diese Farbreaktion lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm beobachten. Die bei der Hydrolyse der Levansucrase aus Saccharose entstehende Glucose wird somit nachgewiesen. Über diese Glucosekonzentration lassen sich wiederum Rückschlüsse auf die Aktivität der Levansucrase ziehen.

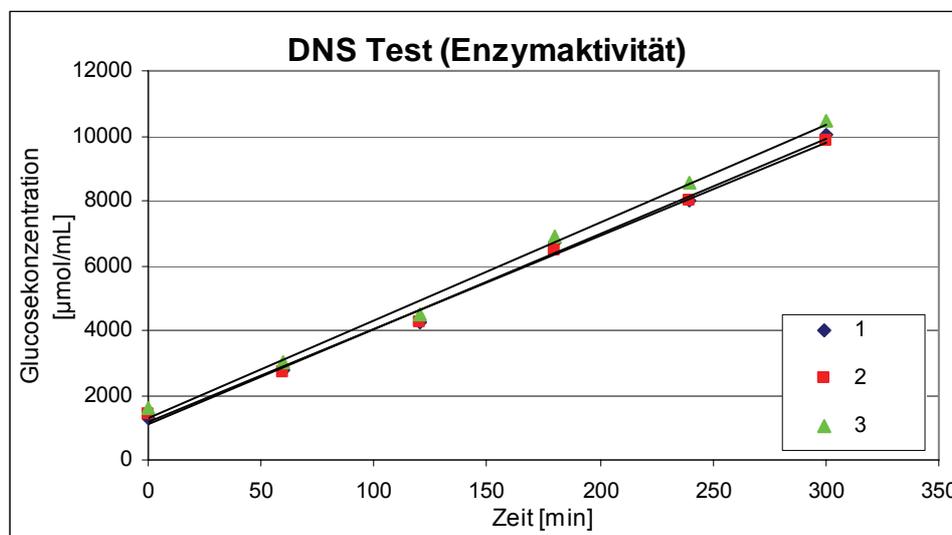


Abb.18: DNS-Test des Zellüberstands aus der Kultivierung von *B.megaterium* (Dreifachbestimmung)

Aus den Ergebnissen des DNS-Tests konnte die Aktivität des Enzyms im Zellüberstand in Unit errechnet werden (Abb. 18). Die Aktivität beträgt in diesen Fall 16,5 U bei einem Gesamtproteingehalt von 135 µg/mL (Bradford-Test). Die Aufreinigung des Enzyms erfolgt analog zu den beiden anderen His-tag-Proteinen über Metallchelate-Chromatographie (nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle Kultivierungen den Erwartungen entsprechend verlaufen sind und aussagekräftige Ergebnisse zum Vergleich mit Kultivierungen im MHFR liefern.

Kultivierung im MHFR

Die Kultivierung im MHFR wurde im extrakapillaren Raum des Reaktors durchgeführt. Durch die Hohlfasern wurde frisches, sauerstoffreiches Medium gepumpt. Es wurden Module mit den Fasern Low Flux und High Flux verwendet. Die MicroPES-Fasern konnten nicht genutzt werden, da die Ausschlussgrenze nicht für

coliforme Bakterien ausreicht. Als Mikroorganismus für die ersten Kultivierungen wurde *E.coli* (GFP-His) ausgewählt, da die Produktausbeute direkt durch Messungen am 2D-Fluoreszenzspektrometer bestimmt werden kann.

Der Reaktor wurde unter einer Clean Bench aufgebaut, um mögliche Fremdinfectionen von außen zu vermeiden. Des Weiteren wurde ein Protokoll zur Desinfektion erstellt (siehe Kap. 2.3.2. AP2 *Sterilisation und Desinfektion*). Bei der Kultivierung im MHFR wurde anhand der optischen Dichte eine Wachstumskurve aufgenommen (Abb. 19). Im Vergleich zu den Kultivierungen im Schüttelkolben ist eine längere lag-Phase zu erkennen und die optische Dichte steigt lediglich bis auf einen Wert von 0,3 rel. AU an. Dies ist teilweise durch die Ablagerung von Zellen im Reaktor zu erklären, denn während der Kultivierung kommt es zu einer starken Anlagerung von Zellen an den Hohlfasern. Die Ablagerung von Zellen kann auch die Ursache für das langsame Ansteigen der Wachstumskurve sein, da die dort gebundenen Zellen nicht durch die Analytik erfasst werden.

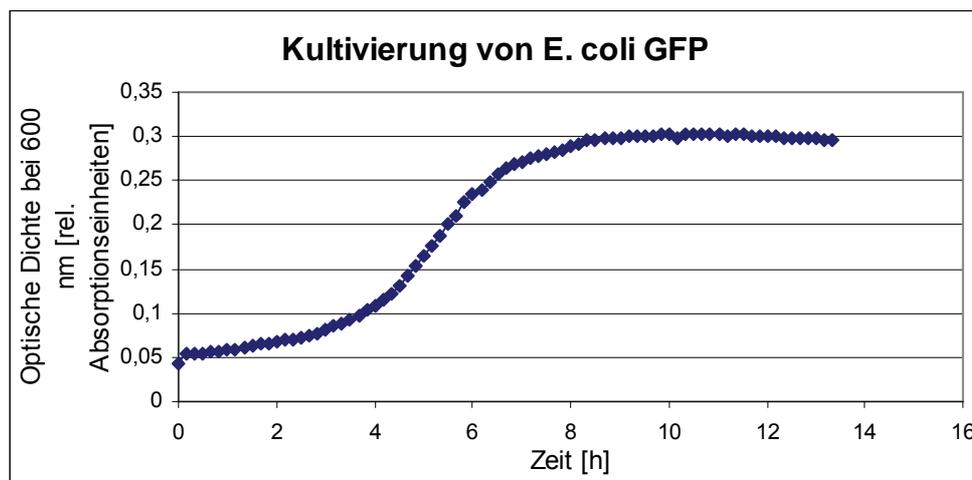


Abb.19: Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im MHFR

Die erzielten Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, da sie deutlich schlechter ausfielen als die Kultivierungen im Schüttelkolben. Daher war eine weitere Optimierung des Reaktors notwendig.

Grundvoraussetzung einer aeroben Kultivierung von Mikroorganismen ist eine ständige Begasung, um die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Sauerstoffkonzentration im Medium und dadurch die Vermeidung einer Sauerstofflimitierung zu gewährleisten. Aufgrund der Miniaturisierung des Reaktors kann eine klassische direkte Begasung nicht angewendet werden, bei der Gas direkt

ins Medium eingeleitet wird. Daher wurden im Folgenden verschiedene blasenfreie Begasungsstrategien bewertet.

Folgende Vorgehensweise wurde verfolgt, um die Optimierung des MHFR-Systems für den Bereich Kultivierung zu verwirklichen:

Aus Plexiglasrohlingen wurden Hohlfaserreaktoren entwickelt, die durch verschiedene Strategien und Gasarten blasenfrei begast wurden. Die Eignung der verwendeten Hohlfasern im Bereich Kultivierung wurde durch Messung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten k_{La} und gegebenenfalls der Sauerstoffeintragsrate (OTR) bewertet.

Die durchgeführten Arbeiten lassen sich grob in folgende Teilbereiche gliedern:

- MHFR-System mit indirekter Begasung
- MHFR-System mit Membranbegasung
- Membranbegasung mit reinem Sauerstoff

MHFR-System mit indirekter Begasung

Als Erstes wurde die indirekte Begasung untersucht, bei der das Medium im Vorratsgefäß durch Blasenbegasung mit Sauerstoff angereichert wird. Die Trennung zwischen dem mit Sauerstoff angereicherten Medium bzw. intrakapillaren Bereich und dem Reaktionsraum bzw. extrakapillarem Bereich erfolgte durch UltraPES Hohlfasermembranen, die ebenfalls zur kontinuierlichen Substratdosierung dienen und deren Kenngrößen in Tabelle 2 beschrieben sind.

Das in diesem Versuchsblock verwendete MHFR-Modul enthält ein Magnetührstäbchen und ist mit einer abnehmbaren Deckplatte ausgestattet. Auf diese Platte wurde ein Sensorspot zur pO_2 -Messung (Planar-Oxygen-Sensitive Spot der Firma PreSens) aufgeklebt. In Abbildung 20 ist das demontierte MHFR-Modul, sowie die mit einem pO_2 -Sensor ausgestattete Deckplatte zu erkennen.

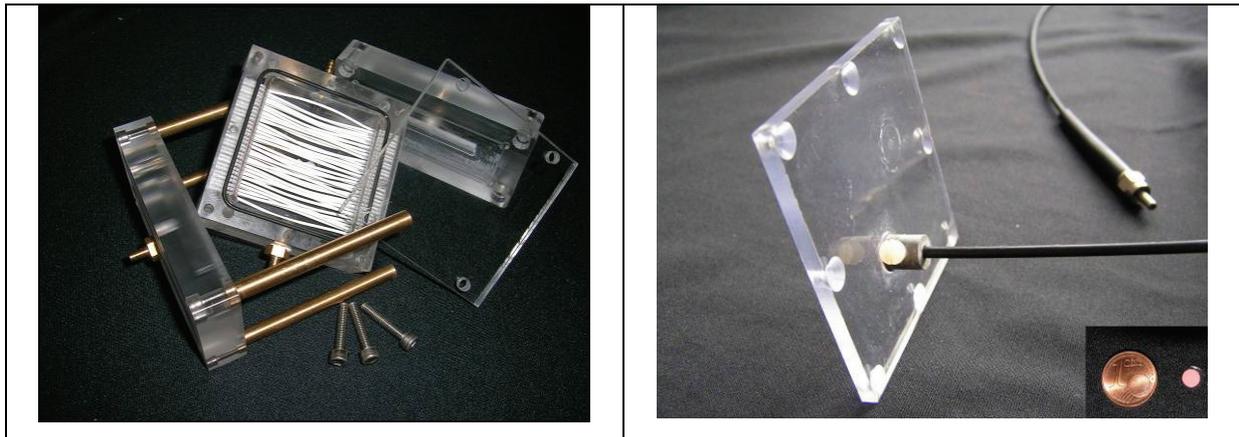


Abb. 20: Links: MHFR mit UltraPES Fasern, Magnetrührstäbchen und abnehmbare Deckplatte; Rechts: Deckplatte mit pO₂-Sensor und Glasfaserkabel.

