

Integrated protein design and process engineering led to production of over 100 g/L L-lysine in *C. glutamicum* with a single-mutation in the enzyme *lysC* and grown in a defined medium

Doinita Frank, Zhen Chen and An-Ping Zeng

Technische Universität Hamburg-Harburg, Hamburg/Deutschland

The success of industrial biotechnology requires integration of both strain development and process engineering. Here, we demonstrate an efficient approach of integrated cellular engineering and process engineering. On one hand, we have developed a concept of structure-based design for efficient strain development, which uses molecule structures as basis to predictably redesign enzyme properties, pathways and metabolic network. This technology can be used for precise control of biological reactions at the molecular level and accurate prediction/analysis of systems behaviour of cells upon genetic perturbation, significantly accelerating the process of strain development. On the other hand, classical tools of process engineering such as medium and fermentation optimization are integrated into the process of strain development, testing strain performance under industry-relevant process conditions.

As a proof of concept, this combined approach was demonstrated for lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Structure based strain development enabled us for the first time to systematically analyze and targeted redesign the allosteric regulation of aspartokinase (encoded by *lysC* gene), the key step toward lysine production. With only a single point mutation (Q298G) in *lysC* gene of wildtype *C. glutamicum*, the non-producer can accumulate significant amount of extracellular lysine even by simplest fermentation in shake flask. Further optimization of culture medium with defined compositions and fermentation process with proper feeding strategy enabled this strain to produce as high as 105 g/L Lysine*HCl with a conversion yield up to 36 % mol L-Lysine/mol glucose. This example demonstrated the feasibility and usefulness of structure-based design of strains and its integration with process engineering for industrial biotechnology.

Polymer/salt aqueous two-phase extraction of BSA

Anna Glyk, Elea Harder, Dörte Solle, Sascha Beutel, Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,

Callinstr. 5, D-30167 Hannover, Germany

As an effective extraction method, aqueous two-phase extraction systems based on polymer and salt have been used in this work. The extraction behavior of the model protein bovine serum albumin (BSA) by polymer/salt aqueous two-phase system (ATPS) was investigated. Considering the hydrophobic character, different polyethylene glycols with intermediate weights (2000, 4000, 6000, 8000) were used to form the ATPS. Sodium sulfate was chosen as the phase-forming salt because of its ability of promoting the hydrophobic difference between the phases.

Effects of PEG concentration (12-16 % (w/w)), sulfate concentration (8-10 % (w/w)), additive (NaCl) concentration (0-2 % (w/w)), PEG MW, and pH value (pH 5/6/7) of the systems on the extraction efficiencies have been determined. Optimal conditions of the extraction were studied using the fractional factorial design method.

It was found that pH value and NaCl concentration had a distinctive influence on the partitioning and extraction of BSA. The ATPS should be composed of 14 % (w/w) PEG and 9 % (w/w) sodium sulfate. ATPS of PEG 2000 or 4000 high pH values and high NaCl concentrations result in high yields (90-100 %) of BSA in one single extraction step. While in systems with PEG 6000 or 8000 high pH values and low NaCl concentrations result in high BSA yields. Additionally, systems of PEG 8000 with low pH values and high NaCl concentrations or average pH values and NaCl concentrations yield to very high BSA yields (95-100 %) in one extraction step.

Thus, the BSA was accumulating nearly quantitative in the salt-rich lower phase. The time for phase separation was estimated to be 30 min. This novel versatile extraction technology is advantageous over traditional extraction methods and is suggested to have important applications for the separation of e.g. proteins, enzymes, and other biomolecules.

Butyric acid addition and pH shift trigger n-butanol production in glycerol fermentation of *Clostridium pasteurianum*

Christin Groeger, Sven Grund, Wael Sabra, An-Ping Zeng

Institute for Bioprocess and Biosystem Engineering, Technical University of Hamburg-Harburg, Hamburg, Germany.

