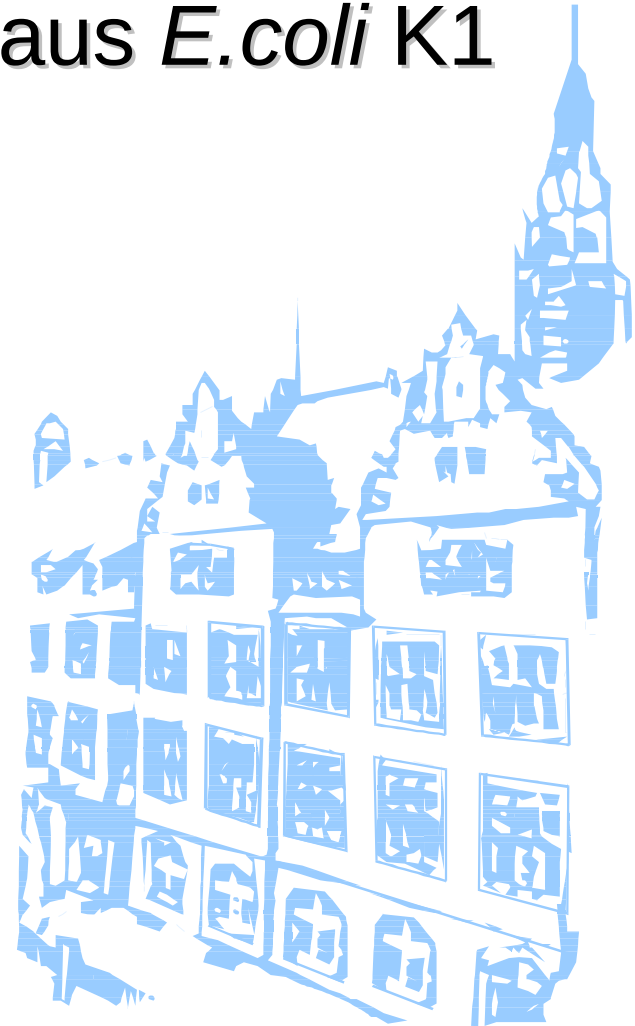


Produktion von Polysialinsäure aus *E.coli* K1

Ismet Bice
Universität Hannover
Institut für Technische Chemie
Callinstr. 5
30167 Hannover
Germany



Kultivierung: Batch

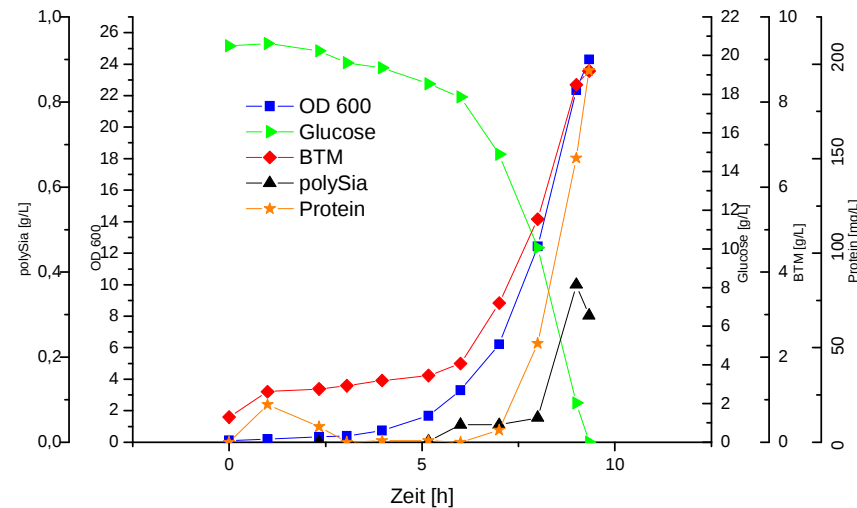
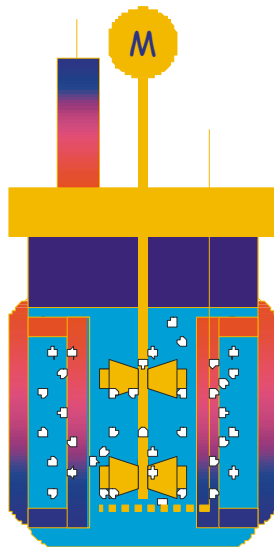


