

Abschlussbericht

Entwicklung eines mikropartikelbasierten Bioprozesses zur nachhaltigen Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe mit filamentösen Mikroorganismen - **AZ 30808**

Laufzeit: 1.10.2013 – 30.9.2016

Projektbeteiligte:

DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI)
Stiftung bürgerlichen Rechts
Theodor-Heuss-Allee 25
60486 Frankfurt am Main
Prof. Dr. Jens Schrader / Dr.-Ing. Dirk Holtmann
Email: schrader@dechema.de, holtmann@dechema.de

W42 Industrial Biotechnology GmbH (W42)
Otto-Hahn-Straße 15
im BMZ
44227 Dortmund
Dr. Ansgar Stratmann
Email: a.stratmann@w42biotechnology.de

Surflay Nanotec GmbH (Surflay)
Max-Planck-Str. 3
(im Technologiepark Adlershof)
12489 Berlin
PD Dr. habil. Lars Dähne
Email: l.daehne@surflay.com

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
Methoden	3
Surflay - Partikelmodifikationen	3
DFI/W42 - Kultivierung von filamentösen Mikroorganismen	3
DFI/W42 - Produktanalytik	4
DFI/W42 - Morphologieuntersuchungen	4
DFI - Parallelerfermentation von <i>Saccharopolyspora erythraea</i> zur Erythromycin-Produktion	4
DFI - Analyse der Genexpression der Erythromycin-Synthese in <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	4
Ergebnisse	6
Surflay – 1: Partikelscreening	6
Surflay – 2: Optimierung der Partikeleigenschaften wie Porosität, Größe und Form	7
Surflay – 3: Beschichten der ausgewählten Partikel mit Polyelektrolytschichten	8
Surflay – 4 Beschichten der ausgewählten Partikel mit Variationen der vielversprechendsten LbL-Kombination	10
Surflay – 5 Adsorption und Desorption von Rifamycin an LbL-beschichtete Silika-Partikel	11
Adsorption	11
Desorption	13
Surflay – 6 Adsorption und Desorption von Rifamycin W	13
DFI – 1: Selektion auf positiv wirkende Partikelgrundtypen an Antibiotika- produzierenden Aktinomyceten	14
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> – Rebeccamycinproduktion und Morphologie-Veränderungen	15
<i>Streptomyces coelicolor</i> – Produktbildung und Morphologieveränderungen	17
DFI – 2: Selektion auf positiv wirkende Partikelgrundtypen an Antibiotika-produzierenden höheren Pilzen	19
DFI – 3: Identifizierung wesentlicher Partikeleigenschaften	20
DFI – 4: Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Partikeleffekt	20
DFI – 5: Untersuchung des Einflusses von Mikropartikeln auf die Genexpression der Erythromycin-Synthese in <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .	23
DFI - 6: In situ Produktentfernung (Testen der Eignung von beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikeln zur <i>in-situ</i> -Abtrennung von Erythromycin A während der Fermentation von <i>S. erythraea</i>)	27
W42 – 1: Charakterisierung der Partikeleffekte bei industriellen Stämmen und Fermentationsprotokollen	29
Cephalosporin C (CPC)	30
Erythromycin A (EryA)	31

Rifamycin W (RifW)	33
W42 – 2: Molekularbiologische / Biochemische Untersuchungen	37
W42 – 3: Einfluss auf bioverfahrenstechnische Parameter	38
W42 – 4: In situ Produktentfernung durch Mikropartikel und W42 – 5: Minimierung der Nebenprodukte	39
W42/DFI/Surflay: Abschätzung der ökologischen und ökonomischen Auswirkungen des Partikeleinsatzes	44
<i>Fazit</i>	47
<i>Öffentlichkeitsarbeit</i>	48
<i>Literaturangaben</i>	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip und Durchführung der Layer-by-Layer (LbL) Technologie	3
Abbildung 2: CLSM-Aufnahmen ausgewählter Partikel mit Rhodamin B gelabeltem PAH beschichtet. 7	
Abbildung 3: Rifamycinspektren nach Inkubation mit PVBTMAC-beschichteten (links) und unbeschichteten porösen Silika-Partikeln.....	12
Abbildung 4: Rifamycinspektren nach Inkubation mit porösen Silika-Partikeln mit Zweischichtsystem mit negativer Außenladung (links) und Dreischichtsystem mit positiver Außenladung (rechts)	12
Abbildung 5: Adsorbiertes Rifamycin SV gegenüber desorbiertes Rifamycin SV von PEI-beschichteten porösen Silika-Partikeln bei bestimmten pH-Werten	13
Abbildung 6: Polyvinylpyrrolidonpartikel mit adsorbiertem Material aus der Rifamycin W Kulturbrühe (oben links), vom Adsorptionsüberstand abgetrennte Partikel (oben rechts), nach der Desorption über pH-Änderung (unten links) und vom Desorptionsüberstand getrennte Partikel (unten rechts) .	14
Abbildung 7: Rebecamycinkonzentrationen nach 8 Tagen Kultivierung ohne Partikel, mit unbehandeltem Talk (uTalk) und Talkpartikeln mit modifizierter Oberfläche (Partikel 02.06-11.06, siehe auch Tabelle 3).....	16
Abbildung 8: Rebecamycinkonzentrationen (A) und die Veränderung der Pelletgrößenverteilung (B) nach 8 Tagen Kultivierung mit Glaskugeln von 0,5-5 mm im Durchmesser.....	16
Abbildung 9: Einfluss verschiedener Partikel auf die Produktion von Actinorhodin (blaue Pigmente).18	
Abbildung 10: Einfluss von Glaskugeln (1 µm bis 5 mm) auf die Bildung von Actinorhodin/blauer Pigmente in <i>S. coelicolor</i>	19
Abbildung 11: Morphologie von <i>P. chrysogenum</i> nach 3 Tagen Kultivierung mit und ohne Partikel. .	19
Abbildung 12: Veränderung der Pigmentmenge im Kulturmedium bei der Kultivierung von <i>S. coelicolor</i>	21
Abbildung 13: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der ersten Fermentation von <i>S. erythraea</i> ohne Partikel (schwarz und grau) und mit modifizierten Talk-Partikeln (grün).....	22
Abbildung 14: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der zweiten Fermentation von <i>S. erythraea</i> ohne Partikel (schwarz und grau) und mit modifizierten Talk-Partikeln (grün).....	23
Abbildung 15: Probennahme von <i>S. erythraea</i> , kultiviert mit und ohne Talkpartikeln im DASGIP- System, sieben Tage nach Induktion zur Untersuchung der Genexpression.....	25
Abbildung 16: Relative Veränderung der Expressionsrate ausgewählter Gene der Erythromycin- Synthese zum Zeitpunkt der Probennahme (7 Tage nach Induktion).....	26
Abbildung 17: Probennahme von <i>S. erythraea</i> , kultiviert mit und ohne Talkpartikeln in einem zweiten DASGIP-Versuch, drei Tage nach Induktion zur Untersuchung der Genexpression.	26
Abbildung 18: Relative Veränderung der Expressionsrate ausgewählter Gene der Erythromycin- Synthese zum Zeitpunkt der Probennahme 3 Tage nach Induktion.	27
Abbildung 19: Erythromycin A-Konzentrationen im mit Erythromycin A versetzten Medium: zum Zeitpunkt t=0 (schwarz), nach vierstündiger Inkubation ohne Partikel (grün) und nach vierstündiger Inkubation mit 10 g/L beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikeln (grün)	28
Abbildung 20: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der Fermentation von <i>S. erythraea</i> ohne Partikel (schwarz und grau) und mit beschichteten Polyvinylpyrrolidon- Partikeln (grün).....	29
Abbildung 21: Typisches Wachstum des Stammes W42-I in Flüssigmedium,	31

Abbildung 22: Entwicklung von Hemmhöfen in einem Bakterienrasen (<i>M. luteus</i>) durch Proben aus Schüttelkolbenversuchen von <i>Sac. erythraea</i> K1 zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde der Einfluss von fünf Mikropartikeln im Vergleich zu einer Kultivierung ohne Partikel untersucht. Als Standard wurden definierte Mengen Erythromycin A verwendet.	33
Abbildung 23: Chemische Struktur von Rifamycin W als Vorstufe der pharmakologisch bedeutenden Substanz Rifamycin B. Der Stamm <i>A. mediterranei</i> W126 produziert Rif W.	33
Abbildung 24: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 6, 5, 7, ohne, 1 (nähere Erläuterung jeweils im Text).....	34
Abbildung 25: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 2, 4, 5, 6, 1, 7, 10, 9, ohne, 8.	35
Abbildung 26: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 10, ohne, 7, 4, 2, 5, 1, 2.	36
Abbildung 27: Einfluss von unterschiedlichen Alginat/Chitosan Partikeln auf die Rif W Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. Für jeden Partikel wurde eine Doppelbestimmung (Parallelkultur) durchgeführt 8 (Ranking, Partikel = 4A, 3B, ohne A, ohne B, 2A, 3A, 2B, 1B, 1A, 4B)..	37
Abbildung 28: Fermentation von <i>Sac. erythraea</i> K1 mit SOP von W42. Dargestellt ist der Verlauf der Fermentation anhand der Zellfeuchtmasse und der Produktion von Erythromycin A, B und C über den gesamten Verlauf. Bestimmung der Erythromycin-Konzentration mittels HPLC. Die beobachteten großen Luftblasen aufgrund der Konsistenz der Kulturbrühe sind mit roten Pfeilen markiert. Es wurden keine Partikel verwendet.	38
Abbildung 29: Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 im Vergleich zu zwei unterschiedlichen Alginat/Chitosan Partikeln (008_3, 008_4) auf die RifW Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. Für jeden Partikel wurde eine Doppelbestimmung (Parallelkultur) durchgeführt. Es wurden 300 mg Partikel je Kultur eingesetzt (Ranking, Partikel = 001_9A, 001_9B, 008_3A, 008_4A, ohne A, ohne B, 008_3B).	40
Abbildung 30: Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge auf die RifW Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen. In einem Versuch wurden 500 mg Partikel nach 92 Stunden der Kultur zugefügt (grüner Pfeil, Ranking, Partikel 001_9 = ohne(1), 200 mg, 500 mg (zugefügt bei 92 h), ohne (2), 400 mg, 100 mg, _300 mg, 500 mg).	41
Abbildung 31: Rif W Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen in Gegenwart von 300 mg Partikeln. Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 auf die Rif. W Produktion im Vergleich zu Kulturen mit Alginat/Chitosan Partikeln bzw. Kontrollen ohne Partikel. Es ist die Gesamtproduktion (total), der Rif.W Gehalt im zellfreien Überstand (supernatant) und nach zwei Desorptionsschritten (Desorption1 + 2) gezeigt.	42
Abbildung 32: Rif W Produktion in <i>A. mediterranei</i> W126 in Schüttelkolbenversuchen in Gegenwart von 100 - 500 mg Partikeln. Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 in verschiedenen Konzentrationen auf die Rif. W Produktion. Es ist die Gesamtproduktion (total), der Rif W Gehalt im zellfreien Überstand (supernatant) und nach einem Desorptionsschritt (Desorption1) gezeigt.	43
Abbildung 33: Verteilung mehrerer Medienkomponenten auf den gesamten E-Faktor.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die für die Voruntersuchung getesteten Partikel	6
Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen eingesetzte SiO ₂ -Template	8
Tabelle 3: Übersicht über die Beschichtungen der Talkum-Partikel und Beschreibung der Eigenschaften	8
Tabelle 4: Übersicht über die Änderungen des jeweiligen Zetapotentials durch den Autoklavierprozess	9
Tabelle 5: Vergleich neue und alte Beschichtung (PAH/PSS) ₂ PAH.....	10
Tabelle 6: Zweite Herstellungsrunde von beschichteten Talkpartikeln und Glasperlen.....	10
Tabelle 7: Dritte Herstellungsrunde von beschichteten Talkpartikeln.....	11
Tabelle 8: Beschichtete Silika-Partikel zur Adsorption von Rifamycin	11
Tabelle 9: Übersicht über den Einfluss von Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften auf die Produktbildung	15
Tabelle 10: Übersicht der Gene und Genprodukte, die an der Erythromycin-Synthese in <i>S. erythraea</i> beteiligt sind.	24
Tabelle 11: Berechnete E-Faktoren zum Vergleich des Partikel-Effektes bei unterschiedlichen Kulturmedien.....	45
Tabelle 12: Abschätzung der ökonomischen Auswirkungen der Partikel-Zugabe bei der Rebeccamycin-Produktion	46

Abkürzungsverzeichnis

Alg	Alginat
Carr	λ -Carrageen
Chit	Chitosan
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
LbL	Layer-by-Layer
MPEC	Micro particle enhanced cultivation
PAA	Polyacrylsäure
PAH	Polyallylamin
PDA	Polydiallyldimethylammonium
PDop	Polydopamin
PEI	Polyethylenimin
PMAA	Polymethacrylsäure
PSS	Polystyrolsulfonat
PVA	Polyvinylalkohol
PVBTMAC	Polyvinylbenzyltrimethylammoniumchlorid

Zusammenfassung

Im Rahmen des Projekts wurden zunächst Oberflächenmodifikationen auf Grundpartikeln aus Talk, und SiO₂ mittels der Layer-by-Layer Technologie hergestellt. Diese Partikel wurden hinsichtlich Zetapotential, pH-Wert, Größenverteilung, Porosität und Aggregationsverhalten charakterisiert und der Herstellungsprozess verbessert. Die modifizierten und unmodifizierten Partikel wurden in folgenden Prozessen zur Produktion von Sekundärmetaboliten eingesetzt (angegeben ist jeweils der Organismus und das Zielprodukt):

- *Lechevalieria aerocolonigenes* DSM 44217 (Rebeccamycin)
- *Streptomyces coelicolor* M145 (Actinorhodin)
- *Saccharopolyspora erythraea* GHS13 (Erythromycin A)
- *Saccharopolyspora erythraea* K1 (Erythromycin A)
- *Amycolatopsis mediterranei* W126 (Rifamycin W)
- *Acremonium chrysogenum* W42-I (Cephalosporin C)
- *Penicillium chrysogenum* DSM 1075 (Penicillin G)

Im Rahmen des Screenings filamentöser Bakterien konnten positive Effekte durch den Zusatz von Partikeln auf das Wachstum und die Produktbildung von Sekundärmetaboliten bestimmt werden. Mit unbehandelten Talkpartikeln konnte beispielsweise die Rebeccamycinproduktion mit *Lechevalieria aerocolonigenes* um den Faktor drei gesteigert werden. Mit drei der modifizierten Talk-Partikeln wurde eine weitere Produktivitätssteigerung gemessen. Es konnte eine 5- bis 8-fache Steigerung der Produktkonzentration erzielt werden. Hierbei handelte es sich um Partikel mit einem negativen Zetapotential, die Hydrophilie hat dabei eine untergeordnete Rolle gespielt. Weiterhin konnte durch den Zusatz von unmodifizierten Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,25-0,5 mm eine ca. 20-fache Steigerung der Rebeccamycinkonzentration erzielt werden. Bei der Produktion des Antibiotikums Actinorhodin mit *Streptomyces coelicolor* haben zwei der Partikel, die bei der Kultivierung von *L. aerocolonigenes* positive Effekte hervorgerufen haben, wiederum zu einer erhöhten Produktivität geführt. Ebenfalls konnten bei dem Zusatz von Partikeln zu Kulturen von *Saccharopolyspora erythraea* zur Produktion von Erythromycin A und dem Rifamycin W Produzenten *A. mediterranei* jeweils positive Effekte in der Produktion der Antibiotika festgestellt werden. Die Produktion von Erythromycin A wurde in der zweiten Projektphase erfolgreich in den Bioreaktor übertragen. Hier konnten wiederum positive Effekte auf die Produktion des Antibiotikums erzielt werden, die Produktionsrate konnte hier um ca. 150 % gesteigert werden. Im Rahmen diese Untersuchungen wurden weiterhin mittels Genexpressionsanalysen Targets für eine gezielte molekularbiologische Optimierung des Produktionsorganismus identifiziert. Es wurde ebenfalls die gezielte Adsorption und Desorption verschiedener Zielmoleküle an die Partikel untersucht, damit konnte die Basis für einen Einsatz der Partikel im Sinne einer in-situ Produktabtrennung gelegt werden. Die Effekte der Partikel-Zugabe auf die Prozess-Ökonomie und -Ökologie wurden abschließend bewertet.

Einleitung

Ziel des Forschungsvorhabens war die Verbesserung der Ökobilanz und der Wirtschaftlichkeit biotechnologischer Wirkstoffproduktionen mit filamentösen Mikroorganismen. Die Produktion von Antibiotika und anderen naturbasierten pharmazeutischen Wirkstoffen mit filamentösen Mikroorganismen stellt mengenmäßig und wirtschaftlich betrachtet eines der Kerngebiete der industriellen Biotechnologie dar (1). Für die fermentative Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen sollte eine maßgeschneiderte Technologie entwickelt werden, die auf dem Einsatz von Mikropartikeln/Partikeln im Kulturmedium basiert. Die Arbeiten wurden modellhaft an pro- und eukaryotischen Antibiotikaproduzenten durchgeführt.

Der „Mikropartikeleffekt“ wurde vom DECHEMA-Forschungsinstitut erstmals am Beispiel der Biomassebildung und Enzymsekretion des filamentösen Pilzes *Caldariomyces fumago* publiziert (2) und in der Folge durch andere Wissenschaftler auch für weitere Enzymproduktionen mit filamentösen Pilzen bestätigt (3, 4). Bisher wurde das Potential der Technologie jedoch nicht systematisch hinsichtlich der Sekundärmetabolitproduktion filamentöser Mikroorganismen untersucht. Vorarbeiten am DFI zeigten jedoch, dass Mikropartikel auch einen positiven Effekt auf die Metabolitsekretion von Pilzen und Streptomyceten besitzen.

Methoden

Surflay - Partikelmodifikationen

Bei Surflay wurden verschiedene Partikel mittels der Layer-by-Layer Technologie hergestellt. Diese Technik erlaubt das Aufbringen von wenigen Nanometer dicken Schichten von funktionalisierten Polymeren auf Partikel. Dadurch ist es möglich, die Oberflächeneigenschaften breit zu modifizieren ohne das Partikel selbst zu verändern (Abbildung 1).

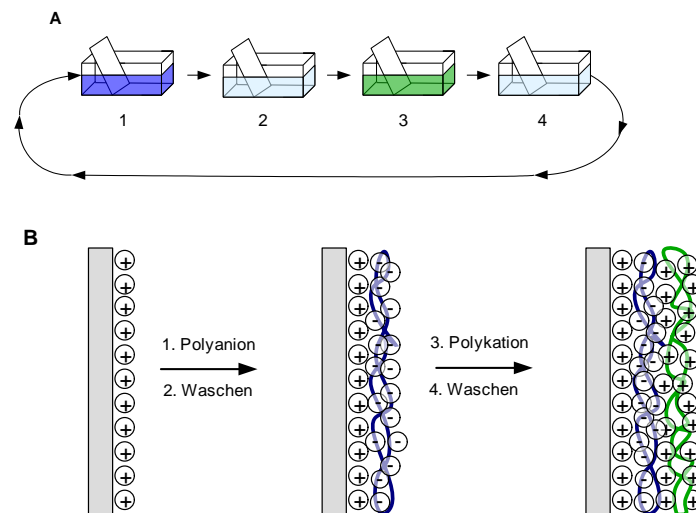


Abbildung 1: Prinzip und Durchführung der Layer-by-Layer (LbL) Technologie

Durch Eintauchen einer geladenen Oberfläche in eine Polyelektrolytlösung scheidet sich selbstlimitierend eine nanometerdicke Polymerschicht ab und lädt die Oberfläche um. Nach dem Waschen mit Wasser kann die nächste Schicht mit einem entgegengesetzt geladenen Polymer (Polyelektrolyt) aufgebracht werden. Dieser Prozess kann beliebig oft wiederholt werden.

Die Analytik der unbeschichteten und beschichteten Partikel erfolgte mittels Zetasizer (Zetapotential) und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).

DFI/W42 - Kultivierung von filamentösen Mikroorganismen

Die filamentösen Mikroorganismen wurden hauptsächlich in 50-500 ml Schüttelkolben mit und ohne Schikane kultiviert. Das Füllvolumen variierte, je nach Organismus und Protokoll, zwischen 10 bis 40%. Es wurden definierte Minimalmedien, Komplexmedien ohne feste Mediumbestandteile und Komplexmedien mit festen Mediumbestandteilen verwendet. Als Inokulum wurden Sporen, Biomasse aus Vorkulturen oder Biomasse von Agarplatten eingesetzt. Sporenkonzentrationen können mithilfe einer Zählkammer bestimmt werden. Kultivierungen im Schüttelkolben (25-30°C; 100-240 rpm) können bis zu 3 Wochen andauern. Es wurden in der Regel ein Mal täglich Proben für Produktkonzentrationsbestimmungen und Morphologieuntersuchungen entnommen oder Endpunktbestimmungen durchgeführt. Manche der filamentösen Mikroorganismen wurden ebenfalls im Mikrotiterplattenreader (Biolector) oder in Bioreaktoren kultiviert.

DFI/W42 - Produktanalytik

Die Produktanalytik erfolgte für die meisten Produkte (z.B. Erythromycin, Cephalosporin C) per HPLC-Analyse. Es wurden sowohl isokratische Methoden als auch Gradientenmethoden verwendet. Gegebenenfalls war eine Extraktion mit Ethyl- oder Butylacetat oder Butanol vor der HPLC-Analytik notwendig. Im Fall von Actinorhodin wurde die Zunahme an blauen Pigmenten im Kulturüberstand photometrisch bestimmt. Produktbildung konnte ebenfalls mithilfe von Hemmhoftestplatten überprüft werden.

DFI/W42 - Morphologieuntersuchungen

Morphologieuntersuchungen erfolgten in der Regel mikroskopisch. Wenn zu große Pellets entstanden, wurde dies fotografisch festgehalten. Änderungen in der Pelletgröße konnten über Bildanalyse mit ImageJ verdeutlicht werden.

DFI - Parallelferrmentation von *Saccharopolyspora erythraea* zur Erythromycin-Produktion

Die parallele Fermentation von *Saccharopolyspora erythraea* erfolgte im DasGip-Kultivierungssystem in Bioreaktoren mit 1300 mL Nennvolumen bei einem Füllvolumen von 400 mL. Die Vorkulturen wurden, entsprechend der vorhergehenden Versuche, im Schüttelkolben angezogen. Analog zur Kultivierung im Schüttelkolben betrug die Kultivierungstemperatur 28°C. Der eingestellte Soll-Wert an gelöstem Sauerstoff von 30% wurde von der Anlage durch Regulierung von Rührerdrehzahl und Luft-Begasung gehalten. Der pH-Wert wurde während der Kultivierung lediglich beobachtet und nicht durch Zugabe von Säuren oder Basen kontrolliert. Die Partikelkonzentration in den mit Partikeln versetzten Kulturen betrug, wie in den vorangegangenen Schüttelkolbenversuchen, 10 g/L. Die Analytik erfolgte über LC-MS/MS. Erythromycin A wurde ohne vorgeschaltete Chromatographiesäule mit einer „Multiple-Reaction-Monitoring“ (MRM-) Methode analysiert. Der MRM-Modus ermöglicht auch ohne den Faktor der Retentionszeit eine spezifische und eindeutige Identifizierung des Erythromycin A, da zum einen gezielt nach der Masse des Analyten gefiltert wird und zum anderen das charakteristische Fragmentierungsmuster des Moleküls betrachtet wird.

