

**Prozessentwicklung für die Produktion des
Lipopeptid-Antibiotikums Friulimicin in
*Actinoplanes friuliensis***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anne Steinkämper

aus Paderborn

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

18.11.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Richard Biener

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einführung in die Entwicklung von Antibiotikaproduktionsprozessen für Aktinomyzeten	3
2.1. Antibiotika	3
2.1.1. Bildung von Antibiotika im natürlichen Habitat	4
2.1.2. Industrielle Herstellung von Antibiotika	4
2.2. <i>Actinoplanes friuliensis</i> und Friulimicin	5
2.2.1. Wirkungsweise von Friulimicin	5
2.2.2. Aufbau des Lipopeptidantibiotikums Friulimicin	6
2.2.3. Biosynthese von Peptidantibiotika	7
2.2.4. Der Produzentenstamm <i>Actinoplanes friuliensis</i>	8
2.2.5. Regulation von Antibiotikabiosynthesen in Aktinomyzeten	9
2.3. Prozessentwicklung für die Antibiotikaproduktion	13
2.3.1. Analytik von Produktionsprozessen	13
2.3.2. Nährmedien- und Prozessentwicklung	17
2.3.3. Entwicklung von Prozessführungsstrategien	19
2.3.4. Prozessoptimierung durch Stammverbesserung	21
2.3.5. Genombasierte Netzwerkmodelle und Stoffflussanalyse	22
3. Material und Methoden zur Kultivierung von <i>A. friuliensis</i>	24
3.1. Nährmedien und Chemikalien	24
3.2. Kultivierung von <i>A. friuliensis</i>	26
3.2.1. Stammhaltung	26
3.2.2. Vorbereitung des Inokulums	26
3.2.3. Kultivierung im Schüttelkolben	27
3.2.4. Kultivierung im Senbit-Schüttelkolbensystem	27
3.2.5. Kultivierung im 2,5-l-Bioreaktor	28
3.2.6. Kultivierung im 7,5-l-Bioreaktor	29
3.3. Analytik von Kultivierungsproben	33
3.3.1. Prüfung von Kulturen auf mikrobielle Kontamination	33
3.3.2. Bestimmung der Biotrockenmasse	33
3.3.3. Bestimmung von Friulimicin B	33
3.3.4. Bestimmung von Glucose	35

Inhaltsverzeichnis

3.3.5.	Bestimmung von Saccharose	35
3.3.6.	Bestimmung von Aminosäuren und Ammonium	35
3.3.7.	Bestimmung von Phosphat und Sulfat	36
3.3.8.	Bestimmung von Acetat	37
3.3.9.	Analyse von Kultivierungsproben mit Mittelinfrarotspektroskopie	37
3.3.10.	Berechnete Größen	38
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Definierte Kultivierungsbedingungen	41
4.1.1.	Homogene Wachstumsbedingungen	42
4.1.2.	Anpassung des chemisch definierten Nährmediums	44
4.1.3.	Untersuchung der Vorkulturführung	49
4.1.4.	Reproduzierbarkeit der Kultivierungen	52
4.2.	Wachstum und Friulimicinbiosynthese von <i>A. friuliensis</i> im chemisch definierten Nährmedium	54
4.2.1.	Nährstofflimitation und Friulimicinbiosynthese	54
4.2.2.	Kohlenstoffquellen für Wachstum und Friulimicinbiosynthese	57
4.2.3.	Stickstoffquellen für Wachstum und Friulimicinbiosynthese	59
4.2.4.	Einfluss von Precursorsubstanzen auf die Friulimicinbiosynthese	62
4.3.	Prozessführungsstrategien für die Friulimicinproduktion	65
4.3.1.	Batch-Prozess	65
4.3.2.	Entwicklung von Fed-Batch-Strategien	66
4.3.3.	Kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung	71
4.4.	Erweiterte Analytik von Kultivierungen	77
4.4.1.	Respiratorische Parameter	77
4.4.2.	Biomassemonitoring mit Impedanzspektroskopie	79
4.4.3.	Analyse von Kultivierungsproben mit Mittelinfrarotspektroskopie	81
4.5.	Stoffwechselmodell für die Biosynthese von Friulimicin in <i>A. friuliensis</i>	85
4.5.1.	Maximale Biomasse- und Friulimicinausbeute	86
4.5.2.	Energieeffizienz und Erhaltungsstoffwechsel	88
5.	Diskussion	89
5.1.	Definierte Kultivierungsbedingungen zur Untersuchung der Friulimicinbiosynthese in <i>A. friuliensis</i>	89
5.2.	Wachstum und Friulimicinbiosynthese von <i>A. friuliensis</i> im chemisch definierten Nährmedium	92

Inhaltsverzeichnis

5.3.	Prozessführungsstrategien für die Produktion von Friulimicin	103
5.4.	Online-Prozessanalytik.....	108
5.5.	Prozessanalytik mit Mittelinfrarotspektroskopie.....	110
5.6.	Stoffwechselmodell zur Beschreibung der Friulimicinbiosynthese in <i>A. friuliensis</i>	113
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Anhang.....	132
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	132
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	133
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	141
7.4.	Genombasiertes Stoffwechselmodell für die Friulimicinbiosynthese in <i>A. friuliensis</i>	142

1. Zusammenfassung

Friulimicin ist ein hochwirksames Antibiotikum gegen gram-positive multiresistente Bakterien wie methicillinresistente Staphylokokken und Enterokokken (MRS, MRE). Zum besseren Verständnis der Biosynthese und zur Untersuchung von Möglichkeiten zur Steigerung der Produktivität des Lipopeptid-Antibiotikums Friulimicin in dem „seltenen Aktinomyzeten“ *Actinoplanes friuliensis* wurden verschiedene Modellprozesse entwickelt.

Für die Entwicklung von Modellprozessen und zur Charakterisierung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* wurde ein chemisch definiertes Nährmedium verwendet. In diesem definierten Nährmedium konnte der Einfluss von einzelnen Nährmedienbestandteilen auf die physiologischen und morphologischen Eigenschaften des Myzelbildners *A. friuliensis* untersucht und Nährmedienanpassungen zur Steigerung der Biomasse- und der Friulimicinausbeute vorgenommen werden. Aus den Kultivierungen mit definiertem Nährmedium wurden zudem Ansätze für die Entwicklung von Prozessführungsstrategien und Möglichkeiten zur erweiterten Prozessanalyse abgeleitet.

Bei der Entwicklung von Prozessführungsstrategien zeigten Fed-Batch-Prozesse großes Potential zur Steigerung der Produktivität von Friulimicin. Der Nährmedienbestandteil Phosphat ist essentiell für das Zellwachstum und die Aktivität der Zellen. Höhere Phosphatkonzentrationen erwiesen sich allerdings als inhibierend auf die Friulimicinbiosynthese. Durch limitierte Zufütterung von Phosphat konnte die Friulimicinproduktionsphase bei gleichzeitigem Wachstum verlängert werden. Neben Phosphat zeigte auch das Nebenprodukt Ammonium eine inhibierende Wirkung auf die Friulimicinbiosynthese. Durch die Zufütterung der Kohlenhydratquelle Glucose konnte die Ammoniumbildung vermieden werden. Als besonders geeignete Prozessführungsstrategie erwies sich ein kontinuierlicher Prozess mit Zellrückhaltung. Die volumetrische Produktivität von Friulimicin konnte durch diesen Prozesstyp im Vergleich zu Batch-Prozessen und Fed-Batch-Prozessen um ein Mehrfaches gesteigert werden.

Um die Prozessentwicklung effizienter zu gestalten, wurde während Kultivierungen von *A. friuliensis* der Einsatz von onlinefähigen Messmethoden wie Mittelinfrarotspektroskopie und Impedanzspektroskopie untersucht. Die Mittelinfrarotspektroskopie (micro-biolytics GmbH, Esslingen) zeigte sich als wenig aufwendige Methode zur Verfolgung einer größeren Anzahl an Prozessparametern und zur Identifikation der Nebenproduktbildung. Die Impedanzspektroskopie lieferte ein aussagekräftiges Online-Signal für die Biomasse und war eine gute Ergänzung zur Biotrockenmassebestimmung, die bei myzelförmig wachsenden Mikroorganismen fehlerträchtig ist.

Zur Unterstützung der Prozessentwicklung, wurden die Daten aus den Kultivierungen von *A. friuliensis* zur Stoffflussanalyse in einem genombasierten Stoffwechselmodell verwendet (Insilico Biotechnology, Stuttgart). Diese Analysen ermöglichten ein tiefgehendes Verständnis der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* und können zur Prozessoptimierung sowohl auf Ebene der Prozessführung als auch auf genetischer Ebene beitragen.

2. Einführung in die Entwicklung von Antibiotikaproduktionsprozessen für Aktinomyzeten

Die Entwicklung von effizienten Produktionsprozessen für die biotechnologische Herstellung von Antibiotika setzt tiefgehende Kenntnisse des Produktionsstammes voraus. Die Produktionsstämme für Antibiotika sind meist myzelartig wachsende Aktinomyzeten, die sehr komplexe Regulationsmechanismen und Differenzierungsmuster besitzen (Bibb, 2005). Diese Eigenheiten stellen einen besonderen Anspruch an die Prozessentwicklung. In der vorliegenden Arbeit wurden Ansätze zur Entwicklung eines Produktionsprozesses zur Herstellung des Lipopeptid-Antibiotikums Friulimicin in dem seltenen Aktinomyzeten *Actinoplanes friuliensis* untersucht.

2.1. Antibiotika

Antibiotika umfassen eine große Gruppe an Molekülen, die zur Behandlung und Vorbeugung von Infektionskrankheiten oder als Antitumoragentien in der Human- und Tiermedizin verwendet werden (Lima Procópio et al., 2012, Pamboukian et al., 2004). Zudem werden Antibiotika bei der Herstellung von Lebensmitteln zur Konservierung eingesetzt. In der Landwirtschaft kommen Antibiotika zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen oder als Futtermittelzusatz zum Einsatz.

Zur Einteilung der zahlreichen Antibiotikatyphen gibt es mehrere Möglichkeiten (Gräfe, 1992). Antibiotika lassen sich zum einen nach ihrer biologischen Wirkung in die drei Gruppen Bakterizide, Fungizide und Zytostatika einteilen, zum anderen können Antibiotika nach ihrer chemischen Struktur gruppiert werden. Dabei werden Strukturen unterschieden wie β -Lactame, Polyketide, Terpene, Nukleoside, Alkaloide, Aminoglykoside und Polypeptide, darunter Glykopeptide und Lipopeptide. Zur Gruppe der Lipopeptide gehören die in dieser Arbeit beschriebenen Friulimicine (Vertesy et al., 2000).

Um die steigende Anzahl an multiresistenten Keimen wirkungsvoll bekämpfen zu können, ist eine vollständige Ausschöpfung dieser Diversität an Antibiotika notwendig. Im „Wettrüsten“ mit den bakteriellen Resistenzen müssen immer neue Antibiotika entdeckt oder weiter entwickelt werden. Mittlerweile werden sogar Substanzen geprüft, die inhibitorisch auf die Resistenzmechanismen der Bakterien wirken (Planson et al., 2011). Zu solchen Substanzen gehören die β -Lactamase-Inhibitoren, die den Resistenzmechanismus der Pathogene gegenüber β -Lactam-Antibiotika inaktivieren, so dass diese Antibiotika dennoch wirken können. Aber selbst diese Substanzen unterliegen wiederum Resistenzmechanismen, sodass eine ständige Neu- und Weiterentwicklung von Antibiotika notwendig ist.

2.1.1. Bildung von Antibiotika im natürlichen Habitat

Antibiotika gehören zu den Sekundärmetaboliten, die im Gegensatz zu den Primärmetaboliten nicht für die Lebensfähigkeit eines Organismus essentiell sind. Die Bildung von Antibiotika stellt vermutlich für viele Organismen einen wichtigen Überlebensvorteil dar, da in natürlichen Habitaten wie im Boden oder Wasser das Angebot an Nährstoffen häufig limitiert ist. Durch die Exkretion antibiotisch wirksamer Substanzen werden andere Mikroorganismen, die mit dem Produzenten im Wettstreit um Nährstoffe stehen, im Wachstum inhibiert oder unschädlich gemacht. Die Bildung von Antibiotika in Aktinomyzeten (*Actinomycetales*), die sogenannte chemische Differenzierung, wird nur unter bestimmten Umweltbedingungen ausgelöst und ist in den meisten Fällen an eine morphologische Differenzierung dieser myzelartig wachsenden Mikroorganismen gekoppelt (Gräfe, 1992). Bei der morphologischen Differenzierung wird bei vielen Aktinomyzeten zusätzlich zum Substratmyzel ein sogenanntes Luftmyzel gebildet, aus dem die Bildung von Sporen hervorgeht. Diese Sporen stellen eine resistente Dauerform dar. Allerdings gibt es Unterschiede bei der morphologischen Differenzierung zwischen den einzelnen Gattungen (Vgl. Kapitel 2.2.4). Die Bildung von Sporen gehört in diesem Zusammenhang ebenfalls zur Überlebensstrategie dieser Bakterien unter ungünstigen Umweltbedingungen. Die Identifikation der Umweltbedingungen, die zur chemischen und morphologischen Differenzierung führen, ist für die Entwicklung von Antibiotikaproduktionsprozessen sehr wichtig (Vgl. Kapitel 2.2.5).

2.1.2. Industrielle Herstellung von Antibiotika

Die industrielle Herstellung von Antibiotika erfolgt über verschiedene Wege. Ein kleinerer Teil der Antibiotika wird durch rein chemische Synthese hergestellt, welches meistens der weniger aufwendigere und kostengünstigere Weg ist (Bérdy, 2005). Da viele wirkungsvolle Antibiotika jedoch sehr komplexe Strukturen aufweisen wie beispielsweise zyklische Peptide, die chemisch nur schwer synthetisiert werden können, wird ein großer Teil der Antibiotika auf biotechnologischem Weg hergestellt (Rokem et al., 2007). In einigen Fällen werden für die industrielle Herstellung von Antibiotika auch beide Wege kombiniert. Bei diesen sogenannten halbsynthetischen Antibiotika werden biotechnologisch synthetisierte Vorstufen hergestellt, die anschließend chemisch abgewandelt werden.

Die biotechnologische Herstellung von Antibiotika ist zeit- und kostenintensiver als die chemische Synthese. Da antibiotische Substanzen schon in niedrigen Konzentrationen wirksam sind, werden sie im Wildstamm oft nur in geringen Mengen synthetisiert. Um eine wirtschaftliche Produktion der Antibiotika zu ermöglichen, ist daher eine Optimierung der Produzentenstämme sowie der Produktionsprozesse notwendig. Die Produzentenstämme sind in den meisten Fällen Aktinomyzeten, da

diese etwa zwei Drittel der bioaktiven Sekundärmetabolite bilden (Bérdy, 2005). Zu dieser Gruppe gehört auch *A. friuliensis*.

2.2. *Actinoplanes friuliensis* und Friulimicin

Actinoplanes friuliensis bildet das Antibiotikum Friulimicin, welches zu einer neuen Klasse potenter Antibiotika gezählt wird, den sauren Lipopeptidantibiotika, zu der auch Daptomycine, Laspartomycine und weitere calciumabhängige Antibiotika gehören (Wang et al., 2011, Strieker et al., 2009, Borders et al., 2007). Daptomycin wurde in den USA bereits als Medikament unter dem Namen Cubicin® zugelassen.

2.2.1. Wirkungsweise von Friulimicin

Friulimicin besitzt eine antimikrobielle Wirkung gegen multiresistente, gram-positive Bakterien wie methicillinresistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) sowie Enterokokken-Stämme (MRE). Der Wirkmechanismus von Friulimicin beruht auf der Inhibierung der Zellwandbiosynthese von gram-positiven Pathogenen (Abbildung 1). Friulimicin bildet mit dem d-C₅₅-Isoprenoidlipidcarrier Bactoprenolphosphat einen Komplex und verhindert so den Aufbau einer funktionellen Zellwand (Schneider et al., 2009). Bei diesem Prozess spielen Calciumionen eine wichtige Rolle (Reder-Christ et al., 2011). Friulimicin besitzt einen ähnlichen Wirkmechanismus wie das verwandte Antibiotikum Daptomycin, das ebenfalls die Integrität der Zellwand schwächt. Allerdings konnte ein mechanistischer Unterschied in der Wirkungsweise zwischen den beiden Antibiotika festgestellt werden (Wecke et al., 2009).

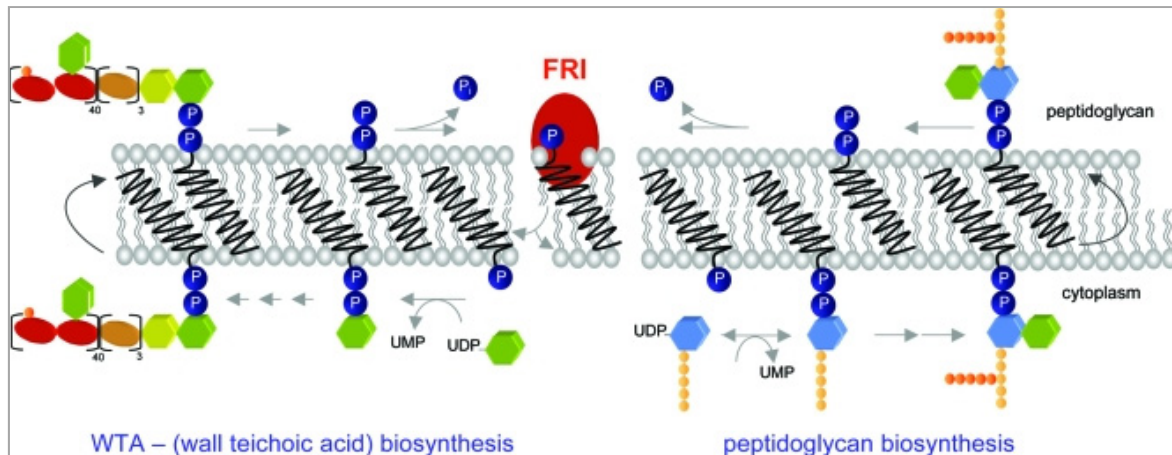


Abbildung 1: Hypothetisches Modell zum Wirkmechanismus von Friulimicin. Vermutlich bildet Friulimicin einen stöchiometrischen Komplex mit Bactoprenolphosphat (C_{55} -P). Das Abfangen dieses zentralen Kohlenhydratcarriers unterbricht das Precursor-cycling und blockiert alle Stoffwechselwege, die Bactoprenolphosphat verwenden. Betroffen sind die Synthese der Zellwand-Teichonsäuren (links), des Peptidoglycans (rechts) und der Exopolysaccharide. Der gleichzeitige Eingriff in diese Stoffwechselwege blockiert die Bildung einer intakten Zellhülle in gram-positiven Bakterien. Abbildung: Schneider et al. (2009).

2.2.2. Aufbau des Lipopeptidantibiotikums Friulimicin

Für *A. friuliensis* wurde die Bildung von acht verschiedenen Lipopeptid-Antibiotikotypen beschrieben (Vertesy et al., 2000). Vier von ihnen sind identisch zum Amphomycintyp, die anderen vier werden Friulimicin A-D genannt. Alle acht Lipopeptide sind aus einem identischen, zyklischen Peptidkern aus zehn Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 2). Der Peptidkern setzt sich neben proteinogenen Aminosäuren wie Asparagin, Glycin, Valin und Prolin auch aus ungewöhnlichen Aminosäuren wie 2,3-Diaminobuttersäure, Pipecolinsäure und Methylasparaginsäure zusammen. An diesen Peptidkern ist über eine exozyklische Aminosäure ein Fettsäurerest angeknüpft. Die exozyklische Aminosäure ist im Fall der Friulimicine Asparagin und im Fall der Amphomycine Asparaginsäure. Innerhalb ihrer Gruppe unterscheiden sich die Amphomycine und Friulimicine lediglich in ihren Fettsäureresten, die eine Kettenlänge von C13-C15 haben können. Diese Fettsäurereste besitzen eine Verzweigung am Kettenende sowie eine ungewöhnliche Doppelbindung zwischen Position C3 und C4 (Vertesy et al., 2000). Die Doppelbindung Δ_{cis3} hat einen großen Einfluss auf die antibiotische Wirksamkeit der Lipopeptide von *A. friuliensis* (Heinzelmann et al., 2005). Im Gegensatz zu andere Peptidantibiotika wie Daptomycin und einigen calciumabhängigen Antibiotika besitzt Friulimicin keine zusätzlichen Modifikationen wie Glykosylierungen oder Hydroxylierungen (Strieker et al., 2009).

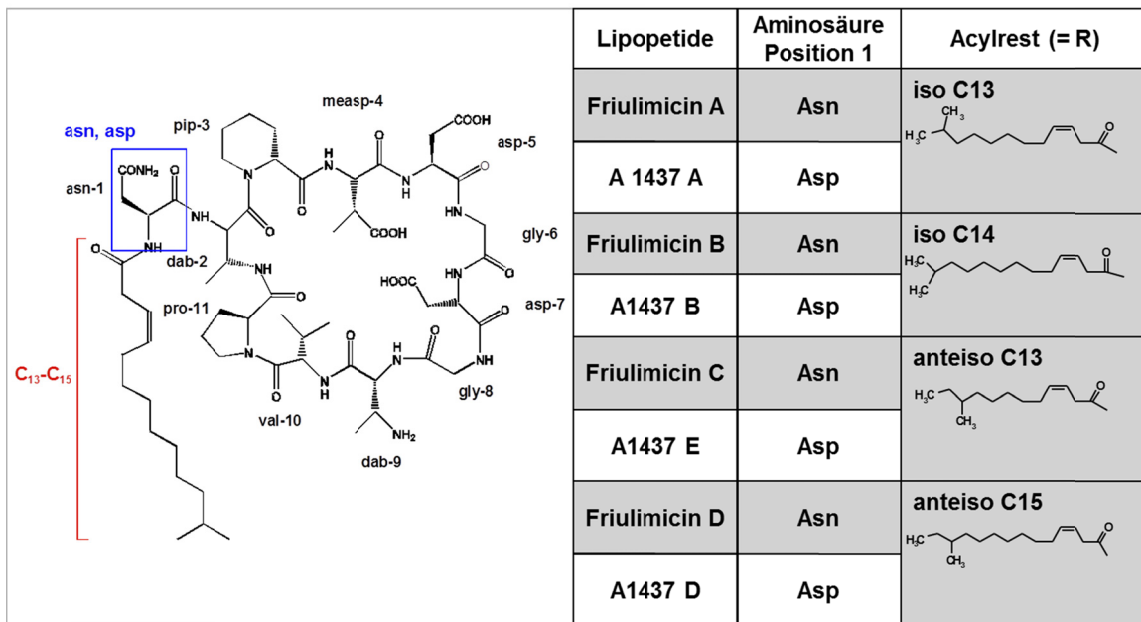


Abbildung 2: Strukturen der von *A. friuliensis* gebildeten Lipopeptidantibiotikatyphen Friulimicin und Amphomycin (A1437). Links: Struktur von Friulimicin B. Die jeweiligen Positionen der Aminosäuren sind nummeriert. Dab: 2,3-Diaminobuttersäure, Pip: Pipecolinsäure, MeAsp: Methylasparaginsäure, Gly: Glycin, Asp: Asparaginsäure, Val: Valin, Pro: Prolin, Asn: Asparagin. Rechts: Übersicht der verschiedenen Lipopeptide mit der jeweiligen exozyklischen Aminosäure an Position 1 und den verschiedenen Fettsäureresten (R). Abbildung: Heinzelmann et al. (2005).

2.2.3. Biosynthese von Peptidantibiotika

Bei der Biosynthese von Peptidantibiotika, zu denen Friulimicin gehört, werden zwei verschiedene Synthesemechanismen unterschieden: Die ribosomalen und die nichtribosomalen Synthesen. Im ersten Fall werden Vorläuferpeptide aus gewöhnlichen Zellbausteinen ribosomal synthetisiert und anschließend posttranslational modifiziert. Über diesen Synthesemechanismus werden beispielsweise Lantibiotika synthetisiert (Chatterjee et al., 2005). Der zweite Mechanismus ermöglicht den direkten Einbau ungewöhnlicher Bausteine wie heterozyklische Elemente und D-Aminosäuren und die Synthese glykosylierter oder methylierter Reste. Dieser sogenannte nichtribosomale Synthesemechanismus, über den auch Friulimicin synthetisiert wird, verläuft über spezielle Enzymkomplexe (Sieber et al., 2003, Liu et al., 2013). Diese Enzymkomplexe bestehen aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), die modular aufgebaut und nach dem „MulticARRIER Thiotemplate Mechanismus“ arbeiten. Jedes Modul katalysiert dabei die Anbindung einer bestimmten Aminosäure an die wachsende Peptidkette. Die Module lassen sich noch weiter in sogenannte Domänen unterteilen. Jede Domäne ist für einen Reaktionsschritt in der Peptidsynthese verantwortlich. Im ersten Schritt erfolgt die Erkennung und Aktivierung einer spezifischen Aminosäure über die Adenylierungsdomäne (A-Domäne). Die Aktivierung der Aminosäure zum

Aminoacyladenylat geschieht hier in einer ATP-abhängigen Reaktion. Anschließend wird das aktivierte Aminoacyladenylat an die Thiolierungsdomäne (T-Domäne) weitergereicht. Diese Domäne besitzt keine autonome katalytische Aktivität, sondern vereinfacht über einen Phosphopantethein-Arm den geordneten Transport zu nachfolgenden katalytischen Reaktionen in andere Domänen. Die Herstellung der Peptidbindungen erfolgt in der Kondensationsdomäne (C-Domäne). Am Schluss der Synthesereihe sitzt eine Thioesterasedomäne (TE-Domäne), die die fertige Peptidkette entweder als lineares Peptid oder zyklisiert freigibt. Häufig werden die Peptide noch weiter durch Glykosylierung und oxidative Vernetzung postsynthetisch modifiziert. Durch diese Modifikationen erhalten nichtribosomal synthetisierte Antibiotika eine stabile Struktur, die eine präzise Funktionalität sichert.

2.2.4. Der Produzentenstamm *Actinoplanes friuliensis*

Der Produzentenstamm von Friulimicin, *Actinoplanes friuliensis*, wurde 1987 aus einem Vorgarten in der norditalienischen Region Friaul isoliert. *A. friuliensis* ist ein gram-positives Bodenbakterium, das zur Gruppe der „seltenen Aktinomyzeten“ gezählt wird (Aretz et al., 2000). Diese Gruppe bezeichnet alle Aktinomyzeten, die nicht zu den Streptomyzeten gezählt werden. *Actinoplanes sp.* gehören in dieser Gruppe zur Familie der *Micromonosporaceae*, die mit zu den bedeutendsten Naturstoffproduzenten zählen (Lazzarini et al., 2000, Stackebrandt et al., 1997).

Mitglieder der Gattung *Actinoplanes* haben einen besonderen Lebenszyklus. Sie bilden unter ungünstigen Lebensbedingungen Sporangien aus, die in wässriger Umgebung mit Flagellen besetzte, rundliche Zoosporen freisetzen (Vobis, 1989). Ein Luftmyzel wird von vielen Stämmen nicht oder nur spärlich gebildet. Der GC-Gehalt ist, wie für diese Gattung üblich, hoch und liegt bei 74 % (Stackebrandt et al., 1987). *A. friuliensis* bildet ein stark orangefarbiges Substratmyzel aus (Aretz et al., 2000).

Das Genom von *A. friuliensis* wurde 2010 sequenziert und ist zyklisch aufgebaut (Cebitec, Bielefeld). Das darin enthaltene Biosynthesecluster (Abbildung 3) für Friulimicin wurde nahezu vollständig untersucht (Heinzelmann et al., 2005, Müller et al., 2007, Nolden et al., 2009) und beinhaltet neben den Genen *pstABCD* für die nichtribosomale Peptidsynthese auch die Gene *dabABC*, *glmAB* und *pip* für die Synthese der ungewöhnlichen Aminosäuren 2,3-Diaminobuttersäure, Methylasparaginsäure und Pipecolinsäure, die als Baustein für den Peptidkern von Friulimicin verwendet werden. Die Gene *lipABDE* sind für die Modifizierung des Fettsäurerests verantwortlich. Außerdem konnten die Gene *regABCD*, die an der Regulation der Friulimicinbiosynthese beteiligt sind sowie die potentiellen Resistenzgene *mem* und *expAB* identifiziert werden.

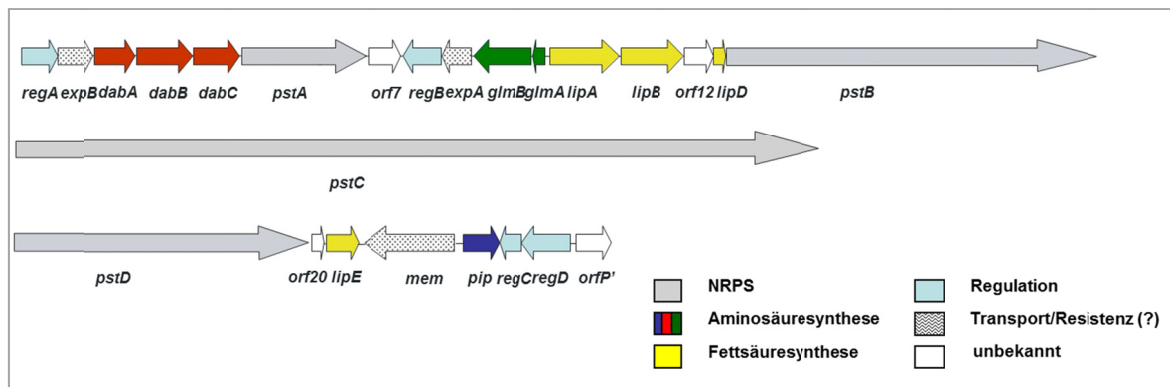


Abbildung 3: Organisation des Friulimicinbiosyntheseclusters in *A. friuliensis*. NRPS: nichtribosomale Peptidsynthetase; Aminosäuresynthese: Gene für die Biosynthese der ungewöhnlichen Aminosäuren 2,3-Diaminobuttersäure, Methylasparaginsäure und Pipecolinsäure; Fettsäuresynthese: Gene für die Synthese und Anbindung des Fettsäurerests; Regulation: Gene für Regulationsproteine; Transport/Resistenz (?): Gene, die vermutlich für Transport und Resistenzmechanismen verantwortlich sind. Abbildung: Nolden et al. (2009).

2.2.5. Regulation von Antibiotikabiosynthesen in Aktinomyzeten

Biosynthesen von Antibiotika in Aktinomyzeten sind hochkomplex regulierte Prozesse. Abhängig von den Umweltbedingungen können in einem Produzentenstamm verschiedene Antibiotikabiosynthesecluster aktiviert werden. Zudem können die Signale aus der Umwelt eine morphologische Differenzierung auslösen (Vgl. Kapitel 2.1.1), die durch eigene regulatorische Netzwerke beeinflusst wird und durch die die Regulation zusätzlich an Komplexität gewinnt.

Um auf Signale aus der Umwelt reagieren zu können, besitzen Aktinomyzeten eine Reihe an Signalwegen. Diese Signalwege werden von übergeordneten (pleiotropen) Regulatoren gesteuert, die wiederum auf biosynthesewegspezifischen Regulatoren wirken. Diese Mechanismen koordinieren zusammen verschiedene Aspekte des Metabolismus in Aktinomyzeten und machen somit eine Anpassung an unterschiedliche Nährstoffangebote und Lebensräume möglich.

Übergeordnete Regulation von Antibiotikabiosynthesewegen

Als Auslöser für die Antibiotikabildung in Aktinomyzeten wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Zum einen wurden bestimmte chemische Substanzen identifiziert, die in Lebensräumen von Aktinomyzeten vorkommen. Dazu gehört N-Acetylglucosamin, das beim Abbau von Chitin aus der Zellwand von Pilzen oder während der Autolyse der eigenen Zellwand entstehen kann und in manchen Antibiotikaproduzenten die Biosynthese von Antibiotika veranlasst (Rigali et al., 2008). Auch der Zellwandbestandteil Mycolsäure aus Mycobakterien wurde als Auslöser für Biosynthese von Antibiotika beschrieben (Onaka et al., 2011). Neben chemischen Substanzen konnte bei vielen Aktinomyzeten auch die Limitation von

Nährstoffen wie Phosphat, Stickstoff und Kohlenhydraten als Auslöser für Antibiotikabiosynthesen beobachtet werden (Martín et al., 2011). Einen ähnlichen Effekt wie die Nährstofflimitation kann auch die Limitation von Sauerstoff ausüben. Ein Beispiel für die Sekundärmetabolitbiosynthese unter Sauerstofflimitation ist die Bildung eines rot-pigmentierten Sekundärmetabolits in *Saccharopolyspora erythraea* (Clark et al., 1995).

Der Auslöser für die Biosynthese von Antibiotika, der unter Laborbedingungen die wichtigste Rolle spielt, ist die Nährstofflimitation. Der in diesem Zusammenhang am häufigsten beschriebene Nährstoff ist Phosphat. Phosphat reguliert die Synthese von verschiedenen Antibiotikagruppen, zu denen Peptidantibiotika, Polyenmakrolide, Tetracykline und weitere biosynthetisch komplexe Antibiotika gehören (Liu et al., 2013, Hobbs et al., 1990, Martín et al., 1980). Die Signale für Nährstofflimitation oder andere ungünstige Lebensbedingungen werden durch übergeordnete Regulatoren vermittelt. Zu diesen übergeordneten Regulatoren gehört auch die Phosphatregulation, die in Streptomyzeten hauptsächlich über das Zweikomponentensystem PhoR-PhoP vermittelt wird (Liu et al., 2013). Dieses System ist ein weitverbreitetes Signaltransduktionssystem in Bakterien und kontrolliert Gengruppen, die sowohl den primären als auch den sekundären Metabolismus beeinflussen. Das PhoR-PhoP-Regulatorsystem misst den Phosphatlevel im Nährmedium, indem anorganisches Phosphat an das Membranprotein PhoR bindet (Zhang et al., 1996, Liu et al., 1975). Diese membrangebundene Sensorkinase phosphoryliert daraufhin den Transkriptionsregulator PhoP, der an sogenannte PHO-Boxen binden kann. Diese PHO-Boxen liegen den Genen des Pho-Regulons vorgelagert, die an der Stressantwort für Phosphatlimitation beteiligt sind. Zu dieser Stressantwort gehört unter anderem auch die Synthese von Antibiotika. Die Abwesenheit von PHO-Boxen in Antibiotikabiosyntheseclustern und die Tatsache, dass PhoP nicht direkt an Promotorbereiche in Antibiotikabiosyntheseclustern oder an biosynthesewegspezifische Regulatorgene bindet, lassen vermuten, dass der regulatorische Effekt von PhoP über Signalkaskaden bewerkstelligt wird.

Neben Phosphatlimitation als Auslöser von Antibiotikabiosynthesen wird häufig die Limitation von Stickstoff beschrieben. Stickstofflimitation ist unter anderem ein Auslöser für die Retamycinproduktion in *Streptomyces olindensis* (Giudici et al., 2004). In einigen Fällen löst auch die Limitation verschiedener Nährstoffe die Biosynthese von Antibiotika aus. Sowohl Phosphatlimitation als auch Stickstofflimitation wurden als Auslöser für die Produktion von Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* beschrieben (Doull et al., 1990). Einer der wichtigsten übergeordneten Regulatoren des Stickstoffmetabolismus ist GlnR. Dieser Regulator kontrolliert sowohl Gene des primären als auch Gene des sekundären Metabolismus.

Der Stickstoffmetabolismus steht häufig unter Kontrolle von Phosphat, indem der oben beschriebene Transkriptionsregulator PhoP an PHO-Boxen bindet, die in der Promotorregion von GlnR liegen (Martín et al., 2011).

Ein weiterer Auslöser für Biosynthese von Antibiotika ist die Kohlenstofflimitation. Die Regulation der Antibiotikabiosynthesen bei Limitation der Kohlenstoffquelle wird meistens im Zusammenhang mit der Kohlenstoff-Katabolitregulation (Carbon Catabolite Regulation, CCR) beschrieben (Sanchez et al., 2002). Dieser Mechanismus ist weit verbreitet unter Mikroorganismen und steuert die sequenzielle Metabolisierung von verschiedenen Kohlenstoffquellen, wenn mehr als eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Unter diesen Bedingungen wird in der Regel die Kohlenstoffquelle bevorzugt aufgenommen, die am schnellsten kohlenstoffhaltige Zellbausteine und Energie für Wachstumsprozesse liefert. Parallel dazu wird die Synthese von Enzymen, die die Verwendung anderer Kohlenstoffe ermöglichen solange unterdrückt, bis die bevorzugte Kohlenstoffquelle aufgebraucht ist. Neben der Regulation der sequentiellen Metabolisierung von verschiedenen Kohlenstoffquellen kann dieser Regulationsmechanismus auch auf die Antibiotikabiosynthese wirken. Der Einfluss der Kohlenstoffquelle Glucose wurde in diesem Zusammenhang am häufigsten beschrieben. Für eine Vielzahl an Antibiotikabiosynthesen wie zum Beispiel die Kanamycinproduktion in *Streptomyces kanamyceticus* und die Erythromycinbiosynthese von *Saccharopolyspora erythraea* ist eine Inhibierung der Antibiotikabiosynthese durch Glucose bekannt (Sanchez et al., 2010). Der genaue Regulationsmechanismus der Kohlenstoff-Katabolitregulation auf die Antibiotikabiosynthese ist allerdings häufig nicht genau aufgeklärt und ist zudem abhängig von der schnellen Verwertung der bevorzugten Kohlenstoffquelle. Neben diesen indirekten Wirkungen der Kohlenstoffquelle auf die Antibiotikabiosynthese wurde aber auch eine direkte Inhibition von Antibiotika-Biosyntheseschritten durch Glucose beschrieben (Blank et al., 2013). Dies war unter anderem bei der Synthese von Actinorhodin und Undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* der Fall.

Die Antibiotikabiosynthese kann nicht nur durch Nährstofflimitation, sondern auch über Signalmoleküle initiiert werden. In zu *A. friuliensis* verwandten Streptomyzeten aktivieren Signalmoleküle wie γ -Butyrolactone biosynthesewegspezifische Regulatoren, die die Sekundärmetabolitproduktion sowie teilweise auch die morphologische Differenzierung steuern (Bibb, 2005). Diese γ -Butyrolactone werden häufig auch als externe Signalmoleküle für die Indikation der Populationsdichte im Zusammenhang mit „Quorum Sensing“ beschrieben. Darüber hinaus wird vermutet, dass sie als Signal für physiologische Zustände wie Nährstofflimitation wirken.

Biosynthesewegspezifische Regulation von Antibiotikabiosynthesen

Biosynthesewegspezifische Regulatoren bilden das letzte Glied in der Regulationskaskade. Sie werden von den oben beschriebenen, übergeordneten Regulatoren kontrolliert und beeinflussen direkt die Transkription von Genen im Antibiotikabiosyntheseweg. Die Gene dieser biosynthesewegspezifischen Regulatoren befinden sich häufig direkt im Antibiotikacluster und können nicht nur regulatorisch auf biosynthesewegspezifischer Ebene, sondern auch auf globaler Ebene wirken. Sie werden daher auch „Cluster-situated Regulators“ (CSR) genannt (Liu et al., 2013, Bibb, 2005).

Im Biosynthesecluster von *A. friuliensis* (Abbildung 3) konnten durch Sequenzanalysen die biosynthesewegspezifischen Regulatorgene *regA*, *regB*, *regC* und *regD* identifiziert werden (Müller et al., 2007). Durch Geninaktivierungsexperimente mit Knockout-Mutanten der jeweiligen Regulatorgene konnte ein Verlust der Fähigkeit zur Friulimicinproduktion nachgewiesen werden und damit ein Zusammenhang zur Regulation der Friulimicinbiosynthese hergestellt werden (Nolden et al., 2009). Für den Regulator RegA konnte zudem durch Transkriptionsanalysen von Friulimicinbiosynthesegenen in *regA*-Knockout-Mutanten bestätigt werden, dass er ein zentraler Transkriptionsaktivator für eine Vielzahl von Friulimicinbiosynthesegenen ist (Wagner, 2009). In diesem Zusammenhang wurde *regA* als Teil eines komplexen regulatorischen Multikomponenten-Netzwerks vermutet. Für die weiteren cluster-ansässigen Regulatorgene *regB*, *regC* und *regD* wurden ebenfalls regulatorische Funktionen in der Friulimicinbiosynthese postuliert (Nolden et al., 2009). Das Genprodukt von *regB* besitzt Ähnlichkeiten zu einem Protein aus *Pseudomonas syringae* SyrP, dem Histidinkinase-Aktivität und damit eine Funktion in der Phosphorylierungskaskade zur Regulation der Syringomycin-Produktion zugeschrieben wurde (Zhang et al., 1997). Neuere Studien widerlegen allerdings eine regulatorische Aktivität von SyrP und postulieren eine Funktion im Reifungsprozess zum fertigen Syringomycin (Singh et al., 2008). Die genaue Funktion von *regB* auf die Friulimicinbiosynthese wurde bisher aber nicht näher untersucht. Die Gene *regC* und *regD* kodieren für ein bakterielles Zweikomponentensystem. Für den Regulator *regC* wurde zudem eine Rolle bei der Pigmentsynthese in *A. friuliensis* zugewiesen. Beim Knock-out von *regC* verlor der Stamm seine orangefarbene Pigmentierung (Wagner, 2009).

Ein weiterer Bereich, der vermutlich von biosynthesewegspezifischen Regulatoren beeinflusst werden kann, sind die Gene für die Selbstresistenz eines Stammes. Für diese Annahme sprechen zum einen, dass die Gene für Selbstresistenz bereits mit Beginn der Antibiotikabiosynthese transkribiert werden (Hopwood, 2007), zum anderen konnte in *Streptomyces coelicolor* gezeigt werden, dass inaktive Vorläuferstufen von Actinorhodin frühzeitig, bevor die Bildung des aktiven

Antibiotikums abgeschlossen war, die Gene für Selbstresistenz aktivierten (Tahlan et al., 2007). Dass die Ausbildung der Selbstresistenz an die Synthese von Antibiotika gekoppelt ist und mit steigender Antibiotikaproduktion zunimmt, wurde in Kultivierungen von *Actinoplanes teichomyceticus* während der Teicoplaninproduktion gezeigt (Heydorn et al., 1999).

2.3. Prozessentwicklung für die Antibiotikaproduktion

Die Biosynthese von Antibiotika in Aktinomyzeten wird sowohl durch genetische als auch durch physiologische Faktoren bestimmt. Um Produktionsprozesse für eine effiziente Herstellung der Antibiotika zu erhalten, müssen daher beide Faktoren optimiert werden. Im Speziellen bedeutet das, dass ein passender Produzentstamm generiert (Vgl. Kapitel 2.3.4) und die Prozessführung optimiert werden muss (Vgl. Kapitel 2.3.3). Dafür muss der Produzentstamm zunächst unter reproduzierbaren Bedingungen möglichst detailliert charakterisiert werden (Vgl. Kapitel 2.3.2). Je mehr über die physiologischen Parameter wie die maximale spezifische Wachstumsrate, Substrataufnahmerate und Produktausbeute sowie Nebenproduktbildung und (Produkt-)Toxizität bekannt ist, desto schneller und effizienter können die Produktionsprozesse optimiert werden. Eine detaillierte Prozessanalytik unterstützt diese Charakterisierung maßgeblich (Vgl. Kapitel 2.3.1). Da der Stoffwechsel der Produktionsstämme sehr komplex und nicht intuitiv verständlich ist, bieten zudem mathematische Modelle eine Möglichkeit, die komplexen Vorgänge im Produzentstamm objektiv zu beschreiben (Vgl. Kapitel 2.3.5). Aus diesen Modellen lassen sich außerdem rationale Ansätze zur Verbesserung des Produzentstammes und der Prozessführung ableiten.

2.3.1. Analytik von Produktionsprozessen

Eine umfassende Prozessanalytik ist Voraussetzung für die Optimierung von Produktionsprozessen, da daraus Aussagen über den physiologischen Zustand der Kultur getroffen werden können (Raju et al., 1992). Zu einer umfassenden Analytik gehören neben der Analyse der Parameter wie pH-Wert, Temperatur und Gelöstsauerstoffkonzentration auch die Analyse von Substrat-, Metabolit- und Produktkonzentrationen sowie der Zelldichte. Aus diesen Analysedaten können Informationen über Stoffwechselforgänge, Reaktionsraten und potentiell inhibitorische Metabolite abgeleitet werden. Bei der Analytik von Prozessen werden Online-Analytik-Methoden und klassische Laboranalytik unterschieden.

Die Online-Analytik-Methoden liefern schnelle Analyseergebnisse und haben gegenüber klassischer Laboranalytik den Vorteil einer zeitnahen Prozessüberwachung. Dadurch kann bei Bedarf sofort in den Prozess eingegriffen

werden und die Prozessentwicklung wird beschleunigt. Zudem laufen diese Methoden automatisiert ab, wodurch sich neue Prozessregelstrategien ergeben können, die für einen robusten Prozess sorgen. Für die direkte Prozessüberwachung über Online-Analytik-Methoden steht eine Vielzahl an Sensoren zur Verfügung. Zu den etablierten Online-Prozessparametern gehören der pH-Wert, die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2), der Kohlenstoffdioxid- und Sauerstoffgehalt in der Fermenterabluft sowie die Biomassekonzentration. Diese Parameter können aber nur sehr begrenzt Auskunft über die tatsächlichen Konzentrationen von Substraten und kritischen Metaboliten geben und erlauben daher nur eine grobe Abschätzung des eigentlichen Prozessgeschehens.

Für eine genauere Beobachtung des Prozessgeschehens ist deshalb die direkte Analyse von Substrat- und Metabolitkonzentrationen über Online-Sonden sinnvoll, die bisher eher eine Ausnahme darstellt. Für einige wenige Substrate sind aber bereits Online-Analysesysteme etabliert (Ulber et al., 2003). Dazu gehört unter anderem die Analyse von Glucose und Lactat über Fließinjektionssysteme. Hier werden die Konzentrationen von einzelnen Substraten enzymatisch über Biosensoren analysiert. Darüber hinaus wurden Fluoreszenz-Analysesysteme zur Bestimmung von fluoreszierenden Metaboliten entwickelt. Die Fluoreszenzspektren dieser Analysesysteme weisen allerdings häufig komplexe Wechselwirkungen und Überlagerungen mit den Spektren anderer Nährmedienbestandteile auf. Als weitere Online-Analysesysteme zur Bestimmung von Nährmedienbestandteilen wurden Infrarotspektroskopie und Raman-Spektroskopie etabliert. Die beschriebenen Analysesysteme sind allerdings aufgrund ihrer Komplexität bisher meist wenig robust und sehr fehlerträchtig.

Die Analytik von Substraten und Metaboliten aus Kultivierungsproben wird aufgrund der Fehlerträchtigkeit der beschriebenen Online-Analysesysteme meistens noch über klassische Laboranalytik durchgeführt, die zeitlich verzögert oder im Anschluss an den Prozess erfolgt. Zur Analyse der Nährmedienbestandteile werden standardmäßig Flüssig- und Gaschromatographie, Massenspektrometrie und enzymatische Tests eingesetzt. Diese Analytikmethoden sind gut etabliert, haben aber den Nachteil, dass sie mit hohem personellen Aufwand und einer starken zeitlichen Verzögerung verbunden sind. Zudem sind sie sehr spezifisch und nur für einzelne Analytgruppen anwendbar, so dass in den meisten Prozessen verschiedenen Analytikmethoden kombiniert werden müssen.

Mittelinfrarot-Transmissionsspektroskopie

Die Mittelinfrarot-Transmissionsspektroskopie ist eine spezielle Form der im vorherigen Kapitel erwähnten Infrarotspektroskopiemethoden. Die Infrarot (IR)-Analytik hat den Vorteil gegenüber anderen Analysemethoden, dass

eine gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von Analyten aus komplexen Kultivierungsproben in einer einzigen Probenmessung möglich ist (Vaidyanathan et al., 2001, Mazarevica et al., 2004).

Das Prinzip der IR-Spektroskopie beruht auf der Eigenschaft von Molekülen durch IR-Strahlung zu Schwingungen angeregt werden zu können und dabei Strahlung bestimmter Wellenlängen zu absorbieren. Daraus entstehen charakteristische Spektren, die qualitativ und quantitativ analysiert werden können. Ein generelles Problem dieser Methode ist jedoch die starke Absorption der IR-Strahlung durch Wassermoleküle, die vor allem in wässrigen Kultivierungsproben zu Problemen führt. Im Nahinfrarot (NIR)-Bereich ist dieser Effekt am wenigsten ausgeprägt. Allerdings liegen die Nachweisgrenzen im NIR-Bereich von biologischen Proben bei etwa 1 g/l. Zudem ist der Informationsgehalt der Spektren in diesem Wellenlängenbereich begrenzt. Im Mittelinfrarot(MIR)-Bereich hingegen sind die Nachweisgrenzen mit etwa 10 mg/l deutlich niedriger und die Spektren weisen einen deutlich höheren Informationsgehalt auf. Ein Problem bei Messungen in MIR-Bereich ist jedoch die, im Vergleich zum NIR-Bereich, noch stärkere Absorption der IR-Strahlung durch Wasser (Roychoudhury et al., 2006).

Eine Möglichkeit, den Einfluss der Absorption der MIR-Strahlung durch Wasser zu minimieren, ist die Reduzierung der optischen Weglängen. Bei der AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen) wird deshalb eine speziell entwickelte Präzisions-Durchflusszelle mit definierten Schichtdicken unter 10 µm verwendet. Mit dieser Zelle ist es möglich, spektrale Informationen von wässrigen Proben im analytisch relevanten Wellenzahlbereich zu erhalten. Im Vergleich zu anderen MIR-Methoden können mit der AquaSpec-MIR-Analytik Substanzen bereits unter 10 mg/l erfasst werden.

Die Auswertung von IR-Spektren komplexer Substanzgemische erfordert eine erhebliche Expertise und wird in der Regel mit der multivariaten Datenanalyse kombiniert (Kessler, 2008). Für die Auswertung müssen die Spektren im Vorfeld durch Auswertalgorithmen, die eine Basislinienkorrektur, Glättung und Entfaltung der Spektren durchführen, aufbereitet werden. Bei der anschließenden multivariaten Datenanalyse werden relevante Informationen aus den Spektren-Datensätzen herausgefiltert und Messwerte mit dem gleichen Informationsgehalt zusammengefasst, wodurch eine Informationsverdichtung und eine Datenreduktion stattfinden. Häufig verwendete Regressionsmodelle bei der multivariaten Datenanalyse von IR-Spektren sind die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) und die Partial Least Square (PLS)-Regression. Bei der PCA werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Spektren in sogenannten Hauptkomponenten zusammengefasst. Durch diese Hauptkomponenten werden die Korrelationen zwischen verschiedenen Spektren

dargestellt und die komplexen Datensätze der MIR-Spektroskopie werden stark reduziert. Die PLS-Regression wird in der Spektroskopie zur Kalibrierung der Spektren verwendet. Bei dieser Methode werden beispielsweise aus Referenzwerten von Analytkonzentrationen Bewertungspunkte erstellt, die bestmöglich korrelieren. Die über multivariate Datenanalyse aufbereiteten Spektrendaten werden in chemometrischen Modellen verwendet, um die Analytkonzentrationen vorherzusagen. Die erstellten chemometrischen Modelle sind speziell auf den jeweiligen Prozess zugeschnitten und nicht auf andere Prozesse übertragbar.

Aufgrund des großen Informationsgehalt und der Genauigkeit der AquaSpec-MIR-Analytik können mit dieser Methode eine Vielzahl relevanter Informationen für einen Kultivierungsprozess gewonnen werden.

Biomassebestimmung myzelartig wachsender Mikroorganismen

Die Bestimmung der Biomassekonzentration ist wichtig während der Kultivierung von Mikroorganismen, da aus der Biomassekonzentration die Wachstumsrate sowie die spezifischen Raten für Substratverbrauch und Produktbildung abgeleitet werden können, die den Verlauf eines Prozesses charakterisieren. Zur Bestimmung der Biomassekonzentration von myzelartig wachsenden Mikroorganismen sind klassische Methoden wie die Trübungsmessung oder mikroskopische Verfahren oft ungeeignet (Rønnest et al., 2011). Es sind aber zahlreiche alternative Ansätze beschrieben, die die Biomassekonzentration dieser Mikroorganismen entweder direkt oder indirekt erfassen und teilweise auch die Möglichkeit für eine Online-Analyse bieten.