Abb.1: batch-Kultivierung im 10 L Biostat C

- 0,298 g/L polySia

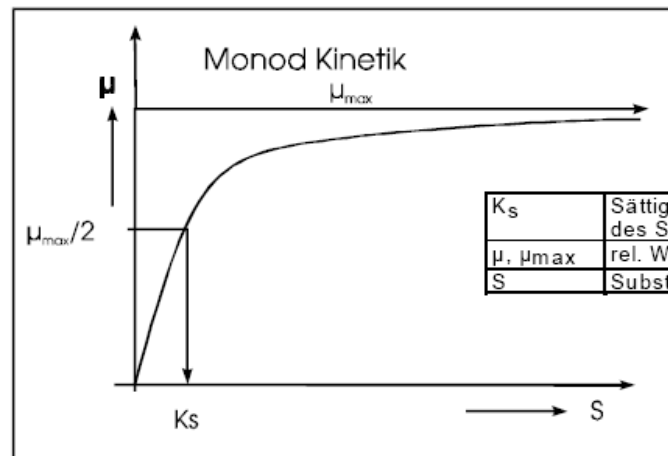
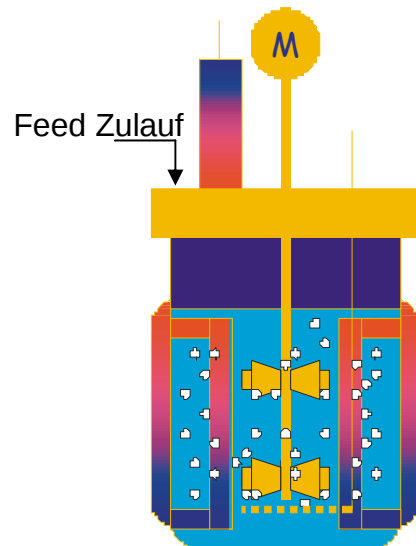
- $\mu = 0,45 \text{ 1/h}$

Ausbeutekoeffizient:

$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$
0,397 g/g	0,0367 g/g	0,0153 g/g

Kultivierungsbedingungen (batch)	
Temperatur	37 °C
Rührgeschw.	1000 rpm
pH	7,5
Begasung	8 L/min

Kultivierung: Fed-batch



$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

K_s	Sättigungskonstante - ist ein Maß für die Affinität des Substrates zum Mikroorganismus
$\mu, \mu_{\max}$	rel. Wachstumsrate
S	Substratkonzentration

Kultivierungsbedingungen (batch/ fed-batch)		
Temperatur	37 °C	/ 37 °C
Rührgeschw.	1000 rpm	/ 150-1250 rpm
pH	7,5	/ 7,5
Begasung	10 L/min	/ 1-10 L/min

Kultivierung: Fed-batch

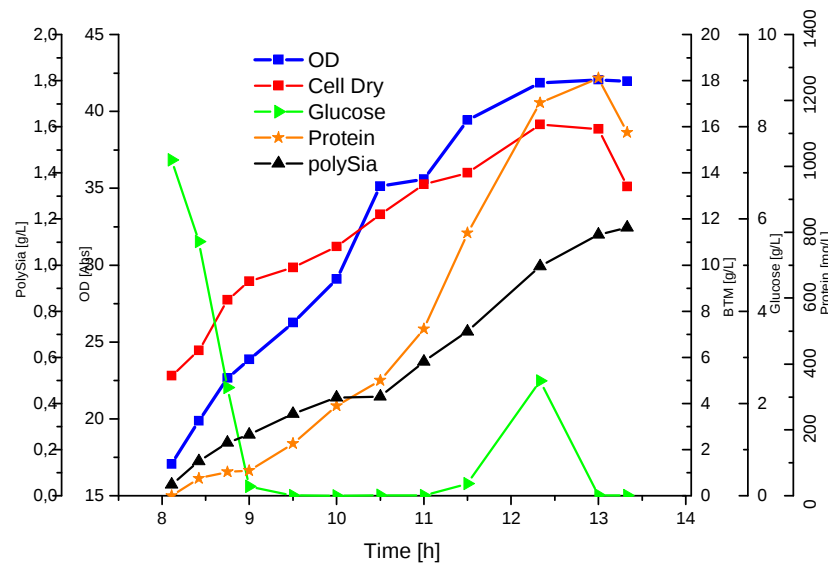


Abb.2: Fed-batch-Kultivierung im Biostat C (8L)