DFI - Analyse der Genexpression der Erythromycin-Synthese in *Saccharopolyspora erythraea*

Zur Untersuchung der Genexpression der Erythromycin-Synthese in *S. erythraea* in Gegenwart von Mikropartikeln wurden Proben während einer Fermentation im DASGIP-Kultivierungssystem gezogen und die RNA sofort mittels „RNAprotect Bacteria Reagent“ stabilisiert und bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss von *S. erythraea* erfolgte mittels zweier Auftau- und Einfrier-Zyklen in Kombination mit

einem Aufschluss in der Zelmühle. Die RNA wurde mittels „RNeasy Plant Mini Kit“ isoliert und DNA mittels DNase I verdaut. Die aufgereinigte RNA wurde mit „iScript cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben und diese in die qPCR eingesetzt. Hierzu wurde der „iQ SYBR Green Supermix“ verwendet und die Expression einzelner Gene mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode untersucht.

Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse orientiert sich an geplanten Arbeitspaketen des Antrages. Da in den Arbeiten bei den Projektpartner DFI und W42 Partikel eingesetzt werden, die von dem Partner Surflay hergestellt werden, wurden diesen an den Anfang des Berichtes gestellt.

Surflay – 1: Partikelscreening

Für die Auswahl der Basis-Partikel, an denen der MPEC-Effekt näher untersucht werden soll, wurden 16 verschiedene Partikel (Tabelle 1) hinsichtlich ihrer Eigenschaften (pH-Verhalten, Größenverteilung, Oberflächenladung, Porosität) charakterisiert. Da in Vorarbeiten je nach Art der Partikel positive wie auch negative Effekte auf das Wachstum und die Produktion von Primärmetaboliten in *Aspergillus* -und *Trichoderma*-Kulturen festgestellt wurden, wurde systematisch untersucht, ob zwischen den Eigenschaften der Partikel und der Wirkung ein Zusammenhang besteht. Dazu wurden die Basis-Partikel hinsichtlich Zetapotential, pH-Wert, Größenverteilung, Porosität und Aggregationsverhalten untersucht.

Tabelle 1: Übersicht über die für die Voruntersuchung getesteten Partikel

●-stark positiver ●-leicht positiver, ●-kein, ●-negativer MPEC-Effekt, ●-kein Wachstum

Probe	Substanz	MPEC <i>Aspergillus niger</i>	MPEC <i>Trichoderma atroviridae</i>	Bemerkungen
1	Calciumsilikat	●	●	Antipilzbaustoff, alkalisch
2	Florisil	●	●	Vorw. sehr große Partikel > 500 µm
3	Cellulose Vivapur MCG 591 PCG	●	●	Höchstes Zetapotential -45 mV
4	Aluminiumoxid	●	●	Vorw. große Partikel > 70 µm
5	Cellulose Arbocel UFC M8	●	●	Geringstes Zetapotential -12,3 mV
6	Eisen(II,III)oxid	●	●	Wenig porös, feines Material, aber auch gr. Aggregate
7	Eisen(III)oxid	●	●	Wenig porös, feines Material, aber auch gr. Aggregate
8	Talk 40 µm	●	●	Keine 40 µm Partikel, eher 70-100 µm und < 1 µm
9	Titansilikat	●	●	pH-Verschiebung ins Saure
10	Cellulose Arbocel M80	●	●	Vorw. große Strukturen, oberflächlich sehr porös
11	Aluminiumtitanat	●	●	Enge Verteilung, sehr dichtes Material
12	Kaolin	●	●	Größtenteils sehr feines Material < 1µm
13	Silica	●	●	Porösestes Material
14	Nanoclay	●	●	Alkalisch, sehr porös
15	Talk 10 µm	●	●	Enge Partikelgrößenverteilung, sehr porös
16	Aluminiumsilikat	●	●	Enge Partikelgrößenverteilung, wenig porös

Sowohl aus dem pH-Verhalten, als auch der Porosität konnten keine eindeutigen Rückschlüsse getroffen werden. Ein basischer pH >9 war in den meisten Fällen negativ, im Fall von Nanoclay aber positiv. Hier könnte eine etwaige negative Wirkung eventuell auch durch andere sehr positive Eigenschaften kompensiert und damit kaschiert werden. Leicht saures pH-Verhalten sorgte in keinem Fall für eine Verschlechterung. Eine Differenzierung beim Zetapotential war dadurch erschwert, dass sich alle Proben im Bereich von -12 bis -45 mV befanden und damit der Bereich von positiven bis ungeladenen Oberflächen nicht betrachtet werden konnte. Für Porositätsuntersuchungen wurden die oberflächlich durchgängig leicht bis stark negativ geladenen Partikel mit einem positiv geladenen Fluoreszenz-gelabelten Polykation (Polyallylamin, MW 40.000, Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B) beschichtet und über Konfokale Laser Scanning Mikroskopie die Porosität bewertet. Auch hier fällt eine Einordnung anhand der Partikel schwer, da sowohl stark poröse (Abbildung 2B), als auch weniger stark poröse Partikel (Abbildung 2C) deutlich positive Einflüsse auf beide Pilzarten aufzeigen. Ebenso verhält es sich mit den Partikeln die negativen Einfluss auf die Produktivität besitzen (Abbildung 2A).

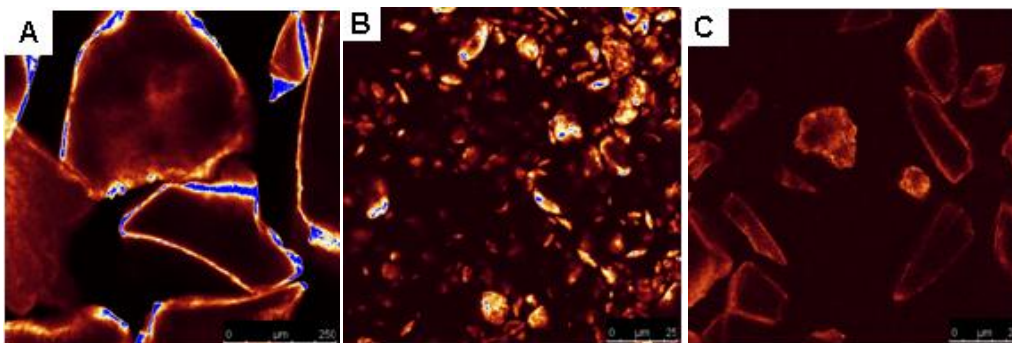


Abbildung 2: CLSM-Aufnahmen ausgewählter Partikel mit Rhodamin B gelabeltem PAH beschichtet (A) Florisil, (B) Talk $10\ \mu\text{m}$ und (C) Aluminiumsilikat - Bildbreite entspricht $733\ \mu\text{m}$ (A) sowie $117\ \mu\text{m}$ (B) und (C).

Anhand der Größenverteilung konnte ein tendenzieller Zusammenhang zwischen MPEC-Effekt und den getesteten Partikeln festgestellt werden. Eine enge Größenverteilung bei einem Durchmesser $< 80\ \mu\text{m}$ war durchweg positiv, während breite Verteilungen bei Partikelgrößen $>120\ \mu\text{m}$ sich eher negativ oder kaum merkbar auf die Produktivität auswirkten. Für die weiteren Beschichtungsversuche wurde Probe 15 ausgewählt, da diese im Vergleich zur Probe 14 (viele Nanopartikel) und 16 (schwächeres Zetapotential) eine bessere Beschichtbarkeit zeigt.

Surflay – 2: Optimierung der Partikeleigenschaften wie Porosität, Größe und Form

Für weiterführende Ergebnisse hinsichtlich des Größenparameters wurden Partikel verschiedener Größe und Porosität an die Projektpartner verschickt (

Tabelle 2). Als Material wurde Siliziumdioxid aufgrund der Inertheit und der Verfügbarkeit der Materialien ausgewählt.

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen eingesetzte SiO₂-Template

Probe	Template	Größe [µm]	Porosität	#cat.
SiliCycle L60	SiO ₂	120-200	porös	R10060B
SiliCycle B150		250-500	porös	R10072H
SiliCycle PB100-45		45	100 nm Poren	S10030T
SiliCycle PB30-10		10	30 nm Poren	S10007M
Fuso SP-01B		1	nicht porös	AN-2716
Fuso SP-04B		4-8	nicht porös	MS-9602

Surflay – 3: Beschichten der ausgewählten Partikel mit Polyelektrolytschichten

Für die erste Herstellungsrunde wurden zehn verschiedene Layer-by-Layer-Beschichtungen mit Dicken von wenigen Nanometern (Tabelle 3) auf dem Talk-Template (Probe 15, Tabelle 1) aufgebracht, welches laut Literaturrecherche und Untersuchungen des DFI bei vielen Mikroorganismen einen MPEC-Effekt hervorruft. An diesen Partikeln sollten die Einflüsse der Oberflächen-Funktionalität wie Zetapotential, biokompatible Oberfläche und Hydrophobizität anhand einer Partikelsorte mit gleichbleibender Größenverteilung untersucht werden. Biokompatible Polymere wie Alginat sind biologisch gut abbaubar und stellen keine synthetischen Polymere wie Polyallylamin dar, während bioaktive Polymere wie Polydopamin vielfältige Wechselwirkungen mit Organismen ermöglichen.

Tabelle 3: Übersicht über die Beschichtungen der Talkum-Partikel und Beschreibung der Eigenschaften

Name	Material	Eigenschaften	Zetapotential [mV]
Talk	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	10 µm (Sigma-Aldrich) - unbeschichtet	-35,1 ± 1,3
02.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PAH/PSS) ₃ , negatives Zetapotential, etwas hydrophob, synthetische Polymere	-54,8 ± 1,2
03.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PAH/PSS) ₂ PAH/Nafion, negatives Zetapotential, stärker hydrophob	-1,9 ± 2,5 <i>Schlechte Mobilität</i>
04.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PAH/PSS) ₂ PAH/PMAA, negatives Zetapotential, etwas hydrophiler	-52,8 ± 0,9
05.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PAH/PSS) ₂ PAH/PAA, negatives Zetapotential, hydrophil	-53,2 ± 3,0
06.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PAH/PSS) ₂ PAH, positives Zetapotential	+32,9 ± 3,3
07.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(Chit/Alg) ₃ , schwaches negatives Zetapotential, biokompatibel	-54,5 ± 1,3 (bei pH 5,6) -56,6 ± 2,7 (bei pH 7)
08.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(Chit/Alg) ₂ Chit, positives Zetapotential bei pH<6.3, pH> 6.3 zunehmend hydrophob, biokompatibel	+31,7 ± 0,2 (bei pH 5.6) -0,3 ± 1,0 (bei pH 7)
09.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	(PDA/Carr) ₃ , negatives Zetapotential, teils biokompatibel	-54,7 ± 1,7
10.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	PDop negatives Zetapotential, hohe Bioaktivität	-45,9 ± 3,3 (bei pH 5,6) -59,0 ± 4,3 (bei pH 7)
11.06	3MgO 4SiO ₂ H ₂ O, Talk	PAH/PVA, sterische Stabilisierung, hydrophil, Zetapotential 0 mV	+3,8 ± 0,7 <i>Schlechte Mobilität</i>

Eine schlechte Mobilität ist auf die Wanderung der Partikel im elektrischen Feld bezogen.

Um etwaige Auswirkungen der Sterilisation auf die LbL-Schichten zu erfassen, wurden die beim DFI in MilliQ-H₂O autoklavierten Proben (20 min bei 121 °C) erneut hinsichtlich der Zetapotentiale vermessen und mit Rückstellproben und den ursprünglichen Werten verglichen.

Tabelle 4: Übersicht über die Änderungen des jeweiligen Zetapotentials durch den Autoklavierprozess

Probe	Beschichtung	Zetapotential vor Autoklavieren [mV]	Zetapotential nach Autoklavieren [mV]	Rückstellprobe [mV]
Talk	/	-35,1 ± 1,3 (pH 7,0)	-57,6 ± 5,1 [3x]	-42,1 ± 1,6
02.06	(PAH/PSS) ₃	-54,8 ± 1,2 (pH 7,0)	-70,5 ± 0,6 [3x]	-52,6 ± 1,4
03.06	(PAH/PSS) ₂ PAH/Nafion	-1,9 ± 2,5 (pH 7,0)	-26,8 ± 8,3	-20,9 ± 4,5
04.06	(PAH/PSS) ₂ PAH/PMAA	-52,8 ± 0,9 (pH 7,0)	-64,9 ± 2,5 [3x]	-49,5 ± 2,1
05.06	(PAH/PSS) ₂ PAH/PAA	-53,2 ± 3,0 (pH 7,0)	-61,0 ± 4,9 [3x]	-51,0 ± 0,7
06.06	(PAH/PSS) ₂ PAH	+32,9 ± 3,3 (pH 7,0)	-13,5 ± 6,8	+37,7 ± 2,8
07.06	(Chit/Alg) ₃	-54,5 ± 1,3 (pH 5,6) -56,6 ± 2,7 (pH 7,0)	-43,3 ± 2,4 (pH 7,0)	-55,5 ± 0,5 (pH 7,0)
08.06	(Chit/Alg) ₂ Chit	+31,7 ± 0,2 (pH 5,6) -0,3 ± 1,0 (pH 7,0)	-38,6 ± 3,4 (pH 7,0)	-0,2 ± 1,9 (pH 7,0)
09.06	(PDA/Carr) ₃	-54,7 ± 1,7 (pH 7,0)	-55,8 ± 1,7	-54,7 ± 1,0
10.06	PDop	-45,9 ± 3,3 (pH 5,6) -59,0 ± 4,3 (pH 7,0)	-54,2 ± 2,8	-56,3 ± 3,4
11.06	PAH/PVA	+3,8 ± 0,7 (pH 7,0)	-28,3 ± 2,4	+8,0 ± 0,4

Neun von elf Proben besitzen nach dem Autoklavieren ein deutlich verändertes Zetapotential (> ± 10 mV), wobei eine Probe auch bei der Rückstellprobe diese Veränderung zeigt (03.06). Die meisten Zetapotentiale veränderten sich in den negativen Bereich, mit einer Ausnahme (07.06). Selbst die unbehandelte Talk-Probe zeigt verändertes Zetapotential, gegenüber den nicht autoklavierten Proben. Es ist davon auszugehen, dass sich beim Autoklavieren die PE-Schichten umorientiert haben. Derartige Annealingsprozesse bei höherer Temperatur sind aus der Literatur bekannt. Daher kann man nicht mehr in jedem Fall von einer definierten Außenschicht sprechen. Für die Probe (06.06) wurde deshalb eine neue Probe (PZD003) hergestellt, die auch nach dem Autoklavieren ein positives Zetapotential besitzen sollte. Hierfür wurde der Autoklavivorgang in den Beschichtungsprozess integriert, indem die letzte Außenschicht für 60 min bei 110 °C aufgebracht wurde. Ein anschließend durchgeführter weiterer Autoklavivorgang bei gleichen Parametern in MilliQ-H₂O bestätigte die Stabilität der Außenschicht (

Tabelle 5). Die neue Variante der Probe 06.06 (PZD003) zeigte nach dem Autoklavierprozess in Beschichtungslösung gesteigerte positive mV-Werte und blieb auch bei weiterem Sterilisieren stabil. Diese Methode wird bei zukünftigen Herstellungsprozessen eingesetzt.

Tabelle 5: Vergleich neue und alte Beschichtung (PAH/PSS)₂PAH.

Messung	06.06 (PAH/PSS) ₂ PAH	PZD003 (PAH/PSS) ₂ PAH	Messung
vor Autoklavieren	+32,9 ± 3,3	+33,5 ± 2,4	vor Autoklavieren
nach Autoklavieren (20 min 121 °C)	-13,5 ± 6,8	+42,5 ± 1,9	nach Autoklavieren in PAH (60 min 110 °C)
2. Autoklavieren	/	+47,4 ± 0,9	2. Autoklavieren in MilliQ (60 min 110°C)

Surflay – 4 Beschichten der ausgewählten Partikel mit Variationen der vielversprechendsten LbL-Kombination

Für die zweite Herstellungsrunde wurden zwei Polyelektrolytkombinationen der ersten Herstellungsrunde ausgewählt und diesmal in der Anzahl ihrer Doppelschichten variiert, um deren potentiellen Einfluss zu erfassen. Es handelt sich hierbei um die Beschichtungskombinationen 02.06 und eine leicht geänderte Variante von 04.06 aus (Tabelle 3), die positive Effekte sowohl bei *Lechevalieria aerocolonigenes* als auch *Streptomyces coelicolor* zeigten (vgl. Tabelle 9 A). Weiterhin wurden 0,25-0,5 mm große Glaskugeln die unbeschichtet einen positiven Effekt auf *Lechevalieria aerocolonigenes* zeigten (vgl. Tabelle 9B). ebenfalls mit der 02.06 Beschichtung für weitere Untersuchungen ausgestattet.

Tabelle 6: Zweite Herstellungsrunde von beschichteten Talkpartikeln und Glasperlen

Probe	Template	Beschichtung
PZD004_1	Talk 10 µm Sigma –Aldrich #243604	(PAH/PSS) ₁
PZD004_2		(PAH/PSS) ₃
PZD004_3		(PAH/PSS) ₅
PZD004_4		(PAH/PMAA) ₁
PZD004_5		(PAH/PMAA) ₃
PZD004_6		(PAH/PMAA) ₅
PZD004_7	Glasperlen	(PAH/PSS) ₃
PZD004_8	0,25-0,5 mm	(PAH/PSS) ₅
PZD004_9	Roth #A553.1	(PAH/PSS) ₇

Für die dritte Herstellungsrunde wurden die Beschichtungskombinationen 07.06 und 08.06, sowie Variationen davon präpariert (

Tabelle 7), da diese positive Effekte bei der Kultivierung von *Amycolatopsis mediterranei* zeigten (vgl. Abbildung 24A).

Tabelle 7: Dritte Herstellungsrunde von beschichteten Talkpartikeln

Probe	Template	Beschichtung
PZD008_1	Talk 10 µm Sigma –Aldrich #243604	Chit/Alg
PZD008_2		(Chit/Alg) ₂
PZD008_3		(Chit/Alg) ₃
PZD008_4		(Chit/Alg)/Chit

Surflay – 5 Adsorption und Desorption von Rifamycin an LbL-beschichtete Silika-Partikel

Adsorption

Zur Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit von Rifamycin an Partikel zur Abtrennung des Wirkstoffs aus den Kulturmedien wurden verschiedene Beschichtungen auf 10 µm Silika-Partikel mit 30 nm Poren hergestellt (Tabelle 8) und mit dem kommerziell erhältlichem Rifamycin SV als Modellmolekül getestet. Darauf aufbauend sollten dann Rückschlüsse zur Adsorption von Rifamycin W geschlossen werden.

Tabelle 8: Beschichtete Silika-Partikel zur Adsorption von Rifamycin

Probe	Template	Beschichtungen
PZD006_1	Silika PB-30-10 Silicycle #S10007M	PAH
PZD006_2a		PEI/PSS/PEI
PZD006_2b		PEI/PMAA/PEI
PZD006_3a		PVBTMAC/PSS/PVBTMAC
PZD006_3b		PVBTMAC/PMMA/PVBTMAC
PZD006_4		unbeschichtet

PEI/PSS/PEI, keine signifikante Verbesserung gegenüber einer Monoschicht bietet (Abbildung 3 und Abbildung 4)

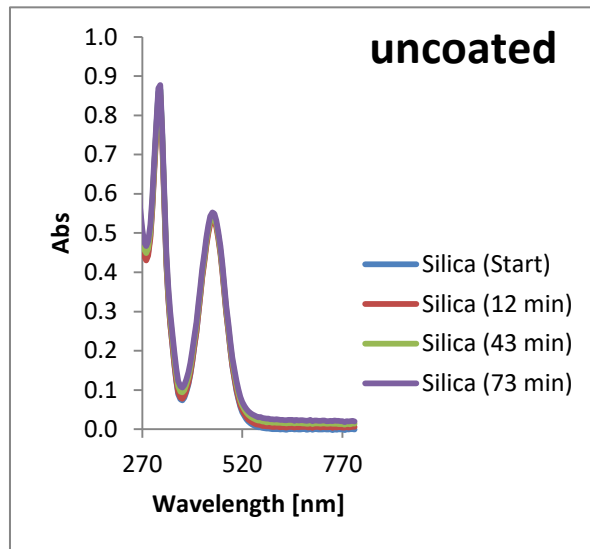
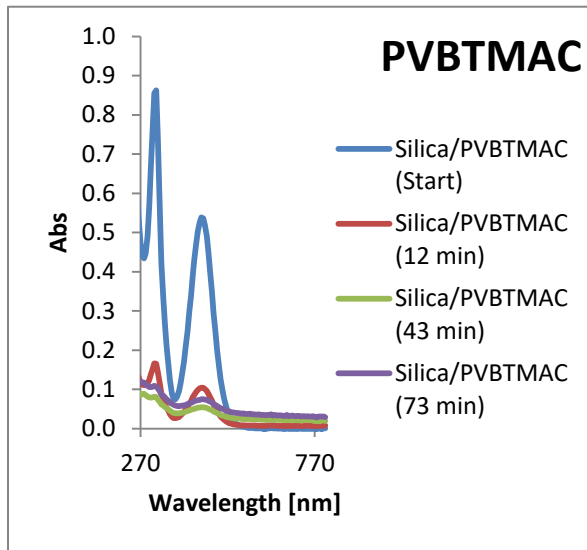


Abbildung 3: Rifamycinspektren nach Inkubation mit PVBTMAC-beschichteten (links) und unbeschichteten porösen Silika-Partikeln

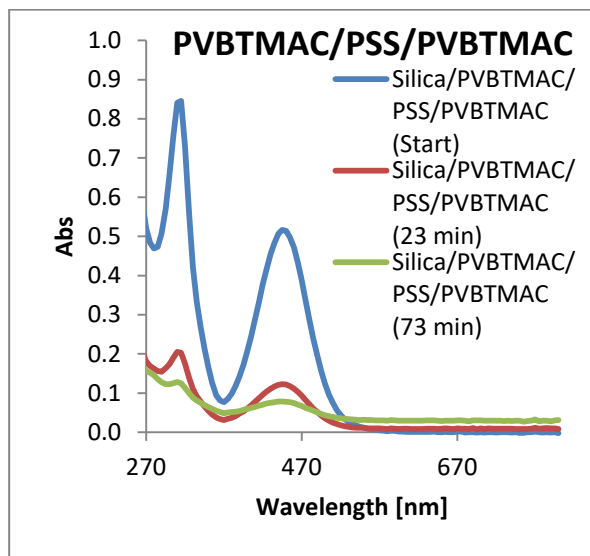
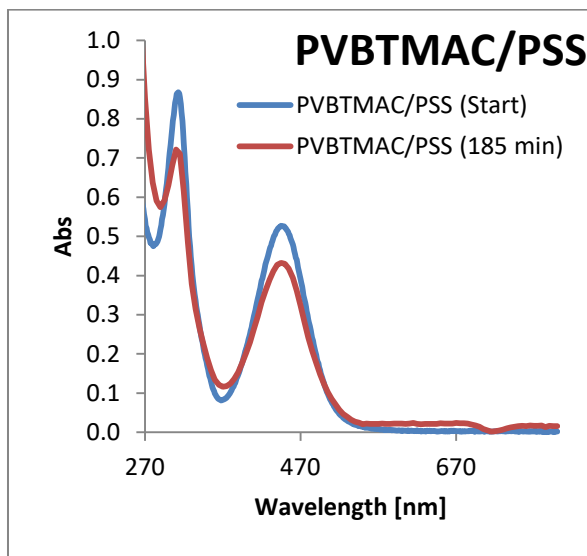


Abbildung 4: Rifamycinspektren nach Inkubation mit porösen Silika-Partikeln mit Zweischichtsystem mit negativer Außenladung (links) und Dreischichtsystem mit positiver Außenladung (rechts)

Desorption

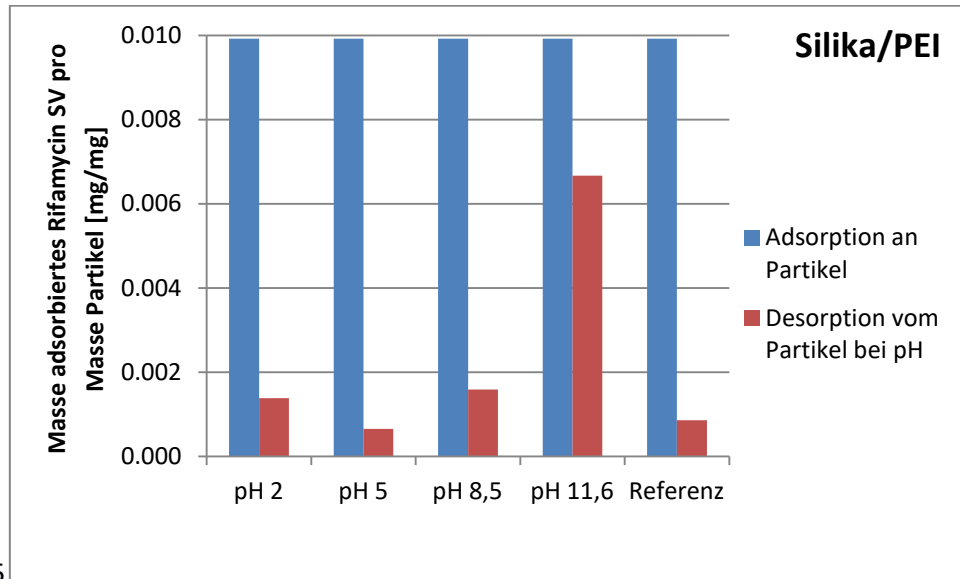


Abbildung 5

Abbildung 5: Adsorbiertes Rifamycin SV gegenüber desorbiertes Rifamycin SV von PEI-beschichteten porösen Silika-Partikeln bei bestimmten pH-Werten

Surflay - 6 Adsorption und Desorption von Rifamycin W

Zur Untersuchung der Sorption von Rifamycin W wurde entsprechendes Kulturmedium des Partners W42 verwendet. Dabei zeigte sich, dass auch nach Aufreinigung durch Zentrifugation und Filtration des Mediums, kein klares Absorptionsspektrum aufgenommen werden konnte und damit keine eindeutige Identifikation des Rifamycin W bei Surflay möglich war. Der Reinstoff selbst ist zudem nicht kommerziell verfügbar. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass PEI bzw. PVBTMAC-beschichtete poröse Silika-Partikel nach Inkubation mit dem zentrifugierten und filtrierten Kulturmedium mit Substanzen beladen werden, da eine deutliche Farbänderung ins Braune auftrat. Diese konnten auch durch pH-Änderung ins basische zum Teil wieder freigesetzt werden. Zusätzlich wurden bei Surflay entwickelte Polyvinylpyrrolidon-Partikel mit dem Kulturmedium inkubiert, wobei sich eine noch stärkere Beladung mit Material aus dem Kulturmedium zeigte (Abbildung 6). Sowohl die Polyelektrolytbeschichteten Silika-Partikel, als auch die Polyvinylpyrrolidon-Partikel wurden den Projektpartnern für genauere Untersuchungen der Sorptionseigenschaften hinsichtlich der relevanten Wirkstoffe zur Verfügung gestellt (siehe W42-4).