Zu den direkten Methoden, die häufig zur Bestimmung der Biomassekonzentration myzelartig wachsender Mikroorganismen verwendet werden, gehören die Biotrockenmassebestimmung und das Packed Myzelial Volume (PMV) (Neves et al., 2000). Diese Methoden sind aufwendig, schwierig zu automatisieren und nicht in feststoffhaltigen Nährmedien anwendbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass sie nicht zwischen metabolisch aktiven und toten Zellen unterscheiden und zudem keine morphologischen Unterschiede erfassen können. Eine weitere direkte Methode zur Bestimmung der Biomassekonzentration, die diese Nachteile aufhebt, ist die Impedanzspektroskopie. Sie arbeitet nach dem Prinzip der Dualen-Frequenz-Dielektrizitäts-Spektroskopie, bei dem die Zellen einem externen elektrischen Feld im Radiowellen-Frequenzbereich ausgesetzt werden (Yardley et al., 2000). Die Ionen des Zellplasmas wandern in diesem Feld, abhängig von der Ladung und begrenzt durch die Plasmamembran, bis zu den Zellpolen. Dabei werden Zellen mit intakter Zellmembran polarisiert und verhalten sich wie kleine elektrische Kondensatoren. Die dadurch messbare Kapazität korreliert linear mit der Zellmasse. Während der Messung wird das elektrische Feld mit einer bestimmten Frequenz geändert. Diese

Frequenz muss idealerweise so gewählt werden, dass eine vollständige Polarisierung der Zellen ermöglicht wird. Eine vollständige Polarisation ist erreicht, wenn die Ionen des Zellplasmas, bei Umkehrung des elektrischen Feldes, zum gegenüberliegenden Zellpol gewandert sind. Die Messfrequenz ist also abhängig von der Länge der Zellen.

Indirekte Methoden zur Bestimmung der Biomassekonzentration schätzen diese über die metabolische Aktivität der Zellen ab (Kiviharju et al., 2008). Diese Methoden verwenden häufig die CO₂-und O₂-Signale der Abgasanalyse und die daraus abgeleitete Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER) und die Sauerstoffaufnahme (OUR). Zu den aus der Abgasanalyse abgeleiteten Größen gehört auch der sogenannte kumulative CER, der auf der Annahme basiert, dass das gesamte während der Kultivierung gebildete CO₂ proportional zur Biomasse ist. Neben Verwendung dieser respiratorischen Parameter können auch der Verbrauch von Base oder Säure zur Regelung des pH-Werts oder die Wärmefreisetzung der Mikroorganismen (Biener et al., 2010) während des Wachstums mit der Biomassekonzentration korrelieren. In einigen Fällen werden auch intrazelluläre Komponenten wie DNA und RNA, NAD(P)H oder Proteine zur Abschätzung der Biomassekonzentration verwendet (Meyer et al., 1985). Die genannten indirekten Methoden haben den Vorteil, dass sie nicht von Feststoffen im Nährmedium oder morphologischen Veränderungen beeinflusst werden. Allerdings haben diese Methoden auch einen Nachteil: Wenn sich der metabolische Zustand der Zellen verändert, korrelieren diese Methoden häufig nicht mehr mit der Biomassekonzentration.

2.3.2. Nährmedien- und Prozessentwicklung

Um optimale Voraussetzungen für die Antibiotikaproduktion unter Laborbedingungen zu schaffen, sind die Entwicklung eines auf den Produzentenstamm zugeschnittenen Nährmediums sowie die Anpassung der Prozessparameter notwendig. Die Nährmedienzusammensetzung kann signifikant die Qualität und Ausbeute von Sekundärmetaboliten beeinflussen (Theobald et al., 2000, Gunnarsson et al., 2003, Hobbs et al., 1990). Aus diesem Grund muss die Nährmedienzusammensetzung so gewählt werden, dass eine ausreichende Versorgung der Stoffwechselwege zu allen Zeiten des Produktionsprozesses gewährleistet ist. Bei der Nährmedienentwicklung muss zudem auf eine ausgeglichene Konzentration aller Nährstoffe geachtet werden, da einerseits bei einer Unterversorgung der Zellen die Ausbeute leidet und andererseits eine Überversorgung an bestimmten Nährmedienbestandteilen häufig zu Overflow-Metaboliten führt, die in bestimmten Konzentrationen sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung hemmen können.

Die Nährmedienentwicklung erfordert eine große Anzahl an Kultivierungen, um die komplexen Wirkungen der einzelnen Nährmedienkomponenten auf den Produzentenstamm zu charakterisieren. Aus diesem Grund wird bei der Nährmedienentwicklung häufig auf die statistische Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) zurückgegriffen (Marques et al., 2011). Bei dieser Methode werden Versuchspläne erstellt, die eine Reduzierung der Anzahl an Kultivierungen bei gleicher Aussagekraft erlauben. Durch die Anwendung der statistischen Versuchsplanung bei der Entwicklung eines Nährmediums für die Produktion des zyklischen Hexapeptid-Antibiotikums NW-G01 mit *Streptomyces albolivus* konnte die Antibiotikakonzentration im Vergleich zum nicht optimierten Nährmedium um das 2,7-fache erhöht werden (Guo et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit, den Aufwand bei der Nährmedienentwicklung zu reduzieren ist der Einsatz von Mikrokultivierungstechniken. Bei Kultivierungen verschiedener Streptomyzeten-Stämme zur Sekundärmetabolitproduktion in Mikrotiterplatten konnte ein hoher Durchsatz an Experimenten parallelisiert werden (Minas et al., 2000). Ein allgemeines Problem dieser Mikrokultivierungen sind jedoch die niedrigen Sauerstofftransferraten. Beim Vergleich von Wachstum und Produktion dieser Streptomyzeten-Stämme in Mikrotiterplatten, Schüttelkolben und Bioreaktoren konnte allerdings gezeigt werden, dass in diesen Systemen trotzdem reproduzierbare Kultivierungen durchgeführt werden können.

Zu Beginn der Nährmedienentwicklung muss der Nährmedientyp festgelegt werden. In der Regel werden komplexe und definierte Nährmedien unterschieden. Die komplexen Nährmedien für Aktinomyzeten enthalten meistens nicht genau definierte Bestandteile wie Hefeextrakt, Sojamehl und Baumwollsaatenmehl, die kostengünstig sind und mit denen in der Regel hohe Produktivitäten erreicht werden (Zhang et al., 1999). Komplexe Nährmedien haben allerdings den Nachteil, dass sie sich chargenweise in ihrer Nährstoffzusammensetzung unterscheiden, was zu Variationen unter den Kultivierungen führt. Zudem sind ihre genauen Bestandteile nicht bekannt. Besonders bei der Biosynthese von Antibiotika können Bestandteile aus komplexen Nährmedien wie Aminosäuren und Fettsäuren zu unerwünschten Verschiebungen des Produktspektrums führen (Park et al., 2009, Jovetic et al., 2008, Taurino et al., 2011). Außerdem können beispielsweise anorganische Phosphate durch die Metabolisierung von komplexen Nährmedienbestandteilen wie Sojabohnenmehl oder Hefeextrakten freigesetzt werden, die häufig regulatorischen Einfluss auf die Biosynthese von Antibiotika haben (Taurino et al., 2011).

Um zuverlässig qualitative und quantitative Aussagen über Stoffwechselfvorgänge treffen zu können, ist daher die Verwendung von chemisch definierten Nährmedien, in denen jeder Bestandteil bekannt ist, sinnvoll. Solche Nährmedien bieten neben einer besseren Reproduzierbarkeit und Prozesskontrolle auch eine verbesserte

Produktrückgewinnung (Zhang et al., 1999). Einen speziellen Vorteil bieten definierte Medien bei Antibiotikabiosyntheseprozessen. Bei vielen Antibiotikabiosynthesen werden verschiedene Variationen eines Antibiotikatypps gleichzeitig synthetisiert. In der biotechnologischen Produktion ist aber meistens nur die Synthese eines Typs erwünscht. Die Biosynthese dieser einzelnen Typen lässt sich durch Vorläufersubstanzen wie Aminosäuren und Fettsäuren gezielt beeinflussen. Neben den genannten Vorteilen für den Produktionsprozess wird durch ein chemisch definiertes Nährmedium auch die quantitative Analyse von metabolischen Stoffflüssen zur Erstellung eines Stoffflussmodells (vgl. Kapitel 2.3.4) ermöglicht. Zudem wurden chemisch definierte Nährmedien auch verwendet, um die Sauerstoffaufnahmekinetik und die metabolischen Parameter in Streptomyzeten-Kulturen bestimmen zu können. In komplexen Nährmedien war dies aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Biomassebestimmung nicht möglich (Ozergin-Ulgen, 1998).

Neben der Nährmedienentwicklung ist auch die Anpassung der physikalischen Prozessparameter wichtig, um einen effizienten Prozess zu ermöglichen (Jung et al., 2008). Zu den Standardparametern, die während eines Prozesses angepasst werden sollten, gehören die Temperatur, der pH-Wert, der osmotische Druck und die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2).

Im Fall von myzelartig wachsenden Mikroorganismen wie Aktinomyzeten und Pilzen wird der Produktionsprozess neben den Standardparametern auch stark durch die Morphologie der Myzelien beeinflusst. In größeren Myzelpellets kommt es schnell zu Diffusionslimitierungen, durch die Differenzierungsprozesse (vgl. Kapitel 2.1.1) ausgelöst werden können und die zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Prozesse führen (Manteca et al., 2008). Die Morphologie der Myzelien wird durch externe Faktoren wie das Nährmedium und die Kultivierungsbedingungen aber auch durch genetische Faktoren beeinflusst (van Wezel et al., 2006). Die Kultivierungsbedingungen, die maßgeblich die Morphologie beeinflussen sind die Scherkräfte, die durch den Leistungseintrag des Rührers oder durch Nährmedienbestandteile wie polymere Substanzen entstehen (Vecht-Lifshitz et al., 1990). Des Weiteren beeinflussen auch chemische Substanzen wie Ionen und Detergenzien die Morphologie, da sie die Hydrophobizität der Zelloberfläche verändern und dadurch Abstoßungsreaktionen zwischen den Zellhyphen verändern.

2.3.3. Entwicklung von Prozessführungsstrategien

Bei biotechnologischen Produktionsprozessen soll das gewünschte Produkt mit möglichst hohen Produktionsraten synthetisiert werden. Damit dies möglich ist, müssen ausreichend Nährstoffe für Biomasse- und Produktbildung bereitgestellt werden (vgl. Kapitel 2.3.2), die eine hohe Stoffwechselaktivität des Produktionsstammes aufrechterhalten. Zudem muss die Bildung inhibierender

Nebenprodukte oder in einigen Fällen auch eine starke Anreicherung des Produktes im Nährmedium vermieden werden. Zur Umsetzung dieser Anforderungen kommen verschiedene Prozesstypen wie Batch-, Fed-Batch und kontinuierliche Prozesse zum Einsatz.

Im Batch-Prozess erfolgt die Kultivierung in einem geschlossenen System ohne Zu- oder Abfuhr von Nährstoffen. Eine Ausnahme bilden die Luftzufuhr durch die Begasung und die Zugabe von Korrekturmitteln zur pH-Wert-Regelung. Bei diesem Prozesstyp ändern sich die Substrat- und Produktkonzentrationen, die Zelldichte und die Scherkraftbelastung im Verlauf des Prozesses. Dadurch entstehen verschiedenen Prozessphasen wie die exponentielle Phase, die stationäre Phase und die Absterbephase. Die Änderungen der Bedingungen während des Batch-Prozesses können, vor allem bei Aktinomyzeten mit ihren komplexen Regulationsmechanismen (vgl. Kapitel 2.2.5), die Ausbildung unterschiedlicher Differenzierungszustände auslösen (Bibb, 2005, Demain, 1998). Um den Einfluss der sich ändernden Substratkonzentrationen auf die Biosynthese von Antibiotika zu minimieren werden daher häufig Fed-Batch-Kultivierungen eingesetzt.

Bei der Fed-Batch-Kultivierung werden Substrate, die eine Bildung von Nebenprodukten auslösen können oder in höheren Konzentrationen inhibierend wirken, limitiert zugefüttert. Ein klassisches Beispiel, bei dem die Zufütterung des wachstumslimitierenden Substrates Glucose eine Reduzierung der Nebenproduktbildung bewirkt, ist die Bildung von Acetat in *E. coli*. Nur wenn die Glucosekonzentrationen eine kritische Konzentration nicht überschreitet, wird kein Acetat gebildet (Riesenberg et al., 1991). Bei Antibiotikaproduktionsprozessen werden häufig Substrate zugefüttert, die regulatorisch auf die Biosynthese wirken (vgl. Kapitel 2.2.5).

Ein weiterer Prozesstyp ist die kontinuierliche Kultivierung. Dieser Prozesstyp stellt ein offenes System dar, bei dem die Nährlösung dem Bioreaktor mit einer konstanten Zuflussrate zugeführt und das Kulturmedium mit derselben Rate abgepumpt wird. Die Verdünnungsrate ist bei diesem Prozesstyp eine wichtige Größe und gibt den Wechsel des Kulturvolumens pro Stunde an. Der Vorteil einer kontinuierlichen Kultivierung besteht darin, dass sich nach einiger Zeit ein dynamisches Fließgleichgewicht einstellt. In diesem Zustand sind alle Konzentrationen im Nährmedium und alle Bildungs- und Verbrauchsraten konstant. Der konstante Zustand wird meistens durch Limitation eines Substrates ausgelöst, wodurch die Wachstumsrate begrenzt wird. Die volumetrische Produktivität eines kontinuierlichen Prozesses wird in diesem Zustand als Produkt aus der Produktkonzentration und der Verdünnungsrate dargestellt. Daher sind in einem kontinuierlichen Prozess hohe Verdünnungsraten wünschenswert.

Eine Erweiterung des kontinuierlichen Prozesses ist der Perfusionsprozess, der vor allem bei langsam wachsenden Mikroorganismen zum Einsatz kommt. Bei diesem Prozessstyp werden die Zellen über Zellrückhaltesysteme aus dem Ablaufstrom entfernt und dem Bioreaktor wieder zugeführt. Dadurch wird der Austrag der Zellen aus dem Bioreaktor stark reduziert. Für Perfusionsprozesse ist eine Vielzahl an Zellrückhaltesystemen beschrieben (Voisard et al., 2003). Dazu gehören Filtrationssysteme, die eine sehr effiziente Zellrückhaltung ermöglichen, aber sehr anfällig für die Verblockung der Membranen sind. Das Problem der Verblockung dieser Systeme wird häufig durch Anwendung des Querstromprinzips und durch Variation der Flussrichtung in den Filtrationsmodulen minimiert. Außerdem sind bei Perfusionsprozessen Sedimentationsmodule, Zentrifugationssysteme und sogenannte Settler im Einsatz. Akustische Settler, bei denen die Sedimentation der Zellen in einer Sedimentationskammer über akustische Wellen verstärkt wird, arbeiten sehr effizient und zellschonend und werden bereits bei Prozessen mit tierischen Zellkulturen erfolgreich eingesetzt. Bei Zentrifugationssystemen wird zellhaltiges Medium aus dem Bioreaktor in eine Zentrifuge gepumpt, in der die Zellen abgetrennt und dem Bioreaktor wieder zugeführt werden. Diese Systeme ermöglichen einen hohen Zellrückhaltegrad, beeinträchtigen aber stark die Vitalität der Zellen aufgrund der hohen Verweilzeiten und den hohen Scherkräften beim Zentrifugieren.

2.3.4. Prozessoptimierung durch Stammverbesserung

Zu einem effizienten Produktionsprozess trägt nicht nur ein optimierter Kultivierungsprozess bei (vgl. Kapitel 2.3.2 und 2.3.3), sondern auch die Leistungsfähigkeit des verwendeten Produktionsstammes. Wildtypstämme synthetisieren die gewünschten Produkte meist nur in geringen Konzentrationen. Vor allem bei Antibiotika, die schon in niedrigen Konzentrationen wirksam sind, sind die Produkttiter sehr gering.

Die Produktbiosynthesewege effizienter Produktionsstämme sind durch Stoffflussraten gekennzeichnet, die hoch zum gewünschten Produkt und gering zu den Nebenprodukten sind. Hohe Stoffflussraten zum Produkt werden erreicht, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind. Zum einen muss eine ausreichende Bereitstellung von Substraten im Nährmedium gewährleistet sein (vgl. Kapitel 2.3.2), zum anderen muss das Zusammenspiel der Enzymaktivitäten und Regulationsmechanismen der Produkt- und Precursorbiosynthesewege in der Zelle aufeinander abgestimmt sein.

Ansatzpunkte für die Stammverbesserung lassen sich durch eine Charakterisierung der Produktstoffwechselwege und der daran beteiligten Enzyme sowie aus Erfahrungswerten, die bei Kultivierungen des Produzentenstammes gesammelt wurden, finden. Zudem eröffnen sich durch die Bereitstellung von Sequenzierdaten

vollständiger Genome, wie sie auch für *A. friuliensis* vorliegen, weitere Möglichkeiten zur gezielten Aufklärung und Veränderung von Stoffwechselwegen. Aus den Genomdaten können beispielsweise Informationen zu regulatorischen Bereichen und Strukturgenen abgeleitet werden. Auch aus der vollständigen Charakterisierung von Sekundärmetabolitclustern können sich neue Ansatzpunkte zur Stammverbesserung ergeben, da diese Cluster regulatorische Elemente enthalten, die zur Steigerung der Produktausbeute verwendet werden können (Olano et al., 2008). Weitere Ansatzpunkte zur Verbesserung der Produzentenstämme lassen sich außerdem aus Stoffwechselmodellen (vgl. Kapitel 2.3.4) ableiten.

2.3.5. Genombasierte Netzwerkmodelle und Stoffflussanalyse

Stoffwechselmodelle können einen wesentlichen Beitrag zur Steigerung der Effizienz bei der Entwicklung von biotechnologischen Prozessen liefern. Aus Stoffwechselmodellen können Informationen gewonnen werden, die nicht direkt aus experimentellen Beobachtungen abgeleitet werden können, da sie verdeckt oder sehr komplex sind (Blank et al., 2013). Stoffwechselmodelle sind metabolisch strukturierte Modelle die, im Gegensatz zu Black-Box-Modellen, einzelne Reaktionen in der Zelle berücksichtigen. Diese Modelle werden als System biochemischer Reaktionsgleichungen formuliert, die das metabolische Reaktionsnetzwerk der Zelle näherungsweise abbilden. Die Genauigkeit dieser Stoffwechselmodelle wird durch den Zugriff auf komplette Genomsequenzen verbessert, da daraus Informationen über tatsächlich vorhandene Reaktionen abgeleitet werden können. Die zugehörigen Reaktionsgleichungen werden dabei, sofern sie verfügbar sind, aus bestehenden metabolischen Reaktionsdatenbanken extrahiert. Teilweise laufen diese Netzwerkrekonstruktionen sogar automatisiert ab, bedürfen dann aber häufig noch aufwendiger manueller Korrektur und Ergänzung. Einige Reaktionsgleichungen beispielsweise für die Produktsynthese und die Synthese von ungewöhnlichen Precursormolekülen müssen neu formuliert werden.

In Stoffwechselmodellen können Daten verschiedener Art integriert und simultan analysiert werden. Dazu gehören experimentell ermittelte Daten aus der Bestimmung von Substrataufnahmeraten und Produktbildungsraten, der Abgasanalyse sowie von Transkriptionsprofilen. Die Integration experimenteller Daten in diese Modelle ermöglicht Stoffflussanalysen und damit Aussagen zu Stoffflussverteilungen, maximalen Ausbeuten und Kontrollhierarchien, die nicht direkt messbar sind (Blank et al., 2013). Darüber hinaus können verschiedene Größen zur Charakterisierung eines Prozesses wie die maximal mögliche Produkt- und Biomasseausbeute sowie der Verbrauch von Zellenergie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) für den Erhaltungsstoffwechsel berechnet werden. Durch Stoffflussanalysen kann zudem die

Leistungsfähigkeit von entwickelten Produzentenstämmen gegenüber dem Ausgangsstamm beurteilt werden.

Neben der Beurteilung von Biosyntheseprozessen können Stoffflussanalysen außerdem Schlüsselreaktionen für die Produktbiosynthese aufzeigen, an denen gezielt genetische Modifikationen vorgenommen werden können, die zu einer Steigerung der Produktivität führen. Dabei handelt es sich meistens um die Entfernung von metabolischen Engpässen (Bottlenecks) oder die Umleitung von Stoffflüssen. Stoffflussanalysen tragen damit zu einer rationalen Stammoptimierung bei (Vongsangnak et al., 2012). Die Stoffflussanalyse allein reicht allerdings meistens nicht aus, um Angriffspunkte für gezielte genetische Modifikationen zu identifizieren. Häufig müssen zusätzliche experimentelle Daten beispielsweise aus der Analyse von intrazellulären Metaboliten oder Transkriptionsdaten für eine zuverlässige Identifikation von solchen Modifikationen hinzugezogen werden.

3. Material und Methoden zur Kultivierung von *A. friuliensis*

3.1. Nährmedien und Chemikalien

Soweit nicht in Tabelle 1 aufgeführt, wurden alle Nährmedien und Chemikalien für die Kultivierung von *A. friuliensis* von der Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 1: Bezugsquellen von Nährmedien und Chemikalien, die nicht von der Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen wurden.

4-Aminobenzoesäure	Riedel-de Haën (Seelze)
Bacto™-Tryptic-Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Ca-Pantothenat	Sigma (St. Louis, USA)
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	Riedel-de Haën (Seelze)
Glycin	Sigma (St. Louis, USA)
Nikotinamid	Fluka (St. Louis, USA)
Nikotinsäure	Merck (Darmstadt)
Riboflavin	Fluka (St. Louis, USA)
Vitamin B12	Sigma (St. Louis, USA)
ZnCl ₂	Merck (Darmstadt)

Die Nährmedien für die Kultivierungen von *A. friuliensis* (Tabelle 2) wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und soweit nicht anders angegeben 20 min bei 121 °C autoklaviert. Das chemisch definierte Nährmedium wurde aus separat hergestellten Stammlösungen angesetzt.

Tabelle 2: Nährmedien für die Kultivierung von *A. friuliensis*.

		g/l
TSB-Medium	Caseinhydrolysat	17,0
(Bacto™-Tryptic Soy Broth)	Sojapepton	3,0
bestehend aus:	Dextrose	2,5
	NaCl	5,0
	K ₂ HPO ₄	2,5

Fortsetzung von Tabelle 2:

		g/l
Chemisch definiertes Nährmedium für <i>A. friuliensis</i> nach Wagner (2009)	Saccharose	11,0
	L-Arginin HCl	2,0
	L-Valin	0,6
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,6
	K ₂ HPO ₄	0,07
	Spurenelementlösung	0,1 %
	Vitaminlösung	0,13 %
Spurenelementlösung (Okanishi et al., 1974)	Fe(III)Cl ₃ · 6 H ₂ O	0,20
	ZnCl ₂	0,04
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	0,01
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,01
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,01
Vitaminlösung (Gonzalez et al., 2003, modifiziert) sterilfiltriert	Biotin	0,04
	Ca-Pantothenat	0,67
	Nikotinamid	0,67
	Thiamin-HCl	0,67
	Pyridoxin HCl	0,67
	4-Aminobenzoessäure	0,13
Medium für Agardiffusionstest	KH ₂ PO ₄	3,0
	K ₂ HPO ₄	7,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
	Na ₃ -Citrat · 2 H ₂ O	0,5
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
	Glucose	2,0
	Agar	15,0

Fortsetzung von Tabelle 2:

		g/l
Sporulationsmedium für <i>Bacillus subtilis</i> (pH 7,1)	Glukose	2,0
	Na-L-Glutamat-Monohydrat	1,9
	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,001
	MnCl ₂ · 2 H ₂ O	0,015
	NH ₄ Cl	0,540
	NaSO ₄	0,105
	KH ₂ PO ₄	0,087
	CaCl ₂	0,195
	NH ₄ NO ₃	0,096
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,008

3.2. Kultivierung von *A. friuliensis*

Für die Untersuchungen der Friulimicinbiosynthese in *Actinoplanes friuliensis* wurde der Stamm HAG 010964 (Aretz et al., 2000) verwendet.

3.2.1. Stammhaltung

Zur Herstellung von Kryokulturen von *A. friuliensis* wurden 100 ml TSB-Medium mit *A. friuliensis* inokuliert und 4 d bei 28 °C und 140 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert. Das Myzel wurde nach der Inkubation zweimal mit TSB-Medium (Tabelle 2) gewaschen, indem die Kultur 10 min bei 3500 g zentrifugiert wurde und das Zellpellet anschließend in frischem TSB-Medium resuspendiert wurde. Nach dem Waschen wurde das Myzel mit einem Glashomogenisator homogenisiert und mit 20 % sterilem Glycerin vermischt. Die Kultur wurde in Röhrchen á 2 ml bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Vorbereitung des Inokulums

Die Vorbereitung des Inokulums für die Kultivierungen im Bioreaktor erfolgte über zwei Vorkulturen. Die Vorkultur 1 wurde in komplexem Nährmedium, die Vorkultur 2 wurde zur Anpassung von *A. friuliensis* an das Nährmedium der Hauptkultur in chemisch definiertem Nährmedium hergestellt. Um eine homogene und möglichst feine Myzelbildung zu erreichen sowie eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Vorkulturen während der gesamten Inkubationszeit auf

einem Magnetrührer mit einem zylindrischen Magnetrührstäbchen bei 300 rpm gerührt (Abbildung 4).

Zur Herstellung der Vorkultur 1 wurden 100 ml TSB-Medium in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen überführt. Die Vorkultur wurde 0,1%ig aus der Kryokultur (3.2.1) inokuliert. Die Vorkultur wurde in einem Inkubator (Multitron InforsHT, Bottmingen, Schweiz) bei 28 °C für 4 d inkubiert.

Für die Vorkultur 2 wurden 300 ml chemisch definiertes Nährmedium (Tabelle 10) in einen 1000-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultur wurde 1%ig aus der Vorkultur 1 inokuliert und wurde bei 28 °C für 3 d inkubiert.



Abbildung 4: Herstellung der Inokula zur Kultivierung von *A. friuliensis*. Die Kultur wurde während der gesamten Inkubationszeit in Kulturkolben auf einem Magnetrührer mit einem Magnetrührstäbchen gerührt.

3.2.3. Kultivierung im Schüttelkolben

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Nährmedienbestandteile auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. friuliensis*, wurden Kultivierungen im Kulturkolben durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten im 200-ml-Maßstab in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane. Die Kulturen wurden 1%ig mit Vorkultur 1 (3.2.2) inokuliert und bei 28 °C und 400 rpm im Inkubationsschüttler (Multitron InforsHT, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

3.2.4. Kultivierung im Senbit-Schüttelkolbensystem

Zur Untersuchung der Kultivierungsbedingungen der Vorkulturen wurde das Senbit-Schüttelkolbensystem verwendet (teleBITcom, Teltow). Dieses System bestand aus 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit Glasstutzen, über die die Kulturkolben mit pH- und pO₂-Sonden (Meinsberg, Ziegra-Knoblesdorf) ausgestattet werden konnten. Die pH- und pO₂-Sonden waren an einen Funktransmitter angeschlossen,

über den die Sondendaten während der Kultivierung alle 12 min an einen PC zur Aufzeichnung gesendet wurden. Die weiteren Kultivierungsbedingungen sind unter 3.2.2 beschrieben.

3.2.5. Kultivierung im 2,5-l-Bioreaktor

Die Kultivierungen im 1,5-l-Maßstab wurden im 2,5-l-Bioreaktor (InforsHT Minifors, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Die Ausstattung des Bioreaktors ist in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Ausstattung des 2,5-l-Bioreaktors

	Messprinzip	Hersteller
pO ₂ -Sonde	optisch	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pH-Sonde	amperometrisch	Mettler-Toledo, Gießen
Durchflussregler	thermisch	Vögtlin red-y, Aesch, Schweiz
Abgasanalyse O ₂	paramagnetisch	BlueSens, Herten
Abgasanalyse CO ₂	Infrarot	BlueSens, Herten

Vor dem Autoklavieren wurde der Bioreaktor mit 1l deionisiertem Wasser gefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden die restlichen Nährmedienbestandteile aus sterilen Stammlösungen in den abgekühlten Reaktor überführt und das fehlende Volumen mit sterilem Wasser ergänzt. Der Bioreaktor wurde mit einem Inokulationsverhältnis von 1:5 aus Vorkultur 2 (vgl. Kapitel 3.2.2) inokuliert. Um möglichst wenig Nährmedium der Vorkultur in den Bioreaktor zu überführen, wurden die Myzelien der Vorkultur vor der Inokulation konzentriert. Dies wurde durch Entfernung von etwa zwei Drittel des Kulturüberstands nach Sedimentation des Myzels erreicht.

Während den Kultivierungen wurde der pH-Wert des Nährmediums mit 1 M H₂SO₄ und 2 M KOH auf pH 7,0 geregelt. Der pO₂-Wert wurde über eine Programmsequenz in der Bioreaktorsoftware Iris durch automatische Anpassung der Rührergeschwindigkeit in 10-rpm-Schritten über 30 % Sauerstoffsättigung gehalten. Die Begasung erfolgte mit Luft und wurde über einen Massendurchflussregler konstant auf 0,3 lpm (0,2 vvm) geregelt. Zur Reduzierung der Verdunstung des Nährmediums und zur Verbesserung der Genauigkeit der Abgasanalyse wurde die Feuchtigkeit im Abluftstrom über einen Abgaskühler reduziert. Das Abgas-Analysesystem wurde vor der Kultivierung mit Raumluft kalibriert. Die aus der Abgasanalyse abgeleiteten Größen Sauerstoffaufnahme (OUR – Oxygen Uptake Rate) und Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER – Carbon

Dioxide Evolution Rate) wurden über die unter 3.3.10 beschriebenen Formeln berechnet. Proben des Kulturmediums wurden ein- bis zweimal täglich entnommen.

Die Probenahme erfolgte durch Erzeugung eines Vakuums im Probenahmefläschchen mit Hilfe einer Spritze über einen Sterilfilter. Dadurch wurde Zellsuspension über das Probenahmerohr des Bioreaktors in das Probenahmefläschchen befördert. Sofort nach der Probenahme wurde die Zellsuspension über einen Spritzenfilter (0,2 µm Polyethersulfon, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) filtriert, in Röhrchen à 2 ml abgefüllt und bis zur Analytik bei -35 °C gelagert. Die Biotrockenmassebestimmung erfolgte unmittelbar nach der Probenahme (siehe 3.3.2).

Bei Fed-Batch-Kultivierungen im 2,5-l-Bioreaktor wurde die Zufütterung nach einer anfänglichen Batch-Phase mit einem linearen Profil gestartet. Da eine kontinuierliche Dosierrate aufgrund der kleinen Zufütterungsvolumina nicht realisierbar war, wurde die Feedlösung im 10 min Takt dosiert. Die Zufütterung der Feedlösung erfolgte über ein in Matlab (The Mathworks, Novi, USA) erstelltes Programm, mit dem die Feedlösung Waagen-kontrolliert über eine externe Schlauchpumpe mit Kassettenpumpenkopf (Ismatec Ecoline, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld) dosiert wurde.

3.2.6. Kultivierung im 7,5-l-Bioreaktor

Da die Möglichkeiten der Messtechnik und das Probenahmevermögen im 2,5-l-Bioreaktor begrenzt waren, wurden einige Kultivierungen im größeren Maßstab durchgeführt. Für die Kultivierungen im 3- und 4-l-Maßstab wurde daher ein 7,5-l-Bioreaktor (InforsHT Labfors, Bottmingen, Schweiz) verwendet. Die Ausstattung des 7,5-l-Bioreaktors ist in Tabelle 4 beschrieben. Die Kultivierungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, wie im 1,5-l-Maßstab (vgl. Kapitel 3.2.5) durchgeführt.

Tabelle 4: Ausstattung des 7,5-l-Bioreaktors

	Messprinzip	Hersteller
pO ₂ -Sonde	optisch	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pH-Sonde	amperometrisch	Mettler-Toledo, Gießen
Mass-Flow-Controller	thermisch	red-y, Vögtlin, Aesch, Schweiz
Abgasanalyse O ₂	Zirconiumelektrolysezelle	BlueSens, Herten
Abgasanalyse CO ₂	Infrarot	BlueSens, Herten
Biomassebestimmung	Impedanz- spektroskopisch	Fogale Nanotech, Nimes, Frankreich

Fed-Batch-Kultivierungen wurden im 4-l-Maßstab durchgeführt. Die Zufütterung wurde über eine Feedpumpe des Bioreaktors realisiert, die über ein in Matlab erstelltes Programm angesteuert wurde. Bei Verwendung einer zweiten Feedlösung wurde zusätzlich eine externe Pumpe (Ismatec, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld) verwendet, die ebenfalls über ein Matlab-Programm angesteuert wurde. Die Dosierung der Feedlösung erfolgte kontinuierlich mit einem linearen Profil und wurde über Waagen kontrolliert.

Die kontinuierlichen Kultivierungen mit Zellrückhaltung wurden im 3-l-Maßstab durchgeführt. Die Zufütterung des Nährmediums erfolgte über eine externe Pumpe mit variabler Drehzahleinstellung (Ismatec MCP, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld), die über ein Matlab-Programm gesteuert und über eine Waage (Sartorius Talent TE6101, Göttingen) kontrolliert wurde (Abbildung 5). Da der Wägebereich der Feedvorlagewaage begrenzt war, wurde das Feedvorlagegefäß bei Bedarf automatisch über eine weitere Pumpe aus einem Vorlagetank nachgefüllt. Das Volumen des Bioreaktors wurde über das Bioreaktorgewicht kontrolliert, indem das Gewicht des gesamten Bioreaktorsystems von einer Waage (Sartorius LA64000, Göttingen) bestimmt wurde. Um das Kulturvolumen im Bioreaktor konstant zu halten, wurde innerhalb einer Schaltdifferenz von 20g (je nach Feedrate etwa alle 15-30 min) Kulturmedium über das Probenahmerohr abgepumpt. Für die Zellrückhaltung wurden 30-60s vor der Entnahme des Kulturmediums Rührer und Begasung ausgeschaltet. Dies ermöglichte eine Sedimentation der Myzelpellets. Das Probenahmerohr wurde zudem, um den nahezu zellfreien Kulturüberstand abzupumpen, etwa 2cm unterhalb des Flüssigkeitslevels im Bioreaktor positioniert. Nach dem Abpumpvorgang wurden Rührer und Begasung wieder angeschaltet und die Kultivierung mit den vorherigen Parametern fortgesetzt.

Die pO_2 -Regelung erfolgte bei der kontinuierlichen Prozessführung nicht wie bei den anderen Prozessen über eine Programmsequenz der Bioreaktorsoftware Iris, sondern über ein Matlab-Programm. Die Regelung über dieses Matlab-Programm ermöglichte ein Ausschalten der pO_2 -Regelung während des Abpumpvorgangs des Kulturmediums, da während des Abpumpvorgangs die Gelöstsauerstoffkonzentration kurzfristig abfiel. Diese pO_2 -Regelung erhöhte bei Unterschreiten des pO_2 von 30 % Sättigungswert die Rührergeschwindigkeit in Schritten von 10 rpm. Als zusätzliche Möglichkeiten zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags konnten bei dieser Regelung zum einen der Sauerstoffanteil durch Zugabe von reinem Sauerstoff in der Zuluft, zum anderen auch die Begasungsrate erhöht werden.

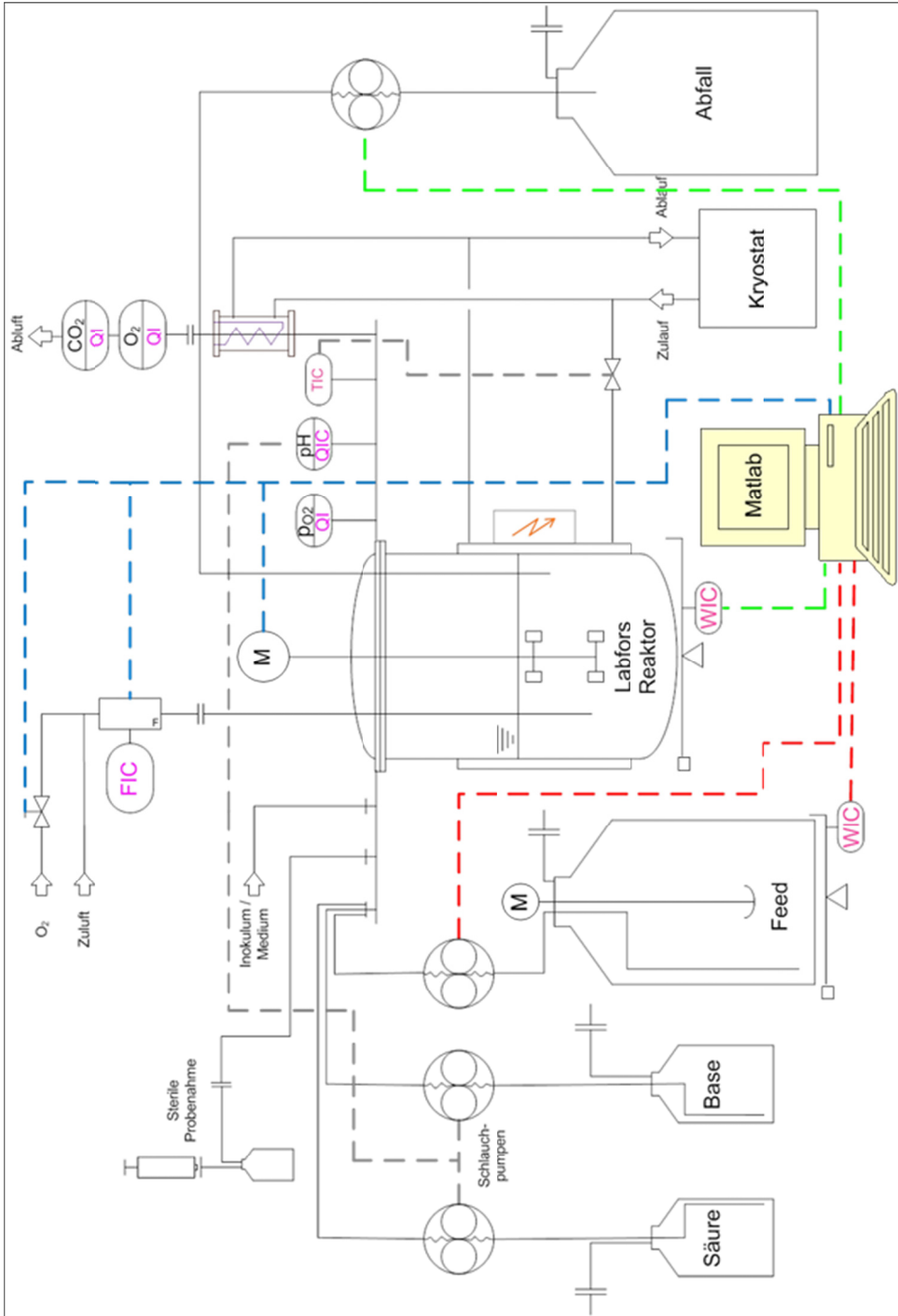


Abbildung 5: Fließbild des kontinuierlichen Prozesses mit Zellrückhaltung. Rote gestrichelte Linie: waagenkontrollierte Regelung der Zufütterung mit Feedpumpe; grüne gestrichelte Linie: Regelung des Bioreaktorvolumens über das Reaktorgewicht mit Ablaufpumpe; blaue gestrichelte Linie: Regelung des pO_2 -Wertes über Rührergeschwindigkeit, Sauerstoffkonzentration der Zuluft und Begasungsvolumen; graue gestrichelte Linie: Standardregelung von pH-Wert und Temperatur.

3.3. Analytik von Kultivierungsproben

Aus Kultivierungsüberständen wurden standardmäßig die Konzentrationen von Biotrockenmasse, Glucose und Saccharose, der Aminosäuren Arginin und Valin, Phosphat und Sulfat sowie Friulimicin analysiert. Die Analytik dieser Komponenten erfolgte über Standardverfahren wie HPLC und Ionenchromatographie sowie mit enzymbasierten Testkits. Die Kultivierungsüberstände ausgewählter Kultivierungen wurden zusätzlich über Mittelinfrarot-Spektroskopie analysiert (3.3.9). Zudem wurden die Kulturen in regelmäßigen Abständen auf Kontamination überprüft (3.3.1).

3.3.1. Prüfung von Kulturen auf mikrobielle Kontamination

Zur Überprüfung von Kultivierungen auf mikrobielle Kontamination wurden Kultivierungsproben in regelmäßigen Abständen mikroskopisch unter 1000-facher Vergrößerung betrachtet sowie Reinheitsausstriche auf Agarplatten durchgeführt. Für die Reinheitsausstriche wurden 100 µl Probe auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und für 3 d bei 28 °C inkubiert. Aufgrund der orangefarbenen Pigmentierung von *A. friuliensis* lassen sich mikrobielle Verunreinigungen auf Agarplatten deutlich erkennen.

3.3.2. Bestimmung der Biotrockenmasse

Bei der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurden 10 ml Kulturflüssigkeit über Vakuumfiltration auf einen Celluloseacetatfilter (0,2 µm, Macherey-Nagel, Düren) gesaugt, von dem zuvor das Gewicht bestimmt wurde. Zur Entfernung von Nährmedienbestandteilen wurde das Myzel mit deionisiertem Wasser gewaschen. Der Filter mit dem ausgesaugten, gewaschenen Myzel wurde bei 130 °C im Infrarot-Trocknungsgerät (Ohaus, Nänikon, Schweiz) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde der Filter auf einer Feinwaage gewogen. Um das Nettogewicht zu erhalten, wurde das Gewicht des leeren Filters von dem des getrockneten Filters subtrahiert. Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte in einer Doppelbestimmung.

3.3.3. Bestimmung von Friulimicin B

Die Untersuchung der Antibiotikabildung von *A. friuliensis* wurde in dieser Arbeit auf das Lipopeptidantibiotikum Friulimicin B beschränkt (Abbildung 2).

Bestimmung von Friulimicin B über HPLC

Die Bestimmung der Konzentration von Friulimicin B in Kultivierungsproben erfolgte über Reversed-Phase-HPLC (Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan) in Anlehnung an das Protokoll von Vertesy et al. (2000). Die wichtigsten Parameter für die

HPLC-Analytik sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Kultivierungsproben wurden vor der Auftrennung 1:5 mit eiskaltem Methanol (-20 °C) gemischt und 10 min bei 16060 g zentrifugiert. Als Standard wurden Verdünnungen von Friulimicin B (MerLion Pharmaceuticals GmbH, Berlin, Chargennummer CBS000043) verwendet, die ebenfalls mit Methanol versetzt wurden.

Tabelle 5: Parameter zur Trennung und Detektion von Friulimicin B über HPLC

Säule:	TSKgel ODS-100V, 25 cm (Tosoh Stuttgart, Germany)
Laufmittel:	Isokratisch: Acetonitril und 0,1%ige Phosphorsäure (45:55)
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min
Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV-Detektor, 210 nm

Agardiffusionstest zur Bestimmung von Friulimicin

Der Agardiffusionstest wurde als semiquantitativer Schnelltest zur Bestimmung der Friulimicinproduktion während der Kultivierungen eingesetzt. Das Testprinzip beruht auf der Ausbildung eines Hemmhofs mit dem friulimicinsensitiven Referenzkeim *Bacillus subtilis*. Bei diesem Test werden im Gegensatz zur HPLC-Analytik alle gebildeten Substanzen erfasst, die eine antibiotische Wirkung gegenüber dem eingesetzten Referenzkeim besitzen. Für den Agardiffusionstest wurden mit einem sterilen Korkbohrer (D = 6 mm) Agarblöckchen aus einer *B. subtilis*-Testplatte ausgestochen. Anschließend wurden in die Vertiefung 80 µl des zu testenden Kulturüberstandes pipettiert. Die Friulimicinproduktion konnte nach Inkubation der Testplatte über Nacht bei 37 °C anhand eines um die Vertiefung entstandenen Hemmhofs detektiert werden.

Für die Herstellung der Testkeimplatten wurde eine Sporensuspension von *B. subtilis* hergestellt. Dazu wurden 100 ml *B. subtilis*-Sporulationsmedium (Tabelle 2) in einem 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Zellmaterial aus einer TSB-Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte für etwa 3 d im Inkubationsschüttler bei 120 rpm und 30 °C. Das Wachstum und die Sporenbildung von *B. subtilis* wurden mikroskopisch verfolgt. Sobald neben einer geringen Menge vegetativer Zellen nur noch Sporen erkennbar waren, wurde die Kultur durch Zentrifugation (9000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Nach dreimaligem Waschen der Zellpellets mit sterilem Leitungswasser wurde die Suspension ebenfalls mit sterilem Leitungswasser auf eine OD₅₄₆ von 1,5 eingestellt. Für die Herstellung der Testkeimplatten wurde 1 % (v/v) dieser Sporensuspension

direkt in den 70 °C heißen TSB-Agar (Tabelle 2) gegeben, um restliche vegetative Zellen zu inaktivieren.

3.3.4. Bestimmung von Glucose

Die Bestimmung der Konzentration von D-Glucose in Kultivierungsproben erfolgte enzymatisch-amperometrisch mit einem Glucoseanalysegerät (C-line EKF, Barleben). Die Kultivierungsproben wurden, soweit notwendig, mit deionisiertem Wasser verdünnt und nach Angaben des Herstellers analysiert.

3.3.5. Bestimmung von Saccharose

Für die Bestimmung der Saccharosekonzentration in Kultivierungsproben wurden diese zunächst 15 min bei 80 °C im Thermoschüttler inkubiert, um mögliche Enzyme in den filtrierten Kultivierungsüberständen zu inaktivieren. Die Saccharosekonzentration wurde anschließend mit einem Saccharose/D-Glucose-Enzymtestkit (r-biopharm, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Saccharose durch β -Fructosidase zu D-Glucose und D-Fructose. Die entstandene D-Glucose wird über weitere enzymatische Schritte mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase unter Freisetzung von NADPH umgesetzt, welches im Spektrometer quantifiziert werden kann. Anhand der NADPH-Konzentration können Rückschlüsse auf die Saccharosekonzentration gezogen werden.

3.3.6. Bestimmung von Aminosäuren und Ammonium

Die Bestimmung der Konzentrationen der Aminosäuren Arginin und Valin sowie von Ammonium erfolgte zum einen nach Abschluss der Kultivierung über HPLC, zum anderen wurde prozessbegleitend ein enzymatischer Schnelltest für Arginin und Ammonium durchgeführt.

Bestimmung von Aminosäuren und Ammonium über HPLC

Die Bestimmung der Konzentrationen von Arginin, Valin und Ammonium in Kultivierungsüberständen wurde mit der AccQ-Tag-Methode (Waters, Milford Massachusetts, USA) über HPLC (Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan) durchgeführt. Bei dieser Methode werden primäre sowie sekundäre Aminosäuren mit 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamat (AQC) in stabile fluoreszierende Derivate umgesetzt, die nach Auftrennung in einem Fluoreszenzdetektor analysiert werden können.

Für die Analyse wurden die filtrierten Kultivierungsproben entsprechend mit HPLC-grade Wasser verdünnt. 100 μ l der verdünnten Probe wurde mit 20 μ l einer

0,5 mM Serinlösung (Interner Standard) versetzt und nach Angaben des Herstellers derivatisiert. In Tabelle 6 sind die wichtigsten Parameter zur Trennung und Detektion der Derivate aufgeführt.

Tabelle 6: Parameter zur Trennung und Detektion von Aminosäuren über HPLC

Säule:	AccQ-Säule (Waters, Milford Massachusetts, USA)
Laufmittel:	Gradient aus Acetonitril, Wasser, AccQ-Puffer
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min
Temperatur:	37 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Detektion:	Fluoreszenzdetektor Ex 250nm, Em 395nm (Waters, Milford Massachusetts, USA)

Enzymatischer Schnelltest zur Bestimmung von Arginin und Ammonium

Die Konzentrationen von Arginin und Ammonium wurden während der Kultivierungen mit einem enzymatischen Arginin/Harnstoff/Ammonium-Schnelltest (Megazyme, Wicklow, Irland) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Bei diesem Test wird Arginin durch das Enzym Arginase zu Harnstoff und Ornithin hydrolysiert. Der freigesetzte Harnstoff wird in einem nächsten Schritt durch Urease zu Ammonium und Kohlenstoffdioxid umgewandelt. Ammonium wird anschließend in einer dritten Reaktion zusammen mit 2-Oxoglutarat unter Verbrauch von NADPH durch Glutamatdehydrogenase zu Glutamat umgesetzt. Der NADPH-Verbrauch kann bei dieser Reaktion über ein Spektrometer quantifiziert werden und ist proportional zur Ammoniumkonzentration. Durch die Bestimmung der NADPH-Konzentrationen nach jedem enzymatischen Schritt kann auf die Arginin- und Harnstoffkonzentration zurückgeschlossen werden.

3.3.7. Bestimmung von Phosphat und Sulfat

Die Bestimmung der Phosphat- und Sulfatkonzentrationen erfolgte zum einen nach Abschluss der Kultivierung über Ionenchromatographie, zum anderen wurde prozessbegleitend ein enzymatischer Schnelltest zur Bestimmung der Phosphatkonzentration durchgeführt.

Ionenchromatographische Bestimmung von Phosphat und Sulfat

Die Konzentrationen von Phosphat und Sulfat in Kultivierungsüberständen wurden über Ionenchromatographie (Metrohm 792 Basic, Filderstadt) bestimmt. Als Standards wurden Verdünnungen von Phosphat- und Sulfatkalibrierlösungen

(Certipur, Merck) verwendet. Die Kultivierungsproben wurden vor der Analyse mit Reinstwasser verdünnt. Die wichtigsten Parameter zur Bestimmung von Phosphat und Sulfat sind in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Parameter zur Trennung und Detektion von Phosphat und Sulfat über IC

Säule:	Metrosep Anion Supp-A 4,0x250 mm, Particle 10 µm
Anionensuppressorsäule:	Dual1 (Metrohm, Filderstadt)
Laufmittel:	1,7 mM NaHCO ₃ , 1,8 mM Na ₂ CO ₃ , 4 % Aceton
Regeneriermittel:	50 mM H ₂ SO ₄
Fließgeschwindigkeit:	1,2 ml/min
Temperatur:	Raumtemperatur
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	Leitfähigkeitsdetektor

Schnelltest zur Bestimmung der Phosphatkonzentration

Während der Kultivierungen wurde die Phosphatkonzentration photometrisch mit einem Schnelltest (Spectroquant, Merck) nach Angaben des Herstellers nachgewiesen. Bei diesem Test bilden Orthophosphat-Ionen in schwefelsaurer Lösung mit Ammoniumvanadat und Ammoniumheptamolybdat die orangegelbe Molybdatovanadatophosphorsäure, die photometrisch bestimmt werden kann.

3.3.8. Bestimmung von Acetat

Die Bestimmung der Acetatkonzentration in Kultivierungsüberständen erfolgte mit einem enzymatischen Acetattestkit (r-biopharm, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers. Vereinfacht beschrieben wird bei diesem Test Acetat über das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase unter anderem zu Acetyl-CoA umgesetzt. Acetyl-CoA reagiert in einer weiteren enzymatischen Reaktion mit Citrat-Synthase bei Anwesenheit von Oxalacetat zu Citrat. Das bei dieser Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Reaktion gebildet. Bei dieser Reaktion wird NAD zu NADH reduziert. Die Entstehung von NADH kann spektrometrisch quantifiziert werden. Über die NADH-Konzentration kann die Acetatkonzentration berechnet werden.

3.3.9. Analyse von Kultivierungsproben mit Mittelinfrarotspektroskopie

Die Analysen von Kultivierungsüberständen über Mittelinfrarot (MIR)-Transmissionsspektroskopie (AquaSpec-MIR-Analytik) und die anschließende

Datenauswertung wurden von der micro-biolytics GmbH (Esslingen) durchgeführt. Die Analyse über AquaSpec-MIR-Analytik erfolgte für ausgewählte Kultivierungen zusätzlich zu der oben aufgeführten Analytik.

Zur Vorbereitung der Kultivierungsproben für die AquaSpec-MIR-Analytik wurde die Zellsuspension, wie auch für die oben aufgeführten Analytikmethoden, über einen Zelluloseacetatfilter (0,2 µm) filtriert. Die filtrierten Proben wurden zu 400 µl in Reaktionsgefäße abgefüllt und bis zur Analyse bei -35 °C gelagert.

Zur Erstellung von Referenzspektren für die spektroskopische Auswertung (vgl. Kapitel 2.3.1) wurden für sämtliche, im chemisch definierten Nährmedium vorkommenden Substanzen sowie für das Produkt Friulimicin B und potentiell vorkommende Nebenprodukte Reinsubstanzlösungen angesetzt (Tabelle 8). Außerdem wurden Reinsubstanzen für die Pufferlösung MOPS, die im Vorkulturmedium verwendet wurde und das bei der Herstellung von Kryokulturen verwendete Glycerin (vgl. Kapitel 3.2.1) angesetzt. Alle Reinsubstanzen wurden in deionisiertem Wasser in Konzentrationen angesetzt, die dem Konzentrationsbereich im Nährmedium entsprechen. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde, entsprechend dem pH-Wert im Nährmedium, auf 7,0 eingestellt. Um den Einfluss von pH-Wert-Änderungen auf die Spektren analysieren zu können, wurde zusätzlich jede Reinsubstanzlösung mit pH-Werten von 6,5 und 7,5 hergestellt. Zur Ermittlung von möglichen Interferenzen der Nährmedienbestandteile untereinander, wurden zusätzlich Gemische dieser Reinsubstanzen analysiert.

Tabelle 8: Lösungen von Reinsubstanzen für die Erstellung einer Spektrendatenbank für die AquaSpec-MIR-Analytik. Alle Reinsubstanzlösungen wurden mit den pH-Werten pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5 angesetzt.

	g/l		g/l
Saccharose	10	myo-Inositol	1
Glucose · 1 H ₂ O	10	Glycerin	1
L-Arginin HCl	5	Trehalose	1
L-Valin	2	Pipecolinsäure	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1	Essigsäure	1
K ₂ HPO ₄	2	MOPS	2
NaHCO ₃	1		

3.3.10. Berechnete Größen

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Gleichungen zur Berechnung verschiedener Größen einer Kultivierung verwendet.