- 1,16 g/L polySia

Synthetisches Medium		(Vorlage/Feed)
Substrat	Glucose	20 g/L / 250 g/L
N-Quelle	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L / -
Puffer	KPP	0,08 M / 0,08 M
Salzlösung		1 mL/L / 2 mL/L

Ausbeutekoeffizient:

Y _{X/S}	Y _{P/X}	Y _{P/S}
0,2068 g/g	0,0867 g/g	0,0179 g/g

Kultivierung: Fed-batch

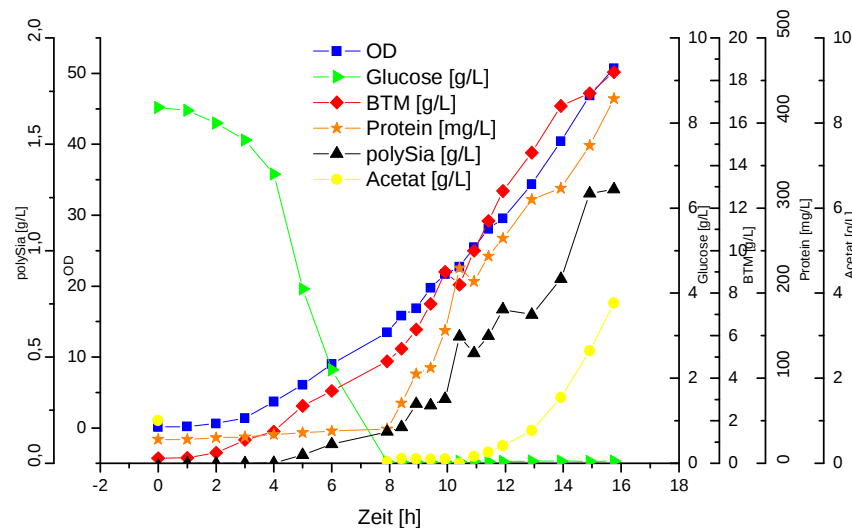


Abb.3: Fed-batch-Kultivierung im Biostat C (10 L)

- 1,29 g/L polySia

Synthetisches Medium		(Vorlage/Feed)
Substrat	Glucose	10 g/L / 250 g/L
N-Quelle	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L / -
Puffer	KPP	0,08 M / 0,08 M
Salzlösung		1 mL/L / 2 mL/L

Ausbeutekoeffizient:

Y _{X/S}	Y _{P/X}	Y _{P/S}
0,325 g/g	0,0698 g/g	0,0227 g/g

Kultivierung: Fed-batch

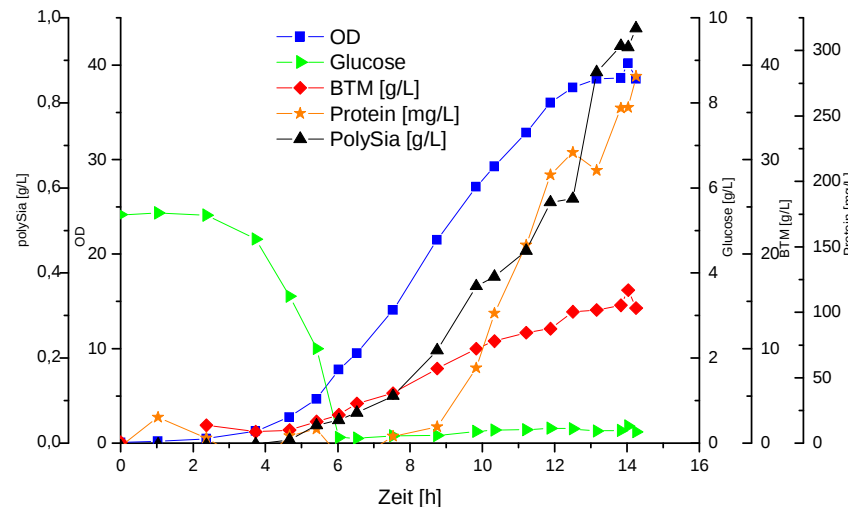


Abb.4: fed-batch-Kultivierung im Biostat C (10 L)