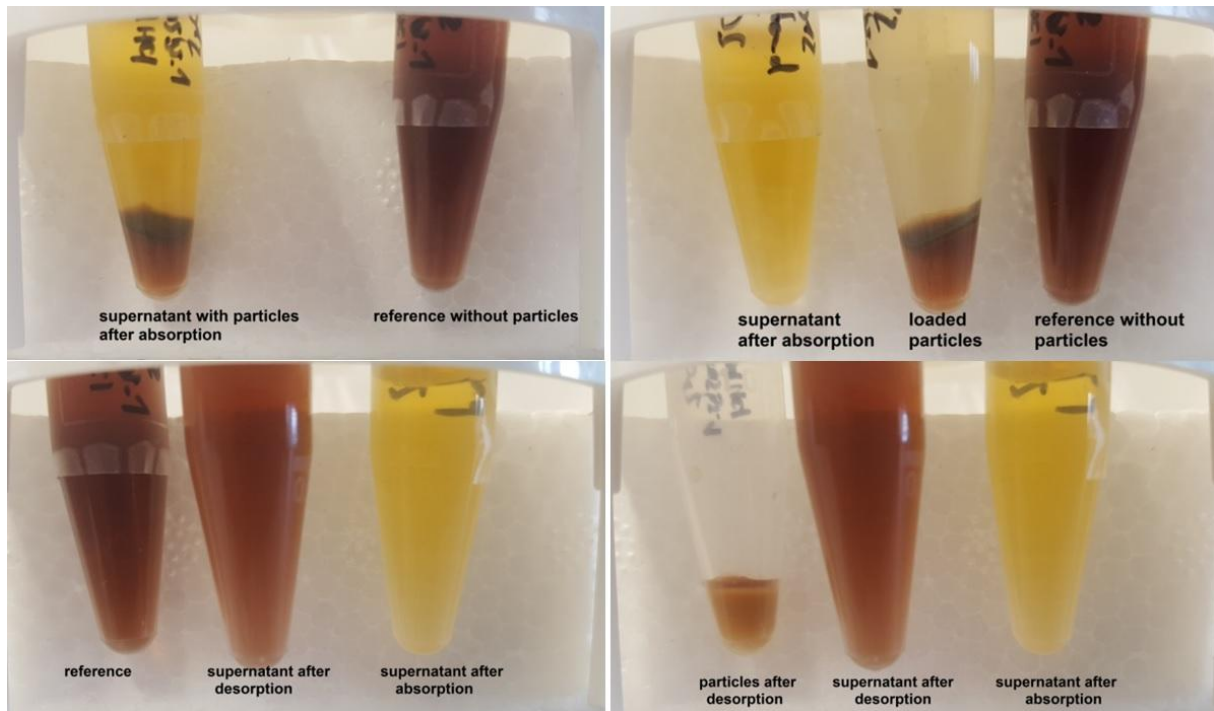


Abbildung 6: Polyvinylpyrrolidonpartikel mit adsorbiertem Material aus der Rifamycin W Kulturbrühe (oben links), vom Adsorptionsüberstand abgetrennte Partikel (oben rechts), nach der Desorption über pH-Änderung (unten links) und vom Desorptionsüberstand getrennte Partikel (unten rechts)

DFI – 1: Selektion auf positiv wirkende Partikelgrundtypen an Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten

Für die Untersuchungen der Partikelgrundtypen auf Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten wurden aufgrund einer Literaturstudie Talk und Siliciumdioxid sowie Glaskugeln als Startmaterial für die Versuche ausgewählt. Der positive Einfluss von Talkpartikeln auf filamentöse Pilze wurde in mehreren Publikationen beschrieben (5-8). Die Untersuchungen wurden mit sechs Organismen, die verschiedene Antibiotika bzw. Sekundärmetabolite produzieren, durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Einflüsse der Partikel auf einige filamentöse Bakterien gezeigt. Die Versuche mit *Lechevalieria aerocolonigenes* wurden in Kooperation mit der AG Krull am Institut für Bioverfahrenstechnik, TU Braunschweig, durchgeführt. Neben *Streptomyces viridochromogenes* wurden ebenfalls die Stämme *Streptomyces pristinaespiralis* und *Streptomyces ghanaensis* bei der AG Wohlleben, Uni Tübingen, untersucht. Da in diesem Fall die Effekte auf die Morphologie weniger ausgeprägt waren, wurden diese Mikroorganismen in der Tabelle nicht aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über den Einfluss von Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften auf die Produktbildung (• = positiv, ◦ = negativ) oder Morphologie (*) verschiedener filamentös-wachsender Bakterien. A) Einfluss von Talkpartikeln mit modifizierten Oberflächen. B) Einfluss von Glaskugeln verschiedener Größe und Partikeln aus Siliziumdioxid. Die Farbintensität der Kästen sowie einfache und doppelte +/- -Zeichen zeigen die Stärke des Einflusses an, bei 0 konnte kein Einfluss festgestellt werden. P→p steht für Pelletverkleinerung, *Ergebnisse müssen wegen einzeln auftretenden Abweichungen in unabhängigen Experimenten noch einmal wiederholt werden.

A)	Talk, unbehandelt, 10 µm	02.06. (PAH/PSS) ₃ , 10µm	03.06. (PAH/PSS) ₂ PAH/Nafion, 10µm	04.06. (PAH/PSS) ₂ PAH/PMAA, 10µm	05.06. (PAH/PSS) ₂ PAH/PAA, 10µm	06.06. (PAH/PSS) ₂ PAH, 10µm	07.06. (Chit/Alg) ₃ , 10µm	08.06. (Chit/Alg) ₂ Chit, 10µm	09.06. (PDA/Carr) ₃ , 10µm	10.06. PDop, 10µm	11.06. PAH/PVA, 10µm
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> (Rebeccamycin)	+	++	-	++	+ (+)	-	+	+	++	-	+
<i>Streptomyces coelicolor</i> (Actinorhodin/blau Pigmente)	-	++	+	++	++	0	- (0)	-	- (0)		--
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (Erythromycin A)	0	0/+	0	0	0	0/+	++	+	+	0/+	0/+
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> * (Rifamycin W)	0	++	++	-	-	+	+	+	+	++	0
<i>Streptomyces geldanamycininus</i> (Geldanamycin)	P → p										
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Phosphinothricintripeptid)	P → p										

B)	Glaskugel 5 (4,7-5,3 mm)	Glaskugel 3 (2,85-3,45 mm)	Glaskugel 2 (1,7-2,1 mm)	Glaskugel 1 (0,75-1,0 mm)	Glaskugel 0,5 (0,25-0,5 mm)	PB100-45 (SiO ₂ , 45 µm, 100 nm Porengröße)	PB30-10 (SiO ₂ , 10 µm, 30 nm Porengröße)	SP-04B (SiO ₂ , 4-8 µm)	SP-01B (SiO ₂ , 1 µm)	L60 SiO ₂ , 120-200 µm
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> (Rebeccamycin)	--	--	-	0	+++					
<i>Streptomyces coelicolor</i> (Actinorhodin/blau Pigmente)	+ (+)	- (0)	+	+	+	+	+	+	+	+

Es konnten für verschiedene Mikroorganismen klare positive Effekte des Partikelzusatzes auf die Produktivität festgestellt werden. Auf diese Effekte wird im Folgenden näher eingegangen (siehe auch W42-1).

Lechevalieria aerocolonigenes – Rebeccamycinproduktion und Morphologie-Veränderungen

Rebeccamycin ist ein schwacher Topoisomerase I – Inhibitor, der antitumorale Eigenschaften besitzt. Die Kultivierung von *L. aerocolonigenes* zur Produktion dieses Wirkstoffes wurde als Dreifachbestimmung in 250 ml-Schikanekolben mit 50 ml Füllvolumen durchgeführt. Es wurde mit einer 3 Tage alten Vorkultur angeimpft und 8 Tage im Dunkeln bei 120 rpm und 28°C kultiviert. Die Pelletgrößenverteilung wurde durch Bildanalyse mithilfe des Computerprogramms ImageJ und die Produktkonzentration nach einer Ethylacetatextraktion mithilfe einer HPLC-Analytik bestimmt. Eingesetzt wurden die Partikel, die von Surflay hergestellt wurden (Tabelle 3) bzw. unmodifizierte Glaspartikel, um den Effekt der Größenverteilung näher zu untersuchen.

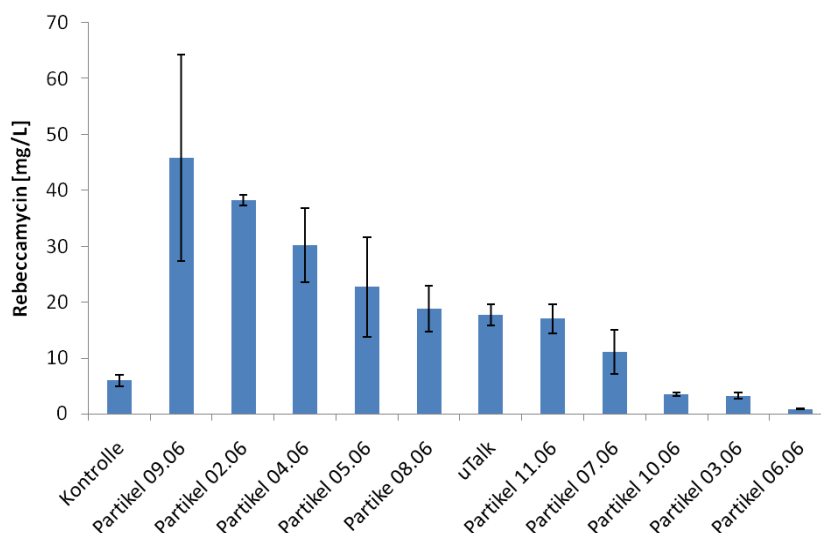


Abbildung 7: Rebeccamycinkonzentrationen nach 8 Tagen Kultivierung ohne Partikel, mit unbehandeltem Talk (uTalk) und Talkpartikeln mit modifizierter Oberfläche (Partikel 02.06-11.06, siehe auch Tabelle 3).

Abbildung 7 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen der Talkpartikel auf die Rebeccamycinproduktion. Den größten Effekt hinsichtlich der Produktbildung trat bei den Partikeln 09.06, 02.06, und 04.06 auf. Hier konnten ca. 5- bis 8-fache Steigerung der Produktivität erzielt werden. Mit unbehandeltem Talk wurde eine ca. 3-fache Produktsteigerung nachgewiesen. Die Partikel 08.06, 11.06, 07.06 hatten einen ähnlichen Einfluss auf die Produktbildung wie der unbehandelte Talk. Kein oder ein negativer Einfluss wurde bei den Partikeln 10.06, 03.06 und 06.06 festgestellt. Generell führte die Zugabe von Talkpartikeln zu einer Verengung der Pelletgrößenverteilung, jedoch konnten sowohl eine Pelletvergrößerung (02.06) als auch Pelletverkleinerungen (z.B. 05.06, 06.06) beobachtet werden. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt im Rahmen des AP DFI – 3.

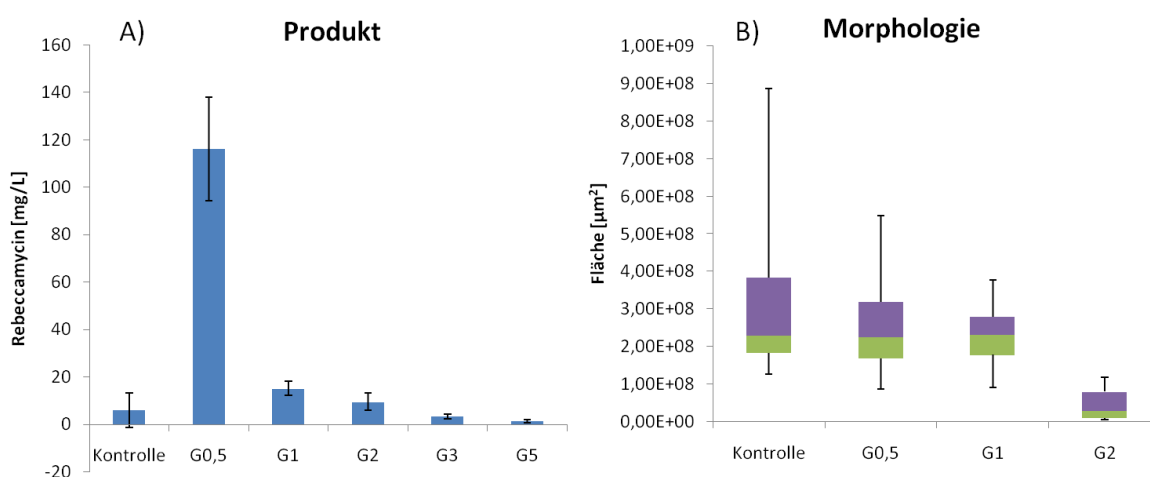


Abbildung 8: Rebeccamycinkonzentrationen (A) und die Veränderung der Pelletgrößenverteilung (B) nach 8 Tagen Kultivierung mit Glaskugeln von 0,5-5 mm im Durchmesser.

In der Boxplot-Darstellung entspricht die Box dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen, durch die Antennen werden Extremwerte berücksichtigt. • oberes Quartil, • unteres Quartil, dazwischen der Median.

Glasperlen von 0,5-5 mm Durchmesser (G0,5 - G5) wurden ausgewählt, um bei gleichbleibendem Material und gleichbleibender Form den Partikeleffekt zu untersuchen. Bei *Streptomyces coelicolor* wurde eine deutliche Verkleinerungen der Pelletgröße bei Zugabe von Glasperlen > 2mm beobachtet (9), bei *Streptomyces geldanamycininus* hatten 0,5 mm-Glasperlen einen positiven Einfluss (10). Abbildung 8 zeigt den Einfluss der Glasperlen auf *L. aerocolonigenes* und Produktion an Rebeccamycin. Durch die Zugabe von 4 g Glasperlen/Kolben mit 0,25-0,5 mm im Durchmesser (G0,5) wurde eine ca. 20-fache Steigerung der Rebeccamycinkonzentration erreicht. Der Einfluss der anderen Glaskugelgrößen auf die Produktbildung war gering bis negativ (Abbildung 8A). Interessant war der Einfluss der Glaskugeln auf die Morphologie. In dem Versuch in Abbildung 8B führte die Zugabe von Glaskugeln mit 0,5-2 mm Durchmesser (G0,5-G2) zu einer Verengung der Pelletgrößenverteilung. Dabei blieb der Median der Pelletgrößen zwischen der Kontrolle ohne Partikel und G1 annähernd gleich. Ab G2 verfeinerte sich die Morphologie deutlich. In G2 waren die Pellets kleiner. G3 und G5 sind in Abbildung 8B nicht aufgeführt, da hier myzelartiges Wachstum auftrat. Myzelartiges Wachstum scheint einen negativen Effekt auf die Produktion von Rebeccamycin zu haben. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen jetzt die am Beispiel der modifizierten Talkpartikel positiv bewerteten funktionalen Beschichtungen auf die Glaspartikel übertragen werden, um eine weitere Steigerung des Partikeleffektes für die Rebeccamycin-Synthese zu ermöglichen.

***Streptomyces coelicolor* – Produktbildung und Morphologieveränderungen**

Die Kultivierungen von *Streptomyces coelicolor* zur Produktion des Antibiotikums Actinorhodin wurden in einem Komplexmedium durchgeführt. Das Actinorhodin wurde 1947 als erster Vertreter der Benzoisochromanchinone aus *Streptomyces coelicolor* isoliert und ist antimikrobiell und antiviral wirksam. Dieser Organismus kann weiterhin als Plattformorganismus angesehen werden, da verschiedene Antibiotika mit dem Organismus produziert werden können. Abbildung 9 zeigt den Einfluss der modifizierten Talkpartikel auf die Produktion der blauen pigmentierten Substanzen (Actinorhodin). Besonders zu Beginn der Produktbildung nach ca. 5 Tagen wirkte sich eine geeignete Oberflächenmodifikation positiv auf die Produktbildung aus. Zum Ende der Kultivierung nach ca. 12 Tagen wurden in allen Proben ähnliche Werte erreicht. Daraus lässt sich ableiten, dass die Produktivität durch den Zusatz der Partikel gesteigert werden kann, aber die Endkonzentrationen vergleichbar sind. Die Oberflächenmodifikationen der Partikel 02.06, 04.06 und 05.06 schienen einen besonders positiven Einfluss zu haben (Abbildung 9A). Negativ wirkende Partikel, mit denen weniger Produkt als in der Kontrolle ohne Partikel produziert wurde, sind in Abbildung 9B gezeigt. Die Zugabe der 11.06-Partikeln schien die Produktbildung sogar zu unterdrücken. Die nähere Diskussion der Ergebnisse erfolgt im Rahmen des AP DFI – 3.

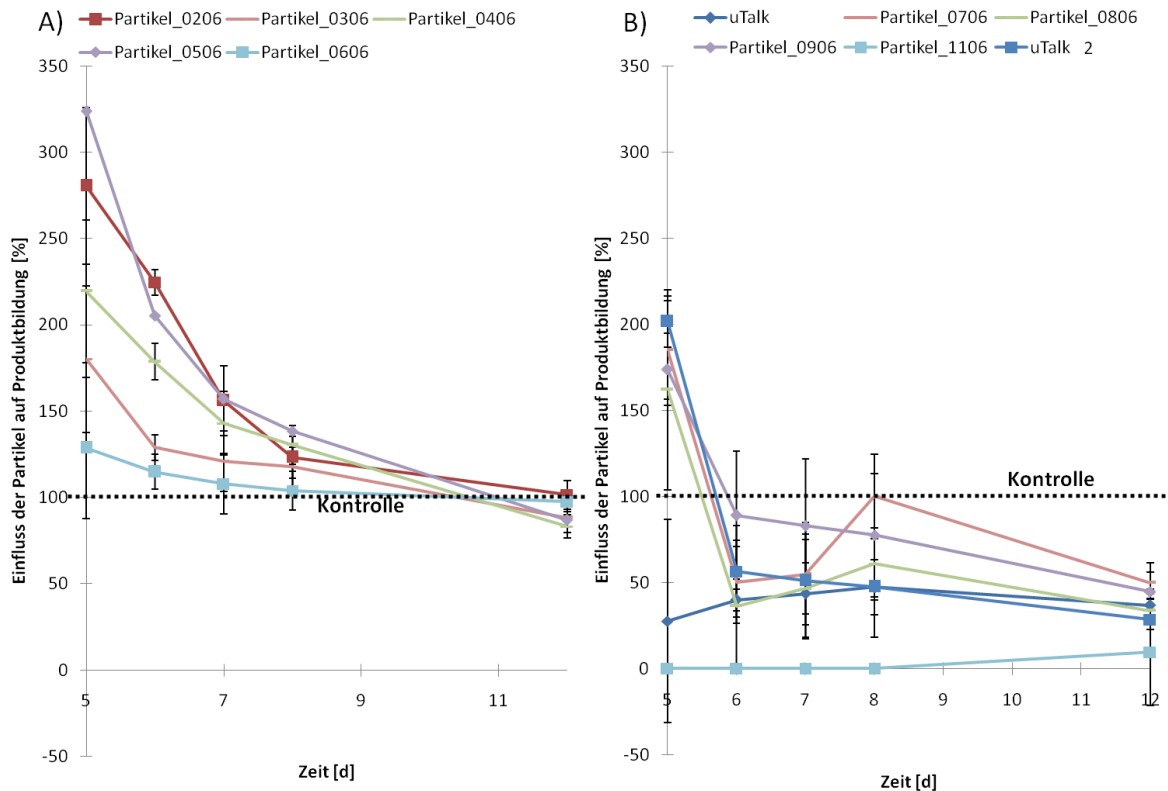


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Partikel auf die Produktion von Actinorhodin (blaue Pigmente).

Die Werte mit Partikeln wurden auf Werte der Kontrolle ohne Partikel normiert: A) Modifizierte Talk-Partikel (Partikel 02.06, 03.06, 04.06, 05.06 und 06.06) mit einem positiven Einfluss und B) Modifizierte Talk-Partikel (Partikel 07.06, 08.06, 09.06, 11.06 und unbehandelter Talk) mit einem negativen Einfluss auf die Produktbildung (erste Probenahme bei $t = 5$ d).