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} für *A. friuliensis* wurde in der Batch-Phase über

$$\mu_{\max} = \left(\frac{\ln c_x - \ln c_{x0}}{t - t_0} \right)$$

mit der Biomassekonzentration c_x und der Kultivierungszeit t berechnet.

Der Ausbeutekoeffizient (Ertragskoeffizient) $Y_{X/S}$ für die Biotrockenmasse in Bezug auf das Substrat Glucose wurde für die Batchphase über

$$Y_{X/S} = \frac{c_{xi} - c_{x0}}{c_{si} - c_{s0}}$$

mit der Substratkonzentration c_s berechnet.

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$ für das Produkt Friulimicin in Bezug auf die Biotrockenmasse wurde für die Batchphase über

$$Y_{P/X} = \frac{c_{pi} - c_{p0}}{c_{xi} - c_{x0}}$$

mit der Produktkonzentration c_p berechnet. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Substrataufnahmerate q_s wurde bei Batch- und Fed-Batch-Prozessen über

$$q_s = \left(-\frac{dc_s}{dt} + \frac{F}{V} (c_{s,zu} - c_s) \right) \cdot \frac{1}{c_x}$$

berechnet. Darin sind der Volumenstrom F und das Flüssigkeitsvolumen des Bioreaktors V enthalten, wobei bei Batch-Prozessen $F=0$ l/h ist.

Die spezifische Produktbildungsrate q_p wurde über

$$q_p = \left(\frac{dc_p}{dt} + \frac{F}{V} \cdot c_p \right) \cdot \frac{1}{c_x}$$

berechnet.

Die volumetrische Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute) Q_p wurde für den Batch-Prozess und den Fed-Batch-Prozess über

$$Q_p = \frac{c_{p\text{Ernte}}}{t_{\text{Ernte}}}$$

berechnet. Für den kontinuierlichen Prozess (Chemostat oder Perfusionsprozess) ergibt sich die volumetrische Produktivität Q_p aus

$$Q_p = D \cdot c_p.$$

Darin ergibt sich die Verdünnungsrate D mit dem Volumenstrom F und dem Flüssigkeitsvolumen des Bioreaktors V aus $D = \frac{F}{V}$. Die Konzentration des Produktes Friulimicin beschreibt c_p .

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme (OUR) und der Kohlenstoffdioxidemissionsrate (CER) erfolgte über die Abgasanalyse und wurde durch folgende Gleichungen (Storhas, 2003) berechnet:

$$\text{OUR} = \frac{F_G \cdot p_{\text{zu}}}{V \cdot R \cdot T_{\text{zu}}} \left(x_{\text{O}_2, \text{zu}} - \frac{1 - x_{\text{O}_2, \text{zu}} - x_{\text{CO}_2, \text{zu}}}{1 - x_{\text{O}_2, \text{ab}} - x_{\text{CO}_2, \text{ab}}} \cdot x_{\text{O}_2, \text{ab}} \right)$$

$$\text{CER} = \frac{F_G \cdot p_{\text{zu}}}{V \cdot R \cdot T_{\text{zu}}} \left(\frac{1 - x_{\text{O}_2, \text{zu}} - x_{\text{CO}_2, \text{zu}}}{1 - x_{\text{O}_2, \text{ab}} - x_{\text{CO}_2, \text{ab}}} \cdot x_{\text{CO}_2, \text{zu}} - x_{\text{CO}_2, \text{ab}} \right)$$

mit

F_G Begasungsrate

p_{zu} Begasungsdruck

V Flüssigkeitsvolumen des Bioreaktors

R allgemeine Gaskonstante

T_{zu} Temperatur der Zuluft

x_{O_2} Molanteil an Sauerstoff in der Zu- oder Abluft

x_{CO_2} Molanteil an Kohlenstoffdioxid in der Zu- oder Abluft

Da für die Begasung der Bioreaktoren Luft verwendet wurde, war $x_{\text{O}_2, \text{zu}} = 0,2095$ und $x_{\text{CO}_2, \text{zu}} = 0,00034$.

4. Ergebnisse

Für die Entwicklung von effizienten biotechnologischen Prozessen sind umfangreiche Kenntnisse des Produzentenstammes wichtig, die aus Untersuchungen des Stammes unter reproduzierbaren Kultivierungsbedingungen gewonnen werden. Für eine bessere Reproduzierbarkeit der Kultivierungsbedingungen für *A. friuliensis* wurden Bedingungen für homogenes Wachstum geschaffen und die Vorkulturführung optimiert (vgl. Kapitel 4.1). Des Weiteren wurden für die Charakterisierung der Friulimicinbiosynthese und des Wachstums von *A. friuliensis* die Einflüsse einzelner Nährmedienbestandteile in einem chemisch definierten Nährmedium untersucht (vgl. Kapitel 4.2). Aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen wurden Zufütterungsstrategien für Fed-Batch-Prozesse sowie kontinuierliche Prozessführungsstrategien abgeleitet (vgl. Kapitel 4.3). Durch eine Erweiterung der Standardanalytik mit onlinefähigen Messmethoden wie Mittelinfrarot- und Impedanzspektroskopie, konnten weitere Ansätze zur Verbesserung der Friulimicinproduktion gefunden werden (vgl. Kapitel 4.4). Die Prozessentwicklung wurde durch ein genombasiertes Stoffwechselmodell und Stoffflussanalysen unterstützt (vgl. Kapitel 4.5).

4.1. Definierte Kultivierungsbedingungen

Bei der Kultivierung von myzelartig wachsenden Mikroorganismen wie *A. friuliensis* sind häufig große Batch-to-Batch-Variationen beschrieben, die zum einen an der Bildung von unterschiedlich großen Myzelpellets liegen (vgl. Kapitel 2.3.2), zum anderen kann es im Umgang mit diesen Myzelbildnern beispielsweise bei Inokulationsvorgängen zu Ungenauigkeiten kommen. Eine homogene Kultur ist daher Voraussetzung, um aussagekräftige Ergebnisse über die Eigenschaften des Produzentenstammes zu erzielen. Um homogene Wachstumsbedingungen für *A. friuliensis* zu schaffen, wurden verschiedene Ansätze zur Beeinflussung der Pelletbildung untersucht (vgl. Kapitel 4.1.1).

Neben dem myzelartigen Wachstum führt auch der Einsatz komplexer Nährmedien, die häufig in industriellen Prozessen verwendet werden, zu starken Batch-to-Batch-Variationen. Chemisch definierte Nährmedien hingegen verbessern die Reproduzierbarkeit der Prozesse. Für die Kultivierung von *A. friuliensis* wurde daher ein chemisch definiertes Nährmedium (Wagner, 2009) verwendet, welches in der vorliegenden Arbeit weiter angepasst wurde (vgl. Kapitel 4.1.2)

Ein weiterer Grund für starke Batch-to-Batch-Variationen zwischen Kultivierungen ist eine nicht genau definierte Vorkulturführung. Die Aktivität der Vorkultur beeinflusst nicht nur die Reproduzierbarkeit, sondern hat auch Einfluss auf den späteren Verlauf der Kultivierung und die Produktausbeuten (Neves et al., 2001). Um ein

standardisiertes Protokoll zur Herstellung der Inokula zu entwickeln, wurde die Vorkulturführung daher näher untersucht (vgl. Kapitel 4.1.3).

4.1.1. Homogene Wachstumsbedingungen

Myzelbildner wie Aktinomyzeten und Pilze bilden in Submerskulturen verschiedene Myzelstrukturen aus, die von lockeren Myzelaggregaten bis hin zu kompakten Pellets reichen. Diese Inhomogenität erschwert die Durchführung von reproduzierbaren Kultivierungen und verfälscht die Aussagen physiologischer Studien. Für reproduzierbare Kultivierungen ist eine geringere Pelletgröße vorteilhaft, da sie die Viskosität des Kulturmediums reduziert und einen optimalen Transfer von Nährstoffen und Sauerstoff ermöglicht. Die Ergebnisse aus Kultivierungen mit *Streptomyces lividans* zeigten dementsprechend, dass die Bildung von kompakten Zellpellets essentiell für die Produktion von Antibiotika ist (Sarrà et al., 1998).

A. friuliensis zeigte bei Kultivierungen im Schüttelkolben ein sehr inhomogenes Wachstumsverhalten mit kompakten Myzelpellets unterschiedlicher Größe sowie der Ausbildung ringförmiger Pellets (Abbildung 6). Die Größen der Myzelpellets variierten von 0,1 bis 2 mm. Kultivierungen mit *A. friuliensis* im Bioreaktor zeigten, dass die Größe der Pellets in den ersten 100 h der Kultivierung abhängig von der Pelletgröße der Vorkultur ist. Je feiner die Myzelpellets in der Vorkultur waren, desto kleiner waren die Pellets im Bioreaktor. Idealerweise besteht eine Vorkultur aus fragmentierten Myzelien, so dass die Vorkultur eine maximale Anzahl an Wachstumskernen enthält (van Wezel et al., 2006). Für die Vorkultur wurde daher ein möglichst homogenes Wachstumsverhalten mit kleinen Myzelpellets angestrebt.

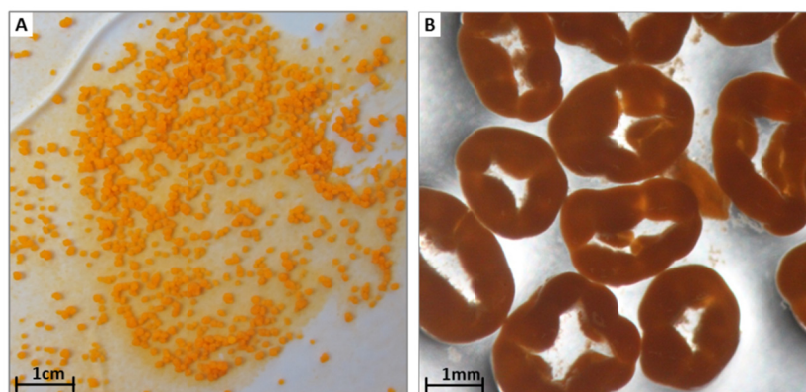


Abbildung 6: Myzelpellets von *A. friuliensis* während Kultivierungen im Schüttelkolben mit TSB-Medium unter Standardbedingungen. (A) Rundliche kompakte Myzelpellets, (B) ringförmige Myzelpellets.

Zur Reduzierung der Pelletgröße sowie für homogenere Wachstumsbedingungen von myzelartig wachsenden Mikroorganismen in Submerskulturen sind einige erfolgreiche Ansätze beschrieben. Die Reduzierung der Pelletgröße und eine damit

verbundene höhere Produktivität der Zellen gelang durch Zugabe von unlöslichen Mikropartikeln wie Aluminiumoxid und Talkpartikeln zum Nährmedium (Kaup et al., 2008). Auch die Zugabe von polymeren Polyanionen wie Junlon oder Agar-Agar führte bei Streptomyzeten zu homogenerem Wachstumsverhalten (Hobbs, 1989). Bei diesen geladenen Polymeren wird vermutet, dass sie die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Zellen induzieren und so die anfängliche Aggregation verringern. Ungeladene Polymere wie Polyethylenglycol zeigten sich hingegen als weniger geeignet. Des Weiteren wurden in systembiologischen Studien mit *Streptomyces coelicolor* Glasperlen oder Spiralfedern zur Homogenisierung der Vorkultur eingesetzt (Wentzel et al., 2012).

Einige der beschriebenen Ansätze wurden zur Reduzierung der Pelletgröße und für homogenere Wachstumsbedingungen in den Vorkulturen von *A. friuliensis* untersucht. Zur Untersuchung dieser Zusätze und Einbauten wurden Kultivierungen mit TSB-Medium im Schüttelkolben durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.3). Als geeignete Ansätze zur Reduzierung der Pelletgröße von *A. friuliensis* erwiesen sich die Verwendung von Spiralfedern und Glasperlen (Tabelle 9). Auch der Zusatz von Talkpartikeln (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zum Nährmedium zeigte einen positiven Einfluss sowohl auf die Pelletgröße als auch auf die Friulimicinbildung (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von Talkpartikeln wurde aber nicht weiter verfolgt, da diese sowohl die Aminosäureanalytik (Kapitel 3.3.6) als auch die Biotrockenmassebestimmung (Kapitel 3.3.2) negativ beeinflusste. Der beste Homogenisierungsgrad wurde durch Verwendung eines Kulturkolbens mit zylindrischem Magnetührstäbchen auf einem Magnetprüher erreicht. Dieser Ansatz wurde deshalb für die Herstellung der Inokula verwendet.

Tabelle 9: Homogenisierungsgrad des Myzels während Kultivierungen im Schüttelkolben mit verschiedenen Nährmedienzusätzen oder physikalischen Einbauten. Die Bewertung erfolgte visuell unter Einstufung in drei Homogenisierungsgrade: o befriedigend, + gut, ++ sehr gut

	Homogenisierungsgrad des Myzels
Referenz (ohne Zusätze/Einbauten)	o
Ringförmige Spiralfeder ($D_{\text{Ring}} = 10 \text{ cm}$, $D_a = 2,5 \text{ cm}$, $d = 1 \text{ mm}$)	+
Glasperlen ($d = 2,1\text{-}2,7 \text{ mm}$, 200 g/l)	+
Talkpartikel ($d < 10 \mu\text{m}$, 1 mM)	+
Magnetprüher mit Magnetührstäbchen (zylindrisch $L = 40 \text{ mm}$, $d = 8 \text{ mm}$)	++

Weitere Erkenntnisse zur Pelletbildung von *A. friuliensis* konnten während Kultivierungen im Bioreaktor gewonnen werden. Bei Kultivierungen mit unterschiedlichen Inokulationsmengen (5 – 20 % des Bioreaktorvolumens) sank die Pelletgröße mit größerer Inokulationsmenge. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich die Pelletgröße mit der Kultivierungszeit ändert. Zu Beginn der Kultivierung waren feine Myzelaggregate vorhanden (Abbildung 7 A). Mit zunehmender Kultivierungsdauer, nach etwa 100-150 h, konnten Myzelpellets mit einem Durchmesser von etwa 0,3-1,0 mm beobachtet werden (Abbildung 7 B). Nach etwa 200 h konnten zusätzlich zu den Myzelpellets wieder kleinere Myzelfragmente beobachtet werden, deren Anteil im Verlauf der Kultivierung weiter zunahm (Abbildung 7 C). Die Rührergeschwindigkeit wurde während eines üblichen Kultivierungsverlaufes, um den pO_2 -Sättigungswert über 30 % zu halten, von 200 auf bis zu 600 rpm erhöht. Vermutlich wurden die Pellets aufgrund der damit verbundenen Scherbelastung mit zunehmender Kultivierungszeit zerkleinert.

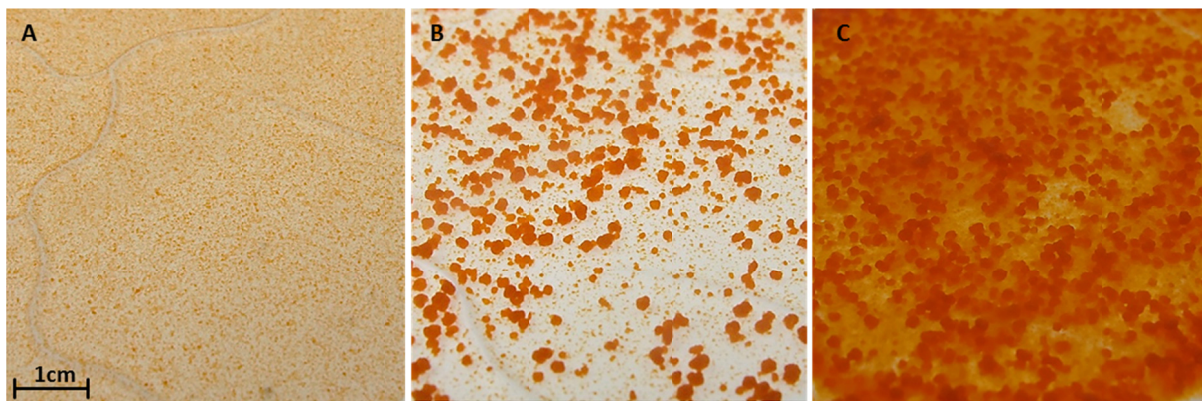


Abbildung 7: Morphologische Veränderung des Myzels während der Kultivierung von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem Nährmedium. Das Myzel wurde auf Celluloseacetatfilter aufgesaugt. (A) Feine Myzelien nach 24 h Kultivierung. (B) Bildung von Myzelpellets nach 150 h Kultivierung. (C) Mischung aus Myzelpellets und feinen Myzelien nach 200 h Kultivierung.

4.1.2. Anpassung des chemisch definierten Nährmediums

In früheren Arbeiten (Wagner, 2009) wurde ein chemisch definiertes Nährmedium für die Untersuchung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* entwickelt (Tabelle 2). Dieses Medium wurde ausgehend von einem komplexen Produktionsmedium (Aretz et al., 2000) entwickelt, das für die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* verwendet wurde. Bei der Entwicklung des definierten Nährmediums wurden zunächst die im Produktionsmedium nach Aretz (2000) vorkommenden komplexen Bestandteile Hefeextrakt und Sojapepton durch eine Aminosäuremischung (Casaminoacids), eine Spurenelementlösung und eine Vitaminlösung ersetzt. Diese Nährmedienzusammensetzung ermöglichte *A. friuliensis* Wachstum und Friulimicinbildung. Um den weniger genau definierten Nährmedienbestandteil

Casaminoacids durch eine definierte Stickstoffquelle zu ersetzen, wurden in weiteren Schritten einzelne Aminosäuren getestet. Arginin erwies sich hierbei als geeignete Stickstoffquelle für Wachstum und Friulimicinbildung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das chemisch definierte Nährmedium von Wagner (2009) weiter auf die Wachstumsbedürfnisse von *A. friuliensis* angepasst. Anforderungen, die dabei an das chemisch definierte Nährmedium gestellt wurden, waren die gute Verfolgbarkeit von Wachstum und Produktbildung sowie die Verwendbarkeit für metabolische Stofffluss- und Transkriptionsanalysen. Weiterhin sollte eine genügend hohe Biomassekonzentration erreicht werden, die häufige Probenahmen ermöglicht und während der Kultivierungen zu deutlich messbaren Veränderungen der Konzentrationen von Nährmedienbestandteilen führt. Eine weitere Voraussetzung war die vollständige Löslichkeit aller Substrate, damit eine Biotrockenmassebestimmung durchgeführt werden konnte. Zur Untersuchung des Übergangs von der Wachstums- in die Friulimicinbildungsphase sollte ein reproduzierbarer Prozess mit deutlich voneinander abgegrenzten Phasen entwickelt werden.

Eine Voraussetzung für reproduzierbare Wachstumsbedingungen ist ein konstanter pH-Wert des Nährmediums während der Kultivierungen. Während im komplexen Nährmedium natürliche Puffersysteme enthalten sind, müssen in definierten Nährmedien in der Regel Puffersubstanzen zugesetzt werden. Im Bioreaktor wird ein konstanter pH-Wert über eine automatische pH-Wert-Regelung durch Dosierung von Säure oder Lauge gewährleistet und macht somit die Zugabe von Puffersubstanzen überflüssig. In klassischen Schüttelkolbenexperimenten hingegen ist eine solche pH-Wert-Regelung nur schwer möglich. Deshalb müssen dem Nährmedium bei Kultivierungen in Schüttelkolben Puffersubstanzen zugesetzt werden.

MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)-Puffer zeigte im Zusammenhang mit einem chemisch definierten Nährmedium bei Kultivierungen mit *Streptomyces clavuligerus* gute Puffereigenschaften und ermöglichte gute Wachstumsbedingungen (Aharonowitz et al., 1977). Zudem beeinflusste dieser Puffer, im Gegensatz zu Phosphatpuffersystemen, die Antibiotikabiosynthese nicht. MOPS-Puffer besitzt einen pK_S -Wert von 7,15 und wird als Good'scher Puffer nicht metabolisiert. Während Kultivierungen von *A. friuliensis* im Schüttelkolben erwies sich MOPS-Puffer ebenfalls als geeignet, um den pH-Wert des Mediums auf etwa pH 7,0 zu halten. Die Biomassekonzentration war im gepufferten Nährmedium etwa 20 % höher als im Nährmedium ohne Pufferzusatz. Ein Einfluss auf die Friulimicinbiosynthese wurde nicht beobachtet.

Ein weiterer Bestandteil eines definierten Nährmediums sind die Spurenelemente, die essentiell für die Funktion von Proteinen und Enzymen sind. Um den

Einflussbereich der Konzentration der Spurenelementlösung (Tabelle 2) auf das Wachstum von *A. friuliensis* einzugrenzen, wurde die Zugabe von Spurenelementlösung zum Nährmedium in Mengen von 2 und 20 % (v/v) getestet. Die Zugabe von 20 % Spurenelementlösung inhibierte das Wachstum und die Friulimicinbildung deutlich (Abbildung 8). Die Zugabe der Spurenelementlösung wurde im Nährmedium deshalb nur auf 2 % erhöht.

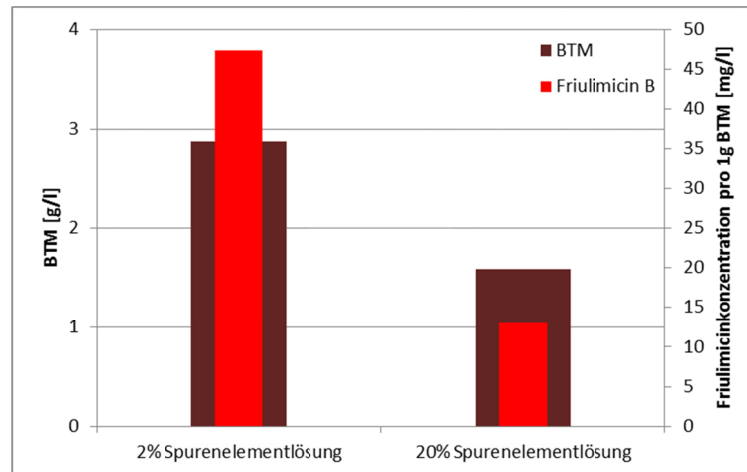


Abbildung 8: Einfluss der Spurenelementlösung (Okanishi et al., 1974) auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* nach 8d. Die Kultivierungen erfolgten im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium.

Neben Spurenelementen können auch Vitamine essentiell für das Wachstum und die Produktbildung sein. Eine erhöhte Zugabe der Vitaminlösung (Tabelle 2) zum chemisch definierten Nährmedium bewirkte eine deutliche Steigerung der Biomassekonzentration. Die Vitaminlösung erwies sich außerdem als essentiell für die Friulimicinbildung (Abbildung 9). Die Zugabe der Vitaminlösung wurde daraufhin im chemisch definierten Nährmedium auf 2 % erhöht.

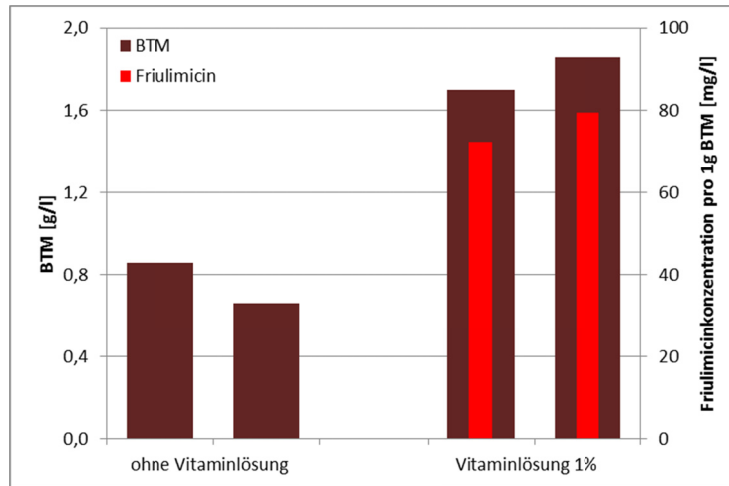


Abbildung 9: Einfluss der Vitaminlösung (Gonzalez et al., 2003, modifiziert) auf das Wachstum von *A. friuliensis* nach 10d. Die Kultivierung wurde im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Produktausbeute ist abhängig von der Biomassekonzentration, so dass in der Regel hohe Biomassekonzentrationen zur Steigerung der Produktivität eines Prozesses beitragen. Eine ausreichend hohe Biomassekonzentration ist außerdem von Bedeutung für die Charakterisierung von Biosynthesen, da nur mit höheren Biomassekonzentrationen messbare Stoffsenken vorhanden sind. Die Biomassekonzentration wird in der Regel stark durch die Kohlenstoffquelle beeinflusst. Im chemisch definierten Nährmedium nach Wagner (2009) ist das Disaccharid Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle vertreten. Da Glucose für viele Mikroorganismen eine effiziente Kohlenstoff- und Energiequelle ist, wurde Glucose als Substrat in Bezug auf die Biomassebildung von *A. friuliensis* getestet. Die maximal zu erreichende Biomassekonzentration ist allerdings nicht nur durch Limitation von Nährstoffen begrenzt, sondern auch durch Regulationsmechanismen wie Quorum Sensing (Williams et al., 2007). Aus den genannten Gründen wurde der Einfluss der Kohlenhydratquelle auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese näher untersucht.

Bei Kultivierungen mit Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle lag die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration etwa 1-2 g/l unter der mit Glucose erreichten Biotrockenmassekonzentration (Abbildung 10). Der Vergleich der Wachstumsraten mit den beiden Kohlenhydratquellen zeigte für Glucose eine etwas höhere maximale Wachstumsrate von $0,015 \text{ h}^{-1}$ als für Saccharose. Für Saccharose lag die maximale Wachstumsrate bei $0,012 \text{ h}^{-1}$. Die spezifischen Friulimicinbildungsraten während der Produktionsphasen waren mit beiden Kohlenhydratquellen mit etwa $0,2 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$ gleich hoch. Aufgrund der höheren Wachstumsrate und der gleichen Friulimicinbildungsraten mit Glucose wurde die Hauptkohlenstoffquelle Saccharose im Nährmedium gegen Glucose ausgetauscht.

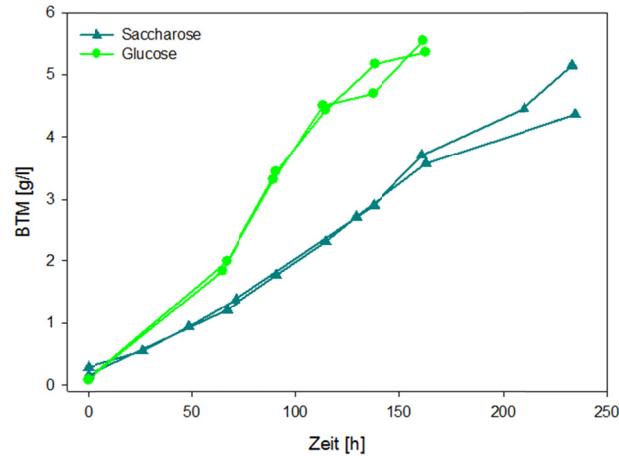


Abbildung 10: Verlauf der Biomassebildung während Kultivierungen von *A. friuliensis* mit Saccharose oder Glucose als Hauptkohlenstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium.

Neben der Kohlenhydratquelle ist Phosphat ein wichtiges Substrat für die Biomassebildung. Zur Eingrenzung der maximalen Phosphatkonzentration im Nährmedium, die sowohl Wachstum als auch Friulimicinbildung ermöglichte, wurden verschiedene Dikaliumhydrogenphosphat-Konzentrationen getestet. Eine Erhöhung der Konzentration an Dikaliumhydrogenphosphat im definierten Nährmedium über 0,42 g/l führte zu keiner weiteren Erhöhung der Biomassekonzentration (Abbildung 11). Zudem konnte bei höheren Phosphatkonzentrationen in Schüttelkolbenexperimenten keine Friulimicinbiosynthese beobachtet mehr werden. Die Dikaliumhydrogenphosphat-Konzentration wurde daher auf 0,42 g/l begrenzt.

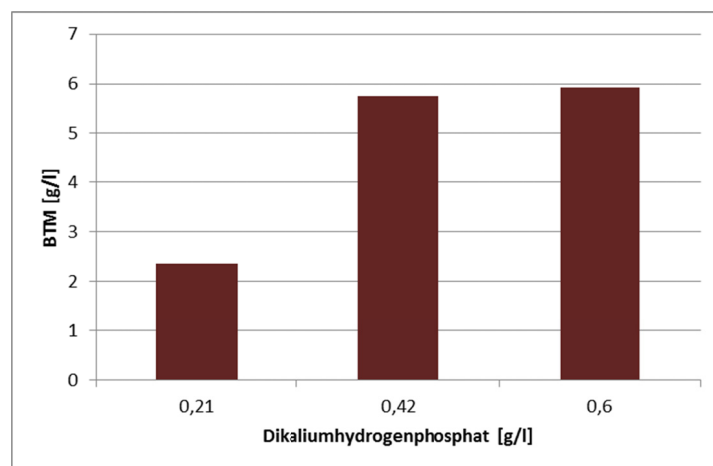


Abbildung 11: Abhängigkeit der maximalen Biotrockenmasse von der Dikaliumhydrogenphosphat-Konzentration während Kultivierungen von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium.

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den aufgeführten Untersuchungen wurde die Zusammensetzung des chemisch definierten Nährmediums (Wagner, 2009)

entsprechend geändert. Die Zusammensetzung des angepassten chemisch definierten Nährmediums ist in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10: Chemisch definiertes Nährmedium für die Biosynthese von Friulimicin in *A. friuliensis* nach Anpassung der Nährmedienbestandteile und -konzentrationen. Die Konzentrationen einzelner Nährmedienbestandteile variieren für die Herstellung der Vorkultur und für Kultivierungen im Bioreaktor oder im Schüttelkolben.

Nährmedienbestandteile	Schüttelkolben [g/l]	Vorkultur 2 [g/l]	Bioreaktor [g/l]
Glucose	20	15	30
L-Arginin HCl	2	1	2
L-Valin	0,6	0,6	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,6	0,6	0,6
K ₂ HPO ₄	0,21	0,42	0,42
MOPS, pH 7,0	21	21	-
Spurenelementlösung	2 %	2 %	2 %
Vitaminlösung	2 %	2 %	2 %

Vergleich des chemisch definierten mit dem komplexen Nährmedium

Um das Wachstum und die Friulimicinbildung im angepassten chemisch definierten Nährmedium mit dem komplexen Produktionsmedium (Aretz et al., 2000), das als Ausgangsbasis für die Entwicklung des definierten Mediums diente, zu vergleichen, wurden Batch-Kultivierungen im 1,5-l-Maßstab durchgeführt. Im komplexen Nährmedium konnte ein Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ für die Biotrockenmasse in Bezug auf das Substrat Phosphat von 90 g/g erreicht werden. Im chemisch definierten Medium war der Ausbeutekoeffizient mit 25 g/g um etwa ein Drittel geringer. Die spezifische Friulimicinausbeute $Y_{P/X}$ lag im komplexen Medium bei 0,1 g/g, wohingegen im chemisch definierten Nährmedium die spezifische Ausbeute mit 0,05 g/g nur halb so groß war.

4.1.3. Untersuchung der Vorkulturführung

Die Herstellungsweise der Vorkulturen (Inokula) von myzelartig wachsenden Antibiotikaproduzenten ist ausschlaggebend für den Erfolg der Hauptkultur bezüglich Produktivität und Dauer der lag-Phase (Stanbury et al., 1984). Die Vorkulturen sollten daher die Kriterien homogenes Wachstum, aktive Zellen der exponentiellen Wachstumsphase und ausreichende Biomassekonzentration erfüllen. Zur

Untersuchung der Vorkulturbedingungen von *A. friuliensis* wurden Kulturkolben mit pH- und pO_2 -Sensoren ausgerüstet, die per Funkübertragung Messdaten zur Aufzeichnung senden (vgl. Kapitel 3.2.4). Das Kulturmedium der so ausgestatteten Kulturkolben wurde mit einem Magnetrührer gerührt (vgl. Kapitel 4.1.1). Da die Herstellung der Inokula für die Kultivierungen im Bioreaktor über zwei Vorkulturen erfolgte, wurden sowohl die Vorkultur 1 als auch die Vorkultur 2 untersucht.

Vorkultur in komplexem Nährmedium (Vorkultur 1)

Die Messungen des Gelöstsauerstoffs pO_2 während der Vorkultur 1 zeigten, dass die Kultur nach etwa 60 h sauerstofflimitiert war (Abbildung 12 B). Trotzdem nahm die Biotrockenmassekonzentration noch weiter zu und erreichte nach etwa 4 d ihr Maximum (Abbildung 12 A). Der Verlauf des pH-Werts zeigte, dass die Pufferwirkung des komplexen Nährmediums nach etwa 80 h erschöpft war. Der pH-Wert sank zunächst um etwa 0,2 pH-Wert-Einheiten, anschließend stieg der pH-Wert stark an (Abbildung 12 C). Da die Wachstumsphase trotz Sauerstofflimitation erst nach etwa 4 d beendet war, wurde die Vorkultur 1 standardmäßig für 4 d (96 ± 2 h) inkubiert. Die Biotrockenmasse erreichte in Vorkultur 1 Konzentrationen von 2,5-3,5 g/l.

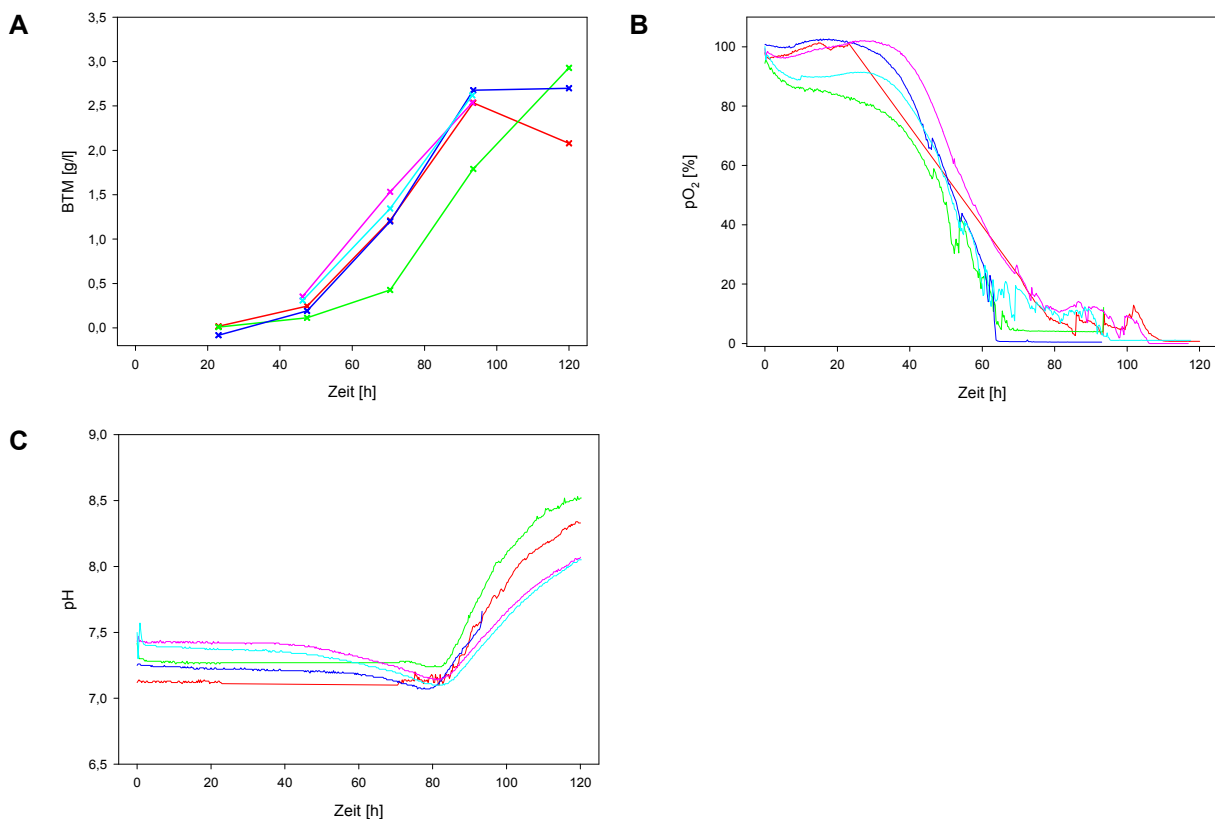


Abbildung 12: Verlauf der Biomassekonzentration (A), des Gelöstsauerstoffs pO_2 (B) und des pH-Werts (C) während fünf Kultivierungen der Vorkultur 1 von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden in TSB-Medium im Senbit-Schüttelkolbensystem durchgeführt.

Die Vorkulturen wurde zur Verbesserung der Homogenität nicht in einem klassischen Schüttelinkubator, sondern in einem Kulturkolben mit zylindrischem Magnetrührstäbchen auf einem Magnetrührer kultiviert (vgl. Kapitel 3.2.2). Bei diesem Kultivierungsansatz war die Kultur, wie oben beschrieben, bereits nach etwa 60 h sauerstofflimitiert. Um der Sauerstofflimitation im Kulturkolben entgegenzuwirken, wurde durch verschiedene Maßnahmen versucht, den Sauerstoffeintrag in das Kulturmedium zu erhöhen. Zunächst sollte über die Erhöhung der Rührergeschwindigkeit des Magnetrührers ein verbesserter Sauerstoffeintrag ermöglicht werden. Die Rührergeschwindigkeit des Magnetrührers konnte aber nicht über 300 rpm erhöht werden, da bei höheren Rührergeschwindigkeiten kein stabiles Rühren mehr möglich war. In weiteren Versuchen wurden daher verschiedene Magnetrührstäbchengemetrien getestet, mit denen höhere Rührergeschwindigkeiten ermöglicht werden konnten. Zum Einsatz kamen kreuzförmige, ellipsenförmige und dreieckige Geometrien. Bei allen alternativ getesteten Magnetrührstäbchengemetrien wurden zwar sehr feine Myzelien, aber zudem auch ein stark verlangsamtes Wachstum beobachtet, das vermutlich durch höhere Scherkräfte bedingt wurde. Für die weitere Kultivierung der Vorkultur 1 auf dem Magnetrührer wurde daher weiterhin ein zylindrisches Magnetrührstäbchen verwendet und eine Sauerstofflimitation gegen Ende der Kultivierung akzeptiert.

Vorkultur in chemisch definiertem Nährmedium (Vorkultur 2)

Zur Anpassung der Zellen an die Bedingungen im Bioreaktor, wurde die Vorkultur 2 in chemisch definiertem Vorkulturnährmedium (Tabelle 10) durchgeführt, welches in seiner Zusammensetzung dem Hauptkulturmedium ähnlich ist. Um eine Umstellung der Zellen von Primär- auf Sekundärmetabolismus durch Substratlimitierung zu vermeiden, wurden die Glucose-, die Arginin- und die Phosphatkonzentration im chemisch definierten Vorkulturnährmedium so angepasst, dass auch am Ende der Kultivierung keine Substratlimitierung vorlag. Die Vorkultur 2 wurde, wie die Vorkultur 1, zur Verbesserung der Homogenität auf einem Magnetrührer kultiviert (vgl. Kapitel 3.2.2).

Obwohl das Nährmedium der Vorkultur 2 die Puffersubstanz MOPS enthielt (Tabelle 10), konnte ein Abfall des pH-Wertes im Laufe der Kultivierung beobachtet werden (Abbildung 13 C). Die Pufferwirkung des verwendeten Puffers war nach etwa 60 h erschöpft. Auch der Gelöstsauerstoff war in der Regel nach etwa 80 h limitiert (Abbildung 13 B). Trotz der Sauerstofflimitation nahm die Biomasse aber weiter zu und erreichte nach etwa 100 h ihr Maximum (Abbildung 13 A). Aufgrund der Sauerstofflimitation und um Zellen der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten, wurde die Kultivierungsdauer für die Vorkultur 2 auf 3 d (72 ± 2 h) festgelegt. Eine Sauerstofflimitation wurde, anders als in der Vorkultur 1, in der Vorkultur 2 nicht

akzeptiert, um möglichst aktive Zellen für die Inokulation des Bioreaktors bereitstellen zu können. Mit dieser Vorkulturführung wurden nach etwa 72 h Biotrockenmassen zwischen 1-1,5 g/l erreicht.

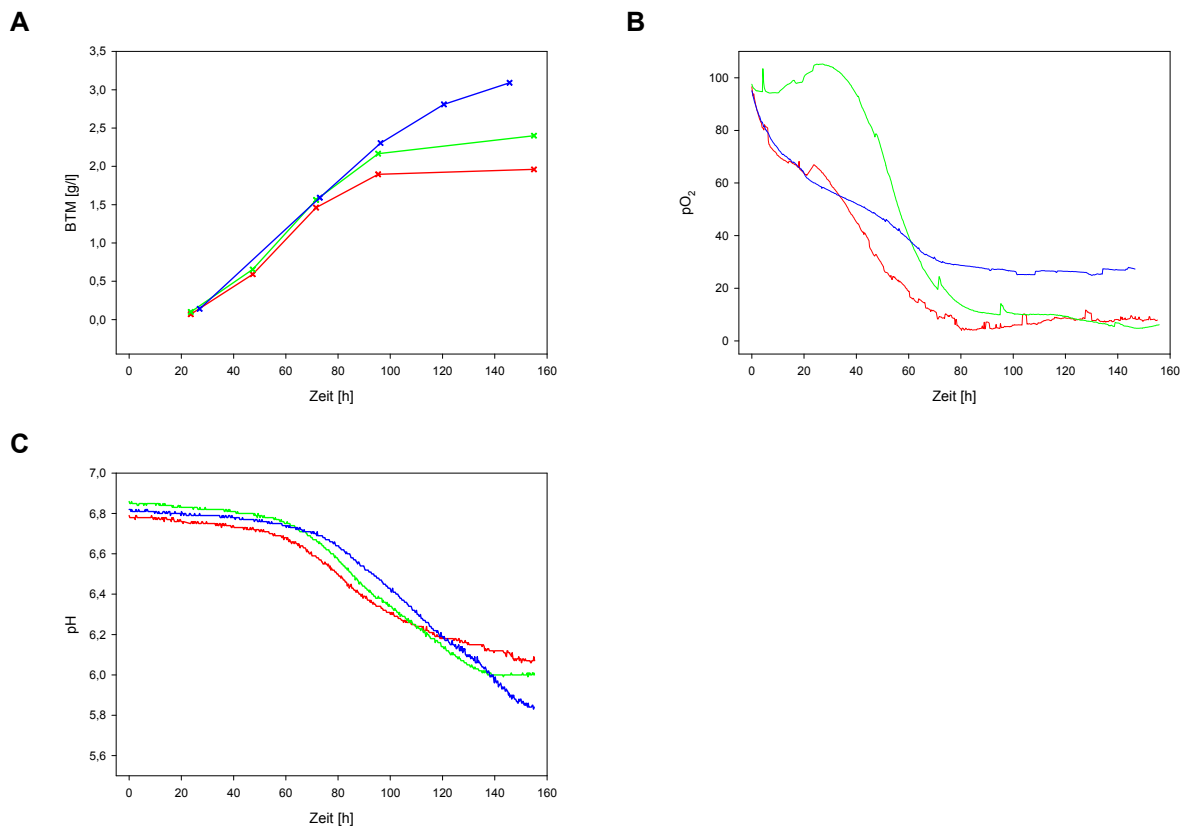


Abbildung 13: Verlauf der Biomassekonzentration (A), des gelösten Sauerstoffs pO₂ (B) und des pH-Werts (C) während drei Kultivierungen der Vorkultur 2 von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden in chemisch definiertem Vorkulturmedium im Senbit-Schüttelkolbensystem durchgeführt.

4.1.4. Reproduzierbarkeit der Kultivierungen

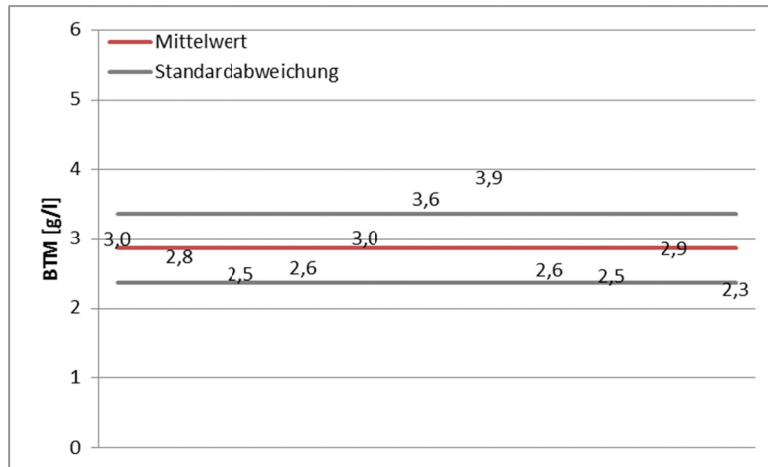
Um die Auswirkungen der getroffenen Maßnahmen für definierte Kultivierungsbedingungen beurteilen zu können, wurden die wichtigsten Prozessparameter der Vorkulturen und der Kultivierungen im Bioreaktor zusammengestellt.

Reproduzierbarkeit der Vorkulturführung

Die Verwendung von Magnetrührern für homogene Wachstumsbedingungen bei der Herstellung der Vorkulturen 1 und 2, die Anpassung der Kultivierungszeiten sowie die Abstimmung des Vorkulturnährmediums sollten zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit bei der Vorkulturführung beitragen. Trotz der genannten Anpassungen und Standardisierungen sind deutliche Variationen bei den erzielten Biotrockenmassekonzentrationen der Vorkulturen 1 und 2 vorhanden (Abbildung 14).

Die Standardabweichung der Biotrockenmassekonzentration von Vorkultur 1 betrug 0,5 g/l, die von Vorkultur 2 war mit 0,2 g/l etwas geringer.

Vorkultur 1



Vorkultur 2

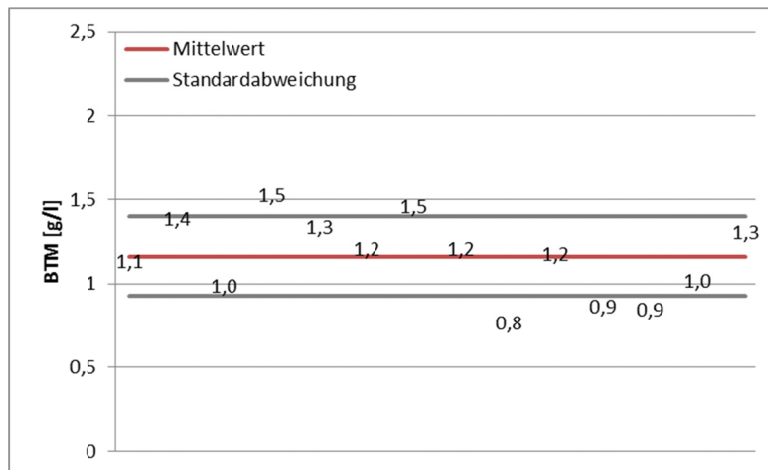


Abbildung 14: Streuung der Biotrockenmassekonzentrationen von 11 Vorkulturen 1 nach 4 d und von 14 Vorkulturen 2 nach 3 d Kultivierung. Die Zahlen geben die Biotrockenmassekonzentrationen am Kultivierungsende an. Die rote Markierung gibt die mittlere Biotrockenmasse aller Vorkulturen 1 oder 2 an.

Reproduzierbarkeit der Kultivierungen im Bioreaktor

Die Anpassungen und Standardisierungen bei der Herstellung der Inokula war Grundlage für die Durchführung von reproduzierbaren Kultivierungen im Schüttelkolben und im Bioreaktor. Der Vergleich der zeitlichen Verläufe der wichtigsten Prozessparameter verschiedener Kultivierungen im Bioreaktor zeigte, dass verlässliche Aussagen zur Charakterisierung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* möglich waren. Die Verläufe der Biomassebildung und des Substrates Phosphat (Abbildung 14 A und B) zeigten nur geringe Variationen zwischen den einzelnen Kultivierungen. Beim Vergleich der Friulimicinbiosyntheseraten (Abbildung 14 C) konnten allerdings größere Variationen festgestellt werden.

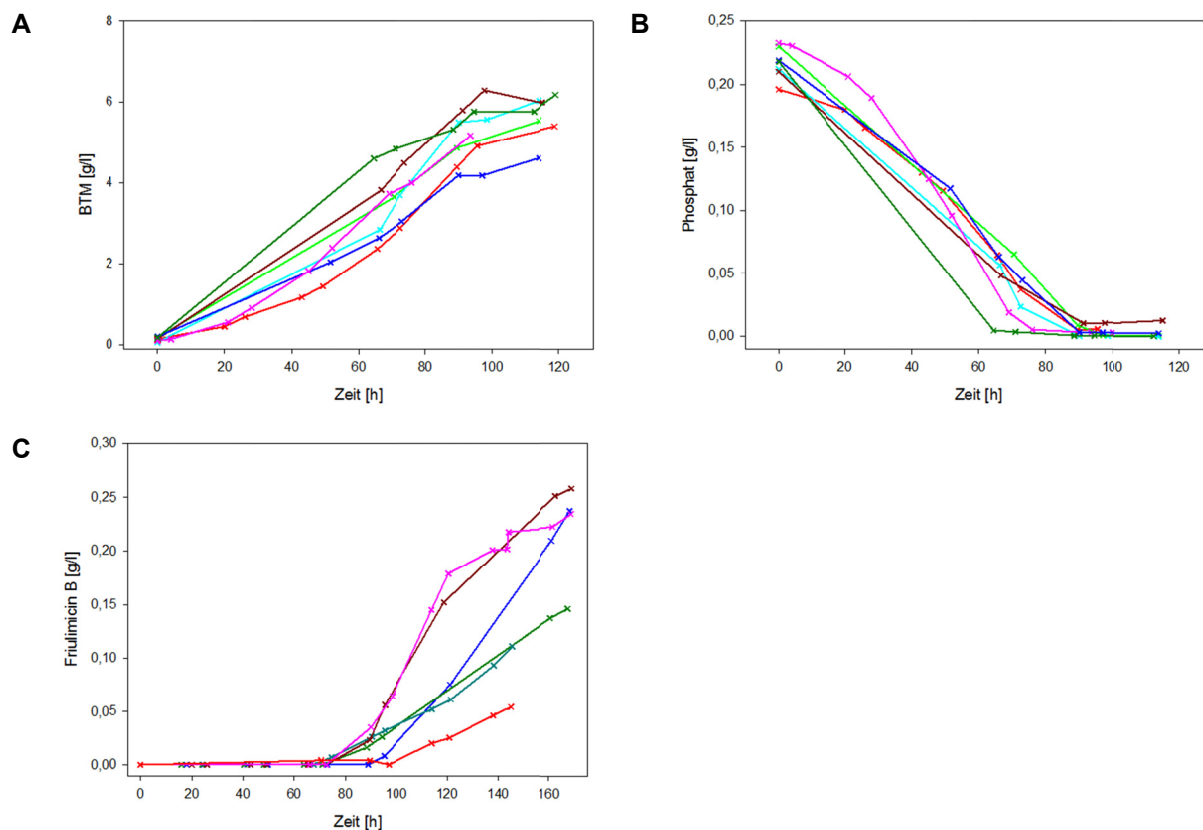


Abbildung 15: Verläufe der Biomassekonzentration (A), der Phosphatkonzentration (B) und der Friulimicin B-Konzentration (C) von verschiedenen Kultivierungen mit *A. friuliensis* im 4-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium.

4.2. Wachstum und Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium

Grundlage für die Untersuchungen der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* waren die in Tabelle 10 aufgeführten, speziell für *A. friuliensis* entwickelten, chemisch definierten Nährmedien. In diesen definierten Nährmedien konnte durch Veränderungen der Konzentrationen einzelner Nährmedienbestandteile der Einfluss dieser Bestandteile auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese genauer untersucht werden.

4.2.1. Nährstofflimitation und Friulimicinbiosynthese

Nährstoffmangel ist in vielen Antibiotikaproduzenten als Auslöser für die Umstellung von Primärmetabolismus auf Sekundärmetabolismus beschrieben. Die am häufigsten beschriebenen Nährstoffe, deren Limitation die Biosynthese von Sekundärmetaboliten wie Antibiotika auslöst, sind Phosphat, Stickstoff und Kohlenstoff (Martín et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Limitation von Phosphat und Stickstoff hinsichtlich der Friulimicinbiosynthese untersucht. Die Kohlenhydratquelle des definierten Nährmediums stellte sich als unverzichtbare

Energiequelle für *A. friuliensis* heraus, deren Limitation zu einem Einbruch der Stoffwechselaktivität führte (Abbildung 20). Eine Untersuchung des Einflusses einer Limitation der Kohlenstoffquelle auf die Friulimicinbiosynthese war daher nicht möglich.

Einfluss von Phosphatlimitation auf die Friulimicinbiosynthese

In zahlreichen Kultivierungen mit dem chemisch definierten Nährmedium (Tabelle 10) konnte gezeigt werden, dass Phosphat in diesem Nährmedium als erster Bestandteil limitiert war. Phosphat liegt im chemisch definierten Nährmedium in Form von Dikaliumhydrogenphosphat mit einer anfänglichen Konzentration von 0,42 g/l vor. In Kultivierungen im Bioreaktor war Phosphat meistens nach 70-90 h im Nährmedium aufgebraucht. Mit der Limitation von Phosphat war Friulimicin erstmals im Nährmedium nachweisbar (Abbildung 16).