Butanol is an important bulk chemical for industry. It also offers great potentials as a fuel additive from renewable resources. On the other hand, glycerol as a waste product from biodiesel production is becoming a cheap and attractive substrate. *Clostridium pasteurianum* was previously shown to be able to convert glycerol into n-butanol or 1,3-propanediol (PDO) as major fermentation products. However, the factors affecting the product selectivity were not well understood. The current study investigated the effect of pH and butyric acid addition on growth and product profile variations from glycerol in cultures of *C. pasteurianum*.

The butanol/1,3-PDO ratio was also strongly influenced by the pH value. In batch culture without the addition of butyric acid, more acidic pH shifted the metabolism to butanol production. This was especially well demonstrated in pH shift experiments, where the culture first grew at pH 6 till the mid logarithmic phase and then shifted to different values. Again, the PDO production almost stopped immediately (from 0.14 g/L*h to 0.01 g/L*h) after the pH was shifted to a value of 5. At the same time, the butanol productivity increased from 0.24 g/L*h to 0.82 g/L*h. With these control pH shift as high as 12.3 g/L n-butanol can be produced with a yield of 0.41 g/g_{glycerol} and 5.76 g/g_{biomass}. At a constant pH of 6, it was shown that butyric acid addition resulted in redirecting the metabolism towards butanol instead of 1,3-PDO production. A butanol/1,3-PDO ratio of 2.4 was detected in batch culture with 5 g/L butyric acid, compared to 0.4 in experiment without any addition. Moreover, the addition of butyric acid in the mid logarithmic phase stopped the PDO production and a final concentration of 15 g/L n-butanol with a yield of 0.26 g/g_{glycerol} and productivity of 0.73 g/L*h was reached. Here we conclude that the selective production of butanol from glycerol can be established through either butyric acid addition or the shift in pH. Since a significant increase of the yield in g/g_{glycerol}, g/g_{biomass} and productivity (g/l*h) under these conditions were established, the in situ removal of butanol by gas stripping will enhance the process performance further.

Aptamer-based microarray for biosensing of small molecules

*Alexandra Heilkenbrinker, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institute of Technical Chemistry,
Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany*

The application of aptamer-based microarrays has many advantages over antibody-based microarrays. Aptamers are able to detect small non-immunogenic molecules without using macromolecules as carrier. Furthermore, they show a higher structural stability and can be regenerated without affecting activity. In comparison to antibodies, aptamers are able to bind their target under non-physiological conditions. These qualities are exploited to develop an aptamer-based microarray that can be used as a biosensor for detection of small molecules.

The biosensor is based on displacement of labeled target molecules. As a model system ethanolamine and a corresponding aptamer were used for detection of small molecules. Therefore, the aptamer was immobilized on an aldehyde-coated surface in microarray format. The ethanolamine target was fluorescently labeled using quantum dots. This enables detection of the aptamer-target binding by fluorescence measurement. The displacement of labeled target molecules by free ethanolamine results in a detectable reduction of fluorescence signal. This allows measurement of unlabeled ethanolamine in the picomolar range.

Due to its high sensitivity this biosensor could play a significant role in biotechnology and process engineering e.g. to detect small metabolism of microorganisms. It is also planned to analyze the aptamer-target bond in gaseous phase to realize a detection of volatile organic compounds. An aptamer-based gas analysis could enable a non-invasive monitoring of metabolic processes during cell cultivations in bioreactors. In medical diagnostics the analysis of exhaled breath is also conceivable.

Heterologous expression of green fluorescent protein (GFP) using *Escherichia coli* in a disposable bag reactor system

Patrick Jonczyk¹, Sascha Beutel¹, Thomas Scheper¹

¹*Gottfried Wilhelm Leibniz University Hanover, Institute for Technical Chemistry,
Callinstr. 5, 30167 Hanover, Germany*

Disposable bioreactor systems are capturing more and more market shares in commercial cultivations. They are available in different sizes, from very small milliliter scales up to industrial-scales with 2.000 l volume. Advantages of disposable cultivation systems compared to non-disposable systems are higher flexibility (fast change of cultivation media and organisms), decreased process downtime (shorter set-up and cleaning times), easy handling, cheaper acquisition costs and therefore an overall saving of time and money.