Um die Effizienz des Sauerstofftransports bei indirekter Begasung zu bewerten, wurde der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient $k_{L,a}$ durch die dynamische Sulfit-Methode (siehe Abschnitt 2.3.2) bestimmt.

Tab. 10: Zusammenfassung der ermittelten Parameter bei der Anpassung einer Funktion erster Ordnung. Software: OriginPro[®] 7.5; Anzahl an Iterationen: 100.

Parameter	Wert
Volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_{L,a}$	1,157 h ⁻¹
O ₂ -Sättigungskonzentration O _{2,l} [*]	97,366 %
Zeit nach vollständigem Sulfit-Verbrauch t ₀	1,207 h
Regressionskoeffizient R ²	0,993

Der ermittelte $k_{L,a}$ -Wert von 1,16 h⁻¹ für den MHFR liegt deutlich unterhalb der in der Literatur beschriebenen $k_{L,a}$ -Werte in Schüttelkolbenkulturen. Die angegebenen Werte liegen zwischen 50 und 150 h⁻¹. Da die maximale Flussrate der Pumpe 1 eingestellt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Sauerstoff-Konzentration am Fasereingang und Ausgang annähernd gleich war. Aus diesem Grund könnte die Erhöhung der Flussrate und dadurch die Erniedrigung der mittleren Verweilzeit in den Kapillaren den Sauerstofftransfer kaum verbessern.

MHFR-System mit Membranbegasung

Durch eine so genannte Membranbegasung können Reaktorsysteme ebenfalls blasenfrei begast werden. Bei der Membranbegasung erfolgt der Gaseintrag in den Reaktor über gasdurchlässige mikroporöse Membranen z.B. aus Polypropylen oder Polyvinylidendifluorid. Die Schlauchmembranen werden in das Medium eingetaucht und von Gas durchströmt. In diesem Abschnitt wurden zwei verschiedene Membranarten

untersucht, Toyobo und Accurel. Die geometrischen Daten und das Material der verwendeten Membranen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Zusammenfassung der geometrischen Daten und des Materials der verwendeten O₂-Membranen

Art	Material	Innerer / Äußerer Durchmesser [µm]	Innere / Äußere Oberfläche pro cm [cm ²]
Accurel	Polypropylen	1.800 / 2.700	0,57 / 0,85
Toyobo	Polyvinylidifluorid	680 / 1.240	0,21 / 0,39

Beide Membranarten wurden in den Reaktor integriert (Abb. 21 und 22), wobei die Accurel Membran aufgrund ihres großen Durchmessers spiralförmig in den Reaktor eingebracht wurde. Die Toyobo Membranen wurden hingegen wie die UltraPES Membranen in Reihe eingebracht. Die Reaktoren wurden so ausgelegt, dass die Sauerstofffasern jeweils im unteren Teil des Reaktors liegen und die UltraPES Fasern im oberen Teil.

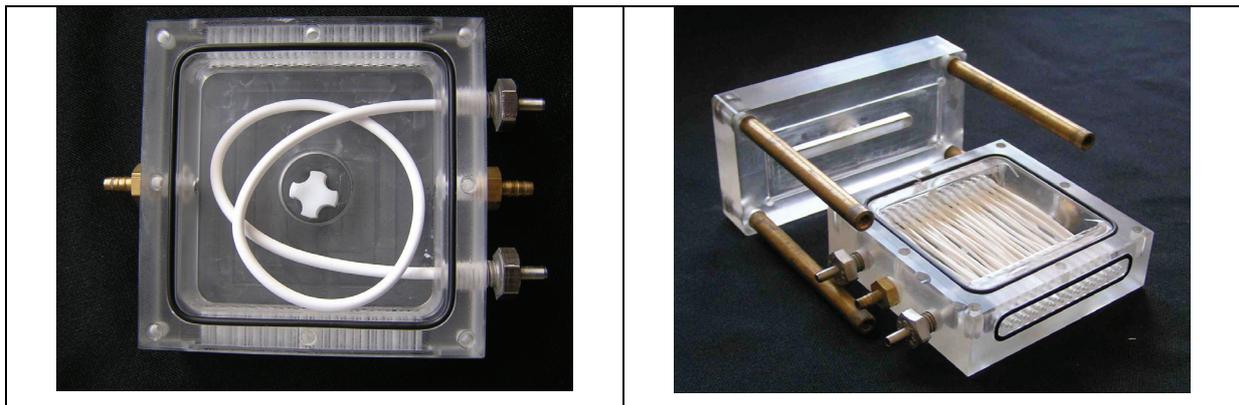


Abb. 21: Links: MHFR mit einer einzelnen Accurel-Membran; Länge: 22 cm; äußere Fläche; 18,7 cm². Rechts: Reaktor mit einer einzelnen Accurel-Membran und mit 43 PES-Fasern für die Kultivierung.

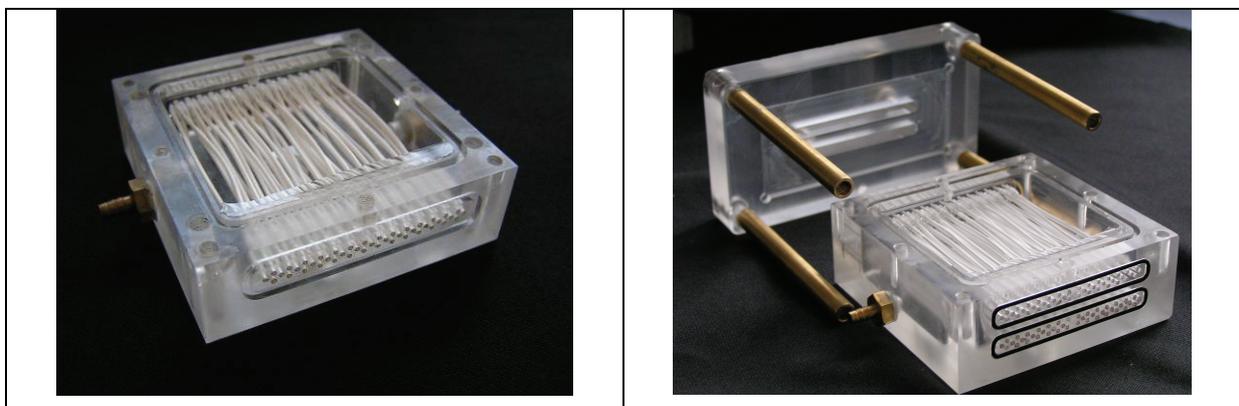


Abb. 22: Links: MHFR mit 43 Toyobo-Membranen. Gesamt-Faserlänge: 193,5 cm, äußere Gesamtfläche: 75,5 cm². Rechts: MHFR mit 43 Toyobo-Membranen und 43 PES Fasern.

Um die Effizienz des Sauerstofftransports bei der Membranbegasung zu bewerten, wurde der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient k_{La} durch die dynamische Sulfit-Methode, wie in Abschnitt 2.2.3, gemessen. Es wurden für jedes Reaktormodul verschiedene Gasvolumenströme getestet. Bereits bei dem niedrigsten getesteten Gasvolumenstrom (0,6 L/h) wurde ein maximaler k_{La} -Wert für das Reaktorsystem erhalten. Die Erhöhung des Gasvolumenstroms über 6 L/h wurde nicht durchgeführt. Volumenströme unter 0,6 L/h konnten nicht mit dem zur Verfügung stehenden Gasdurchflussmesser ohne Schwankungen konstant gehalten werden. Tab. 12 zeigt die k_{La} -Werte für verschiedene Membranlängen.

Tab 12: Zusammenfassung der ermittelten k_{La} -Werte und effektiven Diffusionskoeffizienten für die verschiedenen Membranen.

Art	Länge [cm]	k_{La} -Wert [h^{-1}]	Diffusionskoeffizient [cm^2/h]
Accurel (Polypropylen)	22	4,85	0,560
	11	3,20	0,666
Toyobo (Polyvinylidifluorid)	193	17,15	0,304
	94,5	12,49	0,457

Es konnte gezeigt werden, dass die in diesem Versuchsblock untersuchte Membranbegasung im Vergleich zur indirekten Begasung eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung bewirkt. Es wurden zwei verschiedene Membranarten getestet: Die Accurel-Membran aus Polypropylen und die Toyobo-Membran aus Polyvinylidifluorid. Obwohl höhere k_{La} -Werte in dem Modul mit Toyobo-Membranen erhalten wurden als in dem Modul mit Accurel-Membran, können keine Aussagen über die Transfereffektivität der jeweiligen Membranen getroffen werden. Die Gesamtaustauschflächen der beiden Module waren sehr unterschiedlich und betragen $18,7 \text{ cm}^2$ für Accurel und $75,5 \text{ cm}^2$ für Toyobo. Diese Austauschflächen stimmen tendenziell mit den entsprechenden ermittelten k_{La} -Werten überein.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich O_2 -Membranen bei niedrigem Gasvolumenstrom betreiben lassen. Ab einem Gasvolumenstrom von 0,6 L/h wurden für beide Membranarten, Toyobo und Accurel, hohe k_{La} -Werte erhalten. Die weitere Erhöhung des Gasvolumenstroms führte in beiden Reaktormodulen nicht zu einer Verbesserung des Sauerstofftransfers.

Membranbegasung mit reinem Sauerstoff

Neben der Erhöhung des k_La -Werts stellt die Erhöhung der maximalen Sauerstoff-Sättigungskonzentration eine Möglichkeit dar, den Sauerstofftransfer im Reaktor zu verbessern. Es wurde bereits erwähnt, dass der einzustellende Gasvolumenstrom von 0,6 L/h bei einer Membranbegasung relativ gering ist. Aus diesem Grund ist der Einsatz von reinem Sauerstoff zur Begasung der Reaktormodule ökonomisch denkbar. Da sich theoretisch bei dem Einsatz von reinem Sauerstoff nur die maximale Sättigungskonzentration und nicht der k_La -Wert ändert, kann die daraus resultierende Erhöhung des Sauerstofftransfers nur durch Messung der Sauerstoffeintragsrate (OTR) erfasst werden.