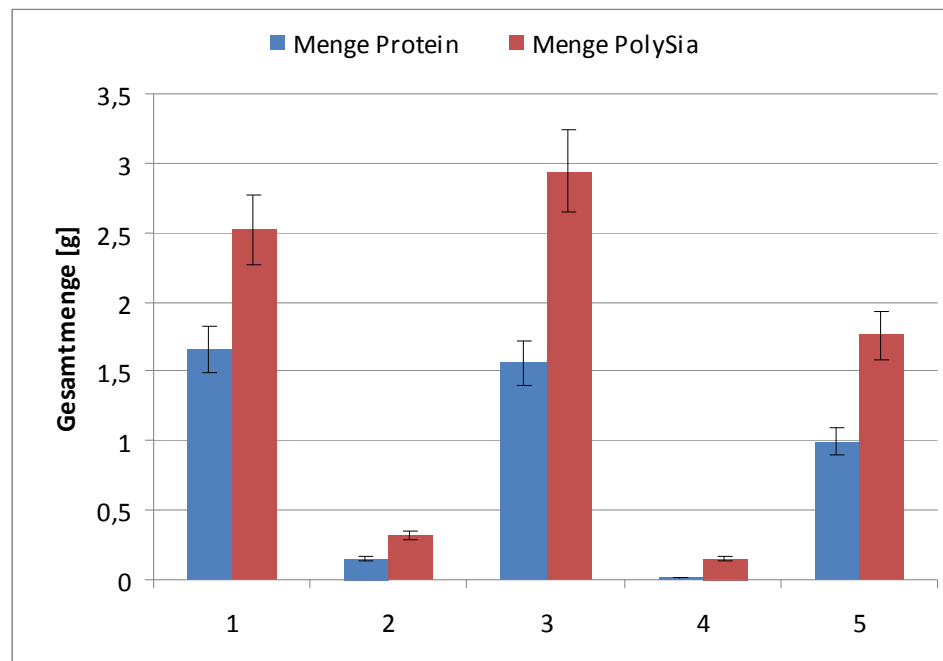
- 0,9752 g/L polySia

Synthetisches Medium		(Vorlage/Feed)
Substrat	Glucose	5 g/L / 200 g/L
N-Quelle	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L / -
Puffer	KPP	0,08 M / 0,08 M
Salzlösung		1 mL/L / 2 mL/L

Ausbeutekoeffizient:

$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$
0,3228 g/g	0,0682 g/g	0,0222 g/g

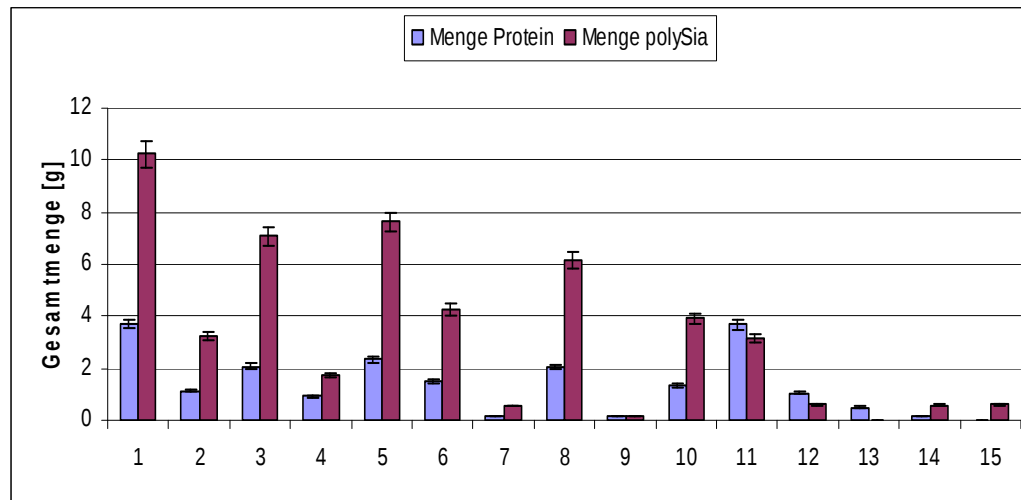
Aufreinigung: Batch



1. Überstand Reaktor nach Ernte
2. Ultrafiltration 0,45 μ m Retentat
3. Ultrafiltration 0,45 μ m Permeat
4. Ultrafiltration 10 kDa Permeat
5. Ultrafiltration 10 kDa Retentat