The employed disposable bag reactor system uses a rocking motion to dissolve oxygen wave-induced into the media. A disadvantage of wave induced systems is the lower oxygen entry into the culture, compared to conventional stainless steel STRs. Therefore wave-induced systems are usually used for cultivations with moderate or low oxygen consumption, e.g. mammalian cells.

In this study the feasibility of heterologous protein production by *Escherichia coli* in a disposable bag reactor was investigated. Due to the high oxygen demand of *E. coli* during growth and production phase technical changes were essential. A system used for mammalian cell culture was equipped with another mass flow controller to increase the air flow and satisfy the oxygen requirements.

Well known green fluorescent protein (GFP) was chosen as protein product because of the various and easy detection possibilities available from literature. Production was analyzed by fluorescence microscopy and SDS-PAGE.

Fluoreszenzmikroskopie zur kontinuierlichen Überwachung von Tier-Zellkultivierungen

Christian Lüder¹, Andreas Prediger¹, Patrick Lindner¹, Thomas Scheper¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, D-30167 Hannover

Im Bereich von Zellkultivierungen in Bioreaktoren, ist es für einen erfolgreichen Prozess von entscheidender Wichtigkeit, ständig über den Zustand der zu kultivierenden Zellen informiert zu sein. Besondere Bedeutung kommen dabei der Zellzahl pro Milliliter und der Viabilität der Zellen zu. Eine hohe Zelldichte ist nicht das alleinige Kriterium zur Charakterisierung der Zellen, sondern erst mit der Information der Viabilität können Aussagen über den weiteren Verlauf der Kultivierung getroffen werden.

Um diese Informationen aus einer laufenden Kultivierung zu erhalten wurde eine offline Analyse entwickelt, bei der Zellproben mit fluoreszierendem Viabilitätsfarbstoff im Durchflussmikroskop untersucht wurden. Die zur Bildaufnahme verwendete CCD-Kamera detektiert nur Licht im Emissionsmaximum von Calcein, somit können durch die unterschiedlichen Grauwerte der Zellen Aussagen über die Viabilität getroffen werden.

Maßgeblich für dieses Verfahren ist die automatisierte Bildanalyse, welche aus den aufgenommenen Bildern anhand der Grauwerte lebende von toten Zellen unterscheidet und außerdem die Zellzahl ermittelt. Lebende Zellen erscheinen aufgrund der Calcein-Färbung auf den aufgenommenen Bildern heller. Aus diesem Grund wurde ein mehrstufig arbeitender Algorithmus programmiert, um trotz der unterschiedlich hellen Objekte die Morphologie dieser korrekt wiederzugeben. Durch die morphologischen Informationen die aus den Bildern gewonnen werden, können in Zukunft weitere Aussagen über die Vitalität der Zellen getroffen werden. Es konnte bei einer Validierung erfolgreich gezeigt werden, dass die so ermittelte Viabilität mit der mittels Neubauer Kammer und Trypanblau-Färbung übereinstimmt.

Es ist geplant diese Analyse auch online zu betreiben und mit den Ergebnissen der Bildanalyse regelungstechnische Schritte zur Prozesssteuerung durchführen zu können, womit ein weiterer Baustein zur automatisierten Zellkultivierung gelegt ist.

Vergleich verschiedener Bioreaktorsysteme zur Kultivierung von Salbeizellkulturen

B. Ludwig¹, K. Muffler¹, D. Leipold¹, T. Möhlmann², E. Neuhaus²,
J. Steingroewer³, C. Haas³, T. Bley³, R. Ulber¹

¹Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, 67663 Kaiserslautern

²Lehrgebiet Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern, 67663 Kaiserslautern

³Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden, 01069 Dresden

Seit der Antike wird Salbei als eine bedeutende Heilpflanze verwendet und ist auch gegenwärtig aufgrund des hohen Triterpengehalts für die Pharmazie von Interesse. Die beiden Triterpensäuren Ursol- und Oleanolsäure stellen in der Salbeipflanze jene Triterpene mit dem höchsten Massenanteil dar und können mit einem Gehalt von 4 % in der Trockensubstanz der Pflanze enthalten sein. Die biologische Aktivität sowohl von Ursol- als auch Oleanolsäure ist sehr vielfältig und weist z.B. neben einer antitumoralen auch eine entzündungshemmende Wirkung auf. Ein Problem für die Wirkstoffherstellung stellt allerdings die Verwendung der nativen Pflanze dar, da diese aufgrund wechselnder Umwelteinflüsse wie z.B. Temperatur, Feuchtigkeit und/oder Licht unterschiedliche Gehalte an Triterpenen aufweisen kann. Eine Möglichkeit, Triterpene unter GMP-konformen Bedingungen zu produzieren, eröffnet sich über die Pflanzenzellkulturtechnik, wobei Salbeizellen unter axenischen und kontrollierten Bedingungen in Reaktorsystemen kultiviert werden.

Im Rahmen des Beitrags wird die Kultivierung von Salbeizellen in verschiedenen Reaktorsystemen vorgestellt, die sich durch unterschiedliche Arten des Leistungseintrags auszeichnen. Eine Charakterisierung des Wachstums der eingesetzten Zellsuspension von *Salvia* sp. sowie der Produktion der Zielsubstanzen wird für die folgenden Systeme vorgestellt: Schüttelkolben, Rührkessel- und Wave-Bag-Reaktor. Bei dem untersuchten biologischen System handelt es sich um eine gentechnisch modifizierte Salbeizelllinie, die eine optimierte Saccharose-Aufnahme aufweist.

Dieses Vorhaben wird aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter den Förderkennzeichen NE 418/17-2, BL 345/10-2 und UL 170/8-2 finanziell unterstützt.

Continuous culture and extracellular recombinant protein production in *Escherichia coli* using alternative plasmid selection mechanism

Velur Selvamani R.S., Friehs K., Flaschel E., Fermentation Engineering, Faculty of Technology, Bielefeld University, Bielefeld, Germany.

The expression of recombinant proteins from *Escherichia coli* along with the possibility of their secretion into the extracellular space is a highly desirable feature due to reasons like easier downstream purification, avoiding accumulation of toxic proteins in the host cell and protection of the product from degradation by the host. This feature has been well-studied and characterized previously using a variety of genetic constructs and culture conditions (1). The expression of Bacteriocin Release Protein (BRP) controlled by a growth-phase regulated promoter (P_{fic}), aids in the release of recombinant proteins from the periplasmic space through the outer membrane. In a continuous culture milieu, it is of major interest to know what kind of interplay would be seen between growth-phase regulated promoters that control release protein genes and the efficiency and productivity of a chemostat process. To make this continuous process even more sustainable, alternative plasmid selection mechanisms were tested with the aim of avoiding antibiotic-based selection mechanisms. This study describes the establishment of a continuous process with an auxotrophic strain of *Escherichia coli* for the expression and secretion of a model protein (β -glucanase) wherein, the recombinant plasmid was stabilized by the presence of a cloned copy of the auxotrophy-complementing gene. The plasmid stability achieved in a continuously cultivated *Escherichia coli* fermentation, in the absence of any antibiotics, with extracellular expressed recombinant protein provides an interesting process strategy.

Reference:

1. Beshay, U., Miksch, G., Friehs, K., & Flaschel, E. (2009). Integrated bioprocess for the production and purification of recombinant proteins by affinity chromatography in *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 32(2), 149-58.

Aptamerproduktion mittels enzymatischer Festphasenamplifikation

Ralf Stadtmüller, Nils Tippkötter, Roland Ulber

Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, Deutschland

Das Produktspektrum der pharmazeutischen Industrie gewinnt sowohl im Bereich der Wirkstoffe als auch auf dem Feld der Bioassays fortwährend an chemischer Diversität, während die Anforderungen an Produktreinheit und -qualität steigen. Diese Trends bedingen eine wachsende Nachfrage für hoch sensitive und dabei schonende Aufreinigungs- und Nachweistechiken bzw. -liganden, die sich auf Moleküle unterschiedlichster Art und Größe übertragen lassen.