Die Ergebnisse dieser Messung für MHFR-Module mit Accurel und mit Toyobo Membranen sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tab. 13: Zusammenfassung der berechneten maximalen Sättigungskonzentrationen für beide Gasarten, Luft und reiner Sauerstoff, und beide Membranarten Toyobo und Accurel.

Membranart: Gasart:	Accurel, Luft	Accurel, reiner O₂	Toyobo, Luft	Toyobo, reiner O₂
Max. Sättigungskonzentration [mg/L]	16,14	54,65	23,0	84,88

Durch den Einsatz von reinem Sauerstoff anstatt von Luft wurden die OTRs um einen Faktor von 3,4 in dem Reaktormodul mit Accurel- bzw. 3,7 in dem Modul mit Toyobo-Membranen erhöht. Es ist zu beobachten, dass das MHFR-Modul mit Toyobo-Membranen die besten Ergebnisse liefert, folglich wird dieses Modul in den folgenden Experimenten für die Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt.

Kultivierung der Testorganismen im optimierten MHFR-Modul

Anschließend an die Optimierung wurden Kultivierungen mit den verschiedenen Testorganismen in dem verbesserten Reaktor durchgeführt. Im Folgenden werden Kultivierungen von *E.coli* (GFP-His) und *B.megaterium* im MHFR exemplarisch dargestellt.

Bei der Kultivierung des ***E.coli*-Stammes** wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Vergleicht man diese mit den vorherigen Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, dass der neue Reaktoraufbau zu einer erheblichen Verbesserung des Wachstums führt (Abb. 23).

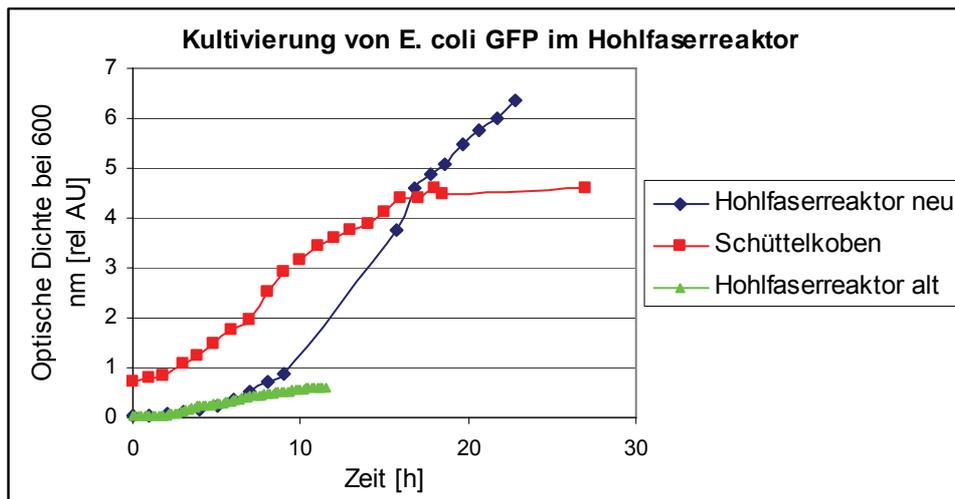


Abb.23: Wachstumskurve der Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) in den verschiedenen Reaktoren und im Schüttelkoben

Dies ist auf die Verbesserung der Sauerstoffversorgung im MHFR zurückzuführen. Abbildung 24 zeigt, dass bei der Kultivierung im alten Reaktor schon nach 3,5 h 0% Gelöstsauerstoff im Medium vorliegen. Im neuen Reaktor hingegen ist die Sauerstoffversorgung deutlich besser und das Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 0 % konnte um mehr als 3 h verzögert werden.

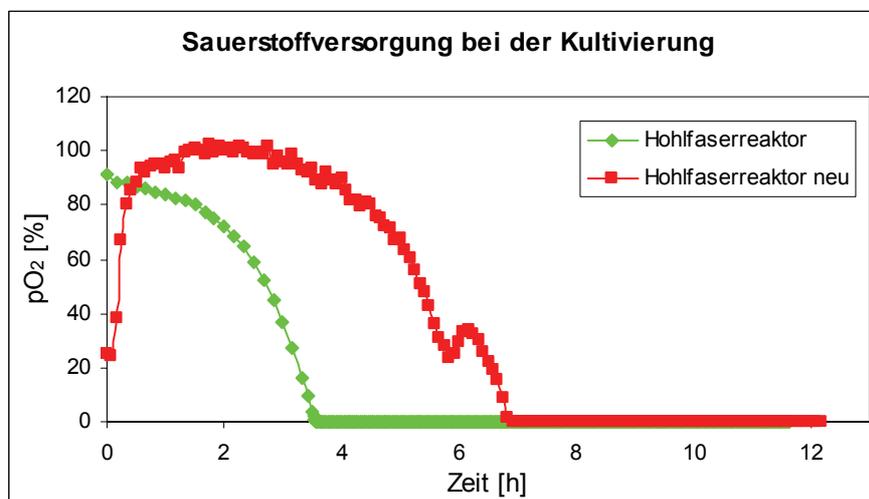


Abb.24: Vergleich der Sauerstoffversorgung bei der Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im einfachen Reaktor und im neuen, optimierten Reaktor

Vergleichende Kultivierungen von *B.megaterium* wurden über 10 h im Schüttelkolben, im Reaktor mit Sauerstoff-Fasern und in einem Reaktor mit Sauerstoff-Fasern und Fasern für die Zufuhr von Feed-Medium durchgeführt. Danach wurde die optische Dichte bestimmt und ein DNS-Test mit den Zellüberständen durchgeführt. In Tab. 14 sind diese Daten zusammengefasst. Es

wird deutlich, dass die optische Dichte bei der Kultivierung im Reaktor mit Sauerstoff-Fasern und Feed-Medium mit 3,72 rel. AU den besten Wert liefert. Die Aktivität der produzierten Levansucrase ist in diesem Reaktor ebenfalls am höchsten. Bezieht man die Enzymaktivität auf die Proteinkonzentration, die mittels Bradford-Test bestimmt wurde, wird noch deutlicher, dass dieser Reaktor für die Kultivierung von *B.megaterium* besser geeignet ist als der Schüttelkolben, da eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um 112 % erreicht wurde.

Tab.14: Optische Dichte und Enzymaktivität von drei *B.megaterium*-Kultivierungen, K = Schüttelkolben, R = MHFR mit 45 Sauerstoff-Fasern ohne Feed-Medium, RF = MHFR mit 45 Sauerstoff-Fasern und Feed-Medium

Reaktortyp	Optische Dichte (600 nm) [rel. AU]	Enzymaktivität [U]	Enzymaktivität [U] / Proteinkonzentration [g/L]
K	3,70	16,47	121,33
R	3,22	15,61	155,61
RF	3,72	19,34	256,77

Die anschließende Aufarbeitung wurde ebenfalls über Metallchelate-Chromatographie durchgeführt.

Zusammenfassend war die Optimierung des Mikrohohlfasersystems durch den Einbau einer direkten Begasung mit reinem Sauerstoff sehr erfolgreich. Zellwachstum und Produktbildung der einzelnen Stämme im MHFR sind vergleichbar mit Schüttelkolbenkultivierungen, bzw. im Fall des *B.megaterium*-Stammes konnte sogar eine deutlich höhere Enzymaktivität als im Schüttelkolben nachgewiesen werden.

2.3.6 AP 6: Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Downstreaming

Der Schwerpunkt der Untersuchungen in diesem Arbeitspaket ist auf das Downstreaming von His-tag-Proteinen mittels IMAC-Hohlfasermembranen gelegt worden, da größtenteils Testorganismen in der Form von *E.coli* und *B.megaterium* zur Verfügung standen (siehe AP 5), die entsprechende his-getagte Proteine (GFP-His, Bgl-His und Levansucrase-His) produzieren.

In Tab. 15 sind die Ergebnisse (Bradford-Test, Fluoreszenz-Messung) hinsichtlich des Downstreamings von dem aus *E.coli* aufgereinigtem GFP-His dargestellt. Die

Kultivierung ist im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt worden. Die *E.coli*-Zellen sind durch wiederholendes Einfrieren und Auftauen (7 Zyklen) aufgeschlossen worden, um das intrazellulär gebildete GFP-His freizusetzen. Nach einem Inkubationsschritt und ausreichend durchgeführten Waschschritten wird angebundenes GFP-His mittels einer Imidazolhaltigen Elutionslösung (250 mM) von der IMAC-Hohlfaseroberfläche eluiert.

Es sind zwei verschiedene Hohlfasertypen in der Form von Micro- und UltraPES-Fasern eingesetzt worden, die jeweils mit den Metallionen Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} dekoriert wurden (AP 2, AP 3). Sowohl der Gesamtproteingehalt mittels Bradford-Test als auch der direkte Produktnachweis durch Fluoreszenz-Messung sind durchgeführt worden. Je nach Hohlfasertyp und Metallbeladung werden GFP-His-Konzentrationswerte im Eluat zwischen 0,04 und 3,01 mg / g Hohlfaser erreicht.

Tab.15: Ergebnisse bezüglich des Downstreamings von GFP-His mittels IMAC-Hohlfasermembranen

Hohlfasertyp	Beladungsdichte			
	Bradford-Test [mg Protein / g Hohlfaser]		Fluoreszenz-Messung [mg GFP / g Hohlfaser]	
	Differenzwerte *	Elutionswerte	Differenzwerte *	Elutionswerte
MicroPES-Cu	43,57	5,81	5,45	3,01
MicroPES-Ni	18,13	3,03	5,58	1,96
MicroPES-Co	12,87	0,21	4,87	0,04
MicroPES-Zn	26,90	0,31	4,83	0,04
UltraPES-Cu	36,55	1,66	5,05	1,14
UltraPES-Ni	19,88	2,82	5,36	1,84
UltraPES-Co	35,67	0,32	4,65	0,22
UltraPES-Zn	32,16	1,95	4,55	0,89

* Die Differenzwerte setzen sich aus den Messwerten der Inkubationslösung abzüglich den entsprechenden Messwerten des Überstandes zusammen.