Es wurde ebenfalls der Einfluss von Glaspartikeln verschiedener Größe auf die Produktbildung in *S. coelicolor* untersucht (Abbildung 10). Es konnte in der Regel eine Verdopplung bis Verdreifachung der Produktmenge erreicht werden. Bei G3 und G5 fand kein Pelletwachstum mehr statt, wobei G3 kaum von der Kontrolle zu unterscheiden war und bei G5 vermutlich mechanische Beanspruchung zur Zellbeschädigung führte. Die Beobachtung, dass sich die Morphologie mit Glasperlen ab 3 mm Durchmesser verkleinert, wurde bereits von Sohoni et al. (2012) in Mikrotiterplattenexperimenten gemacht. Die gemessenen Produktmengen nach 7 Tagen für G1 und G2 (Abbildung 10A) liegen bei ca. 200%, ebenso wie die Produktmenge von G0,5 (Abbildung 10B). Partikel mit einem Durchmesser von 45 μm oder größer (PB100, L60 und G0,5) schienen einen geringfügig stärkeren Einfluss als kleinere Partikel zu haben (PB30, SP-01 und SP-04) (Abbildung 10B).

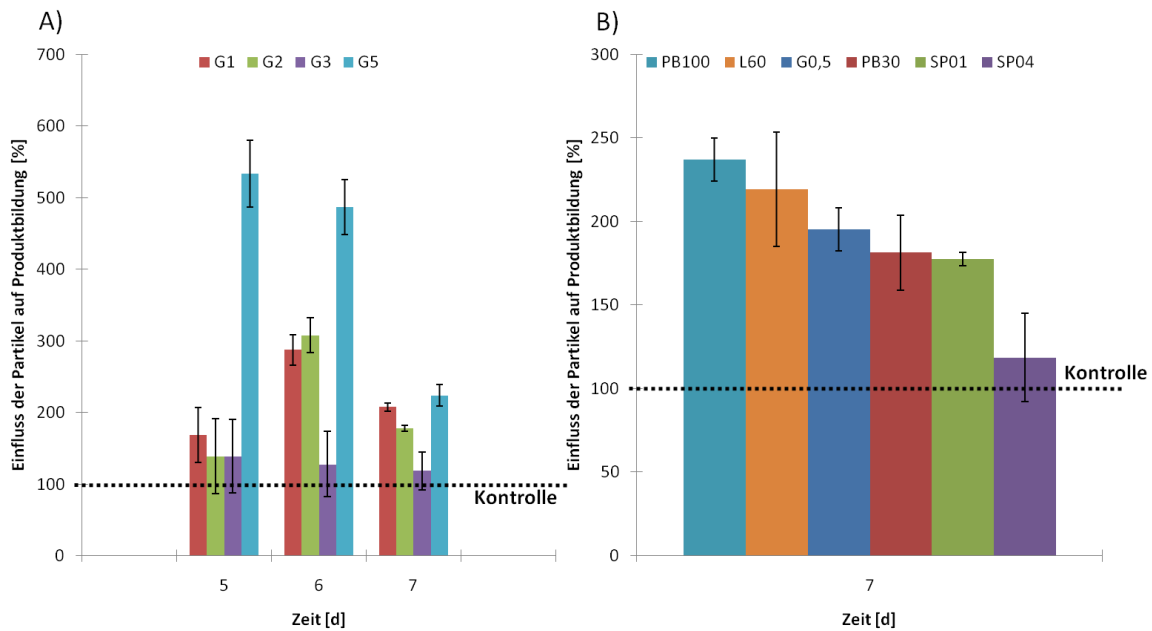


Abbildung 10: Einfluss von Glaskugeln (1 μm bis 5 mm) auf die Bildung von Actinorhodin/blauer Pigmente in *S. coelicolor*. Die Produktbildung in der Kontrolle ohne Partikelzugabe wurde 100% gesetzt. A) Produktbildung mit Glaskugeln von 1-5 mm im Durchmesser (G1-G5) nach 5-7 Tagen Kultivierung. B) Produktbildung mit den Glaspartikel PB100 (d = 45 μm , sphärisch), L60 (d = 120-200 μm , gebrochen), G0,5 (d = 250-500 μm , sphärisch), PB30 (d = 10 μm , sphärisch), SP-01 (d = 1 μm , sphärisch) und SP-04 (d = 4-8 μm , sphärisch) nach 7 Tagen Kultivierung.

DFI – 2: Selektion auf positiv wirkende Partikelgrundtypen an Antibiotika-produzierenden höheren Pilzen

Der Mikropartikeleffekt wurde ebenfalls auf die filamentösen Pilze *Acremonium chrysogenum*, *Penicillium chrysogenum* sowie *Aspergillus niger* getestet. Talkpartikel (10 μm) mit und ohne modifizierte Oberflächen hatten keinen Einfluss auf die Bildung von Cephalosporin C mit *A. chrysogenum* (Daten nicht gezeigt). Unbehandelte Talkpartikel, 0,5 mm-Glasperlen und Glaskohlenstoffpartikel wurden auf ihren Einfluss auf die Penicillin G-Produktion mit *Penicillium chrysogenum* getestet. Abbildung 11 zeigt, dass es keine morphologischen Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne Partikel und der Kultivierung mit 0,5 mm Glasperlen gab. Unbehandelte Talkpartikel hatten hingegen einen positiven Einfluss und führten zur Pelletverkleinerung und einer zwischenzeitlich erhöhten Biomassekonzentration.

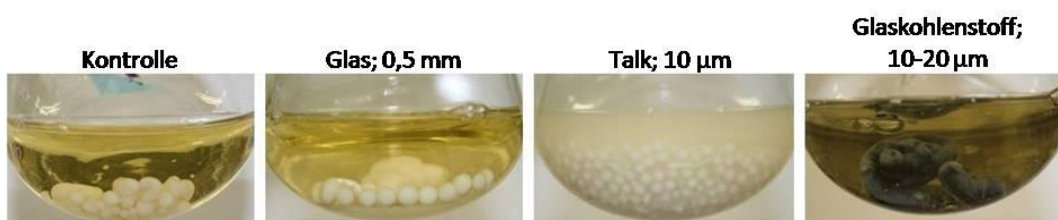


Abbildung 11: Morphologie von *P. chrysogenum* nach 3 Tagen Kultivierung mit und ohne Partikel.

Auf *A. niger* konnte der positive Einfluss von Talkpartikeln und weiteren Partikeln auf die Produktion von Aromakomponenten und Enzymen gezeigt werden. Weiterhin konnte in der AG Meyer der TU Berlin der Sekundärmetabolit Enniatin heterolog in einem *A. niger* – Stamm exprimiert werden (11). Da das DFI schon seit vielen Jahren mit der AG Meyer kooperiert und der Partikeleffekt bei diesem Organismus bisher am besten untersucht ist (3, 5, 11, 12), wurden Untersuchungen zur gezielten Beeinflussung von *A. niger* mittels MPEC weiter adressiert. Dazu wurden u.a. Glaskohlenstoff-Partikel (10-20 µm, sphärisch) eingesetzt und eine verbesserte Produktivität von Primärmetaboliten gezeigt.

DFI – 3: Identifizierung wesentlicher Partikeleigenschaften

Bei den Versuchen mit den filamentösen Bakterien *L. aerocolonigenes* und *S. coelicolor* hatten insbesondere die Partikel 02.06, 04.06 und 05.06 einen positiven Einfluss auf die Produktivität. Bei diesen Partikeln ist das Grundgerüst gleich, aber sie unterscheiden sich in der äußeren Beschichtung. Sie sind leicht hydrophob bis hydrophil und haben ein negatives Zetapotential. Der Partikel 09.06 hatte nur bei *L. aerocolonigenes* einen positiven Einfluss. Die Eigenschaften dieses Partikels ähneln 04.06 und 05.06. Ein positives Zetapotential oder ein schwach negatives Zetapotential scheinen keinen positiven Effekt zu haben. Dies ist bei den Partikeln 06.06, 07.06, 08.06, 10.06 und 11.06 der Fall. Des Weiteren scheinen extreme Hydrophobizität bzw. Hydrophilie nachteilig zu sein. Die Versuche mit Glasperlen verschiedener Größe ergaben für *L. aerocolonigenes*, dass verwendete Partikel kleiner als 500 µm sein sollten. Bei *S. coelicolor* sollten sie kleiner als 2 mm und größer als 10 µm sein.

DFI – 4: Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Partikeleffekt

Die gewählten Kultivierungsbedingungen haben einen großen Einfluss auf den Mikropartikeleffekt, insbesondere die Art des Medium und die Art des Inokulums. Im ersten Zwischenbericht (15.08.2014) wurde bereits der Einfluss verschiedener Medien auf die Produktbildung in *S. coelicolor* gezeigt (Abbildung 12). Bei diesem Organismus hat sich ein Sporeninokulum bewährt.

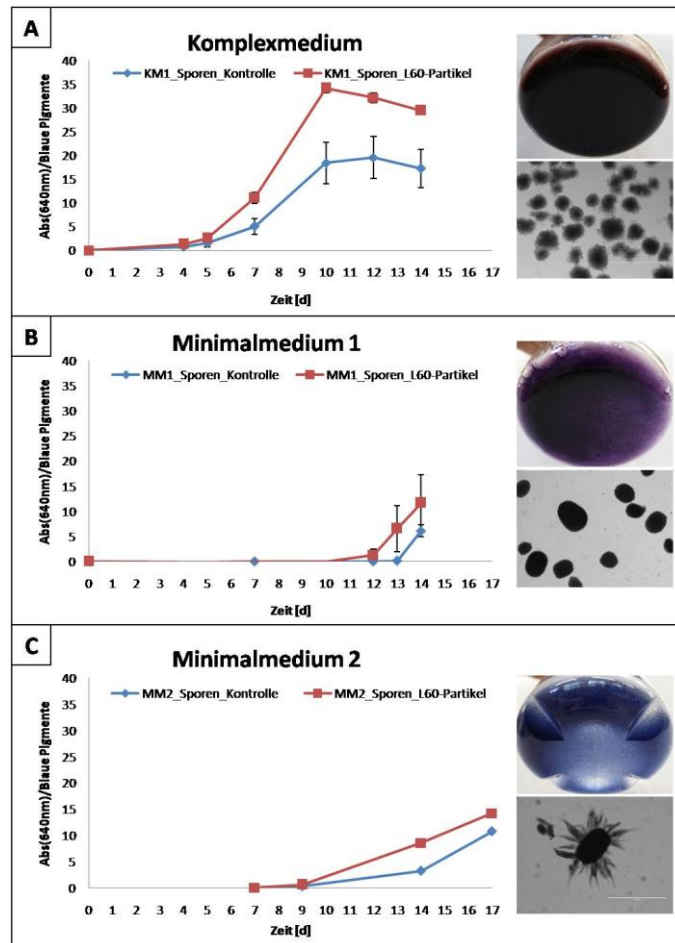


Abbildung 12: Veränderung der Pigmentmenge im Kulturmedium bei der Kultivierung von *S. coelicolor* im Komplexmedium (A), in Minimalmedium 1 (B) und Minimalmedium 2 (C). Als Inokulum wurden Sporen verwendet. Zusätzlich sind für jedes Medium die charakteristische Mediumsverfärbung und Pelletmorphologie gezeigt.

Des Weiteren wird vermutet, dass ein Medium mit hohem Anteil an festen Substraten den Partikeleffekt beeinflusst. In einem Versuch mit *A. chrysogenum* wurde daher in filtriertem Medium ohne feste Substrate und in einem Minimalmedium kultiviert. In beiden Fällen wurde im Vergleich zum feststoffhaltigen Produktionsmedium die Produktbildung negativ beeinflusst und besonders im Minimalmedium veränderte sich die Morphologie stark. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Partikel-Effekt durch feststoffhaltige Medien beeinflusst werden kann. Bei stark mutagenisierten Stämmen von *A. chrysogenum* trat ebenfalls kein Partikeleffekt auf. Da dieser Stamm nicht weiter untersucht werden soll (siehe W42-1 und Zusammenfassung), werden die beschriebenen Effekte nicht näher charakterisiert.

Um die Übertragbarkeit der partikelbasierten Kultivierung in den Laborfermentationsmaßstab zu untersuchen, wurde der vom Industriepartner W42 verwendete *Saccharopolyspora erythraea*-Stamm im von W42 optimierten Medium im DasGip-Parallelfementationssystem kultiviert. *Saccharopolyspora erythraea*, früher auch als *Streptomyces erythraeus* bezeichnet, ist ein filamentöses Bakterium, das zur Ordnung der *Actinomycetales* gehört und das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin produziert.

In vielen Fällen, in denen Mikropartikel einen positiven Einfluss auf die Produktivität filamentöser Organismen haben, geht diese Produktionssteigerung mit einer morphologisch veränderten, oftmals homogeneren Biomasse einher. Im Gegensatz zu vielen anderen filamentösen Pilzen, die eine inhomogene Morphologie und Biomasseagglomerate in der Submerskultivierung ausbilden, wächst der hier eingesetzte Stamm im verwendeten Medium auch ohne Partikelzugabe in fein verteilten Hyphen. Die hier eingesetzten Partikel „PZD008_4“ (Talkpartikel mit ca. 10 µm Durchmesser und einer Chitin/Alginat-Beschichtung mit Chitin als äußerster Schicht) bewirkten daher keine sichtbaren Unterschiede in der Morphologie, beeinflussten die Produktion des Antibiotikums Erythromycin A aber wesentlich. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, konnte die Produktivität vor allem in der frühen Phase der Kultivierung maßgeblich durch die Partikel-Zugabe gesteigert werden, so dass nach 72 Stunden eine dreimal höhere Konzentration an Erythromycin A als in der Kontrolle ohne Mikropartikel vorhanden war.

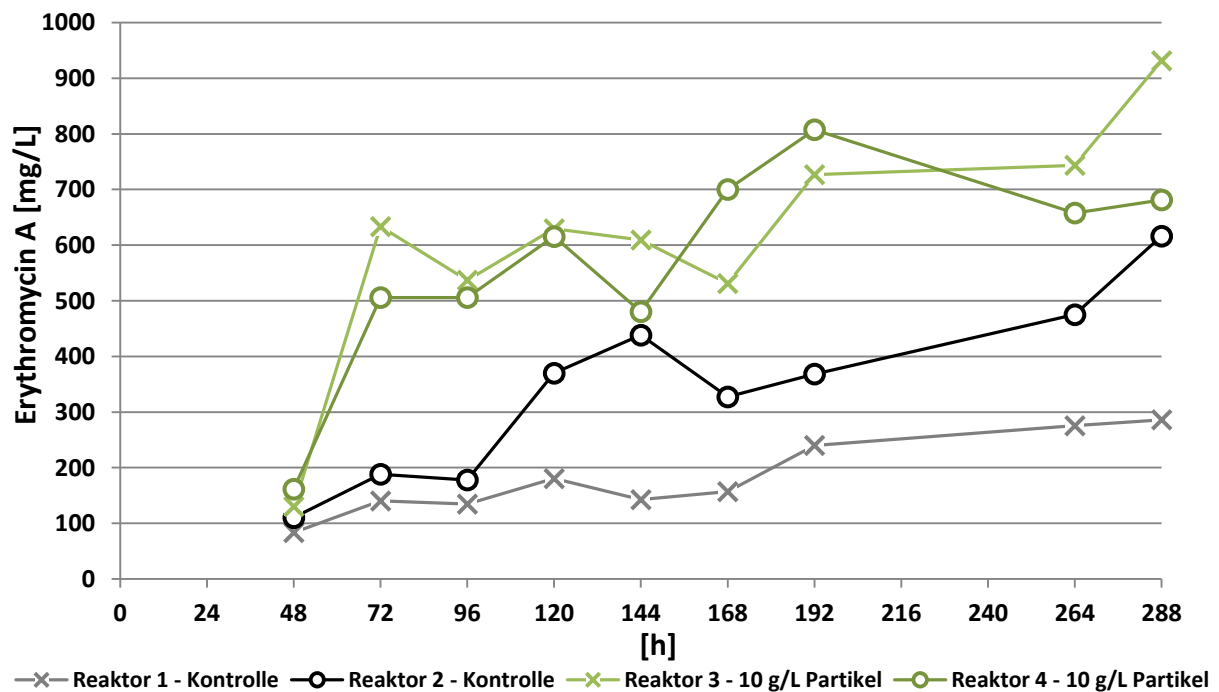


Abbildung 13: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der ersten Fermentation von *S. erythraea* ohne Partikel (schwarz und grau) und mit modifizierten Talk-Partikeln (grün)

Diese Ergebnisse konnten in einem anschließenden, zweiten unabhängigen Versuch reproduziert werden, wie Abbildung 14 zeigt.

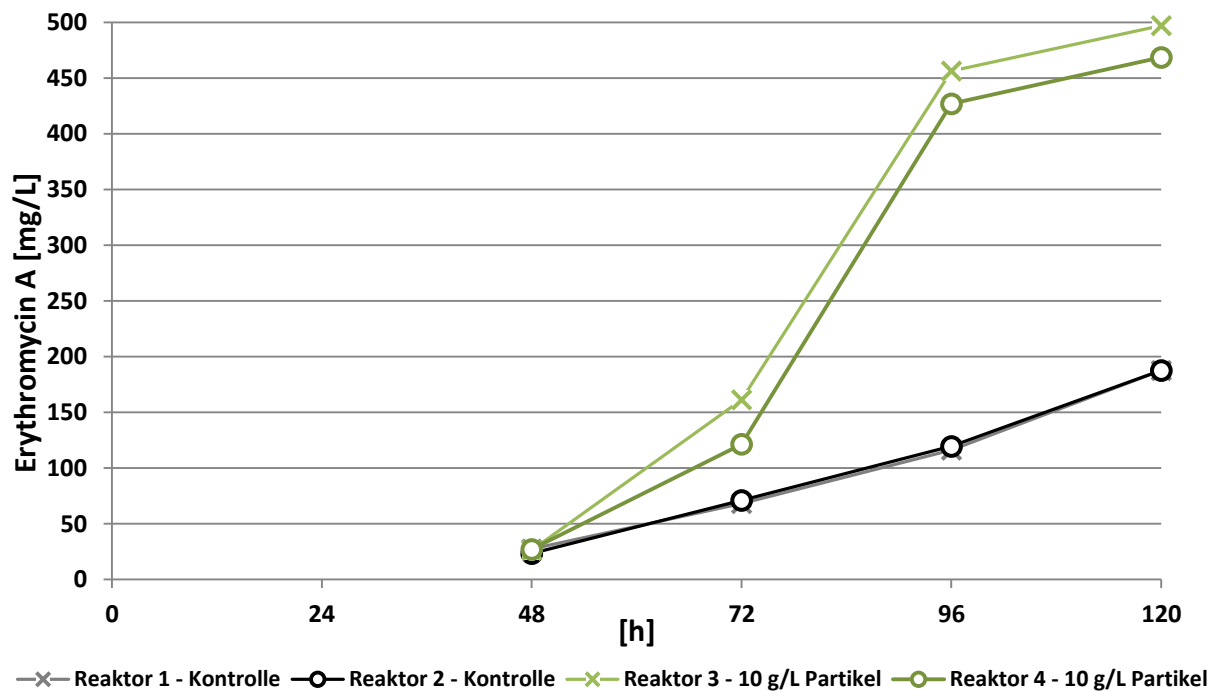


Abbildung 14: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der zweiten Fermentation von *S. erythraea* ohne Partikel (schwarz und grau) und mit modifizierten Talk-Partikeln (grün)

Die Ergebnisse zeigen deutlich den positiven Einfluss der mit einer Alginat-Chitin-Beschichtung modifizierten Partikel auf die Erythromycin-Produktion mit *S. erythraea* während der Fermentation. Da dies ein Beispiel für eine Produktivitätssteigerung ist, die nicht mit einer homogeneren oder anderweitig veränderten Morphologie einhergeht, ist es in diesem Fall von besonderem Interesse, den Einfluss der Partikel auf die Expression der für die Erythromycinsynthese relevanten Gene genauer zu betrachten.

DFI – 5: Untersuchung des Einflusses von Mikropartikeln auf die Genexpression der Erythromycin-Synthese in *Saccharopolyspora erythraea*.

An der Synthese von Erythromycin sind insgesamt 19 Gene beteiligt (Tabelle 10). Aus einem Molekül Propionyl-CoA und sechs Molekülen Methylmalonyl-CoA wird zunächst das 6-Deoxyerythronolid B aufgebaut. Dies geschieht durch die Erythromycin-Polyketid-Synthase, welche 6 Module besitzt, und durch die Gene *eryA1*, *eryA2* und *eryA3*, kodiert werden. Durch die 6-Deoxyerythronolid B Hydroxylase (*eryF*) wird das 6-Deoxyerythronolid B in das Erythronolid B überführt. Weitere sieben Gene (*eryB1*, *eryB2*, *eryB3*, *eryB4*, *eryB5*, *eryB6* und *eryB7*) sind für die Umwandlung des Erythronolid B in 3- α -Mycarosylerythronolid B verantwortlich, welches anschließend durch die Gene *eryC1*, *eryC2*, *eryC3*, *eryC4*, *eryC5* und *eryC6* in Erythromycin D überführt wird. In zwei letzten Schritten erfolgt die Umwandlung von Erythromycin D zu Erythromycin C über die Erythromycin C-12 Hydroxylase (*eryK*) und darauffolgend die Umwandlung von Erythromycin C zum Endprodukt Erythromycin A über die Erythromycin C Methyltransferase (*eryG*).

Tabelle 10: Übersicht der Gene und Genprodukte, die an der Erythromycin-Synthese in *S. erythraea* beteiligt sind.

Gen	Genprodukt
<i>eryA1</i>	Erythromycin Polyketid Synthase Modul 1+2
<i>eryA2</i>	Erythromycin Polyketid Synthase Modul 3+4
<i>eryA3</i>	Erythromycin Polyketid Synthase Modul 5+6
<i>eryB1</i>	β -D-Glucosidase
<i>eryB2</i>	TDP-4-Keto-6-Deoxyhexose-2,3-Reductase
<i>eryB3</i>	NDP-4-Keto-2,6-Dideoxyhexose 3-C-Methyltransferase
<i>eryB4</i>	dTDP-4-Keto-6-Deoxy-L-Hexose-4-Reductase
<i>eryB5</i>	6-DEB-TDP-Mycarsoyl glycosyltransferase
<i>eryB6</i>	NDP-4-Keto-6-Deoxy-Glucose 2,3-Dehydratase
<i>eryB7</i>	TDP-4-Deoxyglucose 3,5-Epimerase
<i>eryC1</i>	Erythromycin-Biosynthese Transaminase
<i>eryC2</i>	TDP-4-Keto-6-Deoxy-Glucose-3,4-Isomerase
<i>eryC3</i>	3-L-Mycarosyl-Erythronolide B Transferase
<i>eryC4</i>	NDP-6-Deoxyhexose 3,4-Dehydratase
<i>eryC5</i>	NDP-4,6-Dideoxyhexose 3,4-Enoylreductase
<i>eryC6</i>	TDP-Desoamin-N-Diemthyltransferase
<i>eryF</i>	6-Deoxyerythronolid B Hydroxylase
<i>eryG</i>	Erythromycin C Methyltransferase
<i>eryK</i>	Erythromycin C-12 Hydroxylase

Zusätzlich gibt es im Genom von *S. erythraea* das Gen *ermE*, welches für die N-6-Aminoadenin-N-Methyltransferase kodiert und Erythromycin-Resistenz vermittelt. Desweiteren konnten auch Regulatoren der Erythromycin-Synthese im Genom von *S. erythraea* identifiziert werden. Das Gen SACE7301 kodiert für einen Regulator aus der TetR/AcrR-Familie, welcher die Erythromycin-Synthese positiv beeinflusst. Der Regulator SACE3446 hingegen hemmt die Erythromycin-Synthese in *S. erythraea*. Der Einfluss von Mikropartikeln auf die Genexpression der Erythromycin-Synthese in *S. erythraea* wurde wie im Folgenden beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten zweier Fermentationen in einem DASGIP-System, anhand ausgewählter Gene (*eryA1*, *eryB1*, *eryC1*, *eryF*, *eryK*, *eryG*, *ermE*, *SACE3446* und *SACE7301*), untersucht. Als Haushaltsgen diente eine Glycosyltransferase (*SACE5571*).