Hoch spezifisch wechselwirkende Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide, sog. ssDNA-Aptamere, ermöglichen als Affinitätsliganden die Kombination von industriell einsetzbaren Trenn- und Analysetechniken mit einer Selektivität und Bindungsstärke, die Antikörperbindungen gleichzusetzen ist. Gleichzeitig verfügen ssDNA-Aptamere über eine höhere Stabilität und sind unter geringerem Aufwand synthetisierbar. Jedoch beruhen bisherige Methoden zur Produktion von ssDNA auf einer chemischen Festphasensynthese, die im Optimum bereits bei einer Sequenzlänge von 100 Nukleotiden zu einem Anteil an Fehlamplikaten von ca. einem Drittel der Produktionsmenge führt. Der vorliegende Ansatz untersucht die Amplifikation von Makronukleotiden in einem enzymatischen Prozess mit einem minimalen Anteil an Nebenprodukten und dem Potential zur Automatisierung und Miniaturisierung.

Enzymatische Festphasenamplifikation

Die Synthesetechnik wird in Form eines *in vitro* Amplifikationsverfahrens realisiert und basiert auf dem Prinzip einer PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hierbei wird ein, dem Aptamer revers komplementäres, Makronukleotid auf einer Oberfläche kovalent immobilisiert und dient im Anschluss der DNA-Polymerase als Templat einer Festphasen-PCR. Ein großer Vorteil liegt in der Sequenzgenauigkeit, die bereits bei Enzymen ohne *proof reading* Aktivität um den Faktor 40 höher als bei modernen chemischen Synthesetechniken ist. Um sterische Inhibitionen zu minimieren, ein möglichst standardisiertes Primer-Annealing für verschiedene Aptamere zu etablieren und ein Recycling der eingesetzten Primer zu ermöglichen, wird das Templat im Vorfeld um entsprechende Sequenzmotive erweitert. Nach ersten erfolgreichen *Proof-of-principle* Versuchen wird die Amplifikation zurzeit in Abhängigkeit verschiedener Parameter, wie z.B. der PCR-Methode (*hot/cold start*), untersucht.

Biomassebilanzierung von Basidiomyceten im Feststoffreaktor mittels Durchflusszytometrie

S. Steudler¹, U. Böhmer², Th. Bley¹

¹*Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Dresden*

²*Gesellschaft für Technologie und Wissenstransfer TUD GmbH*

Die steigende Notwendigkeit der Nutzung nachwachsender Rohstoffe erfordert den Einsatz neuer biotechnischer Methoden. Die Feststofffermentation ist ein robustes Verfahren, das sich hervorragend für die on-site Kultivierung von Basidiomyceten unter Nutzung von lignocellulosehaltigen Reststoffen unter anderem zur Gewinnung von Enzymen für die Behandlung von Lignocellulosen eignet. Problematisch sind jedoch das Monitoring und die Kontrolle von Prozessparametern, welche aber wichtig für die Erstellung von Bilanzierungen, Fermentationsstrategien und Scale-up-Strategien sind. Die wichtigste Bilanzierungsgröße ist hierbei die Biomasse. Allerdings ist eine direkte Biomassebestimmung bei dieser Fermentationsart nicht möglich, so dass auf indirekte Wachstumsparameter zurückgegriffen werden muss. Die meisten dieser Verfahren sind jedoch in ihrer Durchführung sehr aufwändig und kostenintensiv. Erstrebenswert ist daher eine schnelle, einfache und preisgünstige Alternativmethode.

Am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Dresden wurde ein Verfahren entwickelt, welches die schnelle und einfache Quantifizierung der Pilzbiomasse bei einer Feststofffermentation mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Dabei werden die Zellkerne nach dem mechanischen Aufschluss der Probe mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und mittels eines Durchflusszytometers (Partec CyFlow[®] SL FCM System (CY-S-1035)) ausgezählt. Anhand einer Kalibriergerade wird anschließend die entsprechende Biomasse bestimmt. Dieses Verfahren benötigt nur eine halbe Stunde bis zum Erhalt des Messergebnisses und erzielt im Vergleich mit anderen Bestimmungsmethoden, zum Beispiel die Bestimmung über den Ergosterolgehalt, ebenso gute Ergebnisse. Im Praxistest konnte mit Hilfe dieser preisgünstigen Methode erfolgreich das Wachstum von *T. hirsuta* auf Kieferhackschnitzel bzw. Maissilage sowohl im kleinen (Arbeitsvolumen 100 mL) als auch im großen Maßstab (Arbeitsvolumen 10 L) über einen Zeitraum von acht Wochen nachvollzogen werden.