Des Weiteren hat eine Analyse ausgewählter Aufreinigungsproben (UltraPES-Cu, UltraPES-Co) mittels SDS-Page stattgefunden (Abb. 25). Anhand der Positiv-Kontrolle (Spur 2, rek. GFP, ca. 27 kDa) können entsprechende Produktbanden in den Spuren der Inkubationslösung (3) und des Überstandes (4) gut zugeordnet werden. Wie erwartet, sind bei den Waschfraktionen in Reihenfolge ihrer Anwendung

immer weniger bis keine Proteinbanden zu erkennen (5-8). Produktbanden bei der Elution können sowohl beim Downstreaming mit Cu^{2+} - als auch mit Co^{2+} -Ionen detektiert werden. Im Hinblick auf Verunreinigungen liefert die Aufreinigung mittels UltraPES-Co im Vergleich zu UltraPES-Cu die besseren Ergebnisse, da neben der Produktbande in Form von GFP-His fast keine weiteren Proteinbanden zu erkennen sind. Die erzielten Ergebnisse beim Downstreaming von GFP-His aus *E.coli* mittels IMAC-Hohlfasermembranen (Cu, Co) stehen im Einklang mit denen aus AP 5, wobei his-getagtes GFP mittels Vivapure Metal Chelate Mini spin columns (Sartorius AG) aufgereinigt worden ist.

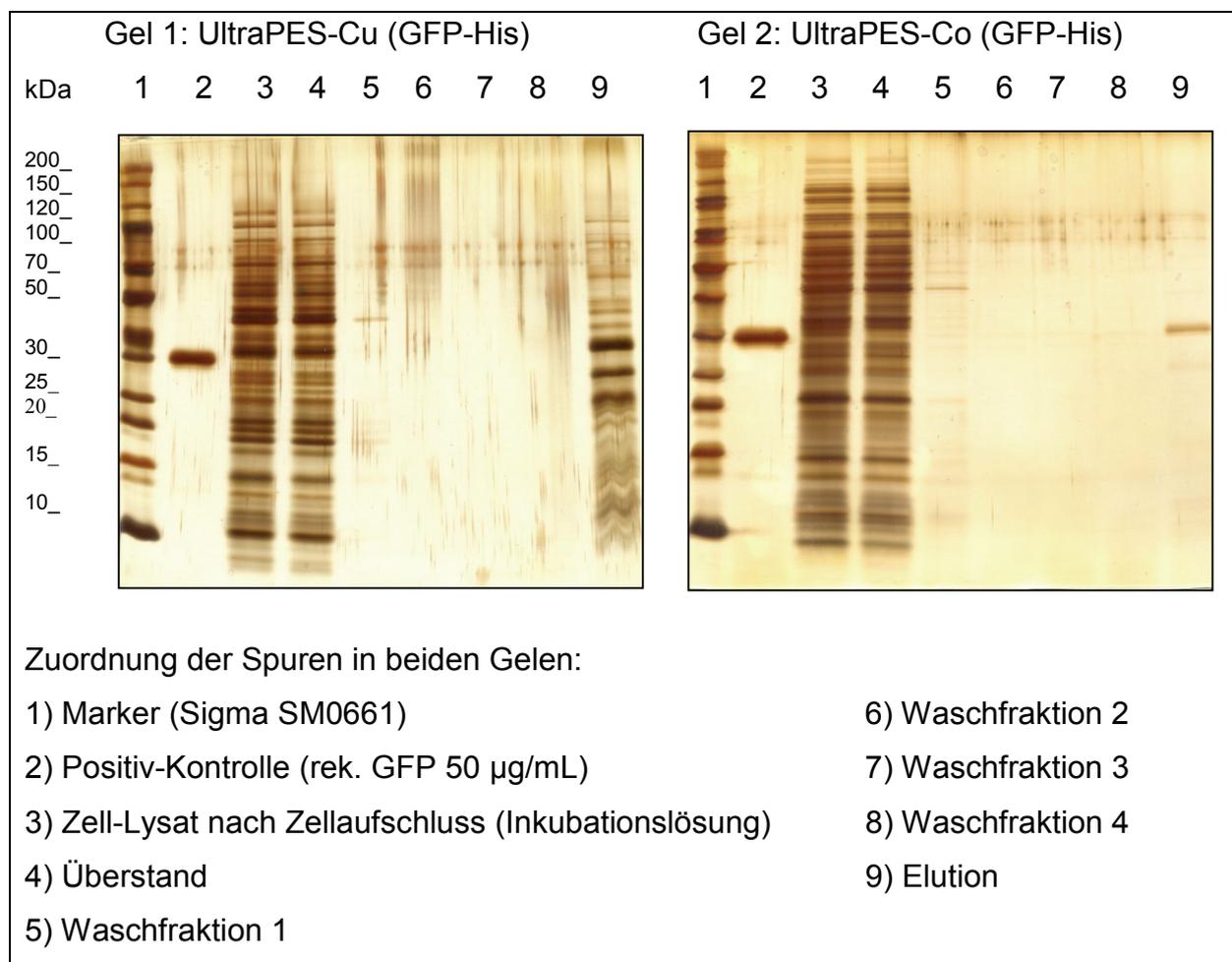


Abb.25: Aufreinigung von GFP-His mittels IMAC-Hohlfasermembranen (UltraPES-Cu, UltraPES-Co); 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt, Proben 3 und 4 sind 1:5 verdünnt worden.

Die Analyse unspezifischer Bindungseffekte bei den UltraPES-Hohlfasermembranen hat ergeben, dass sich je nach eingesetztem Metall (Cu, Ni, Co, Zn) 1,6 bis 13,6 % der eluierten GFP-His-Konzentration auf solche unspezifischen Bindungseffekte zurückführen lassen.

Aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen sind mit Co funktionalisierte Mikro-Hohlfaserreaktoren (Typ Saxonia) eingesetzt worden, um GFP-His aus *E.coli* aufzureinigen. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der Differenz- und Elutionswerte des Bradford-Tests und der Fluoreszenzmessung. Wie erwartet, sind die ermittelten Konzentrationen des Gesamtproteingehaltes (Bradford-Test) höher als die entsprechenden GFP-His-Konzentrationen. Je nach Reaktormodul werden GFP-His-Konzentrationswerte im Eluat zwischen 0,08 und 0,30 mg / g Hohlfaser erreicht. Im Vergleich zu den ermittelten Differenzwerten sind die entsprechenden Elutionswerte um den Faktor 2,4 bis 8,3 geringer, was zum Einen auf eine unspezifische Produktanbindung an die Hohlfaser und zum Anderen auf Auswascheffekte zurückzuführen ist.

Tab.16: Ergebnisse bezüglich des Downstreamings von GFP-His mittels unterschiedlichen Mikro-Hohlfaserreaktoren (Typ Saxonia, Co-Modifizierung)

Hohlfasermodul (Faseranzahl)	Beladungsdichte			
	Bradford-Test [mg Protein / g Hohlfaser]		Fluoreszenz-Messung [mg GFP / g Hohlfaser]	
	Differenzwerte *	Elutionswerte	Differenzwerte *	Elutionswerte
MicroPES (150)	75,30	0,99	0,66	0,08
High Flux (400)	36,25	1,37	0,34	0,10
Low Flux (400)	76,08	2,64	0,72	0,30

* Die Differenzwerte setzen sich aus den Messwerten der Inkubationslösung abzüglich den entsprechenden Messwerten des Überstandes zusammen.

Neben der Aufreinigung von GFP-His ist ebenfalls das Downstreaming von *E.coli* produziertem Bgl-His mittels IMAC-Hohlfasermembranen (Co-Funktionalisierung) untersucht worden. Kultivierungs- und Aufarbeitungsmethoden sind analog zu denen bei der Analyse des Stammes *E.coli* (GFP-His) übernommen worden.

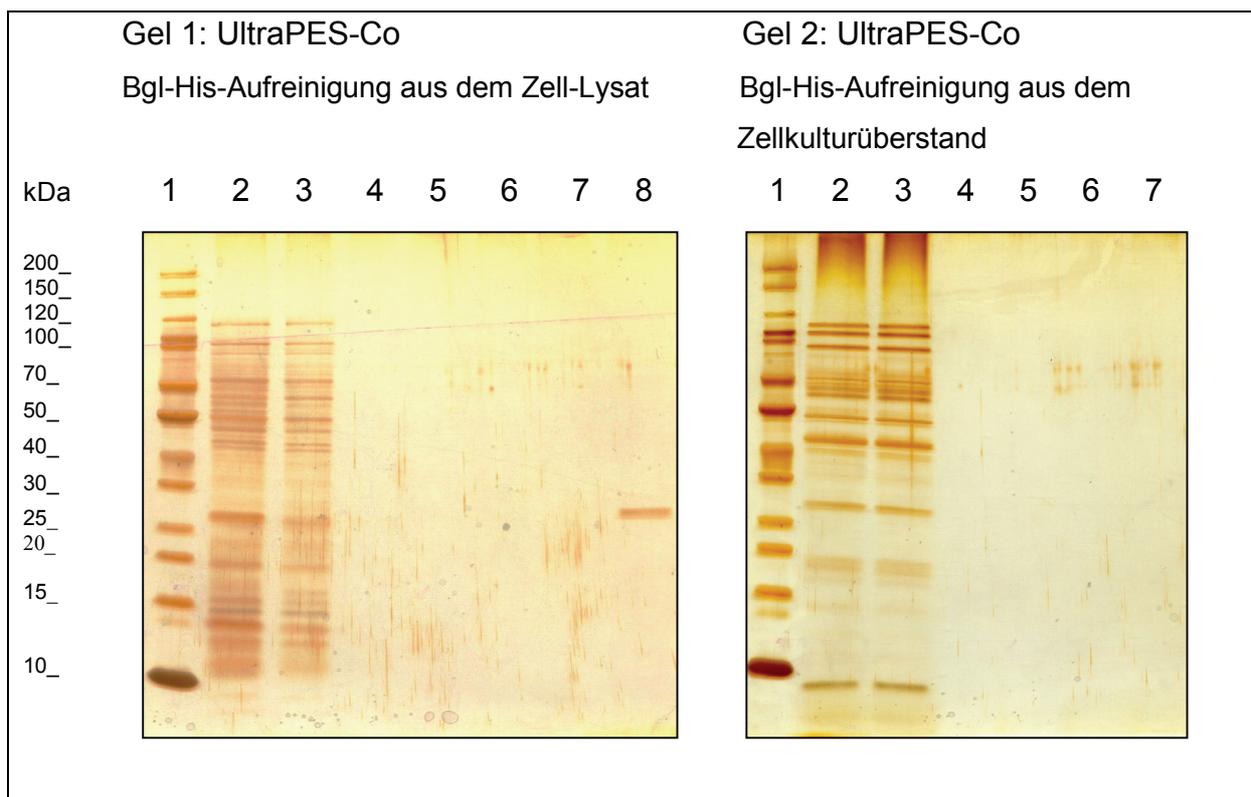
Es sind hier UltraPES-Hohlfasermembranen eingesetzt worden, die jeweils mit Co²⁺-Ionen dekoriert worden sind (AP 2, AP 3). Sowohl die intrazelluläre (Zellaufschluss durch Einfrieren/Auftauen) als auch die extrazelluläre Bgl-His-Bildung (Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes mittels Viva Spin 5 kDa-Modulen, Faktor 8,6) sind untersucht worden. Aussagen über die Effektivität der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat und dem Zellkulturüberstand werden über den Gesamtproteingehalt (Bradford-Test) und SDS-Page gemacht (Tab. 17, Abb. 26).