Veränderung der Genexpression am 7. Tag nach Induktion

In einem Fermentationsversuch mittels DASGIP-System wurde *S. erythraea* mit und ohne Talkpartikel (10%, w/v) kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Induktion mit n-Propanol. Sieben Tage nach erfolgter Induktion wurden Proben zur Untersuchung der Genexpression genommen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Ansätze mit und ohne Talkpartikel sehr unterschiedliche Erythromycin A-Konzentrationen

auf (Abbildung 15). Der Ansatz mit Talkpartikel hatte eine ca. 3-fach höhere Erythromycin A-Konzentration als der Ansatz ohne Talkpartikel (zum Zeitpunkt 192 h).

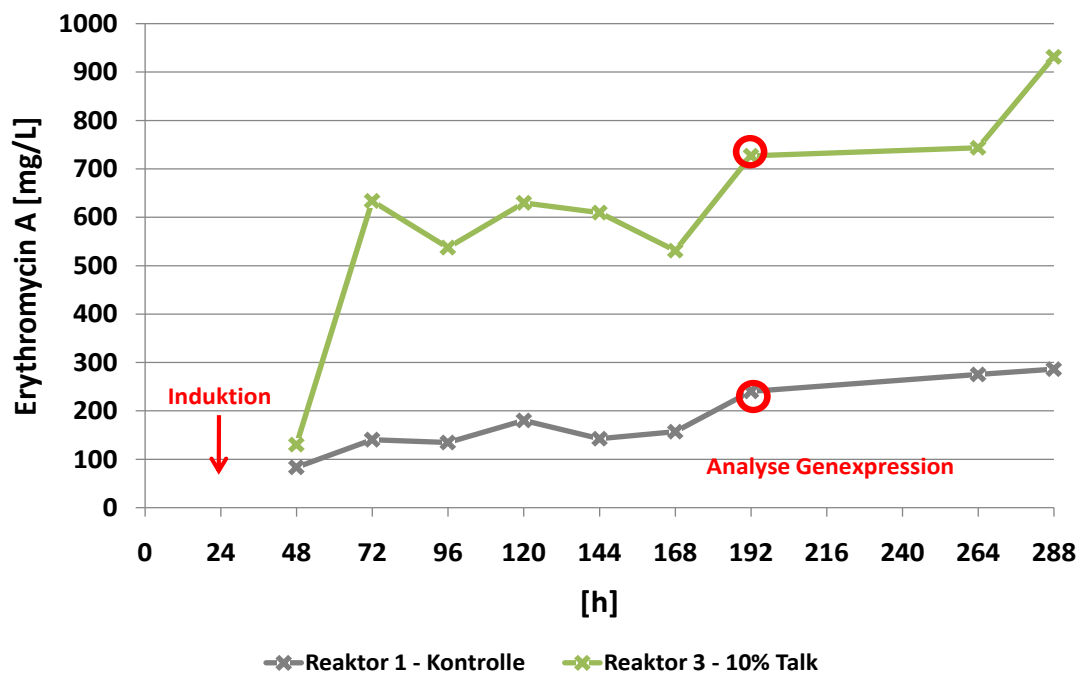


Abbildung 15: Probennahme von *S. erythraea*, kultiviert mit und ohne Talkpartikeln im DASGIP-System, sieben Tage nach Induktion zur Untersuchung der Genexpression.

Die Genexpressionsanalysen zeigen, dass der Einsatz von Talkpartikeln während der Fermentation zu einer gesteigerten Expression verschiedener Gene führt (Abbildung 16). Im Vergleich zum Haushaltsgen (Threshold 1) ist die Expression der Stoffwechselgene *eryK*, *eryG*, *eryF*, *eryA1* und *eryB1* deutlich erhöht, teils wie im Falle von *eryF* und *eryB1* um das 27- bzw. 28-Fache des Haushaltsgenes. Unklar ist jedoch warum die Stoffwechselgene so unterschiedlich stark hochreguliert wurden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die RNA-Level mancher Gene zum Zeitpunkt der Probennahme schon wieder abgebaut wurden. Desweiteren konnte auch gezeigt werden, dass der positive Regulator *SACE7301*, der die Erythromycin-Synthese stimuliert hochreguliert wurde. Passend dazu wurde der negative Regulator *SACE3446*, der die Erythromycin-Synthese hemmt, nicht hochreguliert.

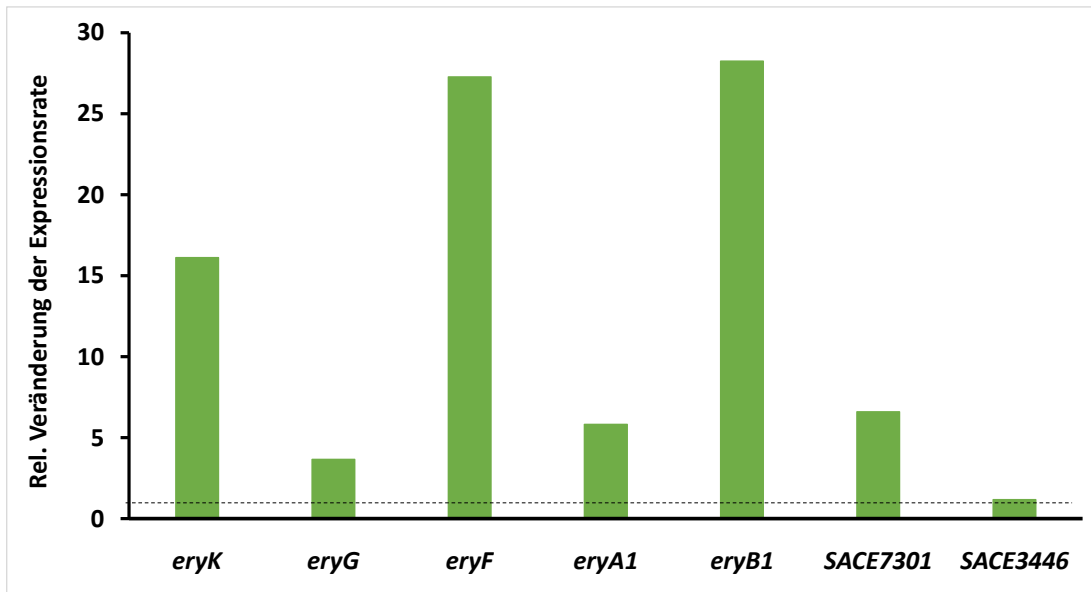


Abbildung 16: Relative Veränderung der Expressionsrate ausgewählter Gene der Erythromycin-Synthese zum Zeitpunkt der Probennahme (7 Tage nach Induktion).

Veränderung der Genexpression am 3. Tag nach Induktion

In einem weiteren unabhängigen DASGIP-Fermentationsversuch wurden die Proben zur Analyse der Genexpression bereits am 3. Tag nach Induktion mit n-Propanol genommen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Ansätze mit und ohne Talkpartikel wiederum unterschiedliche Erythromycin A-Konzentrationen auf (Abbildung 17). Der Ansatz mit Talkpartikel hatte eine ca. 4.5-fach höhere Erythromycin A-Konzentration als der Ansatz ohne Talkpartikel (zum Zeitpunkt 96 h).

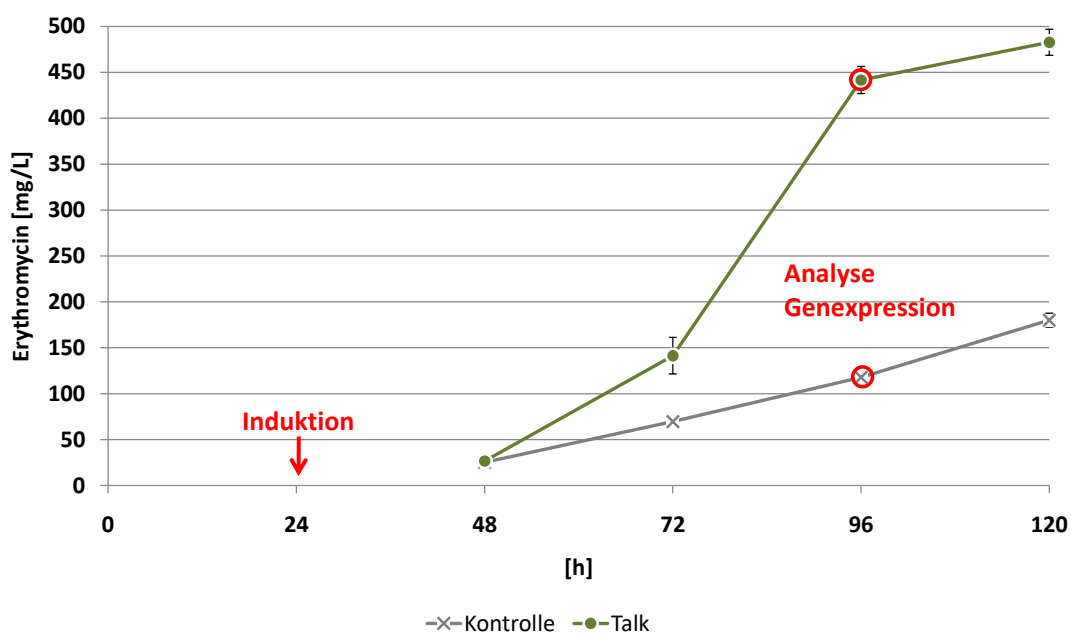


Abbildung 17: Probennahme von *S. erythraea*, kultiviert mit und ohne Talkpartikeln in einem zweiten DASGIP-Versuch, drei Tage nach Induktion zur Untersuchung der Genexpression.

Die Genexpressionsanalysen zeigen, dass es am 3. Tag nach Induktion bei den meisten Genen noch nicht zu einer gesteigerten Genexpression gekommen ist (Abbildung 18). Die Gene *eryA1*, *eryC1* und *eryG* sind nur minimal über dem Threshold des Haushaltsgenes von 1. Etwas stärker hochreguliert sind die Gene *SACE7301* und das Resistenz-Gen *ermE*. *SACE7301* ist ein positiver Regulator der Erythromycin-Synthese, der die Synthese des Antibiotikums auf Gen-Ebene stimulieren kann. Durch die Hochregulation des Gens *ermE* wird *S. erythraea* vor dem selbstproduzierten Antibiotikum Erythromycin geschützt und resistenter.

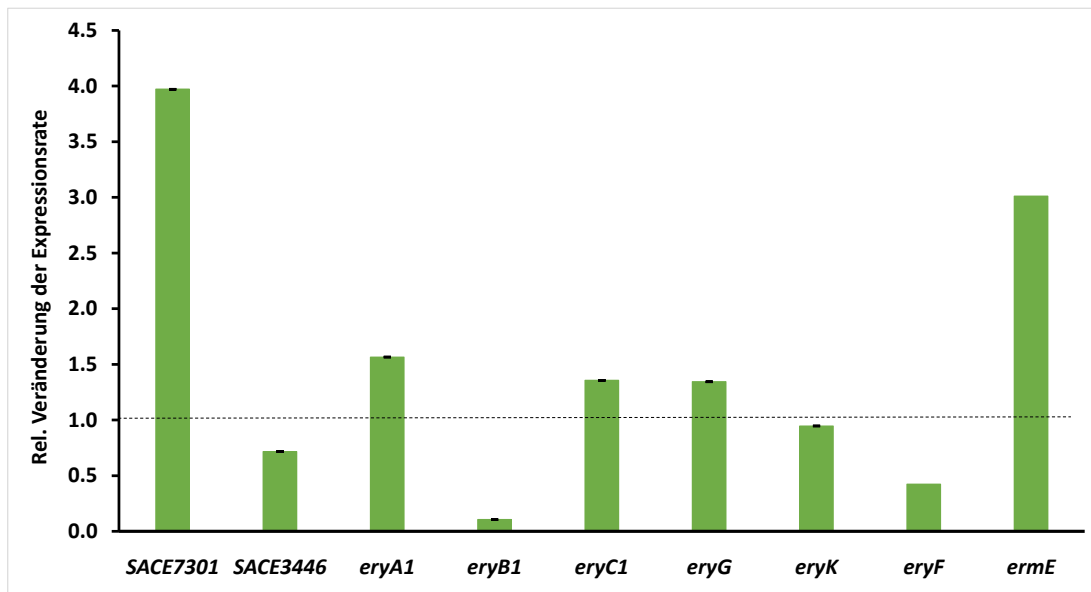


Abbildung 18: Relative Veränderung der Expressionsrate ausgewählter Gene der Erythromycin-Synthese zum Zeitpunkt der Probenahme 3 Tage nach Induktion.

DFI - 6: In situ Produktentfernung (Testen der Eignung von beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikeln zur *in-situ*-Abtrennung von Erythromycin A während der Fermentation von *S. erythraea*)

Die vom Projektpartner entwickelten porösen, beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikel zeigten in abiotischen Versuchen eine hohe Adsorptionskapazität. Um zu überprüfen, inwiefern sich die Zugabe dieser Partikel auf die Kultivierung von *S. erythraea*, die Erythromycin A-Produktion und die Konzentration im Medium auswirkt, wurden die Partikel für eine Parallelfermentation im DasGip-System verwendet. Die Kultivierungen erfolgten unter zu den vorhergehenden Fermentationen mit modifizierten Talkpartikeln analogen Bedingungen. Die Fermentation mit 10 g/L der beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikel wurde, genauso wie die Kontrollkultivierung ohne Partikel, in Doppelbestimmung durchgeführt.

Während der Fermentation wurden zusätzlich abiotische Adsorptionsversuche durchgeführt, um die Adsorptionskapazität der Partikel für Erythromycin A zu bestimmen. Dazu wurde dasselbe Medium verwendet, das für die Kultivierung von *S. erythraea* genutzt wird. Dieses wurde mit einer definierten

Konzentration von reinem Erythromycin A versetzt und anschließend für vier Stunden bei 30°C unter Schütteln mit 10g/L der Polyvinylpyrrolidon-Partikel inkubiert. Ein äquivalentes Experiment ohne Partikel diene zur Kontrolle. Beide Versuchsansätze, sowohl mit, als auch ohne Partikel, wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Analyse der Erythromycin A-Konzentration erfolgte nach Zentrifugation im Überstand. Das Ergebnis des Adsorptionsversuchs zeigt Abbildung 19.

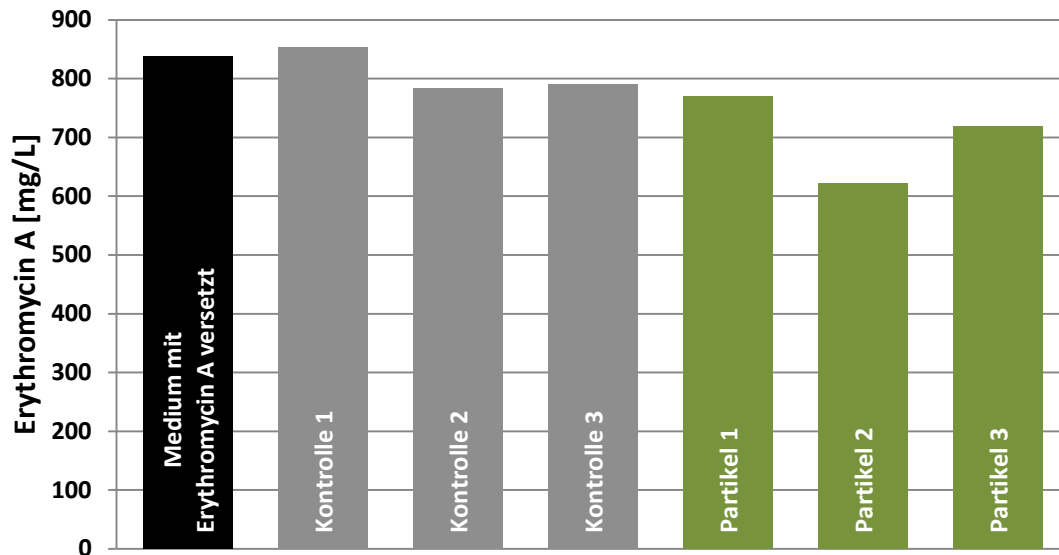


Abbildung 19: Erythromycin A-Konzentrationen im mit Erythromycin A versetzten Medium: zum Zeitpunkt t=0 (schwarz), nach vierstündiger Konzentration ohne Partikel (grün) und nach vierstündiger Inkubation mit 10 g/L beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikeln (grün)

Die Verringerung der Erythromycin A-Konzentration im Medium durch Adsorption an die Partikel ist minimal und kann aufgrund der Schwankungen nicht als signifikant bezeichnet werden. Dies kann einerseits an einer kaum vorhandenen Adsorptionskapazität für Erythromycin A liegen, andererseits aber auch durch die Mediumszusammensetzung und die eventuelle Adsorption anderer Mediumskomponenten begründet sein. Für die Verwendung zur in situ Abtrennung von Erythromycin A im Produktionsmedium sind die Partikel nicht geeignet. Trotz der Tatsache, dass sich die beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikel nicht zur in situ-Produktabtrennung eignen, sollte eine Auswertung der Parallelfementations-Versuche zeigen, ob die Partikel eine Produktivitätssteigerung bewirken. Dazu wurden die Konzentrationen in den Kultivierungsansätzen über den Versuchszeitraum bestimmt (Abbildung 20).

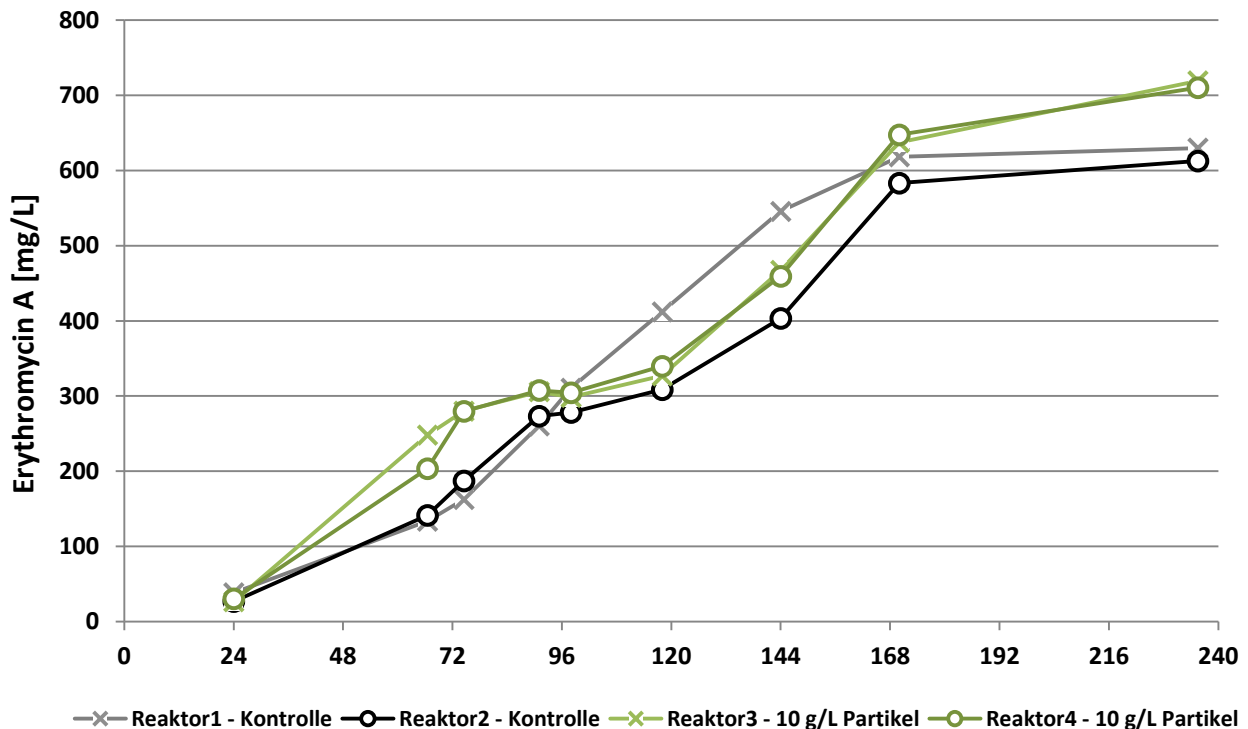


Abbildung 20: Erythromycin A-Konzentration der einzelnen Bioreaktoren während der Fermentation von *S. erythraea* ohne Partikel (schwarz und grau) und mit beschichteten Polyvinylpyrrolidon-Partikeln (grün)

Es konnte lediglich eine minimale Steigerung der Erythromycin A-Konzentrationen in den Kulturen mit Partikeln gegenüber Kontrollkulturen festgestellt werden. Auf eine Desorption des Produktes von den Partikeln wurde verzichtet, da die abiotischen Adsorptionsversuche gezeigt haben, dass keine signifikante Menge Erythromycin A von den Partikeln adsorbiert wird. Die positiven Effekte der Polyvinylpyrrolidon-Partikel bleiben somit weit hinter denen der beschichteten Talkpartikel zurück.

W42 – 1: Charakterisierung der Partikeleffekte bei industriellen Stämmen und Fermentationsprotokollen

Mikropartikel üben einen positiven Einfluss auf die Produktbildung durch filamentöse Mikroorganismen aus (siehe Vorarbeiten DFI), wobei es zu einer direkten Beeinflussung der Morphologie der Stämme und damit indirekt zu verbesserten Bedingungen z.B. Nährstoff- und O₂-Versorgung kommt, die sich dann auch in einer erhöhten Produktbildung zeigen kann. Bisherige Versuche wurden mit Wildtyp-Stämmen durchgeführt. Der Einfluss von Mikropartikeln auf die Wirkstoffproduktion industrieller Stämme wurde bisher nicht untersucht. Filamentöse Mikroorganismen in der industriellen Anwendung haben in der Regel einen mehrjährigen Optimierungsprozess aus sich wiederholenden Zyklen von chemischer Zufallsmutagenese und anschließendem ‚screening‘ auf optimierte Wirkstoffproduktion durchlaufen. Diese klassische Stammoptimierung resultiert in der Produktion des gewünschten Naturstoffes im deutlich zweistelligen g/l Bereich, führt aber gleichzeitig zu einer grundlegenden Veränderung des vielfach mutierten Stammes im Vergleich zum natürlichen Ausgangsstamm. Daher sind morphologische, physiologische und biochemische Daten, die mit den ursprünglichen Wildtyp-Stämmen erzielt

werden, auf die industriellen Hochleistungsstäme in der Regel nicht übertragbar. Die W42 GmbH hat in der ersten Hälfte des Projekts folgende industrielle Stämme hinsichtlich eines möglichen Partikeleffektes untersucht:

- *Acremonium chrysogenum* W42-I – Cephalosporin C Produzent, 28 g/l*
- *Saccharopolyspora erythraea* K1 – Erythromycin A Produzent, 8 g/l*
- *Amycolatopsis mediterranei* W126 – Rifamycin W Produzent > 10 g/l*

*Die angegebenen Produktionsraten werden im Fermenter erzielt.