Lipase catalyzed esterifications in supercritical CO₂

R. Ulmann, S. Alemdar, S. Beutel, T. Scheper

Leibniz University, Institute for Technical Chemistry, Hanover, Germany

The natural role of Lipases (EC 3.1.1.3) is the hydrolysis of triacylglycerides into free fatty acids and glycerol in aqueous solution. However, they are also able to catalyze the reversible reaction (i.e. esterification) in organic solvents containing an alcohol and a fatty acid. Therefore, they are used in various industrial processes, including organic and food chemistry.

Nowadays, modern chemistry focuses more and more on the avoidance of conventional organic solvents because of their critical health and environmental effects. Supercritical Carbon Dioxide (scCO₂) is a fluid, which is formed at temperatures and pressures above its critical point ($T > 304.25 \text{ K}$, $p > 7.39 \text{ MPa}$), resulting in fluid properties that lay between a gas and a liquid. It has several advantages compared with organic solvents: It is inert and a non-toxic, non-polluting and non-flammable fluid. It is available in high amounts and has low production costs. After the reaction process, it can be completely removed by expansion of pressure, thus leading to products in high purity.

In the current study, several effects on enzymatic esterification of oleic acid with methanol and ethanol, respectively, were studied as model reactions. Lipase B from *Candida Antarctica* (CalB) was chosen as the biocatalyst. A gas chromatography was established to separate oleic acid from both oleates successfully and to determine product yields. Due to similar solvation properties, hexane was chosen as the reference medium for a first screening. The highest yields of esterification were determined in a 30 % (w/w) buffer solution at pH 10 and 32 °C after 4 h of reaction: 32 % for methyl oleate and 43 % for ethyl oleate, respectively. A high-pressure plant was constructed to perform the esterification in scCO₂. By using the same parameters, 19 % of methyl oleate and 33 % of ethyl oleate were determined after 4 h. Further investigations will focus on the effect of pressure on ester synthesis.

Aptamers as ligands in affinity separations

*Johanna-Gabriela Walter, Guohong Zhu, Frank Stahl, Thomas Scheper
Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie,
Hannover, Germany*

The purification of biotechnological products from complex sources like fermentation broth, cell culture supernatants or natural sources is the major task of downstream processing. Aptamers are single-stranded synthetic DNA or RNA oligonucleotides that are able to capture their target molecule with high affinity and specificity. In the context of affinity separation, the main advantages of aptamers are their high stability, the possibility to select aptamers that are functional under desired conditions and to design suitable methods for the elution of the target during the selection process of the aptamer.

Within this study, we demonstrated the suitability of aptamers as ligands in affinity separations by using three different aptamers.

- Utilizing aptamers directed against the His-tag we have developed an aptamer-based purification method for His-tagged proteins.
- Aptamers directed against human IgG were used to purify IgG from serum. Moreover, the used aptamers enable the gentle elution of bound protein with the chelating agent EDTA.
- We have investigated the possibility to exploit aptamers for the purification of small molecules by utilizing an aptamer directed against theophylline to isolate theophylline from closely related xanthenes.

The development of the aforementioned aptamer-based purification strategies was performed utilizing magnetic beads as a matrix. Moreover, we have transferred the strategy to sepharose in order to enable an easy scale-up of the purification.

In summary, we have demonstrated that aptamers are valuable alternative affinity ligands in diverse downstream processing tasks including the purification of proteins as well as small molecules.