Tab.17: Ergebnisse bezüglich der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat und dem Zellkultur-überstand mittels UltraPES-Hohlfasermembranen, die mit Co^{2+} -Ionen dekoriert worden sind

Aufreinigungsstrategie (Hohlfasertyp)	Beladungsdichte	
	Bradford-Test [mg Protein / g Hohlfaser]	
	Differenzwerte *	Elutionswerte
Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat (UltraPES-Co)	$19,52 \pm 3,29$	$0,25 \pm 0,01$
Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zellkulturüberstand (UltraPES-Co)	$0,91 \pm 0,28$	$0,02 \pm 0,001$

* Die Differenzwerte setzen sich aus den Messwerten der Inkubationslösung abzüglich den entsprechenden Messwerten des Überstandes zusammen.

In Abhängigkeit von der Aufreinigungsstrategie (Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat bzw. Zellkulturüberstand) werden Gesamtprotein-Konzentrationen von 19,52 bzw. 0,91 mg/mL bei den Differenzwerten und 0,25 bzw. 0,02 mg/mL bei den Elutionswerten erhalten. Da hier nur ein indirekter Bezug zu der Bgl-His-Konzentration über den Gesamtproteingehalt (Bradford-Test) der Aufreinigungsproben geschaffen wurde, ist des Weiteren eine SDS-Page zur genaueren Produktcharakterisierung durchgeführt worden (Abb. 26).



Zuordnung der Spuren in beiden Gelen:

Gel 1:

- 1) Marker (Sigma SM0661)
- 2) Zell-Lysat nach Zellaufschluss
- 3) Überstand nach Inkubation
- 4) -7) Waschfraktionen 1-4
- 8) Elution

Gel 2:

- 1) Marker (Sigma SM0661)
- 2) Kulturüberstand (aufkonzentriert)
- 3) Überstand nach Inkubation
- 4) - 6) Waschfraktionen 1-3
- 7) Elution

Abb.26: Aufreinigung von bgl-His mittels IMAC-Hohlfasermembranen (UltraPES-Co); 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt, bei Gel 1 sind die Proben 2 und 3 1:4 verdünnt worden.

Bei der Bgl-His-Aufreinigung aus dem Zell-Lysat (Abb. 26, Gel 1) kann das Produkt Bgl-His (ca. 26,7 kDa) wie erwartet im Zell-Lysat nach durchgeführtem Zellaufschluss und in abgeschwächter Bandenintensität auch im Überstand nachgewiesen werden. Eine deutliche Produktbande im Eluat (Gel 1, Spur 8) ohne weitere Proteinbanden verweist darauf, dass sich neben dem Produkt keine Proteinverunreinigungen in der Elutionsfraktion befinden.

Bei der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zellkulturüberstand (Abb. 26, Gel 2) kann das Produkt in Form von Bgl-His nur im Kulturüberstand und im Überstand nach erfolgter Inkubation detektiert werden. Ein erfolgreicher Nachweis von Bgl-His in der Elutionsfraktion kann hier nicht mittels SDS-Page aufgezeigt werden. Optimierungsmöglichkeiten bestehen durch Einsatz einer höher konzentrierten Inkubationslösung, Veränderung des Waschprotokolls und/oder Aufkonzentrierung der Eluatfraktionen, um letztendlich eine Produktbande im Eluat zu erhalten.

Für Arbeiten im Bereich des „integrierten Downstreamings“ (Kombination der Zellkultivierung im extrakapillaren Raum des MHFRs bei gleichzeitiger Produktaufreinigung) eignet sich besonders der Stamm *B.megaterium*, der in der Lage ist, Produkt in Form einer his-getagten Levansucrase zu sekretieren. Die Kultivierung dieses Stammes im System MHFR ist etabliert worden (siehe AP 5). Für die direkte Einbindung von IMAC-Hohlfasermodulen in den Aufreinigungsprozess bedarf es zwar noch einiger Experimente und Modifikationen, doch sind derzeit keine Gründe offensichtlich, die eine Einbindung verhindern könnten.

2.3.7 AP 7: Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Wirkstofftestung

In diesem Arbeitspaket sind Versuche zur Analyse des Zellwachstums von HepG2 Zellen auf sterilen MicroPES Flach- und Hohlfasermembranen durchgeführt worden. Als Sterilisationsmethoden sind die Sterilisation mittels verschieden konzentrierten Isopropanollösungen (70%, 50%, 30% und 10%) und Autoklavieren angewendet worden. Um eine qualitative Aussage über das Wachstum der adhären wachsenden HepG2 Zellen zu treffen, ist Toluidinblau zur Übersichtsfärbung dieser auf den entsprechend sterilisierten Membranen wachsenden Leberzellen verwendet worden. In der Abbildung 27 sind mikroskopische Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 2.000x von den mit Toluidinblau angefärbten HepG2 Zellen nach jeweils einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen auf den entsprechenden Matrices dargestellt.

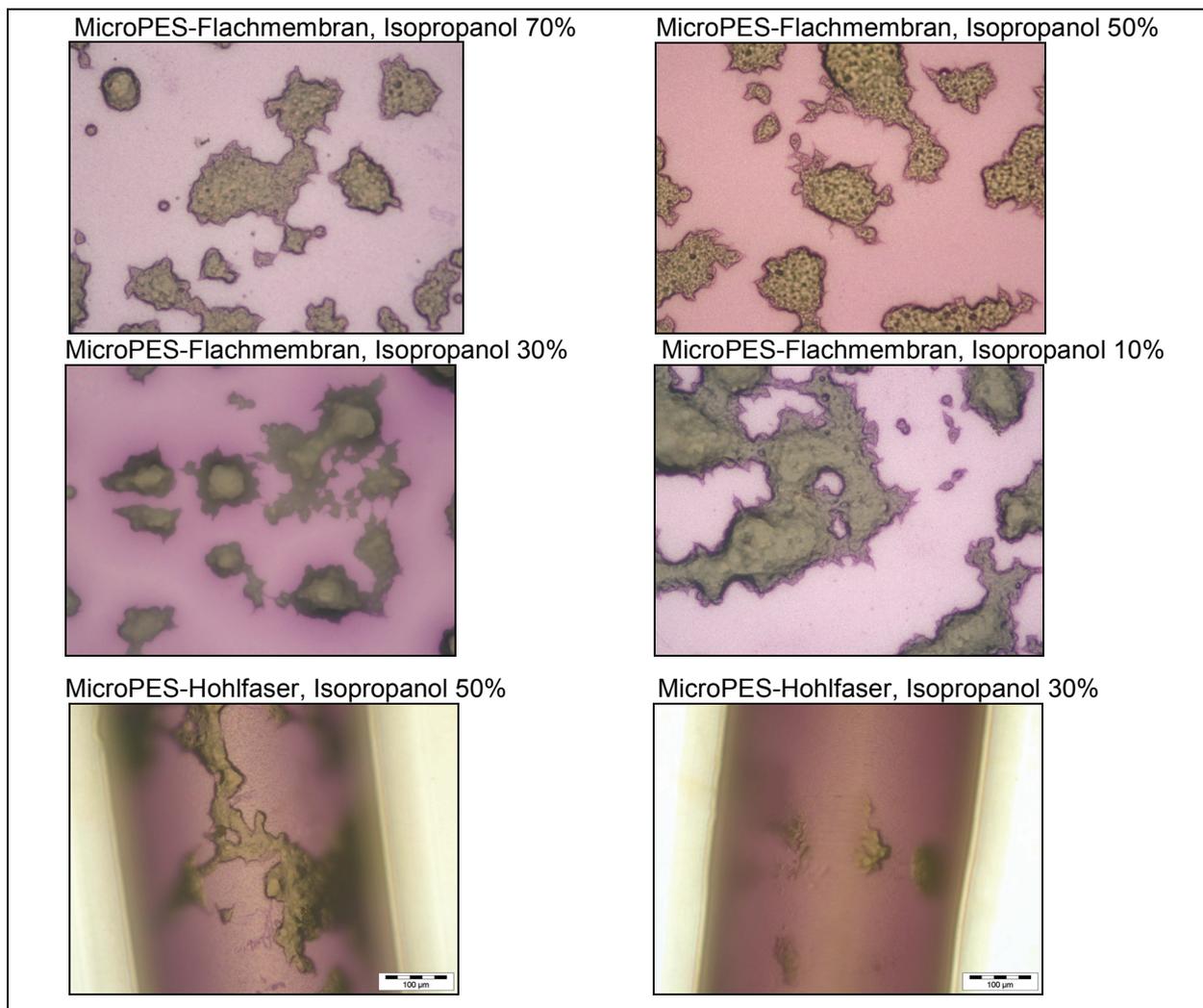


Abb.27: Mikroskopische Analyse von den mit Toluidinblau angefärbten HepG2 Zellen, die auf sterilen MicroPES Flach- bzw. Hohlfasermembranen wachsen.