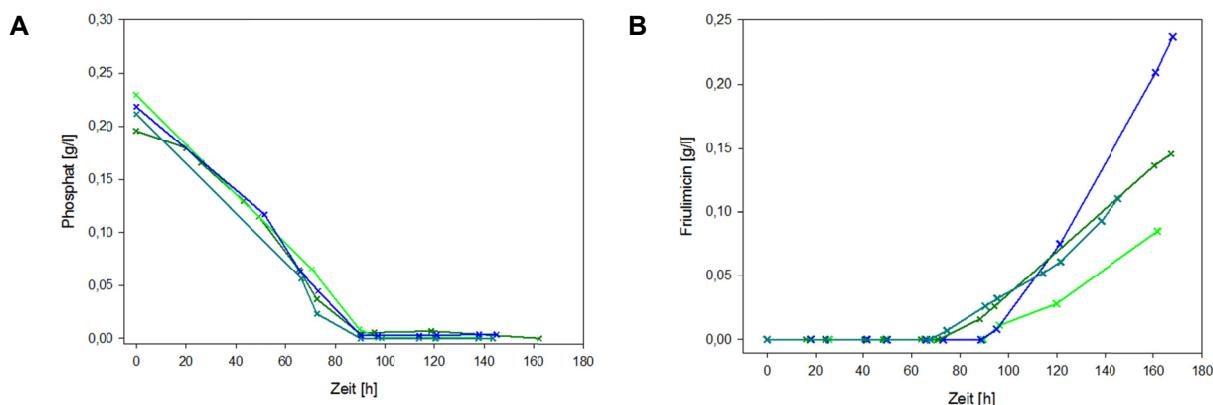


Abbildung 16: Verlauf der Phosphat- und Friulimicinkonzentrationen während vier Kultivierungen von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem Nährmedium.

Um den Einfluss von anorganischem Phosphat auf die Friulimicinbiosynthese und das Wachstum von *A. friuliensis* näher zu untersuchen, wurden während der Friulimicinproduktionsphase verschiedene Konzentrationen von Dikaliumhydrogenphosphat zugegeben. Bei dieser Untersuchung wurden Phosphatkonzentrationen von 100, 50 und 25 mg/l getestet. Ab Konzentrationen von 50 mg/l führte die Zugabe zu einem sofortigen Produktionsstopp der Friulimicinbiosynthese (Abbildung 17 A). Die Zugabe geringerer Konzentrationen von 25 mg/l führte lediglich zu einer Reduzierung der Friulimicinbildungsrate (Abbildung 17 B). Unabhängig von der Phosphatkonzentration konnte bei allen Kultivierungen nach Phosphatzugabe ein Anstieg der Biomassekonzentration beobachtet werden. Des Weiteren konnte bei Zugabe geringerer Phosphatkonzentrationen, die entsprechend schnell metabolisiert wurden, nach erneuter Phosphatlimitation im Nährmedium ein weiterer Anstieg der Friulimicinkonzentration beobachtet werden (Abbildung 17 B).

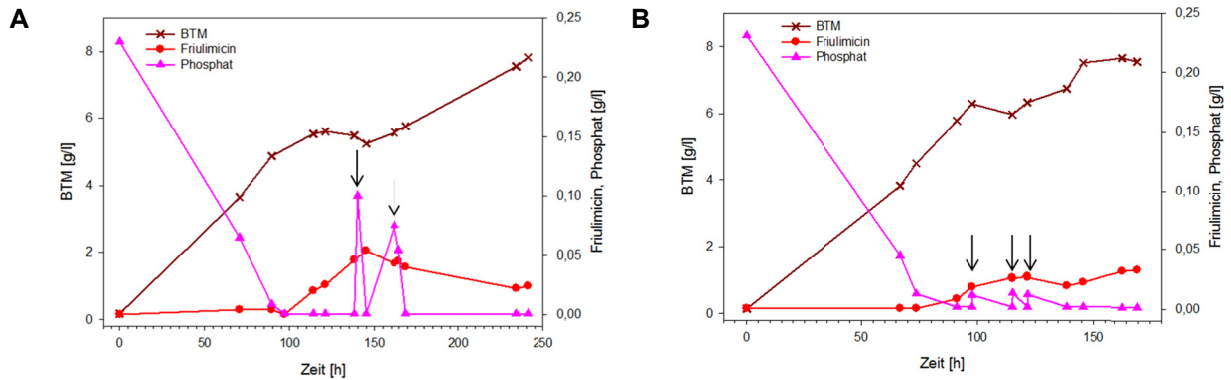


Abbildung 17: Verlauf der Biomasse- und Phosphatkonzentration sowie der Friulimicinproduktion während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 4-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Durch die Pfeile sind die Zeitpunkte gekennzeichnet, zu denen anorganisches Phosphat mit einer Endkonzentration von jeweils (A) 100 mg/l und (B) 25 mg/l zugegeben wurde.

Einfluss von Stickstofflimitation auf die Friulimicinbiosynthese

Um den Einfluss einer Stickstofflimitation auf die Friulimicinbiosynthese zu untersuchen, wurden Kultivierungen unter Arginin- und Valinlimitation durchgeführt, die die einzigen Stickstoffquellen im definierten Nährmedium waren. Dabei wurde die Arginkonzentration im Nährmedium (Tabelle 10) auf 0,6 g/l reduziert. Außerdem wurde, um eine Phosphatlimitation zu vermeiden, die Phosphatkonzentration im Nährmedium auf 2 g/l erhöht. Alle anderen Nährstoffkonzentrationen wurden beibehalten. Durch diese Anpassungen waren Arginin und Valin die ersten limitierten Substrate. Bei dieser Kultivierung wurde eine Ausschleusung des Nebenprodukts Ammonium, das häufig bei Kultivierungen mit Aminosäuren beschrieben wird (Lounès et al., 1995), nicht beobachtet, sodass hier ebenfalls von einer Limitation im Nährmedium ausgegangen werden konnte. Unter diesen stickstofflimitierten Bedingungen konnte kein Friulimicin nachgewiesen werden. Die Konzentration der Biotrockenmasse nahm sofort nach der Limitation von Stickstoff ab (Abbildung 18).

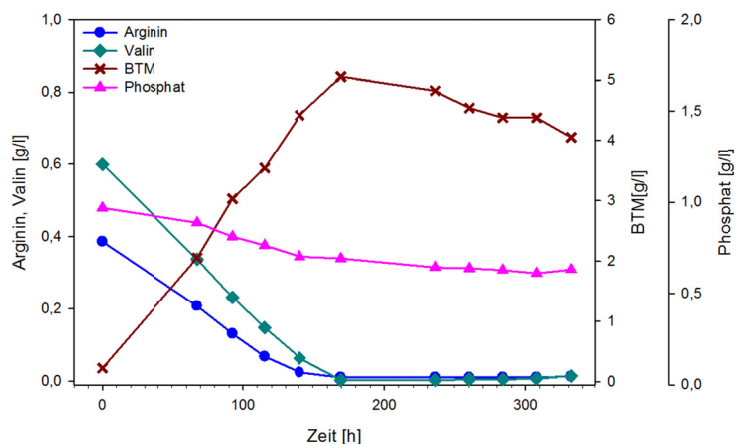


Abbildung 18: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Phosphat-, Arginin- und Valinkonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* unter Stickstofflimitation. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit modifiziertem, chemisch definiertem Nährmedium. Friulimicin und das Nebenprodukt Ammonium wurden während dieser Kultivierung nicht gebildet. Die Kohlenstoffquelle Glucose war zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung limitiert.

4.2.2. Kohlenstoffquellen für Wachstum und Friulimicinbiosynthese

Mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle konnten höhere Wachstumsraten erzielt werden als mit Saccharose, die im definierten Nährmedium nach Wagner (2009) als Hauptkohlenstoffquelle diente (Abbildung 10). Obwohl die Prozessdauer mit Saccharose als alleinige Hauptkohlenstoffquelle verlängert war, wurde eine Strategie mit Glucose als Wachstumsförderer und Saccharose als Kohlenstoffquelle für die Antibiotikaproduktionsphase getestet, da Saccharose aufgrund ihrer langsameren Metabolisierung Vorteile während der Produktionsphase haben kann (Sanchez et al., 2010). Das Nährmedium wurde so ausgelegt, dass Glucose und Phosphat gleichzeitig limitiert waren, da mit der Phosphatlimitation die Umstellung auf die Friulimicinbiosynthesephase begann (Abbildung 16). Saccharose war somit in der anschließenden Antibiotikaproduktionsphase als schwerer metabolisierbare Kohlenstoffquelle verfügbar.

In dieser Kultivierung war Glucose zusammen mit Phosphat nach etwa 140 h aufgebraucht (Abbildung 19). Ab diesem Zeitpunkt konnte eine verstärkte Aufnahmerate von Saccharose beobachtet werden, deren Konzentration sich zuvor kaum veränderte. Eine weitere Beobachtung, die während dieser Kultivierung gemacht werden konnte, war die verstärkte Abnahme der Argininkonzentration nach der Limitation von Glucose. Die Valinkonzentration war in dieser Kultivierung im Vergleich zu den Standard-Kultivierungen zwar erhöht, wurde aber während des Prozesses kaum metabolisiert. In der Wachstumsphase wurde außerdem Base zur Regelung des pH-Wertes auf 7,0 dosiert. Mit der Limitation von Glucose und Phosphat konnte ein Wechsel auf die Dosierung von Säure beobachtet werden, die

mit der Bildung von Ammonium einherging (Abbildung 19). Eine erhöhte Friulimicinbiosyntheserate mit der Kohlenstoffquelle Saccharose konnte nicht beobachtet werden.

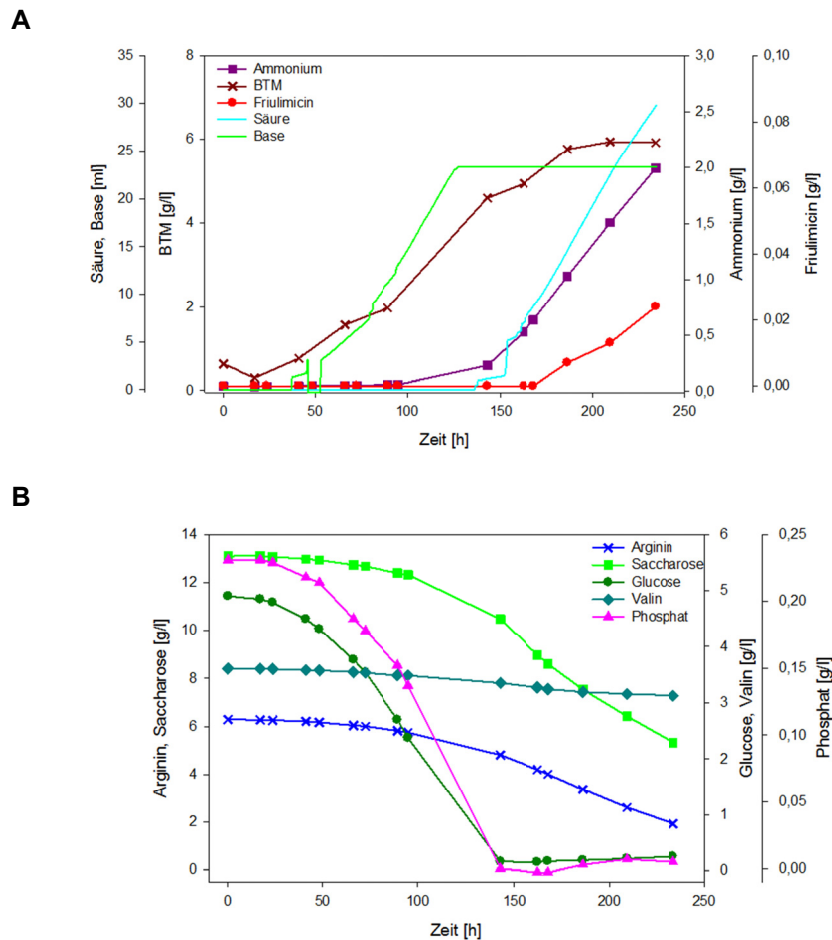


Abbildung 19: Verlauf von Substrat-, Produkt- und Biomassekonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit den beiden Kohlenhydratquellen Glucose und Saccharose. Die Konzentrationen der Substrate und Produkte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse und des Friulimicins, wurden über die AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen) analysiert. Die Säure- und Baseverläufe geben die Dosierung von H_2SO_4 und KOH zur Regelung des pH-Werts auf pH 7,0 an.

Da in der oben gezeigten Kultivierung (Abbildung 19) eine verstärkte Abnahme der Argininkonzentration nach Glucoselimitation zu beobachten war, wurde die Eignung von Arginin und auch Valin als Kohlenstoff- und Energielieferanten für das Wachstum von *A. friuliensis* untersucht. Dazu wurden Kultivierungen im Schüttelkolben durchgeführt, in denen die beiden Aminosäuren als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienten. Bis auf Glucose wurden alle anderen Nährmedienbestandteile beibehalten. Das Wachstum in den Ansätzen mit Arginin und Valin war nur sehr schwach ausgeprägt (Abbildung 20).

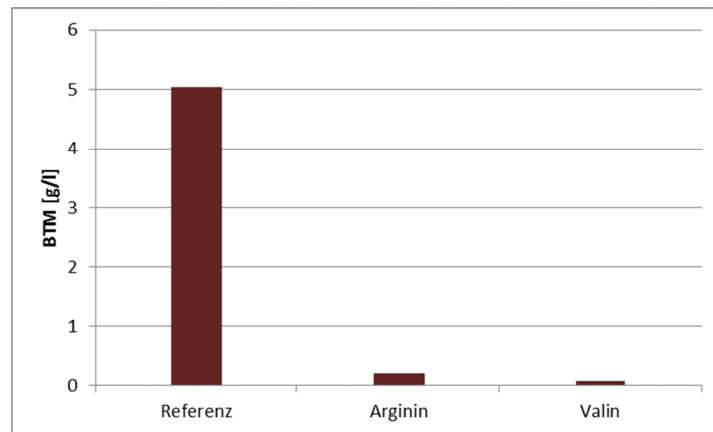


Abbildung 20: Vergleich der Biotrockenmassekonzentrationen von *A. friuliensis* mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Referenz), Arginin und Valin nach 10d Kultivierung im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium. Angegeben sind die Mittelwerte der Biotrockenmassekonzentrationen aus einer Doppelbestimmung.

4.2.3. Stickstoffquellen für Wachstum und Friulimicinbiosynthese

Im industriellen Maßstab werden für die biotechnologische Produktion von Antibiotika häufig kostengünstige Stickstoffquellen wie Sojamehl und Hefeextrakte verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem chemisch definierten Nährmedium gearbeitet, bei dem solche undefinierten Nährmedienquellen nicht eingesetzt wurden, um eine Analytik aller Substrate und Metabolite zu ermöglichen. Im definierten Nährmedium wurde die Aminosäure Arginin als Hauptstickstoffquelle eingesetzt. Um weitere kostengünstigere Stickstoffquellen zu finden, wurden neben Arginin die Stickstoffquellen Ammonium und Harnstoff auf ihre Eignung für Wachstum und Friulimicinbildung näher untersucht.

Aminosäuren

Im chemisch definierten Nährmedium sind die Aminosäuren Arginin und Valin als Stickstoffquellen vertreten (Tabelle 10). Arginin diente im chemisch definierten Nährmedium als Hauptstickstoffquelle, wohingegen Valin dem Nährmedium als Precursor zur Verbesserung der Friulimicinbiosynthese (Aretz et al., 2000) zugesetzt wurde. Mit Arginin als Hauptstickstoffquelle wurden Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 6 g/l und Friulimicinkonzentrationen von bis zu 0,3 g/l erreicht.

Ammonium

Um die Eignung von Ammonium als Stickstoffquelle für die Friulimicinproduktion zu untersuchen, wurden Schüttelkolbenkultivierungen durchgeführt bei denen die Hauptstickstoffquelle Arginin im definierten Medium durch 2 g/l Ammoniumchlorid ersetzt wurde. Außerdem wurde die weitere potentielle Stickstoffquelle Valin, die als

Precursor zur Erhöhung der Friulimicinbiosynthese eingesetzt wurde, aus dem Nährmedium entfernt. In diesen Kultivierungen konnten Biomassekonzentrationen von bis zu 3 g/l erreicht werden. Die Produktion von Friulimicin wurde nicht beobachtet (Abbildung 21).

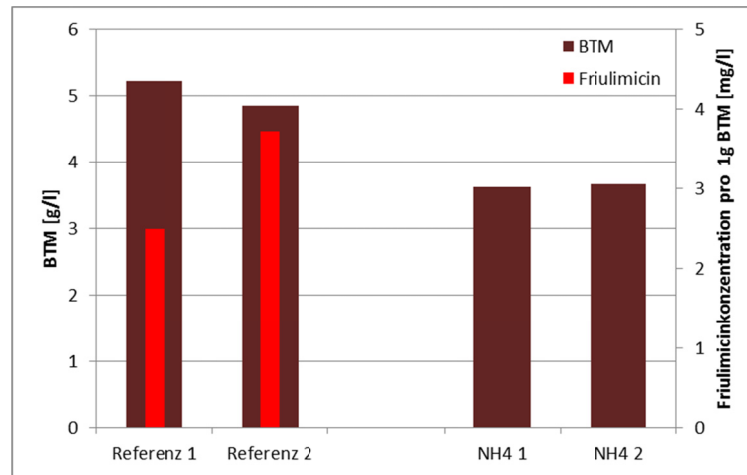


Abbildung 21: Biotrockenmasse- und Friulimicinkonzentrationen mit Arginin (Referenz) und Ammonium als Stickstoffquellen in Kultivierungen von *A. friuliensis* nach 10d. Die Kultivierungen wurden in einer Doppelbestimmung im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt.

In Kultivierungen im Bioreaktor wurde die Verwendung der Stickstoffquelle Ammonium näher untersucht. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Schüttelkolbenkultivierungen, wurde die Aminosäure Valin als Precursor im Nährmedium beibehalten. Außerdem wurden zwei Hauptkohlenhydratquellen (Glucose und Saccharose), wie unter 4.2.2 beschrieben, verwendet. Bei dieser Kultivierung konnten Biomassekonzentrationen von knapp 4 g/l erreicht werden. Friulimicin wurde in dieser Kultivierung nicht gebildet (Abbildung 22).

Auffallend war bei dieser Kultivierung, dass in Anwesenheit von Glucose Ammonium verbraucht wurde, während die Konzentration der alternativen Stickstoffquelle Valin kaum abnahm (Abbildung 22). Sobald Glucose im Nährmedium verbraucht war (nach etwa 140 h), nahm aber die Konzentration von Valin ebenso wie die von Saccharose stärker ab. Ab diesem Zeitpunkt war außerdem eine Zunahme der Ammoniumkonzentration zu beobachten. Nach etwa 230 h wurde der glucoselimitierten Kultur einmalig Glucose mit einer Konzentration von 2 g/l zugegeben. Nach dieser Zugabe nahm die Ammoniumkonzentration im Nährmedium wieder ab.

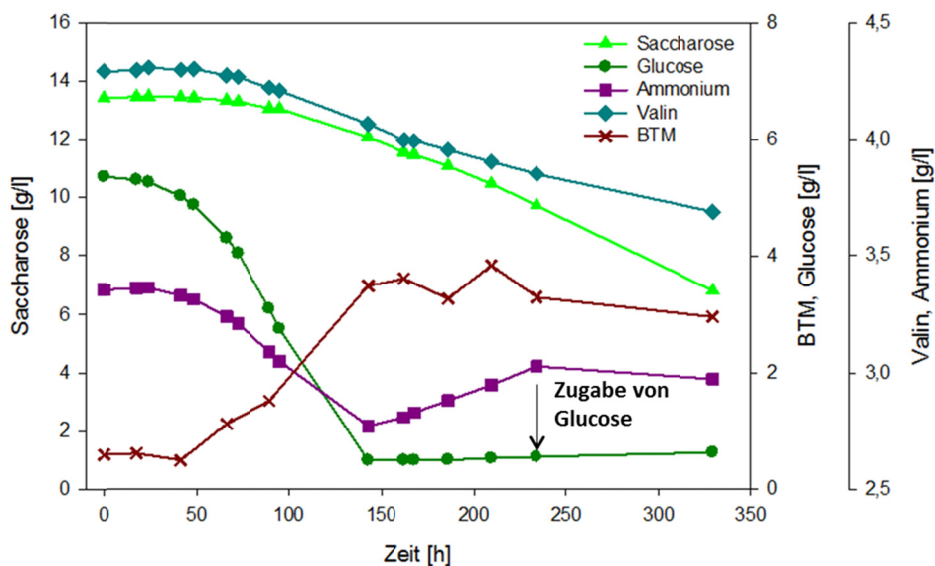


Abbildung 22: Verlauf der Biomasse- und Substratkonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* mit Ammonium als Hauptstickstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Substrate und Produkte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse und des Friulimicins, wurden über AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen) analysiert. Nach 230 h wurde einmalig Glucose mit einer Endkonzentration von 2 g/l zugegeben (siehe Pfeil). Friulimicin wurde während dieser Kultivierung nicht gebildet.

Da in Kultivierungen mit Ammonium als Stickstoffquelle keine Friulimicinproduktion zu beobachten war, wurde der Einfluss von Ammonium auf die Friulimicinbiosynthese in Schüttelkolbenversuchen untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Ammonium im Bereich von 0,3-1 g/l in Form von Ammoniumchlorid zum chemisch definierten Nährmedium (Tabelle 10) zugegeben. Bereits ab Ammoniumkonzentrationen von 0,3 g/l konnte eine Reduzierung der Friulimicinbiosynthese festgestellt werden (Abbildung 23). Ab einer Ammoniumkonzentration von 1 g/l wurde die Friulimicinbiosynthese total inhibiert. Die Biomassebildung blieb bei Ammoniumkonzentrationen bis zu 1 g/l unbeeinflusst.

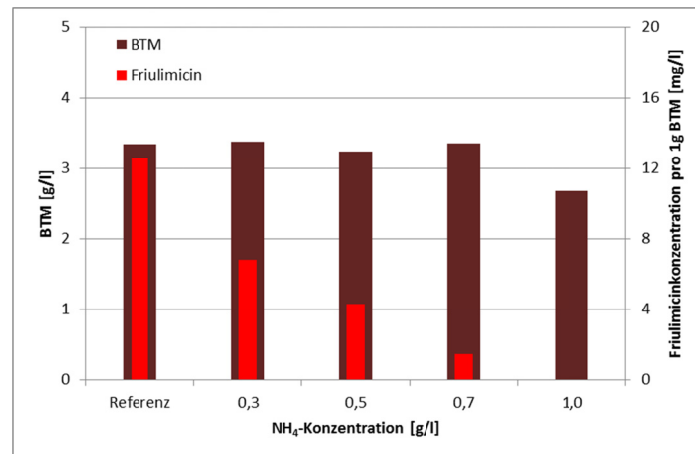


Abbildung 23: Einfluss von Ammonium auf die Biomassebildung und die Friulimicinproduktion von *A. friuliensis* nach 10d Kultivierung im Schüttelkolben. Die Kultivierung erfolgte im chemisch definierten Nährmedium mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Ammoniumchlorid. Als Referenz diente das chemisch definierte Nährmedium ohne Zusatz von Ammoniumchlorid.

Harnstoff

Die Aminosäure Arginin erwies sich als geeignete Stickstoffquelle zur Biosynthese von Friulimicin in *A. friuliensis*. Arginin hat allerdings den Nachteil, dass bei seiner Metabolisierung Ammonium entsteht, das unter bestimmten Kultivierungsbedingungen von den Zellen ausgeschleust wird (Abbildung 19). Ammonium beeinflusste die Friulimicinbiosynthese in Schüttelkolbenkultivierungen negativ (Abbildung 23).

Die Stickstoffquelle Harnstoff entsteht als Nebenprodukt des Argininabbaus und ist über den Harnstoffzyklus eng mit dem Argininstoffwechsel verknüpft. Zur Untersuchung der Eignung dieser Stickstoffquelle für die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* wurden Kultivierungen im Bioreaktor durchgeführt, bei denen Arginin im chemisch definierten Nährmedium gegen 5 g/l Harnstoff ausgetauscht wurde. Alle anderen Nährmedienbestandteile wurden beibehalten. Mit Harnstoff als Hauptstickstoffquelle konnte eine Biotrockenmassekonzentration von über 3 g/l erreicht werden. Eine Produktion von Friulimicin konnte während dieses Prozesses nicht nachgewiesen werden. Außerdem kam es während des Prozesses zu einer starken Ammoniumbildung mit Konzentrationen von mehr als 3 g/l (Daten nicht gezeigt).

4.2.4. Einfluss von Precursorsubstanzen auf die Friulimicinbiosynthese

Die Zugabe von Vorläufersubstanzen (Precursoren) zum Nährmedium kann die Ausbeute und das Biosynthesemuster von Antibiotika stark beeinflussen (vgl. Kapitel 2.3.2). Daher wurde der Einfluss der Zugabe von Precursorsubstanzen auf die Friulimicinbiosynthese untersucht. Als Grundlage für die Auswahl der

Precursorsubstanzen diente das genom-basierte Stoffwechselmodell (Insilico Biotechnology, Stuttgart), aus dem Precursoren sowohl für den Peptidkern als auch für den Fettsäurerest von Friulimicin abgeleitet werden konnten (Abbildung 24).

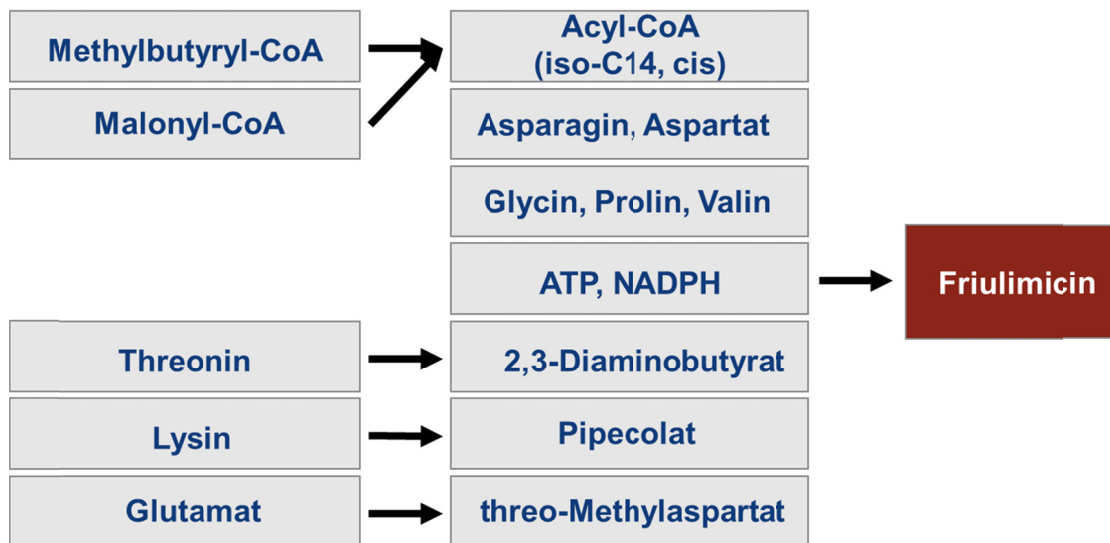


Abbildung 24: Precursoren für die Biosynthese des Peptidkerns und des Fettsäurerests von Friulimicin B, abgeleitet aus dem genom-basierten Stoffwechselmodell für *A. friuliensis* (Insilico Biotechnology).

Precursorsubstanzen für den Fettsäurerest von Friulimicin

Die direkten Precursoren für die Synthese von ungeradkettigen Fettsäuren, wie die Fettsäurereste in Friulimicin (Abbildung 2), sind Methylbutyrat, Isovalerat und Isobutyryl-CoA. Diese Precursoren sind toxisch für die Zellen (Taurino et al., 2011) und konnten deshalb nicht direkt zugefüttert werden, sondern mussten in Form ihrer Vorstufen, der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin bereitgestellt werden. Beim Abbau dieser Aminosäuren entstehen durch Desaminierung und anschließender oxidativer Decarboxylierung die direkten aktivierten Precursoren für die Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren Isobutyryl-CoA, Methylbutyryl-CoA und Isovaleryl-CoA. Der Zusatz der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin beeinflusste bereits die Bildung der verschiedenen Friulimicin- und Amphomycintypen im komplexen Nährmedium (Aretz et al., 2000). Die Zugabe von Valin zum Nährmedium führte hier zu einer Verschiebung der Lipopeptidbiosynthese zu Gunsten der Komponente B. Leucin und Isoleucin verschoben die Biosynthese zugunsten der anderen Komponenten.

Zur Untersuchung des Einflusses dieser verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Friulimicinbiosynthese im chemisch definierten Nährmedium, wurde die Aminosäure Valin durch die gleichen Mengen der Aminosäuren Leucin oder Isoleucin ersetzt. Ein

weiterer Ansatz wurde ohne Zusatz von Precursoramino­säuren durchgeführt. Der oben beschriebene Effekt konnte im chemisch definierten Nährmedium ebenfalls beobachtet werden. Mit Zusatz des Precursors Valin konnte eine deutlich höhere Friulimicin-B-Produktion erreicht werden, als mit den anderen beiden Aminosäuren Leucin und Isoleucin (Abbildung 25). Im Ansatz ohne Precursoren war die Friulimicin-B-Produktion am niedrigsten.

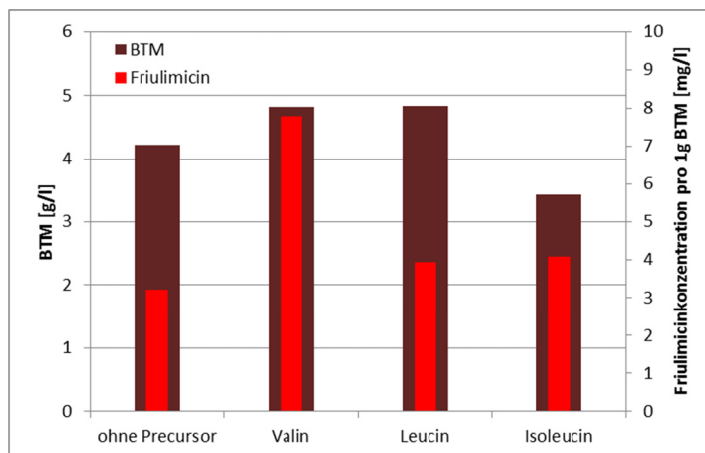


Abbildung 25: Friulimicin B- und Biomassekonzentration unter Zusatz verschiedener Aminosäure-Precursoren der Fettsäurebiosynthese. Die Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben für 12d im chemisch definierten Nährmedium. Das Referenzmedium enthielt keine Precursoramino­säuren.

Precursorsubstanzen für den Peptidkern von Friulimicin

Aus dem genom­basierten Stoffwechselmodell (Insilico Biotechnology, Stuttgart) konnten die Aminosäuren Glutamat, Lysin, Threonin, Glycin, Valin und Prolin sowie die ausschließlich in den Friulimicinen vorkommende, exozyklische Aminosäure Asparagin (Abbildung 2) als direkte und indirekte Precursoren für die Biosynthese des Friulimicin-Peptidkerns abgeleitet werden (Abbildung 24).

Zur Untersuchung des Einflusses dieser Precursoramino­säuren auf die Friulimicinbildung wurden Schüttelkolbenexperimente mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt, dem alle oben genannten Aminosäuren in Konzentrationen von je 0,1 g/l zugefügt wurden. Zu Beginn der Kultivierung zeigten die Ansätze mit Precursoramino­säuren eine höhere Biomassebildung (Abbildung 26). Nach etwa 10 d hatten sich die Biomassekonzentrationen angeglichen. Die Ansätze mit Precursoren zeigten hier eine deutlich höhere Friulimicinbildung. Allerdings ließ die Zugabe dieser Precursoren während Kultivierungen im Bioreaktor ein anderes Ergebnis erkennen. Hier hatte die Zugabe der Precursoren während der Friulimicinproduktionsphase keinen Einfluss auf die Friulimicinbiosynthese (Daten nicht gezeigt).

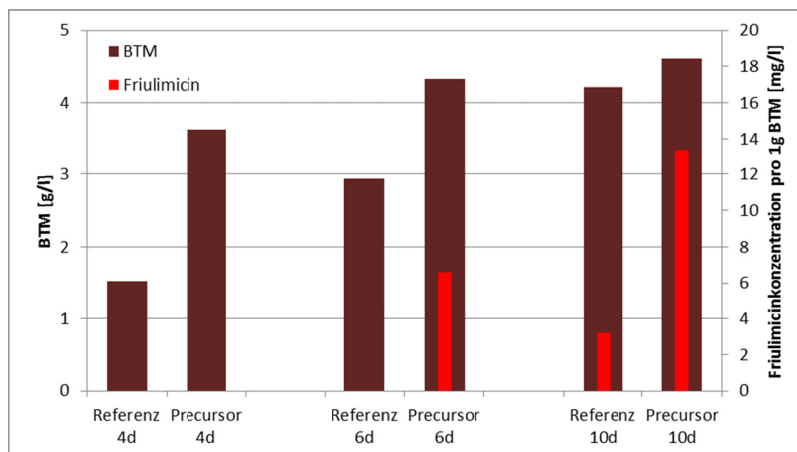


Abbildung 26: Biotrockenmassekonzentration und Friulimicinproduktion von *A. friuliensis* ohne (Referenz) und mit Zusatz von Precursoramino-säuren für den Peptidkern nach 4, 6 und 10d. Die Kultivierungen von *A. friuliensis* erfolgten im chemisch definierten Nährmedium im Schüttelkolben.

4.3. Prozessführungsstrategien für die Friulimicinproduktion

Für die biotechnologische Produktion von Antibiotika wurden verschiedene Prozessführungsstrategien beschrieben, mit denen eine effiziente Produktion möglich war (McIntyre et al., 1999, Vara et al., 2002, Ates et al., 1997, Giudici et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die gängigen Prozessführungsstrategien hinsichtlich des Potentials zur Produktivitätssteigerung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* untersucht. Dazu gehörten die absatzweise Prozessführung (Batch-Prozess), die Entwicklung von Zufütterungsstrategien (Fed-Batch-Prozessen) sowie die Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses mit Zellrückhaltung (Perfusionsprozess).

4.3.1. Batch-Prozess

In einem typischen Batch-Prozess zur Friulimicinproduktion in *A. friuliensis* mit dem entwickelten chemisch definierten Nährmedium (Tabelle 10) ließen sich fünf Prozessphasen unterscheiden (Abbildung 27). In der ersten, sogenannte lag-Phase, fand eine Adaptation der Zellen an die Bedingungen im Bioreaktor statt. Diese Phase ging nach etwa 20 h in eine exponentielle Wachstumsphase (zweite Phase), in der noch keine Friulimicinproduktion auftrat, über. Nach etwa 70-90 h war Phosphat als erster Nährmedienbestandteil limitiert und damit das exponentielle Wachstum beendet. Ab diesem Zeitpunkt (Beginn der dritten Phase) reduzierte sich die Wachstumsrate und die Friulimicinbiosynthese begann. Die Zeitspanne zwischen Phosphatlimitation im Nährmedium und dem Zeitpunkt, zu dem Friulimicin zum ersten Mal im Nährmedium nachweisbar war, betrug nur wenige Stunden und war aufgrund der weitläufigen Probenahmeintervalle nicht eindeutig festlegbar. Nach der intensiven Produktbildungsphase (dritte Phase) nahmen Biomasse- und

Friulimicinkonzentration kaum mehr weiter zu (Beginn der vierten Phase). Im gezeigten Prozess erreichte die Biomassekonzentration nach etwa 170 h ihr Maximum von etwa 6 g/l, die Friulimicinkonzentration lag bei knapp 300 mg/l (Abbildung 27). Meistens konnten in Batch-Prozessen Biotrockenmassekonzentrationen von 5-6 g/l erreicht werden, die Friulimicinkonzentrationen lagen zwischen 150-300 mg/l. Einige Stunden nach Einbruch der Wachstums- und Friulimicinbildungsphase begann die fünfte Phase, in der eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und in einigen Kultivierungen auch eine Abnahme der Friulimicinkonzentration zu beobachten war. In Batch-Prozessen konnten volumetrische Produktivitäten von 2-3 mg/l*h erreicht werden.

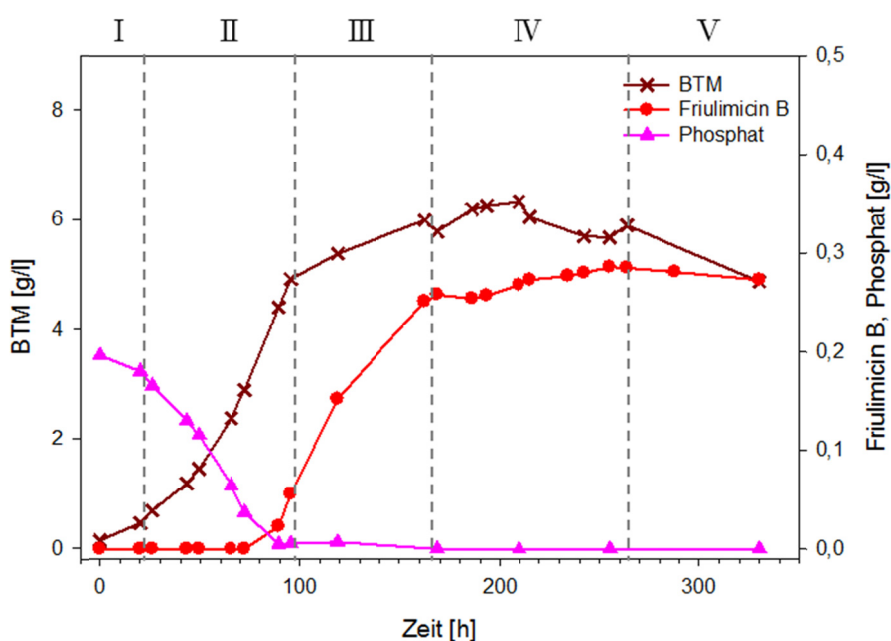


Abbildung 27: Verlauf der Biotrockenmasse-, Friulimicin- und Phosphatkonzentrationen während einer Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* zur Friulimicinproduktion im 4-l-Maßstab. Die Kultivierung wurde mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt. Einzelne Prozessphasen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

4.3.2. Entwicklung von Fed-Batch-Strategien

Während Batch-Kultivierungen werden Substrate weder zugeführt noch abgeführt. Dadurch ändern sich die Substratkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung und im Kulturmedium akkumulieren sich Metabolite. Bei hohen Substratkonzentrationen zu Beginn eines Prozesses unterscheiden sich zudem oft die spezifischen Substrataufnahmeraten in Vergleich zu den Raten späterer Prozessphasen, in denen die Substratkonzentrationen niedriger sind. Dies kann zu unerwünschten physiologischen Zustandsänderungen führen. So entstehen auch die verschiedenen, unter 4.3.1 beschriebenen Prozessphasen. Durch gezielte Zufütterung von Substraten in Fed-Batch-Prozessen kann die Substratkonzentration im

Anfangsnährmedium reduziert werden und während des Prozesses auf einem gewünschten Wert gehalten werden.

Zufütterung der Stickstoffquellen

Im chemisch definierten Nährmedium für die Friulimicinproduktion dient die Aminosäure Arginin als Hauptstickstoffquelle. Als weitere potentielle Stickstoffquelle ist die Aminosäure Valin vertreten, die als Precursor für die Friulimicinbiosynthese dient und nur in geringeren Konzentrationen vorliegt. In Kultivierungen von *A. friuliensis* mit Arginin als Hauptstickstoffquelle konnte die Bildung von Ammonium beobachtet werden (Abbildung 19). Ammonium entsteht vermutlich als Nebenprodukt des Aminosäuremetabolismus und zeigte in Schüttelkolbenexperimenten eine hemmende Wirkung auf die Friulimicinbiosynthese (Abbildung 23).

In Fed-Batch-Kultivierungen wurde deshalb untersucht, ob die Bildung des inhibierenden Nebenprodukts Ammonium durch eine limitierte Zufütterung der Aminosäuren Arginin und Valin reduziert werden kann. Die Zufütterung mit Feedraten von 0,02 g/l*h für Arginin und 0,01 g/l*h für Valin erwies sich als geeignet, um die Konzentrationen beider Aminosäuren während des Prozesses gering zu halten. Die limitierte Zufütterung von Arginin und Valin zeigte allerdings keine signifikante Reduzierung der Ammoniumbildung während des Prozesses (Daten nicht gezeigt).

Eine limitierte Zufütterung der Stickstoffquellen Ammonium und Harnstoff, die sich ebenfalls als geeignete Stickstoffquellen für die Biomassebildung zeigten (vgl. Kapitel 4.2.3), wurde aufgrund der inhibierenden Wirkung von bereits geringen Konzentrationen von Ammonium auf die Friulimicinbiosynthese nicht getestet.

Zufütterung der Kohlenstoffquelle

Für zahlreiche Aktinomyzeten ist eine Inhibierung der Antibiotikabiosynthese durch Kohlenhydrate, vor allem durch Glucose, beschrieben (Rokem et al., 2007). Glucose inhibiert beispielsweise die Biosynthese vieler Aminoglykosid-Antibiotika von Aktinomyzeten wie Streptomycin, Kanamycin, Istamycin sowie Neomycin über die Inhibierung von Biosyntheseenzymen.

In Kultivierungen mit *A. friuliensis* konnte eine Inhibierung der Friulimicinbiosynthese durch Glucose, selbst in Kultivierungen mit Glucosekonzentrationen von über 30 g/l, nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), so dass aus physiologischer Sicht keine limitierte Zufütterung der Kohlenhydratquelle notwendig war. Da die anfängliche Glucosekonzentration im Bioreaktor aber schon bei 30 g/l lag und bereits nach etwa 100 h aufgebraucht war, wurde die Kohlenhydratquelle zur Verhinderung einer Limitation durch Zufütterung ergänzt.

Eine Beobachtung, die während der Entwicklung dieser Fed-Batch-Kultivierungen gemacht wurde, war der Einfluss der Glucosekonzentration auf die Ammoniumbildung. Die Bildung von Ammonium erfolgte nicht erst bei vollständiger Limitation von Glucose, sondern trat bereits auf, sobald die Glucosekonzentration unter etwa 5 g/l fiel (in Abbildung 28 B nach etwa 100 h). Ab diesem Zeitpunkt war auch die Argininaufnahmerate leicht erhöht (Abbildung 28 D). Während der Glucoselimitationsphase war zudem eine Veränderung der metabolischen Aktivität der Zellen zu beobachten, die durch einen Einbruch der Sauerstoffaufnahme (OUR) und der Kohlenstoffdioxidbildungsrate (CER) sichtbar wurde (Abbildung 28 C). Nach einer deutlichen Erhöhung der Glucosefeedrate nach etwa 170 h nahm die Ammoniumkonzentration im Nährmedium ab (Abbildung 28 B) und die Glucoseaufnahmerate stieg wieder an (Abbildung 28 D). Zudem war die Argininaufnahmerate auch wieder etwas geringer. Eine Zufütterung von Glucose mit 0,3 g/l*h erwies sich während Kultivierungen von *A. friuliensis* als geeignet, um die Glucosekonzentration oberhalb der kritischen Konzentration von 5 g/l zu halten.

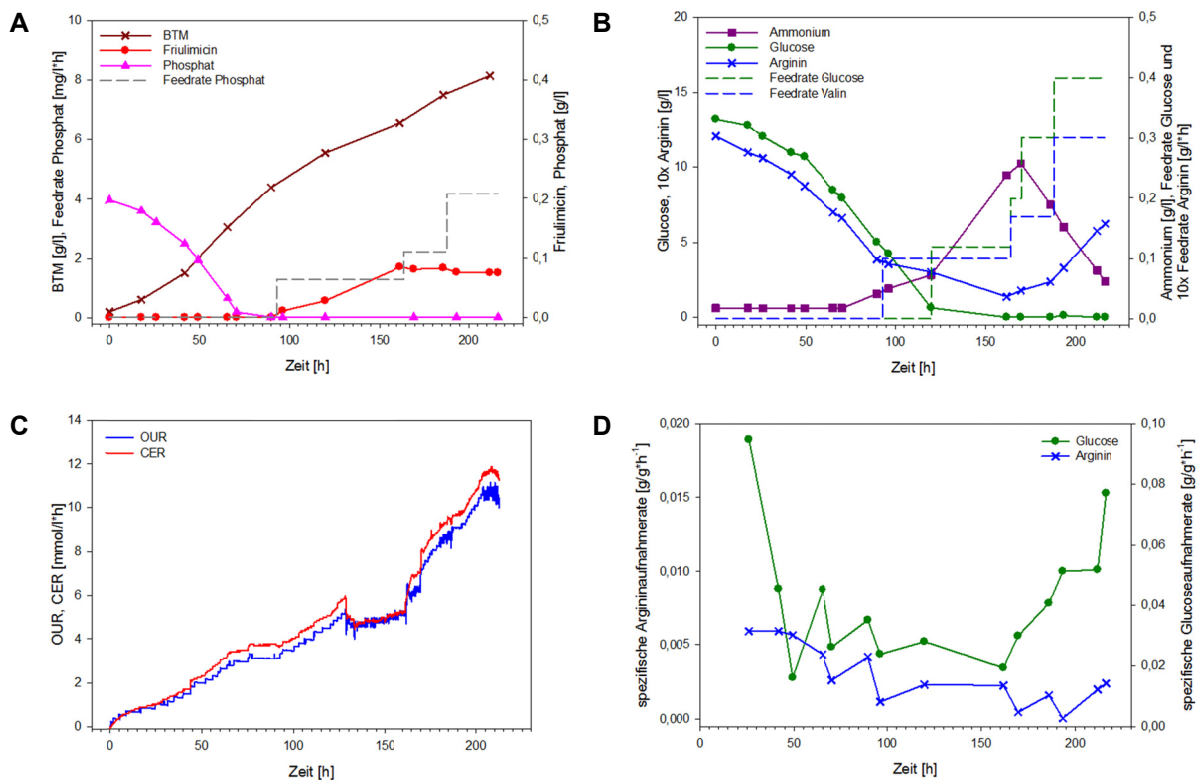


Abbildung 28: Verlauf der Konzentrationen von Substraten und Produkten sowie der Zufütterung von Arginin, Valin, Glucose und Phosphat (A und B) während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Glucose wurde nach 90 h, Arginin, Valin und Phosphat wurden nach 130 h mit steigenden Feedraten dosiert. Die Feedraten für Valin sind im Diagramm nicht eingezeichnet, sie entsprechen 70 % der Argininfeedrate. (C) Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlenstoffdioxidemissionsrate (CER). (D) spezifische Substrataufnahmeraten von Glucose und Arginin.

Zufütterung von Phosphat

In dem unter 4.3.1 beschriebenen Batch-Prozess dauerte die Phase, in der Friulimicin mit hohen Raten produziert wurde etwa 100 h. Danach waren ein Einbruch der Friulimicinbiosyntheserate und ein Wachstumsstopp zu beobachten. Für einen effizienten Produktionsprozess wäre eine Verlängerung der Friulimicinbiosynthesephase wünschenswert. In Kultivierungen zur Untersuchung des Einflusses von Phosphat konnte gezeigt werden, dass der Primär- und Sekundärmetabolismus von *A. friuliensis* durch Phosphat beeinflusst werden kann (Abbildung 17). Einige Beispiele aus der Literatur zeigen zudem, dass Antibiotika auch von aktiv wachsenden Zellen gebildet werden können (Hobbs et al., 1990, Reza Fazeli et al., 1995). In Fed-Batch-Kultivierungen mit Zufütterung von Phosphat unterhalb der Hemmkonzentration für die Friulimicinbiosynthese sollte daher untersucht werden, ob ein Aktivitätsverlust der Zellen verhindert werden kann oder sogar weiteres Zellwachstum bei gleichzeitiger Produktion von Friulimicin möglich ist. Eine Voraussetzung bei diesen Kultivierungen war, die Feedrate für Phosphat so auszulegen, dass die Zellen ihre metabolische Aktivität hinsichtlich Wachstum und Produktbildung länger aufrechterhalten, aber ihren Metabolismus nicht wieder auf ausschließliches Wachstum umstellen.

Bei diesen Fed-Batch-Kultivierungen wurde die Zufütterung von Phosphat erst einige Stunden nach Phosphatlimitation im Nährmedium und Beginn der Friulimicinbiosynthese gestartet, sodass eine vollständig Umstellung der Zellen auf Sekundärmetabolismus stattfinden konnte. Der Zeitpunkt der Umstellung der Zellen auf Sekundärmetabolismus konnte während der Kultivierung über einen Anstieg des pO_2 -Signals erkannt werden (vgl. Kapitel 4.4.1).

Um die kritische Phosphatkonzentration, bei der die Biomassebildung während der Friulimicinproduktionsphase wieder aufgenommen wird und es nicht zu einer Stagnation der Friulimicinbildung kommt, einzugrenzen, wurde zunächst auf die Ergebnisse der Versuche mit pulsartiger Dosierung verschiedener Phosphatkonzentrationen zurückgegriffen (vgl. Kapitel 4.2.1). Für eine kontinuierliche Zufütterung von Phosphat wurde die Feedrate zudem über die Phosphataufnahmerate während der Wachstumsphase abgeschätzt. Die Abschätzung ergab eine spezifische Phosphataufnahmerate von etwa $0,7 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$. Zu Beginn der Friulimicinproduktionsphase waren meistens $5\text{-}6 \text{ g/l}$ Biotrockenmasse vorhanden. Diese Biomasse würde in der Wachstumsphase etwa $3\text{-}4 \text{ mg/l}\cdot\text{h}$ Phosphat aufnehmen. Da die Phosphataufnahmerate während der Friulimicinbiosynthese vermutlich deutlich geringer ist, als während der reinen Wachstumsphase und eine Inhibition der Friulimicinbiosynthese ausgeschlossen werden sollte, wurde die Feedrate für Phosphat deutlich unterhalb der Phosphataufnahmerate angesetzt. Es zeigte sich, dass mit den getesteten Phosphat-

Feedraten von $0,75 \text{ mg/l}^*h$ und $0,375 \text{ mg/l}^*h$ paralleles Wachstum und Friulimicinbildung umgesetzt werden konnten (Abbildung 29). Außerdem konnte durch die Zufütterung von Phosphat die Produktionsphase (Phase III, Abbildung 27) deutlich verlängert werden. Bezogen auf die Biotrockenmasse zu Beginn der Zufütterung von Phosphat lagen die spezifischen Phosphat-Feedraten, mit denen Wachstum und Friulimicinbildung gleichzeitig möglich sind, bei $0,15$ und $0,07 \text{ mg/g}^*h$. Bei höheren spezifischen Phosphat-Feedraten über $0,3 \text{ mg/g}^*h$ brach die Friulimicinbiosynthese ein. Dies ist im Prozess in Abbildung 28 A nach Erhöhung der Feedrate 160 h nach Prozessbeginn der Fall. Die Biomassekonzentrationen waren bei höheren Phosphatzufütterungsraten von $0,75 \text{ mg/l}^*h$ (Abbildung 29 A und B) wie erwartet etwas höher als bei niedrigeren Raten von $0,375 \text{ mg/l}^*h$ (Abbildung 29 C und D). Die maximalen Friulimicinkonzentrationen lagen in Kultivierungen mit Phosphatzufütterung zwischen 70 - 250 mg/l . Daraus ergeben sich volumetrische Produktivitäten von 1 - 2 mg/l^*h .