Funktionalisierung von Magnetpartikeln mit Aptameren für die spezifische Proteinabtrennung

*S. Wollny¹, R. Stadtmüller¹, N. Tippkötter¹, H. Schneider², J. Oster³, P. Kampeis⁴,
R. Ulber¹*

¹ *Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland*

² *ABBIS bio process automation / Vulkan Technic Maschinen-Konstruktions GmbH, Wiesbaum, Deutschland*

³ *PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Baesweiler, Deutschland*

⁴ *Umwelt-Campus Birkenfeld, FH Trier, Birkenfeld, Deutschland*

Die Aufarbeitung pharmakologischer Wirkstoffe bedarf mehrstufiger Prozesse, die bis zu 90 % der Gesamtherstellungskosten ausmachen können. Durch die Funktionalisierung magnetischer Partikel mit selektiven Gruppen ist die Anwendung bereits im Fermentationsaufschluss ohne vorherige Aufreinigung möglich. Nach erfolgter Bindung des Zielmoleküls werden die Partikel magnetisch zurückgehalten, während sie gewaschen, eluiert und recycelt werden können. Diese Kombination bedeutet eine Minimierung der benötigten Abtrennungsoperationen und der damit verbundenen Prozesskosten. Als Liganden werden Aptamere (kurze Oligonukleotidsequenzen mit bis zu 80 Basen) verwendet, die spezifisch Moleküle über ihre dreidimensionale Struktur binden können.

In dem vom BMWi im Rahmen der AiF/ZIM-Kooperation (KF 2031212 FR0) geförderten Projekt wird His₆-GFP als Modellprotein mittels Aptamer-funktionalisierten Magnetpartikeln aufgearbeitet. Die mit Polyvinylalkohol beschichteten Magnetpartikel werden chemisch aktiviert und kovalent mit Oligonukleotiden beladen. In darauf folgenden Bindungs- und Elutionsuntersuchungen mit His₆-GFP wird die Kapazität der Aptamerpartikel sowie ihre Wiederverwendung und Lagerstabilität überprüft. Zudem wird die Bindungsspezifität des His₆-GFPs an die Aptamerpartikel im Fermentationsaufschluss von *E. coli*-Zellen untersucht.

Mittel- und Nahinfrarotspektroskopie zur online Überwachung von CHO-Kultivierungen

M. Sandor¹, F. Rüdinger¹, R. Biener², D. Solle¹,
C. Grimm², T. Scheper¹

¹*Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover, Callinstraße 5, D-30167 Hannover*

²*Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Straße 11,
D-37079 Göttingen*

Die Kultivierung von CHO Zellen (chinese hamster ovary cells) ist in der Biotechnologie ein etablierter Prozess zur Produktion von rekombinanten Proteinen und Antikörpern als Humantherapeutika. Eine lückenlose Überwachung der Kultivierung erlaubt es in einen laufenden Prozess frühzeitig eingreifen zu können und Ausfallzeiten zu minimieren.

Verschiede Prozessvariablen (pH, pO₂, Temperatur) werden standardmäßig *in situ* online überwacht und geregelt. Diese Prozessvariablen ermöglichen jedoch keine genauen Rückschlüsse über den Status einer Kultivierung. Zu den dafür relevanten Variablen gehören die Zelldichte, Viabilität sowie die Substrat- und Produktkonzentration. Diese Prozessvariablen werden in der Regel invasiv at-line oder offline analysiert.

Die mittlere und nahe Infrarotspektroskopie (MIRS und NIRS) erlauben eine gleichzeitige zerstörungsfreie *in situ* Überwachung mehrerer Variablen in Echtzeit. Bei den durchgeführten Säugetierzellkultivierungen (CHO-K1) wird die Konzentration von Glukose und anderen kritische Variablen, wie die Zellzahl, mittels spektroskopischer Verfahren online überwacht.

Infrarotspektren sind multivariate Daten, so dass zur Quantifizierung der einzelnen Variablen aus den Spektren multivariate Kalibrationsmodelle erstellt werden müssen. Die Vorhersagequalität der Modelle wird anhand separater Kultivierungen, die nicht Teil des Kalibrationsmodells sind, validiert und beide spektroskopische Methoden werden vergleichend beurteilt.