Mittels MTT-Test, einem kalorimetrischen Verfahren zur indirekten Bestimmung der Zellzahl, besteht die Möglichkeit, anhand einer Wachstumskurve Aussagen über das Zellwachstum zu machen. In der Abbildung 28 sind zwei Wachstumskurven dargestellt, wobei HepG2 Zellen zum Einen auf autoklavierten und zum Anderen auf mit 30 %iger Isopropanollösung behandelten MicroPES-Flachmembranen kultiviert worden sind.

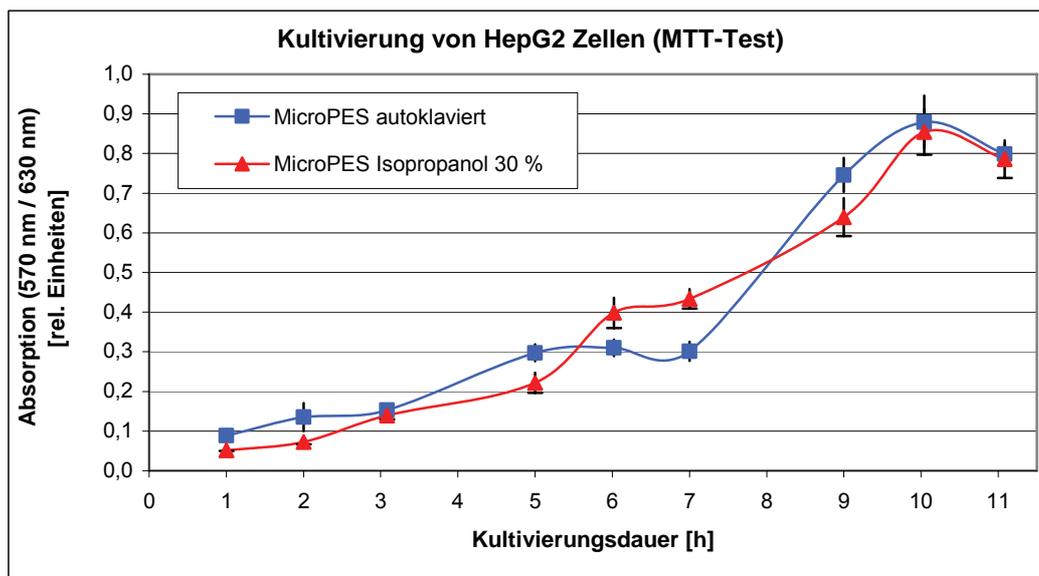


Abb.28: Wachstumskurvenverläufe von HepG2 Zellen, die auf autoklavierten bzw. auf mit Isopropanol (30%) behandelten MicroPES-Flachmembranen kultiviert worden sind.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich die eingesetzten Membrantypen prinzipiell für Kultivierungen von HepG2 Zellen eignen, so dass eine Anwendung dieser Leberzelllinie im Bereich der Kultivierung in den Mikro-Hohlfaserreaktoren stattfinden kann. Die durchgeführten Vorversuche belegten aber auch die Schwierigkeit, bei Bewuchs mit adhärennten Zellen durch die Hohlfasermembran eine ausreichende Substratversorgung gewährleisten; selbiges gilt für die angestrebte Inkubation mit Wirkstoffmolekülen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Eignung des MHFR-Systems für den Bereich Wirkstofftestung generell in Frage zu stellen.

Weitere Untersuchungen zur Durchlässigkeit der Hohlfasermembranen bei Bewuchs durch adhärennte Zellen und zum Biofouling sowie zur angestrebten Wirkstofftestung erwiesen sich als zu umfangreich, um im Rahmen dieses Projektes vollständig bearbeitet werden zu können und wurden daher zu Gunsten von grundlegenden Untersuchungen hinsichtlich Reaktoraufbau und Reaktorcharakterisierung zurückgestellt.

2.3.8 AP 8: Modellierung und Testung kombinierter Module anhand von Modellverfahren zur Etablierung integrierter Abläufe

Die Aufgabenstellung des Arbeitspakets 8 konnte im Rahmen dieses Projektes nicht abschließend bearbeitet werden, da die zusätzlichen Arbeitspakete zur Neukonstruktion und Charakterisierung des MHFRs (AP 3), zu weiterführenden Untersuchungen im Anwendungsbereich Kultivierung, insbesondere die Entwicklung einer geeigneten Begasungsstrategie (AP 5), sich als sehr zeitintensiv in ihrer Bearbeitung herausgestellt haben. Somit ist der in diesem Arbeitspaket angestrebte Einsatz des Stammes *B. megaterium* (Levansucrase-His, sekretierend) vorerst zurückgestellt worden.

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse für die Realisierung integrierter Abläufe beschränken sich daher auf Versuche mit dem Stamm *E.coli*, der Produkt in Form von GFP-His intrazellulär bildet. Nach durchgeführter Kultivierung im MHFR (siehe Abb. 23, Hohlfaserreaktor neu) ist die Kulturbrühe für den erforderlichen Zellaufschluss (wiederholendes Einfrieren und Auftauen, 6 Zyklen) aus dem Modul abgepumpt worden. Die aufgeschlossenen *E.coli*-Zellen im LB-Medium werden anschließend direkt einem Affinitätshohlfasermodul (Co-Modifizierung) zugeführt, um das freigesetzte Produkt in Form von GFP-His aufzureinigen. Nach Inkubation und ausreichend durchgeführtem Waschen erfolgt die Elution ausschließlich über den intrakapillaren Raum des Affinitätshohlfasermoduls, so dass hier sowohl die Separation der Reaktionsräume des Moduls als auch der Einsatz von relativ geringen Elutionsvolumina (5 mL) vorteilhaft ausgenutzt werden kann. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich des integrierten Downstreamings von GFP-His mittels verschiedenen Affinitätshohlfasermodulen, welche final mit Co^{2+} -Ionen dekoriert worden sind. Es sind hier drei Affinitätsmodule vom Typ Saxonía (MicroPES, High Flux und Low Flux) als auch ein selbst angefertigtes Affinitätsmodul (Typ TCI, UltraPES) zum Einsatz gekommen. An die Hohlfaser gebundenes GFP-His wird final durch drei nacheinander angewendete Elutionsschritte (Elution 1-3) aufgereinigt.

Tab.18: Ergebnisse bezüglich des integrierten Downstreamings von GFP-His mittels unterschiedlichen MHFR (Co-Modifizierung)

Affinitäts- hohlfaserm modul (Faseranzahl)	Beladungsdichte				
	Fluoreszenz-Messung [mg GFP / g Hohlfaser]				
	Differenzwerte *	Elution 1	Elution 2	Elution 3	∑ Elutionen
MicroPES (150)	1,12	0,14	0,05	0,02	0,19
UltraPES (43)	1,24	0,09	0,06	0,05	0,19
High Flux (300)	1,19	0,04	0,03	0,02	0,09
Low Flux (200)	3,03	0,17	0,07	0,07	0,31

* Die Differenzwerte setzen sich aus den Messwerten der Inkubationslösung abzüglich den entsprechenden Messwerten des Überstandes zusammen.

Je nach Affinitätshohlfaserm modul werden GFP-His-Konzentrationswerte in den Eluatfraktionen (Summe Elutionen) zwischen 0,09 und 0,31 mg / g Hohlfaser erreicht. Wie erwartet verringern sich die GFP-His-Konzentrationswerte der Eluatfraktionen in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Elutionsschritte, so dass ein Großteil des angebondenen Produktes bereits nach dem ersten und zweiten Elutionsschritt von der entsprechenden Hohlfasermembran abgelöst werden kann. Im Vergleich zu den ermittelten Differenzwerten sind die entsprechenden Elutionswerte (Summe Elution) um den Faktor 5,9 bis 13,2 geringer, was hauptsächlich auf den Aspekt zurückzuführen ist, dass es sich hier ausschließlich um eine intrakapillare Elution handelt und folglich Produkt, welches an die Hohlfaseraußenseite angebonden hat, nicht abgelöst werden kann. Zudem können sich auch Effekte der unspezifischen Produkthanbindung an die Hohlfaser und Auswascheffekte auswirken.

Der Aufbau eines MHFR-Kaskadensystems erweitert die Einsatzmöglichkeiten des MHFR für die Etablierung integrierter Abläufe. So können z.B. mehrere Reaktoren verbunden werden, um das Reaktorvolumen beliebig zu vergrößern. Des Weiteren können Module zur Kultivierung mit Modulen für die Produktabtrennung gekoppelt werden.

Der folgende Versuch zeigt eine Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) in einem MHFR-Kaskadensystem, bestehend aus zwei verbundenen Reaktoren mit jeweils 43

UltraPES-Fasern für die Mediumversorgung und 43 Toyobo-Fasern für die Sauerstoffversorgung (siehe Abb. 22 rechts). Das MHFR-Kaskadensystem enthält somit insgesamt 86 mL zellhaltiges Medium und 100 mL Feed Medium. Abb. 29 zeigt den Wachstumsverlauf der Kultivierung, sowie die GFP-Fluoreszenz, die aus offline Proben bestimmt wurde.