Der Einfluss auf die Produktbildung durch die von Surflay entwickelten Partikel wurde systematisch analysiert. Dabei kamen die stammspezifischen industriellen Kultivierungsbedingungen zum Einsatz (SOPs der W42 GmbH). Die verwendeten Medien für die Produktionsphase zeichnen sich durch einen hohen Anteil unlöslicher Bestandteile (Sojamehl, Maisquellwasser, Pharmamedia „traders protein“) aus, so dass sie einen hohen Trübungsgrad aufweisen. Bei der Analyse/Auswertung stand daher die Produktbildung im Vordergrund. Aufgrund der hohen Konzentration unlöslicher Bestandteile war eine mikroskopische Analyse der Morphologie und deren Beeinflussung durch die eingesetzten Mikropartikel schwer möglich.

Cephalosporin C (CPC)

Neben der signifikant erhöhten Produktion von Cephalosporin C zeichnet sich der Stamm *A. chrysogenum* W42-I durch eine stark geänderte Morphologie aus. Anstelle eines verzweigten, durch lange und feine Hyphen bestimmten Myzels (WT) weist W42-I stark verkürzte und komprimierte Zellen auf. Sogenannte „yeast like cells“, die kennzeichnend für die CPC Produktionsphase sind und im WT erst in der stationären (späten) Wachstumsphase als multizelluläre Arthrosporen auftreten, werden bei dem Stamm W42-I bereits in der frühen Wachstumsphase in hoher Anzahl gebildet. Eine ausgeprägte morphologische Änderung im Verlauf einer Kultivierung findet bei W42-I im Vergleich zum WT somit nicht mehr statt. Die für viele myzelartig wachsende Mikroorganismen typische Pelletbildung lässt sich daher ebenfalls nicht feststellen. Es kommt nur ansatzweise zu einer „Aggregatbildung“ während des Wachstums, wie sie in der Abbildung 21 für den Stamm W42-I exemplarisch gezeigt ist.



Abbildung 21: Typisches Wachstum des Stammes W42-I in Flüssigmedium, 40-fache mikroskopische Aufnahme nach dreitägiger Inkubation bei 27°C und 210 rpm (Schüttelkolben) in CCM Medium.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Produktbildung unter Einfluss reiner Talkpartikel (Probe 15, Tab. 1), des Partikel L60 und der beschichteten Talkpartikel 02.06, 03.06, 10.06 und 11.06 in Schüttelkolbenversuchen untersucht. Die Probenaufarbeitung und HPLC-Analytik erfolgte mit den standardisierten Methoden von W42. Als Standardverbindungen wurde gereinigtes CPC und Deacetyl-CPC (DAC) verwendet. DAC stellt die Hauptnebenkomponente in industriellen Fermentationen dar. Neben der Steigerung der CPC Produktion stellt die Verminderung der DAC Konzentration in der Fermentation ein wichtiges Ziel von Stammoptimierungsprogrammen dar, da es aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Strukturen zu hohen Verlusten von CPC während der Reinigung kommt. Für keinen der getesteten Partikel konnte allerdings reproduzierbar ein Effekt auf die CPC- oder DAC-Produktion nachgewiesen werden. In einzelnen Schüttelkolbenversuchen kam es in Gegenwart von Partikeln zu einer erhöhten CPC-Bildung. Dieser Effekt konnte nicht reproduziert werden. Es handelte sich somit um „normale“ Schwankungen bezüglich CPC-Titer, die bei Kultivierungen im Schüttelkolben auftreten können und nicht durch Partikel induziert worden sind. Eine Erklärung des negativen Ergebnisses für den Stamm *A. chrysogenum* W42-I könnte in der oben beschriebenen morphologischen Anpassung an die CPC-Optimierung liegen. Da dieser Stamm eine morphologische Veränderung hin zu den multizellulären Arthrosporen nicht mehr durchlaufen muss, könnte das ‚target‘ für die Mikropartikel bei diesem Stamm nicht mehr vorhanden bzw. durch die intensive Stammoptimierung ein Potential für weitere, morphologisch induzierte CPC Produktionssteigerungen nicht mehr gegeben sein. In parallelen Versuchen am DFI wurden die Partikel 03.06 bis 11.06 an *A. chrysogenum* W42-I getestet und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Erythromycin A (EryA)

Für das Vorhaben standen anfänglich zwei Stammvarianten zur Verfügung, mit den Bezeichnungen GHS13 und K1. In ersten Vorversuchen, auch unter Verwendung von Mikropartikeln (L60 und Talk), wurde der Stamm *Sac. erythraea* K1 aufgrund der höheren Produktivität für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Für den Stamm K1 war eine Erythromycin A Produktion von 8 g/l beschrieben, wobei als unerwünschte Nebenkomponenten Erythromycin B (0,25 g/l) und Erythromycin C (0,45 g/l) gebildet

werden (Kunde der W42 GmbH, pers. Mitteilung). Ziel der Prozessoptimierung ist eine Erhöhung der EryA Ausbeuten, bei möglichst geringer Produktion von EryB und EryC. Im Rahmen des Projektes wurde die Produktbildung unter Einfluss reiner Talkpartikel, des Partikel L60 und der beschichteten Talkpartikel 02.06, 03.06, 04.06, 05.06, 06.06, 07.06, 08.06, 09.06, 10.06 und 11.06 in Schüttelkolbenversuchen untersucht. Die Probenaufarbeitung und HPLC-Analytik erfolgte zunächst mit der Methode die W42 von einem Kunden zur Verfügung gestellt worden war. Als Standardverbindungen wurden gereinigtes Erythromycin A, B und C verwendet. Die HPLC-Analytik erwies sich als problematisch, da keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine Trennung und Darstellung der Erythromycine war grundsätzlich möglich, allerdings kam es nach Analyse einer geringen Anzahl von Proben zu einer bisher nicht geklärten „Veränderung“ des HPLC-Systems (Säule/Laufpuffer), die zu einer massiven Reduzierung des Erythromycin-Signals, bis hin zum völligen Verschwinden, führte. Dies galt für Proben aus Schüttelkolbenversuchen und auch für die definierten Standards (EryA, B, C). Im Rahmen des Vorhabens wurden fünf verschiedene HPLC-Methoden (C8 und C18 Säulen, verschiedene Laufpuffer) getestet, es konnte aber kein stabil funktionierendes System etabliert werden. Zur Analyse der Proben aus Schüttelkulturen, wurde daher alternativ ein Bio-Assay mit dem Indikatorbakterium *Micrococcus luteus* etabliert. Diese Methode kann reproduzierbar für die Bestimmung von antibiotischen Substanzen, über die konzentrationsabhängige Entwicklung von Hemmhöfen, verwendet werden. Allerdings kann nicht zwischen den verschiedenen Erythromycinen unterschieden und der zusätzliche Einfluss von anderen inhibitorisch wirkenden Substanzen in der Kulturbrühe nicht ausgeschlossen werden. Da der Stamm K1 Erythromycin A in sehr hoher Konzentration und auf jeden Fall als absolut dominierende antibiotische Substanz bildet, können die Ergebnisse aus dem Bio-Assay trotzdem für die Bestimmung des Partikeleffektes genutzt werden. Beispielhaft ist die Auswertung eines Bio-Assays in der Abbildung 22 dargestellt.

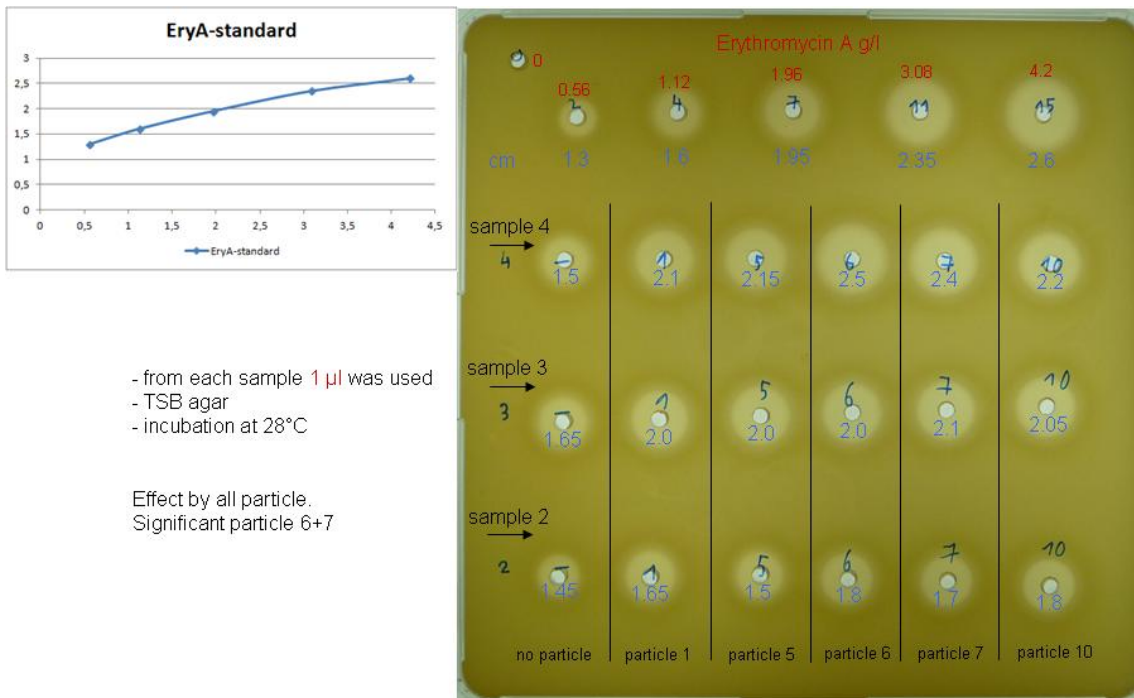


Abbildung 22: Entwicklung von Hemmhöfen in einem Bakterienrasen (*M. luteus*) durch Proben aus Schüttelkolbenversuchen von *Sac. erythraea* K1 zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde der Einfluss von fünf Mikropartikeln im Vergleich zu einer Kultivierung ohne Partikel untersucht. Als Standard wurden definierte Mengen Erythromycin A verwendet.

Eine erhöhte inhibitorische Aktivität kann in den Proben aus Kulturen mit verschiedenen Partikeln im Vergleich zur Kontrolle (Kultivierung ohne Partikel) festgestellt werden. In diesem Versuch erscheint der erzielte Effekt vermittelt durch die Partikel 07.06 (Nr. 6) und 08.06 (Nr. 7) signifikant zu sein. Zur weiteren Analyse des Partikeleffekts auf die Erythromycin Produktion in *Sac. erythraea* wurden parallele Fermentationen am DFI durchgeführt (siehe oben).

Rifamycin W (RifW)

Amycolatopsis mediterranei W126 ist eine Variante des natürlichen Rifamycin B Produzenten, der im Rahmen einer industriellen Stammentwicklung entstanden ist und die Verbindung Rifamycin W (Abbildung 23), ein Intermediat der Rif B Biosynthese (13), in hoher Konzentration (> 10 g/l) im Kulturüberstand anreichert.

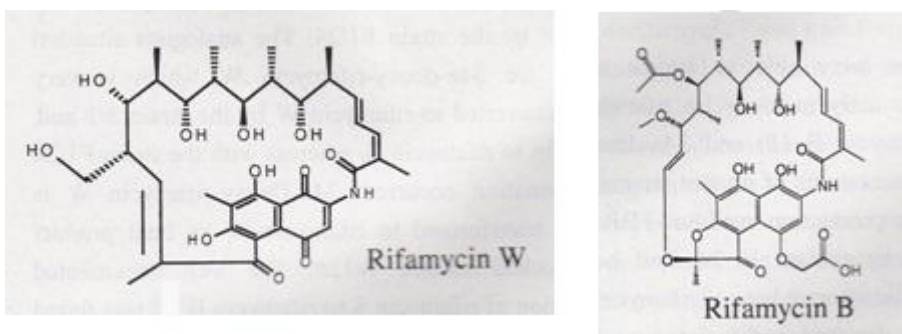


Abbildung 23: Chemische Struktur von Rifamycin W als Vorstufe der pharmakologisch bedeutenden Substanz Rifamycin B. Der Stamm *A. mediterranei* W126 produziert Rif W.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Produktbildung unter Einfluss verschiedener Partikel in Schüttelkolbenversuchen untersucht. Die Probenaufarbeitung und HPLC-Analytik erfolgte mit der beschriebenen Methode (14). Als Standard wurde gereinigtes Rif W verwendet, welches W42 exklusiv zur Verfügung steht. Es kamen folgende Partikel zum Einsatz:

- a) Reiner Talkpartikel PZD003
- b) Beschichtete Talkpartikel 02.06, 03.06, 04.06, 05.06, 06.06, 07.06, 08.06, 09.06, 10.06 und 11.06 (siehe Tabelle 3)
- c) Mit Chitosan/Alginat beschichtete Partikel, 008_1 – 008_4

Die benötigte Menge an Partikeln wurde mit H₂O auf 4 ml aufgefüllt und in den Schüttelkolben vor Zugabe des sterilen Mediums autoklaviert. Bei einigen der beschichteten Talkpartikeln kam es dabei zu einem „Verkleben“ der Partikel bzw. bildete sich ein fester Belag auf dem Kolbenboden, der nur schwer wieder suspendiert werden konnte. Die Versuche wurden bei 24°C und 180 rpm (Ø50mm) oder bei 28°C und 230 rpm (Ø25mm) in 30 ml Volumen in Glaskolben (250 ml) mit einer Schikane durchgeführt. Ausgehend von einer dicht bewachsenen Vorkultur wurden die Produktionskulturen 8%ig angeimpft.

Zu a + b) Der Einsatz von unmodifizierten Talkpartikeln beeinflusste die Rif W Produktion nicht (Ergebnis Zwischenbericht). Zur Untersuchung des Einfluß der unterschiedlich modifizierten Talkpartikel wurden 12 Schüttelkolbenversuche durchgeführt, wobei Partikel aus zwei unabhängigen Chargen verwendet wurden. In der Abbildung 24 ist beispielhaft die Auswertung für einen der ersten Schüttelkolbenversuche dargestellt.

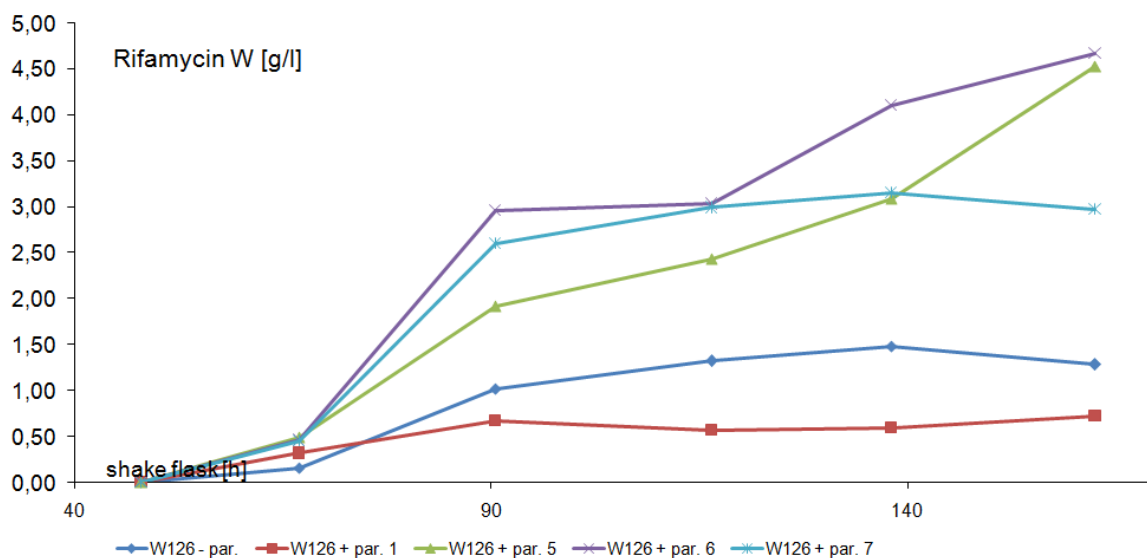


Abbildung 24: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 6, 5, 7, ohne, 1 (nähere Erläuterung jeweils im Text).

Eine erhöhte Rif W Produktion kann in den Proben aus Kulturen mit verschiedenen Partikeln im Vergleich zur Kontrolle (Kultivierung ohne Partikel) festgestellt werden. Signifikant erscheint der

erzielte Effekt vermittelt durch die Partikel 06.06 (Nr. 5), 07.06 (Nr. 6) und 08.06 (Nr. 7) zu sein. Der Effekt der unterschiedlich modifizierten Partikel auf die Rif W Produktion sollte in unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Allerdings wurde die Auswertung durch Schwankungen der absoluten Rif W-Produktion in den einzelnen unabhängigen Versuchen erschwert. Die erzielten maximalen Rif W-Konzentrationen schwankten zwischen 7g/l und 1, g/l. Diese grundsätzliche Schwankungsbreite in der maximalen Produktivität ist aus den Abbildungen ersichtlich. Auch konnte in den durchgeführten Experimenten kein reproduzierbarer Effekt für einen der verwendeten Partikel festgestellt werden. Dies ist exemplarisch in zwei Versuche in Abbildung 26 und Abbildung 26 dargestellt. In weiteren Versuchen wurden in den Kulturen ohne Partikelzugabe sogar die höchsten Rif W Konzentrationen gemessen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann auf Basis der erzielten Daten, keine reproduzierbare Produktsteigerung durch den Zusatz der hier verwendeten modifizierten Talkpartikel postuliert werden. Die Untersuchungen wurden aber durch die stark schwankenden Rif W Ausbeuten in parallel durchgeführten Schüttelkolbenexperimenten extrem erschwert. Dies ist vermutlich begründet in der komplexen Regulation der Biosynthese, die in dem „undefinierten“ Medium FBR42, mit hohem Anteil nicht löslicher Medienbestandteile, grundsätzlich starken Schwankungen unterliegt. Inwieweit der durch intensive Mutagenese erzeugte „Hochproduktions-Phänotyp“ eine weitere Steigerung der Rif W Produktion durch Partikelzugabe grundsätzlich ausschließt, konnte im Rahmen des Projektes nicht geklärt werden.

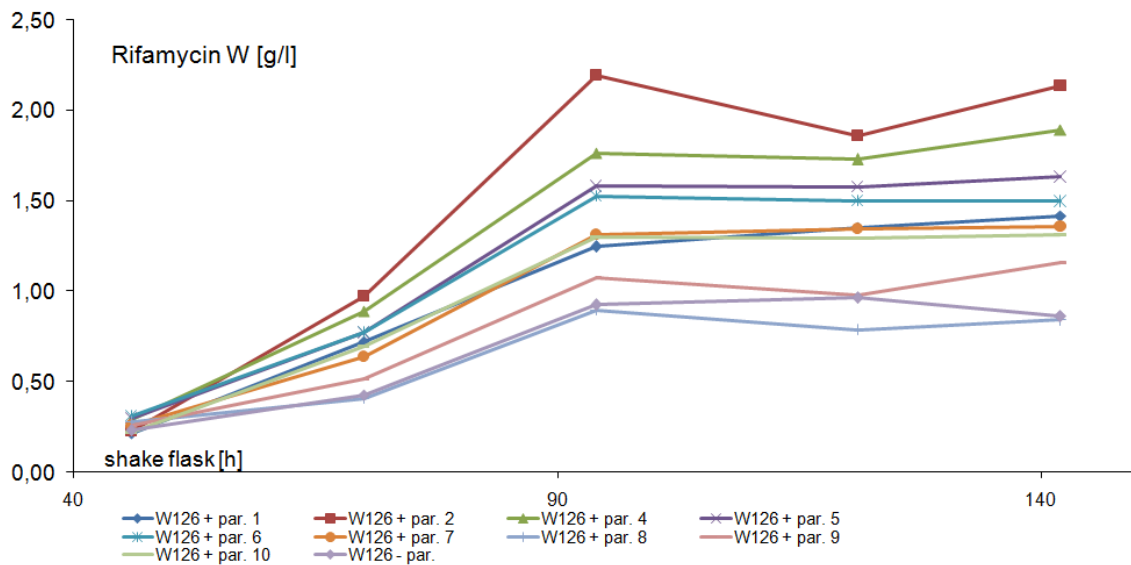


Abbildung 25: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 2, 4, 5, 6, 1, 7, 10, 9, ohne, 8.

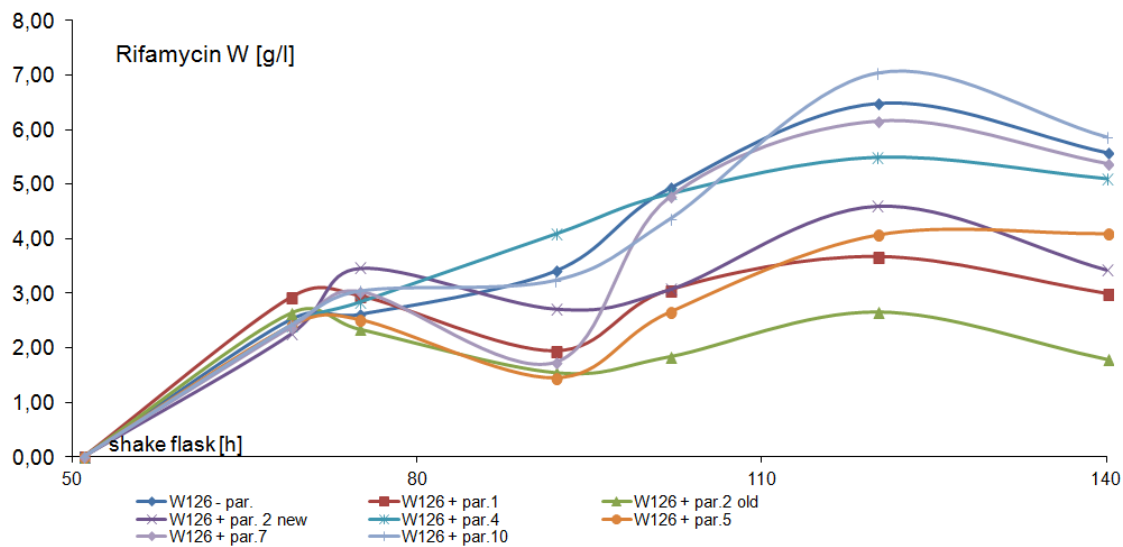


Abbildung 26: Einfluss von modifizierten Talkpartikeln auf die RifW Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. Ranking, Partikel = 10, ohne, 7, 4, 2, 5, 1, 2.

Zu c) In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Partikeln mit Varianten von Alginat/Chitosan Beschichtungen auf die Rif W Produktion untersucht. Es standen vier verschiedene Partikel zur Verfügung (008_1 – 008_4, Tab. 7). Zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlich modifizierten Alginat/Chitosan Partikel wurden 5 Schüttelkolbenversuche durchgeführt. Ein exemplarischer Versuch ist in der Abbildung 27 dargestellt. Wie auch schon bei Einsatz der modifizierten Talkpartikel beobachtet, unterliegen die produzierten Mengen an Rif. W starken Schwankungen, die nicht mit zugesetzten Partikeln korrelieren. Es konnte somit in den durchgeführten Experimenten kein reproduzierbarer Effekt für einen der verwendeten Alginat/Chitosan Partikel festgestellt werden.