- Kont. Zentrifuge ersetzt durch Cross flow - Filtration

Aufreinigung: Fed- batch



1. Überstand Reaktor nach Ernte
2. Ultrafiltration 0,45 µm Retentat
3. Ultrafiltration 0,45 µm Permeat
4. Ultrafiltration 0,45 µm Retentat nach Verdünnung mit dd H₂O
5. Ultrafiltration 0,45 µm Permeat nach Verdünnung
6. Ultrafiltration 10 kDa Retentat
7. Ultrafiltration 10 kDa Permeat
8. Retentat nach Fällung mit 45 % (v/v) Aceton, Überstand
9. Acetonpellet resuspendiert in dd H₂O
10. Überstand nach Aceton Abrotation
11. nach Fällung mit Cetavlon, Überstand
12. Cetavlonpellet gelöst in 1M NaCl
13. Überstand nach Fällung mit 80 % (v/v) Ethanol
14. Pellet nach 80 % Ethanolfällung in dd H₂O resuspendiert
15. Nach 3 Tagen Adsorber

10 g → 0,65 g polySia
 100 % → 6,5 %

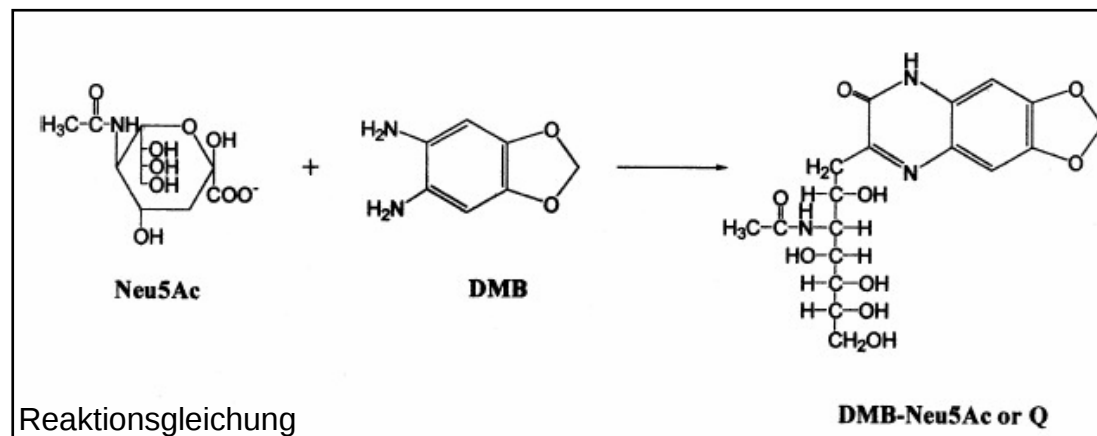
Verluste

Durchschnittliche Verlustprozentage an polySia während der einzelnen Aufreinigungsschritte von den Ernten aus Batch- und Fed-batch-Prozessen unter Berücksichtigung von Messfehlern der polySia- Konzentration:

Reinigungsschritt	Batch	Fed-batch
Ultrafiltration (0,45 µm)	1 bis 10 %	10 bis 40 %
Ultrafiltration (10 kDa)	bis 30 %	30 bis 40 %
Aceton-Fällung (45 %)	~ 10 %	12 bis 15 %
Aceton-Fällung (>75 %)	< 10 % *	-
Cetavlon-Fällung (10 g/L)	< 1%	> 74 %
Ethanol-Fällung (80 %)	< 1 %	< 1 %
Adsorber Ex M 1753	< 1%	< 1 %
Gesamt	45-50 %	89- 95 %