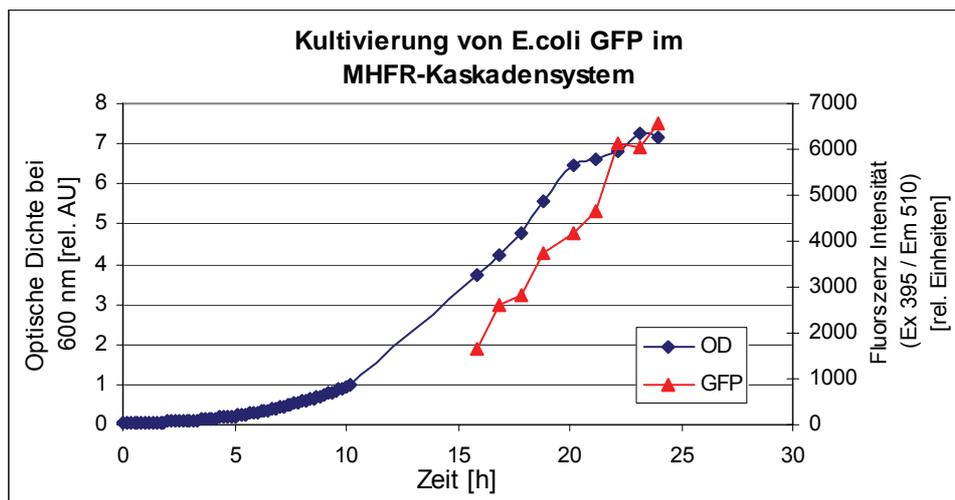


Abb.29: Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) in einem MHFR-Kaskadensystem, ◆ = Optische Dichte, ▲ = GFP-Fluoreszenz

Die Wachstumskurve ist der in Abb. 23 gezeigten Wachstumskurve, die für die Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) in einem Einzelmodul aufgenommen wurde, sehr ähnlich. Die optische Dichte der Kultivierung im MHFR-Kaskadensystem ist nach dem Abpumpen der Zellbrühe sogar deutlich höher als aus den offline Proben ermittelt werden konnte. Sie liegt nach 24 h Kultivierungsdauer bei 9,2 rel. AU. Die Werte für die GFP-Fluoreszenz fallen um 31 % schlechter aus als bei der Schüttelkolbenkultivierung (siehe Abb. 14) und liegen so unter den Erwartungen. Dies sollte jedoch durch eine Optimierung der Produktbildung noch verbessert werden können.

Im nachfolgenden Versuchsteil werden die gewonnenen Zellen aus der Kultivierung im Kaskadenmodul aufgeschlossen (Einfrieren/Auftauen, 6 Zyklen) und in einem Aufarbeitungsmodul (Typ Saxonia, Low Flux) weiter verarbeitet. Die Prozedur des integrierten Downstreamings ist wie oben beschrieben durchgeführt worden. Tabelle 19 stellt die Ergebnisse (Fluoreszenz-Messung) des integrierten Downstreamings von GFP-His dar.

Tab.19: Ergebnisse bezüglich des integrierten Downstreamings von GFP-His (*E.coli*, MHFR-Kaskadensystem) mittels einem Affinitätshohlfasermodule (Typ Saxonia, Co-Modifizierung)

Affinitätshohlfasermodule (Faseranzahl)	Beladungsdichte				
	Fluoreszenz-Messung [mg GFP / g Hohlfaser]				
	Differenzwerte *	Elution 1	Elution 2	Elution 3	∑ Elutionen
Low Flux (200)	2,60	0,18	0,08	0,06	0,32

* Die Differenzwerte setzen sich aus den Messwerten der Inkubationslösung abzüglich den entsprechenden Messwerten des Überstandes zusammen.

Es wird ein GFP-His-Konzentrationswert in den Eluatfraktionen (Summe Elutionen) von 0,32 mg / g Hohlfaser erreicht. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen (siehe Tab. 18, Affinitätsmodule Low Flux), bei denen die Kultivierung von *E.coli* im Einzelmodule erfolgt ist, werden hier GFP-His-Konzentrationswerte sowohl bei den Differenzwerten als auch bei den Elutionswerten in derselben Größenordnung ermittelt. Somit ist es möglich, auch in MHFR-Kaskadensystemen durch *E.coli* gebildetes Produkt (GFP-His) erfolgreich aufzureinigen.

Die Erkenntnisse, der beschriebenen Arbeiten und Ergebnisse, sollen zukünftig als Grundlage für die weitere Bearbeitung dieses Arbeitspakets herangezogen werden. Dafür eignet sich besonders der im Rahmen dieses Projektes erst nach der Zwischenbegutachtung zur Verfügung gestellte Stamm *B.megaterium* (Prof. Dr. Jahn, TU Braunschweig), der in der Lage ist, Produkt in Form einer his-getagten Levansucrase extrazellulär (Sekretion) zu bilden. Somit sollte durch Einsatz dieses Stammes die Etablierung integrierter Abläufe besser realisierbar sein.

Die Vorversuche mit dem Stamm *E.coli* (GFP-His) haben gezeigt, dass es möglich ist, MHFR-Kaskaden für die Kultivierung einzusetzen und intrazellulär gebildetes Produkt nach durchgeführtem Zellaufschluss mittels Einsatz von Affinitätshohlfasermodule (Co-Modifizierung) erfolgreich aufzureinigen. Anhand dieser Ergebnisse kann aufgezeigt werden, dass dem Einsatz des neu erhaltenen Stammes *B.megaterium* im Bereich der Kombination von Modulen zur Etablierung integrierter Abläufe großes Potential zu Teil wird.

Abschließende Bilanzierung der mikrobiellen Proteinproduktion im MHFR-System

Im Folgenden wird eine Bilanzierung der Proteinproduktion für die GFP-Produktion in *E.coli* und für die Levansucrase-Produktion in *B.megaterium* vorgestellt. Da die vorliegenden Versuche in LB-Medium (Komplexmedium) durchgeführt worden sind, kann hier keine Bilanzierung der Produktivität bezogen auf den eingesetzten Kohlenstoff vorgestellt werden, wie sie bei dem Gebrauch von synthetischen Medien üblich ist. Die Ergebnisse wurden stattdessen auf den Verbrauch an LB-Medium bezogen.

Die Tabellen 20 und 21 beschreiben die Ergebnisse für jeweils eine Kultivierung von *E.coli* (GFP) und *B.megaterium* (Levansucrase). Hierbei sind die verschiedenen Mengen an LB-Medium für die jeweilige Kultivierung angegeben sowie die Versuchsergebnisse für Zellwachstum und Produktausbeute.

Anschließend wurde die Produktivität für das eingesetzte zellhaltige Medium bestimmt. Um den Verbrauch an Feed-Medium für den MHFR einzubeziehen wurde die Produktivität auch in Bezug zum Gesamtmediumverbrauch gesetzt. Diese Werte wurden auf 100 % normiert, um einen Vergleichswert zu bilden.

Die Kultivierung von *E.coli* (GFP) im MHFR zeigt im Vergleich zum Schüttelkolben 88 % höhere Werte, bei der optischen Dichte jedoch eine niedrigere Produktkonzentration. Dies spiegelt sich in den Werten für die Produktivität wider. Die Kultivierung im MHFR liefert eine um 31 % niedrigere Produktivität. Bezieht man die Produktivität auf den gesamten Mediumverbrauch, liefert ebenfalls die Schüttelkolbenkultivierung bessere Werte. Auf Grund der wesentlich höheren optischen Dichte im MHFR sollten jedoch durch eine Optimierung der Produktbildung wesentlich höhere Produktivitäten erreicht werden können.

Tab. 20: Bilanzierung der Produktivität von *E.coli* (GFP) im Schüttelkolben und im MHFR bezogen auf den Verbrauch an LB-Medium

	Schüttelkolben	MHFR
LB-Medium [mL]	100	86 (Reaktor) + 100 (Feed Medium) = 186
Optische Dichte [rel. AU]	4,9	9,2
Produktkonzentration [rel. Fluoreszenzeinheiten]	10.260	7.123
Produktivität [%]	100	69
Produktivität / Mediumverbrauch [%]	100	37

Die Kultivierung von *B.megaterium* (Levansucrase) belegt, dass die optische Dichte im MHFR nur geringfügig höher ist als im Schüttelkolben. Bei der Produktkonzentration hingegen gibt es deutliche Unterschiede zwischen den beiden Reaktortypen. So ist die Produktkonzentration im MHFR mehr als doppelt so hoch wie im Schüttelkolben. Bezogen auf das verbrauchte zellhaltige LB-Medium erreicht die Produktivität im Schüttelkolben nur 47 % der im MHFR erzielten Leistung. Bezieht man die Produktivität wieder auf den gesamten Mediumverbrauch, liefert wiederum die MHFR Kultivierung die besseren Werte.

Tab. 21: Bilanzierung der Produktivität von *B.megaterium* (Levansucrase) im Schüttelkolben und im MHFR bezogen auf den Verbrauch an LB-Medium

	Schüttelkolben	MHFR
LB-Medium [mL]	100	40 (Reaktor) + 100 (Feed Medium) = 140
Optische Dichte [rel. AU]	3,7	3,72
Produktkonzentration [$\frac{U}{g/L}$]	121	256
Produktivität [%]	47	100
Produktivität / Mediumverbrauch [%]	66	100

Abschließend lässt sich konstatieren, dass die Kultivierung von *E.coli* im MHFR noch in Bezug auf die Produktbildung optimiert werden muss, um vergleichbare Werte zu der Schüttelkolbenkultivierung zu liefern. Für die Kultivierung von *B.megaterium* (Levansucrase-His) bietet der MHFR schon jetzt entscheidende Vorteile.

Außerdem ist zu beachten, dass der Vergleich mit einer Schüttelkolbenkultivierung nur bedingt möglich ist. Das MHFR System ermöglicht eine kontinuierliche Kultivierung mit blasenfreier Sauerstoffbegasung und vielfältigen Möglichkeiten für Zufütterung, Induktion, etc. im Screeningmaßstab. Das heißt, im Gegensatz zur einfachen Schüttelkolbenkultivierung können viele verschiedene Parameter im Vorfeld im kleinen Maßstab optimiert werden. Dies macht den Einsatz von MHFR für die mikrobielle Proteinproduktion zusätzlich ökologisch und ökonomisch sinnvoll.