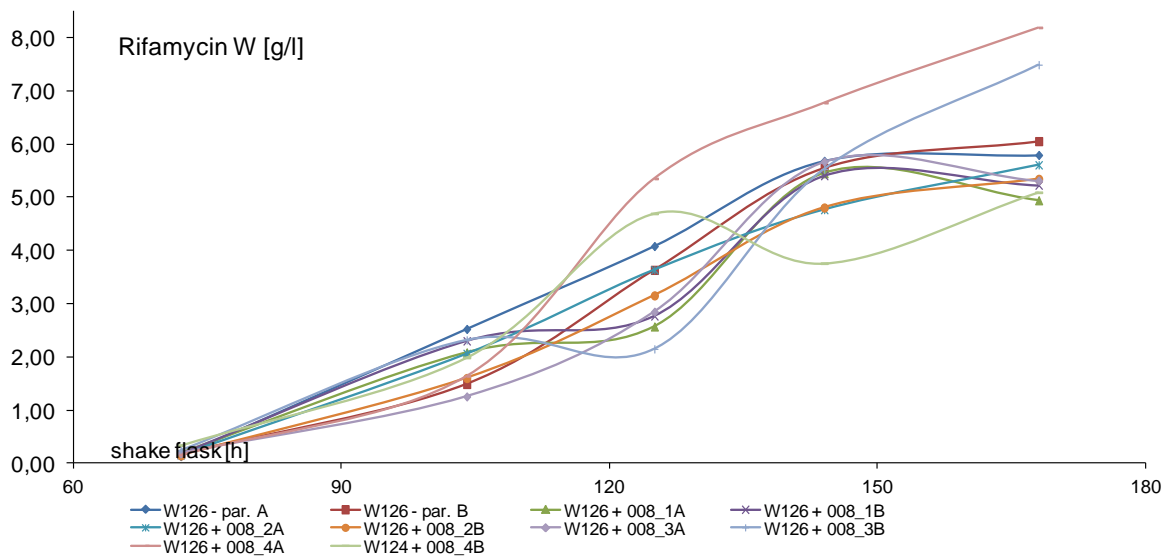


Abbildung 27: Einfluss von unterschiedlichen Alginat/Chitosan Partikeln auf die Rif W Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. Für jeden Partikel wurde eine Doppelbestimmung (Parallelkultur) durchgeführt (Ranking, Partikel = 4A, 3B, ohne A, ohne B, 2A, 3A, 2B, 1B, 1A, 4B).

Schlussfolgerung/Ausblick

Grundsätzlich konnte in den durchgeführten Versuchen mit Partikeln zur Produktionssteigerung kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. In einigen der durchgeführten Versuche konnten modifizierte Talk- bzw. Alginat/Chitosan Partikel eine erhöhte Rif W Produktion induzieren. Allerdings konnte für diese Partikel dieser Effekt nicht reproduziert werden. Für einen eindeutigen Nachweis eines möglichen Partikeleffekts sollten in der Zukunft weitere Untersuchungen zur Untersuchung folgender Fragen/Probleme durchgeführt werden:

- Reproduzierbarkeit der Rif W Produktion in Schüttelkolben Kultivierungen.
- Chargen bedingte Veränderung des Partikeleffekts.
- Veränderung der Partikeleigenschaften durch die Sterilisation im Autoklaven.
- Untersuchung des Partikeleffekts in der Fermentation.

W42 – 2: Molekularbiologische / Biochemische Untersuchungen

Hier sollte auf molekularbiologischer Ebene die Partikeleffekte auf die Produktion von natürlichen Wirkstoffen durch filamentöse Mikroorganismen analysiert werden. In der Literatur finden sich dazu keine Daten, so dass im Rahmen des Projektes die Basis für solche Untersuchungen gelegt werden sollte. Ziel war es mögliche genetische ‚targets‘ für den Partikeleffekt zu identifizieren.

Diese Arbeiten wurden in enger Kooperation zwischen dem DFI und W42 durchgeführt, die entsprechenden Ergebnisse sind unter DFI-5 beschrieben.

W42 – 3: Einfluss auf bioverfahrenstechnische Parameter

Die in den Schüttelkolbenversuchen identifizierten Systeme aus Stamm/Wirkstoff/Partikel müssen betreffend der gesteigerten Wirkstoffproduktion in Fermentationen unter industriellen Bedingungen getestet werden. Ein Stamm der für diese Untersuchungen in Frage kommt, ist der Erythromycin A Produzent *Sac. erythraea* K1. Im Rahmen des Vorhabens wurde der Stamm mit der Fermentationsvorschrift von W42 zum ersten Mal im Labor von W42 fermentiert. Das Ergebnis ist in einer Übersicht in der Abbildung 28 dargestellt.

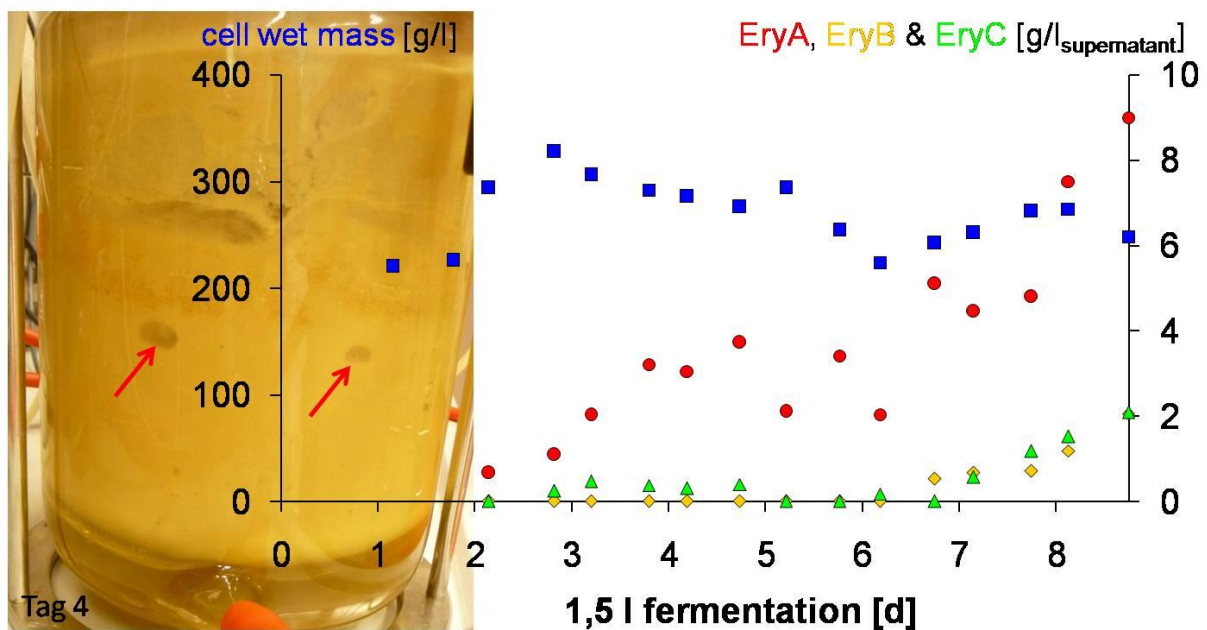


Abbildung 28: Fermentation von *Sac. erythraea* K1 mit SOP von W42. Dargestellt ist der Verlauf der Fermentation anhand der Zellfeuchtmasse und der Produktion von Erythromycin A, B und C über den gesamten Verlauf. Bestimmung der Erythromycin-Konzentration mittels HPLC. Die beobachteten großen Luftblasen aufgrund der Konsistenz der Kulturbrühe sind mit roten Pfeilen markiert. Es wurden keine Partikel verwendet.

In diesem ersten Versuch konnte bereits ein sehr gutes Ergebnis von 9 g/l Erythromycin A (HPLC-Daten) erzielt werden. Die dargestellten starken Schwankungen der gemessenen EryA Konzentration sind hauptsächlich in den bereits beschriebenen analytischen Schwierigkeiten begründet (W42 – 1) und bei den Proben zu den Zeitpunkten (d) 5.2, 5.8, 6.2, 7.2 und 7.8 kam es zu Fehlern bei der Durchführung des Extraktionsschrittes, so dass dort vermutlich zu geringe Werte in der HPLC erzielt wurden. Auffällig sind die hohen Konzentrationen für EryB und EryC. Diese müssen durch Anpassung der Prozessparameter in zukünftigen Versuchen auf das angegebene Niveau (W42 – 1; Angaben Kunde W42) gebracht werden. Aufgrund des mycelartigen Wachstums durchläuft die Kultur im Fermenter eine Phase, die sich durch eine stark gelartige Konsistenz auszeichnet (Tag 4 – 6) und durch das Auftreten großer Luftblasen mit langer Verweildauer geprägt ist. Dies lässt auf eine nicht optimale Sauerstoffversorgung schließen. Durch den Einsatz von Partikeln, soll dieser Morphologie begründete Effekt bei *Sac. erythraea* im Fermenter so verändert werden, dass diese vermutete Limitierung aufgehoben und die EryA Produktion verbessert wird.

Fermentation zur Rif W Produktion

Um den Einfluss ausgewählter Partikel, die in Schüttelkolben Versuchen eine Steigerung der Rif. W Produktion bewirken, auf die industrielle Produktion zu untersuchen, wurde eine Fermentation durchgeführt. Zum Einsatz kam ein modifiziertes Medium, welches sich von dem Produktionsmedium für Schüttelkolbenversuche ableitet. Die Fermentation lief 5,8 Tage mit einem Standardprozess für filamentöse Bakterien (Streptomyceten). In den ersten beiden Nächten, kam es zu einer starken Schaumbildung, die trotz automatischer Antischaum Zugabe zu einem Überlaufen des Fermenters führte. Die Biomasse in der Abluftflasche wurde dann jeweils wieder zurück gepumpt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Zellen durch die mehrstündige Verweilzeit ohne Belüftung in ihrer biologischen Aktivität negativ beeinflusst worden sind. Trotzdem konnten zum Ende der Fermentation 5 g/l Rif W gemessen werden. Weiterhin wurde die Morphologie des Mycel über den gesamten Fermentationsverlauf dokumentiert (Daten nicht gezeigt). Nach anfänglich starker Pelletbildung (Tag 1 – 3) konnte ab Tag 4 ein verstärktes Auftreten von „feinem“ Mycel beobachtet werden. Es kommt somit im Verlauf der Fermentation zu einer grundlegenden Änderung der Morphologie, die mit einer starken „Schwarzfärbung“ und Steigerung der Rif W Bildung verbunden ist. Die gewonnenen Daten/Informationen stellen eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen zum Partikeleffekt in Fermentationen von *A. mediterranei* zur Optimierung der Rif W Produktion dar.

W42 – 4: In situ Produktentfernung durch Mikropartikel und W42 – 5: Minimierung der Nebenprodukte

Im Rahmen des Projekts stand nicht nur die Entwicklung optimaler Partikel zur Steigerung der Wirkstoffproduktion bei filamentösen Mikroorganismen im Mittelpunkt, sondern es sollte auch eine mögliche Bindung der Wirkstoffe an spezifisch adsorbierender Partikeloberflächen während der Kultivierung ermöglicht werden. Die dadurch erzielte Verringerung der Wirkstoffkonzentration in der Kultur könnte zu einer höheren Gesamtproduktion führen und gleichzeitig einen ersten effektiven Reinigungsschritt darstellen.

Vorversuche zur Absorption von Rif W

Von surflay wurden zwei Partikeltypen zur spezifischen Bindung von Rifamycinen zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurden die Partikel zu zellfreiem Kulturüberstand gegeben und die Rif W Konzentration mittels HPLC analysiert. Die Absorption fand unter physiologischen Bedingungen (pH 5.0 – 7.5) statt. Die Desorption wurde durch einstellen des pH Werts auf 12 mit NaOH herbeigeführt. Nach Abtrennung der Partikel und Rückstellung des pH Wertes auf 7, konnte Rif W in der anschließenden Extraktion in die Butanol-Phase überführt werden.

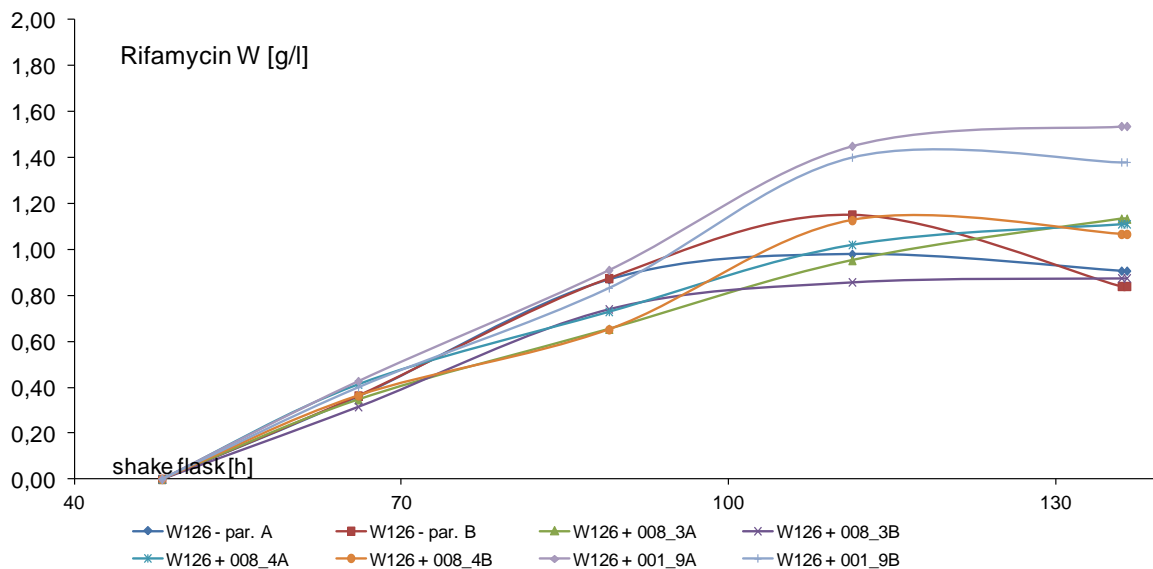
PZD009 I und PZD009 II: Die Partikel unterscheiden sich hinsichtlich der Beschichtung des SiO₂ Grundkörpers mit PEI (I) bzw. PVBTMAC (II). An den Partikel PZD009_II konnten signifikante Mengen Rif. W gebunden werden. Bei Zugabe von max. 80 mg in 500 µl zellfreiem Überstand (2.2 g/l Rif W), wurden 57% des Rif W von den Partikeln absorbiert. Allerdings war es unter den gewählten Bedingungen nicht möglich das gebundene Rif W vollständig von den Partikeln zu lösen. Es konnten nur 10% des gebundenen Rif W wieder freigesetzt werden. Eine annähernd vollständige Desorption

konnte auch durch Einsatz von 1 M NaCl oder Isopropanol nicht herbeigeführt werden. Daher wurden diese Partikel nicht für Schüttelkolbenversuche eingesetzt.

PVPF001_9: Dieser unbeschichtete Partikel besteht aus Polyvinylpyrrolidon. An den Partikel PVPF001_9 konnten ebenfalls signifikante Mengen Rif W gebunden werden. Bei Zugabe von max. 80 mg in 500 µl zellfreiem Überstand (1.5 g/l Rif W), wurden 68% des Rif W von den Partikeln absorbiert. Allerdings war es unter den gewählten Bedingungen auch mit diesem Partikel nicht möglich das gebundene Rif W vollständig von den Partikeln zu lösen. Es konnten aber immerhin 59% des gebundenen Rif W wieder freigesetzt werden. In einer Wiederholung, konnten ausgehend von einem zellfreien Extrakt (2.2 g/l), 63% gebunden und 52% des gebundenen Rif W wieder desorbiert werden. Somit erscheint dieser Partikel-Typ geeignet, um dessen Einfluss auf die Rif W Produktion in Schüttelkolbenversuchen zu untersuchen.

Absorption und Partikel-Effekt

MPEC: In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des Partikels PCPF001_9 (unbeschichtet, Polyvinylpyrrolidon) auf die Rif W Produktion untersucht unter Berücksichtigung der Bindung von Rif W an diesen Partikel während der Schüttelkolben Kultivierung. Es wurden 5 Schüttelkolbenversuche durchgeführt, wobei Partikel aus drei unabhängige Chargen verwendet wurden. Zwei exemplarische Versuche sind in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass in den beiden Abbildungen die Rif W Menge im Überstand gezeigt ist. Der Anteil gebundenes Rif. W wurde in anschließenden Versuchen zur Desorption bestimmt (siehe unten, Abbildungen 31 und 32



).

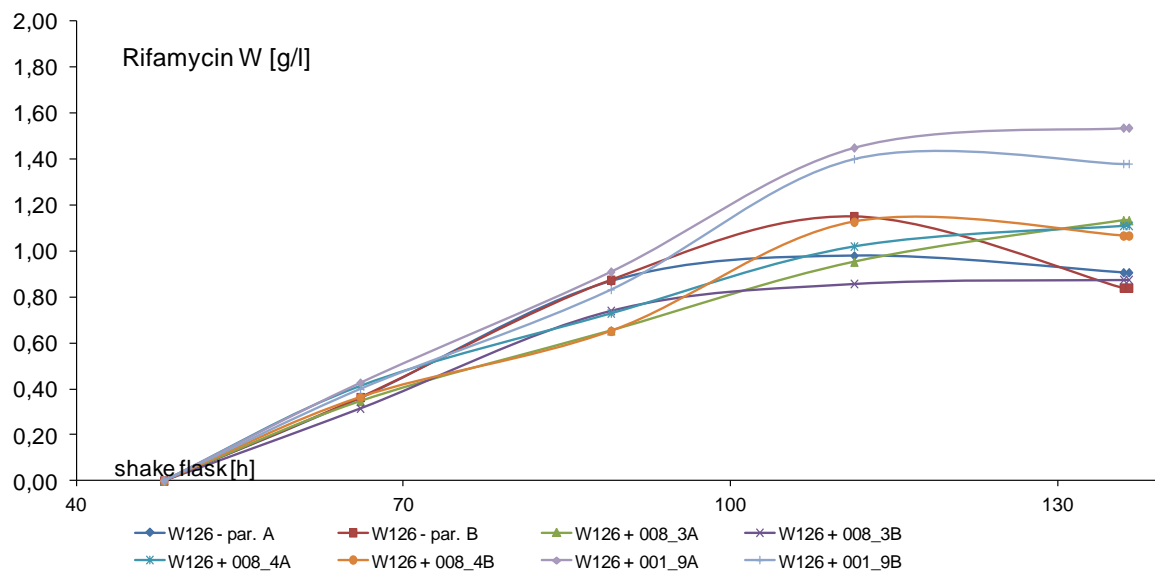


Abbildung 29: Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 im Vergleich zu zwei unterschiedlichen Alginate/Chitosan Partikeln (008_3, 008_4) auf die RifW Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. Für jeden Partikel wurde eine Doppelbestimmung (Parallelkultur) durchgeführt. Es wurden 300 mg Partikel je Kultur eingesetzt (Ranking, Partikel = 001_9A, 001_9B, 008_3A, 008_4A, ohne A, ohne B, 008_3B).

Im dem Versuch in Abbildung 29 verläuft die Rif W Produktion in den beiden Kulturen in Gegenwart des Absorptionpartikel 001_9 nahezu identisch und es wurden im Vergleich zur Kontrolle und den beiden Alginate/Chitosan Partikeln signifikant höhere Ausbeuten erzielt. Dieses sehr vielversprechende Ergebnis konnte aber leider nicht reproduziert werden. Zum Vergleich zeigt die Abbildung 30 die bereits beschriebene Partikel unabhängige Streuung der Produktion in einem Vergleich unterschiedlicher Partikel-Konzentrationen (001_9) im Schüttelkolben. In drei weiteren Versuchen konnte der positive Einfluss des Partikels 001_9 ebenfalls nicht bestätigt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

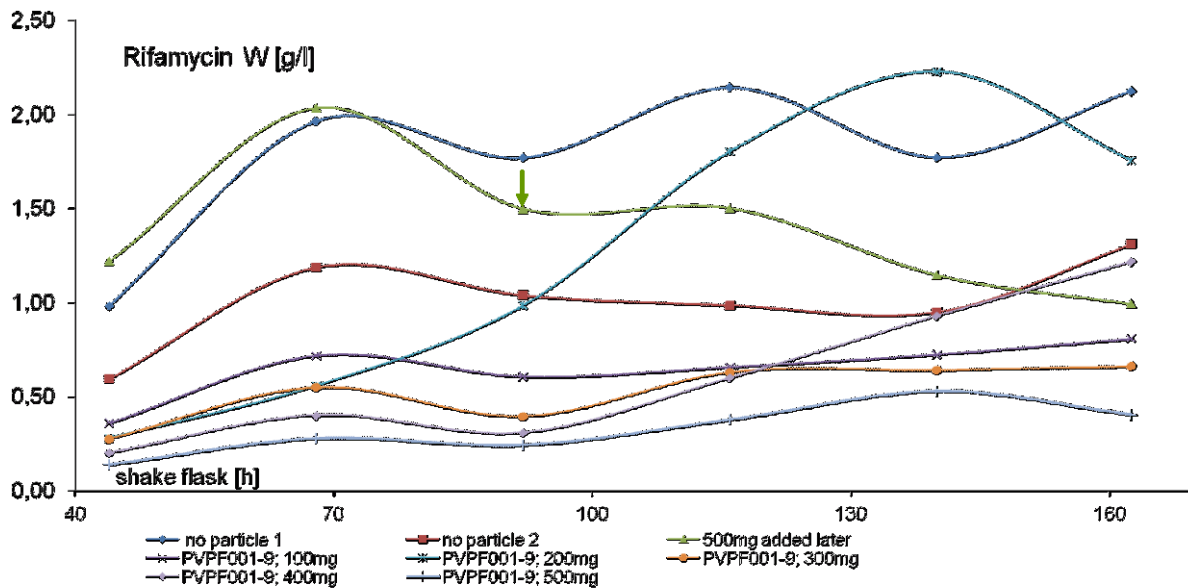


Abbildung 30: Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 in Abhängigkeit von der eingestzten Menge auf die RifW Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen. In einem Versuch wurden 500 mg Partikel nach 92 Stunden der Kultur zugefügt (grüner Pfeil), Ranking, Partikel 001_9 = ohne(1), 200 mg, 500 mg (zugesetzt bei 92 h), ohne (2), 400 mg, 100 mg, _300 mg, 500 mg).

Desorption

Ausgehend von den Schüttelkolbenversuchen in Gegenwart von Partikel PVPF001_9 wurde die Menge an gebundenem Rif W bestimmt. Die Desorption wurde durch Erhöhung des pH Wertes in der Kultur auf 12 herbeigeführt. Nach Entfernung der Zellen und der Partikel (Zentrifugation) und Rückstellung des pH Wertes auf 7, konnte Rif W in die Butanol-Phase in der anschließenden Extraktion überführt werden. Das Sediment aus Zellen und Partikeln konnte nach Zugabe von Wasser (pH 12), dann für eine zweite Desorption verwendet werden. Zur Untersuchung des Partikel-Effekts auf die Rif W Produktion, wurden parallele Schüttelkulturen mit unterschiedlichen Mengen des Partikels PVPF001_9 versetzt. Es kamen 100 – 500 mg pro Kultur (30 ml) zum Einsatz. Dabei wurden die Partikel in der Regel dem Medium vor dem Beimpfen zugefügt. In zwei Versuchen, wurde Kulturen 72 bzw. 92 h nach Beginn der Kultivierung 300 bzw. 500 mg Partikel steril zugefügt. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Desorption ausgehend von dem oben beschriebenen Schüttelkolbenversuch. Die Kulturen mit dem Partikel PVPV001_9 zeigen sowohl im Überstand, als auch in der Gesamtproduktion (total, Überstand und Desorption) die höchste Produktivität. Allerdings wurden im Desorptionsschritt auch bei den Kulturen mit den Alginat/Chitosan Partikeln bzw. in den Kulturen ohne Partikeln signifikante Mengen zusätzliches Rif W freigesetzt, so dass eine *in-situ* Produktbindung an die Partikel nicht eindeutig nachweisbar ist. Auffällig war die schwarze Färbung der Partikel zum Ende der Kultivierung, die sich auch in mehreren Desorptionszyklen (max. drei) nicht wieder entfernen ließ. Ob diese Färbung von nicht wieder ablösbarem Rif W stammt oder von anderen Produkten im Kulturüberstand, konnte im Rahmen des Projekts nicht untersucht werden.