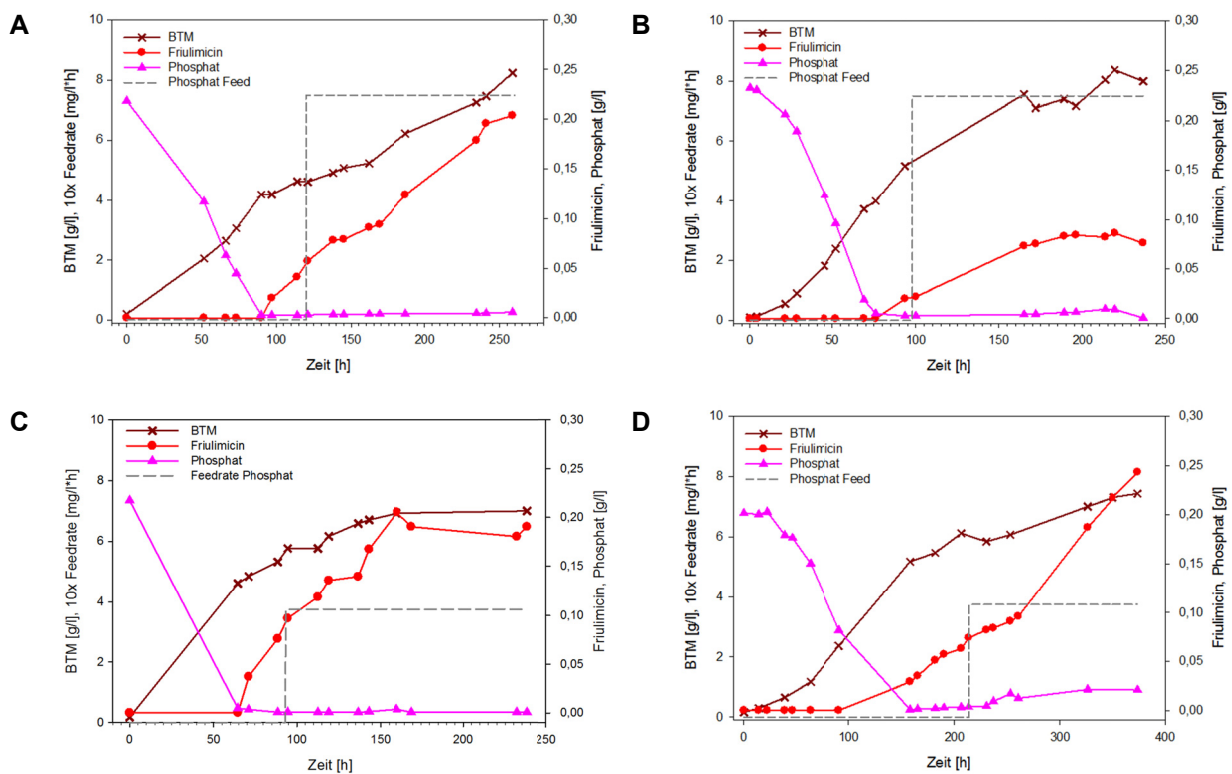


Abbildung 29: Verlauf der Biomasse-, Friulimicin- und Phosphatkonzentrationen während Fed-Batch-Kultivierungen von *A. friuliensis* mit Zufütterung von Phosphat. Die Kultivierungen A-C erfolgten im 4-l-Maßstab, die Kultivierung D wurde im 1,5-l-Maßstab durchgeführt. Die gestrichelten Linien zeigen die Feedraten von Phosphat an. (A und B) Phosphat-Feedrate: $0,75 \text{ mg/l}^*h$ und (C und D) Phosphat-Feedrate: $0,375 \text{ mg/l}^*h$.

4.3.3. Kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung

Die Biosynthese von Antibiotika ist aufgrund ihrer komplexen Regulation sehr sensitiv bezüglich Änderungen der Kultivierungsbedingungen. Wie in Abbildung 17 gezeigt, führte bereits die Zugabe kleiner Phosphatmengen zu einer Reduzierung der Friulimicinbiosyntheserate. Während Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen ändern sich die Bedingungen im Verlauf des Prozesses vor allem in Bezug auf die Nährstoff- und Biomassekonzentrationen ständig. Bei kontinuierlichen Prozessen ist dies nicht der Fall. Hier wird fortlaufend Nährmedium zugefüttert und Kulturmedium mit dem gleichen Volumenstrom abgepumpt. Dadurch stellt sich nach einiger Zeit ein dynamisches Fließgleichgewicht ein, das zu konstanten Bedingungen im Bioreaktor führt. Zur Untersuchung, ob sich diese konstanten Bedingungen positiv auf die Produktion von Friulimicin auswirken, wurde daher ein kontinuierlicher Prozess etabliert.

Im kontinuierlichen Prozess ist die volumetrische Produktivität proportional zur Verdünnungsrate D . Um hohe Produktivitäten zu erhalten, müssen daher hohe Verdünnungsraten angewendet werden. In kontinuierlichen Kultivierungen ist die Verdünnungsrate durch die maximale Wachstumsrate des verwendeten Mikroorganismus begrenzt. Werden höhere Verdünnungsraten angewendet, führt dies zu einem Auswaschen der Zellen aus dem Bioreaktor. Da *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium eine maximale Wachstumsrate μ_{\max} von etwa $0,02 \text{ h}^{-1}$ hatte, konnten in einer kontinuierlichen Kultivierung nur Verdünnungsraten kleiner $0,02 \text{ h}^{-1}$ verwendet werden. Um höhere Verdünnungsraten und damit höhere Produktivitäten zu erzielen, war ein Prozess mit Zellrückhaltung (Perfusionsprozess) erforderlich, bei dem durch Zellrückhaltesysteme verhindert wird, dass die Zellen aus dem Bioreaktor ausgetragen werden. Für die Zellrückhaltung im Perfusionsprozess zur Friulimicinproduktion wurde die Eigenschaft von *A. friuliensis* genutzt, kompakte Myzelpellets zu bilden (Abbildung 6), die gute Sedimentationseigenschaften besitzen. Die Zellrückhaltung wurde dabei über eine absatzweise Entnahme der Nährlösung gewährleistet. Dazu wurden vor der Nährmedienentnahme Rührer und Begasung für 60sec ausgeschaltet, sodass die Myzelpellets sedimentieren konnten (Abbildung 30). Die nahezu zellfreie Nährlösung konnte so als Überstand abgepumpt werden. Nach der Entnahme des Überstands wurden Rührer und Begasung wieder angeschaltet.

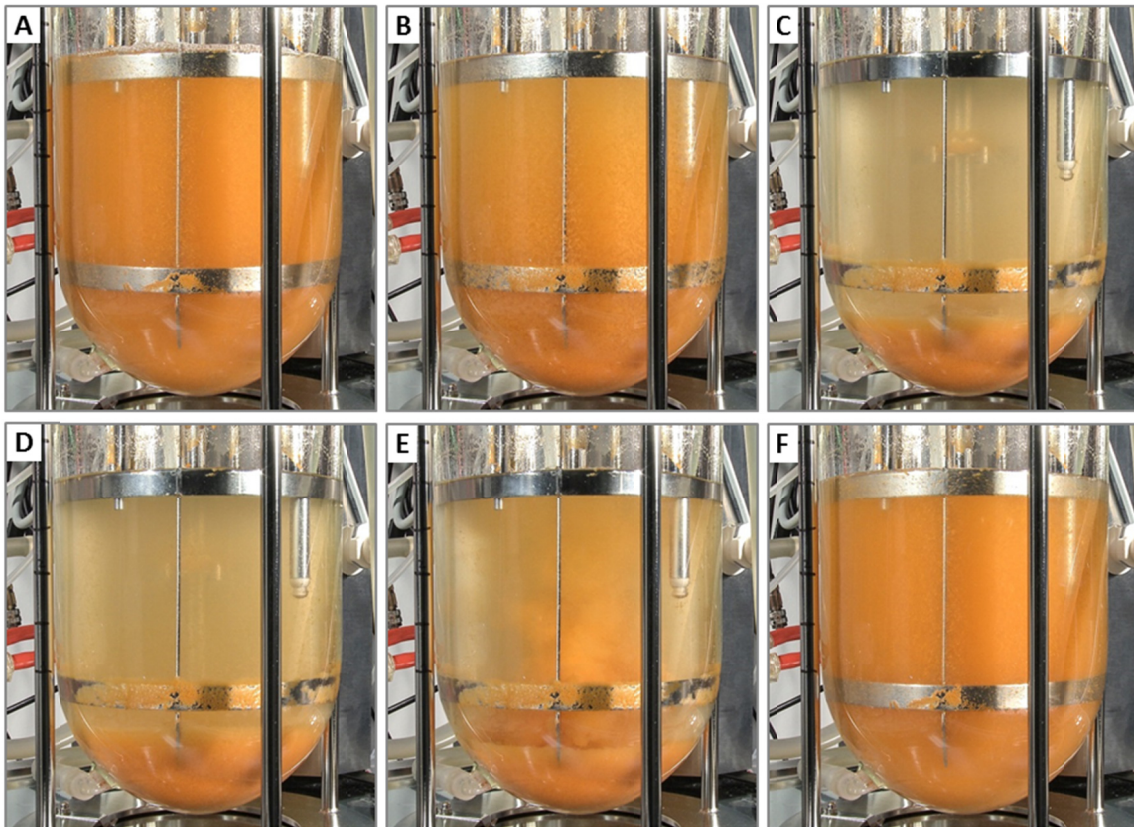


Abbildung 30: Zellrückhaltung durch Sedimentation der Myzelpellets während einer kontinuierlichen Kultivierung von *A. friuliensis*. (A) Vor der Entnahme der Nährlösung wurden Rührer und Begasung ausgeschaltet, damit die Myzelpellets sedimentieren können. (B und C) Sedimentation der Myzelpellets. (D) Entnahme des zellfreien Überstandes. (E und F) Aufwirbeln der Myzelpellets nachdem Rührer und Begasung wieder eingeschaltet wurden. (Bild: C. Stephan, Hochschule Esslingen).

Eine Voraussetzung für die Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses zur Friulimicinproduktion in *A. friuliensis* war, die Fähigkeit von *A. friuliensis* zu wachsen und simultan Friulimicin zu produzieren. Diese Fähigkeit konnte in Fed-Batch-Kultivierungen mit Phosphatzufütterung gezeigt werden (Abbildung 29). Im kontinuierlichen Prozess sollte sich, nach Erreichen einer bestimmten Biomassekonzentration, ein Gleichgewicht zwischen Phosphatzufütterungsrate und -aufnahme einstellen. Phosphat wäre in diesem Zustand im Nährmedium limitiert und hätte keine inhibierende Wirkung auf die Friulimicinbiosynthese.

Beim Perfusionsprozess (Kapitel 3.2.6) wurde die kontinuierliche Betriebsweise aus einer Batch-Kultivierung heraus gestartet, in der noch keine Umstellung auf Friulimicinproduktion stattgefunden hatte, also noch Phosphat im Nährmedium nachweisbar war. Als Feedlösung wurde das angepasste chemisch definierte Nährmedium (Tabelle 10) verwendet. Die zugeführte Feedlösung sowie das Bioreaktorgewicht wurden über eine Waage kontrolliert (Abbildung 31). Die Steuerung des Prozesses erfolgte über ein in Matlab (The Mathworks, Novi, USA)

erstelltes Programm mit graphischer Benutzeroberfläche, über die die Feedrate, die Schaltdifferenz zur Füllstandskontrolle des Bioreaktors sowie die Sedimentationszeit der Myzelpellets verändert werden konnten (Abbildung 32).

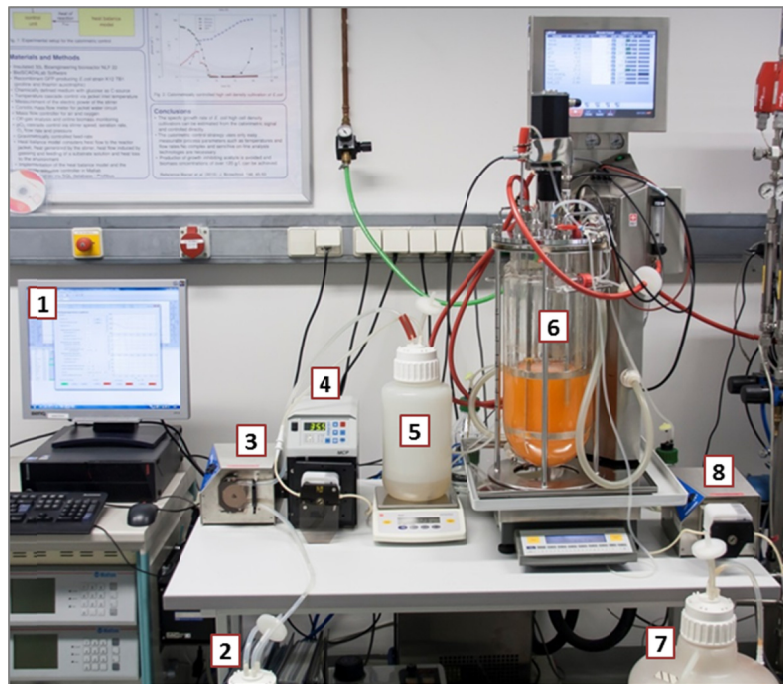


Abbildung 31: Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung von *A. friuliensis* mit Zellrückhaltung zur Produktion von Friulimicin. (1) PC zur Steuerung der Kultivierung, (2) Feed-Vorlagetank, (3) Feedvorlagepumpe, (4) Feedpumpe, (5) Feedvorlagegefäß auf Kontrollwaage, (6) Bioreaktor auf Kontrollwaage, (7) Erntetank, (8) Erntepumpe. (Bild: C. Stephan, Hochschule Esslingen).

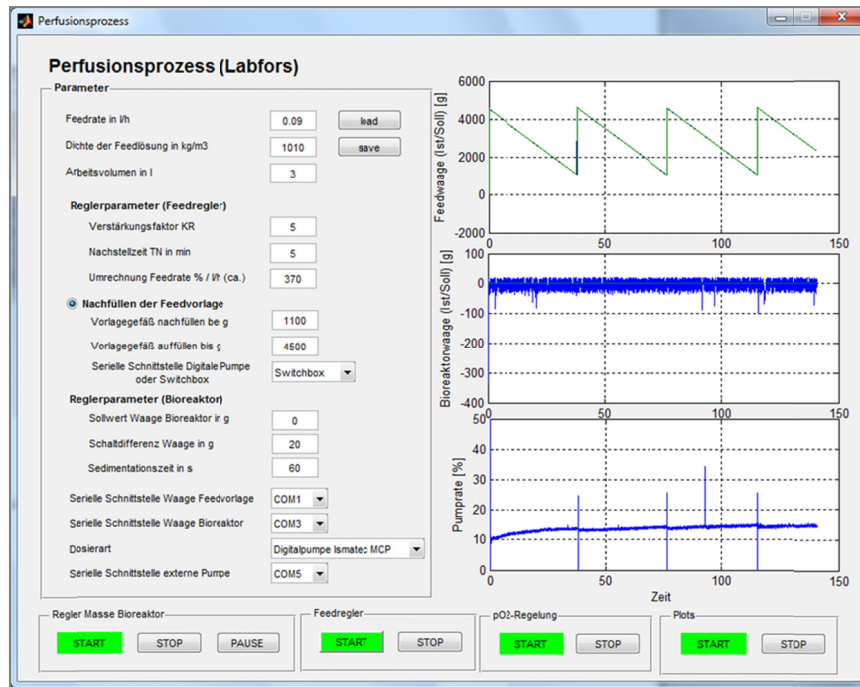
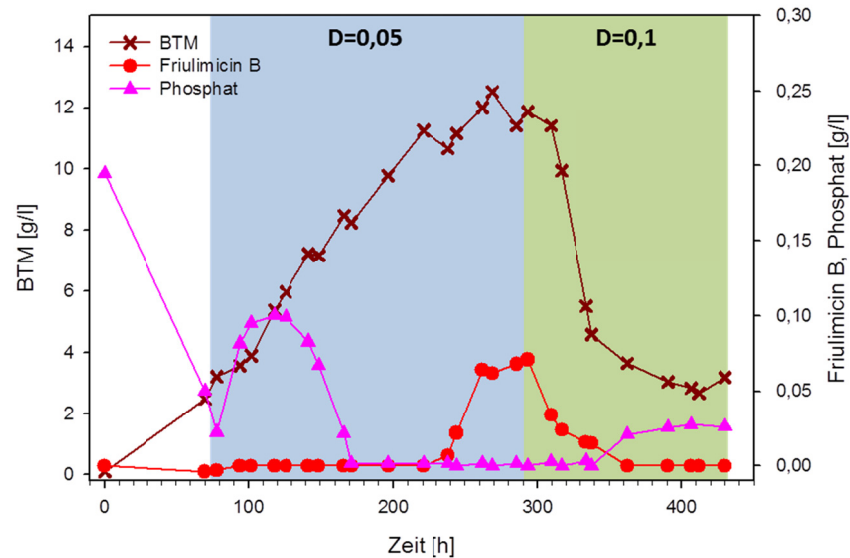


Abbildung 32: Benutzeroberfläche des Matlab-Programms zu Steuerung des kontinuierlichen Prozesses. Über das Parameterfeld (links) kann über die Eingabe der Feedrate F die Verdünnungsrate D verändert werden. Die Parameter zum Konstanthalten des Bioreaktorvolumens und die Sedimentationszeit der Myzelpellets können ebenfalls gesetzt werden. Die Verläufe des Gewichts der Feedvorlage und des Bioreaktors sowie die Pumprate der Feedpumpe werden graphisch ausgegeben (rechts). Die einzelnen Regler können separat ein- und ausgeschaltet werden (unten).

In einem klassischen kontinuierlichen Prozess (Chemostat) mit *A. friuliensis* könnten, wie oben beschrieben, nur Verdünnungsraten von $D \leq \mu_{\max} 0,02 \text{ h}^{-1}$ angewendet werden. Höhere Verdünnungsraten würden zu einem Auswaschen der Zellen aus dem Bioreaktor führen. Durch Verwendung des beschriebenen Zellrückhaltesystems, konnten auch Verdünnungsraten größer μ_{\max} angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Kultivierungen mit den Verdünnungsraten $D = 0,03, 0,05$ und $0,1 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Diese Verdünnungsraten zeigten sich bereits in Perfusionsprozessen mit anderen Aktinomyzeten als geeignet (Melzoch et al., 1997, Pamboukian et al., 2004). Für die Verdünnungsraten $D = 0,05$ und $0,1 \text{ h}^{-1}$ ist der Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung mit Zellrückhaltung gezeigt (Abbildung 33). Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ war nach etwa 180 h der stationäre Zustand erreicht. Der stationäre Zustand war durch eine konstante Substrat- und Produktkonzentration gekennzeichnet. Zudem wurde dieser Zustand durch eine Stagnation des Anstiegs der Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidbildungsrate sichtbar (Abbildung 33 B). Die Friulimicinkonzentration lag im stationären Zustand bei etwa 60 mg/l und die Biomassekonzentration bei etwa 12 g/l. Die volumetrische Produktivität für Friulimicin betrug demnach $3,3 \text{ mg/l} \cdot \text{h}$. Friulimicin war im kontinuierlichen Prozess erst etwa 70 h nach Phosphatlimitation

nachweisbar. Der späte Nachweis von Friulimicin im Nährmedium lässt sich zum einen durch ein Gleichgewicht zwischen Phosphatzufüederungsrate und Phosphataufnahmerate erklären, zum anderen ist er prozessbedingt und ergibt sich aus der Verdünnung des Nährmediums durch die Zufüederung. Bei einer Erhöhung der Verdünnungsrate auf $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ konnte kein Friulimicin nachgewiesen werden. Hier wurde das zugeführte Phosphat auch nicht vollständig von den Zellen verbraucht (Abbildung 33 A).

A



B

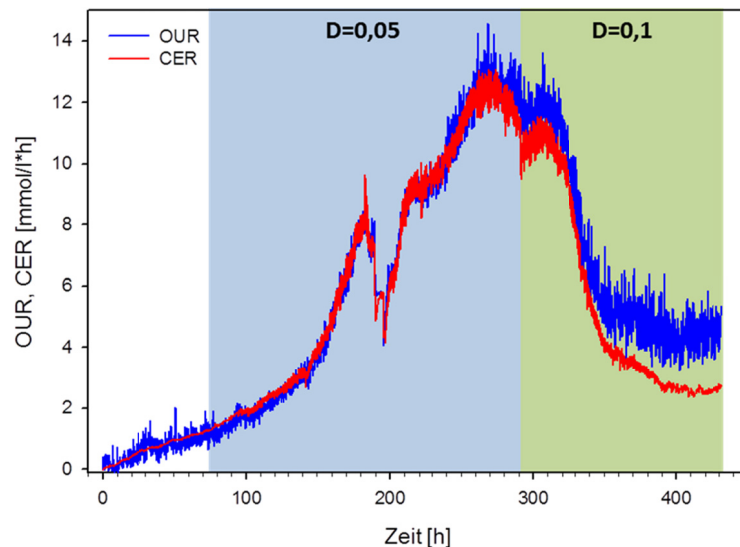


Abbildung 33: Kontinuierliche Kultivierung von *A. friuliensis* mit Zellrückhaltung. (A) Verlauf von Biotrockenmasse, Friulimicin B und Phosphat. (B) Verlauf der Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidbildungsrate. Der Einbruch des Abgasanalyse-signal nach etwa 200 h ist auf einen technischen Defekt der Abgasanalyse zurückzuführen. Die Phasen mit den Verdünnungsraten $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ sind blau und die mit $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ grün markiert. Die Kultivierung erfolgte im 3-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Als Feedlösung wurde ebenfalls das chemisch definierte Nährmedium verwendet.

Nach Erhöhung der Verdünnungsrate auf $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ wurde eine Abnahme der Biomassekonzentration beobachtet (Abbildung 33 A). Bei einem theoretischen Zellrückhaltegrad von 100 % müsste die Biomassekonzentration eigentlich mit zunehmender Verdünnungsrate solange ansteigen, bis ein Substrat limitiert vorliegt. Bei der Untersuchung des Zellrückhaltegrads konnte gezeigt werden, dass sich dieser mit der Kultivierungszeit änderte (Abbildung 34). Zu Beginn der Kultivierung wurde das Myzel durch das Zellrückhaltesystem fast vollständig zurückgehalten. In dieser Phase hatten die Myzelpellets eine kompakte Form (Daten nicht gezeigt). Mit zunehmender Kultivierungszeit wurden die Myzelien feiner und konnten nur noch zu etwa 50 % zurückgehalten werden. Dies ist wahrscheinlich die Hauptursache für die sinkende Biomassekonzentration nach Erhöhung der Verdünnungsrate auf $0,1 \text{ h}^{-1}$. Gegen Ende der Kultivierung stieg der Zellrückhaltegrad wieder an, da die Zellpellets wieder kompakter wurden. Diese kompakten Myzelpellets bildeten sich vermutlich, da aufgrund der geringen Biomassekonzentration die Rührergeschwindigkeit reduziert und dadurch die Scherbelastung verringert wurde.

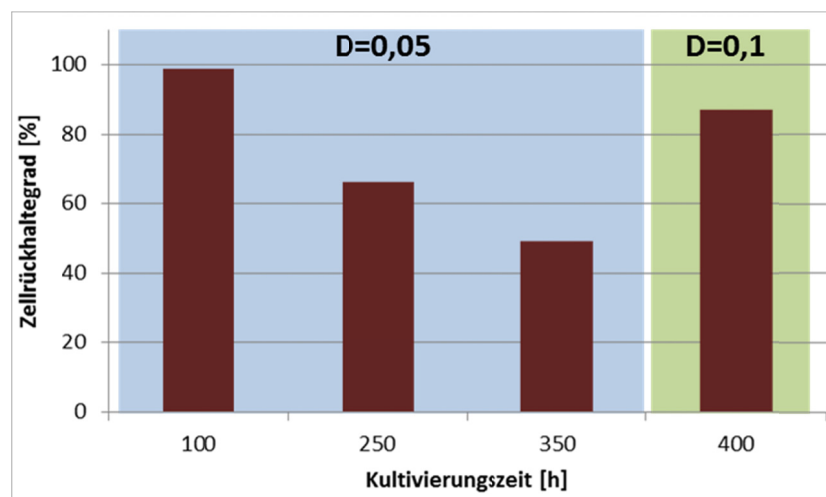


Abbildung 34: Zellrückhaltung während eines Perfusionsprozesses von *A. friuliensis*.

In einem weiteren Perfusionsprozess mit *A. friuliensis* konnte bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ eine Produktivität von $4,1 \text{ mg/l} \cdot \text{h}$ erreicht werden (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall lag die Konzentration der Biotrockenmasse mit über 20 g/l deutlich höher als bei den anderen getesteten Verdünnungsraten. Diese hohen Biomassekonzentrationen wurden durch einen besseren Zellrückhaltegrad erreicht.

Um die Entstehung feiner Myzelien zu verhindern, die bei dem beschriebenen Perfusionsprozess unerwünscht sind, wurde in einer weiteren Kultivierung die Rührergeschwindigkeit auf 400 rpm begrenzt. Durch diese Begrenzung sollte die Scherbelastung durch den Rührer reduziert werden. Die Regelstrategie, die ein Unterschreiten des Gelöstsauerstoffs pO_2 unter 30% Sättigungskonzentration

verhindert, wurde entsprechend geändert. Bei einer Rührergeschwindigkeit zwischen 200-400 rpm wurde der pO_2 über eine Erhöhung der Rührergeschwindigkeit in Schritten von 10 rpm geregelt. Darüber wurde die Sauerstoffkonzentration in der Zuluft durch Anreicherung mit reinem Sauerstoff in 1-%-Schritten bis maximal 11 % erhöht. Als letzte Stellgröße wurde die Begasungsrate in Schritten von 0,1 lpm erhöht. Durch diese Maßnahmen konnte allerdings die Bildung von feinen Myzelpellets, vor allem zu späteren Kultivierungszeitpunkten mit hohen Biomassekonzentrationen, nicht verhindert werden.

4.4. Erweiterte Analytik von Kultivierungen

Eine umfassende Prozessanalytik ermöglicht ein tiefgehendes Verständnis des Prozesses und unterstützt eine effiziente Prozessentwicklung. Durch die verwendete Standardanalytik (Kapitel 3.3) konnte das Prozessgeschehen zwar ausreichend verfolgt werden, diese Standardanalytikmethoden sind aber meist aufwendig und mit zeitlicher Verzögerung verbunden. Durch eine onlinefähige Prozessanalytik kann das Prozessgeschehen direkt verfolgt und bei Bedarf in den Prozess eingegriffen werden. Eine Online-Analytik eröffnet zudem die Möglichkeit der Automatisierung des Prozesses. Dadurch wird eine effizientere und sicherere Prozessführung ermöglicht. In diesem Kapitel werden verschiedene Möglichkeiten zur erweiterten Analyse des Produktionsprozesses für Friulimicin mit *A. friuliensis* gezeigt.

4.4.1. Respiratorische Parameter

Zwei Möglichkeiten zur Online-Erfassung der Stoffwechselaktivität von Zellen über respiratorische Parameter sind die Messung des Gelöstsauerstoffs im Nährmedium (pO_2) sowie die Analyse von O_2 und CO_2 im Abluftstrom. Da *A. friuliensis* eine geringe Atmungsaktivität in Vergleich zu anderen Mikroorganismen wie Hefen oder *E. coli* besitzt, konnte diese nur bei sehr kleinen Begasungsraten von 0,2-0,5 vvm erfasst werden. Während Kultivierungen von *A. friuliensis* im Bioreaktor konnte mit diesen geringen Begasungsraten über den Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) sowie der O_2 - und CO_2 -Anteile in der Fermenterablufte eine Umstellung von der Wachstumsphase auf die Antibiotikaproduktionsphase beobachtet werden.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Nährmedium wurde während Kultivierungen von *A. friuliensis* im Bioreaktor über eine pO_2 -Sonde gemessen. In diesen Kultivierungen nahm der pO_2 während der Wachstumsphase exponentiell ab und wurde durch Erhöhung der Rührergeschwindigkeit auf über 30 % Sättigungskonzentration gehalten (Abbildung 35 A und B). Mit Beginn der Friulimicinbiosynthese war ein plötzlicher Anstieg des pO_2 zu beobachten. Während Batch-Kultivierungen stieg der pO_2 nach diesem Anstieg langsam weiter an. In Fed-

Batch-Kultivierungen hingegen, bei denen die Aktivität der Zellen nach Phosphatlimitation durch Zufütterung von Phosphat wieder aufgenommen wurde, konnte nach Beginn der Zufütterung ein erneutes Absinken des pO_2 , verbunden mit weiteren Erhöhungen der Rührergeschwindigkeit beobachtet werden (Abbildung 35 B).

Die Umstellung von Primär- auf Sekundärmetabolismus konnte in Kultivierungen von *A. friuliensis* im Bioreaktor neben dem pO_2 -Signal auch anhand der von der Abgasanalyse abgeleiteten Parameter Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidemissionsrate (CER) verfolgt werden. Während der Wachstumsphase stiegen beide Raten sowohl im Batch-Prozess als auch im Fed-Batch-Prozess, exponentiell an und blieben nach Phosphatlimitation zunächst konstant (Abbildung 35 C und D). In dieser Phase fand vermutlich die Umstellung von der reinen Wachstumsphase auf eine Wachstums- und Produktionsphase statt. In Batch-Kultivierungen nahmen beide Raten nach Beginn der Friulimicinbiosynthese wieder ab (Abbildung 35 C). In Fed-Batch-Kultivierungen hingegen stiegen die Sauerstoffverbrauchs- und Kohlenstoffdioxidbildungsraten mit Beginn der Zufütterung von Phosphat weiter an (Abbildung 35 D).

Die respiratorischen Signale wurden zur Abschätzung des Feedstarts in Fed-Batch und kontinuierlichen Prozessen verwendet (vgl. Kapitel 4.3.2).

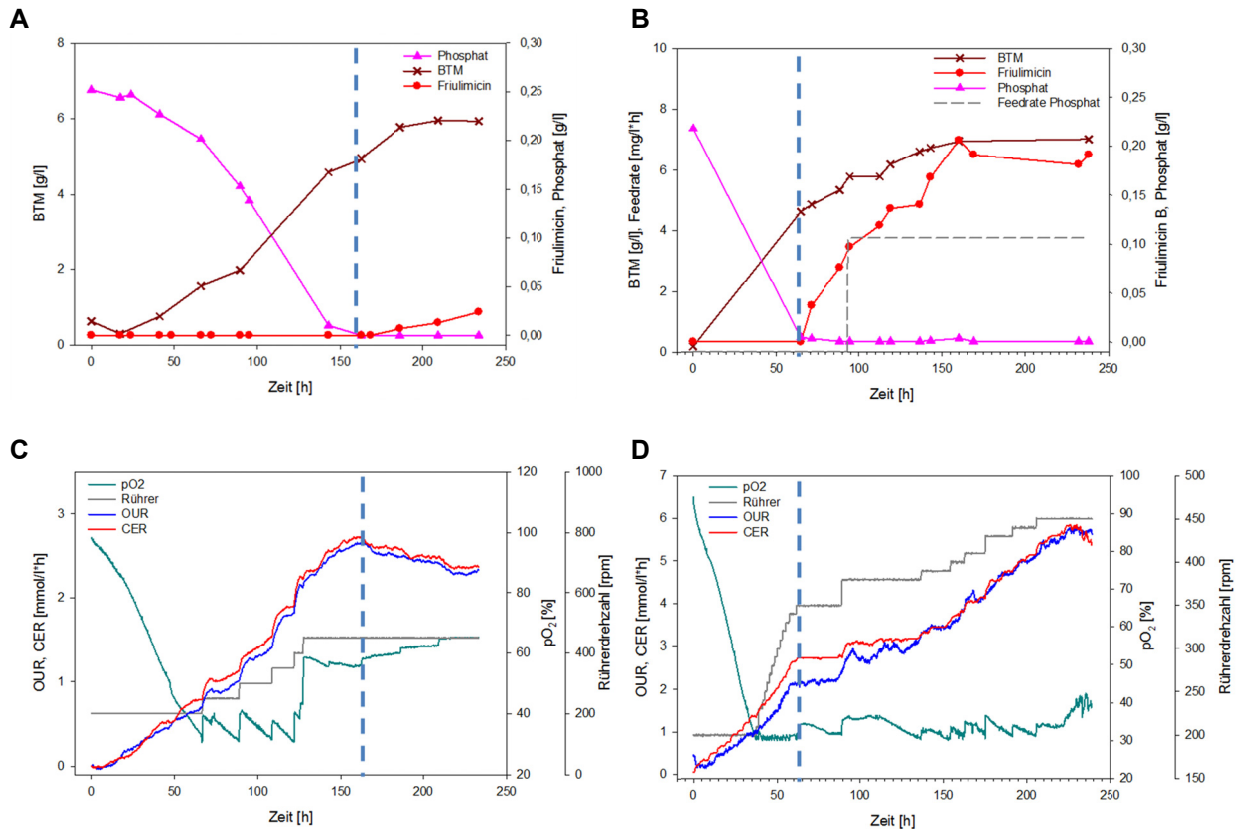


Abbildung 35: Respiratorische Parameter und Verlauf der Biotrockenmasse- und Phosphatkonzentrationen sowie der Friulimicinbiosynthese während (A und C) Batch-Kultivierung und (B und D) Fed-Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Der Übergang von der Wachstumsphase zur Friulimicinproduktionsphase ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

4.4.2. Biomassemonitoring mit Impedanzspektroskopie

Die Biomassekonzentration ist eine wichtige Größe während der Kultivierung, da die Produktivität eines Prozesses meistens von ihr abhängig ist. Außerdem ist die Biomassekonzentration mit den daran gebundenen spezifischen Raten für Substratverbrauch und Produktbildung eine wichtige Größe zur Beurteilung des Prozessgeschehens. Übliche Methoden wie die Bestimmung der optischen Dichte und die Biotrockenmassebestimmung haben den Nachteil, dass sie nicht zwischen metabolisch aktiven und toten Zellen unterscheiden können. Optische Methoden sind zudem bei myzelbildenden Mikroorganismen wie *A. friuliensis* weniger geeignet, da die Myzelaggregate zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung führen. Auch die Bestimmung der Biotrockenmasse ist fehlerträchtig und benötigt relativ große Probevolumina. Aus diesen Gründen wurde zur Bestimmung der Biomassekonzentration von *A. friuliensis* zusätzlich zur Biotrockenmassebestimmung eine Impedanzspektroskopiesonde (vgl. Kapitel 3.2.6) eingesetzt. Diese Duale-Frequenz-Dielektrizitäts-Spektroskopiesonde arbeitet mit zwei Frequenzen.

Eine hohe Frequenz bei 10 MHz erfasst Änderungen in der Nährmedienzusammensetzung, eine niedrigere Frequenz erfasst die Biomasse. Die Frequenz, die mit der Biomassekonzentration am besten korreliert, ist abhängig von der Morphologie der Zellen. Da für *A. friuliensis* bisher keine optimalen Messfrequenzen bekannt waren, wurde alle 12 min ein Scan über den gesamten Frequenzbereich von 0,3 – 10 MHz durchgeführt. Die beste Korrelation zwischen Permittivität und Biotrockenmasse ergab sich bei der niedrigsten verwendeten Frequenz von 300 kHz (Abbildung 36).

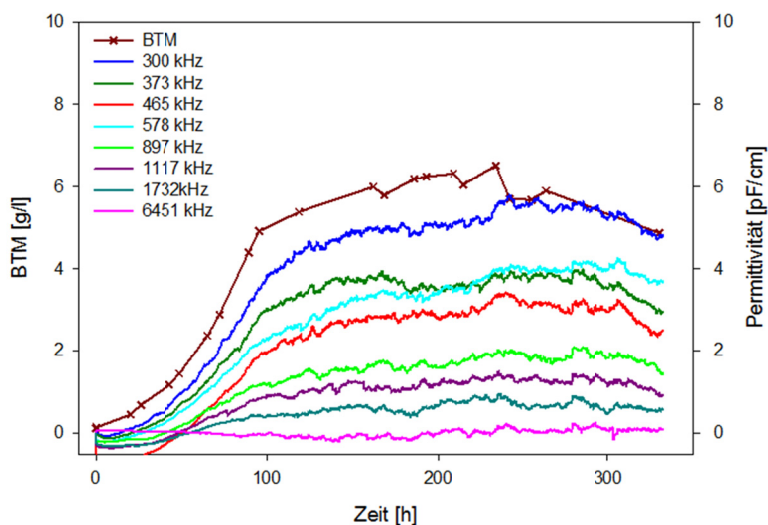


Abbildung 36: Biotrockenmassekonzentration und Frequenzscan der Impedanzspektroskopie während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem Nährmedium. Die Rohdaten aus der Impedanzspektroskopie wurden über eine exponentielle Glättung bearbeitet.

In Batch-, Fed-Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen konnte der Verlauf der Biomassekonzentration mit der Impedanzsonde qualitativ verfolgt werden. In der exemplarisch gezeigten Batch-Kultivierung (Abbildung 37 A) endete die exponentielle Wachstumsphase nach etwa 100 h und ging danach in eine Phase mit verlangsamter Wachstumsrate über. Nach etwa 150 h nahm die Biomassekonzentration nicht mehr weiter zu. Der Anstieg des Impedanzsignals nach etwa 230 h kann wahrscheinlich mit einem Bewachsen der Sonde in Zusammenhang gebracht werden. Um dies zu verhindern, konnte die Sonde über eine sogenannte Autolysefunktion gereinigt werden. Dabei wurde eine hohe Spannung angelegt, die das Zellmaterial an der Sonde zerstörte. Mit dieser Funktion konnte das Bewachsen der Sonde weitgehend verhindert werden. Die Biomassebildung von *A. friuliensis* korrelierte im Batch-Prozess zusätzlich zum Impedanzsignal bei 300 kHz gut mit der Kohlenstoffdioxidbildungsrate CER (vgl. Kapitel 4.4.1). Für die anderen gezeigten Prozesse waren keine verwertbaren Abgasanalysedaten zur Bestimmung der CER verfügbar. In der gezeigten Fed-Batch-Kultivierung (Abbildung 37 B) endete das exponentielle Wachstum nach etwa 80 h. Danach war ein weiterer Anstieg der

Biomassekonzentration sichtbar. In dieser Kultivierung wurde das wachstumslimitierende Substrat Phosphat nach etwa 80 h zugefüttert. Beim Perfusionsprozess (Abbildung 37 C) korrelierte die Biomassekonzentration, trotz der sich stark ändernden Morphologie der Myzelien (vgl. Kapitel 4.3.3), gut mit dem Impedanzsignal bei 300 kHz.

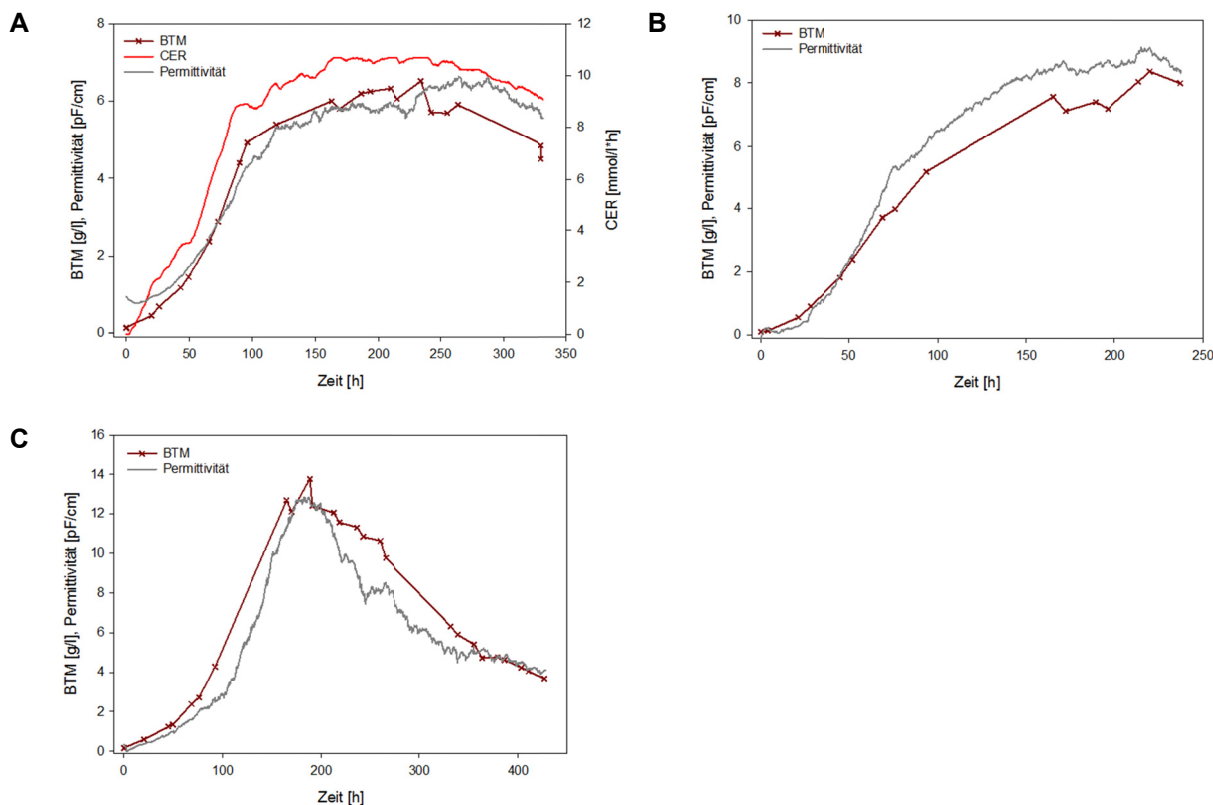
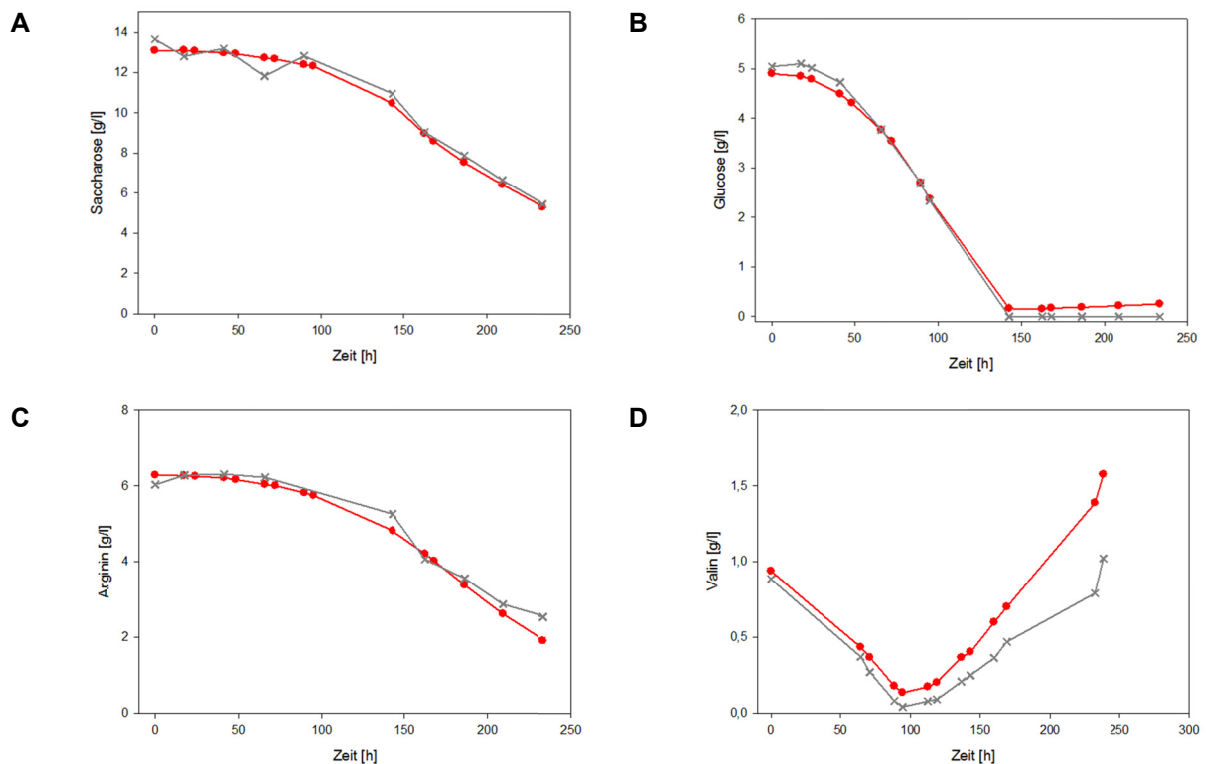


Abbildung 37: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration, des Impedanzsignals bei 300 kHz und der Kohlenstoffdioxidemissionsrate CER während Kultivierungen von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden (A) im Batch-Betrieb, (B) im Fed-Batch-Betrieb und (C) im Perfusionsprozess mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt. Die Rohdaten der Impedanzspektroskopie wurden über eine exponentielle Glättungsfunktion bearbeitet. Für die Fed-Batch-Kultivierung und den Perfusionsprozess waren keine Abgasanalysedaten verfügbar.

4.4.3. Analyse von Kultivierungsproben mit Mittelinfrarotspektroskopie

Die Bestimmung der Konzentrationen von Nährmedienbestandteilen über Mittelinfrarotspektroskopie (AquaSpec-MIR-Analytik) wurde von der micro-biolytics GmbH (Esslingen) durchgeführt. Bei dieser Methode wird von einer Kultivierungsprobe ein Gesamtspektrum im Mittelinfrarotbereich aufgenommen, aus dem die Spektren einzelner Komponenten bestimmt werden können (vgl. Kapitel 2.3.1). Aus diesen Einzelspektren lassen sich qualitative und quantitative Aussagen zu einzelnen Nährmedienbestandteilen treffen. Die Auswertung der Spektren kann über zwei Methoden erfolgen (vgl. Kapitel 2.3.1). Bei der ersten

Methode erfolgt eine Kalibrierung über die sogenannte Partial-Least-Square-(PLS)-Regression mit Hilfe von klassischer Referenzanalytik. Die zweite Methode kommt ohne eine Kalibrierung über Referenzanalytik aus. Bei dieser Methode wird ein chemometrisches Modell erstellt, mit dem die Konzentrationen der einzelnen Komponenten über eine Principal-Component-Analysis (PCA) abgeschätzt werden. Diese Methode wurde für die Analyse der Probenspektren aus Kultivierungsproben von *A. friuliensis* verwendet. Für die Auswertung über PCA wurde zuvor eine Spektrendatenbank mit Referenzspektren einzelner Komponenten (Tabelle 8) erstellt. Ein Vergleich der Analysen von Kultivierungsproben mit der AquaSpec-MIR-Analytik und den unter 3.3 beschriebenen Referenzmessungen ist exemplarisch für eine Kultivierung in Abbildung 38 gezeigt. Mit der AquaSpec-MIR-Analytik ließen sich die Verläufe von allen Komponenten des definierten Nährmediums, die in Konzentrationen größer als 0,5 mg/l vorlagen, bestimmen. Die Konzentrationen von Friulimicin B aus der Bestimmung mit AquaSpec-MIR-Analytik waren allerdings etwa 5-fach höher als die Konzentrationen aus der HPLC-Analytik.



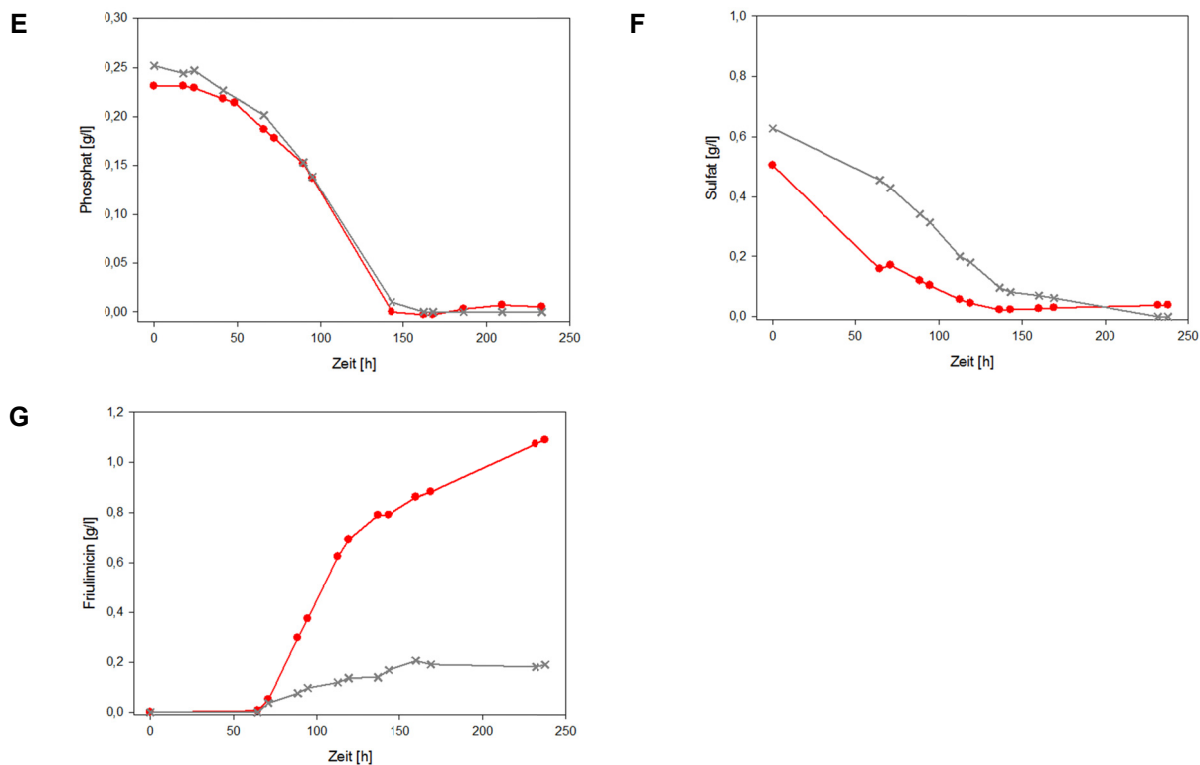


Abbildung 38: Vergleich der Verläufe für einzelne Substrate (A-F) und Friulimicin (G) während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Rotes Kreissymbol: AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen), graues Kreuzsymbol: Referenzanalytik.

Aufgrund der guten Korrelationen der AquaSpec-MIR-Analytik mit der Referenzanalytik (Abbildung 38), wurden noch weitere Nährmedienkomponenten in das chemometrische Modell aufgenommen. Da die Bestimmung der Nährmedienbestandteile über PCA auch ohne Kalibrierung durch Referenzanalytik möglich war, wurde die Annahme getroffen, dass die Analysen weiterer Nährmedienbestandteile, die nach demselben Prinzip analysiert wurden, ebenfalls zuverlässig sind.

Für diese Nährmedienbestandteile ist in Abbildung 39 eine Kultivierung exemplarisch gezeigt. In dieser Kultivierung wurde unter anderem die Bildung von Trehalose nach Abschluss der exponentiellen Wachstumsphase von *A. friuliensis* in Konzentrationen von über 2 g/l nachgewiesen (Abbildung 39 A). Auch die Bildung von organischen Säuren, hauptsächlich von Acetat aber auch von α -Ketoglutarinsäure, Formiat, Itaconsäure und Propionsäure konnte gezeigt werden (Abbildung 39 B). Außerdem wurde mit Beginn der Friulimicinbiosynthese die Bildung der ungewöhnlichen Aminosäuren Pipecolinsäure und 2,3-Diaminobuttersäure, die im Peptidkern von Friulimicin (Abbildung 2) vorkommen, nachgewiesen (Abbildung 39 C).

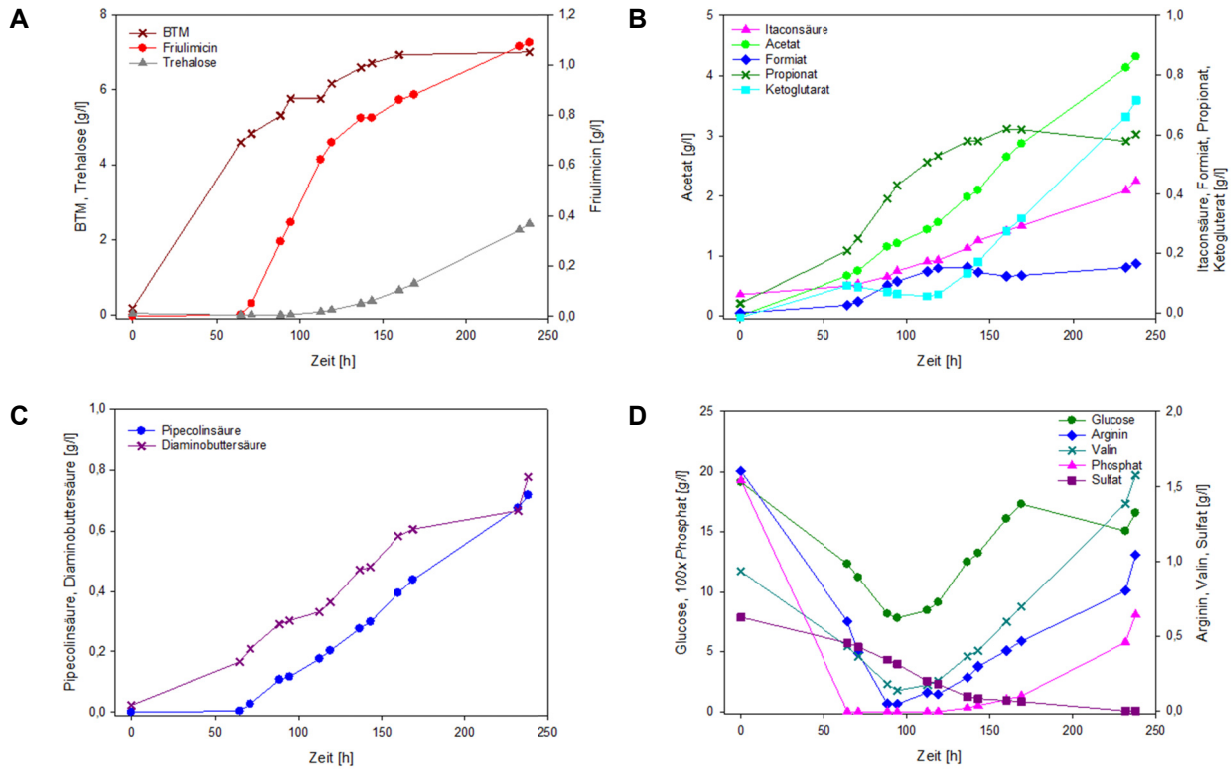


Abbildung 39: Bildung von Trehalose, Biomasse und Friulimicin (A), ungewöhnlichen Aminosäuren (B), organischen Säuren (C) und Verlauf von Substraten (D) während einer Fed-Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* zur Produktion von Friulimicin im chemisch definierten Nährmedium. Die Analytik der Kultivierungsproben erfolgte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse, über AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen).