2.4 Diskussion

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten konnte aufgezeigt werden, dass fertige Hohlfasermembranen aus PES oder PS, die hinsichtlich der Porengröße und des Durchmesser variieren, gezielt modifiziert werden können. Ausgehend von der epoxyaktivierten Hohlfaseroberfläche besteht die Möglichkeit, verschiedene funktionelle Gruppen auf die Membran aufzubringen. Neben den nucleophilen Agenzien wie 2-Aminoethansulfonsäure, Glycin, Triethylamin und Diethylamin (Synthese von Ionenaustauscher-Membranen) können auch Metalle, die an eine mit IDA modifizierte Membran angebunden werden, auf die Hohlfaser aufgebracht werden. Die Beladungskapazitäten der entsprechenden Gruppen pro g Hohlfaser liegen im unteren μmol -Bereich. Modifizierte Membranmaterialien weisen keine Beeinträchtigung der Porenstruktur auf, so dass sie im Bereich der Kultivierung und des Downstreamings eingesetzt werden können. Des Weiteren ist der Aspekt der Sterilität bzw. Desinfektion für eine erfolgreiche Anwendung im Bereich Kultivierung essentiell. Die Methode der Wahl ist die Anwendung von 1 %iger Natriumhypochloritlösung gefolgt vom Einsatz einer 30 %igen Isopropanollösung, um kontaminationsfreies Arbeiten ohne Beeinträchtigung der Porenstruktur der Membran zu gewährleisten. Kultivierungen im MHFR sowie im Schüttelkolben von *E.coli* (GFP-His bzw. Bgl-His), *B.megaterium* (Levansucrase-His) und *C.glutamicum* (Serin) mit anschließender Produktaufarbeitung sind durchgeführt worden.

Der Einsatz der miniaturisierten Hohlfasermodule eignet sich besonders, um integrierte Prozessabläufe zu realisieren. Im Bereich Kultivierung konnte gezeigt werden, dass sich der MHFR für die Kultivierung der genutzten Testorganismen erfolgreich eingesetzt werden kann. Dies konnte jedoch nur durch eine vorherige Optimierung des Reaktorsystems erreicht werden. Insbesondere durch den Einsatz integrierter Sensorspots (pO_2) im Reaktor konnte eine detailliertere Prozessüberwachung der Kultivierung realisiert werden und somit die bestehende Sauerstofflimitierung minimiert werden. Die durch *E.coli* oder *B.megaterium* produzierten His-tag-Proteine können effizient über die mit Metall modifizierten Hohlfasern aufgereinigt und isoliert werden. Des Weiteren konnte der Aufbau eines Kaskadensystems für Up-Scaling- und Screeningexperimente verwirklicht werden. Insgesamt betrachtet ist der neukonstruierte MHFR nun im Bereich biotechnologischer Prozesse vielfältig einsetzbar. Sowohl im Anwendungsbereich Kultivierung als auch im Bereich Downstreaming erfahren Hohlfasermodule eine Anwendung. Durch die Miniaturisierung des Reaktors wurde die Etablierung eines upscalebaren Mikroreaktorsystems erreicht, mit dem unter ökonomisch sinnvoller Ressourcenschonung die Produktion in Hohlfaserreaktorsystemen optimiert werden kann. Die mögliche Kombination mehrerer Hohlfasermodule zur Anordnung von Kaskaden oder Flächen erlaubt die automatische Verarbeitung in Reihenuntersuchungen (Screeninganalysen).

2.5 Soll-/Ist-Vergleich

Arbeitspakete

AP-Nr.	Arbeitspaket (AP)	Soll/Ist	Monate																										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	Modifikation der Basismembran zur Anbindung von Liganden (alle Partner)	Soll Ist																											
2	Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen, z.B. spezifischen Aptameren (RiNA, TCI)	Soll Ist																											
3	Aufbau und Charakterisierung der funktionalisierten Hohlfasermodule (alle Partner)	Soll Ist																											
4	Reaktionstechnische Charakterisierung der Kassettenreaktoren(TCI, Saxonia)	Soll Ist																											
5	Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Kultivierung und Reaktion (TCI, Saxonia)	Soll Ist																											
6	Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Downstreaming (TCI, Saxonia)	Soll Ist																											
7	Testung, Etablierung und Optimierung der Hohlfasermodule im Anwendungsbereich Wirkstofftestung (TCI, Saxonia)	Soll Ist																											
8	Modellierung und Testung kombinierter Module anhand von Modellverfahren zur Etablierung integrierter Abläufe (alle Partner)	Soll Ist																											
	Koordination & Berichterstellung (TCI)	Soll Ist																											

Aufgrund eines verzögerten internen Projektbeginns, der durch die Neueinstellung wissenschaftlicher Mitarbeiter bedingt war, kommt es zu einer ca. 3-monatigen Verschiebung in der Bearbeitung der einzelnen Arbeitspakete. Dies ist in der Prognose dargestellt. Das Projekt wurde dann im Rahmen der kostenneutralen Verlängerung abgeschlossen.

2.6 Öffentlichkeitsarbeit

2006, 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen

Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and application to integrated downstream processes (Vortrag)

S. Kroll, L. Meyer, A. Graf, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper

2006, 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen

Processing of a hollow fiber micro-bioreactor for applications in cultivation and downstreaming (Poster)

L. Meyer, S. Kroll, L. Villain, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper

2006, 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES)

Applications for novel hollow fiber micro-bioreactor in cultivation and downstreaming (Vortrag)

L. Meyer, S. Kroll, L. Villain, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper

2006, 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES)

Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and the utilization of affinity membranes in purification processes (Poster)

S. Kroll, L. Meyer, A. Graf, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper

Veröffentlichungen

Development and characterization of a novel hollow fiber micro-bioreactor for cultivation of microorganisms

L. Meyer, S. Kroll, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, T. Scheper

In Veröffentlichung bei *Journal of Biotechnology*

Heterogeneous surface modification of single hollow fiber membranes and novel hollow fiber micro-bioreactor

S. Kroll, L. Meyer, A. Graf, S. Beutel, J. Glöckler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper

In Veröffentlichung bei *Journal of Membrane Science*

Diplomarbeiten

Chemische Funktionalisierung von Hohlfasermembranen für die Anwendung im Bereich integrierter Downstreaming-Prozesse (A. Graf, November 2006)

2.7 Fazit

Durch die Aufnahme neuer Arbeitspakete wie die Weiterentwicklung bzw. vollständige Neukonstruktion des MHFRs durch Integration von verschiedenen Rührertypen sowie zusätzlichen Hohlfasermembranen für eine O₂-Begasung, die den erfolgreichen Einsatz des MHFRs im Bereich Kultivierung erst ermöglicht haben, konnten die Arbeiten zu dem weiterführenden Arbeitspaket 7 im Rahmen der Projektlaufzeit nicht abschließend bearbeitet werden.

Die Arbeitspakete zur Modifikation der Basismembran zur Anbindung von Liganden sowie der Aufbau und Charakterisierung der funktionalisierten Hohlfasermodule sind vollständig abgeschlossen. Eine Vielzahl verschiedener Oberflächenfunktionalitäten der Hohlfasermembranen wurde generiert und an verschiedenen Targetmolekülen, die von den entsprechenden Mikroorganismen produziert werden, getestet.

Weitere Arbeitspakete im Bereich Kultivierung und Downstreaming sind in den letzten Monaten intensiv bearbeitet worden und zeigen vielversprechende Ergebnisse. So liegen nun optimierte Mikro-Hohlfaserreaktoren vor, die ein großes Potential für vielfältige Anwendungen zeigen. Durch die ständige Weiterentwicklung des MHFRs (z.B. Einbau von verschiedenen Magnetrührertypen, zusätzliche Hohlfasern für O₂-Begasung, Sensorspots und Quarzglasplatte) konnte die erfolgreiche Kultivierung verschiedenster Mikroorganismen gewährleistet werden. Im Bereich Kultivierung konnte außerdem ein Kaskadensystem für Up-Scaling-Experimente etabliert werden.

Des Weiteren sind Strategien zur Aufreinigung und zum Nachweis der entsprechenden Produkte etabliert worden. Die Affinitätshohlfasermodule kamen insbesondere bei der Aufreinigung von GFP-His und Bgl-His zum Einsatz. Durch Kombination dieser beiden Arbeitsaspekte konnte die Option eines integrierten Downstream processings erarbeitet werden. Das MHFR-System bietet sowohl als Einzelmodul als auch als Kaskadensystem vielfältige Möglichkeiten zur Realisierung des integrierten Downstreamings.

Insgesamt verlief die Kooperation der Projektpartner problemlos und die Arbeiten griffen nahtlos ineinander. So wurden alle benötigten Materialien zeitnah zur Verfügung gestellt. Da den Weiterentwicklungsmöglichkeiten des MHFR-Basissystems aber produktionstechnische Grenzen gesetzt waren, wurden die Arbeitspakete der Projektpartner nach Rücksprache mit dem Projektträger angepasst und die Weiterentwicklung des Reaktorsystems beim Projektpartner TCI vor Ort durchgeführt, da hier auch die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Optimierung des biotechnologischen Einsatzes stattfanden. Die Basisreaktoren des Partners Saxonia hingegen konnten in großer Zahl z.B. für Screeningversuche zur Membranaktivierung und Ligandendekoration eingesetzt werden und dienten als Basisvergleichsmodell zur Bewertung der Optimierungsarbeiten. Die vom Partner RINA im Rahmen des Projektes zur Verfügung gestellten Aptamere waren aufgrund der zur Zeit noch erheblichen Herstellungskosten nur in sehr begrenzter Menge verfügbar, so dass der erfolgreiche Aufbau eines Aptamer-Ligandendekorierten Hohlfasermoduls nicht erreicht werden konnte. Die durchgeführten Vorversuche legen nahe, dass ein Einsatz dieses Liganden erst nach Etablierung einer Großproduktion ökonomisch möglich sein wird.

Das Vorhaben wird auch über die Projektlaufzeit hinaus weitergeführt, so dass einzelne noch nicht abgeschlossene Bereiche des Projektes weiter bearbeitet werden. Mit Hilfe des optimierten MHFRs werden weiterführende Versuche zur Etablierung der Kultivierung tierischer Zellen und die Testung kombinierter Hohlfasermodule für Screeninguntersuchungen anhand von Modellverfahren durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt zukünftiger Untersuchungen wird die Biofoulingproblematik sein, die bei der Kultivierung verschiedener Mikroorganismen zum limitierenden Faktor in der Substratversorgung werden kann.

Hannover, den

26.02.2007

Prof. Dr. Thomas Scheper
(Projektleiter)

Dr. Sascha Beutel
(Projektkoordinator)