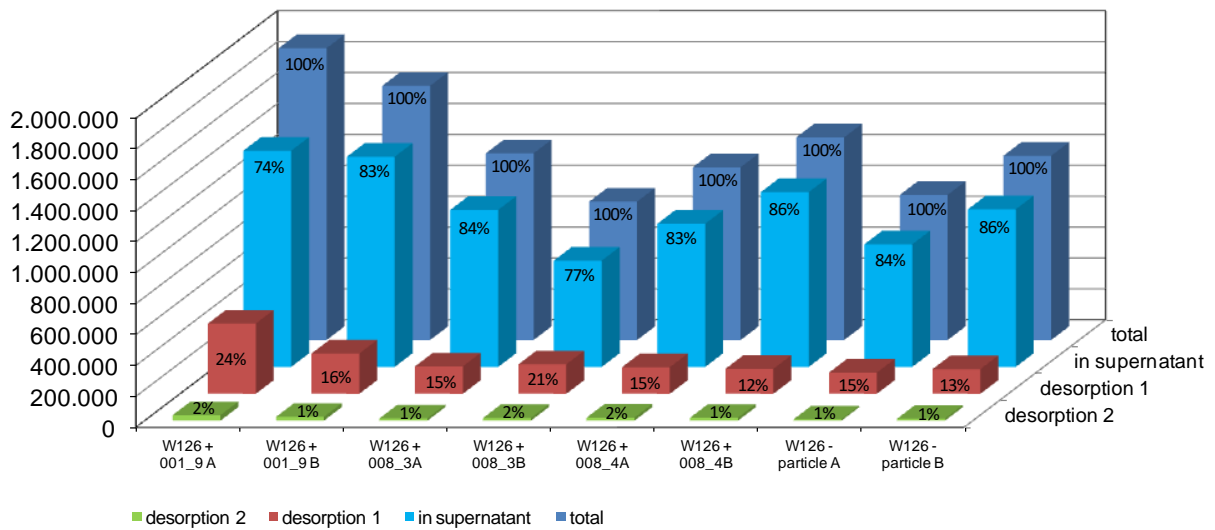


Abbildung 31: Rif W Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen in Gegenwart von 300 mg Partikeln. Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 auf die Rif. W Produktion im Vergleich zu Kulturen mit Alginat/Chitosan Partikeln bzw. Kontrollen ohne Partikel. Es ist die Gesamtproduktion (total), der Rif.W Gehalt im zellfreien Überstand (supernatant) und nach zwei Desorptionsschritten (Desorption1 + 2) gezeigt.

Abbildung 32 zeigt das Ergebnis der Desorption ausgehend von dem zweiten der oben beschriebenen Schüttelkolbenversuche. In diesem Versuch konnte kein grundsätzlicher Effekt nach Partikelzugabe im Vergleich zu den beiden Ansätzen ohne Partikel (no particle 1+2) festgestellt werden. Die freigesetzte Menge Rif W nach Desorption wies, wie auch schon in Abbildung 31 gezeigt, keinen Unterschied zwischen den Ansätzen „mit“ bzw. „ohne“ Partikel auf.

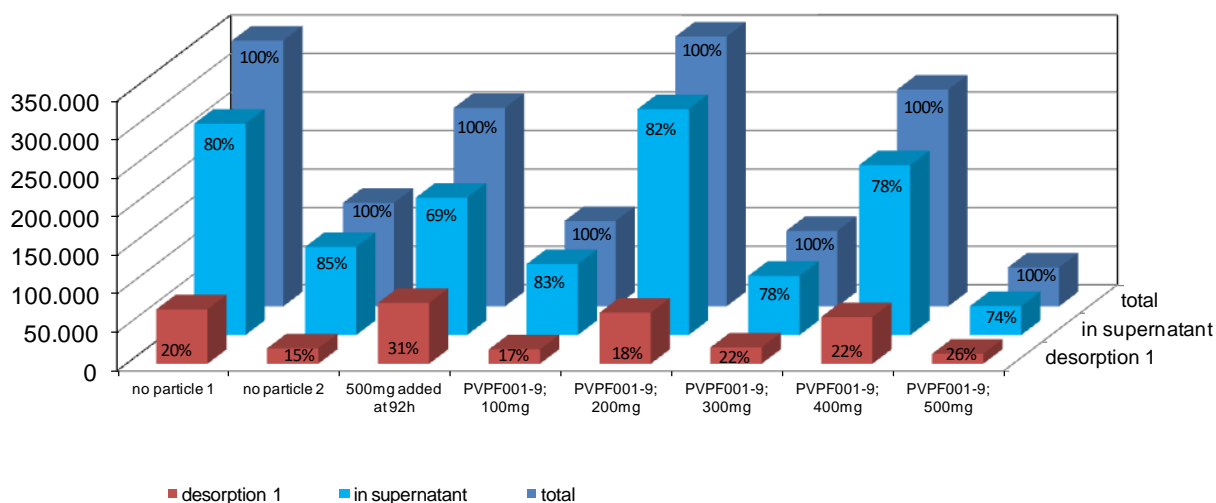


Abbildung 32: Rif W Produktion in *A. mediterranei* W126 in Schüttelkolbenversuchen in Gegenwart von 100 - 500 mg Partikeln. Einfluss des Absorptionpartikel PVPF001-9 in verschiedenen Konzentrationen auf die Rif. W Produktion. Es ist die Gesamtproduktion (total), der Rif W Gehalt im zellfreien Überstand (supernatant) und nach einem Desorptionsschritt (Desorption1) gezeigt.

Schlussfolgerung/Ausblick

Grundsätzlich konnte in den durchgeführten Versuchen mit Partikeln zur *in-situ* Produktentfernung kein reproduzierbarer Effekt auf die Rif W Gesamtproduktion nachgewiesen werden. In zwei von fünf Schüttelkolben Versuchen, wurde in Kulturen mit dem Partikel PVPF001_9 eine signifikant höhere Rif. W Produktion gezeigt, die aber nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Nicht erwartet war die signifikante Freisetzung von Rif W in den entsprechenden Desorptionsversuchen in den Ansätzen ohne Partikel-Zugabe, die sich von den Ansätzen mit Partikeln (PVPF001-9 und Alginat/Chitosan) kaum unterschieden. Für einen eindeutigen Nachweis eines möglichen Partikeleffekts müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden zur Untersuchung folgender Fragen/Probleme:

- Reproduzierbarkeit der Rif W Produktion in Schüttelkolben Kultivierungen.
- Chargen bedingte Veränderung des Partikel-Effekts.
- Steigerung der Bindungskapazität und Optimierung der Desorption.
- Veränderung der Partikeleigenschaften durch die Sterilisation im Autoklaven.
- Optimierung der Rif W Freisetzung bzw. Analyse der nicht abgelösten Substanzen nach pH Shift.

W42/DFI/Surflay: Abschätzung der ökologischen und ökonomischen Auswirkungen des Partikeleinsatzes

Um den Einfluss der Zugabe der Partikel auf die Umweltbelastung des Gesamtprozesses zu bewerten, wurde der sogenannte E-Faktor verwendet. Der E-Faktor (environmental factor, Umweltfaktor) beschreibt die Menge des pro Produktäquivalent erzeugten Abfalls (Gleichung 1).

$$E = \frac{m_{\text{Waste}}}{m_{\text{Product}}}$$

Gleichung 1: E-Faktor

Der E-Faktor gibt damit einen Hinweis auf die verbrauchten Ressourcen in Bezug auf das erzeugte Produkt. Der E-Faktor schließt dabei allerdings weder den Energieverbrauch ein, noch unterscheidet er zwischen verschiedenen Abfallqualitäten wie harmlosen und toxischen Abfällen. Da eine vollständige Bewertung der Umweltauswirkungen (Ökobilanzierung) gerade in den frühen Stadien der Prozessentwicklung sehr zeitaufwändig ist, kann der E-Faktor trotz der Unzulänglichkeiten als ein wertvolles Instrument für die Bestimmung der Nachhaltigkeit auf reiner Ebene der Materialbilanz angesehen werden. Schließlich muss erwähnt werden, dass das eingesetzte Prozesswasser traditionell von der Berechnung des E-Faktors ausgeschlossen ist. Der Grund dafür ist, dass Wasser allgemein als grünes Lösungsmittel akzeptiert wird, da es keine oder nur geringe Umweltbelastungen verursacht.

Hier wurde der E-Faktor verwendet, um den oben beschriebenen Vergleich verschiedener Medien sowie die Wirkung der Partikel-Zugabe beispielhaft in Bezug auf die verbrauchten Ressourcen zu bewerten (siehe Abbildung 12).

Tabelle 11 zeigt die erzeugten Konzentrationen an Actinorhodin, die Massenkonzentrationen im Ausgangsmedium sowie die resultierenden E-Faktoren. Während die Produktkonzentration in beiden Minimalmedien mit Partikeln in einem vergleichbaren Bereich lag, unterschied sich der E-Faktor deutlich. Dies kann durch die hohen Mengen an Glukose und Natriumglutamat im Wentzel-Medium und die insgesamt erhöhten Substratkonzentrationen erklärt werden. Wie oben beschrieben, führt die Partikel-Zugabe zu einer erhöhten Produktkonzentration. Die Berechnung des E-Faktors zeigt, dass die Partikel-Supplementierung auch zu einem reduzierten E-Faktor in allen untersuchten Medien führte. Dies zeigt, dass der Anstieg in der Produktmenge durch die Zugabe von Partikeln die Massenbilanz des Gesamtprozesses verbessert. Um final zu entscheiden, welche Medien in ökologischer und ökonomischer Hinsicht die beste Performance aufweist, müssen weitere Faktoren berücksichtigt werden. Höchstwahrscheinlich sind die Komponenten des komplexen Mediums günstiger als u.a. die Vitamine in den Minimalmedien. Auf der anderen Seite kann die Verwendung von komplexen Medien negative Auswirkungen auf die Produktreinheit und -rückgewinnung haben und führt daher häufig zu komplizierteren Downstream-Prozessen.

Tabelle 11: Berechnete E-Faktoren zum Vergleich des Partikel-Effektes bei unterschiedlichen Kulturmedien

	C_{Produkt} in g L^{-1}	C_{Edukt} in g L^{-1}	E-Faktor in [-]
Borodina Medium	0,154	27,38	178
Borodina Medium + Partikel	0,293	32,38	111
Wentzel Medium	0,082	96,01	1168
Wentzel Medium + Partikel	0,216	101,01	468
Complex Medium	0,431	72,00	167
Complex Medium + Partikel	0,738	77,00	104

Um ein tieferes Verständnis der Auswirkungen der verschiedenen Medienkomponenten auf den E-Faktor zu erhalten, wurde der Beitrag der Komponenten zum gesamten E-Faktor untersucht (Abbildung 33). Die Medienkomponenten wurden dabei in sechs Gruppen unterteilt; C-Quelle (Glucose oder Maltose), komplexe Substanzen (z. B. Malzextrakt), Mineralien (z. B. NaCl oder MgSO), Spurenelemente, Vitamine und ggf. zugegebene Partikel. In allen Experimenten zeigte sich, dass die Kohlenstoffquelle einen wesentlichen Einfluss auf den E-Faktor hat (Anteil von 40% bis 73%). Die zweithöchsten Prozentzahlen ergeben sich für die mineralischen oder komplexen Medienkomponenten. Der Einfluss der Vitamine oder Spurenelemente auf den E-Faktor war recht gering (weniger als 0,3%). Die prozentualen Anteile der Partikel auf dem E-Faktor betrugen 15% in Kombination mit dem Borodina-Medium, 5% unter Verwendung des Wentzel-Mediums und 6,5% in den Kulturen mit komplexen Medien. Die entsprechenden absoluten E-Faktoren waren 17, 23 bzw. 7. Schließlich kann davon ausgegangen werden, dass Silica-Partikel eine vernachlässigbare Wirkung auf die Umwelt haben und im Sandfang einer Abwasserbehandlungsanlage entfernt werden können. Für beschichtete Partikel müssen ggf. weitere Analysen durchgeführt werden.

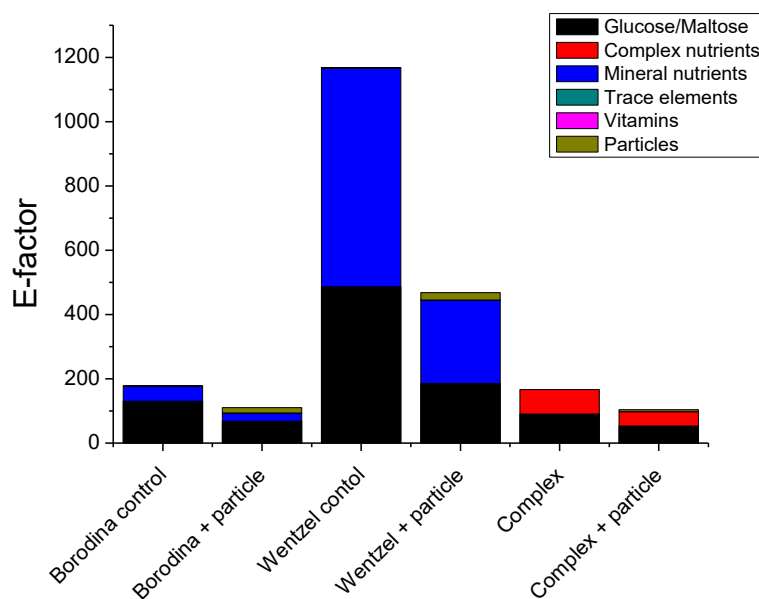


Abbildung 33: Verteilung mehrerer Medienkomponenten auf den gesamten E-Faktor

Der E-Faktor wurde im Rahmen dieser Bewertung als Parameter des ökologischen Einflusses der Partikel-Zugabe verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass die Partikel-Zugabe jeweils zu einem erhöhten E-Faktor führte, sollte in einem nächsten Schritt eine detailliertere Bewertung in Form einer Lebenszyklusanalyse durchgeführt werden.

Für eine Abschätzung der ökonomischen Auswirkungen der Partikel-Zugabe wurde die Produktion von Rebeccamycin (Abbildung 7, siehe auch die entsprechende Publikation J. Walisko, F. Vernen, K. Pommerehne, G. Richter, J. Terfehr, D. Kaden, L. Dähne, D. Holtmann, R. Krull (2015) Particle-based production of antibiotic rebeccamycin with *Lechevalieria aerocolonigenes*) näher betrachtet. Folgende Annahmen wurden für diese Berechnung gemacht:

- Der Substratverbrauch wird nicht verändert (siehe Publikation)
- Biomassebildung wird nicht verändert (siehe Publikation)
- Produktionsdauer sowie Energie- und Wasserkosten für die Prozesse wurden ebenfalls als konstant angenommen
- Als Produktpreis wurden 10% des Katalogpreises von Sigma-Aldrich angenommen
 - Rebeccamycin (Artikelnummer R4900, laut Katalog 42,50 €/250 µg = 170,20 €/mg)
- Entsorgungskosten laut persönlicher Mitteilung der Kläranlage Frankfurt Niederrad
- Höhere Produkttiter beeinflussen nicht die Aufarbeitung der Produkte
- Partikel-Kosten laut Projektpartner Surflay

Die weiteren Angaben und Berechnungen finden sich in

Tabelle 11.

Tabelle 12: Abschätzung der ökonomischen Auswirkungen der Partikel-Zugabe bei der Rebeccamycin-Produktion

	Ohne Partikel	Mit Partikeln	
Reaktorvolumen	100	100	L
Produktkonzentration	20	100	mg/L
Produktpreis	170	170	€/mg
Wert des produzierten Produktes	3200	16000	k€
Partikel-Konzentration	-	10	g/L
Preis der Partikel	-	20	€/g
Kosten der Partikel	-	20	k€
Feststoffanteil (Biomasse + Partikel)	10	20	g/L
Preis der Entsorgung der Feststoffe	0,6	0,6	€/kg
Entsorgungskosten	0,6	1,2	K€
Vergleich	3200	15980	k€
Faktor		5.0	

In dem betrachteten Prozess hat sich die Kostenstruktur durch den Partikel-Einsatz deutlich verbessert. Bei der Produktion des sehr hochpreisigen Rebeccamycin hat sich pro Fermentationslauf der Wert des Produktes verfünffacht. Die Kosten für den Partikel-Einsatz und die entsprechende Entsorgung haben hier nur eine untergeordnete Rolle auf die Kostenstruktur. Schlüssel für diese verbesserte Wertschöpfung ist die Verfünffachung der Produktkonzentration. Bei relativ günstigen Produkten wie Erythromycin reicht dagegen die Erhöhung des Produkttiters um ca. 150 % nicht aus, um die Kosten für den Partikel-Einsatz aufzuwiegen.

Fazit

Der MPEC-Effekt konnte mit verschiedenen Produzenten von Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden. Das generelle Vorgehen mit einem breiten Screening zu Projektbeginn und eine Fokussierung während der Projektlaufzeit hat sich als zielführend herausgestellt. Als Herausforderung hat sich die teilweise komplizierte Analytik der Stoffwechselprodukte sowie die Reproduzierbarkeit und Zeitdauer der Kultivierungen herausgestellt. Die Übertragung der Effekte auf Kultivierung in den Bioreaktor-Maßstab wurde erfolgreich durchgeführt. Es konnten mittels der Expressionsanalyse molekularbiologische Targets für weitere Optimierungen identifiziert werden. Es konnte weiterhin erfolgreich die Adsorption und Desorption von Sekundärmetaboliten an Partikel gezeigt werden, so konnte die Basis für *in-situ* Abtrennungsvorgänge gelegt werden. Es konnte allerdings kein allgemeingültiges Verfahren für die Produktion von verschiedenen Sekundärmetaboliten entwickelt werden, hier sind weiterhin je nach Produzent und Produkt Anpassungen notwendig. Es konnten ökologischen und ökonomischen Vorteile der partikel-basierten Prozesse gezeigt werden.

Öffentlichkeitsarbeit

Messepräsentationen

1. Darstellung des Projektes auf der Biotechnica 2013 (8. bis 10. Oktober 2013, Hannover)
2. Darstellung des Projektes im Rahmen der Hannover-Messe 2014 „Mikropartikelbasierte Kultivierung von filamentösen Pilzen: Wie Schimmelpilze dank Mikropartikeln besser arbeiten“ (siehe <http://biocorrosion.de/Hannover+Messe+2014.html>, 7.-11. April 2014)
3. Kurzvorstellung im Rahmen der ACHEMA 2015, BMBF-Stand, Filamentöse Mikroorganismen und die Mikropartikel-basierte Kultivierung (MPEC)
4. Kurzvorstellung des Projektes im Rahmen der Woche der Umwelt, Berlin 07.06.2016 (siehe https://www.woche-der-umwelt.de/index.php?menuecms=2708&programm_id=201)

Beiträge im Rahmen von wissenschaftlichen Tagungen

- Poster

1. Posterpräsentation bei der Summer School „Quantitative Biology“, Berlin, 21.7.-25.7.2015 „Microparticle-Enhanced Cultivation (MPEC) for Production of Antibiotic Compounds“
2. Posterpräsentation bei ProcessNet-Jahrestagung, Aachen, 30.9.-2.10.2014 „Microparticle-Enhanced Cultivation (MPEC) for Production of Antibiotic Compounds“
3. Posterpräsentation auf dem Stiftungstag des DECHEMA-Forschungsinstituts, Frankfurt am Main, 10.12.2014 „Microparticle enhanced cultivation of filamentous microbes for antibiotic production“
4. Posterpräsentation auf dem Stiftungstag des DECHEMA-Forschungsinstituts, Frankfurt am Main, 09.12.2015 „Microparticle enhanced cultivation of filamentous microbes for antibiotic production“
5. Posterpräsentation auf dem Stiftungstag des DECHEMA-Forschungsinstituts, Frankfurt am Main, 07.12.2016, „Microparticle based cultivation of filamentous organisms“

- Vorträge

1. I. Huth, L. Baumann, D. Holtmann, J. Schrader, Cultivation of *Aspergillus niger* in microtiter plates – gaining control of complex morphologies, ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 12.-15. September 2016
2. D. Holtmann, F. Vernen, I. Huth, F. Mayer, Particles prevent pellets: microparticle enhanced cultivation (MPEC) of filamentous microorganisms, Partec, Nürnberg, 19. -21. April 2016

- Peer-reviewed Publikationen

1. J. Walisko, F. Vernen, K. Pommerehne, G. Richter, J. Terfehr, D. Kaden, L. Dähne, D. Holtmann, R. Krull (2015) Particle-based production of antibiotic rebeccamycin with *Lechevalieria aerocolonigenes*, Process Biochemistry
2. D. Holtmann, F. Vernen, J.M. Müller, D. Kaden, J.M. Risse, K. Friehs, L. Dähne, A. Stratmann, J. Schrader (2015) Effects of particle addition to Streptomyces cultivations to optimize the production of actinorhodin and streptavidin, Sustainable Chemistry and Pharmacy

- weitere Massnahmen

1. Kurzdarstellung des Projektes im Internet (<http://dechema-dfi.de/Mikropartikelbasierte+Kultivierung+f%C3%BCr+die+Pharmazie.html>). Durch diese Maßnahmen konnten gleichermaßen Fachkollegen als auch die breite Öffentlichkeit über das Projekt im Allgemeinen und die entsprechenden Ergebnisse informiert werden.

Literaturangaben

1. der DECHEMA eV P (2004) Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland.
2. Kaup BA, Ehrich K, Pescheck M, & Schrader J (2008) Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng* 99(3):491-498.
3. Driouch H, Sommer B, & Wittmann C (2010) Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng* 2009/12/03(6):1058-1068.
4. Driouch H, Hänsch R, Wucherpfennig T, Krull R, & Wittmann C (2012) Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol Bioeng* 109(2):462-471.
5. Driouch H, Roth A, Dersch P, & Wittmann C (2011) Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioengineered Bugs* 2(2):1-5.
6. Gao D, Zeng J, Yu X, Dong T, & Chen S (2014) Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. *Biotechnology and Bioengineering*.
7. Gonciarz J & Bizukojc M (2013) Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. *Engineering in Life Sciences* 14(2):190-200.
8. Etschmann M, *et al.* (2014) Improving 2 - phenylethanol and 6 - pentyl - α - pyrone production with fungi by microparticle - enhanced cultivation (MPEC). *Yeast*.
9. Sohoni SV, Bapat PM, & Eliasson Lantz A (2012) Robust, small-scale cultivation platform for *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Cell Factories* 11(1):9.
10. Dobson LF, O'Clearigh CC, & O'Shea DG (2008) The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5):859-866.
11. Richter L, *et al.* (2014) Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. *Fungal Biol. Biotechnol* 1(4).
12. Driouch H, Roth A, Dersch P, & Wittmann C (2010) Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(6):2011-2024.
13. Stratmann A, *et al.* (2002) New insights into rifamycin B biosynthesis: isolation of proansamycin B and 34a-deoxy-rifamycin W as early macrocyclic intermediates indicating two separated biosynthetic pathways. *The Journal of Antibiotics* 55(4):396-406.
14. Stratmann A, *et al.* (1999) Intermediates of rifamycin polyketide synthase produced by an *Amycolatopsis mediterranei* mutant with inactivated *rifF* gene. *Microbiology* 145(12):3365-3375.