Für die Nebenprodukte Acetat (Abbildung 39 C) und Ammonium (Abbildung 19, Abbildung 22) wurde nachträglich eine Referenzanalytik durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.8). Durch die Referenzanalytik konnten zum einen die qualitative Bildung der Nebenprodukte, zum anderen auch die quantitativen Konzentrationsverläufe bestätigt werden (Abbildung 40). Bei beiden Komponenten zeigten sich allerdings, vor allem zu späteren Kultivierungszeitpunkten, größere Abweichungen der Konzentrationen zwischen AquaSpec-MIR-Analytik und Referenzanalytik.

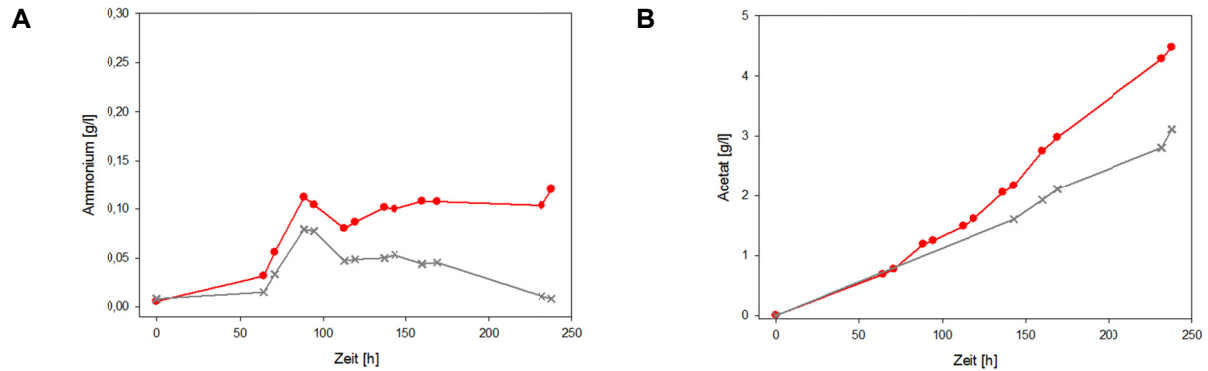


Abbildung 40: Vergleich der Verläufe für Ammonium und Acetat während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Rotes Kreissymbol: AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen), graues Kreuzsymbol: Referenzanalytik.

4.5. Stoffwechselmodell für die Biosynthese von Friulimicin in *A. friuliensis*

Stoffflussmodelle können das biologische Potential der Zellen wie die maximale Wachstumsrate und die maximalen theoretischen Ausbeuten sowie den Einfluss von Umweltveränderungen oder genetischen Modifikationen auf die Stoffflüsse beispielsweise in Antibiotikabiosynthesewegen zeigen. Daraus lassen sich Strategien für die Nährmedien- und Prozessentwicklung sowie für zielgerichtete genetische Modifikationen ableiten, die zu einem effizienteren Produktionsprozess führen.

Grundlage für die Stoffflussanalysen in *A. friuliensis* war die Erstellung eines Stoffwechselmodells. Die Modellbildung für *A. friuliensis* wurde von Insilico Biotechnology (Stuttgart) durchgeführt und basiert auf den Genomdaten von *A. friuliensis* (Cebitec, Bielefeld). Für die Erstellung des Modells wurde eine automatisierte Datenverarbeitungspipeline (Insilico Biotechnology, Stuttgart) verwendet, die auf eine Datenbank von Reaktionsgleichungen zurückgreift und Gerüstbausteine für die Modellbildung liefert. Um die bei der automatisierten Erstellung nicht geschlossenen Lücken im Reaktionsnetzwerk aufzufinden, wurde unter Zuhilfenahme des Genoms von *A. friuliensis* versucht, diese Lücken durch plausible Annahmen zu schließen. Dabei dienten die bereits bestehenden Stoffwechselmodelle von *Streptomyces* und *Corynebacterium* als Hilfestellung. Der Biosyntheseweg von Friulimicin wurde basierend auf den Untersuchungen des Friulimicinbiosyntheseclusters (Müller et al., 2007) gebildet. Das gesamte Reaktionsnetzwerk zur Beschreibung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* berücksichtigt 458 Reaktionen und Transportschritte, 322 Metabolite sowie 359 Gene und beschreibt die wichtigsten Stoffwechselwege wie die Glykolyse, den Pentosephosphatweg, den Citratzyklus, den Glyoxylatzyklus, anaplerotische Reaktionen und die Nukleotid- und Aminosäure-Biosynthese. Für die Durchführung

von Stoffflussanalysen wurden experimentelle Daten aus fünf verschiedenen Kultivierungen mit *A. friuliensis* verwendet. Dabei wurden nur extrazelluläre Substrate und Produkte sowie Zugaben über Zufütterungen berücksichtigt. Intrazelluläre Metabolite wurden bei diesen Analysen nicht berücksichtigt.

Zur Beschreibung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* über das Stoffwechselmodell wurde der Produktionsprozess in sechs verschiedene Phasen eingeteilt. Die Beschreibungen von drei Fed-Batch-Prozessen durch das Modell im Vergleich zu experimentellen Daten sind im Anhang (Kapitel 7.4) gezeigt. Die Komponenten, die in diesem Modell hauptsächlich die Kohlenstoffbilanz beeinflussten, waren Glucose, CO₂ und die Biomasse sowie zu einem kleinen Anteil die Aminosäure Arginin. Eine Verbesserung der Kohlenstoffbilanz konnte durch die Einbeziehung der mengenmäßig relevanten Nebenprodukte Acetat und Trehalose aus der AquaSpec-MIR-Analytik (Abbildung 39) erreicht werden. Da die Konzentrationsangaben aus der AquaSpec-MIR-Analytik für diese Nebenprodukte fehlerbehaftet waren, wurden diese über einen Korrekturfaktor, der über die Referenzanalytik von Acetat (Kapitel 3.3.8) abgeschätzt wurde, korrigiert. Die Stickstoffbilanz wurde im für *A. friuliensis* aufgestellten Modell hauptsächlich durch Arginin und die Biomasse beeinflusst. Der Precursor Valin und das Nebenprodukt Ammonium trugen nur untergeordnet zur Stickstoffbilanz bei und konnten durch das Modell nicht ausreichend beschrieben werden. Die Nährmedienkomponente Phosphat wurde durch das Modell ebenfalls nur unzureichend beschrieben. Zudem konnte die Komponente Sulfat nicht berücksichtigt werden, da die Zugabe von Sulfat in Form von H₂SO₄ zur pH-Wert-Regelung nicht in das Modell mit einbezogen wurde.

4.5.1. Maximale Biomasse- und Friulimicinausbeute

Über das Stoffwechselmodell wurden die maximalen theoretischen Ausbeuten Y_{\max} für die Biomasse und für Friulimicin abgeschätzt. Bezogen auf das Substrat Glucose wurde für die Biomasse sowie für Friulimicin eine maximale theoretische spezifische Ausbeute von je 0,64 g/g errechnet (Insilico Biotechnology, Stuttgart). Die Gegenüberstellung der Biomasse- und Friulimicinausbeute zeigte, dass geringere Biomasseausbeuten mit einer höheren Friulimicinausbeute verbunden sind (Abbildung 41).

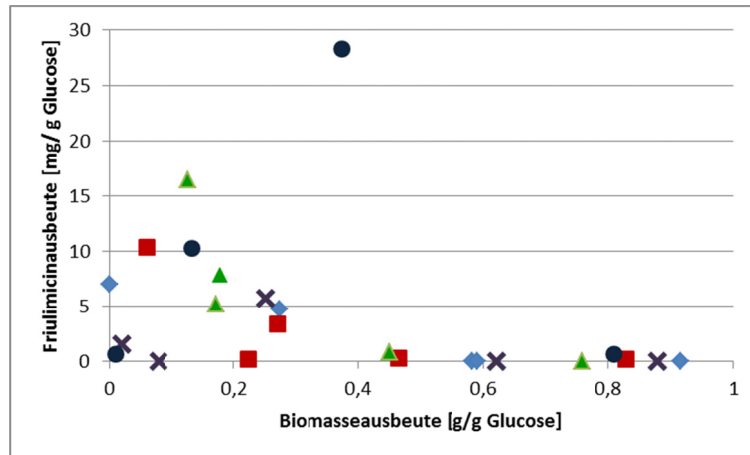


Abbildung 41: Gegenüberstellung der Biomasse- und Friulimicinausbeuten in Bezug auf die Hauptkohlenstoffquelle Glucose verschiedener Kultivierungen von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Gleiche Symbole kennzeichnen die jeweiligen Zusammenhänge der Ausbeuten aus einer Kultivierung. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart.

Durch das Stoffwechselmodell wurden nicht nur die maximalen Ausbeuten abgeschätzt, sondern auch die Wachstums- und Produktbildungsrate berechnet. Bei der Gegenüberstellung der Wachstumsrate und der spezifischen Friulimicinproduktivität verschiedener Kultivierungen von *A. friuliensis* konnte der Zusammenhang zwischen der Friulimicinbiosynthese und der Wachstumsrate verdeutlicht werden (Abbildung 42). Bei geringen Wachstumsraten von *A. friuliensis* konnten höhere spezifische Produktivitäten erzielt werden, die bereits mit leicht zunehmender Wachstumsrate stark abnahmen.

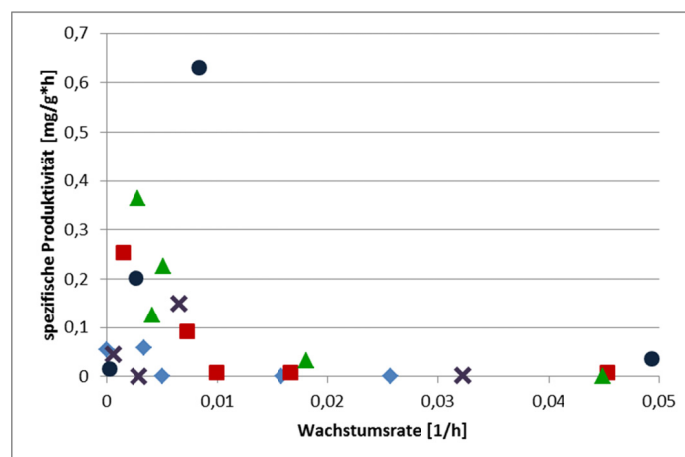


Abbildung 42: Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von Friulimicin von der Wachstumsrate in verschiedenen Kultivierungen von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Gleiche Symbole geben die Produktivitäten aus einer Kultivierung bei verschiedenen Wachstumsraten an. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart.

4.5.2. Energieeffizienz und Erhaltungsstoffwechsel

Der Energiebedarf einer Zelle wird meistens in Form des ATP (Adenosintriphosphat)-Verbrauchs ausgedrückt und setzt sich aus drei Teilen zusammen (Naeimpoor et al., 2000). Einen Teil der Energie verwendet die Zelle für die Biosynthese von Vorläufersubstanzen, aus denen Makromoleküle für das Zellwachstum hergestellt werden. Ein zweiter Teil wird für die Bildung und Exkretion von wachstumsunabhängigen Produkten benötigt und ein dritter Teil der Energie fließt in den Erhaltungsstoffwechsel (Maintenance) der Zelle. Der Erhaltungsstoffwechsel dient zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Anpassung der Stoffwechselvorgänge an veränderte Umweltbedingungen.

Um die Energieeffizienz von *A. friuliensis* auszudrücken, wurde ein Erhaltungswert definiert. Dieser Erhaltungswert wurde über die Differenz zwischen der ATP-Bildung und des ATP-Verbrauchs bei der Umsetzung der bilanzierten Stoffwechselprodukte errechnet. Ein kleiner Erhaltungswert bedeutet dabei eine hohe Stoffwechseleffizienz, wohingegen ein großer Erhaltungswert auf einen hohen Energieverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel hinweist. Um den Anteil des Erhaltungsstoffwechsels am Energieverbrauch der Zelle unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde dieser Wert gegen die Wachstumsrate aufgezeichnet (Abbildung 43). Bei hohen Wachstumsraten, die mit einer frühen Prozessphase verbunden waren, war der Energieverbrauch von *A. friuliensis* durch den Erhaltungsstoffwechsel mit etwa 1-2 mmol ATP/ g BTM vernachlässigbar klein. Demgegenüber war der Erhaltungsstoffwechsel in späteren Prozessphasen mit geringeren Wachstumsraten größer. Der Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis* lag hier bei 2-3 mmol ATP/ g BTM.

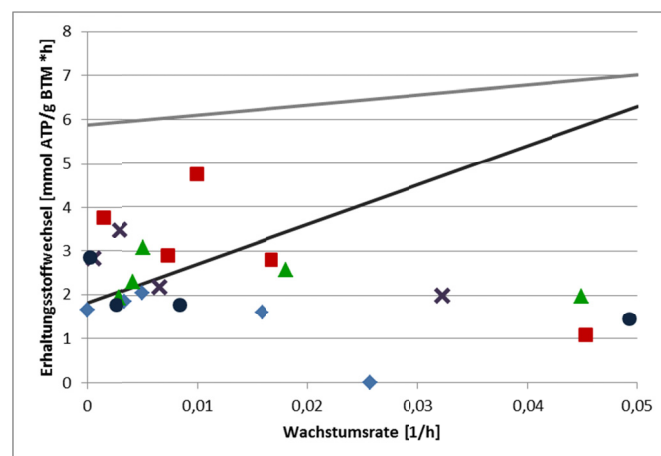


Abbildung 43: Vergleich der Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis*, *E. coli* und *C. glutamicum* bei verschiedenen Wachstumsraten. Die unterschiedlichen Symbole zeigen den Erhaltungsstoffwechsel verschiedener Kultivierungen von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Die Geraden geben die Änderung des Erhaltungsstoffwechsels mit der Wachstumsrate für *E. coli* (hellgrau) und *C. glutamicum* (dunkelgrau) an. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart.

5. Diskussion

Die Prozessentwicklung für die Antibiotikaproduktion in Aktinomyzeten stellt aufgrund des komplexen Regulationsmechanismus und des myzelartigen Wachstums dieser Mikroorganismen eine große Herausforderung dar. Um reproduzierbare Kultivierungsbedingungen für *A. friuliensis* zu schaffen, mussten Standardprotokolle entwickelt werden, die bereits bei der Vorkulturherstellung beginnen und ein möglichst homogenes Wachstum ermöglichen. Im Produktionsprozess zur Friulimicinbiosynthese spielte außerdem die Zusammensetzung des Nährmediums eine wichtige Rolle, da einzelne Nährmedienbestandteile zum einen stark in den Regulationsmechanismus der Friulimicinbiosynthese eingriffen, zum anderen die Ausbildung unterschiedlicher Strukturvarianten von Friulimicin bedingten. Bei der Entwicklung von Prozessführungsstrategien zur Produktion von Friulimicin zeigten sich zur Steigerung der Produktivität Zufütterungsstrategien für kritische Substrate sowie Perfusionsprozesse Erfolg versprechend. Die Erweiterung der Prozessanalytik und die Zuhilfenahme von Stoffwechselmodellen konnten die Prozessentwicklung unterstützen.

5.1. Definierte Kultivierungsbedingungen zur Untersuchung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis*

Die Batch-to-Batch-Variationen, die häufig in Kultivierungen mit myzelartig wachsenden Mikroorganismen wie *A. friuliensis* zu beobachten sind, erschweren die Entwicklung von Produktionsprozessen. Diese Variationen entstehen in diesen Mikroorganismen vor allem durch die Bildung von Myzelpellets. Unter üblichen Anzuchtbedingungen im Schüttelkolben bildete *A. friuliensis* unterschiedlich große, teilweise ringförmige Pellets (Abbildung 6). Die Bildung solcher Pellets wurde auch für *Streptomyces lividans* in späteren Phasen von Kultivierungen beschrieben (Manteca et al., 2008). Bei der Untersuchung dieser Pellets durch Querschnitte und mikroskopische Betrachtung konnten zwei Zonen identifiziert werden. Eine interne Zone, in der Zellyse aufgrund von Nährstofflimitation auftrat, die durch Diffusionslimitierungen ausgelöst wurde sowie eine äußere Zone, die aktives Zellmaterial aufwies, in dem wahrscheinlich Zellwachstum und Antibiotikaproduktion stattfanden. Diese Inhomogenität innerhalb der Myzelpellets erschwert die Untersuchung der Antibiotikabiosynthese (Sarrà et al., 1999, Sarrà et al., 1998). Zusätzlich zu dieser Inhomogenität wird durch die unterschiedlich großen Myzelpellets auch der definierte Transfer bei der Inokulation von Vorkulturen und Bioreaktoren erschwert.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Ansätze zur Homogenisierung der Myzelpellets von *A. friuliensis* in Kulturkolben untersucht. Dabei wurde der

Einsatz von Spiralfedern und Glasperlen sowie der Zusatz von Talkpartikeln zum Nährmedium, die bereits bei anderen myzelartig wachsenden Mikroorganismen zu homogeneren Wachstumsbedingungen führten, getestet (Kaup et al., 2008, van Wezel et al., 2006, Hobbs, 1989). Bei diesen Ansätzen konnte ein homogeneres Wachstumsverhalten von *A. friuliensis* erzielt werden (Tabelle 9). Eine weitere Methode, die zur Anzucht von *A. friuliensis* untersucht wurde und für diesen Zweck bisher nicht beschrieben wurde, war die Anzucht in Kulturkolben, die über einen Magnetrührer gerührt wurden. Bei dieser Methode konnte, neben einer ausreichenden Biomassekonzentration, der beste Homogenisierungsgrad des Myzels von *A. friuliensis* erreicht werden. Diese Methode wurde deshalb zur Herstellung der Vorkulturen von *A. friuliensis* verwendet. Neben physikalischen Methoden zur Reduzierung der Myzelpelletgröße in Submerskultur gelang dies auch auf genetischem Weg bei *Streptomyces coelicolor* (van Wezel et al., 2006). Die Überexpression des SsgA-Proteins, welches die Septenbildung in den Myzelhyphen stimuliert, führte durch eine verbesserte Wachstumsrate und eine reduzierte lag-Phase zur Reduzierung der Pelletgröße.

Neben einem homogenen Wachstum ist auch die Aktivität der Zellen der Vorkultur wichtig für den späteren Kultivierungsprozess (Stanbury et al., 1984). Untersuchungen der Vorkulturführung von *Streptomyces clavuligerus* für die Clavulansäure-Produktion zeigten, dass die Aktivität der Vorkultur einen starken Einfluss auf den späteren Kultivierungsverlauf hatte (Neves et al., 2001). Kultivierungsprozesse, die mit Zellen aus der späten exponentiellen Phase inokuliert wurden zeigten in diesen Untersuchungen im Vergleich zu Prozessen, die mit Zellen aus der stationären Phase inokuliert wurden, eine kürzere lag-Phase sowie eine frühere Umstellung auf die Antibiotikaproduktionsphase. Zudem war die Reproduzierbarkeit der Kultivierungsprozesse mit den Vorkulturen aus der exponentiellen Phase verbessert. Die Zellen der Vorkultur sollten sich daher in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, um die Anpassungsphase (lag-Phase) beim Transfer in den Bioreaktor zu verkürzen. Diese Empfehlung wurde auch bei der Anpassung der Bedingungen für die Vorkultur 1 und 2 von *A. friuliensis* berücksichtigt. Die Kultivierungszeiten der Vorkultur 2 wurden so angepasst, dass sich die Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase, in der ausreichend Biomasse verfügbar war und keine Sauerstofflimitation vorlag (vgl. Kapitel 4.1.3), befanden. Um eine Umstellung der Vorkultur 2 auf den Sekundärmetabolismus zu verhindern, wurde zudem das Vorkulturnährmedium (Tabelle 10) so ausgelegt, dass keine Nährstofflimitation vorlag. Die Kultivierungszeiten der Vorkultur 1 wurden ebenfalls angepasst. Allerdings wurde die Kultur trotz der Sauerstofflimitation nach etwa 60 h (Abbildung 12) weitergeführt, um eine höhere Biomassekonzentration zur Inokulation der Vorkultur 2 zu erhalten.

Nach den Anpassungen und Standardisierungen der Vorkulturherstellung wurde die Reproduzierbarkeit der Vorkulturen bestimmt. Die Standardabweichung der Biotrockenmassekonzentrationen von Vorkultur 1 betrug 0,5 g/l, die von Vorkultur 2 war mit 0,2 g/l etwas geringer (Abbildung 14). Diese höheren Variationen der Vorkultur 1 liegen möglicherweise an einer Unterversorgung mit Sauerstoff nach etwa 60 h in den gerührten Vorkulturgefäßen (Abbildung 12). Ein Grund für die relativ hohen Variationen beider Vorkulturen könnte die Inokulation der Vorkultur 1 mit Myzel aus Kryokulturen (vgl. Kapitel 3.2.2) sein, da der Transfer von Myzelien in definierter Menge schwer zu standardisieren war. Um die Reproduzierbarkeit der Vorkulturen weiter zu verbessern, wäre möglicherweise eine Inokulation des Vorkulturmediums mit Sporen anstelle von Myzel sinnvoll. In vielen Untersuchungen mit Aktinomyzeten ist die Inokulation über Sporen mit Titern von 10^6 bis 10^9 Sporen/ml beschrieben (Hobbs et al., 1990, Neves et al., 2001, Wentzel et al., 2012). Für *A. friuliensis* ist die Bildung von begeißelten Sporen ebenfalls beschrieben (Aretz et al., 2000). In Wachstumsversuchen mit *A. friuliensis* auf Celluloseacetatfiltern und nährstoffarmen, huminsäurehaltigen Festmedien konnten die Sporen von *A. friuliensis* bereits isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Die Ausbeuten waren aber bisher zu gering, um daraus Kulturen im größeren Maßstab inokulieren zu können.

Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit von Kultivierungen mit *A. friuliensis* wurden zum einem die oben beschriebenen Maßnahmen zur Verbesserung der Vorkulturführung getroffen, zum anderen wurde ein chemisch definiertes Nährmedium verwendet und weiterentwickelt, auf das im nächsten Kapitel näher eingegangen wird. Diese Maßnahmen ermöglichten aussagekräftige Ergebnisse aus Kultivierungen zur Charakterisierung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis*. Der Vergleich der zeitlichen Verläufe der Biomasse- und Friulimicinkonzentrationen sowie des für die Friulimicinbiosynthese kritischen Substrates Phosphat zeigte dennoch eine erhebliche Variabilität zwischen den einzelnen Kultivierungen (Abbildung 15). Am größten war die Variabilität bei den Friulimicinbildungsraten. Die Ursache dafür war vermutlich die komplexe Regulation der Friulimicinbiosynthese, die sich aus einer Kombination an übergeordneten und biosynthesewegspezifischen Regulationsmechanismen zusammensetzt und in ihrer Gesamtheit bisher noch nicht analysiert wurde (vgl. Kapitel 2.2.5). Beim Vergleich der Batch-to-Batch-Variationen zwischen den verschiedenen Kultivierungsmaßstäben konnten ebenfalls Unterschiede festgestellt werden. Im 1,5-l-Maßstab waren die Variationen größer als im 3- und 4-l-Maßstab (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache dafür könnte das Probenahmenvolumen von etwa 25 ml pro Probenahme sein. Im kleineren Maßstab hatte das Probenahmenvolumen stärkere Auswirkungen auf das Prozessgeschehen als im größeren Maßstab, da die Probenahme bei kleineren

Kultivierungsmaßstäben zu einer verhältnismäßig stärkeren Reduzierung des Kulturvolumens führte. Bei Fed-Batch-Prozessen im 1,5-l-Maßstab waren die niedrigeren Dosieraten zudem nur durch eine absatzweise Dosierung realisierbar (vgl. Kapitel 3.2.5), während im 3- und 4-l-Maßstab eine kontinuierliche Dosierung der Feedlösungen umgesetzt werden konnte, die eine gleichmäßige Zufütterung ermöglichte. Dies könnte möglicherweise eine weitere Ursache für die schlechtere Reproduzierbarkeit im kleineren Maßstab sein.

5.2. Wachstum und Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium

Neben den im vorherigen Kapitel beschriebenen Anpassungen der Wachstumsbedingungen der Vorkulturen trägt auch die Verwendung eines passenden Nährmediums maßgeblich zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit von Prozessen bei. In diesem Zusammenhang haben vor allem chemisch definierte Nährmedien Vorteile gegenüber komplexen Nährmedien (Zhang et al., 1999). Für die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* wurde bereits ein chemisch definiertes Nährmedium entwickelt (Wagner, 2009). Dieses Nährmedium wurde in der vorliegenden Arbeit weiter an die Bedürfnisse von *A. friuliensis* angepasst (Tabelle 10).

Um das angepasste definierte Nährmedium mit dem Ausgangsnährmedium von Wagner (2009) zu vergleichen, wurden die erreichten Biomassekonzentrationen bezogen auf das erste limitierte Substrat Phosphat gegenübergestellt. In der Arbeit von Wagner (2009) wurden mit 0,07 g/l Dikaliumhydrogenphosphat Biomassekonzentrationen von fast 5 g/l erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden mit der dreifachen Konzentration an Dikaliumhydrogenphosphat (0,21 g/l) Biomassekonzentrationen von nur 2 g/l erreicht. Diese Diskrepanz beruht vermutlich auf den unterschiedlichen Verfahren zur Bestimmung der Biotrockenmasse. In der Arbeit von Wagner (2009) wurde die Biotrockenmasse bestimmt, indem ein definiertes Volumen an Kulturmedium in einem Zentrifugenröhrchen zentrifugiert wurde und das Zellpellet nach Entfernen des Überstands getrocknet wurde. Bei dieser Methode werden neben der Biomasse auch Nährmedienbestandteile mitbestimmt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration nach Aufsaugen des Myzels auf einen Filter und anschließender Entfernung der Nährmedienbestandteile mit Wasser (vgl. Kapitel 3.3.2). Vergleiche der Biotrockenmassekonzentrationen von Wagner (2009) mit denen in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Konzentrationen lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Analyseverfahren daher nur schwer herstellen.

Beim Vergleich der Friulimicin-B-Konzentrationen aus der Arbeit von Wagner (2009) mit denen aus der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Widersprüchlichkeit der Ergebnisse festgestellt. Nach Wagner (2009) wurden im chemisch definierten Nährmedium Friulimicin-B-Konzentrationen von etwa 1 g/l erreicht. Diese Konzentrationen liegen etwa 5-fach über den Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit im gleichen Nährmedium ermittelt wurden. Vermutlich wurde in der Arbeit von Wagner (2009) die Summe der Masse aller Friulimicintypen (Abbildung 2) erfasst, da hier andere Parameter, die eine geringere Auflösung der einzelnen Friulimicintypen ermöglichten, zur Auftrennung der Friulimicine über HPLC verwendet wurden. Dieser Massenunterschied entspricht auch in etwa dem, der bei der Bestimmung der Friulimicinkonzentration mit der AquaSpec-MIR-Analytik (microbiology, Esslingen) festgestellt wurde (Abbildung 38). Bei der AquaSpec-MIR-Analytik wurden vermutlich auch alle Friulimicintypen gleichzeitig erfasst.

Zusätzlich zum Vergleich mit dem definierten Nährmedium von Wagner (2009) wurde ein Vergleich des in der vorliegenden Arbeit angepassten definierten Nährmediums mit dem komplexen Nährmedium von Aretz et al. (2000) gezogen. Dieses komplexe Nährmedium diente als Ausgangsnährmedium zur Entwicklung des chemisch definierten Nährmediums (Wagner, 2009). Im angepassten chemisch definierten Nährmedium war die Friulimicinausbeute nur halb so groß wie im komplexen Nährmedium (vgl. Kapitel 4.1.4). Auch die Biomasseausbeute, in Bezug auf das wachstumslimitierende Substrat Phosphat, war im angepassten chemisch definierten Nährmedium um etwa ein Drittel geringer. Mit definierten Nährmedien werden häufig geringere Ausbeuten erreicht (Zhang et al., 1999). Sie enthalten einfach aufgebaute chemische Verbindungen, aus denen die Mikroorganismen ihre Zellbausteine selbst synthetisieren müssen. In komplexen Nährmedien hingegen sind diese Bausteine wie Aminosäuren oder Vitamine bereits in fertiger Form vorhanden. Diese Bausteine können den chemisch definierten Nährmedien zwar zugefügt werden, machen deren Herstellung aber aufwendig und teuer. Aus Gründen der besseren Reproduzierbarkeit und Eigenschaften beim Aufreinigungsprozess werden die Ausbeuteverluste in definierten Nährmedien aber häufig toleriert. Vor allem für weitere Untersuchungen durch Transkriptions-, Proteom- oder Metabolomanalysen sind diese Nährmedien eine Voraussetzung. Für diese Analysen sind ausreichend hohe Biomassekonzentrationen von mindestens 4 g/l notwendig (Wentzel et al., 2012). Diese Bedingung ist mit dem entwickelten definierten Nährmedium erfüllt. Daher ist die Voraussetzung für eine erweiterte Charakterisierung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* geschaffen.

Der Einfluss einzelner Nährmedienbestandteile wie der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, der Mineralsalze, der Spurenelement- und Vitaminlösung sowie der Precursorsubstanzen auf die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* wurde in

Kultivierungen im Schüttelkolben und im Bioreaktor mit dem chemisch definierten Nährmedium (Tabelle 10) näher untersucht.

Spurenelemente und Vitamine

Die Erhöhung der Spurenelementlösung im Nährmedium von 2 auf 20 % führte zu einer deutlichen Reduzierung des Wachstums und der Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* (Abbildung 8). Eine mögliche Erklärung für die Reduzierung der Friulimicinbiosynthese bei hohen Spurenelementkonzentrationen könnte die Eisenkonzentration in dieser Lösung sein. In Kultivierungen zur Produktion von Actinorhodin mit *Streptomyces coelicolor* führte die Erhöhung der Konzentration einer Spurenelementlösung zu einer verbesserten Actinorhodinproduktion (Wentzel et al., 2012). In dieser Spurenelementlösung war Eisen als Hauptkomponente vertreten. Eine weitere Konzentrationserhöhung dieser Spurenelementlösung, die zu Eisenkonzentrationen über 104 μM führte, reduzierte hingegen die Actinorhodinproduktion. Die maximale Biomassekonzentration wurde durch die Spurenelementlösung nicht beeinflusst. Ein Erklärungsmodell für die Regulation Actinorhodinproduktion durch Eisen wurde allerdings bisher nicht gefunden. In der zur Kultivierung von *A. friuliensis* verwendeten Spurenelementlösung ist ebenfalls Eisen als Hauptkomponente vertreten. Die Endkonzentration im Nährmedium liegt im Standardnährmedium bei 15 μM . In Kultivierungen von *A. friuliensis*, bei denen der Anteil der Spurenelementlösung auf 20 % erhöht wurde, lag die Eisenkonzentration mit 150 μM über dem Bereich der für die Actinorhodinproduktion beschriebenen optimalen Konzentration. Möglicherweise inhibierte diese erhöhte Eisenkonzentration auch die Friulimicinproduktion.

Neben der Spurenelementlösung hatte auch die Vitaminlösung im chemisch definierten Nährmedium einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Friulimicinbildung von *A. friuliensis*. Ohne Zusatz der Vitaminlösung war die Biomassekonzentration deutlich reduziert und keine Friulimicinbildung nachweisbar (Abbildung 9). Bei Wachstumsversuchen mit einer alternativen Vitaminlösung aus einem Vollmedium nach Hopwood (1967) war die Biomassekonzentration deutlich geringer (Daten nicht gezeigt). Diese Vitaminlösung enthielt bis auf Ca-Pantothenat alle Vitamine, die auch in der Vitaminlösung des chemisch definierten Nährmediums (Gonzalez et al., 2003) verwendet wurde (Tabelle 10). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ca-Pantothenat ein wichtiges Vitamin für *A. friuliensis* ist. Ca-Pantothenat spielt unter anderem bei der nichtribosomalen Peptidsynthese (NRPS) in Form des Phosphopantethein-Arms der Thiolierungsdomäne (T-Domäne) eine große Rolle (vgl. Kapitel 2.2.3). Dadurch ist möglicherweise die verbesserte Friulimicinbiosynthese bei Zugabe der Vitaminlösung zu erklären.

Phosphat

Mit dem chemisch definierten Nährmedium konnte unter anderem auch der Einfluss von Phosphat auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* untersucht werden. Phosphat zeigte sich als ein wichtiges Substrat in Bezug auf die Regulation der Friulimicinbiosynthese. In verschiedenen Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* mit der Limitation von Phosphat im Nährmedium beginnt (Abbildung 16). Dieser Zusammenhang wurde bereits für zahlreiche Antibiotikabiosynthesen in Aktinomyzeten beschrieben (Gunnarsson et al., 2003, Young et al., 1985, Maiti et al., 2010). Die Dauer der Umstellungsphase sowie die genaue Phosphatkonzentration für die Umstellung von der Wachstumsphase auf die Friulimicinbiosynthesephase waren, aufgrund der Probenahme mit größeren Zeitintervallen, nicht eindeutig festlegbar. Sarrà et al. (1999) erstellten ein Modell zur Darstellung des extra- und intrazellulären Phosphatlevels in *Streptomyces lividans* während der Antibiotikabiosynthese. Dabei postulierten sie sehr geringe Phosphatkonzentrationen, die ihrer Meinung nach nicht experimentell zu bestimmen waren.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Einflusses von Phosphat auf die Friulimicinbiosynthese konnte zudem gezeigt werden, dass die Zugabe von anorganischem Phosphat während der Friulimicinbildung in Konzentrationen von über 50 mg/l (2,4 mM) zu einem sofortigen Produktionsstopp von Friulimicin und einer weiteren Zunahme der Biomassekonzentration führte (Abbildung 17). Die Zugabe geringerer Phosphatkonzentrationen von 25 mg/l (1,2 mM) führte lediglich zu einer Reduktion der Friulimicinbiosyntheserate. Bei den Versuchen mit geringeren Phosphatkonzentrationen war ein erneuter Anstieg der Friulimicinbiosynthese zu beobachten, sobald die Phosphatzugaben wieder aufgebraucht waren. Durch die Phosphatkonzentration konnten folglich die Friulimicinbiosynthese und das Wachstum beeinflusst werden. Diese Eigenschaften konnten auch bei der Produktion von Candicidin in *Streptomyces griseus* beobachtet werden (Liu et al., 1975). Die Zugabe von 5 mM Phosphat während der Antibiotikabiosynthesephase führte ebenfalls zu einer sofortigen Inhibierung der Candicidinbiosynthese. Zusätzlich zur Inhibition der Candicidinbiosynthese wurde ein Anstieg der Sauerstoffaufnahme beobachtet, der von einer Zunahme der Biotrockenmassekonzentration gefolgt wurde. Diese Umstellung von Sekundär- auf Primärmetabolismus konnte zu allen Zeitpunkten während der Candicidinproduktion initiiert werden. Die Biosynthese von Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* wurde erst ab einer Phosphatkonzentration von 24 mM total inhibiert (Hobbs et al., 1990). Neben der Inhibierung durch anorganisches Phosphat wurde auch die Inhibierung der Antibiotikabiosynthese durch die Zugabe von organischem Phosphat beschrieben. Die Zugabe von

Phosphat in Form von GMP (Guanosin-5'-monophosphat) zu einer phosphatlimitierten Kultur inhibierte die Candicidinproduktion (Ates et al., 1997).

Eine weitere Beobachtung, die während Kultivierungen von *A. friuliensis* in Zusammenhang mit Phosphat gemacht wurde, ist eine weitere Zunahme der Biomassekonzentration auch einige Zeit nachdem kein Phosphat mehr im Nährmedium nachweisbar war (Abbildung 27). Dieser Effekt ist bereits für viele Aktinomyzeten beschrieben worden (Voelker et al., 2001, Hege-Treskatis, 1993). Eine Erklärung für diesen Effekt sind intrazelluläre Speicherstoffe wie beispielsweise Polyphosphate, die während der Wachstumsphase, in der überschüssiges Phosphat vorhanden ist, in Massenanteilen von 0,1 – 20 % der Biotrockenmasse gespeichert werden (Kulaev, 1979). Unter Phosphatlimitation im Nährmedium könnte dieses intrazelluläre Phosphat für weiteres Zellwachstum verwendet werden. Ob diese intrazellulären Phosphatmengen inhibitorisch auf die Biosynthese von Antibiotika wirken, ist bisher nicht eindeutig geklärt (Sarrà et al., 1998). Untersuchungen der Balhimycinproduktion in *Amycolatopsis balhimycina* zeigten allerdings, dass diese auch dann noch inhibiert wurde, wenn das extrazelluläre Phosphat im Nährmedium bereits aufgebraucht war (Maiti et al., 2010). Hier wurde vermutet, dass Phosphat sehr schnell von den Zellen aufgenommen und intrazellulär gespeichert wurde. Das intrazelluläre Phosphat wurde erst durch weitere Zunahme der Biomassekonzentration bis zur stationären Phase aufgebraucht, bevor die Balhimycinbiosynthese begann. In Kultivierungen mit *A. friuliensis* konnte nach Phosphatlimitation zwar weiteres Wachstum mit einer verringerten spezifischen Wachstumsrate beobachtet werden, die Friulimicinproduktion begann jedoch unmittelbar mit der Phosphatlimitation im Nährmedium (Abbildung 27). Entweder sind die Mengen an intrazellulär gespeichertem Phosphat in *A. friuliensis* nicht so groß, oder die Friulimicinbiosynthese ist weniger sensitiv in Bezug auf intrazelluläres Phosphat.

Der Zusammenhang zwischen Antibiotikabildung und Phosphatlimitation wurde in einigen Aktinomyzeten näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Aktinomyzeten die Limitation von Phosphat häufig über das Zweikomponentensystem PhoR-PhoP (Kapitel 2.2.5) vermittelt wird (Gallo et al., 2010, Martín, 2004). Dieses System wirkt wahrscheinlich als übergeordneter Regulator auf die Regulatoren der Antibiotikabiosynthese. Im Genom von *A. friuliensis* wurden Gene gefunden, die homolog zu den Genen *phoABDPR* eines solchen PhoR-PhoP-Zweikomponentensystems sind (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf einen ähnlichen Regulationsmechanismus der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* bei Phosphatlimitation hin.

Neben der Regulation der Antibiotikabiosynthese durch Phosphat sind auch andere Nährmedienbestandteile bekannt, die regulatorisch auf die Antibiotikabiosynthese

wirken (vgl. Kapitel 2.2.5). Da der Nährmedienbestandteil Stickstoff in diesem Zusammenhang häufig beschrieben wird (Giudici et al., 2004, Doull et al., 1990), wurde der Einfluss von Stickstofflimitation auf die Friulimicinbiosynthese untersucht. In Kultivierungen unter Stickstofflimitation war allerdings keine Friulimicinbiosynthese feststellbar (Abbildung 18). Einige Aktinomyzeten bilden jedoch abhängig von den Umweltbedingungen verschiedene Antibiotikatyphen. *Streptomyces tendae* bildet beispielsweise unter Phosphatlimitation verstärkt Nikkomycine und unter Stickstoff- und Phosphatlimitation überwiegend Juglomycine (Hege-Treskatis, 1993). Daher wurde eine bioinformatische Untersuchung der Genomsequenz von *A. friuliensis* (Cebitec, Bielefeld) auf weitere Antibiotikacluster durchgeführt. Dafür wurde das Tool antiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell, Medema et al., 2011) verwendet, das anhand von Sequenzdaten Sekundärmetabolitcluster identifizieren kann. Mit diesem Tool konnten, neben dem bekannten Friulimicinbiosynthesecluster, vier weitere NRPS-Cluster und zwei Cluster vom PKS-Typ I und II sowie ein Cluster für Lantibiotika identifiziert werden. Das Produktbildungsverhalten von *A. friuliensis* unter stickstofflimitierten Bedingungen wurde in Agardiffusionstests mit den Testkeimen *Bacillus subtilis* als gram-positive Vertreter, *Escherichia coli* als gram-negativer Vertreter und *Saccharomyces cerevisiae* näher untersucht. Es konnten aber keine Hemmhöfe durch zusätzlich gebildete Antibiotika identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Agardiffusionstests von Proben aus phosphatlimitierten Kulturen wurden nicht durchgeführt. Transkriptomdaten (Cebitec, Bielefeld) weisen jedoch darauf hin, dass zumindest unter Phosphatlimitierung, die oben beschriebenen Sekundärmetabolitcluster inaktiv sind.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass unter Stickstofflimitierung weder die Biosynthese von Friulimicin, noch von anderen antibiotisch wirksamen Substanzen nachweisbar war, könnte die übergeordnete Regulation der Antibiotikabiosynthese durch Phosphat sein. Phosphat war in den Kultivierungen zur Untersuchung der Stickstofflimitation in Konzentrationen von über 0,5 g/l im Nährmedium vorhanden (Abbildung 18). Da die Stickstoffregulation häufig der Phosphatregulation untergeordnet ist (Martín et al., 2011), könnte die Biosynthese von Friulimicin und potentiellen anderen Antibiotika in der stickstofflimitierten Kultivierung durch Phosphat unterdrückt worden sein.

Kohlenstoffquellen

Weitere Substrate, die im chemisch definierten Nährmedium hinsichtlich des Wachstums und der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* untersucht wurden, waren die Kohlenhydrate Saccharose und Glucose. Kohlenhydrate werden in der Zelle sowohl als Kohlenstoff- als auch als Energielieferanten für Zellwachstum und Erhaltungsstoffwechsel verwendet und sind daher ein Haupteinflussfaktor im

Nährmedium. Beim Vergleich der beiden Kohlenhydratquellen erwies sich das Monosaccharid Glucose als deutlich besser metabolisierbarer Energie- und Kohlenstofflieferant als das Disaccharid Saccharose (Abbildung 10). Dies könnte daran liegen, dass Saccharose im Gegensatz zu Glucose vor Eintritt in den Stoffwechsel unter Energieaufwand gespalten werden muss, was zu geringeren Ausbeuten führen kann. Davon abgesehen sind in Bakterien zwei verschiedene Stoffwechselwege für den Saccharoseabbau bekannt (Reid et al., 2005). Beim ersten Weg, der hauptsächlich in gram-negativen Bakterien vorkommt, wird Saccharose beim Transport in die Zelle über ein Phosphotransferasesystem (PTS) phosphoryliert und anschließend zu Fructose und Glucose-6-phosphat hydrolysiert. Glucose-6-phosphat kann sofort der Glykolyse zugeführt werden, wohingegen Fructose erst noch über eine Fructosekinase phosphoryliert werden muss. Das dabei entstehende Fructose-6-phosphat ist ein Zwischenprodukt der Glykolyse. Beim zweiten Weg wird Saccharose zunächst über eine Permease unverändert in die Zelle transportiert. In der Zelle wird Saccharose dann über eine Saccharose-Phosphorylase in Fructose und Glucose-1-phosphat gespalten. Vor Eintritt in die Glykolyse muss Glucose-1-phosphat zunächst über eine Phosphoglucomutase in Glucose-6-phosphat und die entstandene Fructose wie beim ersten Weg noch über eine Fructosekinase phosphoryliert werden. Dieser zweite Weg ist energieaufwendiger als der erste und kann zu verringerten Ausbeuten führen (Reid et al., 2005). Im Genom von *A. friuliensis* (Cebitec, Bielefeld) konnte nur ein Gen für ein unspezifisches PTS-System (afr05960) gefunden werden. Allerdings konnte ein Gen für eine Saccharose-Permease (afr25520) gefunden werden, das Hinweise auf eine Metabolisierung von Saccharose in *A. friuliensis* über den zweiten, energieaufwendigeren Weg gibt. Dies könnte unter anderem eine Erklärung für die stark verringerten Ausbeuten beim Wachstum von *A. friuliensis* mit Saccharose sein.

Neben der Wirkung auf den Energie- und Kohlenstoffmetabolismus können Kohlenhydrate auch Einfluss auf die Antibiotikabiosynthese haben (vgl. Kapitel 2.2.5). In manchen Prozessen wie beispielsweise der Lincomycinproduktion durch *Streptomyces lincolnensis* in einem definierten Nährmedium scheinen selbst Glucosekonzentrationen von 30 g/l keinen inhibierenden Einfluss auf die Antibiotikabiosynthese zu haben (Young et al., 1985). Die Friulimicinbiosynthese wurde durch Glucose, im verwendeten Konzentrationsbereich bis 30 g/l, ebenfalls nicht merkbar beeinflusst (vgl. Kapitel 4.2.2). Daher wurde vermutlich auch keine Verbesserung der Friulimicinbiosynthese bei Verwendung der schwerer metabolisierbaren Kohlenhydratquellen Saccharose erreicht (Abbildung 19). In vielen anderen Antibiotikaproduktionsprozessen hingegen unterstützt Glucose zwar schnelles

Wachstum, hemmt aber die Antibiotikabiosynthese durch Kohlenhydrat-Katabolitregulation (Sanchez et al., 2002, Sousa et al., 2001).

Ein mögliches Vorkommen der Kohlenhydrat-Katabolitregulation (vgl. Kapitel 2.2.5) in *A. friuliensis* konnte allerdings in einem anderen Zusammenhang, nämlich bei der Verwertung von Kohlenstoffquellen, die alternativ zu Glucose verwendet wurden, gezeigt werden. In Kultivierungen mit *A. friuliensis* konnte, sobald die Glucosekonzentration im Nährmedium unter 5 g/l fiel, Ammonium im Nährmedium nachgewiesen werden (Abbildung 28). Wurde die Glucosekonzentration wieder erhöht, stagnierte die Ammoniumbildung. Während der Glucoselimitationsphase konnte neben der Ammoniumbildung außerdem eine erhöhte Aufnahmerate der Aminosäure Arginin beobachtet werden, die im definierten Nährmedium eigentlich als Stickstoffquelle diente. Eine mögliche Ursache für die Bildung von Ammonium lässt sich über den Abbau von Arginin erklären. Beim Abbau von Arginin entsteht im ersten Schritt das Nebenprodukt Harnstoff (Cunin et al., 1987). Während Kultivierungen von *A. friuliensis* konnte im Nährmedium aber kein Harnstoff nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass dieser sofort weiter zu Ammonium und Kohlenstoffdioxid abgebaut wurde. In weiteren Abbauschritten von Arginin entsteht zudem Glutamat, bei dessen Abbau zu α -Ketoglutarat nochmals Ammonium freigesetzt wird. Die Bildung von Ammonium und die erhöhten Argininaufnahmeraten sprechen dafür, dass Arginin bei Glucoselimitation von *A. friuliensis* als alternative Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Wenn Arginin als einzige Kohlenstoffquelle genutzt wird, muss vermutlich verhältnismäßig viel Arginin über den Citratzyklus abgebaut werden, um den Energiebedarf der Zelle zu decken. Da für die Bildung von stickstoffhaltigen Metaboliten wie beispielsweise Aminosäuren weniger Ammonium benötigt wird als entsteht, wird überschüssiges Ammonium ausgeschieden. Dies kann zum einen aus der Stickstoffbilanz abgeleitet werden, zum anderen wird diese Vermutung auch durch die Versuche mit Arginin und Valin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquellen unterstützt. Die Aminosäuren zeigten sich als Energiequellen in Schüttelkolbenexperimenten als eher ungeeignet für das Wachstum von *A. friuliensis* (Abbildung 20). Eine eindeutige Aussage über die Verwertbarkeit dieser Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequellen konnte allerdings aus diesen Versuchen nicht getroffen werden. Nach bisherigen Erkenntnissen müssten in diesen Versuchen wahrscheinlich hohe Konzentrationen von Ammonium freigesetzt worden sein, die den pH-Wert des Nährmediums trotz Pufferzusatz möglicherweise erhöht haben. Die Konzentration von Ammonium und der pH-Wert wurden während dieser Kultivierungen nicht bestimmt. Die Freisetzung von Ammonium durch Desaminierung von Aminosäuren wurde auch in Kultivierungen von *Streptomyces lividans* mit einem definierten Medium, das Glutamat als Stickstoffquelle enthielt, beobachtet (Sarrà et al., 1998).

Die oben beschriebenen Beobachtungen zeigen eine Unterdrückung der Verwendung von Arginin als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Glucose, was auf eine Regulation über Kohlenstoff-Katabolitregulation hinweist. Für die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus in *A. friuliensis* über Katabolitregulation spricht außerdem die erhöhte Aufnahme von Saccharose nach Glucoselimitation, die in Kultivierungen mit beiden Kohlenhydratquellen beobachtet werden konnte (Abbildung 19). Die bevorzugte Energie- und Kohlenstoffquelle für *A. friuliensis* ist nach diesen Erkenntnissen Glucose, gefolgt von Saccharose und Arginin. Bei der Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in Kultivierungen mit *Streptomyces coelicolor* konnte ebenfalls ein komplexer Zusammenhang bei der Metabolisierung von Kohlenstoffquellen hergestellt werden (Wentzel et al., 2012). Untersuchungen des Zusammenspiels zwischen den Kohlenstoffquellen Glucose und Glutamat durch Isotopenmarkierungsexperimente zeigten hier, dass Glucose während der Wachstumsphase und Glutamat während der Antibiotikabildungsphase die bevorzugten Kohlenstoffquellen sind. Ein weiteres Beispiel für eine Kohlenstoff-Katabolitregulation in Aktinomyzeten konnte von Maiti et al. (2010) für *Amycolatopsis balhimycina* gezeigt werden. Für diesen Stamm wurde ein strukturiertes kinetisches Modell entwickelt, das durch Kultivierungen mit den Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin validiert wurde. Glucose inhibierte nach diesem Modell teilweise die Aufnahme von Glycerin. Beide Substrate wurden zwar simultan verwertet, Glucose wurde aber mit deutlich höherer Rate aufgenommen als Glycerin.

Stickstoffquellen

Ein weiteres wichtiges Substrat, das Einfluss auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese hatte, war die Stickstoffquelle. Für die Eignung als Stickstoffquelle für die Friulimicinproduktion wurden die Aminosäure Arginin, die eng mit dem Argininstoffwechsel verknüpfte Stickstoffquelle Harnstoff und die anorganische Stickstoffquelle Ammonium untersucht. Alle getesteten Stickstoffquellen ermöglichten gute Biomassebildung, Friulimicin wurde jedoch nur in Kultivierungen mit Arginin gebildet (4.2.3). Diese Beobachtung konnten auch in Kultivierungen zur Produktion von Simocyclinonen mit *Streptomyces antibioticus* in einem chemisch definierten Nährmedium mit verschiedenen Stickstoffquellen gemacht werden (Theobald et al., 2000). In diesen Kultivierungen waren die Produktkonzentrationen mit Aminosäuren signifikant höher als mit Ammoniumsalzen und Harnstoff. Bei Verwendung von Arginin in Kultivierungen von *A. friuliensis* konnte die Bildung des Nebenprodukts Ammonium unter Glucoselimitation beobachtet werden (Abbildung 28 B). Dies wurde im vorherigen Abschnitt ausführlich diskutiert. In diesen Kultivierungen konnte zudem beobachtet werden, dass die Zugabe von Glucose zum glucoselimitierten Nährmedium zu einer sofortigen Abnahme des

gebildeten Ammoniums im Nährmedium führte. Die Argininaufnahmerate blieb dagegen weiterhin niedrig (Abbildung 28 D). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Ammonium in Anwesenheit von Arginin als bevorzugte Stickstoffquelle aufgenommen wird. In kontinuierlichen Kultivierungen von *Streptomyces fradiae* wirkte sich Ammonium ebenfalls positiv auf das Wachstumsverhalten aus, hatte aber gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf die Bildung des Antibiotikums Tylosin (Lee, 1997).

Eine hemmende Wirkung von Ammonium auf die Friulimicinbiosynthese konnte auch bei *A. friuliensis* beobachtet werden. In Schüttelkolbenkultivierungen mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumchlorid wurde eine Inhibierung der Friulimicinbiosynthese ab einer Ammoniumkonzentration von 0,3 g/l festgestellt (Abbildung 23). In Kultivierungen von *Streptomyces ambofaciens* zeigte ein ähnlicher Versuch, dass die Spiramycinbiosynthese durch Ammoniumkonzentrationen ab 0,9 g/l vollständig unterdrückt wurde (Lounès et al., 1995). Ebenso wurde ein negativer Effekt von Ammoniumionen auf ein Glykopeptidantibiotikum von *Actinomadura* sp. beschrieben (Technikova-Dobrova et al., 2004). In diesem Zusammenhang zeigten Lebrihi et al. (1992), dass Ammonium die Expression und Aktivität der Valindehydrogenase während der Produktion von Spiramicin in *Streptomyces ambofaciens* negativ beeinflusste. Dieses Enzym ist an der Umsetzung der verzweigtkettigen Aminosäure Valin zu iso-Butyrat beteiligt, welches als Startermolekül für die Biosynthese der verzweigtkettigen Fettsäuren dient (Beltrametti et al., 2004). Da Valin für die Synthese des Fettsäurerests von Friulimicin B (Abbildung 2) ebenfalls der Precursor ist, kann die negative Wirkung von Ammonium auf die Friulimicinbiosynthese möglicherweise auch über das Erklärungsmodell von Lebrihi et al. (1992) verstanden werden.