* Bei 80 % (v/v) Aceton werden 100 % gefällt

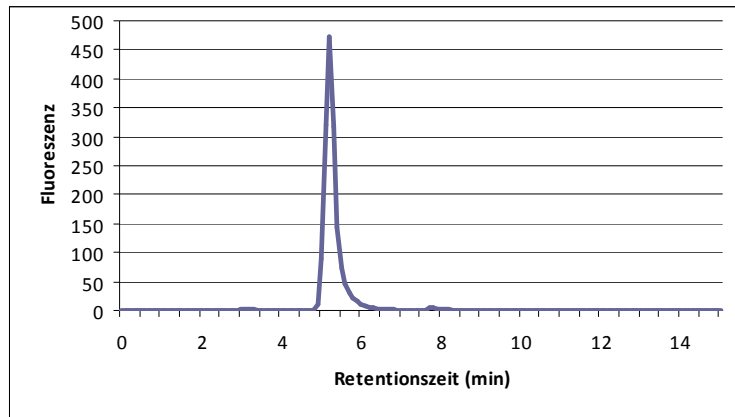
DMB-HPLC



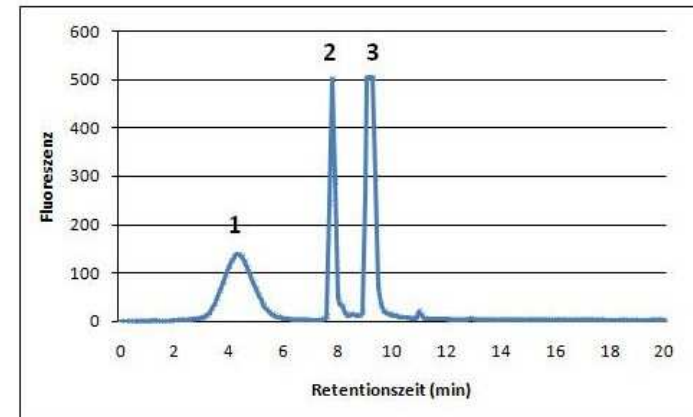
DMB-Markierung von polySia:

Schritt	Lösung/Behandlung	Volumen	Temperatur	Dauer
	Probe	10 µL (10 mg/mL) Probe + 70 µL dd H ₂ O	8 / 50 °C	5 / 24 h
Färbung	DMB-Reagenz	80 µL		
Hydrolyse	40 mM TFA	80 µL		
Abbruch	1 M NaOH	20 µL	-	-

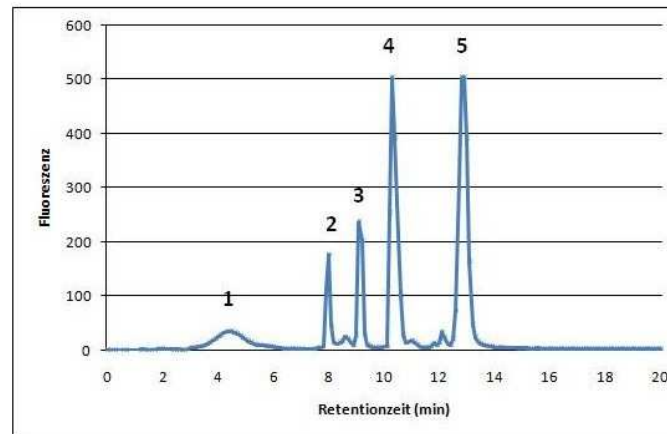
DMB: Standard (MHH, Abt.: Frau Prof. Dr.Gerardy-Schahn)