Die ausbleibende Produktion von Friulimicin bei Kultivierung mit Harnstoff als Stickstoffquelle kann dementsprechend auch über den inhibierenden Effekt von Ammonium auf die Friulimicinbiosynthese begründet werden. Harnstoff wird in Streptomyzeten bei Stickstoffmangel über das Enzym Urease zu Ammonium und Kohlenstoffdioxid abgebaut (Bascaraan et al., 1989). Ammonium war bei der Kultivierung von *A. friuliensis* mit Harnstoff in Konzentrationen von über 3 g/l im Nährmedium nachweisbar (vgl. Kapitel 4.2.3). Eine Friulimicinproduktion mit Ammonium oder Harnstoff könnte möglicherweise dennoch ermöglicht werden, wenn die Substrate unterhalb der hemmenden Konzentrationen zugefüttert würden. Die Inhibierungskonzentrationen von Ammonium lagen zudem bei Wachstum auf Glucose (Abbildung 23) höher als bei Wachstum auf Saccharose (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wurde Ammonium bei Wachstum auf Glucose schneller metabolisiert.

Precursorsubstanzen für die Friulimicinbiosynthese

Neben den oben genannten essentiellen Substraten für Wachstum und Friulimicinproduktion können auch Precursorsubstanzen die Friulimicinbiosynthese beeinflussen. Die Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin oder Isoleucin zum Nährmedium verschob das Biosynthesemuster der Lipopeptidantibiotika von *A. friuliensis* (Abbildung 2) sowohl im komplexen Nährmedium (Aretz et al., 2000) als auch im chemisch definierten Nährmedium (Abbildung 25). Die Zugabe von Valin führte dabei zu einer erhöhten Produktion der Friulimicin-Komponente B. Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, wurde bei der Kultivierung von *A. friuliensis* mit Aminosäuren unter Glucoselimitation Ammonium gebildet, das einen negativen Einfluss auf die Friulimicinbiosynthese hatte (Abbildung 23). Während der Kultivierungen zur Untersuchung des Einflusses der Precursoren wurde eine mögliche Ammoniumbildung nicht analysiert. Aufgrund einer ausreichend hohen Glucosekonzentration im Nährmedium wurde aber davon ausgegangen, dass die Aminosäuren nicht als Kohlenstoffquelle verwendet wurden und daher kein Ammonium gebildet wurde, welches die Ergebnisse dieser Untersuchung beeinflusst hätte.

Die Veränderung des Biosynthesemusters durch Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin wurde nicht nur für Friulimicin, sondern auch für die Produktion von Ramoplanin und Teicoplanin in *Actinoplanes sp.* beschrieben (Brunati et al., 2005, Taurino et al., 2011). Diese Antibiotika besitzen wie Friulimicin einen Fettsäurerest. Die Effekte durch die Aminosäurezugabe können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass auch die Synthese der verzweigten, ungeradkettigen Membranfettsäuren von den verzweigtkettigen Aminosäure-Precursoren ausgeht (vgl. Kapitel 4.2.4). Jovetic et al. (2008) postulierten dementsprechend eine Synthese der Fettsäurereste von Antibiotika durch beta-Oxidation von Membranfettsäuren. Auch Park et al. (2009) postulierten einen Zusammenhang der Membranlipidzusammensetzung mit der Antibiotikabiosynthese. Die Fettsäurereste der Friulimicine sind auch verzweigte, ungeradkettige Fettsäuren und werden daher vermutlich auf ähnliche Weise synthetisiert.

Die Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren zum Nährmedium kann aber auch negative Effekte zeigen. In höheren Konzentrationen konnte Valin die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran von *Actinoplanes sp.* ATCC 33076 und damit die Membranfluidität so stark verändern, dass sich dies negativ auf das Wachstum auswirkte (Brunati et al., 2005). Valin begünstigte aber vermutlich nicht nur wegen seiner Funktion als Precursor der Fettsäurebiosynthese die Friulimicin-B-Produktion, sondern verbesserte generell die Synthese aller Lipopeptidantibiotika von *A. friuliensis*, da Valin auch Bestandteil des Peptidkerns ist (Abbildung 2). Bei der Produktion von Teicoplanin in *Actinoplanes teichomyeticus* führte ebenfalls nicht nur

die Zugabe der verzweigt-kettigen Aminosäuren zu einer erhöhten Produktivität, sondern auch die Zugabe der Aminosäure Prolin (Song et al., 2008).

5.3. Prozessführungsstrategien für die Produktion von Friulimicin

Für die Friulimicinproduktion in *A. friuliensis* wurden die gängigsten Prozessführungsstrategien wie Batch-Prozesse, Fed-Batch-Prozesse sowie Perfusionsprozesse untersucht.

Im Batch-Prozess konnten fünf Prozessphasen unterschieden werden (Abbildung 27). Die Friulimicinbiosynthese begann in der dritten Phase und wurde durch Phosphatlimitation im Nährmedium ausgelöst. Einige Stunden nach Phosphatlimitation reduzierte sich jedoch die Friulimicinbiosyntheserate erheblich. Anschließend konnte zudem eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration beobachtet werden. Die Abnahme der Biotrockenmassekonzentration lässt sich neben einem Abbau von intrazellulären Speicherstoffen durch die Lyse von vegetativem Myzel erklären. Diese Zellyse, die durch programmierten Zelltod ausgelöst wird, könnte indirekt auch die Friulimicinbiosyntheserate beeinflusst haben, da bei der Lyse Zuckerphosphate aus der Zellwand frei werden (Tenconi et al., 2012). In geringen Konzentrationen können diese Zuckerphosphate als Signalmoleküle dienen, die die Sekundärmetabolitsynthese und Differenzierung von überlebenden Zellen anregen. In höheren Konzentrationen können jedoch sowohl diese Zuckerphosphate selbst als auch das davon abgespaltene anorganische Phosphat die Sekundärmetabolitbildung hemmen. Eine weitere Ursache für die reduzierte Friulimicinbildungsrate könnte auch die erhöhte Produktion von Phosphatasen sein. Phosphatasen führten während der Limitation von anorganischem Phosphat bei *Streptomyces griseus* zu einer Freisetzung von organisch gebundenem Phosphat, das die Antibiotikabiosynthese inhibierte (Moura et al., 2001, Hege-Treskatis, 1993). Aus den genannten Gründen sollte daher die Zellyse während des Friulimicinproduktionsprozesses vermieden werden.

Um eine Zellyse nach Phosphatlimitation zu verhindern und damit die Friulimicinproduktionsphase zu verlängern, wurden Zufütterungsstrategien für das Substrat Phosphat entwickelt. Da Phosphat die Friulimicinbiosynthese hemmt, wurde Phosphat limitiert zugefüttert. Durch Zufütterung von Phosphat nach Beginn der Friulimicinbiosynthese mit spezifischen Raten von 0,15 und 0,07 mg/g*h konnte die Friulimicinbiosynthese bei gleichzeitigem Wachstum aufrechterhalten werden (Abbildung 29). Bei der Cycloheximidproduktion in *Streptomyces griseus* konnte durch Zufütterung von Phosphat die Biomassekonzentration ebenfalls weiter erhöht werden, die Produktion von Cycloheximid wurde dabei allerdings reduziert (Payne et al., 1987). Eine optimale Rate für die Zufütterung von Phosphat, mit der Wachstum

und hohe Friulimicinproduktionsraten von *A. friuliensis* gleichzeitig möglich waren, konnte nicht bei allen Kultivierungen eingestellt werden. Dies lag zum einen an der sehr niedrigen Hemmkonzentration von Phosphat, dessen Zufütterung bereits bei spezifischen Raten über 0,3 mg/g*h zu einem Einbruch der Friulimicinbiosynthese führte (Abbildung 28), zum anderen konnten die Variationen der Biomassekonzentrationen (Abbildung 15 A) zu Beginn der Zufütterung nicht berücksichtigt und damit die Phosphatfeedrate nicht optimal angepasst werden. Eine alternative Strategie zur limitierten Zufütterung von Phosphat wurde in Kultivierungen mit *Streptomyces lincolnensis* zur Lincomycinproduktion verfolgt (Young et al., 1985). Hier wurde durch Präzipitation von Ammoniummagnesiumphosphat das frei verfügbare Phosphat reduziert. Das Präzipitat diente als schwer zugängliche Phosphatquelle, die keine größeren Konzentrationen von freiem Phosphat absonderte. Durch diese Methode wurde die Lincomycinproduktion erhöht.

Im Vergleich zur Entwicklung von Phosphatzufütterungsstrategien zeigte sich die Entwicklung von Zufütterungsstrategien für Glucose und die Aminosäuren Arginin und Valin als eher nebensächlich für den Friulimicinproduktionsprozess. Sofern Glucose in Konzentrationen von über 5 g/l im Nährmedium vorhanden war, konnte die im vorherigen Kapitel diskutierte Bildung des Nebenprodukts Ammonium aus dem Aminosäurestoffwechsel nicht beobachtet werden. Eine Zufütterung von Glucose, Arginin und Valin während der Kultivierungen von *A. friuliensis* zur Friulimicinproduktion war dennoch sinnvoll, um eine genügend hohe Glucosekonzentration aufrechtzuerhalten und die Konzentrationen der Aminosäuren im Nährmedium möglichst niedrig zu halten. Neben der Reduzierung der Ammoniumbildung durch die Entwicklung von Zufütterungsstrategien könnte ein weiterer Ansatz ein Eingreifen auf molekularbiologischer Ebene sein. Eine Erhöhung der Enzymaktivität oder des Expressionslevels der Glutaminsynthetase, die die Bildung von Glutamin aus Glutamat unter Einbau von Ammonium katalysiert, könnte möglicherweise ebenfalls die Ammoniumausscheidung reduzieren (persönliche Mitteilung Prof. Wohlleben).

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Entwicklung der Zufütterungsstrategien für Phosphat wurde ein Perfusionsprozess zur Friulimicinproduktion entwickelt, der vor allem durch die Ausbildung eines stationären Zustands mit gleichbleibenden Bedingungen Vorteile für die Antibiotikaproduktion bietet (vgl. Kapitel 4.3.3). In der vorliegenden Arbeit war mit den Verdünnungsraten von $D = 0,03$ und $0,05 \text{ h}^{-1}$ Friulimicinproduktion möglich, bei Verdünnungsraten ab $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ fand keine Friulimicinproduktion mehr statt (vgl. Kapitel 4.3.3). Bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Streptomyces olindensis* für die Retamycinproduktion wurde eine maximale Produktivität bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ erreicht (Pamboukian et al., 2004). Für die Produktion von

Actinorhodin durch *Streptomyces coelicolor* in einer kontinuierlichen Kultivierung ohne Zellrückhaltung wurde eine optimale Verdünnungsrate von $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$ festgelegt (Melzoch et al., 1997). Eine optimale Verdünnungsrate für maximale Produktivität konnte für die Friulimicinproduktion in *A. friuliensis* nicht ermittelt werden, da die Zellrückhaltung im Perfusionsprozess nicht optimal funktionierte.

Ein Grund für die Probleme bei der Zellrückhaltung waren die Veränderungen der Morphologie der Myzelpellets während der Kultivierung. Mit zunehmender Kultivierungszeit wurden die Myzelien feiner und die Sedimentationseigenschaften verschlechterten sich. Da für die Funktion des verwendeten Zellrückhaltesystems gute Sedimentationseigenschaften der Myzelpellets entscheidend waren, nahm der Zellrückhaltegrad ab (Abbildung 34). Eine Reduzierung der Pelletgröße konnte auch während Fed-Batch-Kultivierungen von *Streptomyces olindensis* zur Retamycinproduktion mit fortschreitender Kultivierung beobachtet werden (Giudici et al., 2004). Hier wurde ein Zusammenhang zwischen der Pelletgröße und den Scherkräften des Rührers vermutet. Zudem konnte bei der Retamycinproduktion über kontinuierliche Kultivierung eine Abhängigkeit der Morphologie von der Verdünnungsrate beobachtet werden (Pamboukian et al., 2004). Hier nahm der Anteil an großen Myzelpellets mit steigender Verdünnungsrate zu. Dies wurde über eine kürzere Verweilzeit bei steigender Verdünnungsrate begründet. Dementsprechend war die Zeit, in der die Myzelpellets den durch den Rührer bedingten Scherkräften ausgesetzt waren, verkürzt. Um morphologische Veränderungen durch die Scherkräfte des Rührers zu verhindern, wurde die Rührergeschwindigkeit während weiterer Perfusionsprozesse von *A. friuliensis* auf 400 rpm begrenzt (vgl. Kapitel 4.3.3). Diese Maßnahme führte aber, vor allem bei höheren Biomassekonzentrationen, nicht zu einer Verbesserung des Zellrückhaltegrads. Aufgrund der eher geringen spezifischen Sauerstoffaufnahme von *A. friuliensis* von etwa $1 \text{ mmol/g}\cdot\text{h}$ könnten möglicherweise andere Rührer wie Schrägblattrührer oder alternative Bioreaktorsysteme wie Airlift-Reaktoren eingesetzt werden. Diese Systeme ermöglichen Kultivierungen mit reduzierten Leistungseinträgen und könnten daher zu verbesserten Eigenschaften der Myzelpellets für die Zellrückhaltung durch Sedimentation führen.

Eine weitere Möglichkeit, den Zellrückhaltegrad zu erhöhen, wäre die Verwendung von alternativen Zellrückhaltesystemen. Mit dem verwendeten System zur Zellrückhaltung über Sedimentation konnten bei guten Sedimentationseigenschaften der Myzelpellets und bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$, Biotrockenmassekonzentrationen von über 20 g/l im Bioreaktor erreicht werden. Diese Konzentrationen konnten auch bei einer vergleichbaren Verdünnungsrate während eines Perfusionsprozesses mit *Amycolatopsis orientalis* zur

Vancomycinproduktion erreicht werden (McIntyre et al., 1999). Bei diesem Prozess wurde die Zellrückhaltung über einen oszillierenden Membranseparator realisiert. Allerdings war die Zellrückhaltung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten, sehr einfachen Systems zur Zellrückhaltung, stark von der sich verändernde Morphologie von *A. friuliensis* abhängig (vgl. Kapitel 4.3.3). Um eine effizientere Zellrückhaltung bei allen Myzelformen zu gewährleisten, wären vermutlich andere Zellrückhaltesysteme wie Zentrifugen oder akustische Settler besser geeignet (2.3.3). Mikrofiltrationssysteme wurden bereits bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Actinoplanes teichomyeticus* zur Teicoplaninproduktion erfolgreich eingesetzt (Vara et al., 2002). Das Problem der Verblockung der Filtrationsmembran durch Myzelien wurde hier durch ein Gegenstrom-Reinigungssystem verhindert.

Ein Vergleich der Leistungsfähigkeit der drei untersuchten Prozesstypen Batch-, Fed-Batch- und Perfusionsprozess, ist aufgrund der Variabilität unter den einzelnen Prozessen (Abbildung 15) schwierig. Zum Vergleich der einzelnen Prozesstypen untereinander wurden daher die Bereiche angegeben, in denen sich die maximalen Friulimicinkonzentrationen und volumetrischen Produktivitäten bei den durchgeführten Kultivierungen bewegten. Die volumetrischen Produktivitäten des Fed-Batch-Prozesses lagen hierbei, trotz der durch die Phosphatzufütterung verlängerten Friulimicinproduktionsphase (Abbildung 29), unterhalb der Produktivitäten des Batch-Prozesses (Tabelle 11). Beim Vergleich der Friulimicinproduktionsraten verschiedener Fed-Batch-Prozesse unmittelbar nach Phosphatlimitation und vor Beginn der Phosphatzufütterung (Abbildung 28, Abbildung 29), die bis dahin unter gleichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt wurden, fällt auf, dass die Raten starken Schwankungen unterliegen. Diese unterschiedlichen Friulimicinproduktionsraten konnten auch bei den Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Kultivierungen beobachtet werden (Abbildung 15 C) und führten zu unterschiedlichen maximalen Friulimicinkonzentrationen. So werden auch im gezeigten Batch-Prozess (Abbildung 27) trotz verkürzter Friulimicinproduktionsphase ähnlich hohe Friulimicinkonzentrationen erreicht wie im Fed-Batch-Prozess, da im Batch-Prozess die Friulimicinbiosyntheserate unmittelbar nach Phosphatlimitation aus nicht erkennbaren Gründen deutlich höher war. Die starken Schwankungen der Friulimicinbiosyntheseraten unter eigentlich gleichen Prozessbedingungen sind möglicherweise durch die morphologischen Unterschiede der Myzelpellets zu erklären. Wie unter 5.1 diskutiert kann es in den Myzelpellets zu einer unterschiedlichen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung kommen, auf die vermutlich der komplexe Regulationsmechanismus der Friulimicinbiosynthese reagierte. Ein weiterer Grund für die geringen Produktivitäten im Fed-Batch-Prozess könnten zudem die bereits diskutierten unzureichenden Anpassungen der Phosphatfeedrate an die Biomassekonzentration sein.

Im Perfusionsprozess sind die geringen maximalen Friulimicinkonzentrationen (Tabelle 11) im Vergleich zum Batch- und Fed-Batch-Prozess durch die Verdünnung mit Nährmedium bedingt und charakteristisch für diesen Prozesstyp. Die Produktivitäten waren im Perfusionsprozess trotz des teilweise schlechten Zellrückhaltegrads mindestens doppelt so hoch wie während der Batch- und Fed-Batch-Prozesse. Der Perfusionsprozess wurde zur Gewinnung des Glykopeptidantibiotikums Teicoplanin mit *Actinoplanes teichomyceticus* ebenfalls als die beste Strategie erkannt (Vara et al., 2002). Hier wurden kontinuierliche Kultivierungsstrategien mit und ohne Zellrückhaltung miteinander verglichen. Ohne Zellrückhaltung konnten nur sehr geringe Verdünnungsraten von $D = 0,062 \text{ h}^{-1}$ ermöglicht werden. Die Teicoplaninkonzentrationen betrug dabei $2,60 \text{ mg/l} \cdot \text{h}$. Durch die Auslegung des kontinuierlichen Prozesses als Perfusionsprozess konnte die volumetrische Produktivität deutlich gesteigert werden. Die Zellrückhaltung wurde dabei über ein Mikrofiltrationssystem gewährleistet. Mit diesem Perfusionsprozess konnten die Verdünnungsraten auf $D = 0,162 \text{ h}^{-1}$ erhöht und eine maximale Produktivität von $8,83 \text{ mg/l} \cdot \text{h}$ erreicht werden.

Tabelle 11: Vergleich der maximalen Friulimicinkonzentrationen und volumetrischen Produktivitäten von verschiedenen Prozesstypen zur Friulimicinproduktion in *A. friuliensis*.

	Batch-Prozess	Fed-Batch-Prozess	Perfusions-Prozess
Maximale Friulimicinkonzentration [mg/l]	150-300	70-250	50-150
Volumetrische Produktivität [mg/l*h]	2-3	1-2	3-5

Eine Aussage über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Prozesstypen war aufgrund der im vorherigen Abschnitt diskutierten Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Phosphatzufütterung im Fed-Batch-Prozess und wegen des variierenden Zellrückhaltegrads im Perfusionsprozess nur eingeschränkt möglich. Allerdings konnte das Potential zur weiteren Verbesserung dieser Prozesse bewertet werden. Die Optimierungsmöglichkeiten des Batch-Prozesses beschränken sich im Prinzip auf die Weiterentwicklung des Nährmediums. Beim Fed-Batch-Prozess ist das Potential zur weiteren Erhöhung der volumetrischen Produktivität größer. Diese ist möglicherweise durch eine weitere Optimierung der Phosphatzufütterungsstrategie zu erreichen. In diesem Fall würde vermutlich der Einsatz einer Online-Analytik-Methode zur Bestimmung der Phosphatkonzentration von Vorteil sein, die den Einsatz von erweiterten Regelstrategien ermöglicht. Durch diese erweiterten Regelstrategien könnte eine limitierte Zufütterung des Substrates Phosphat, welches

die Friulimicinbiosynthese bereits in geringen Konzentrationen inhibiert, erreicht werden (vgl. Kapitel 4.4). Der Perfusionsprozess hat aufgrund der Ausbildung eines stationären Zustandes vermutlich das höchste Potential, die Bedingungen zur Friulimicinproduktion im komplex regulierten Aktinomyzeten-Stoffwechsel aufrechtzuerhalten. Dieser Prozesstyp zeigte auch in der vorliegenden Arbeit, trotz der Probleme bei der Zellrückhaltung, die höchsten Produktivitäten (Tabelle 11).

5.4. Online-Prozessanalytik

Der Einsatz von Online-Analytikmethoden lässt die Beobachtung der Kultivierungen in Echtzeit zu und ermöglicht dadurch ein bedarfsgerechtes Eingreifen in das Prozessgeschehen. In der vorliegenden Arbeit wurden Zufütterungsstrategien für die Substrate Phosphat, Glucose, Arginin und Valin entwickelt (vgl. Kapitel 4.3.2). Dabei wurden Kenntnisse über den aktuellen Status der Kultur vorausgesetzt. Der Beginn der Phosphatfütterung erfolgte beispielsweise erst nach Umstellung der Zellen auf die Friulimicinproduktionsphase (vgl. Kapitel 4.3.2). Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase und damit einhergehend der Beginn der Friulimicinproduktionsphase waren in Kultivierungen von *A. friuliensis* mit einem Absinken der respiratorischen Aktivität verbunden. Die Umstellung des Stoffwechsels konnte über einen Anstieg des gelösten Sauerstoffs pO_2 und durch eine Reduzierung der Sauerstoffaufnahme OUR sowie der Kohlenstoffdioxidbildungsrate CER während des Prozesses beobachtet werden (Abbildung 35). Während der Produktion von Clavulansäure mit *Streptomyces clavuligerus* konnte der Antibiotikastart ebenfalls über die respiratorischen Parameter beobachtet werden. Der Beginn der Clavulansäurebiosynthese war mit Erreichen der maximalen Sauerstoffaufnahme OUR assoziiert (Rosa et al., 2005).

Eine weitere Möglichkeit, das Wachstumsverhalten von *A. friuliensis* online zu erfassen, war durch die Impedanzspektroskopie (2.3.1) möglich. Diese Methode hat den Vorteil, dass nur intakte Zellen bestimmt werden und die Messwerte in sehr kleinen Zeitabständen geliefert werden. Da die Messung zur Bestimmung der Biomassekonzentration über Impedanzspektroskopie bisher nur für einzellig wachsende Bakterien und Hefen etabliert wurde, wurde eine optimale Messfrequenz zur Bestimmung der myzelartigen Biomasse von *A. friuliensis* durch die Auswertung des Frequenzscans von 300-9000 kHz bestimmt. Das Messsignal der Impedanzspektroskopie bei einer Frequenz von 300 kHz korrelierte dabei am besten mit der Biotrockenmassekonzentration von *A. friuliensis* (Abbildung 36). Bei Bestimmungen der Biomassekonzentration über Impedanzspektroskopie während Kultivierungen mit dem myzelartig wachsenden *Streptomyces clavuligerus* wurde ebenfalls eine sehr niedrige Frequenz von 400 kHz gewählt (Neves et al., 2000).

Die Impedanzmessungen korrelierten während der Wachstumsphase gut mit der Biotrockenmasse von *A. friuliensis*. In späteren Phasen der Kultivierung divergierten die Messungen allerdings. Diese Abweichungen des Impedanzsignals von der Biotrockenmassebestimmung in späteren Kultivierungsphasen konnten auch bei anderen myzelartig wachsenden Mikroorganismen beobachtet werden (Rønnest et al., 2011, Sarra et al., 1996, Neves et al., 2000). Ein Grund für diese Abweichungen sind wahrscheinlich die unterschiedlichen Methoden zur Biomassebestimmung. Bei der Impedanzspektroskopie werden nur Zellen mit intakter Zellmembran erfasst. Die Größe und Morphologie der Zellen spiegelt sich bei dieser Methode nur teilweise in einer Verschiebung der Messfrequenz wider und wird meistens nicht mitbestimmt. Bei der Biotrockenmassebestimmung hingegen werden sowohl intakte Zellen als auch Zellbruchstücke erfasst. Zudem werden bei dieser Methode auch Änderungen der Zellgröße durch Ansammlung von Speicherstoffen erfasst. Diese Unterschiede führten vermutlich zu den Abweichungen der Messungen in späteren Kultivierungsphasen, in denen sich zum einen abgestorbene Zellen anreicherten, zum anderen aufgrund von Nährstofflimitation vermehrt Speicherstoffe gebildet wurden. Die Biomassebestimmung über Impedanzspektroskopie war trotz der genannten Abweichungen zur Online-Verfolgung des Wachstumsverlaufs von *A. friuliensis* geeignet. Eine quantitative Bestimmung war mit dieser Methode allerdings nicht möglich, da geeignete Methoden zur Kalibrierung fehlten. Eine Bewertung verschiedener Online-Sensoren zur Biomassebestimmung von myzelartig wachsenden Mikroorganismen zeigte, dass die Impedanzmessung, die wie die Bestimmung des kumulativen CER (Kohlenstoffdioxidbildungsrate) zu den univariablen Sensoren gehört, bessere oder zumindest vergleichbar gute Vorhersagen der Biomassekonzentration treffen kann wie die aufwendigeren multivariaten Online-Sensoren, zu denen die Multiwellenlängenfluoreszenz-Spektroskopie oder die multivariable Modellierung mit klassischen Monitordaten gehören (Rønnest et al., 2011).

Der Einsatz der Impedanzspektroskopie zur Biomassebestimmung von *A. friuliensis* könnte zur Verbesserung von Prozessführungsstrategien beitragen. Die Messsignale der Impedanzspektroskopie waren zwar trotz Glättung stark verrauscht (Abbildung 37), prinzipiell könnte diese Methode aber zur Abschätzung der Wachstumsrate während des Prozesses verwendet werden. Daraus könnte sich die Möglichkeit ergeben, die Feedrate des wachstumslimitierenden Substrates Phosphat über eine wachstumsratenabhängige Zufütterung zu regeln. Durch diese erweiterte Zufütterungsstrategie ließen sich vermutlich die bereits diskutierten Probleme bei der Anpassung der Phosphatfeedrate vermeiden.

5.5. Prozessanalytik mit Mittelinfrarotspektroskopie

Die Prozessanalytik mit Mittelinfrarotspektroskopie (AquaSpec-MIR-Analytik) ermöglicht die Analyse aller bekannter Substrate und Metabolite in einer Probe innerhalb weniger Minuten (vgl. Kapitel 2.3.1). Über die AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics, Esslingen) ließen sich fast alle wichtigen Substrate und Produkte während des Kultivierungsprozesses zur Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* abbilden (Abbildung 38). Es zeigte sich, dass aus den Probenspektren der AquaSpec-MIR-Analytik, auch ohne Einsatz von Referenzanalytik, allein durch die Anwendung der PCA-Methode (vgl. Kapitel 2.3.1), der Prozess sowohl qualitativ als auch annähernd quantitativ abgebildet werden konnte. Beim Vergleich der Analysen der AquaSpec-MIR-Analytik mit der Referenzanalytik (Abbildung 38) konnte beobachtet werden, dass die Konzentrationen der AquaSpec-MIR-Analytik zu späten Kultivierungszeitpunkten über denen der Referenzanalytik lagen. Diese Überbestimmung der Konzentrationen liegt meistens an einer ungenauen Vorhersage über das chemometrische Modell. Bei der Analyse des Gesamtspektrums einer Kultivierungsprobe bleiben immer Teile eines Spektrums übrig, die sogenannten Residuen, für die noch keine Zuordnung im chemometrischen Modell stattgefunden hat. Die Werte, die diese Residuen beschreiben, waren für die Analysen des Friulimicinproduktionsprozesses hoch. Je höher diese Werte sind, umso weniger gut können die Fermentationsspektren mit den berücksichtigten Datenbankspektren beschrieben werden und desto unsicherer ist die Richtigkeit der Analysenwerte. Vermutlich wurden während der Kultivierung von *A. friuliensis* weitere Nebenprodukte gebildet, die sich mit fortschreitender Kultivierungszeit akkumulierten und noch nicht bei der Auswertung anhand des chemometrischen Modells berücksichtigt wurden.

Eine Komponente, die nicht ausreichend über die AquaSpec-MIR-Analytik bestimmt werden konnte, war Friulimicin B. Die Konzentrationen von Friulimicin B lagen bei der AquaSpec-MIR-Analytik etwa 5-fach über denen der HPLC-Messungen (Abbildung 38 G). *A. friuliensis* bildet verschiedene Lipopeptidantibiotika-Typen, die sich nur in der extrazyklischen Aminosäure des Peptidkerns sowie im Fettsäurerest unterscheiden (Abbildung 2). Da zur Erstellung der Spektrendatenbank sowie für die Analytik über HPLC nur die Komponente Friulimicin B zur Verfügung stand und die Gewinnung der einzelnen Lipopeptide als Reinsubstanzen sehr aufwendig ist, konnten die Spektren der anderen Lipopeptidtypen nicht in das chemometrische Modell aufgenommen werden. Die höher vorhergesagten Konzentrationen von Friulimicin B lassen sich vermutlich dadurch erklären, dass anhand der AquaSpec-MIR-Analytik die Summe aller gebildeten Lipopeptide vorhergesagt wurde.

Mit der AquaSpec-MIR-Analytik konnten neben der Bestimmung der Hauptbestandteile des Nährmediums auch Nährmedienkomponenten wie Vitamine, die in geringeren Konzentrationen vorkommen, bestimmt werden. In der Regel werden solche, oft aufwendigen Analysen in niedrigen Konzentrationsbereichen nicht durchgeführt. Die AquaSpec-MIR-Analytik stellte aber eine sehr sensitive Analysemethode dar, die eine relativ wenig aufwendige Analyse dieser Bestandteile erlaubte. Während der Anpassung des chemisch definierten Nährmediums konnte mittels der AquaSpec-MIR-Analytik gezeigt werden, dass das Vitamin myo-Inositol aus der eingesetzten Vitaminlösung (Tabelle 2) vermutlich von *A. friuliensis* als Kohlenstoffquelle verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Myo-Inositol wurde daher aus der Vitaminlösung für die Friulimicinproduktion entfernt. Die verwendete Vitaminlösung (Gonzalez et al., 2003) wurde ursprünglich für Hefen ausgelegt und enthält daher eine relativ hohe Konzentration von myo-Inositol.

Neben der Bestimmung der Nährmedienkomponenten konnten anhand der AquaSpec-MIR-Analytik auch eine Reihe von Nebenprodukten analysiert werden. Dabei wurden alle Komponenten berücksichtigt, für die vorher Referenzspektren aufgenommen wurden. Zu diesen Komponenten gehörte unter anderem Trehalose. Trehalose ist ein nicht-reduzierendes Disaccharid, aufgebaut aus zwei α,α' -1,1-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Die Bildung von Trehalose konnte nach Abschluss der exponentiellen Wachstumsphase von *A. friuliensis* in Konzentrationen von bis zu etwa 5 g/l nachgewiesen werden (Abbildung 39 A). In glucoselimitierten Kultivierungen konnte zudem beobachtet werden, dass die Bildungsrate des Speicherstoffs Trehalose im Nährmedium abnimmt (Daten nicht gezeigt). Die Bildung von Trehalose wurde zwar nicht über Referenzanalytik nachgewiesen, im Genom von *A. friuliensis* wurden aber Gene des Trehalosestoffwechsels identifiziert, darunter ein Gen, das zur Trehalosesynthese TreS homolog ist. Zudem konnte eine verstärkte Transkription der Trehalosegene während Transkriptionsanalysen beobachtet werden (Cebitec, Bielefeld). Trehalosebildung wurde in *Streptomyces griseus* im Zusammenhang mit der Sporenbildung beschrieben (McBridet et al., 1987). Kultivierungen unter Stickstoff- oder Phosphatlimitation führten dabei zu einer erhöhten Konzentration an Trehalose in den Sporen. Dort wird Trehalose als Osmoprotektant bei Hitze- und Trocknungsstress vermutet. Trehalosebildung wurde zudem bei vielen anderen Aktinomyzeten im Zusammenhang mit der Differenzierung beschrieben. In *Micromonospora echinospora* wurde die Bildung von Trehalose in der Wachstumsphase beobachtet, während der sie sich in Mengen von bis zu 5 % der Biotrockenmasse anreicherte und vermutlich als Speicherstoff diente (Hoskisson et al., 2001).

Weitere Nebenprodukte, deren Bildung durch die Analyse von Kultivierungsproben mit AquaSpec-MIR-Analytik gezeigt werden konnte, waren die Friulimicin-Precursoren Pipecolinsäure und 2,3-Diaminobuttersäure (Abbildung 24), die während der Friulimicinbiosynthese ausgeschieden wurden (Abbildung 39 C). Die Gene für diese ungewöhnlichen Aminosäuren sind im Friulimicincluster codiert (Abbildung 3) und werden daher wahrscheinlich ausschließlich zur Synthese von Friulimicin verwendet. Zusammen mit der Tatsache, dass die Zugabe von Precursor-Aminosäuren für den Friulimicin-Peptidkern während Kultivierungen im Bioreaktor keinen Einfluss auf die Friulimicinbiosynthese hatte (vgl. Kapitel 4.2.4), könnte dies auf einen Engpass der Friulimicinbiosynthese während der nichtribosomalen Peptidsynthese (NRPS) hinweisen (persönliche Mitteilung J. Schmid, Insilico Biotechnology). Die Bestimmung von weiteren Friulimicin-Precursoren für Friulimicin in Kultivierungsproben von *A. friuliensis* könnte diesen möglichen Engpass in der Friulimicinbiosynthese bekräftigen.

Die Zugabe von Lauge zur Regelung des pH-Wertes während Kultivierungen von *A. friuliensis* (Abbildung 19) lässt sich ebenfalls durch die Bildung von Nebenprodukten erklären, die durch den Einsatz der AquaSpec-MIR-Analytik bestimmt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass während Kultivierungen von *A. friuliensis* organische Säuren, hauptsächlich Acetat aber auch Propionat, α -Ketoglutarinsäure und Formiat (Abbildung 39 B), die den pH-Wert des Kulturmediums reduzieren und eine Dosierung von Lauge erfordern, gebildet werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von Madden et al. (1996) beschriebenen Ausscheidung von organischen Säuren in das Kulturmedium bei Kultivierungen mit *Streptomyces lividans*. Durch Markierungsexperimente konnte hier gezeigt werden, dass der Kohlenstoff für die Bildung von organischen Säuren aus schnell verwertbaren Kohlenhydraten wie Glucose oder aber auch aus Aminosäuren entstehen kann. In vielen Mikroorganismen führten auch hohe C:N-Verhältnisse im Nährmedium zur Exkretion von organischen Metaboliten (Naeimpoor et al., 2000). Überschüssiger Kohlenstoff, der unter diesen Bedingungen nicht zu CO₂ oxidiert und aufgrund von Stickstoffmangel nicht zur Proteinbildung verwendet werden konnte, wurde dabei in Form von organischen Säuren ausgeschieden. Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen wäre denkbar, dass *A. friuliensis* organische Säuren aufgrund von Phosphatmangel bildete. Dafür spricht auch die verstärkte Bildung der organischen Säuren nach Phosphatlimitation im Nährmedium (Abbildung 39 B). Eine weitere Beobachtung, die im Zusammenhang mit der Bildung organischer Säuren gemacht wurde, war eine reduzierte Ausscheidung von α -Ketoglutarinsäure durch *A. friuliensis* bei niedrigeren Glucosekonzentrationen (Abbildung 39 B und D). α -Ketoglutarinsäure kann während des Argininkatabolismus entstehen (Cunin et al., 1987). Beim Abbau wird Arginin über Ornithin zu Glutamat umgesetzt, das weiter zu

α -Ketoglutar säure abgebaut werden kann. Diese Beobachtung bekräftigt die These, dass die Aminosäuren Arginin, wie bereits diskutiert, als alternative Kohlenstoffquelle verwendet werden kann. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Kultivierung von *Streptomyces pristinaespiralis* mit Valin als Stickstoffquelle gemacht werden (Voelker et al., 2001). Hier wurde die Ausschleusung von 2-Ketoisovalerat beobachtet, wenn Valin als Stickstoffquelle und nicht als Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Die organische Säure 2-Ketoisovalerat entsteht bei der Abspaltung der Aminogruppe von Valin.

Aufgrund des hohen Informationsgehalts bot die AquaSpec-MIR-Analytik die Möglichkeit, den Friulimicinprozess sehr detailliert abzubilden und trug deshalb zur Verbesserung des Prozessverständnisses bei. Zudem konnte durch den Einsatz der AquaSpec-MIR-Analytik die Genauigkeit der Vorhersagen bei den Stoffflussanalysen (vgl. Kapitel 4.5) erhöht werden, da es durch die einfache Analytik von Nebenprodukten möglich war, weitere Metabolite in die Elementbilanzen der Stoffwechselmodelle von *A. friuliensis* aufzunehmen und diese zu schließen. Prinzipiell hat die AquaSpec-MIR-Analytik auch das Potential, als Online-Analytikmethode eingesetzt zu werden, wodurch sich neue Möglichkeiten hinsichtlich Prozessanalytik und Prozessautomatisierung ergeben können. Bei einer Kultivierung mit Bäckerhefe zur Bestimmung von Glucose und Ethanol wurde die MIR-Spektroskopie bereits als Online-Messmethode eingesetzt (Mazarevica et al., 2004). In Form einer Online-Analytikmethode könnte die AquaSpec-MIR-Analytik aufgrund ihrer hohen Genauigkeit eventuell für die limitierte Zufütterung des für die Friulimicinbiosynthese kritischen Substrates Phosphat (vgl. Kapitel 4.2.1.) eingesetzt werden.

5.6. Stoffwechselmodell zur Beschreibung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis*

Bei der Prozessoptimierung muss ein komplexes Zusammenspiel von vielen Parametern beachtet werden. Vor allem in späteren Entwicklungsschritten der Prozessoptimierung entstehen hochkomplexe, kombinatorische Probleme, die nicht mehr intuitiv gelöst werden können. Stoffwechselmodelle können in diesem Fall zu einem besseren Prozessverständnis beitragen und Hinweise für die Prozessoptimierung geben. Diese Stoffwechselmodelle stellen die Zelle als Netz von vielen Reaktionsgleichungen dar (vgl. Kapitel 2.3.5). Durch die Integration von Prozessdaten wie metabolische Daten und Zufütterungsraten in diese Modelle können Stoffflussanalysen zur Quantifizierung zellulärer Prozesse durchgeführt werden. Dadurch können Zusammenhänge gewichtet und objektiviert werden. Für die Verbesserung eines Antibiotikaproduktionsprozesses für das Glykopeptidantibiotikum Balhimycin in *Amycolatopsis balhimycina* wurde bereits ein

genomüberspannendes, metabolisches Netzwerkmodell erfolgreich eingesetzt (Vongsangnak et al., 2012). In diesem Modell wurden durch Stoffflussanalysen mit simulierten Gendelektionen Reaktionswege und die zugehörigen Gene, die durch einen Knockout die Balhimycinproduktion erhöhen könnten, gefunden.

Mit einem genombasiertem Stoffwechselmodell für die Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* (Insilico Biotechnology, Stuttgart) konnte auch die Biosynthese von Friulimicin beschrieben werden (vgl. Kapitel 7.4). Allerdings konnten in diesem Modell nur die Bilanzen für Kohlenstoff und Stickstoff aufgestellt werden. Eine Bilanz für Phosphat konnte nicht aufgestellt werden, da die Stoffflüsse von Phosphat während der Friulimicinbiosynthese sehr gering waren. Erschwert wurde die Beschreibung der Phosphatstoffflüsse auch durch die komplexe Regulation des Phosphatmetabolismus in Aktinomyzeten (Martín et al., 2011). Phosphathaltige Metabolite können unter limitierten Bedingungen umgebaut oder ihre Synthese kann soweit wie möglich vermieden werden. So können beispielsweise Phospholipide der Zellmembran gegen Membranlipide ohne Phosphatrest ausgetauscht werden. Dieses Programm verwendet die Zelle unter phosphatlimitierten Bedingungen, um phosphathaltige Substrate einzusparen. Des Weiteren wurde die Beschreibung der Phosphatstoffflüsse erschwert, da die genaue Biomassezusammensetzung von *A. friuliensis* nicht bekannt war und für das Stoffwechselmodell die Biomassezusammensetzung von *Streptomyces sp.* zugrunde gelegt wurde. Um die oben genannten Veränderungen der Zellzusammensetzung beschreiben zu können, müsste eine genaue stöchiometrische Zusammensetzung der Biomasse von *A. friuliensis* für phosphatreiche und phosphatlimitierte Bedingungen bekannt sein.

Zur Charakterisierung des Friulimicin-Produktionsprozesses in *A. friuliensis* wurden anhand des Stoffwechselmodells die maximalen theoretischen Ausbeuten Y_{\max} für Friulimicin und die Biomasse ermittelt. Sie lagen bei je 0,64 g/g bezogen auf das Substrat Glucose. Die ähnlichen Ausbeuten für die Biomasse und Friulimicin können vermutlich dadurch begründet werden, dass beide einen hohen Anteil an Peptiden besitzen und daher ähnliche Precursoren haben. Dementsprechend konnte in Hochproduzentenstämmen zur Penicillinproduktion gezeigt werden, dass der Fluss der Precursor-metabolite für die Antibiotikabiosynthese ähnlich zu dem der Biomassesynthese ist (Rokem et al., 2007). Von den ähnlichen Ausbeuten abgesehen, liegen die experimentell zu ermittelnden Ausbeuten für die Biomasse und Friulimicin deutlich unter den maximalen theoretischen Ausbeuten. Die geringe Friulimicinausbeute im Vergleich zum theoretischen Maximum liegt vermutlich darin begründet, dass der Friulimicinbiosyntheseweg nicht für einen hohen Stofffluss ausgelegt ist. Bei Antibiotikabiosynthesen sind die Stoffflüsse häufig gering, da Antibiotika schon in geringen Mengen wirksam sind und einen Wachstumsvorteil bringen (vgl. Kapitel 2.1). Um näher an das maximale Synthesepotenzial der Zellen

heranzukommen, müssten zunächst Maßnahmen für eine Stammverbesserung getroffen werden. Ein weiterer Grund für die geringeren tatsächlichen Ausbeuten könnte das Anpassungsverhalten von Mikroorganismen an sich ändernde Bedingungen sein. Mikroorganismen passen sich an veränderte Umweltbedingungen an, indem sie einen Kompromiss zwischen optimaler metabolischer Funktion und minimaler Anpassung an diese Bedingungen suchen (Schuetz et al., 2012). Zudem könnte auch die komplexe Regulation der Friulimicinbiosynthese (vgl. Kapitel 2.2.5) zu einer Ausbeutereduzierung führen. Diese Regulationsmechanismen (vgl. Kapitel 4.2.1 und 5.2) sind wahrscheinlich auch der Grund für die gegensätzlichen Abhängigkeiten der Friulimicin- von der Biomasseausbeute (Abbildung 41) sowie der spezifischen Produktivität von der Wachstumsrate (Abbildung 42).

Eine weitere Charakterisierung des Friulimicin-Produktionsprozesses erfolgte über die Abschätzung des Energieaufwands für den Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis*, die ebenfalls über das Stoffwechselmodell erfolgte. Im Vergleich zum Erhaltungsstoffwechsel des verwandten *Corynebacterium glutamicum* und vor allem zu dem des schnell wachsenden Bakteriums *Escherichia coli* war der Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis* in allen Prozessphasen gering ausgeprägt (Abbildung 43). Ein geringer Erhaltungsstoffwechsel ist typisch für Bodenbakterien wie *A. friuliensis* und *C. glutamicum*, da sie meist unter nährstoffarmen Bedingungen leben und so auf einen effizienten Umgang mit Nährstoffen angewiesen sind. Bei den Referenzorganismen war außerdem eine Zunahme des Erhaltungsstoffwechsels bei höheren Wachstumsraten zu beobachten. Im Gegensatz dazu war der Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis* bei höheren Wachstumsraten deutlich geringer als bei niedrigeren (Abbildung 43). Diese geringen Erhaltungsstoffwechselwerte, die in den frühen Prozessphasen auftraten, können möglicherweise durch die geringe Biomassekonzentration in dieser Phase erklärt werden. Durch die Ungenauigkeiten bei der Bestimmung niedriger Biomassekonzentrationen und durch die niedrigen Umsätze an Substraten und Produkten, die ebenfalls durch die geringen Biomassekonzentrationen bedingt waren, konnte die Stoffflussanalyse keine genauen Vorhersagen liefern. In späteren Kultivierungsphasen, die mit geringeren Wachstumsraten verbunden sind, stieg der Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis* jedoch an und erreichte ähnliche Werte wie *C. glutamicum*. Die Zellen benötigen in späteren Prozessphasen vermutlich Energie für Prozesse wie Stressantworten, Detoxifizierung und Aufrechterhaltung der pH-Homöostase, die nicht im Modell abgebildet wurden und in den frühen Prozessphasen noch nicht aktiviert waren. Für eine Stressantwort in diesen späten Kultivierungsphasen könnten möglicherweise die Nährstofflimitation und höhere Zelldichten verantwortlich sein. Diese Änderungen des

Erhaltungsstoffwechsels im Verlauf der Kultivierung konnten auch für *Streptomyces coelicolor* gezeigt werden, bei dem der Energieverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel von den Nährstoffkonzentrationen im Nährmedium abhing (Naeimpoor et al., 2000).

Neben der Charakterisierung von Prozessen können Stoffwechselmodelle auch Hinweise auf Angriffspunkte für genetische Veränderungen zur Verbesserung der Biosynthese geben. Solche Angriffspunkte wie zum Beispiel metabolische Engpässe (Bottlenecks) konnten bei der Stoffflussanalyse der Friulimicinbiosynthese im Wildtyp von *A. friuliensis* nicht eindeutig ermittelt werden. Sie befinden sich aber wahrscheinlich nicht im zentralen Kohlenstoffwechsel, wie es in der Regel erst bei Hochproduzentenstämmen zu erwarten ist, sondern eher im Produktsyntheseweg oder in den Stoffwechselwegen, die für die Versorgung mit ungewöhnlichen Precursoren verantwortlich sind.

Die oben erwähnten Hochproduzentenstämmen werden häufig noch durch iterative Zufalls-Mutagenese und Selektion entwickelt. Bei dieser sehr gut etablierten Technik werden mittels Mutagenen zufällige Mutationen ausgelöst. Aus der dabei entstehenden riesigen Menge an Mutanten werden durch aufwendige Selektionsprozeduren, die auf maximale Produktausbeute zielen, die besten Mutanten ausfindig gemacht (Rowlands, 1984). Bei dieser Technik sind die genauen Veränderungen im Stamm selten bekannt und durch zusätzliche, häufig unnötige Mutationen geprägt. Diese unnötigen Mutationen können sich in der weiteren Stammentwicklung auch als kontraproduktiv herausstellen und müssen dann unter hohem Aufwand gesucht und eliminiert werden. Um diese Nachteile zu umgehen, wird daher immer häufiger das rationale Stammdesign (Metabolic Engineering) eingesetzt. Zur Verbesserung der Produktivität werden dabei durch detaillierte Charakterisierung des Produzentenstammes gezielte Veränderungen durch gerichtete Mutagenese vorgenommen. Diese gerichtete Mutagenese hat den Vorteil, dass der Produzentenstamm nur diejenigen Mutationen in sich trägt, die tatsächlich zur Produktivitätssteigerung beitragen und nicht zusätzliche Veränderungen aufweist, die sich gegebenenfalls negativ auf den Produzentenstamm auswirken. Auch bereits etablierte Hochproduzentenstämmen können durch diese Methode weiter verbessert werden (Olano et al., 2008, Blank et al., 2013).

Für die gezielte Verbesserung der Sekundärmetabolitproduktion in Aktinomyzeten-Stämmen wurden verschiedene genetische Ansätze beschrieben. Ein möglicher Ansatz zur Erhöhung der Antibiotikabiosynthese war die Anwendung des rationalen Proteindesigns bei der Optimierung der nichtribosomalen Peptidsynthese (Planson et al., 2011). Dieser Angriffspunkt könnte möglicherweise auch zur Erhöhung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* beitragen. Ergebnisse zur Nebenproduktbildung deuteten auf einen Engpass bei der nichtribosomalen

Peptidsynthese in *A. friuliensis* hin (vgl. Kapitel 5.5). Als weiterer Ansatz zur Steigerung der Antibiotikaproduktion wurde die Verbesserung der Promotorstärke und die Erhöhung der Anzahl an Genkopien beschrieben, die die Expression ganzer Antibiotikacluster verbesserte (Olano et al., 2008). Neben der Überexpression ganzer Antibiotikacluster führte auch die Überexpression einzelner Strukturgenen eines Biosyntheseweges zu einer verbesserten Produktivität. In *Streptomyces clavuligerus* wurden vier Gene des Clavulansäurebiosynthesewegs überexprimiert, wodurch die Biosynthese um ein Vielfaches erhöht werden konnte (Jnawali et al., 2011). Im Zusammenhang mit der Überexpression einzelner Strukturgene wäre ein weiterer möglicher Ansatzpunkt zur Erhöhung der Friulimicinbiosynthese in *A. friuliensis* die bessere Versorgung der nichtribosomalen Peptidsynthese (NRPS) mit Ca-Pantothenat, das sich als sehr wichtig für die Friulimicinbiosynthese herausstellte (vgl. Kapitel 5.2). Als weitere Möglichkeit für die Stammverbesserung wurde für verschiedene Streptomyzeten-Stämme eine Steigerung der Produktivität durch den Eingriff in die Regulationsmechanismen der Antibiotikabiosynthese in Form von Geninaktivierung oder Überexpression einzelner Regulatorgene, die spezifisch für einen Stoffwechselweg sind, beschrieben (Barrios-Gonzales et al., 2003). In Bezug auf die Verbesserung der Friulimicinbiosynthese könnte durch einen Eingriff in den Regulationsmechanismus von *A. friuliensis* möglicherweise die Sensibilität der Friulimicinbiosynthese bezüglich des inhibierenden Substrats Phosphat reduziert werden. Ein anderer Ansatz zur zielgerichteten Stammverbesserung wurde durch Überexpression von Resistenzgenen verfolgt, die intrazellulär produziertes Antibiotikum aus den Zellen ausschleusen und somit die Eigenresistenz des Produzentenstammes erhöhen (Adrio et al., 2010). Sämtliche dieser gezielten genetischen Veränderungen waren durch herkömmliche rekombinante DNA-Techniken möglich.

Für gezielte genetische Manipulationen an seltenen Aktinomyzeten wie *A. friuliensis* stehen derzeit allerdings kaum geeignete Werkzeuge wie beispielsweise replikative Plasmide oder induzierbare Promotoren zur Verfügung (te Poele E. M. et al., 2008). Eines der wenigen Beispiele für seltene Aktinomyzeten, an denen bereits genetische Eingriffe vorgenommen und Tools entwickelt wurden, ist *Actinoplanes teichomyceticus*. Das Gen *metK* aus diesem Stamm, das für eine S-Adenosyl-L-Methioninsynthetase codiert, wurde in einen integrativen Expressionsvektor hinter den starken konstitutiven *ermE**-Promotor, der durch Konjugation unter anderem in *A. teichomyceticus* transformiert wurde, kloniert (Kim et al., 2011). Dadurch konnte eine Erhöhung der Teicoplaninproduktion erreicht werden. Darüber hinaus wurden zur Steigerung der Teicoplaninproduktion zwei regulatorische Gene des Teicoplaninbiosyntheseclusters manipuliert (Horbal et al., 2012). Genetische Manipulationen an *A. friuliensis* wurden bisher nur erfolgreich mit integrativen

Plasmiden auf Basis des Bakteriophagens $\Phi 31$ durchgeführt (Müller et al., 2007). Die Eigenschaften genetischer Elemente, die für Streptomyzeten gut charakterisiert sind, konnten bislang nicht für die Entwicklung genetischer Werkzeuge für *A. friuliensis* genutzt werden. Auch starke heterologe Promotoren, die für eine vielversprechende Überexpression von Regulatorgenen oder zur Entfernung von Bottlenecks von Bedeutung sind, konnten bisher nicht gefunden werden (Wagner et al., 2009).

Die Entwicklung geeigneter genetischer Werkzeuge und Klonierungsvektoren ist eine Voraussetzung für die gezielte Veränderung seltener Aktinomyzetenstämme wie *A. friuliensis*, da mit diesen eine gezielte Manipulation und Kontrolle von Genen, die in die Sekundärmetabolitproduktion involviert sind, ermöglicht wird. Dadurch wird die effiziente Herstellung von Überexpressionsstämmen vereinfacht, mit denen hohe Produktivitäten erreicht werden. Zu einer erfolgreichen Prozessentwicklung gehört somit die Herstellung von effizienten Produktionsstämmen ebenso wie die Entwicklung von Prozessführungsstrategien.

6. Literaturverzeichnis

- Adrio, J.-L.; Demain, A. L. (2010):** Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng Bugs* 1 (2), S. 116–131.
- Aharonowitz, Y.; Demain, A. L. (1977):** Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* 115 (2), S. 169–173.
- Aretz, W.; Meiwes, J.; Seibert, G.; Vobis, G.; Wink, J. (2000):** Friulimicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 53 (8), S. 807–815.
- Ates, S.; Elibol, M.; Mavituna, F. (1997):** Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* in batch and fed-batch cultures. *Process Biochemistry* 32 (4), S. 273–278.
- Barrios-Gonzales, J.; Fernandez, F.; Tomasini, A. (2003):** Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. *J Biotechnol* 2, S. 322–333.
- Bascaraan, V.; Hardisson, C.; Brana, A. F. (1989):** Regulation of Nitrogen Catabolic Enzymes in *Streptomyces clavuligems*. *Microbiology* 135 (9), S. 2465–2474.
- Beltrametti, F.; Jovetic, S.; Feroggio, M.; Gastaldo, L.; Selva, E.; Marinelli, F. (2004):** Valine influences production and complex composition of glycopeptide antibiotic A40926 in fermentations of *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. *J Antibiot (Tokyo)* 57 (1), S. 37–44.
- Bérdy, J. (2005):** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58 (1), S. 1–26.
- Bibb, M. J. (2005):** Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2), S. 208–215.
- Biener, R.; Steinkämper, A.; Hofmann, J. (2010):** Calorimetric control for high cell density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology* 146 (1-2), S. 45–53.
- Blank, L. M.; Ebert, B. E. (2013):** From measurement to implementation of metabolic fluxes. *Current Opinion in Biotechnology* (24), S. 13–21.

- Borders, D. B.; Leese, R. A.; Jarolmen, H.; Francis, N. D.; Fantini, A. A.; Falla, T. et al. (2007):** Laspartomycin, an acidic lipopeptide antibiotic with a unique peptide core. *J. Nat. Prod* 70 (3), S. 443–446.
- Brunati, M.; Bava, A.; Marinelli, F.; Lancini, G. (2005):** Influence of leucine and valine on ramoplanin production by *Actinoplanes sp.* ATCC 33076. *J Antibiot (Tokyo)* 58 (7), S. 473–478.
- Chang, H. N.; Yoo, I.-K.; Kim, B. S. (1994):** High density cell culture by membrane-based cell recycle. *Biotechnology Advances* 12 (3), S. 467–487.
- Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. (2005):** Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chem. Rev.* 105 (2), S. 633–684.
- Clark, G. J.; Langley, D.; Bushell, M. E. (1995):** Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology* 141, S. 663–669.
- Cunin, R.; Glansdorff, N.; Pierard, A. (1987):** Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* (51).
- Demain, A. L. (1998):** Induction of microbial secondary metabolism. *International microbiology* 1, S. S. 259 - 264.
- Doull, J. L.; Vining, L. C. (1990):** Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (4), S. 449–454.
- Gallo, G.; Alduina, R.; Renzone, G.; Thykaer, J.; Bianco, L.; Eliasson-Lantz, A. et al. (2010):** Differential proteomic analysis highlights metabolic strategies associated with balhimycin production in *Amycolatopsis balhimycina* chemostat cultivations. *Microb. Cell Fact* 9, S. 95.
- Giudici, R.; Pamboukian, C. R.D.; Facciotti, M. C.R. (2004):** Morphologically structured model for antitumoral retamycin production during batch and fed-batch cultivations of *Streptomyces olindensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 86 (4), S. 414–424.
- Gonzalez, R.; Andrews, B. A.; Molitor, J.; Asenjo, J. A. (2003):** Metabolic analysis of the synthesis of high levels of intracellular human SOD in *Saccharomyces cerevisiae* rhSOD 2060 411 SGA122. *Biotechnol. Bioeng* 82 (2), S. 152–169.

-
- Gräfe, Udo (1992):** Biochemie der Antibiotika. Struktur, Biosynthese, Wirkmechanismus. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Gunnarsson, N.; Bruheim, P.; Nielsen, J. (2003):** Production of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* sp. ATCC 39727: influence of medium composition in batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 30 (3), S. 150–156.
- Guo, Z.; Shen, L.; Ji, Z.; Wu, W. (2012):** Enhanced Production of a Novel Cyclic Hexapeptide Antibiotic (NW-G01) by *Streptomyces alboflavus* 313 Using Response Surface Methodology. *Int J Mol Sci* 13 (4), S. 5230–5241.
- Hege-Treskatis, Daniela (1993):** Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycin- und der Juglomycinproduktion des Produzentenstammes *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. Kontinuierliche Fermentationen und Batch-Fermentationen unter Verwendung eines definierten Nährmediums. Dissertation, Aachen: Verlag Shaker.
- Heinzelmann, E.; Berger, S.; Müller, C.; Hartner, T.; Poralla, K.; Wohlleben, W.; Schwartz, D. (2005):** An acyl-CoA dehydrogenase is involved in the formation of the Delta cis3 double bond in the acyl residue of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Microbiology* 151 (6), S. 1963–1974.
- Heydorn, A.; Suhr-Jessen, T.; Nielsen, J. (1999):** Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teichomyceticus*. *J. Antibiot* 52 (1), S. 40–44.
- Hobbs, G. (1989):** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology, New York*.
- Hobbs, G.; Frazer, C. M.; Gardener, D.; Flett, F.; Oliver, S. G. (1990):** Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *Journal of General Microbiology* 136, S. 2291–2296.
- Hopwood, D. A. (1967):** Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol Rev* 31 (4), S. 373–403.
- Hopwood, D. A. (2007):** How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Mol. Microbiol* 63 (4), S. 937–940.

- Horbal, L.; Zaburanny, N.; Ostash, B.; Shulga, S.; Fedorenko, V. (2012):** Manipulating the regulatory genes for teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus*. *World J Microbiol Biotechnol* 28 (5), S. 2095–2100.
- Hoskisson, P. A.; Hobbs, G.; Sharples, G. P. (2001):** Antibiotic production, accumulation of intracellular carbon reserves, and sporulation in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Can. J. Microbiol.* 47 (2), S. 148–152.
- Jnawali, H. N.; Yoo, J. C.; Sohng, J. K. (2011):** Improvement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* by genetic manipulation of structural biosynthesis genes. *Biotechnol. Lett* 33 (6), S. 1221–1226.
- Jovetic, S.; Feroggio, M.; Marinelli, F.; Lancini, G. (2008):** Factors influencing cell fatty acid composition and A40926 antibiotic complex production in *Nonomuraea sp.* ATCC 39727. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 35 (10), S. 1131–1138.
- Jung, H. M.; Kim, S. Y.; Prabhu, P.; Moon, H. J.; Kim, I. W.; Lee, J. K. (2008):** Optimization of culture conditions and scale-up to plant scales for teicoplanin production by *Actinoplanes teichomyceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 80 (1), S. 21–27.
- Kaup, B. A.; 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), S. 491–498.
- Kessler, Waltraud (2008):** Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Ein Lehrbuch. 1. Aufl., Weinheim: WILEY-VCH.
- Kim, D.-Y.; Hwang, Y.-I.; Choi, S.-U. (2011):** Cloning of *metK* from *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 and effect of its high expression on antibiotic production. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (12), S. 1294–1298.
- Kiviharju, K.; Salonen, K.; Moilanen, U.; Eerikäinen, T. (2008):** Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (7), S. 657–665.
- Kulaev, I. S. (1979):** The biochemistry of inorganic polyphosphates. London: Wiley.

- Lazzarini, A.; Cavaletti, L.; Toppo, G.; Marinelli, F. (2000):** Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78 (3/4), S. 399–405.
- Lebrihi, A.; Lamsaif, D.; Lefebvre, G.; Germain, P. (1992):** Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 37 (3), S. 382–387.
- Lee, S. H. (1997):** Ammonium ion affecting tylosin production by *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 in continuous culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (5), S. 349–352.
- Lima Procópio, R. E. de; da Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L. de; Araújo, J. M. de (2012):** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16 (5), S. 466–471.
- Liu, C.-M.; McDaniel, L.; Schaffner, C. (1975):** Factors Affecting the Production of Candicidin. *Antimicrob Agents Chemother* 7 (2), S. 196–202.
- Liu, G.; Chater, K. F.; Chandra, G.; Niu, G.; Tan, H. (2013):** Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (1), S. 112–143.
- Lounès, A.; Lebrihi, A.; Benslimane, C.; Lefebvre, G.; Germain, P. (1995):** Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can. J. Microbiol* 41 (9), S. 800–808.
- Maiti, S. K.; Singh, K. P.; Lantz, A. E.; Bhushan, M.; Wangikar, P. P. (2010):** Substrate uptake, phosphorus repression, and effect of seed culture on glycopeptide antibiotic production: process model development and experimental validation. *Biotechnol Bioeng* 105 (1), S. 109–120.
- Manteca, A.; Alvarez, R.; Salazar, N.; Yagüe, P.; Sanchez, J. (2008):** Myzelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (12), S. 3877–3886.
- Marques, D.; Cunha, M. N. (2011):** Optimization of Clavulanic Acid Production by *Streptomyces daufpe* 3060 by Response Surface Methodology. *B Journal of Microbiology* (42), S. 658–667.
- Martín, J. F. (2004):** Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* 186 (16), S. 5197–5201.

-
- Martín, J. F.; Demain, A. L. (1980):** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* 44 (2), S. 230–251.
- Martín, J. F.; Sola-Landa, A.; Santos-Beneit, F.; Fernández-Martínez, L. T.; Prieto, C.; Rodríguez-García, A. (2011):** Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol* 4 (2), S. 165–174.
- Mazarevica, G.; Diewok, J.; Baena, J. R.; Rosenberg, E.; Lendl, B. (2004):** On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc* 58 (7), S. 804–810.
- McBridet, M. J.; Ensign, J. C. (1987):** Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology* 11 (169), S. 4995–5001.
- McIntyre, J. J.; Bunch, A. W.; Bull, A. T. (1999):** Vancomycin production is enhanced in chemostat culture with biomass-recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (5), S. 576–582.
- Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; Jager, V. de; Zakrzewski, P.; Fischbach, M. A. et al. (2011):** antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 39 (Web Server issue), S. W339-46.
- Melzoch, K.; Mattos, M. J. de; Neijssel, O. M. (1997):** Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* 54 (6), S. 577–582.
- Meyer, H. P.; Käppeli, O.; Fiechter, A. (1985):** Growth control in microbial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, S. 299–319.
- Minas, W.; Bailey, J. E.; Duetz, W. (2000):** Streptomycetes in micro-cultures: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78 (3-4), S. 297–305.
- Moura, R. S.; Martín, J. F.; Martín, A. (2001):** Substrate analysis and molecular cloning of the Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 147, S. 1525–1533.

- Müller, C.; Nolden, S.; Gebhardt, P.; Heinzelmann, E.; Lange, C.; Puk, O. et al. (2007):** Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic Friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (3), S. 1028–1037.
- Naeimpoor, F.; Mavituna, F. (2000):** Metabolic flux analysis in *Streptomyces coelicolor* under various nutrient limitations. *Metab. Eng.* 2 (2), S. 140–148.
- Neves, A. A.; Pereira, D. A.; Vieira, L. M.; Menezes, J. C. (2000):** Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *J. Biotechnol.* 84 (1), S. 45–52.
- Neves, A. A.; Vieira, L. M.; Menezes, J. C. (2001):** Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 72 (6), S. 628–633.
- Nolden, S.; Wagner, N.; Biener, R.; Schwartz, D. (2009):** Analysis of RegA, a pathway-specific regulator of the friulimicin biosynthesis in *Actinoplanes friuliensis*. *J Biotechnol* 140 (1-2), S. 99–106.
- Okanishi, M.; Suzuki, K.; Umezawa, H. (1974):** Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol* 80 (2), S. 389–400.
- Olano, C.; Lombo, F.; Mendez, C.; Salas, J. A. (2008):** Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng* 10 (5), S. 281–292.
- Onaka, H.; Mori, Y.; Igarashi, Y.; Furumai, T. (2011):** Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2), S. 400–406.
- Ozergin-Ulgen, K. M.F. (1998):** Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor.
- Pamboukian, C. R.D.; Facciotti, M. C.R. (2004):** Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Process Biochemistry* 12 (39), S. 2249–2255.
- Park, H.-R.; Lee, J.-C.; Hwang, J.-H.; Park, D.-J.; Kim, C.-J. (2009):** Glycerol affects the acyl moieties of teicoplanin components produced by *Actinoplanes teichomyceticus* MSI2210. *Microbiol. Res* 164 (5), S. 588–592.

- Payne, G. F.; Wang, H. Y. (1987):** Phosphate feeding to permit growth while maintaining secondary product synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* (27), S. 572–576.
- Planson, A.-G.; Carbonell, P.; Grigoras, I.; Faulon, J.-L. (2011):** Engineering antibiotic production and overcoming bacterial resistance. *Biotechnol J* 6 (7), S. 812–825.
- Raju, G. K.; Cooney, C. L. (1992):** Fermentation monitoring. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3 (1), S. 40–44.
- Reder-Christ, K.; Falkenstein-Paul, H.; Klocek, G.; Al-Kaddah, S.; Bakowsky, U.; Bendas, G. (2011):** Model membrane approaches to determine the role of calcium for the antimicrobial activity of friulimicin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37 (3), S. 256–260.
- Reid, S. J.; Abratt, V. R. (2005):** Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (3), S. 312–321.
- Reza Fazeli, M.; Cove, J. H.; Baumberg, S. (1995):** Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1), S. 55–61.
- Riesenberg, D.; Schulz, V.; Knorre, W. A.; Pohl, H. D.; Korz, D.; Sanders, E. A. et al. (1991):** High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20 (1), S. 17–27.
- Rigali, S.; Titgemeyer, F.; Barends, S.; Mulder, S.; Thomae, A. W.; Hopwood, D. A.; van Wezel, G. P. (2008):** Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 9 (7), S. 670–675.
- Rokem, J. S.; Lantz, A. E.; Nielsen, J. (2007):** Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* 24 (6), S. 1262–1287.
- Rønneest, N. P.; Stocks, S. M.; Eliasson Lantz, A.; Gernaey, K. V. (2011):** Introducing process analytical technology (PAT) in filamentous cultivation process development: comparison of advanced online sensors for biomass measurement. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (10), S. 1679–1690.
- Rosa, J. C.; Baptista Neto, A.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. (2005):** Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess Biosyst Eng* 27 (2), S. 99–104.

- Roychoudhury, P.; Harvey, L. M.; McNeil, B. (2006):** The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring. *Anal. Chim. Acta* 571 (2), S. 159–166.
- Sanchez, S.; Chavez, A.; Forero, A.; Garcia-Huante, Y.; Romero, A.; Sanchez, M. et al. (2010):** Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo)* 63 (8), S. 442–459.
- Sanchez, S.; Demain, A. L. (2002):** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology* 31, S. 895–906.
- Sarrà, M.; Casas, C.; Poch, M.; Gòdia, F. (1999):** A simple structured model for continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* pellets in a fluidized-bed bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80 (1), S. 39–50.
- Sarra, M.; Ison, A.; Lilly, M. (1996):** The relationship between biomass concentration, determined by a capacitance-based probe, rheology and morphology of *Saccharopolyspora erythraea* cultures. *J Biotechnol* 51, S. 157–165.
- Sarrà, M.; Pérez-Pons, J. A.; Gòdia, F.; Casas Alvero, C. (1998):** Importance of growth form on production of hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* TK21 by fed-batch and continuous fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75 (2-3), S. 235–248.
- Schneider, T.; Gries, K.; Josten, M.; Wiedemann, I.; Pelzer, S.; Labischinski, H.; Sahl, H. G. (2009):** The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (4), S. 1610–1618.
- Schuetz, R.; Zamboni, N.; Mattia Zampieri, M.H.U.S. (2012):** Multidimensional Optimality of Microbial Metabolism. *Science* 336, S. 601–604.
- Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. (2003):** Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J. Bacteriol.* 185 (24), S. 7036–7043.
- Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T. (2008):** β -Hydroxylation of the Aspartyl Residue in the Phytotoxin Syringomycin E: Characterization of Two Candidate Hydroxylases AspH and SyrP in *Pseudomonas syringae*†. *Biochemistry* 47 (43), S. 11310–11320.

- Song, J. M.; Park, J. T.; Lee, H. S.; Kang, J. H.; Kang, D. J. (2008):** Production of teicoplanin from *Actinoplanes teichomyceticus* ID9303 by adding proline. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 (6), S. 1635–1637.
- Sousa, M. F.; Pereira, C. E. (2001):** A Chemically Defined Medium for Production of Actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44 (3), S. 227–231.
- Stackebrandt, E.; Kroppenstedt, R. M. (1987):** Union of the genera *Actinoplanes* couch, *Ampullariella* couch, and *Amorphosporangium* couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Systematic and Applied Microbiology* 9 (1-2), S. 110–114.
- Stackebrandt, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. (1997):** Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (2), S. 479–491.
- Stanbury, Peter F.; Whitaker, Allan (1984):** Principles of fermentation technology. Oxford: Pergamon.
- Storhas, Winfried (2003):** Bioverfahrensentwicklung. Weinheim: WILEY-VCH.
- Strieker, M.; Marahiel, M. A. (2009):** The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *Chembiochem* 10 (4), S. 607–616.
- Tahlan, K.; Ahn, S. K. (2007):** Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 63 (4), S. 951–961.
- Taurino, C.; Frattini, L.; Marccone, G. L.; Gastaldo, L.; Marinelli, F. (2011):** *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microb. Cell Fact* 10, S. 82.
- te Poele E. M.; Bolhuis, H.; Dijkhuizen, L. (2008):** Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94 (1), S. 127–143.
- Technikova-Dobrova, Z.; Damiano, F.; Tredici, S. M.; Vigliotta, G.; Di Summa, R.; Palese, L. et al. (2004):** Design of mineral medium for growth of *Actinomadura* sp. ATCC 39727, producer of the glycopeptide A40926: effects of calcium ions and nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 65 (6), S. 671–677.
- Tenconi, E.; Jourdan, S.; Motte, P.; Virolle, M.-J.; Rigali, S. (2012):** Extracellular sugar phosphates are assimilated by *Streptomyces* in a PhoP-dependent manner. *Antonie van Leeuwenhoek*.

- Theobald, U.; Schimana, J.; Fiedler, H. P. (2000):** Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78 (3-4), S. 307–313.
- Ulber, R.; Frerichs, J.-G.; Beutel, S. (2003):** Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Anal Bioanal Chem* 376 (3), S. 342–348.
- Vaidyanathan, S.; Arnold, S. A.; Matheson, L.; Mohan, P.; McNeil, B.; Harvey, L. M. (2001):** Assessment of near-infrared spectral information for rapid monitoring of bioprocess quality. *Biotechnol. Bioeng.* 74 (5), S. 376–388.
- van Wezel, G. P.; Krabben, P.; Traag, B. A.; Keijser, B. J.F.; Kerste, R.; Vijgenboom, E. et al. (2006):** Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl. Environ. Microbiol* 72 (8), S. 5283–5288.
- Vara, A. G.; Hochkoepple, A.; Nielsen, J.; Villadsen, J. (2002):** Production of teicoplanin by *Actinoplanes teichomyceticus* in continuous fermentation. *Biotechnol Bioeng* 77 (5), S. 589–598.
- Vecht-Lifshitz, S. E.; Magdassi, S.; Braun, S. (1990):** Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* 35 (9), S. 890–896.
- Vertesy, L.; Ehlers, E.; Kogler, H.; Kurz, M.; Meiwes, J.; Seibert, G. et al. (2000):** Friulimicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis inhibiting activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. nov. II. Isolation and structural characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 53 (8), S. 816–827.
- Vobis, G. (1989):** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5: The Actinobacteria, Section 28: Actinoplanetes.
- Voelker, F.; Altaba, S. (2001):** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147 (Pt 9), S. 2447–2459.
- Voisard, D.; Meuwly, F.; Ruffieux, P.-A.; Baer, G.; Kadouri, A. (2003):** Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 82 (7), S. 751–765.
- Vongsangnak, W.; Figueiredo, L. F.; Förster, J.; Weber, T.; Thykaer, J.; Stegmann, E. et al. (2012):** Genome-scale metabolic representation of *Amycolatopsis balhimycina*. *Biotechnol. Bioeng.* 109 (7), S. 1798–1807.

- Wagner, N. (2009):** Regulatorische und biochemische Aspekte der Friulimicinbiosynthese in *Actinoplanes friuliensis*. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Wagner, N.; Osswald, C.; Biener, R.; Schwartz, D. (2009):** Comparative analysis of transcriptional activities of heterologous promoters in the rare actinomycete *Actinoplanes friuliensis*. *J Biotechnol* 142 (3-4), S. 200–204.
- Wang, Y.; Chen, Y.; Shen, Q.; Yin, X. (2011):** Molecular cloning and identification of the laspartomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes*. *Gene* 483 (1-2), S. 11–21.
- Wecke, T.; Zühlke, D.; Mäder, U.; Jordan, S.; Voigt, B.; Pelzer, S. et al. (2009):** Daptomycin versus Friulimicin B: in-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob. Agents Chemother* 53 (4), S. 1619–1623.
- Wentzel, A.; Bruheim, P.; Overby, A.; Jakobsen, O. M.; Sletta, H.; Am Omara, W. et al. (2012):** Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC systems biology* 6 (1), S. 59.
- Williams, P.; Winzer, K.; Chan, W. C.; Camara, M. (2007):** Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362 (1483), S. 1119–1134.
- Yardley, J. E.; Kell, D. B.; Barrett, J.; Davey, C. L. (2000):** On-line, real-time measurements of cellular biomass using dielectric spectroscopy. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 17, S. 3–35.
- Young, M. D.; Kempe, L. L. (1985):** Effects of Phosphate, Glucose and Ammonium on Cell Growth and Lincomycin Production by *Streptomyces lincolnensis* in Chemically Defined Media. *Biotechnology and Bioengineering* 27, S. 327–333.
- Zhang, J. H.; Quigley, N. B.; Gross, D. C. (1997):** Analysis of the syrP gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), S. 2771–2778.
- Zhang, J.; Greasham, R. (1999):** Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, S. 407–421.

Zhang, J.; Marcin, C.; Shifflet, M. A.; Salmon, P.; Brix, T.; Greasham, R. et al. (1996): Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44 (5), S. 568–575.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
D	Verdünnungsrate
Dab	2,3-Diaminobuttersäure
Gly	Glycin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	Ionenchromatographie
IR	Infrarot
lpm	Liter per minute
MeAsp	Methylasparaginsäure
MIR	Mittelinfrarotspektroskopie
NIR	Nahinfrarot
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
Pip	Pipecolinsäure
Pro	Prolin
rpm	Rounds per minute
TSB	Trytic soy broth
Val	Valin
vvm	Vessel volume per minute
OUR	Oxygen uptake rate
CER	Carbon dioxide evolution rate

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Hypothetisches Modell zum Wirkmechanismus von Friulimicin. Vermutlich bildet Friulimicin einen stöchiometrischen Komplex mit Bactoprenolphosphat (C_{55} -P). Das Abfangen dieses zentralen Kohlenhydratcarriers unterbricht das Precursorcycling und blockiert alle Stoffwechselwege, die Bactoprenolphosphat verwenden. Betroffen sind die Synthese der Zellwand-Teichonsäuren (links), des Peptidoglycans (rechts) und der Exopolysaccharide. Der gleichzeitige Eingriff in diese Stoffwechselwege blockiert die Bildung einer intakten Zellhülle in gram-positiven Bakterien. Abbildung: Schneider et al. (2009). 6
- Abbildung 2: Strukturen der von *A. friuliensis* gebildeten Lipopeptidantibiotikatyphen Friulimicin und Amphomycin (A1437). Links: Struktur von Friulimicin B. Die jeweiligen Positionen der Aminosäuren sind nummeriert. Dab: 2,3-Diaminobuttersäure, Pip: Pipecolinsäure, MeAsp: Methylasparaginsäure, Gly: Glycin, Asp: Asparaginsäure, Val: Valin, Pro: Prolin, Asn: Asparagin. Rechts: Übersicht der verschiedenen Lipopeptide mit der jeweiligen exozyklischen Aminosäure an Position 1 und den verschiedenen Fettsäureresten (R). Abbildung: Heinzelmann et al. (2005)..... 7
- Abbildung 3: Organisation des Friulimicinbiosyntheseclusters in *A. friuliensis*. NRPS: nichtribosomale Peptidsynthetase; Aminosäuresynthese: Gene für die Biosynthese der ungewöhnlichen Aminosäuren 2,3-Diaminobuttersäure, Methylasparaginsäure und Pipecolinsäure; Fettsäuresynthese: Gene für die Synthese und Anbindung des Fettsäurerests; Regulation: Gene für Regulationsproteine; Transport/Resistenz: Gene, die vermutlich für Transport und Resistenzmechanismen verantwortlich sind. Abbildung: Nolden et al. (2009)..... 9
- Abbildung 4: Herstellung der Inokula zur Kultivierung von *A. friuliensis*. Die Kultur wurde während der gesamten Inkubationszeit in Kulturkolben auf einem Magnetrührer mit einem Magnetrührstäbchen gerührt..... 27
- Abbildung 5: Fließbild des kontinuierlichen Prozesses mit Zellrückhaltung. Rote gestrichelte Linie: waagenkontrollierte Regelung der Zufütterung mit Feedpumpe; grüne gestrichelte Linie: Regelung

- des Bioreaktorvolumens über das Reaktorgewicht mit Ablaufpumpe; blaue gestrichelte Linie: Regelung des pO_2 -Wertes über Rührergeschwindigkeit, Sauerstoffkonzentration der Zuluft und Begasungsvolumen; graue gestrichelte Linie: Standardregelung von pH-Wert und Temperatur. 32
- Abbildung 6: Myzelpellets von *A. friuliensis* während Kultivierungen im Schüttelkolben mit TSB-Medium unter Standardbedingungen. (A) Rundliche kompakte Myzelpellets, (B) ringförmige Myzelpellets. 42
- Abbildung 7: Morphologische Veränderung des Myzels während der Kultivierung von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem Nährmedium. Das Myzel wurde auf Celluloseacetatfilter aufgesaugt. (A) Feine Myzelien nach 24 h Kultivierung. (B) Bildung von Myzelpellets nach 150 h Kultivierung. (C) Mischung aus Myzelpellets und feinen Myzelien nach 200 h Kultivierung. 44
- Abbildung 8: Einfluss der Spurenelementlösung (Okanishi et al., 1974) auf das Wachstum und die Friulimicinbiosynthese von *A. friuliensis* nach 8d. Die Kultivierungen erfolgten im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium..... 46
- Abbildung 9: Einfluss der Vitaminlösung (Gonzalez et al., 2003, modifiziert) auf das Wachstum von *A. friuliensis* nach 10d. Die Kultivierung wurde im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium in einer Doppelbestimmung durchgeführt. 47
- Abbildung 10: Verlauf der Biomassebildung während Kultivierungen von *A. friuliensis* mit Saccharose oder Glucose als Hauptkohlenstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium..... 48
- Abbildung 11: Abhängigkeit der maximalen Biotrockenmasse von der Dikaliumhydrogenphosphat-Konzentration während Kultivierungen von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium..... 48
- Abbildung 12: Verlauf der Biomassekonzentration (A), des gelösten Sauerstoffs pO_2 (B) und des pH-Werts (C) während fünf Kultivierungen der Vorkultur 1 von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden in TSB-Medium im Senbit-Schüttelkolbensystem durchgeführt. 50

- Abbildung 13: Verlauf der Biomassekonzentration (A), des Gelöstsauerstoffs pO_2 (B) und des pH-Werts (C) während drei Kultivierungen der Vorkultur 2 von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden in chemisch definiertem Vorkulturmedium im Senbit-Schüttelkolbensystem durchgeführt. 52
- Abbildung 14: Streuung der Biotrockenmassekonzentrationen von 11 Vorkulturen 1 nach 4 d und von 14 Vorkulturen 2 nach 3 d Kultivierung. Die Zahlen geben die Biotrockenmassekonzentrationen am Kultivierungsende an. Die rote Markierung gibt die mittlere Biotrockenmasse aller Vorkulturen 1 oder 2 an. 53
- Abbildung 15: Verläufe der Biomassekonzentration (A), der Phosphatkonzentration (B) und der Friulimicinkonzentration (C) von verschiedenen Kultivierungen mit *A. friuliensis* im 4-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. 54
- Abbildung 16: Verlauf der Phosphat- und Friulimicinkonzentrationen während vier Kultivierungen von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem Nährmedium. 55
- Abbildung 17: Verlauf der Biomasse- und Phosphatkonzentration sowie der Friulimicinproduktion während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 4-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Durch die Pfeile sind die Zeitpunkte gekennzeichnet, zu denen anorganisches Phosphat mit einer Endkonzentration von jeweils (A) 100 mg/l und (B) 25 mg/l zugegeben wurde. 56
- Abbildung 18: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Phosphat-, Arginin- und Valinkonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* unter Stickstofflimitation. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit modifiziertem, chemisch definiertem Nährmedium. Friulimicin und das Nebenprodukt Ammonium wurden während dieser Kultivierung nicht gebildet. Die Kohlenstoffquelle Glucose war zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung limitiert. 57
- Abbildung 19: Verlauf von Substrat-, Produkt- und Biomassekonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit den beiden Kohlenhydratquellen Glucose und Saccharose. Die Konzentrationen der Substrate und Produkte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse und des Friulimicins, wurden über die

- AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen) analysiert. Die Säure- und Baseverläufe geben die Dosierung von H_2SO_4 und KOH zur Regelung des pH-Werts auf pH 7,0 an. 58
- Abbildung 20: Vergleich der Biotrockenmassekonzentrationen von *A. friuliensis* mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Referenz), Arginin und Valin nach 10d Kultivierung im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium. Angegeben sind die Mittelwerte der Biotrockenmassekonzentrationen aus einer Doppelbestimmung..... 59
- Abbildung 21: Biotrockenmasse- und Friulimicinkonzentrationen mit Arginin (Referenz) und Ammonium als Stickstoffquellen in Kultivierungen von *A. friuliensis* nach 10d. Die Kultivierungen wurden in einer Doppelbestimmung im Schüttelkolben mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt. 60
- Abbildung 22: Verlauf der Biomasse- und Substratkonzentrationen während einer Kultivierung von *A. friuliensis* mit Ammonium als Hauptstickstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Substrate und Produkte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse und des Friulimicins, wurden über AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen) analysiert. Nach 230 h wurde einmalig Glucose mit einer Endkonzentration von 2 g/l zugegeben (siehe Pfeil). Friulimicin wurde während dieser Kultivierung nicht gebildet..... 61
- Abbildung 23: Einfluss von Ammonium auf die Biomassebildung und die Friulimicinproduktion von *A. friuliensis* nach 10d Kultivierung im Schüttelkolben. Die Kultivierung erfolgte im chemisch definierten Nährmedium mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Ammoniumchlorid. Als Referenz diente das chemisch definierte Nährmedium ohne Zusatz von Ammoniumchlorid. 62
- Abbildung 24: Precursoren für die Biosynthese des Peptidkerns und des Fettsäurerests von Friulimicin B, abgeleitet aus dem genom-basierten Stoffwechselmodell für *A. friuliensis* (Insilico Biotechnology). 63
- Abbildung 25: Friulimicin B- und Biomassekonzentration unter Zusatz verschiedener Aminosäure-Precursoren der Fettsäurebiosynthese. Die Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben für 12d im chemisch definierten Nährmedium. Das Referenzmedium enthielt keine Precursoramino-säuren. 64

- Abbildung 26: Biotrockenmassekonzentration und Friulimicinproduktion von *A. friuliensis* ohne (Referenz) und mit Zusatz von Precursoramino-säuren für den Peptidkern nach 4, 6 und 10d. Die Kultivierungen von *A. friuliensis* erfolgten im chemisch definierten Nährmedium im Schüttelkolben..... 65
- Abbildung 27: Verlauf der Biotrockenmasse-, Friulimicin- und Phosphatkonzentrationen während einer Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* zur Friulimicinproduktion im 4-l-Maßstab. Die Kultivierung wurde mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt. Einzelne Prozessphasen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. 66
- Abbildung 28: Verlauf der Konzentrationen von Substraten und Produkten sowie der Zufütterung von Arginin, Valin, Glucose und Phosphat (A und B) während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im 1,5-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Glucose wurde nach 90 h, Arginin, Valin und Phosphat wurden nach 130 h mit steigenden Feedraten dosiert. Die Feedraten für Valin sind im Diagramm nicht eingezeichnet, sie entsprechen 70 % der Argininfeedrate. (C) Sauerstoffaufnahme-rate (OUR) und Kohlenstoffdioxidemissionsrate (CER). (D) spezifische Substrataufnahmeraten von Glucose und Arginin..... 68
- Abbildung 29: Verlauf der Biomasse-, Friulimicin- und Phosphatkonzentrationen während Fed-Batch-Kultivierungen von *A. friuliensis* mit Zufütterung von Phosphat. Die Kultivierungen A-C erfolgten im 4-l-Maßstab, die Kultivierung D wurde im 1,5-l-Maßstab durchgeführt. Die gestrichelten Linien zeigen die Feedraten von Phosphat an. (A und B) Phosphat-Feedrate: 0,75 mg/l*h und (C und D) Phosphat-Feedrate: 0,375 mg/l*h..... 70
- Abbildung 30: Zellrückhaltung durch Sedimentation der Myzelpellets während einer kontinuierlichen Kultivierung von *A. friuliensis*. (A) Vor der Entnahme der Nährlösung wurden Rührer und Begasung ausgeschaltet, damit die Myzelpellets sedimentieren können. (B und C) Sedimentation der Myzelpellets. (D) Entnahme des zellfreien Überstandes. (E und F) Aufwirbeln der Myzelpellets nachdem Rührer und Begasung wieder eingeschaltet wurden. (Bild: C. Stephan, Hochschule Esslingen). 72

- Abbildung 31: Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung von *A. friuliensis* mit Zellrückhaltung zur Produktion von Friulimicin. (1) PC zur Steuerung der Kultivierung, (2) Feed-Vorlagetank, (3) Feedvorlagepumpe, (4) Feedpumpe, (5) Feedvorlagegefäß auf Kontrollwaage, (6) Bioreaktor auf Kontrollwaage, (7) Erntetank, (8) Erntepumpe. (Bild: C. Stephan, Hochschule Esslingen)..... 73
- Abbildung 32: Benutzeroberfläche des Matlab-Programms zu Steuerung des kontinuierlichen Prozesses. Über das Parameterfeld (links) kann über die Eingabe der Feedrate F die Verdünnungsrate D verändert werden. Die Parameter zum Konstanthalten des Bioreaktorvolumens und die Sedimentationszeit der Myzelpellets können ebenfalls gesetzt werden. Die Verläufe des Gewichts der Feedvorlage und des Bioreaktors sowie die Pumprate der Feedpumpe werden graphisch ausgegeben (rechts). Die einzelnen Regler können separat ein- und ausgeschaltet werden (unten). 74
- Abbildung 33: Kontinuierliche Kultivierung von *A. friuliensis* mit Zellrückhaltung. (A) Verlauf von Biotrockenmasse, Friulimicin B und Phosphat. (B) Verlauf der Sauerstoffaufnahme OUR und Kohlenstoffdioxidbildungsrate CER . Der Einbruch des Abgasanalyse signals nach etwa 200 h ist auf einen technischen Defekt der Abgasanalyse zurückzuführen. Die Phasen mit den Verdünnungsraten $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ sind blau und die mit $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ grün markiert. Die Kultivierung erfolgte im 3-l-Maßstab mit chemisch definiertem Nährmedium. Als Feedlösung wurde ebenfalls das chemisch definierte Nährmedium verwendet. 75
- Abbildung 34: Zellrückhaltung während eines Perfusionsprozesses von *A. friuliensis*..... 76
- Abbildung 35: Respiratorische Parameter und Verlauf der Biotrockenmasse- und Phosphatkonzentrationen sowie der Friulimicinbiosynthese während (A und C) Batch-Kultivierung und (B und D) Fed-Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Der Übergang von der Wachstumsphase zur Friulimicinproduktionsphase ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. 79
- Abbildung 36: Biotrockenmassekonzentration und Frequenzscan der Impedanzspektroskopie während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im Bioreaktor mit chemisch definiertem

- Nährmedium. Die Rohdaten aus der Impedanzspektroskopie wurden über eine exponentielle Glättung bearbeitet..... 80
- Abbildung 37: Verlauf von Biotrockenmassekonzentration, des Impedanzsignals bei 300 kHz und der Kohlenstoffdioxidemissionsrate CER während Kultivierungen von *A. friuliensis*. Die Kultivierungen wurden (A) im Batch-Betrieb, (B) im Fed-Batch-Betrieb und (C) im Perfusionsprozess mit chemisch definiertem Nährmedium durchgeführt. Die Rohdaten der Impedanzspektroskopie wurden über eine exponentielle Glättungsfunktion bearbeitet. Für die Fed-Batch-Kultivierung und den Perfusionsprozess waren keine Abgasanalysedaten verfügbar..... 81
- Abbildung 38: Vergleich der Verläufe für einzelne Substrate (A-F) und Friulimicin (G) während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Rotes Kreissymbol: AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen), graues Kreuzsymbol: Referenzanalytik..... 83
- Abbildung 39: Bildung von Trehalose, Biomasse und Friulimicin (A), ungewöhnlichen Aminosäuren (B), organischen Säuren (C) und Verlauf von Substraten (D) während einer Fed-Batch-Kultivierung von *A. friuliensis* zur Produktion von Friulimicin im chemisch definierten Nährmedium. Die Analytik der Kultivierungsproben erfolgte, mit Ausnahme der Biotrockenmasse, über AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen)..... 84
- Abbildung 40: Vergleich der Verläufe für Ammonium und Acetat während einer Kultivierung von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Rotes Kreissymbol: AquaSpec-MIR-Analytik (micro-biolytics GmbH, Esslingen), graues Kreuzsymbol: Referenzanalytik..... 85
- Abbildung 41: Gegenüberstellung der Biomasse- und Friulimicinausbeuten in Bezug auf die Hauptkohlenstoffquelle Glucose verschiedener Kultivierungen von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Gleiche Symbole kennzeichnen die jeweiligen Zusammenhänge der Ausbeuten aus einer Kultivierung. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart. 87
- Abbildung 42: Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von Friulimicin von der Wachstumsrate in verschiedenen Kultivierungen von

A. friuliensis im chemisch definierten Nährmedium. Gleiche Symbole geben die Produktivitäten aus einer Kultivierung bei verschiedenen Wachstumsraten an. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart. 87

Abbildung 43: Vergleich der Erhaltungsstoffwechsel von *A. friuliensis*, *E. coli* und *C. glutamicum* bei verschiedenen Wachstumsraten. Die unterschiedlichen Symbole zeigen den Erhaltungsstoffwechsel verschiedener Kultivierungen von *A. friuliensis* im chemisch definierten Nährmedium. Die Geraden geben die Änderung des Erhaltungsstoffwechsels mit der Wachstumsrate für *E. coli* (hellgrau) und *C. glutamicum* (dunkelgrau) an. Abbildung: J. Schmid, Insilico Biotechnology, Stuttgart. 88

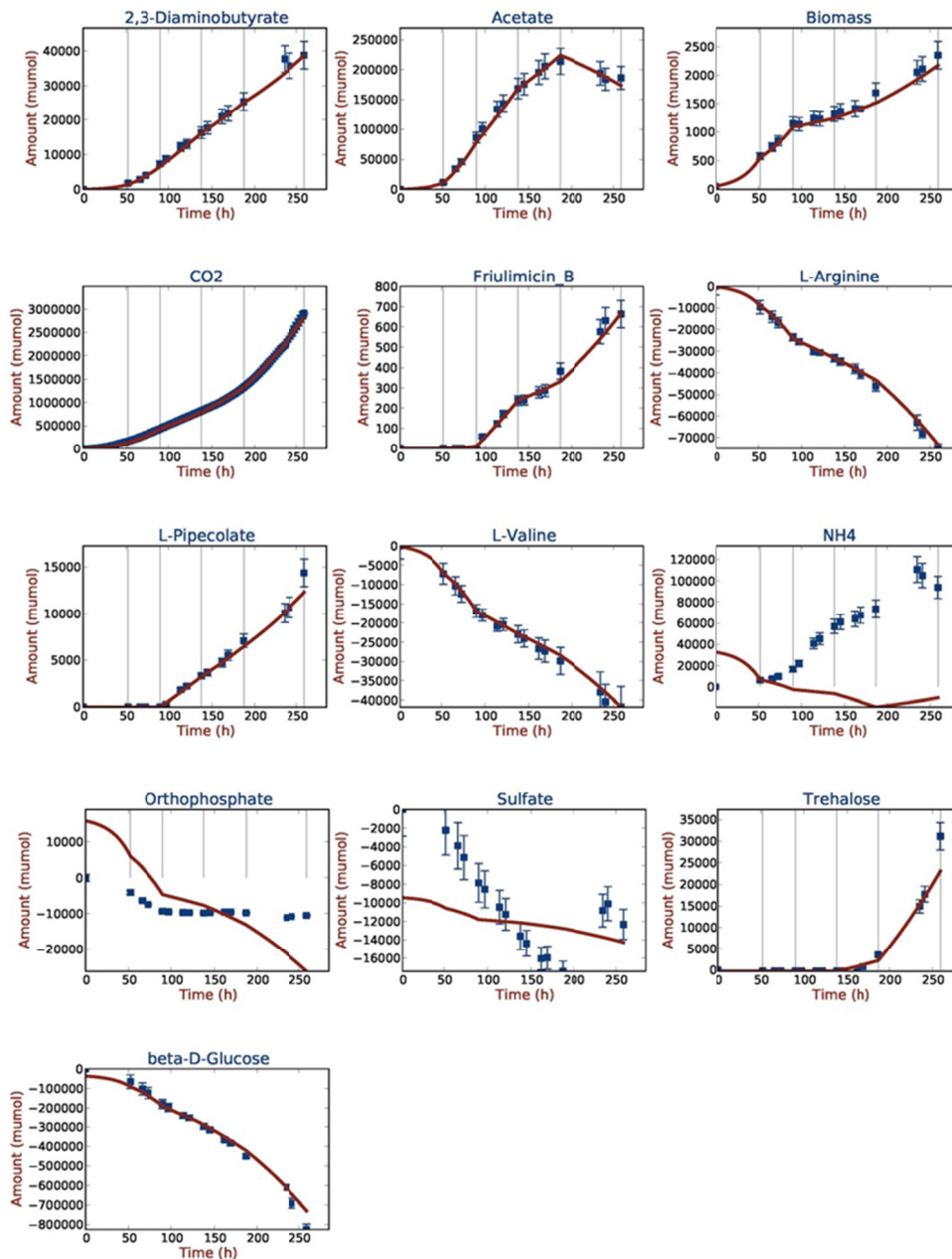
7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bezugsquellen von Nährmedien und Chemikalien, die nicht von der Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen wurden.	24
Tabelle 2:	Nährmedien für die Kultivierung von <i>A. friuliensis</i>	24
Tabelle 3:	Ausstattung des 2,5-l-Bioreaktors	28
Tabelle 4:	Ausstattung des 7,5-l-Bioreaktors	30
Tabelle 5:	Parameter zur Trennung und Detektion von Friulimicin B über HPLC	34
Tabelle 6:	Parameter zur Trennung und Detektion von Aminosäuren über HPLC	36
Tabelle 7:	Parameter zur Trennung und Detektion von Phosphat und Sulfat über IC	37
Tabelle 8:	Lösungen von Reinsubstanzen für die Erstellung einer Spektrendatenbank für die AquaSpec-MIR-Analytik. Alle Reinsubstanzlösungen wurden mit den pH-Werten pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5 angesetzt.	38
Tabelle 9:	Homogenisierungsgrad des Myzels während Kultivierungen im Schüttelkolben mit verschiedenen Nährmedienzusätzen oder physikalischen Einbauten. Die Bewertung erfolgte visuell unter Einstufung in drei Homogenisierungsgrade: o befriedigend, + gut, ++ sehr gut.....	43
Tabelle 10:	Chemisch definiertes Nährmedium für die Biosynthese von Friulimicin in <i>A. friuliensis</i> nach Anpassung der Nährmedienbestandteile und -konzentrationen. Die Konzentrationen einzelner Nährmedienbestandteile variieren für die Herstellung der Vorkultur und für Kultivierungen im Bioreaktor oder im Schüttelkolben.	49
Tabelle 11:	Vergleich der maximalen Friulimicinkonzentrationen und volumetrischen Produktivitäten von verschiedenen Prozesstypen zur Friulimicinproduktion in <i>A. friuliensis</i>	107

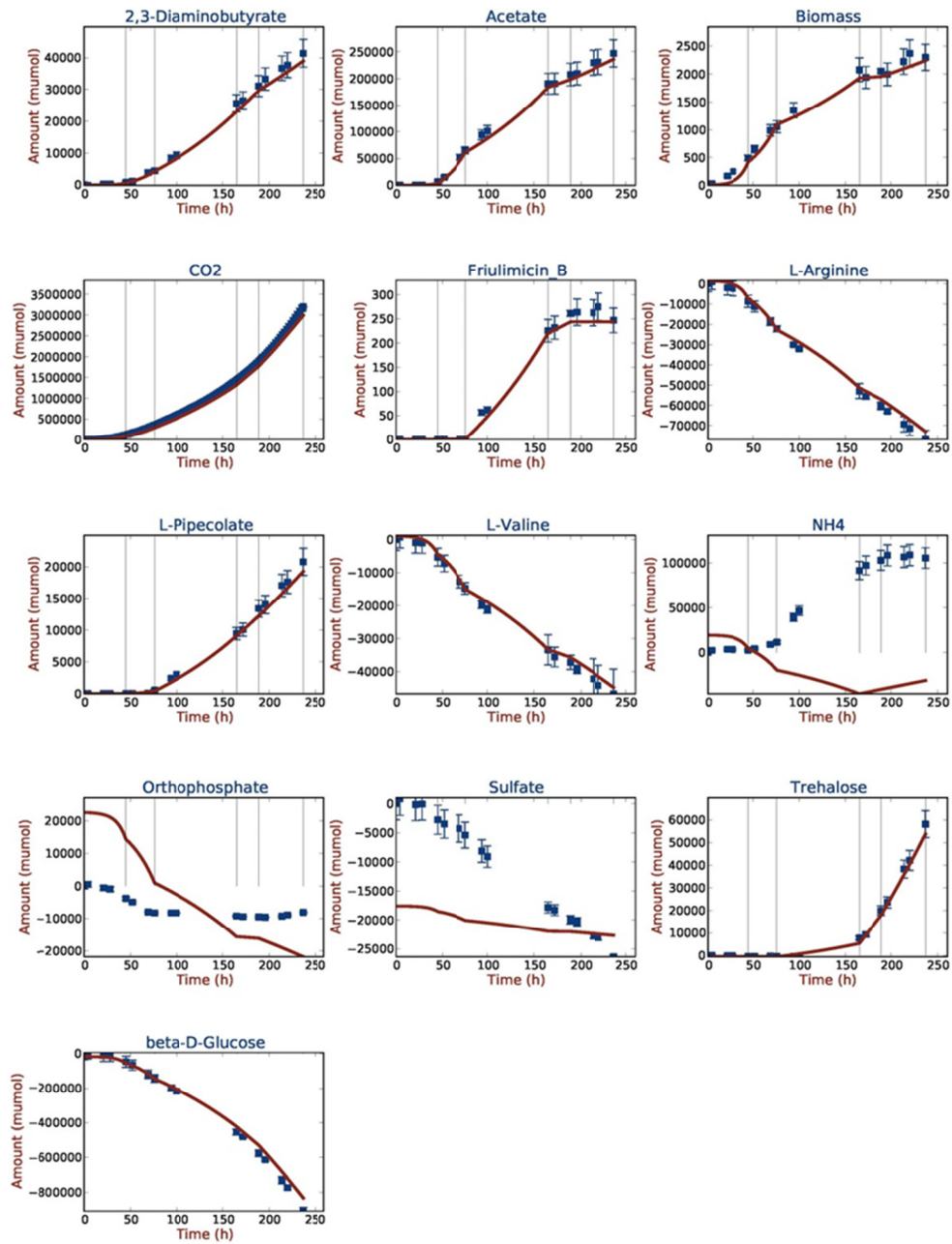
7.4. Genombasiertes Stoffwechselmodell für die Friulimicin-Biosynthese in *A. friuliensis*

Die unten gezeigten Verläufe stellen den Vergleich von experimentellen Kultivierungsdaten ausgewählter Verbrauchs- und Bildungsraten (blaue Quadrate) aus drei unabhängigen Kultivierungen von *A. friuliensis* zur Friulimicinbiosynthese mit den Vorhersagen des genombasierten Stoffwechselmodells (rote Kurven, Insilico Biotechnology, Stuttgart) dar. Die experimentellen Daten stammen aus Fed-Batch-Prozessen im 4-l-Maßstab mit Zufütterung von Phosphat, Arginin, Valin und Glucose (vgl. Kapitel 3.2.6).

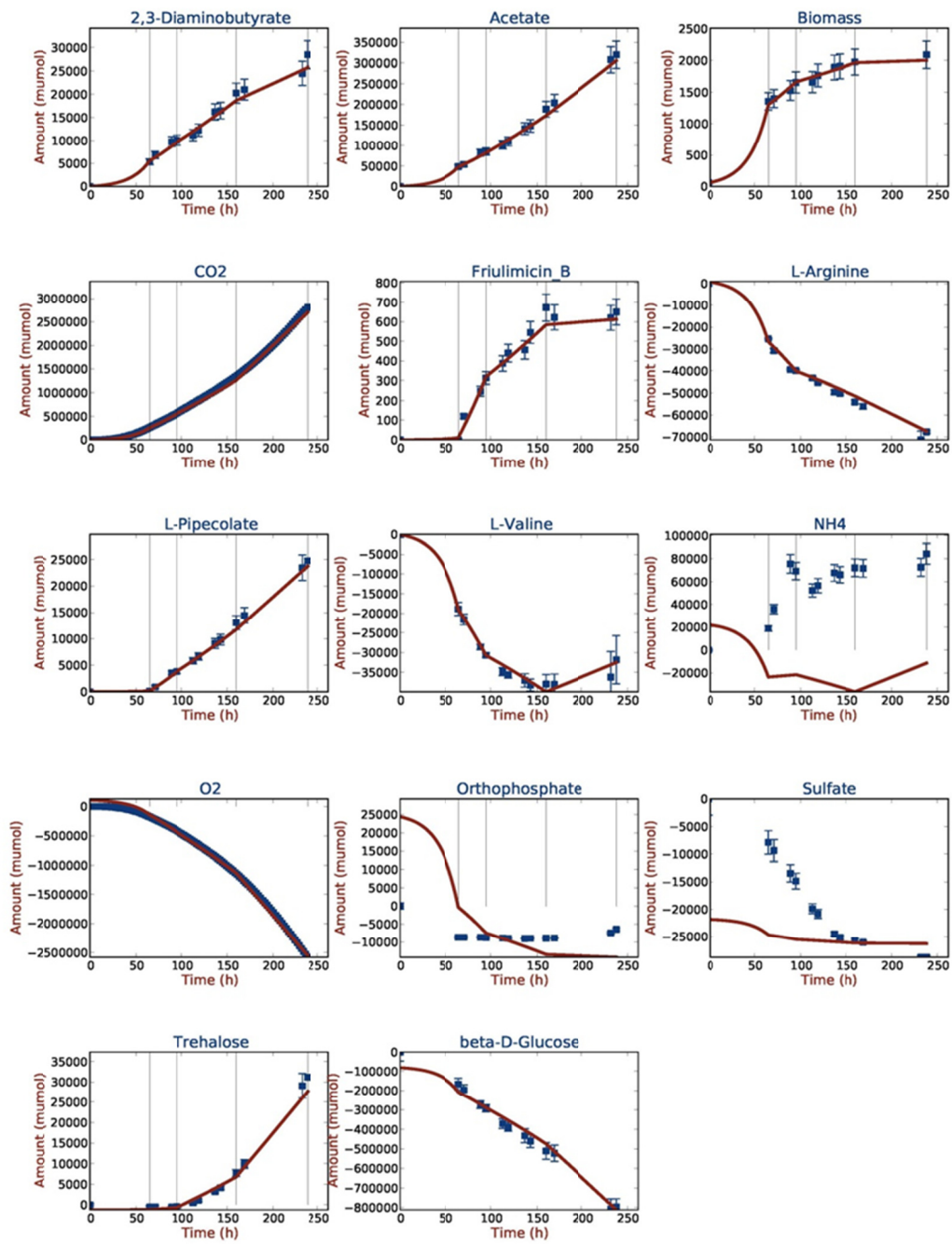
Kultivierung A:



Kultivierung B:



Kultivierung C:



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Hochschule Esslingen in Kooperation mit der Eberhard Karls Universität Tübingen im Rahmen des BMBF geförderten Projekts „Anwendungsorientierte Forschung an nicht-pathogenen Mikroorganismen für Gesundheit, Ernährung und ressourceneffiziente Industrieproduktion“ durchgeführt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Richard Biener für die sehr gute Betreuung an der Hochschule Esslingen und die wertvollen Ideen für meine Arbeit. Außerdem danke ich Herrn Professor Dirk Schwartz für die hilfreiche Unterstützung vor allem bei den molekular- und mikrobiologischen Fragestellungen.

Herrn Professor Wolfgang Wohlleben danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Universität Tübingen, die nur durch seine Kooperationsbereitschaft mit der Hochschule Esslingen möglich war. Ich danke ihm außerdem für die Begutachtung meiner Arbeit und für die Einladungen zur Teilnahme an den Lehrstuhlseminaren.

Bei unserem Projektpartner Insilico Biotechnology möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Joachim Schmid.

Unserem weiteren Projektpartner micro-biolytics danke ich ebenfalls für die hilfreiche Unterstützung bei der Prozessanalytik.

Allen Studenten, die in Form von Projekt- und Abschlussarbeiten an dem Forschungsprojekt beteiligt waren, danke ich sehr für ihre wertvollen Beiträge.

Den Mitarbeitern der Fakultät Angewandte Naturwissenschaften der Hochschule Esslingen danke ich für die Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Abteilung von Herrn Professor Wohlleben der Universität Tübingen für die konstruktive Kritik bei der Vorstellung meiner Arbeitsfortschritte.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht sowie meiner Tante Vera fürs Korrekturlesen.