Neuraminsäure



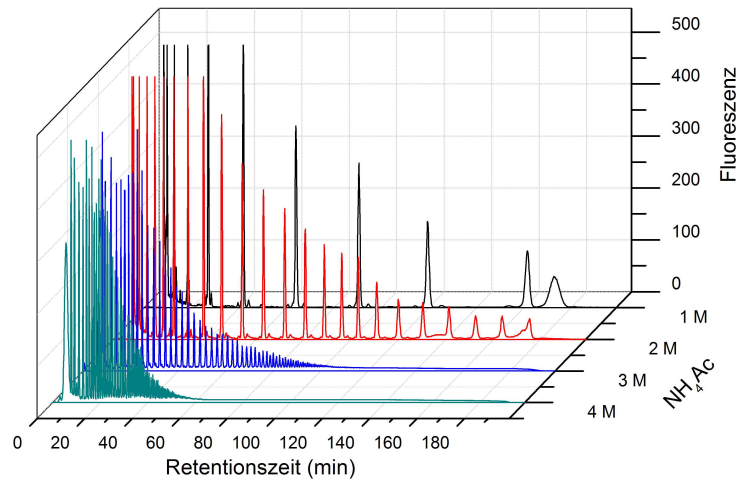
DP3



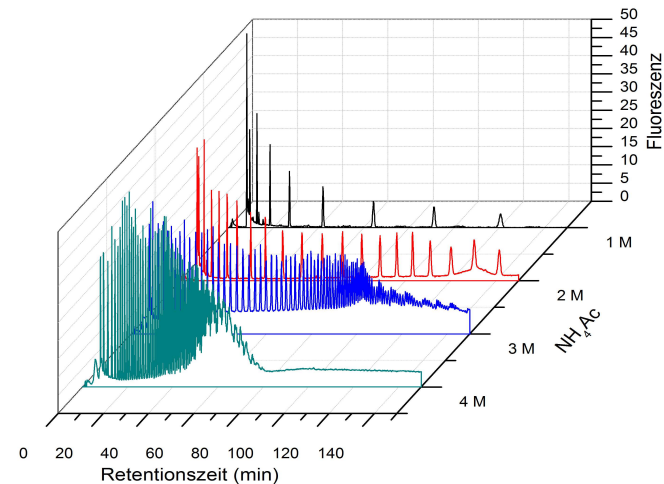
DP5

DMB: Optimierung

5 h bei 50 °C



24 h bei 8 °C

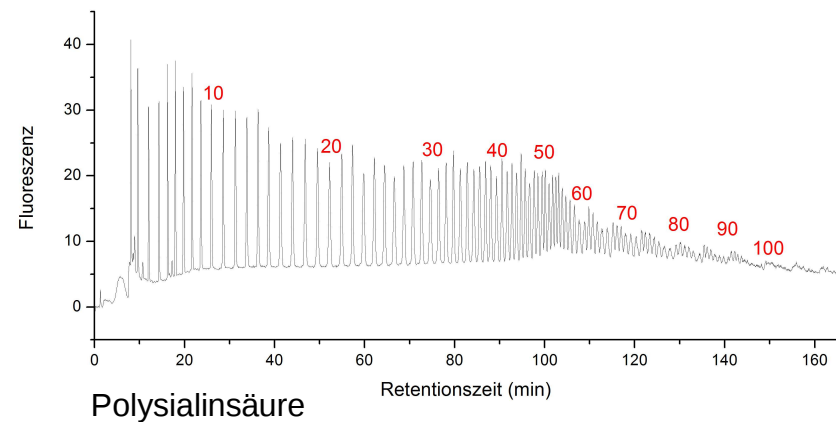
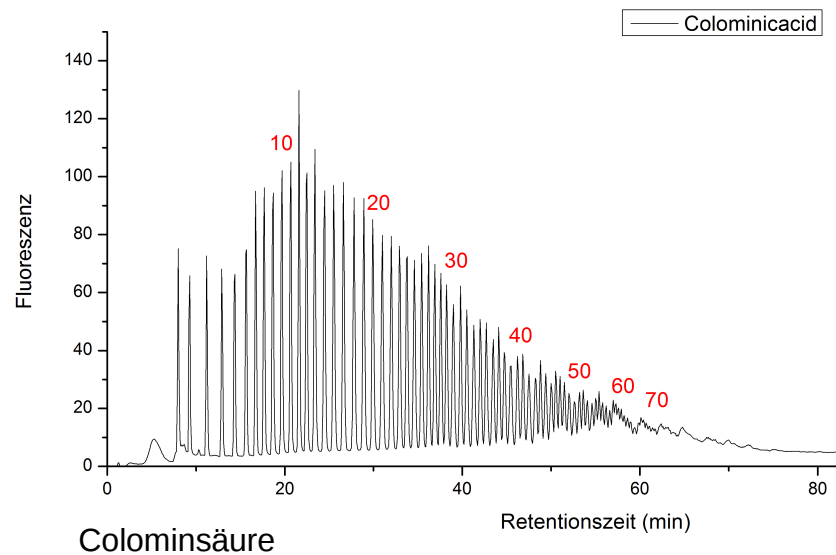


Optimal:

→ Reaktion bei 8 °C und 24 h

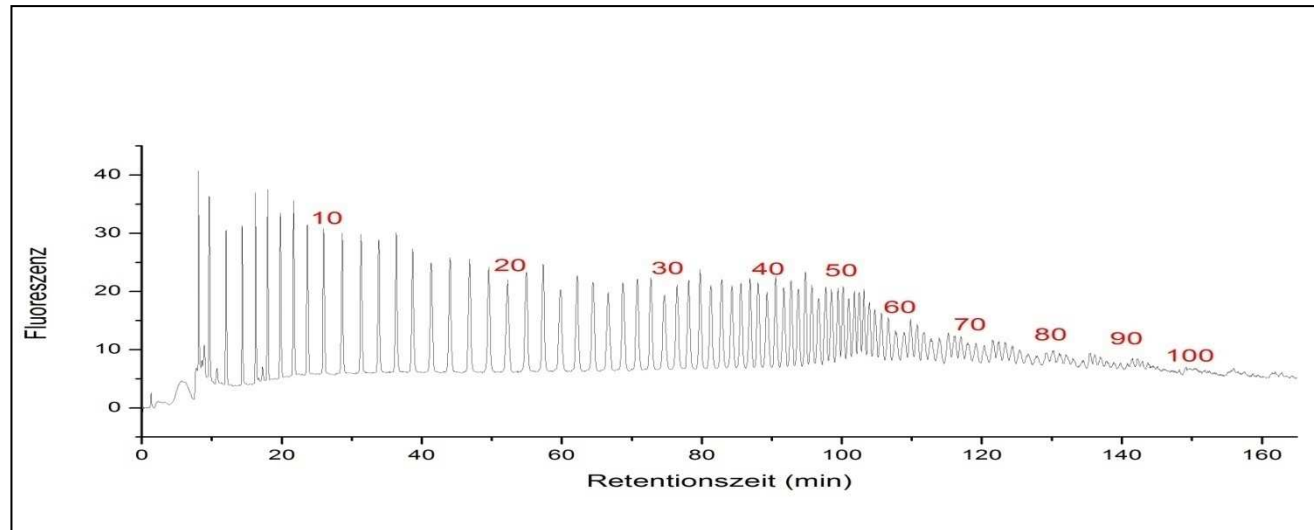
→ Laufmittel dd H₂O und 3-4 M NH₄Ac

DMB: Colominsäure und Polysialinsäure

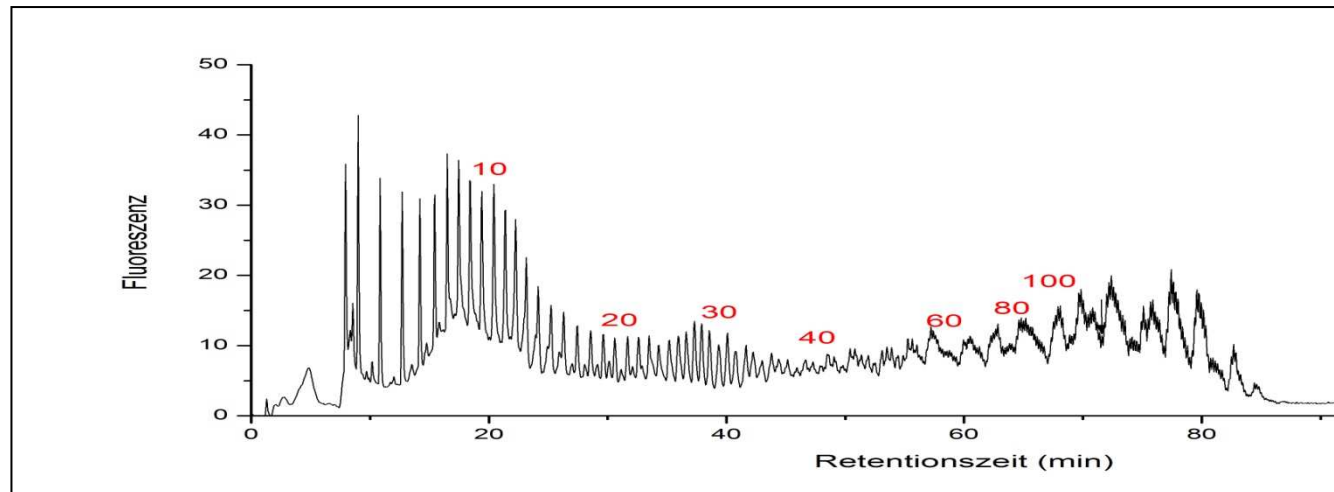


DMB: Batch und Fed-batch

batch



fed-batch



Ausblick

- Steuerung der Fed-batch-Kultivierung mit Unterschiedlichen Feed-Systemen
- Entwicklung eines neuen Aufreinigung Prozesses für die Fed-batch-Kultivierung
- Bestimmung der polySia-Kettenlänge während der Kultivierung